

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200010

研究課題名（和文） 網膜神経節細胞サブタイプ決定機構および regular mosaic 形成機構の  
解明研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms for determination of retinal ganglion cell  
subtype and regular mosaic formation

研究代表者

作田 拓 (SAKUTA HIRAKI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：40343743

研究成果の概要（和文）：

我々は世界に先駆けて2種類の網膜神経節細胞サブタイプを可視化することに成功した。網膜神経節細胞サブタイプ決定機構および regular mosaic 形成機構を解明することを目的として、Single-cell マイクロアレイ法によりサブタイプ特異的遺伝子の同定を試みたが、目的を達することができなかった。しかしながら2つのサブタイプに共通して発現する遺伝子を1つ同定することができた。また、この2種類のサブタイプの電気生理学的性質を明らかにした。さらに、この2種類のサブタイプが異なる経路で副視覚系内側核へ投射することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

For the first time, we succeeded in visualization of two distinct subtypes of retinal ganglion cell. For the purpose of elucidation of mechanisms for determination of retinal ganglion cell subtype and regular mosaic formation, we tried isolation of the subtype-specific genes using single-cell microarray method but failed. However, we succeeded in isolation of a gene which is commonly expressed in these two retinal ganglion cell subtypes. We revealed the electrophysiological property of the two subtypes. Furthermore, we found that these the two subtypes projected to the medial terminal nucleus via different pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：網膜神経節細胞、サブタイプ、モザイク、マイクロアレイ、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

網膜にはニューロンの複雑な回路が含まれており、視覚入力から特徴的な情報を抽出している。光受容細胞からの信号は、網膜内在ニューロンにより処理されて網膜神経節細胞により統合され、網膜神経節細胞の軸索

を介して脳へと送られる。異なる視覚特性、例えば光強度の増加や減少、色、物体の動きなどは、別々のサブタイプの網膜神経節細胞が応答する（光強度の増減の場合は、それぞれ ON 細胞と OFF 細胞が応答）。これらのサブタイプは、形態的な違い等から少なくとも

12 種類に分類される(Masland, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2001; Masland, *Nat. Neurosci.*, 2001)。さらに同一のサブタイプの細胞は、お互いに一定以上の距離を保ち、網膜上に規則正しく配置しており、このような分布パターンは *regular mosaic* と呼ばれ(Rodieck, *Vis. Neurosci.*, 1991; Masland, *Nat. Neurosci.*, 2001)、網膜ばかりではなく脳においても広く観察される分布様式であり、効率よく情報処理を行うために必要なものと考えられている。しかしながら、どのようにして網膜神経節細胞のサブタイプごとに特有の機能を獲得するようになるのか、また網膜上の *regular mosaic* はどのように形成されるのかといった点については、ほとんど分かっていないのが現状である。これは、それぞれのサブタイプを簡便に判別する方法がこれまでになかったためである。我々は世界に先駆けて、サブタイプの1つ(上向きの光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞)に特異的に発現する分子 SPIG1 を発見した(図 1)。

さらに SPIG1-EGFP ノックインマウスを作製し、このマウスの副視覚系内側核を赤色蛍光の逆行性トレーサーでラベルすることにより、上向きばかりではなく下向きの光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞を可視化することに成功した(図 2)。

この成果は世界的に高く評価されており、PLOS ONE 誌に発表した際には「Faculty of 1000 Biology」において「Must read」に選ばれている。このように網膜神経節細胞サブタイプの決定機構や *regular mosaic* 形成機構に関する研究を遂行できるのは、我々のグループだけであると言える。この成果により、このような問題に対して分子生物学的なアプローチが可能となった。

## 2. 研究の目的

SPIG1-EGFP ノックインマウスから 2 種類のサブタイプの細胞を単離し、これらのサブタイプの遺伝子発現プロファイルを Single-cell マイクロアレイ法により明らかにし、サブタイプ特異的に発現する遺伝子を同定する。その後、同定したサブタイプ特異的遺伝子のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作製したり、*in utero* エレクトロポレーションにより網膜に野生型やドミナントネガティブ型を導入したりすることにより、網膜神経節細胞サブタイプ決定機構および *regular mosaic* 形成機構を解明することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

マウス網膜細胞のうち網膜神経節細胞の割合は約 0.5% であり、さらにその約 1% が副視覚系内側核へ投射する上方向および下

方向の光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞である。これらの網膜神経節細胞のサブタイプはほぼ同数であり、前者は SPIG1 陽性、後者は陰性である(図 2)。したがって、上方向および下方向の光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞は、網膜細胞のうち、それぞれわずか約 0.0025% に過ぎない。したがって、マウス網膜が非常に小さいこともあり、それぞれのサブタイプの細胞をセルソーターを用いて単離し、そこから RNA 抽出を行い通常のマイクロアレイ解析を行うことは不可能である。そこで、最近開発された Single-cell マイクロアレイ法(Esumi et al., *Neurosci. Res.*, 2008)を用いることにした。

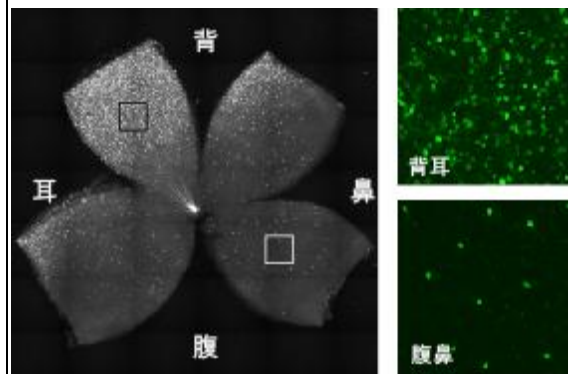


図 1 マウス網膜における SPIG1 陽性細胞の分布

網膜背耳側の領域では SPIG1 陽性網膜神経節細胞が密に存在するが、それ以外の領域では SPIG1 陽性網膜神経節細胞は *regular mosaic* を形成している。

生後 0 日目の SPIG1-EGFP ノックインマウスの副視覚系内側核を赤色蛍光の逆行性トレーサーでラベルした。翌日(生後 1 日目)、網膜を取り出し、SPIG1 が単一のサブタイプで発現していない領域(背耳側)を除去した後(図 1)。パパイン消化により細胞を分散した。前述のように網膜細胞のうち副視覚系内側核へ投射する網膜神経節細胞の割合は非常に少ないので、このままでは単一細胞を単離することは非常に困難である。そこで全網膜神経節細胞のマーカである Thy-1 に対する抗体が結合したマグネティックビーズを用いて、網膜神経節細胞を精製した。これにより副視覚系内側核へ投射する網膜神経節細胞の割合を 0.8% 程度にまで高めることができた。次に精製した網膜神経節細胞を培養ディッシュに撒き、蛍光顕微鏡下で副視覚系内側核投射網膜神経節細胞を、ガラスキャピラリーを用いて 1 細胞ずつ単離した。この際、上方向の光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞は副視覚系内側核へ投射し、SPIG1 を発現しているため黄色の蛍光を

発する。また下方向の光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞は副視覚系内側核へ投射し、SPIG1 を発現していないので赤色の蛍光を発する (図 2)。したがって、色の違いにより 2 つのサブタイプを容易に判別できる。コントロールとして網膜神経節細胞の主要投射先の 1 つである上丘を赤色蛍光の逆行性トレーサーでラベルし、上丘投射網膜神経節細胞を単離した。次に単離した細胞から RNA の抽出・逆転写、PCR による増幅を行い、プローブ作製のための cDNA を合成した。プローブは Affymetrix 社の One-Cycle Target Labeling and Control Reagents を用いて合成し、Affymetrix 社の Mouse Genome 430 2.0 Array を用いてマイクロアレイ解析を行った。得られたアレイデータを Agilent 社のマイクロアレイ解析ソフト Genespring を用いて、それぞれのサブタイプに特異的な遺伝子の候補の選定を行った。

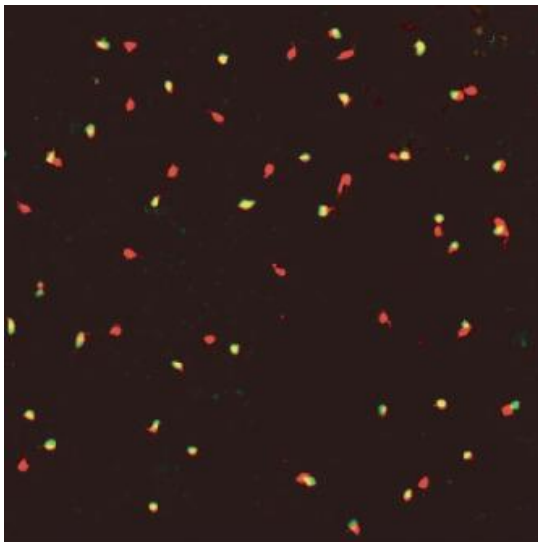


図 2 副視覚系内側核投射細胞の分布  
SIPG 陽性細胞はすべて副視覚系内側核へ投射しており、副視覚系内側核投射細胞の半数を占める。副視覚系内側核投射細胞は、全体ではランダムに分布しているが、SIPG 陽性 (黄) と SIPG 陰性細胞 (赤) はそれぞれ regular mosaic を形成している。

マイクロアレイ解析により得られた上方向および下方向の光の動きに反応する ON 中心型方向選択性神経節細胞において特異的な発現パターンを示す候補遺伝子群について、マウス網膜における発現パターンを発生を追って (最初の網膜神経節細胞が出現する胎生 12.5 日目から網膜神経節細胞の回路形成がほぼ完了する生後 12 日目まで) in situ hybridization または免疫染色によって確認した。

#### 4. 研究成果

2 つサブタイプを単離し、Single-cell マイクロアレイ法によりサブタイプ特異的に発現する遺伝子の同定を試みた。マイクロアレイ解析の結果、上丘投射網膜神経節細胞に発現していないサブタイプ特異的な遺伝子の候補は 100 余り同定された。次に生後 1 日目の網膜における発現パターンを in situ hybridization または免疫染色によって確認した。しかしながら、これらの候補分子中に、サブタイプ特異的な発現パターンを示すものは、SPIG1 意外に見出すことができなかった。そこで 2 つのサブタイプに共通して発現する遺伝子の候補も同定し、これらの発現パターンの検証も行った。これらについても、そのほとんどすべてが目的とするものではなかったが、1 つだけであるものの、2 つのサブタイプに共通して発現する核内転写調節因子を同定することに成功した (図 3)。この遺伝子のノックアウトマウスについては、すでに入手する手続きに入っており、今後このマウスを用いた機能解析を行う予定である。

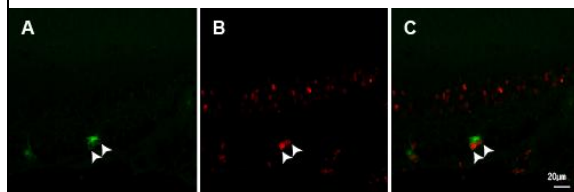


図 3  
副視覚系内側核投射細胞 (A, C; 緑) は、すべてこの転写調節因子を発現している (B, C; 赤)。

このように、Single-cell マイクロアレイ法により同定した候補遺伝子のほとんどが、擬陽性というものであった。しかしながら、サブタイプ特異的な遺伝子の候補の中には、SPIG1 が含まれており、2 つのサブタイプに共通して発現する遺伝子の候補中には、1 つではあるものの真に陽性と言えるものが含まれていたことから、Single-cell マイクロアレイ法が、機能していないことはないが、擬陽性が非常に多い方法であるということが推測される。この原因として、Single-cell マイクロアレイ法では、mRNA の増幅に増幅率に偏りの大きい PCR を用いていることと、マイクロアレイ法は検出感度が低いため発現量の多い遺伝子しか正確に定量できないということが考えられる。この欠点を克服するため、mRNA の増幅には、増幅率に偏りが非常に小さく定量性に優れた T7 RNA ポリメラーゼによる mRNA 増幅法を用いることにした (Tougan et al., *Nucleic Acids Res.*, 2008)。また、次世代シーケンサー SOLiD はマイクロアレイの 100 倍以上の感度を有しており、発

現量の少ない遺伝子でも正確に定量することができるので、マイクロアレイ解析の代わりに SOLiD による Whole transcriptome 解析を用いることにした。現在、SOLiD による Whole transcriptome 解析を行うための、予備実験を行っている。

また、この2種類のサブタイプが、上向きと下向きの光の動きに反応することを電気生理学的に証明した。さらに、この2種類のサブタイプは共に副視覚系内側核へ投射するが、その経路が異なっていることも明らかにした (図4)。

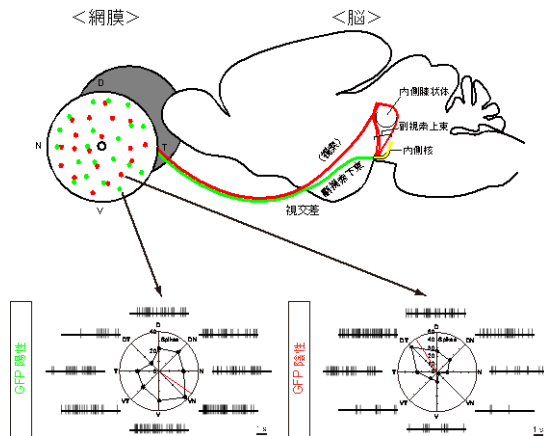


図4

GFP 陽性 (SPIG1 陽性) の神経節細胞は網膜において光が下方方向に動いたときに発火 (反応) 頻度が増加し、GFP 陰性の細胞は上方方向に動いたときに発火することがわかる。光はレンズを通して網膜に入るため、視野中の動きとしては、逆にそれぞれ上方、下方の動きを認識していることになる。両者は別の経路で内側核に入力する。D、V、N、T は、それぞれ背 (上) 側、腹 (下) 側、鼻側、耳側を示す。

## 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)

- ① Takahashi, H., Sakuta, H., Shintani, T., and Noda, M. (2009) Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina. *Dev Biol* 331, 300-310, 査読有
- ② Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiji, N. L., Usui, S., and Noda, M. (2009) Identification of retinal ganglion cells and their projections involved in central transmission of

information about upward and downward image motion. *PLoS ONE* 4, e4320, 査読有

- ③ Sakuta, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2008) Retroviral vector-mediated gene transfer into the chick optic vesicle by in ovo electroporation. *Dev Growth Differ* 50, 453-457, 査読無

[学会発表] (計1件)

- ① 米原圭祐、新谷隆史、鈴木亮子、作田拓、竹内靖、中村-米原佳世、石金浩史、Nilton L. Kamiji、臼井支朗、野田昌晴 SPIG1 の発現により明らかになった ON 中心型方向選択性神経節細胞サブタイプの発達様式 2008 年 第 31 回日本神経科学大会 東京 7 月

[図書] (計2件)

- ① Sakuta, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2009) Retroviral vector-mediated gene transfer into the chick optic vesicle by in ovo electroporation. In *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology* (H. Nakamura, ed.) pp. 105-116. Springer, Springer-Verlag, 査読無
- ② Noda, M., Takahashi, H., and Sakuta, H. (2009) Neural Patterning: Eye fields. In *Encyclopedia of Neuroscience 4th ed.* (L. M. Squire et al., eds.) pp. 199-204. Elsevier B. V., Amsterdam, 査読有

[その他]

ホームページ等

所属機関ホームページ

<http://www.nibb.ac.jp/>

所属研究室ホームページ

<http://niwww3.nibb.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

作田 拓 (SAKUTA HIRAKI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：40343743

(2) 連携研究者

米原 圭祐 (YONEHARA KEISUKE)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・特別協力研究員

研究者番号：80510619