

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500467

研究課題名(和文) 哺乳類網膜神経節細胞の樹状突起上の抑制性シナプスの分布と視覚情報処理機能との関係

研究課題名(英文) Relationship between dendritic localization of inhibitory synapses and visual information processing in mammalian retinal ganglion cells

研究代表者

小泉 周 (Koizumi, Amane)

生理学研究所・細胞器官研究系・特任教授

研究者番号：10296551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜組織培養法と遺伝子銃によるRGCへの遺伝子導入を、霊長類(マモセット)網膜に応用し、成功させた。とくに、マモセット網膜に対してGFPの遺伝子導入を行い、これまで主として考えられていたMidgetやParasol神経節細胞以外のさまざまな種類の網膜神経節細胞を発見した。また、その神経回路基盤として、シナプス統合過程が、細胞ごとにどのように違うのか、PSD95-GFPの遺伝子導入により明らかとした。これによって、とくにナローソニー神経節細胞が特異的にDB6双極細胞とシナプス結合し、さらに、視床の外側膝状体のK1層に投射している事実を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We successfully applied organotypic adult retina culture system with gene-gun to marmoset retina. Especially, we introduced GFP plasmid into marmoset retinal ganglion cells, and found a morphological diversity of retinal ganglion cells beside well-known midget and parasol ganglion cells. In addition, we introduced PSD95-GFP, synaptic maker, plasmid into retinal ganglion cells and analyzed dendritic localization pattern of synapses in different subtypes of retinal ganglion cells. By this method, we found narrow thorny retinal ganglion cells almost exclusively receive synaptic inputs from DB6 bipolar cells, and project into K1 layer of lateral geniculate nucleus.

研究分野：神経生理学

キーワード：網膜 視覚 組織培養 遺伝子導入 樹状突起

1. 研究開始当初の背景

生体哺乳類網膜の視覚情報処理において、ウサギにおいては、異なる機能を示す 12 種類の網膜神経節細胞 (RGC) があることが知られていたが、げっ歯類や霊長類などの哺乳動物における RGC の形態学的・機能的多様性については、あまり知られていなかった。こうした違いを生み出す基盤として、RGC の樹状突起におけるシナプス統合機構、とくに、興奮性シナプスは一様なのに対して、抑制性シナプスもあわせたシナプス統合過程が重要な働きをしているものと考えられた。

これまで研究代表者らは、世界にさがけ、ウサギを用いて、生体哺乳類の網膜組織培養法に成功した (図 1)。さらに、網膜組織培養に対して、遺伝子銃を用いて、様々な遺伝子 (プラスミド) を遺伝子導入することに成功した。この方法を用いることによって、GFP の遺伝子導入で多くの RGC の形態学的特徴を観察することができるとともに、PSD95-GFP などのシナプス・マーカーの遺伝子導入によって樹状突起におけるシナプスの位置や神経回路基盤の特徴を明らかとすることができる。この方法を、ウサギ以外の哺乳類網膜にも応用することによって、比較的単純と考えられてきた哺乳類網膜における RGC の多様性とその基盤となる神経回路を明らかにするものと考えられた。

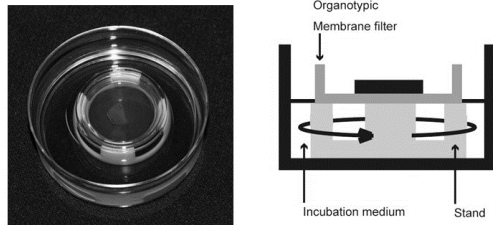


図 1 研究代表者らが開発した網膜組織培養法の模式図

2. 研究の目的

本研究は、生体哺乳類網膜の視覚情報処理において異なる機能を示す 12 種類の RGC のシナプス統合過程の違いを知るため、樹状突起上のシナプスの空間的な分布の特徴を明らかにし、視覚情報処理機能との関係を調べることである。

また、そもそも、ウサギ以外の哺乳類網膜、とくに霊長類網膜において、網膜神経節細胞における形態学的多様性が見られるのか、また、それがどのような神経回路基盤に基づくものかこれまで明らかになっていないことから、特に重点的に霊長類 (マーモセット) 網膜に着目した研究を行った。

3. 研究の方法

研究代表者の開発した生体哺乳類の網膜組織培養法 (Koizumi et al, 2007 など) を用

いて、遺伝子銃によってシナプス・マーカー (プラスミド) 等を遺伝子導入し、樹状突起上のシナプスの位置を可視化して、その分布特性を解析した。

更に、霊長類 (マーモセット) 網膜に対して網膜組織培養法ならびに遺伝子銃による遺伝子導入法を適用し、GFP の遺伝子導入により、RGC の形態を明らかとし、その形態学的多様性を観察した。

4. 研究成果

網膜組織培養法についてはげっ歯類動物とウサギで成功していたが、平成 25 年度は、網膜組織培養法と遺伝子銃による RGC への遺伝子導入を、霊長類 (マーモセット) 網膜に応用し、成功させた。とくに、この方法を用いることにより、マーモセット網膜に対して GFP の遺伝子導入を行い、これまで主として考えられていた Midget や Parasol 神経節細胞以外のさまざまな種類の網膜神経節細胞を発見した。中でも、ウサギですでに発見されている動きを感受することができる方向選択性網膜神経節細胞と形態学的特徴が同じ RGC を発見した。これによって、動きの感受を行っている特殊な RGC が、霊長類網膜に存在することをはじめて明らかとした。霊長類網膜の情報処理は比較的シンプルで単純なものと考えられていたが、これまで知られていたよりも複雑で多様であることが明らかになった (図 2、2013)。

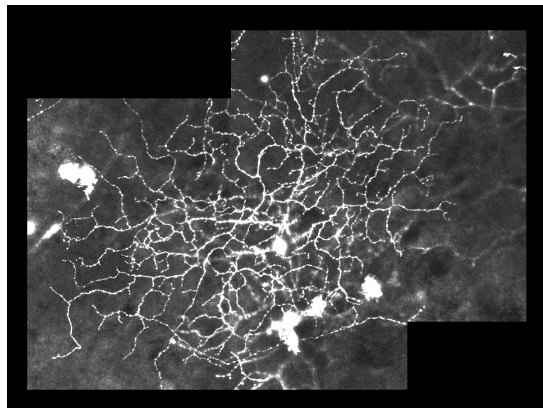


図 2 霊長類 (マーモセット) 網膜で発見された方向選択性網膜神経節細胞と考えられる細胞 (2013)

また、その神経回路基盤として、シナプス統合過程が、細胞ごとにどのように違うのか、シナプス・マーカーである PSD95-GFP の遺伝子導入により明らかとした。これによって、特にナローソニー神経節細胞が特異的に DB6 双極細胞とシナプス結合し、さらに、視床の外側膝状体の K1 層に投射している事実を明らかとした (図 3、2014)。この経路は、第一次視覚野を經由せず動きに関する視覚情報を直接 M T 野に伝える経路であると考えられた。つまり、ブラインドサイトを引き起こす視覚情報を中枢に伝える経路である

と考えられた。

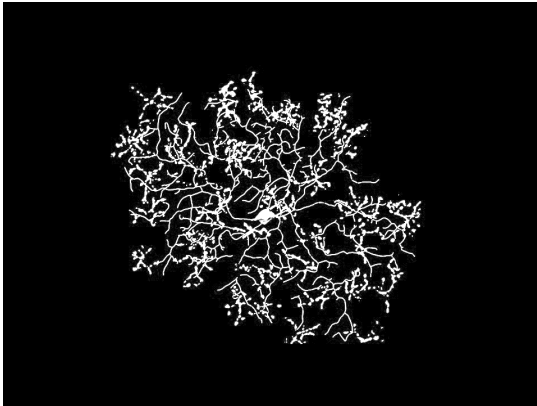


図3 霊長類(マーモセット)網膜でみられるナローソニー神経節細胞(ライン)がDB6双極細胞と結合している様子。

以上、本研究期間中の成果として、ウサギ以外の哺乳動物、特に霊長類(マーモセット)についても生体網膜組織培養に成功したこと、また、シナプス・マーカーの遺伝子導入によって、樹状突起上のシナプス統合過程の一端を明らかにすることができた。また、これまで明らかとなっていたいなかった、霊長類網膜におけるRGCの多様なシナプス統合過程が明らかとなり、その全容について、総説としてまとめた(2015)。霊長類網膜、特にマーモセット網膜においても、網膜神経節細胞には形態学的多様性があり、様々な神経回路基盤に基づくことが明らかになった(図4)。

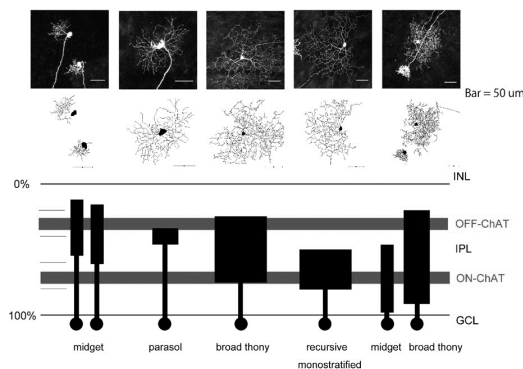


図4 霊長類(マーモセット)網膜でみられた形態学的多様性

なお、ナローソニー神経節細胞のシナプス回路基盤に関する論文は、アメリカ神経科学会誌であるザ・ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス誌の表紙となり、注目論文として紹介された。

また、こうした神経回路基盤の違いによる電気生理学的な反応の差異について、研究を行い、特に、色に関する反応性の違いについ

て、論文としてまとめ投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

小泉周、新世界ザル(マーモセット)網膜における網膜神経節細胞の形態的・機能的多様性、BRAIN and NERVE-神経研究の進歩、査読なし、67(2)、2015、193-198
KA Percival, A Koizumi, RA Masri, P Buzás, PR Martin, U Grünert, Identification of a pathway from the retina to koniocellular layer K1 in the lateral geniculate nucleus of marmoset. The Journal of Neuroscience 査読あり、34(11)、2014、3821-3825
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4491-13.2014
S Moritoh, Y Komatsu, T Yamamori, A Koizumi, Diversity of retinal ganglion cells identified by transient GFP transfection in organotypic tissue culture of adult marmoset monkey retina, 査読あり、PloS one 8(1)、2013、e54667
DOI: 10.1371/journal.pone.0054667

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 周 (Koizumi, Amane)
生理学研究所・細胞器官研究系・特任教授
研究者番号：10296551

(2) 研究分担者

中澤 徹 (Nakazawa, Toru)
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：30361075

(3) 連携研究者

なし