

論文の内容の要旨

論文題目 シナプス前ジストログリカン-ピカチュリン複合体による
網膜視細胞-双極細胞間のシナプス形成メカニズム

氏名 荒木章之

筋ジストロフィー患者やそのモデルマウスにおいて、網膜電図(以下、ERG)の異常が観察されることが知られている。ジストログリカン(以下、DG)は、主に筋組織、神経組織に発現している細胞膜タンパク質であり、網膜においては視細胞の前シナプスにジストロフィン-糖タンパク質複合体(以下、DGC)を形成している。

Sato らは、以前、細胞外マトリックス蛋白質であるピカチュリンが、適切な視細胞リボンシナプス形成に不可欠であることを報告した。ピカチュリンノックアウトマウスは、他の DGC 構成タンパク質の変異マウスと同様、ERG で b 波の振幅低下と潜時延長が起こっていた。ピカチュリンは DG と相互作用し、その結合には、DG の糖鎖修飾が不可欠であった。これらの報告から、網膜視細胞リボンシナプスにおいて、DG とピカチュリンの機能的な相互作用が示唆された。しかし、DGC とピカチュリンによる、適切な網膜視細胞リボンシナプス形成の分子メカニズムは明らかにされていなかった。

今回、私は、 DG^{fllox} マウスと *Crx-Cre* マウスの交配により、網膜視細胞特異的 DG コンディショナルノックアウトマウス(DG CKO マウス)を作製し、網膜における表現型の解析を行った。

(1)ジストロフィン、DG とピカチュリンは、生後網膜の視細胞シナプス末端にて共局在する
視細胞シナプス発生における DGC の細胞内局在を調べるために、視細胞、双極細胞、水平細胞がリボンシナプスを形成する網膜外網状層(outer plexiform layer ; OPL)のピカチュリン、DG、ジストロフィンの免疫染色を行った。生後 4 日 (P4)では、OPL の *Ctbp2* 陽性の未熟なシナプスリボンの近くにピカチュリンの弱いシグナルが見られた。P8 においては、シナプスリボンの近傍に DG とピカチュリンがはっきりと見られた。P12 における視細胞シナプスの馬

蹄形のリボンに隣接する DG とピカチュリンは、成体マウス網膜と同様であった。これらの結果により、双極細胞樹状突起が視細胞に陥入する直前の P8 から P12 の間に視細胞における DGC の形成が起こることが分かった。

(2) 視細胞特異的 DG ノックアウトマウスはシナプスにおけるピカチュリンの局在に影響を与える

網膜視細胞リボンシナプスにおける DG の機能を調べるために、コンディショナルジーンターゲット法により、視細胞のみで DG の発現を欠損させた。すなわち、 DG^{lox} マウスと、網膜錐体・杆体細胞において Cre リコンビナーゼを発現する $Crx-Cre$ トランスジェニックマウスの交配により $DG^{lox/lox}; Crx-Cre^+$ (DG CKO) マウスを作製した。DG CKO マウス網膜の免疫染色を行ったところ、 $Ctbp2$ が OPL に見られたが、DG は OPL にほとんど検出できないレベルであり、視細胞特異的に DG が欠損したことを確認した。

DG の欠損により視細胞シナプスにおけるピカチュリンの局在に影響が出るかどうかを調べるために、DG CKO マウス網膜のピカチュリン免疫染色を行った。対照マウス網膜では、ピカチュリンは、OPL の杆体細胞、錐体細胞両方のシナプスの $Ctbp2$ 陽性リボンの近傍にのみ斑点状に分布していた。一方、DG CKO マウス網膜では、ピカチュリンが OPL のほぼ全域で明らかに消失しており、DG と同様わずかに OPL に残っているのみであった。この結果は、視細胞における DG が、視細胞シナプス末端へのピカチュリンの発現に不可欠であることを示唆している。一方、予想に反して、DG CKO マウス網膜においてもジストロフィン発現には変化がなかった。ジストロフィンは、DG 以外の DGC 構成要素やアクチン細胞骨格とも相互作用するため、これらとの相互作用により、DG が存在しなくとも視細胞シナプス末端への局在を維持できるのかもしれない。

(3) 視細胞における DG の欠損により、視細胞から双極細胞へのシナプス伝達が阻害される

視細胞における DG の生理的機能を調べるために、DG CKO マウスの ERG 測定を行った。DG CKO マウスの ERG は、暗順応下、明順応下両方において、b 波の振幅の低下と潜時の延長を認めた。ERG の b 波は、主に ON 双極細胞の興奮により生じる。これらの結果により、DG は視細胞と ON 双極細胞の間の生理的結合に不可欠であることが示唆された。さらに、DG CKO マウスとピカチュリンノックアウトマウス(ピカチュリン KO マウス)の ERG 異常の程度を比較したところ、暗順応下における b 波の潜時の延長が DG CKO マウスの方がピカチュリ

ン KO マウスと比べて有意差をもって大きかった。加えて、暗順応下、明順応下両方において、b 波の振幅が DG CKO マウスの方が有意差をもって小さかった。これらの結果から、DG の欠損により、ピカチュリンの欠損よりも深刻な視細胞と双極細胞間のシナプス結合の異常を来すことが示唆された。

(4) DG CKO マウスの視細胞リボンシナプスの電子顕微鏡による観察

DG の欠損が視細胞シナプスの超微細構造に影響を与えるかどうかを調べるために、3次元電子顕微鏡解析を行った。対照マウス網膜、DG CKO 網膜両方において、水平細胞は視細胞リボンシナプスに陥入していた一方、DG CKO マウス網膜では、双極細胞の樹状突起は杆体細胞のリボンシナプスへの陥入が認められなかった。これらの結果から、DG の欠損により、視細胞と双極細胞のシナプス構造が失われることが示唆された。DG CKO マウス網膜におけるリボンシナプス構造の破綻の結果、ERG の b 波の減衰が起こったと考えられた。

以上まとめると、今回、視細胞の DG は、視細胞シナプスの形成と、視細胞と双極細胞の機能的なシナプス結合に必須であることを示した。DG 欠損により視細胞におけるピカチュリンの発現が大幅に減少し、視細胞シナプスにおけるピカチュリンの欠損によっても DG の発現が阻害されることが分かった。これらの結果から、ピカチュリンは細胞表面の DG の発現に必要であり、同時に、ピカチュリンと DG の機能的結合が視細胞シナプス形成に重要であることが分かった。今回みられた DG とピカチュリンの相互作用における分子メカニズムは、他の組織における LGドメインを持つ DGリガンドと DG の相互作用と共通であるかもしれない。