

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293070

研究課題名(和文) 視細胞-双極細胞/水平細胞シナプスの形成を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms underlying synapse formation between photoreceptor, bipolar and horizontal cells

研究代表者

大森 義裕 (Omori, Yoshihiro)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：90469651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：眼球に入った光は、光センサーニューロンである視細胞により感知され脳へと情報伝達される。視細胞シナプスは、種々のタイプの双極細胞や水平細胞の樹状突起に接続し、単に光刺激情報を次の階層の神経細胞に伝えるだけでなく色・形・動き・コントラストなどの特徴を抽出して情報処理を行っている。視細胞シナプス形成メカニズムを解明することは、疾患の発症機構解明という点でも興味深い。このように精密かつ複雑な視細胞シナプスの形成メカニズムは、これまでに、ほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、視細胞シナプスの形成メカニズムの解明を行った。

研究成果の概要(英文)：In the vertebrate retina, visual information is transmitted from photoreceptor cells to ganglion cells via bipolar cells. The photoreceptor axon terminal forms a specialized synaptic structure, the ribbon synapse, which specifically connects photoreceptor axonal terminals with bipolar and horizontal cell dendritic terminals in the outer plexiform layer. Although various presynaptic proteins which are required for synaptic ribbon structure, such as Ctbp2, piccolo and bassoon, have been identified, the mechanism of ribbon synapse apposition specific to bipolar and horizontal terminals remains mostly unknown. We investigated molecular mechanisms underlying the proper formation of photoreceptor ribbon synapses.

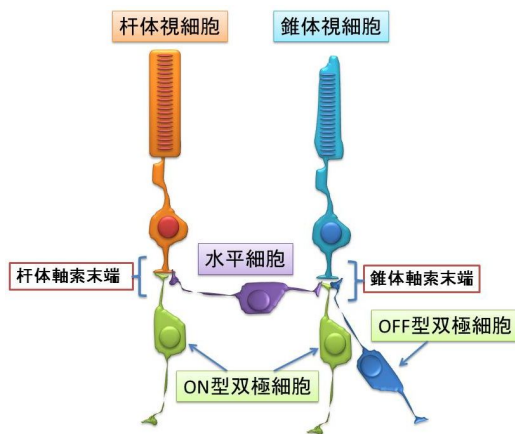
研究分野：神経科学

キーワード：網膜 視細胞 双極細胞 水平細胞 リボンシナプス

1. 研究開始当初の背景

網膜は、5種類のニューロン（視細胞、双極細胞、神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞）と1種類のグリア細胞から成るシンプルな神経組織であり、脳と比較すると回路の明確性から、より詳細な回路の解析が可能な中枢神経系モデルであり、古くから研究されてきた。

網膜は光を感知して電気信号に変換し、色・形・動き・コントラストなどの特徴を抽出して、その視覚情報を脳に伝達する。光情報の感受と電気信号への変換は網膜最外層に存在する視細胞が行う。特徴抽出は双極細胞以降の下流ニューロンの網膜内神経回路で行われる。視細胞には、明暗を感知する杆体視細胞と色覚を感知する錐体視細胞が存在し、水平細胞と双極細胞の両方に連結している（下図）。



双極細胞には、光照射により脱分極するON型双極細胞と光照射により過分極するOFF型双極細胞が存在する。杆体視細胞にはON型双極細胞が接続し、錐体視細胞には、ONとOFF両方の双極細胞が接続している。杆体・錐体視細胞シナプスには、水平細胞とON型双極細胞の樹状突起が深く入り込み、錐体視細胞シナプスにはOFF型双極細胞の樹状突起が、シナプス表面の浅い位置に接続している。このように視細胞シナプスは精密かつ複雑な構造を持つが、このシナプス構造や正確な接続を形作るメカニズムはこれまでほとんど明らかとなっていなかった。

私たちは、これまでに視細胞特異的に発現する細胞外マトリクス蛋白質ピカチュリンが視細胞-双極細胞の特異的な接続に重要であることを見出してきた。ピカチュリン欠損マウスでは、網膜電図の異常が見られ、電子顕微鏡による観察では、視細胞-双極細胞シナプス接続部における微細構造の異常が明らかとなった (Sato, Omori *et al.*, Nat Neurosci 2008)。興味深いことに、筋ジストロフィーの発症機構に重要な役割を果たすジストログリカンとピカチュリンが直接相互作用し、視細胞-双極細胞接続に特異的に重要であることを明らかにした (Omori *et al.*, J Neurosci 2012)。筋ジストロフィー患者では、以前より網膜機能の異常が報告さ

れている (Nat Genet. 1993, 4, 82)。申請者らの研究により、その原因がピカチュリンとジストログリカンの機能欠損によることが明らかとなった。また、生化学的な実験によりジストログリカンとピカチュリンの相互作用には糖鎖修飾が必須であり、ピカチュリンのラミニンGドメインが重要であることを見出した (Kanagawa, Omori *et al.*, JBC 2010)。

2. 研究の目的

ピカチュリンとジストログリカンについての一連の研究により、正常な視細胞-双極細胞シナプス接続形成の分子メカニズムの一端が明らかとなったが、ピカチュリンとジストログリカン欠損マウスでは視細胞-水平細胞シナプス接続部における微細構造には異常が見られず、視細胞-水平細胞シナプス接続に関するメカニズムは未だ不明のままである。また、視細胞-双極細胞シナプス接続についても、視細胞や双極細胞のサブタイプの多様性から、その正確な配線の決定には、他にも重要な決定因子が作用していることが予想される。

また、網膜に存在する神経細胞はサブタイプを含めると数十種類におよび、それぞれが特異的なシナプス回路を形成するが、その形成メカニズムは明らかでない。私たちは、サブタイプ特異的なシナプス回路の形成メカニズムを解明する目的でこれらの因子の探索を行った。

3. 研究の方法

蛍光免疫染色法によるマウス網膜組織の染色とコンフォーカル顕微鏡による解析

マウスの眼球を摘出しPBSで洗浄する。18Gの注射針で角膜側に穴をあけ4%PFA/PBSで1分間固定した後、眼科用ハサミとピンセットを使って角膜を切除しeye cupを作製する。4%PFA/PBS中で室温30分間固定を行い30%スクロース/PBS中で4晩振とうする。OTCコンパウンド中にeye cupを浸し、ドライアイス上で凍結ブロックを作製する。凍結ブロックからクライオスタットを用いて20 μ mの凍結切片を作製しスライドグラス上で1時間乾燥させる。この切片をPBSで洗浄し、ブロッキング液 (5% normal donkey serum/0.1% TritonX100/PBS) で常温1時間ブロッキングを行う。1次抗体をブロッキング液中に希釈し常温4時間抗体反応を行う。その後PBSで5分洗浄を3回を行い、2次抗体反応を常温2時間行う。染色後はPBSで5分洗浄を2回行う。染色後の切片はゲルバトールを用いてマウントし、Zeiss LSM700コンフォーカル顕微鏡を用いて網膜組織の観察を行った。

4. 研究成果

網膜は主に5種類の神経細胞から成る3層の細胞層(ONL, INL, GCL)と2層の網状層(OPL, IPL)から成るシート状の組織である。IPLはさらに5つの層S1-S5に分かれており、S1, S2層はOFF型双極細胞の軸索が投射し、S3-S5層にはON型双極細胞の軸索が投射する。まず、これまでに知られているマーカーを使ってS1-S5を染め分ける条件の検討を行った。カルビンディンとCtbp2に対する抗体を用いてS1-S5が鮮明に解析できることがわかった。

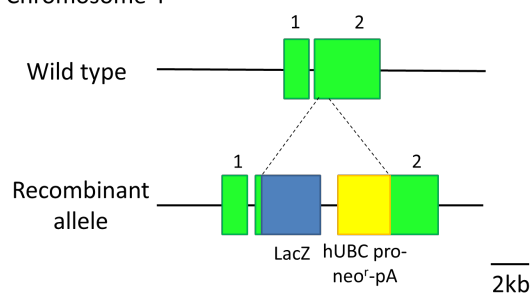
Otx2は視細胞の運命決定因子であり、Otx2欠損マウスは視細胞を欠く。Otx2は双極細胞の遺伝子発現も制御しており、Otx2欠損マウス網膜のマイクロアレイを用いた発現解析により、視細胞や双極細胞に発現する遺伝子を同定することが可能である。私たちはこの解析から、Otx2欠損マウスの網膜において、Tmem215がWTマウスの網膜に比べて発現量が大きく減少していることを見出した。

Tmem215は、分泌シグナル配列と膜貫通ドメイン、PDZ結合ドメインを持つ蛋白質である。両生類、一部の魚類を含む脊椎動物において保存されている。パラログは存在しない。ノザンプロットによる発現解析の結果、Tmem215 mRNAはマウスの14組織のうち、網膜において強く発現しており、また脳においては大脳皮質での発現が見られた。

マウス網膜組織における*in situ*ハイブリダイゼーション解析の結果、Tmem215は胎生17.5日(E17.5)において、神経芽細胞層に発現が見られた。また、生後9日(P9) P21のマウス網膜の内顆粒層(INL)において特異的な発現が見られた。

Tmem215のExon 2のORFをLacZ(レポーター遺伝子)とネオマイシン耐性遺伝子で置換し、Tmem215プロモーターからLacZ遺伝子を発現するマウスを作製した(下図)。

Chromosome 4



このマウスでは本来Tmem215を発現する細胞において外来性遺伝子LacZの遺伝子産物ガラクトシダーゼを発現するため、これを指標にTmem215を発現する細胞を同定することが可能である。

Tmem215-LacZ発現マウスにおけるβ-ガラクトシダーゼ(β-GAL)の局在を免疫組織化学染色により解析した。

β-GALは、内網状層(IPL)のS1, S3, S4層

に特異的な局在が見られた。一方、S2, S5層においては局在が見られなかった。このことからTmem215はOFF型錐体双極細胞とON型錐体双極細胞に発現すると考えられる。

β-GALとChx10(すべての双極細胞のマーカー) Trpm1(ON型錐体・杆体双極細胞のマーカー) NK3R(1型OFF錐体双極細胞のマーカー)の共染色を行った。β-GAL発現細胞はChx10発現細胞、Trpm1発現細胞、NK3R発現細胞とオーバーラップが見られた。

β-GALとZnp1陽性細胞(2型OFF双極細胞のマーカー)・PKAR11陽性細胞(3b型OFF双極細胞のマーカー)・Calnenilin陽性細胞(4型OFF双極細胞のマーカー)・Pax6陽性細胞(すべてのアマクリン細胞のマーカー)ではオーバーラップが見られなかった。

PDZ結合ドメインを持つ一回膜貫通型蛋白質Tmem215は、1型OFF錐体双極細胞を含む特定の錐体双極細胞において重要な機能を持つことが想定される。私たちは、現在Tmem215遺伝子のホモ欠損マウスの作製を進めており、Tmem215の機能解析を行う予定である。他の視細胞シナプス形成候補遺伝子についても解析を進めている。

以前の研究で視細胞の成熟を制御するCrx遺伝子のプロモーター下にGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製し、発生途上の錐体視細胞を濃縮する目的で胎生後期のGFP陽性細胞をFACSソートした(文献)。この細胞集団から単離したRNAに対してマイクロアレイ解析を行ったところ、転写因子Mef2dがGFP陽性細胞に高い発現を示すことを見いだした。Mef2転写制御因子ファミリーは心臓および骨格筋を含む広範囲にわたる組織の発生において重要な役割を果たすことが知られているが、網膜における機能は未知であった。Mef2dの錐体視細胞発生における機能を明らかにする目的で、Mef2dの機能解析を行った。ノザンプロット解析および*in situ*ハイブリダイゼーション解析の結果、Mef2dがマウス網膜において高発現していることを見いだした。次に、ジーンターゲットングによりMef2d欠損マウスを作製した。Mef2d欠損マウス網膜の組織解析を行ったところ、視細胞の変性を観察した。また、Mef2d欠損マウスの網膜電図の振幅が、暗順応下および明順応下において視細胞由来のa波と双極細胞由来のb波ともに著しく減弱していたことから、Mef2dが網膜の生理的機能に必須であることが明らかとなった。免疫染色により、生後30日のMef2d欠損網膜において、錐体と杆体視細胞ともに外節の長さが野生型マウスと比較して短縮していることを見いだした。

Mef2d欠損網膜において視細胞のCtbp2染色によりリボンシナプスを観察したところ正常な形態のリボンの数が著しく減少していることが見られ、Mef2dが視細胞と双極細胞のシナプス接続に重要な役割を果たして

いることがわかった。また、本来 OPL に形成されるシナプスが ONL に異所的に形成されることが認められた。これらの結果から、Mef2d が視細胞外節およびシナプスの成熟に必須であることが示唆された。Mef2d 欠損網膜の異常の分子メカニズムを明らかにするため、マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、生後 14 日の Mef2d 欠損マウス網膜において、錐体アレスチン (Arr3)、Gucy1b、Pde6h、Cacna1s といった視細胞外節およびシナプスで発現する蛋白質をコードする遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。レポーターアッセイの結果、Mef2d が Crx と相乗的に作用して、視細胞に発現する遺伝子である錐体アレスチンのプロモーター活性を上昇させることを見いだした。以上の結果から、Mef2d が視細胞の成熟に関わる遺伝子群の転写活性化を通じて視細胞の発生を制御する転写因子であることが明らかとなった (Omori et al 2015)。

Gene expression analysis of embryonic photoreceptor precursor cells using BAC-Crx-EGFP transgenic mouse. Muranishi Y, Sato S, Inoue T, Ueno S, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(3): 317-22

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 9 件)

1. Mizuhashi K, Chaya T, Kanamoto T, Omori Y, Furukawa T. Obif, a Transmembrane Protein, Is Required for Bone Mineralization and Spermatogenesis in Mice. *PLoS One.* 査読有, 2015, 10, e0133704. doi: 10.1371/journal.pone.0133704
2. Omori Y, Chaya T, Yoshida S, Irie S, Tsujii T, Furukawa T. Identification of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Primary Cilia and Their Possible Involvement in Body Weight Control. *PLoS One.* 査読有, 2015, 10, e0128422. doi:10.1371/journal.pone.0128422.
3. Omori Y, Kitamura T, Yoshida S, Kuwahara R, Chaya T, Irie S, Furukawa T. Mef2d is essential for the maturation and integrity of retinal photoreceptor and bipolar cells. *Genes Cells.* 査読有, 2015, 20, 408-26. doi:10.1111/gtc.12233.

4. Chaya T, Omori Y, Kuwahara R, Furukawa T. ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. *EMBO J.* 査読有, 2014, 33, 1227-42. doi:10.1002/embj.201488175.
5. Mizuhashi K, Kanamoto T, Moriishi T, Muranishi Y, Miyazaki T, Terada K, Omori Y, Ito M, Komori T, Furukawa T. Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. *Hum Mol Genet.* 査読有, 2014, 23, 2953-67. doi:10.1093/hmg/ddu007.
6. Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, Miki H. Basolateral Mg²⁺ extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg²⁺ transport across epithelia: a mouse model. *PLoS Genet.* 査読有, 2013, 9, e1003983. doi:10.1371/journal.pgen.1003983.
7. 渡邊哲史, 大森義裕, 古川貴久. 網膜の発生研究と再生医療への応用. *生体の科学.* 査読無, 2014, 65, 220-225. doi: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425101612>
8. 大森義裕. 古くて新しいオルガネラ, 「繊毛」研究の広がり. *生物工学会誌.* 査読無, 2014, 92,117. www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9203/9203_biomed3.pdf
9. 大森義裕. 次世代の担い手たちが創る神経科学の新しい潮流」に参加して. *神経科学ニュース.* 査読無, 2013, 3, 8-9. www.jnss.org/wp-content/news/2013/news_133.pdf

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 上野明希子, 大森義裕, 古川貴久, 網膜視細胞と双極細胞シナプス成熟における転写因子 Mef2d の機能と視細胞変性, 第 8 回 Retina Research Meeting, 2015 年 10 月 31 日, JP タワー ホール & カンファレンス (東京都千代田区)
2. 吉田怜代, 大森義裕, 北村民樹, 栗原隆亮, 茶屋太郎, 入江彰一, 古川貴久. Mef2d による転写制御はマウス網膜における視細胞と双極細胞の成熟に必須である, Transcriptional regulation by Mef2d is essential for maturation of

photoreceptor and bipolar cells in the mouse retina. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 30 日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

3. 吉田怜代, 大森義裕, 古川貴久. Otx2 欠損マウス網膜の遺伝子発現プロファイル解析と錐体双極細胞に発現する膜貫通蛋白質 Tmem215 の同定 Analysis of expression profiling of the Otx2-deficient retina and identification of a bipolar specific transmembrane protein Tmem215. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
4. 大森義裕. 繊毛キナーゼによる繊毛内輸送システムの制御と繊毛関連疾患の発症メカニズム. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014 年 3 月 28 日, 自治医科大学 (栃木県下野市)
5. 大森義裕, 茶屋太郎, 古川貴久. 繊毛キナーゼ ICK は神経前駆細胞における繊毛形成とヘッドホッグシグナル伝達に重要である. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会), 2013 年 6 月 21 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
6. 大森義裕, 茶屋太郎, 古川貴久. Functional role of ciliary kinases in cilia development and human disease. 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点シンポジウム 合同シンポジウム, 2013 年 6 月 27 日 芝蘭会館 稲盛ホール (京都府京都市)
7. 大森義裕, 古川貴久. Functional role of ciliary kinases in cilia development and human diseases. 第 25 回 CDB ミーティング “Cilia and Centrosomes: from Fertilization to Cancer”. 2013 年 6 月 18 日, 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 大森義裕. 秀潤社, 細胞工学別冊 最新バイオ論文解説総集編「マウス胚発生における細胞系譜に特異的な一次繊毛の形成」, 2015, 52-53.
2. Omori Y, Furukawa T. Springer Japan, Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases : Chapter 8 “Structure and Development of the Photoreceptor Ribbon Synapse. ”, 2014, 99-216.

〔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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://yoshihiroomori.web.fc2.com/>
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furuka_wa_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大森 義裕 (Yoshihiro Omori)
大阪大学蛋白質研究所 准教授
研究者番号 : 90469651

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :