

[課程－ 2]

審査の結果の要旨

氏名 荒木章之

本研究は脊椎動物網膜のシナプス形成過程において重要な役割を演じていると考えられる遺伝子を明らかにするため、網膜視細胞特異的ジストログリカンコンディショナルノックアウトマウスの作製、解析により、下記の結果を得ている。

1. 生後4日(P4)、P8、P12マウス網膜のピカチュリン、DG、ジストロフィン免疫染色を行い、視細胞シナプス形成過程におけるこれらの発現を調べた。P4では外網状層(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示された。
2. コンディショナルジーンターゲティング法により、視細胞のみでDGの発現を欠損させた $DG^{lox/lox}; Crx-Cre^+$ (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 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、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が示された。
3. DG CKO マウスのERG測定を行った結果、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。この結果により、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された。

4. DG CKO マウスの 3 次元電子顕微鏡解析を行ったところ、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、本論文は網膜視細胞特異的ジストログリカンコンディショナルノックアウトマウスの解析から、視細胞の細胞膜蛋白質ジストログリカンが、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。本研究は、これまで未知であった視細胞と双極細胞のシナプス形成の分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。