

第 14 回視覚科学フォーラム



2010 年 8 月 26 日～27 日

筑波大学・大学会館

第14回視覚科学フォーラム研究会

日程： 2010年8月26日(木)～27日(金)
会場： 筑波大学 大学会館 国際会議室
(茨城県つくば市天王台 1-1-1)
共催： 筑波大学
連絡先： 中谷 敬 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)
029-853-6672
nakatani@biol.tsukuba.ac.jp

会場に関する注意事項

- ◇ 口演会場の国際会議室内およびその前のホール等(カーペット部分)での飲食は禁止されています。飲食は休憩室内でお願いします。
- ◇ 国際会議室の各座席の前にマイクが設置されています。質疑応答の際はスイッチをONにしてお話しください。使用が終わりましたら必ずスイッチをお切りください。スイッチがONのままになっているとトラブルの原因となりますのでご注意ください。
- ◇ クロークは設けませんので、大きなお荷物をお持ちの方は口演会場後部の座席上、または会場内の空きスペースに置いてください。

発表に関する注意事項

- ◇ 発表時間は30分(口演:25分, 質疑応答:5分)です。時間厳守にご協力ください。
- ◇ 発表用のパソコンは各自でご持参ください。
- ◇ 各セッションが始まる前に各自のパソコンを切替器に接続し、動作確認を行ってください。

会場でのインターネットアクセスについて

参加者は、講演会場、休憩室、懇親会場、学内の各食堂で無線LANのアクセスポイントを通じてインターネットに接続することができます。接続を希望される方は、受付で外来者向け利用申請書に記入し、一時アカウントとパスワードをお受け取りください。

懇親会

8月26日(木) 18:00より大学会館1階のレストラン「プラザ」にて開催します。場所は「会場見取図」でご確認ください。

筑波大学宿泊施設について

- ◇ **場所：** 大学会館東側の大学会館別館内にあります。バスで来られる場合は「大学会館前」で下車し、会場周辺マップを参照して大学会館別館までお越しください。宿泊施設への入口は会場周辺マップの矢印で示した個所です。入口を入ったらエレベーターで4階にお上がりください。エレベーターを降りたところにフロントがあります。
- ◇ **チェックイン：** フロントでチェックインの手続きを行い、宿泊日数分の宿泊料金をお支払いください。チェックインの時間は16:00～24:00です。
- ◇ **チェックアウト：** 10:00
- ◇ **門限：** 門限は24:00です。それ以降は建物内に入れませんのでご注意ください。
- ◇ **インターネット：** 宿泊施設内でインターネットに接続できます。ご希望の方はフロントでお申し込みください。なお、宿泊施設内のインターネット接続は学内無線LANシステムとは異なりますので、会場等で無線LANをご利用される方は視覚フォーラムの受付で別途お申し込みください。
- ◇ **TEL：** 029-853-2386（宿泊施設フロント）

駐車場について

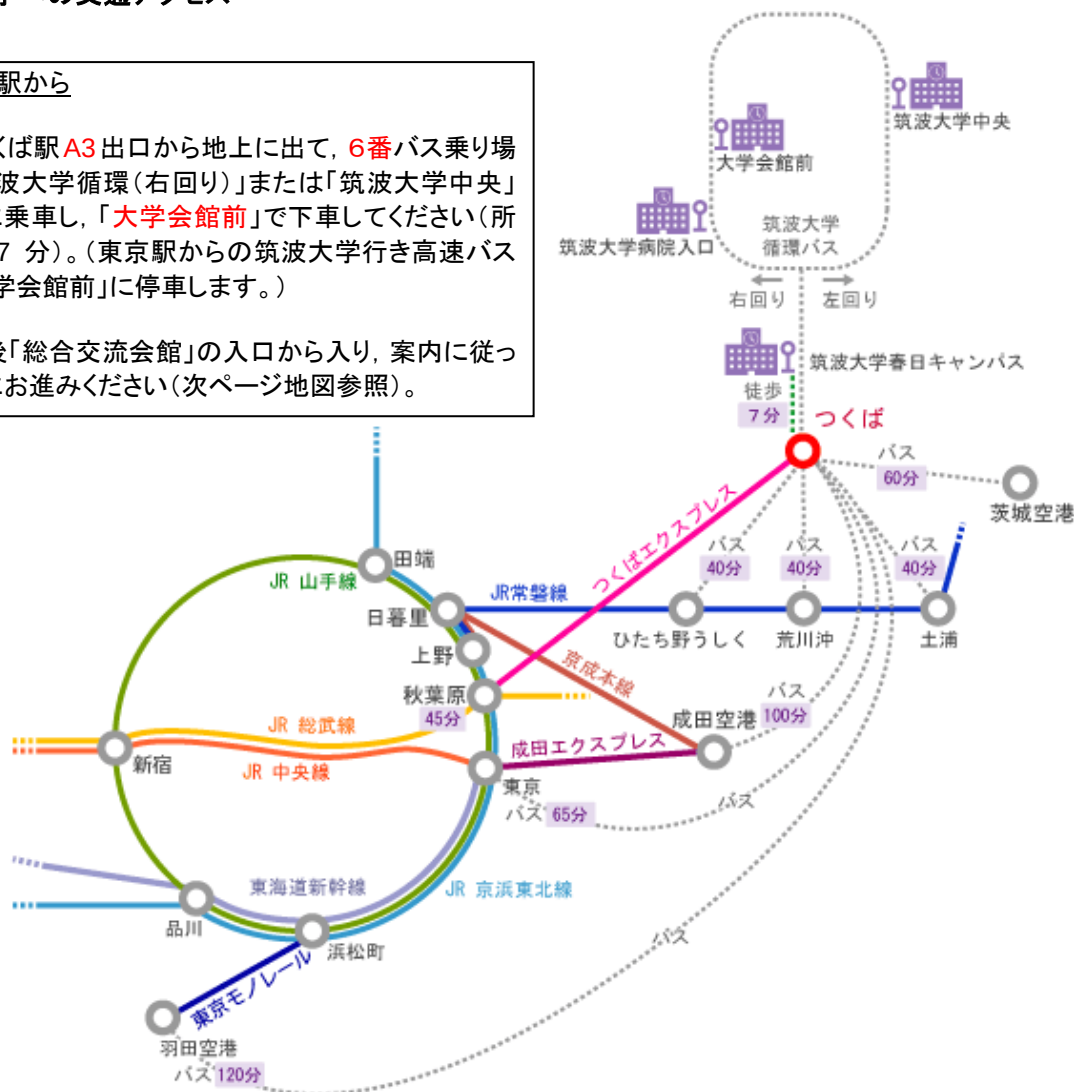
- ◇ 大学会館北側の駐車場をご利用ください。この駐車場には学外の道路から直接入ることはできません。まず学内のループ道路に入り、「かえで通り」の大学会館南側交差点を東に入り、大学会館地区建物配置図(ウェブサイトからダウンロード)の矢印に従ってお進みください。常磐自動車道からの道順と詳しい地図もウェブサイトからダウンロードできます。
〔 <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/vision2010/> 〕
- ◇ 駐車される方は、ウェブサイトから「駐車証」をダウンロードしてプリントアウトしていただくか、受付にて「駐車証」をお受け取りの上、ダッシュボード上など外から見える場所に置いてください。
- ◇ 駐車場の申し込みが少なかったことと、他のイベントと重ならなかったために、駐車スペースにまだ余裕があります。申し込みをされなかった方で駐車場の利用をご希望の方は、上記の要領でご利用ください。
- ◇ 駐車場から会場へは、大学会館1階の「留学生センター」入口から入り、正面のエレベーターで3階にお上がりください。

筑波大学への交通アクセス

つくば駅から

TXつくば駅A3出口から地上に出て、6番バス乗り場で「筑波大学循環(右回り)」または「筑波大学中央」行きに乗車し、「**大学会館前**」で下車してください(所要約 7 分)。(東京駅からの筑波大学行き高速バスも「大学会館前」に停車します。)

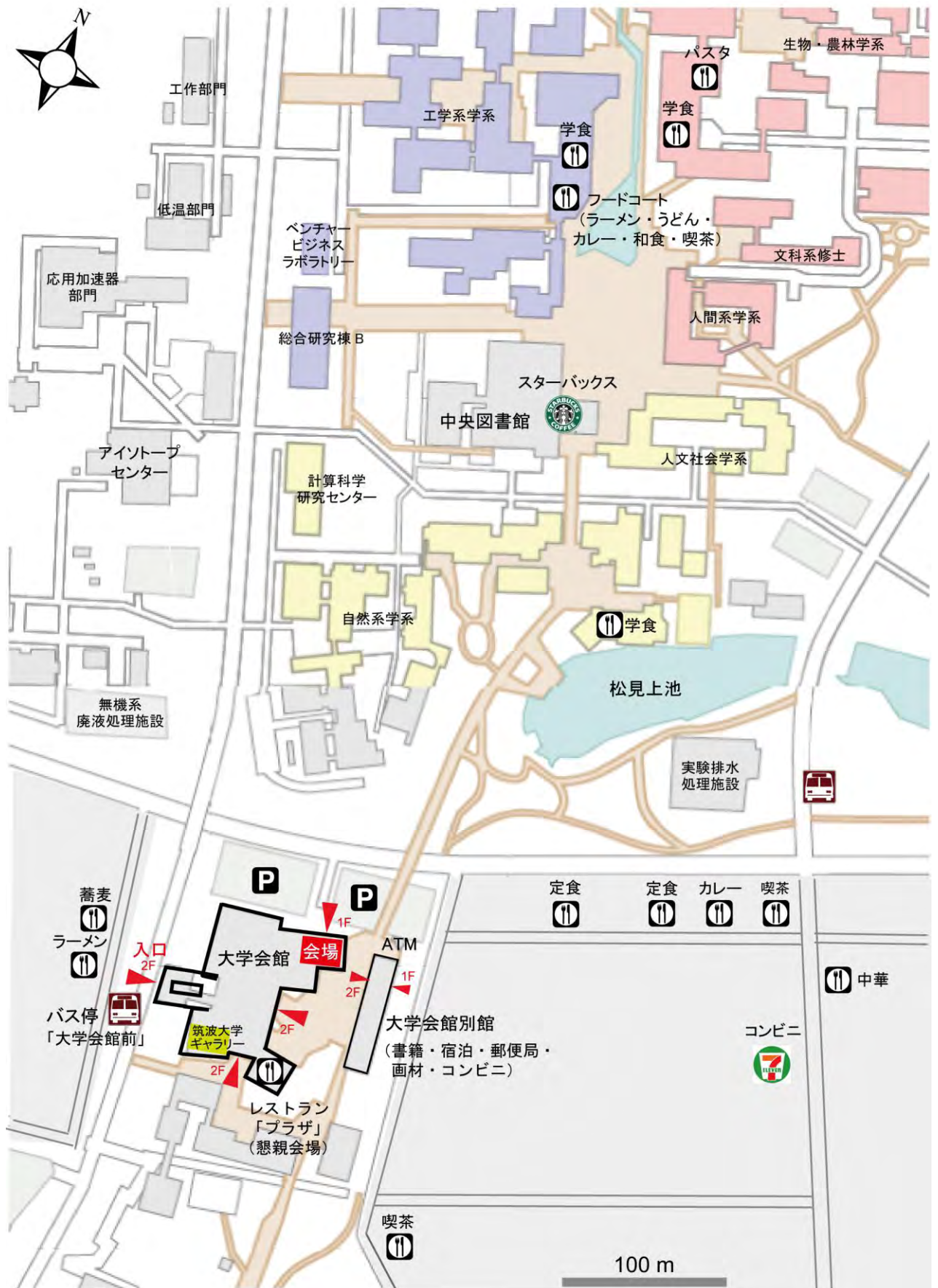
下車後「総合交流会館」の入口から入り、案内に従って奥にお進みください(次ページ地図参照)。



会場周辺の案内 (次ページの地図でご確認ください。)

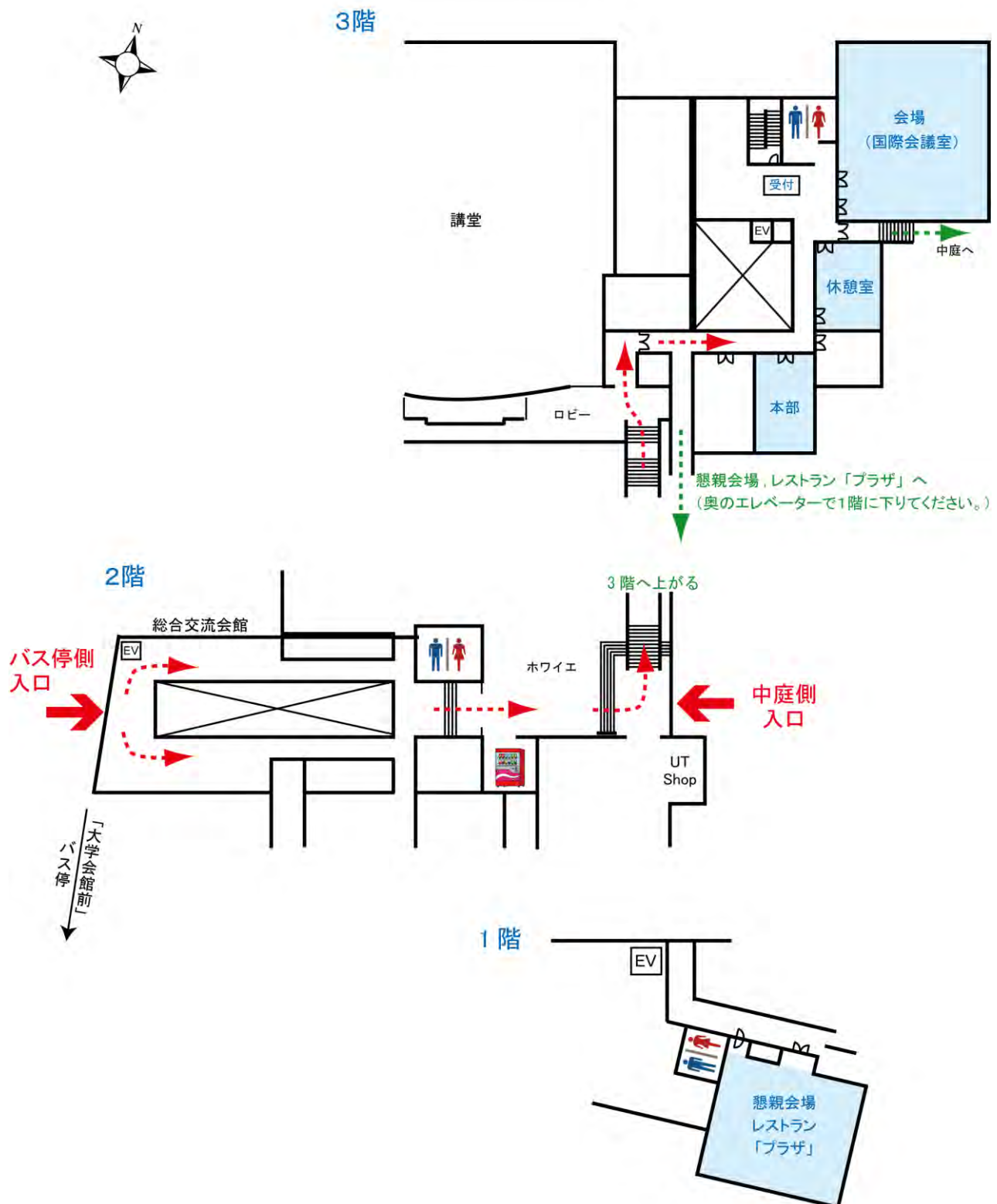
- ◆ **食事**: キャンパス内には複数の学生食堂・フードコート・レストランがあり、いろいろな種類の食事ができます。また、大学会館周辺の民有地にも飲食店があります。
- ◆ **コーヒー**: 中央図書館内にスターバックスコーヒーがあります。また学外には喫茶店があります。
- ◆ **図書館**: どなたでもご利用できます。中央図書館受付までお越しください。(9:00~17:00)
- ◆ **筑波大学ギャラリー**: 大学会館 2 階にあります。「朝永記念室」、「白川記念室」、「体育・スポーツ展示」、「筑波大学アートコレクション(絵画、版画、陶磁器、等)」、「筑波大学アートスペース」などがあります。昼休み等の空いた時間にどうぞ。(9:00~17:00) 筑波大学アートスペースでは、構成専攻クラフト領域の齋藤敏寿准教授による個展が行なわれています。
- ◆ **筑波大学アートツアー**: 筑波大学のキャンパスには、芸術専門学群の学生や卒業生、教員の制作した彫刻やモニュメントが展示されています。展示場所の情報→ http://www.art.tsukuba.ac.jp/art_tour/2010/
- ◆ **UT ショップ**: 大学会館 2 階にあります。筑波大学グッズ等の販売を行っています。(10:00~17:00)
- ◆ **書籍**: 大学会館の向かいの大学会館別館に書籍部(丸善)があります。(9:50~18:30)
- ◆ **その他の店舗**: 大学会館別館に郵便局、画材店、コンビニ、ATM(郵便貯金、常陽銀行)があります。

会場周辺マップ



(グレーで塗った地域はキャンパス外の民有地です。)

会場見取図



プログラム

8 月 26 日(木)

9:45 – 9:50 視覚科学フォーラム会長挨拶

9:50 – 9:55 世話人挨拶

座長：蟻川 謙太郎（総合研究大学院大学）

1. 10:00 – 10:30

視物質における光感受性制御メカニズム

筒井 圭^{1,2}・〇七田 芳則¹（¹京都大学大学院理学研究科・²現所属：大阪大学大学院生命機能学研究科）

2. 10:30 – 11:00

錐体における高い視物質リン酸化調節活性

有信 大輔¹・橋本 修志^{1,2}・〇河村 悟（大阪大学大学院・¹生命機能研究科・²理学研究科）

3. 11:00 – 11:30

ゼブラフィッシュ視細胞の光感度調節におけるオプシンキナーゼ活性の重要性

〇小島 大輔¹、白木 知也¹、和田 恭高^{1,2}、河村 悟²、西脇 優子³、政井 一郎³、Fivos Vogalis⁴、Trevor Lamb⁴、深田 吉孝¹（¹ 東京大学大学院理学系研究科, ² 大阪大学大学院生命機能研究科, ³ 沖縄科学技術研究基盤整備機構, ⁴Australian National University）

11:30 – 13:00 昼食（運営委員会・第3会議室）

◇ 13:00 – 14:00 講演会

マウスおよびヒト網膜 ON 双極細胞における TRPM1-L チャネルの機能解析

古川 貴久 ((財)大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門)

----- Coffee break -----

座長：小島 大輔（東京大学大学院理学系研究科）

4. 14:20 – 14:50

4層構造の網膜を持つハエトリグモの視物質の解析

〇永田 崇¹・小柳 光正¹・塚本 寿夫¹・磯野 邦夫²・蟻川 謙太郎³・寺北 明久¹（¹大阪市立大学大学院理学研究科・²東北大学大学院農学研究科・総合研究大学院大学先端科学研究科）

5. 14:50 – 15:20

シロチャウ類における視細胞分光感度の調節機構

○蟻川 謙太郎・若桑 基博・栗田 ひろ子^(¹総合研究大学院大学 先端科学研究科)

6. 15:20 – 15:50

核膜電位と細胞内カルシウム濃度変化の同時測定

山下勝幸 (奈良医大第一生理)

----- Coffee break -----

座長: 渡辺 修一 (埼玉医科大学医学部)

7. 16:10 – 16:40

マウス網膜における杆体信号経路のシナプス構築

○塚本 吉彦¹・臣 尚子¹ (¹兵庫医科大学・生物学教室)

8. 16:40 – 17:10

キンギョ Mb1 型双極細胞における EGTA 感受性の異なるグルタミン酸放出経路

○田中雅史¹・立花政夫¹ (¹東京大学大学院人文社会系研究科)

9. 17:10 – 17:40

コリン作動性アマクリン細胞で見られる二種類のコリン輸送

○金田 誠¹・重松 康秀²・霜田 幸雄² (¹慶應義塾大学医学部生理学教室・²東京女子医科大学総合研究所)

◇ 18:00 – 20:00 懇親会 (大学会館内レストラン「プラザ」)

8 月 27 日 (金)

座長: 澤井 元 (大阪大学医学系研究科)

10. 9:15 – 9:45

サル V2 野細胞の色と運動方向の組み合わせに対する選択的応答

○田村 弘・荒殿 航輔 (大阪大学大学院生命機能研究科)

11. 9:45 – 10:15

初期視覚野の機能的構造は半球を隔てて保存されているか?

○朝田 雄介¹・西本 伸志²・眞田 尚久³・大澤 五住^{1,4} (¹大阪大学大学院生命機能研究科・²カリフォルニア大学バークレー校・³ロチェスター大学・⁴JST CREST 吉岡プロジェクト)

12. 10:15 – 10:45

素材カテゴリ識別に関わるヒト視覚関連領域

○郷田直一^{1,2}・平松千尋^{1,3}・小松英彦^{1,2} (¹生理学研究所・²総合研究大学院大学・³京都大学大学院文学研究科)

◇ 10:45 – 11:30 「運営委員会報告および視覚科学フォーラムの将来に関する意見交換会」

11:30 – 12:30 (昼休み)

座長: 立花 政夫 (東京大学大学院人文社会系研究科)

13. 12:30 – 13:00

イモリの網膜再生メカニズムはどこまで解ったか

○千葉 親文 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

14. 13:00 – 13:30

網膜変性マウスにおける移植網膜視細胞の神経活動計測

○本間耕平¹・万代道子¹・高橋政代¹ (¹理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チーム)

----- *Coffee break* -----

座長: 宮地 栄一 (藤田保健衛生大学医学部)

15. 13:45 – 14:15

慢性低血糖マウスの月齢依存的視覚低下の原因の1つは桿体入力型双極細胞の応答低下である

○田丸文信¹・海野由美子²・Drew Everhart²・Yuning Sun²・Eduardo Solessio²・渡辺修一¹・The Late Robert Barlow Jr² (¹埼玉医科大学医学部生理学・²Center for Vision Research, Department of Ophthalmology, SUNY Upstate Medical University)

16. 14:15 – 14:45

げっ歯類成熟網膜組織培養と遺伝子導入法

○城宝 浩¹・森藤 暁²・田中謙二²・池中一裕²・小泉 周² (¹アステラス製薬・安全性研究所 ²自然科学研究機構・生理学研究所)

14:45 – 14:50 閉会の挨拶

視物質における光感受性制御メカニズム

筒井 圭^{1,2}・〇七田芳則¹

(¹京都大学大学院理学研究科・²現所属：大阪大学大学院生命機能学研究科)

Key words: 発色団、光異性化、対イオン

目 的

動物の目の視細胞に存在する視物質は、分子内に発色団として 11 シスレチナールを含む光受容タンパク質であり、光を受容して活性状態になり、G タンパク質を介するシグナル伝達系を駆動する。視物質が活性状態になる効率はレチナールが光を受容して異性化される効率に依存する。そのため、視物質の機能発現にとってこの反応が高い効率で起こることが重要である。我々はこれまでの研究から、脊椎動物タイプの視物質において、対イオンとして働く 113 番目のグルタミン酸残基 (E113) が光異性化反応 (量子収率) の促進に重要であることを発見した (1, 2)。一方、無脊椎動物タイプの視物質などは E113 をもたないことが知られており、E113 は分子進化の後になって脊椎動物タイプのロドプシン類で獲得されたことがわかっていく (3)。そこで、本発表では、紫外光受容体を含めた脊椎動物視物質の研究を概説したあと、113 番目以外の位置に対イオンを持つ脊椎動物視物質の変異体を利用した最近の研究を紹介する。

方 法

実験には、HEK293 培養細胞系で発現させたウシ・マウス・ニワトリの視物質およびそれらの変異体を試料として用いた。これら試料の光感受性は、紫外・可視分光法を用いた方法と HPLC を利用した方法で測定した (1, 4)。また、試料の分子吸光係数は酸変性法を利用して決定した (5)。なお、光感受性、分子吸光係数、量子収率の間には下記の関係式が成立する。

$$S \propto \varepsilon \cdot \phi$$

ここで、S は野生型ウシロドプシンの 500 nm の光に対する光感受性を 1 としたときの光感受性、 ε は分子吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$)、 ϕ は量子収率である。量子収率は、ウシロドプシン野生型の値 0.65 (6) に対する相対値として求めた。

結 果 および 考 察

視物質には可視光感受性のものと紫外光感受性のものが存在する。可視光感受性視物質の発色団はシッフ塩基がプロトン化しているのに対し、紫外光感受性視物質は脱プロトン化している。紫外光感受性視物質の脱プロトン化発色団が可視光感受性視物質のプロトン化発色団のように高効率で光異性化できるのかを調べるため、ウシロドプシン E113Q 変異体 (アルカリ性でシッフ塩基が脱プロトン化する) とマウスの紫外光感受性視物質 (マウス UV) の量子収率を測定した。シッフ塩基が脱プロトン化する条件である pH 8.2 においてはウシロドプシン E113Q 変異体の量子収率は野生型と比較して有意に低かった。一方、シッフ塩基がプロトン化する条件である pH 5.5 においては野生型とほぼ等しい値を示した。これらの結果は、シッフ塩基のプロトン化が量子収率の上昇に寄与していることを示しているように思われた。さらに、脱プロトン化発色団をもつマウス UV の量子収率は、可視光感受性視物質よりは低かったものの、ウシロドプシン E113Q 変異体の脱プロトン化フォームと比較すると有意に高かつ

た。これらの結果から、マウス UV において脱プロトン化発色団の光異性化を促進する特異的なメカニズムが存在することが示唆された。

「対イオン」は発色団のシッフ塩基プロトンを安定化することにより可視光感受性を可能にしているアミノ酸残基である。脊椎動物の視物質においては 113 番目のグルタミン酸残基 (E113) が対イオンとして機能することが知られている。しかしシッフ塩基が脱プロトン化しているため対イオンを必要としないはずの紫外光感受性視物質においても E113 は保存されている。このことから、E113 が紫外光感受性視物質の光感受性に関与する可能性が考えられた。そこで、マウス UV の E113Q 変異体を作製しその量子収率を測定した。その結果、変異体の量子収率は野生型と比較して大きく低下した値を示した。この結果から、マウス UV において E113 が脱プロトン化発色団の高効率な光異性化に必要であることが明らかとなった。また、プロトン化発色団をもつニワトリの紫色感受性視物質 (ニワトリ紫) にも E113Q 変異を導入したところ、シッフ塩基が脱プロトン化すると同時に量子収率の低下が見られた。一方、ニワトリ紫に S90C 変異 (E113 を変異することなくシッフ塩基を脱プロトン化することのできる変異) を導入したところ、量子収率は野生型と比較して有意には変化しなかった。これらの結果は紫外光感受性視物質と可視光感受性視物質の両方において E113 が光異性化を促進していることを示唆している。また、紫外光感受性視物質において E113 が保存されていることに対して一つの説明が与えられた。

可視光感受性視物質において 113 番目以外の位置にある対イオンが光異性化を促進できるのかを検証するため、ウシロドプシンにおいて対イオンの位置を変えた一連の変異体を作製し解析を行った。具体的には、E113Q 変異または E113A 変異によって対イオンを中性化すると同時に、シッフ塩基近傍に位置する別の場所 (90 番目、94 番目、117 番目、292 番目) にグルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を導入した。その結果、分子吸光係数に関しては、一部の變異体において低下が見られたものの、その他の變異体は野生型と同程度の値を示した。また、量子収率は全ての變異体において野生型と比較して大きくは変わらなかった。これらの結果から、可視光感受性視物質が高い光感受性を持つためには対イオンは必ずしも 113 番目にある必要はないということが明らかとなった。ただ、全ての變異体においてヒドロキシルアミン感受性が大きく上昇したことから、シッフ塩基結合の安定性を保つうえで対イオンが 113 番目に位置することが重要であることが示唆された。

引用文献

1. Tsutsui et al., *Biochemistry* 46, 6437-6445 (2007)
2. Tsutsui et al., *Biochemistry* 47, 10829-10833 (2008)
3. Terakita et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 284-289 (2004)
4. Okano et al., *Photochem. Photobiol.*, 56, 995-1001 (1992)
5. Sakmar et al., *PNAS*, 86, 8309-8313 (1989)
6. Kim et al., *Biochemistry* 40, 13774-13778 (2001)

錐体における高い視物質リン酸化調節活性

有信大輔¹・橋本修志^{1,2}・河村 悟^{1,2}

(大阪大学大学院・¹生命機能研究科・²理学研究科)

Key words: 視物質、リン酸化、S-モジュリン/リカバリン

目 的

視物質は光受容によって活性化されたのち、視物質キナーゼによってリン酸化されて不活性化する。視物質キナーゼの活性は、桿体ではS-モジュリン/リカバリン（以下ではS-モジュリンとのみ記載する）によって¹⁾、また、錐体では錐体型S-モジュリンであるビジニン（従来はs26と呼んでいた）によって²⁾Ca²⁺濃度依存的に調節され、明順応に寄与していることが示されている。本研究では、このCa²⁺濃度依存的な視物質キナーゼの活性調節が桿体と錐体とでどの様に違い、どのように両者の光応答形成に寄与しているかを明らかにしたいと考えた。そこで、桿体でのS-モジュリンによるCa²⁺濃度依存的な桿体視物質キナーゼ（GRK1）の阻害と、錐体でのビジニンによるCa²⁺濃度依存的な錐体視物質キナーゼ（GRK7）の阻害とを比較検討した。

方 法

精製桿体、精製錐体の調製

コイ網膜より、密度勾配遠心法により、精製桿体と精製錐体を得た³⁾。一部の実験では精製した両視細胞をそのまま用いたが、多くの実験では膜試料を使った。膜試料は、凍結融解した桿体または錐体を遠心分離し、その沈殿画分として得た。内在性のS-モジュリン（桿体）やビジニン（錐体）を含まない膜試料が必要な場合は、膜試料を低Ca²⁺濃度溶液で十分に洗って除去した。これらの膜試料には内在性のGRK1（桿体）やGRK7（錐体）が残存している。

表面プラズモン共鳴法によるS-モジュリン、ビジニンとGRK1、GRK7ペプチドとの結合の定量的解析

コイGRK1またはコイGRK7のN末ペプチドをIAsys（Affinity Sensors, UK）のキューベットに固定化し⁴⁾、発現コイS-モジュリン、または発現コイビジニンのこれらペプチドに対するCa²⁺濃度依存的な結合を測定した。

結 果

S-モジュリンとビジニンの外節内濃度の決定

桿体、および錐体での視物質キナーゼのCa²⁺濃度依存的な活性調節を定量的に理解するためには桿体外節でのS-モジュリン濃度、錐体外節におけるビジニン濃度を知る必要がある。そこで、これらの定量を行った。その結果、暗順応した桿体外節でのS-モジュリン濃度は53 μM、また、暗順応した錐体外節でのビジニン濃度は1.2 mMという数値を得た。

桿体（GRK1/S-モジュリン）と錐体（GRK7/ビジニン）でのCa²⁺濃度依存的なリン酸化活性阻害の違い

GRK1阻害のS-モジュリン濃度依存性とCa²⁺濃度依存性、および、GRK7阻害のビジニン濃度依存性とCa²⁺濃度依存性と比べた。その結果、ビジニンによるGRK7阻害の方が大きく、Ca²⁺濃度依存性には大きな違いはなかった。この結果から、錐体の方がリン酸化酵素の阻害は

大きいことが示唆された。そこで、上記の外節内のS-モジュリン濃度（53 μM）、ビジニン濃度（1.2 mM）のもとで暗時の外節内Ca²⁺濃度（500 nM）におけるリン酸化の阻害程度を求めたところ、桿体では20%程度の阻害しか起こらないのに、錐体では50%程度の阻害が起こるとの結果を得た。錐体のGRK7活性は単位体積あたりで見ると桿体の100倍程度も高いので⁵⁾、暗順応直後に光が当たった状態（500 nM Ca²⁺）から強い光で明順応した状態（～10 nM Ca²⁺）に至る間で、桿体GRK1は相対値として0.8から1.0への活性変化、錐体GRK7は50から100への活性変化を起こすことが推定された。

S-モジュリンとビジニンの機能上の差異

S-モジュリンが桿体で、ビジニンが錐体で発現しているのでこれら両蛋白質は、それぞれの視細胞特異的な作用を持つこと、つまり、S-モジュリンは桿体GRK1に、また、ビジニンは錐体GRK7に特異的に、または、より強い作用を持つことが予想された。しかし、桿体GRK1を錐体ビジニンで阻害したところ、S-モジュリンと同程度の阻害を示した。同様に、桿体S-モジュリンも錐体GRK7に対してビジニンと同程度の阻害を示した。さらに、桿体GRK1のN末ペプチドはS-モジュリンとビジニンに同等の結合性を示し、また、錐体GRK7のN末ペプチドもビジニンとS-モジュリンに同等の結合性を示した。これらから、S-モジュリンとビジニンはGRK1とGRK7に対して同等に作用することが明らかになった。

考 察

錐体は非常に幅広い光強度の範囲で機能できると言われている。今回明らかになった、Ca²⁺濃度依存的な視物質キナーゼの幅広い活性調節は、低い光強度の領域（Ca²⁺濃度が比較的高い）から、高い光強度の領域（Ca²⁺濃度が非常に低い）にかけて視物質の活性化能を調節出来ることを意味するので、錐体が幅広い光強度の領域で機能するための1つのメカニズムであろうと考えられる。

S-モジュリンとビジニンは細胞のサブタイプ依存的に発現しておりそのアミノ酸配列の同一性は66%しかない。しかし今回示されたように、これらの蛋白質はGRK1、GRK7の両者に対して機能上の差異を見せなかった。細胞サブタイプ特異的に発現している蛋白質が、必ずしも細胞サブタイプ固有の機能を持っているのではないという知見は、分子進化の意義を考察する上で興味深いと言える。

引用文献

- 1) Kawamura, S. (1993) Nature, 362: 855-857
- 2) Kawamura, S. et al. (1996) JBC 271: 21359-21364.
- 3) Tachibanaki, S. et al., (2001) PNAS, 98: 14044-14049.
- 4) Torisawa, A. et al. (2008) Photochem. Photobiol. 84: 823-830.
- 5) Tachibanaki, S. et al. (2005) PNAS 102: 9329-9334.

ゼブラフィッシュ視細胞の光感度調節における オプシンキナーゼ活性の重要性

○ 小島 大輔¹、白木 知也¹、和田 恭高^{1,2}、河村 悟²、西脇 優子³、

政井 一郎³、Fivos Vogalis⁴、Trevor Lamb⁴、深田 吉孝¹

(¹ 東京大学大学院理学系研究科, ² 大阪大学大学院生命機能研究科,

³ 沖縄科学技術研究基盤整備機構, ⁴ Australian National University)

Key words: トランスジェニック系統、GRK7、錐体

目 的

脊椎動物の網膜には桿体と錐体という2種類の視細胞が存在し、各々の生理的役割に応じて異なる光応答特性を示す:

薄明視を担う桿体は、錐体に比べて光刺激に対する感度が高く、一方、昼間視を担う錐体は興奮からの回復が速い。

視細胞において光情報は、『光受容体の活性化→三量体型 G 蛋白質の活性化→cGMP 分解酵素の活性化→cGMP 濃度低下→cGMP 依存性カチオンチャネルの閉鎖』という過程を経て増幅され、電気的な信号に変換される。その後、これらの情報伝達因子が不活性化されることにより、視細胞は視興奮から回復する。この回復過程は光受容蛋白質オプシンの C 末端領域のリン酸化から始まるが、近年、コイ視細胞を用いた解析から、錐体オプシンのリン酸化は桿体オプシンのリン酸化に比べて 20 倍以上も速いことが明示された (Tachibanaki *et al.*, 2001)。このことは、オプシンキナーゼの活性や発現量が桿体・錐体間の光応答特性の違いを規定している可能性を示している。我々は一方、ゼブラフィッシュの錐体オプシンキナーゼ GRK7-1 の *in vitro* における活性 (Vmax) が、桿体オプシンキナーゼ GRK1A より約 30 倍も高いことを見出した (Wada *et al.*, 2006)。これらの知見から我々は、桿体と錐体における GRK 活性の違いが両者の光応答の特性に大きく寄与するのではないかと考えた。本研究では、視細胞の光応答特性に対するオプシンキナーゼの寄与を明らかにするため、錐体オプシンキナーゼ GRK7-1 を桿体に異所発現するトランスジェニック系統を作製し、その光応答特性を解析した。

方 法

Tol2 transposon system (Kawakami *et al.*, 2004) を用いて、GRK7-1 を桿体に異所的に発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統 (GRK7-tg)、ならびに GRK1 を桿体に過剰発現する系統 (GRK1-tg) を樹立した。

これらの系統における単一桿体の光応答を測定するため、吸引電極法を用いた解析を行った。また、桿体由来の視覚機能を個体レベルで解析するため、錐体が機能しない突然変異 (*eclipse*; Nishiwaki *et al.*, 2008) をバックグラウンドにもつ個体を用いて、視覚性眼球運動 (optokinetic response, OKR) を測定した。

結 果

免疫組織化学的解析により、GRK7-tg において GRK7 が桿体に異所発現することを確認した。GRK7-tg 網膜の懸濁液を用いてロドプシンリン酸化活性を測定したところ、野生型の網膜に比べて約 5 倍の活性上昇が見られた。これらの解析から、GRK7-tg 桿体に発現している GRK7 は高活性を維持していると判断した。

次に、単一細胞レベルでの桿体の光応答を測定した結果、

GRK1-tg 桿体の応答特性には野生型と比べて大きな違いは見られなかったが、GRK7-tg 桿体では光感度が 12% に低下していることが分かった。このことから、GRK 活性が視細胞の光感度調節に重要な役割を果たすと考えられた。ところが予想とは異なり、光応答のピークに到達するまでの時間や光応答からの回復に要する時間は、GRK7-tg 桿体の方が野生型に比べて約 2 倍長くなっていた。この原因は現在のところ不明である。

さらに、個体レベルでの視覚機能解析 (桿体由来の OKR 測定) を行ったところ、GRK7-Tg 個体はコントロール個体と比較して、より強い光強度下において OKR を示すことがわかった。また、OKR における眼球追従速度の光強度依存性を詳細に解析したところ、GRK7-tg 個体におけるピーク光強度はより明るい方向へとシフトしていることを見出した。この結果より、GRK7-Tg 桿体の光感度の低下は個体レベルの視機能に反映していると考えた。

考 察

錐体オプシンキナーゼ GRK7 を桿体に異所発現し、桿体の GRK 活性を大きく亢進させることにより、桿体の光感度が低下することがわかった。このことから、視細胞における GRK 活性の大きさが、桿体と錐体の光感度の違いに寄与することが強く示唆された。

引用文献

- Tachibanaki S, Tsushima S, Kawamura S. Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14044-14049. 2001.
- Wada Y, Sugiyama J, Okano T, Fukada Y. GRK1 and GRK7: unique cellular distribution and widely different activities of opsin phosphorylation in the zebrafish rods and cones. *J Neurochem* 98:824-837. 2006.
- Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N, Mishina M. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Dev Cell* 7:133-144. 2004.
- Nishiwaki Y, Komori A, Sagara H, Suzuki E, Manabe T, Hosoya T, Nojima Y, Wada H, Tanaka H, Okamoto H, Masai I. Mutation of cGMP phosphodiesterase 6alpha'-subunit gene causes progressive degeneration of cone photoreceptors in zebrafish. *Mech Dev* 125:932-946. 2008.

4 層構造の網膜を持つハエトリグモの視物質の解析

○永田崇¹・小柳光正¹・塚本寿夫¹・磯野邦夫²・蟻川謙太郎³・寺北明久¹

(¹大阪市立大学大学院理学研究科・²東北大学大学院農学研究科・総合研究大学院大学先端科学研究科)

Key words: 4 層構造網膜、視物質、ハエトリグモ

目 的

眼は視覚を支える重要な光受容器であるが、動物種によりその形態は多様である。形態視、色覚、立体視などの高度な視覚機能を支える眼の中で、脊椎動物やイカ・タコなどが持つカメラ眼や昆虫の持つ複眼については、光学系から光受容分子に至る様々なレベルでの研究が進んでいる。一方、これらの眼とは形態的・系統的に異なる単眼についての研究は著しく立ち遅れており、特に分子レベルでの知見は皆無だった。我々は単眼による視覚の分子基盤の解明は、視覚の進化や多様性を理解する上で重要であると考え、発達した視覚機能に関与しているクモ類の単眼、特にハエトリグモの主眼と呼ばれる単眼に注目した。ハエトリグモの主眼は高い空間分解能を持ち、また色弁別、立体視にも関わることが知られており (Forster, 1979; Nakamura and Yamashita, 2000)、交尾行動や捕食行動で重要な役割を果たす。興味深いことに、ハエトリグモの発達した視覚を支える主眼の網膜は視細胞の受光部 (感桿) が 4 層に積み重なった非常に特殊な構造をしている (Land, 1969)。この 4 層構造網膜の役割については、レンズによりが生じる色収差 (光の波長によって焦点距離が異なること) の補正や、異なる距離に同時にピントを合わせるための複数の焦点面の構成など、いくつかの説がある (Land, 1969; Blest et al., 1981)。しかし、これまでのところ視物質の性質や分布などの情報が欠けているため、結論は得られていない。そこで我々はハエトリグモの視物質遺伝子の同定を行い、4 層構造網膜における視覚の分子基盤の解析を行った。

方 法

ハエトリグモの眼から作製した cDNA を用い、視物質遺伝子のクローニングを行った。主眼で機能する視物質を特定するため、得られた 4 種類の視物質遺伝子についてそれぞれ半定量的 PCR を行って主眼とそれ以外の眼 (副眼) における発現を解析した。

培養細胞 HEK293S を用いて視物質を発現させた後、11-*cis*-retinal を加えても色素を生成しなかった視物質について、それぞれのオプシンがどのような吸収特性を持つ色素を作り出すのかを知るために、遺伝子導入により視細胞にこれらの視物質を発現する遺伝子組み換えショウジョウバエの作製を行った。これらのショウジョウバエについて、主要な視物質と遮蔽色素を遺伝学的に欠損させた上で網膜電図の測定を行った。

それぞれの視物質の主眼網膜における分布を明らかにするために、単離したオプシンの C 末端を認識するポリクローナル抗体を作製し、これらを用いて免疫組織化学的解析を行った。

結 果

RT-PCR による解析により、ハエトリグモから得られた 4 種

類の視物質遺伝子の中で、4 層構造網膜を持つ主眼に発現する 2 種類の視物質を決定した。次にこれらの視物質の吸収特性を調べた。1 種類の視物質は、培養細胞系による発現結果から、緑色感受性視物質であることが明らかになった。次にもう一方の視物質について、その視物質を視細胞に発現させた遺伝子組換えショウジョウバエを作製し、網膜電図の詳細な解析によって、UV 感受性視物質であることが分かった。実際に、網膜電図の測定により決定したハエトリグモ主眼網膜の分光感度はこれらの 2 種類の視物質の吸収特性の組み合わせにより説明できた。次にこれら 2 種類の視物質に対して作製した抗体を用いて、4 層構造網膜における局在の解析を行った結果、それぞれの視物質は層ごとに分布していることがわかった。

考 察

主眼の光学系に関する先行研究から、各層には異なる波長の光がフォーカスすることがわかっている (Blest et al., 1981)。この知見を踏まえると、今回の結果から網膜の 4 層構造はこれまでに仮説として考えられていた色収差の補正および焦点深度の拡張の両方の機能を持つことが強く示唆された。一方で、これらとは全く異なる視覚機能に関わる可能性も示唆された。この可能性について、検証実験の結果を紹介しながら議論したい。

引用文献

- Blest, A.D., Hardie, R.C., McIntyre, P., Williams D.S. The spectral sensitivities of identified receptors and the function of retinal tiering in the principal eyes of a jumping spider. *J. Comp. Physiol.* 145:227-39. 1981.
- Forster, L.M. Visual mechanisms of hunting behavior in *Trite planiceps*, a jumping spider (Araneae, Salticidae). *New Zeal J Zool* 6:79-93. 1979.
- Land, M.F. Structure of the retinae of the principal eyes of jumping spiders (Salticidae: Dendryphantinae) in relation to visual optics. *J Exp Biol* 51:443-70. 1969.
- Yamashita S., Nakamura T. Learning and discrimination of colored papers in jumping spiders (Araneae, Salticidae). *J. Comp. Physiol. A* 186:897-901. 2000.

シロチョウ類における視細胞分光感度の調節機構

○蟻川謙太郎・若桑基博・栗田ひろ子

(¹総合研究大学院大学 先端科学研究科)

Key words: 視物質、遺伝子重複、昆虫色覚

目 的

訪花性昆虫の代表格であるチョウ類は、鋭敏な色覚をもっている。中には分光感度の異なる視細胞を6種類以上ももっているものがあり、その基礎にある視物質の多様性も顕著である。面白いのは、種による多様性が著しいことで、この点でチョウ類は最近、色覚進化の格好の研究対象として注目を集めている(Arikawa, 2003; Briscoe, 2008; Briscoe et al 2010)。

モンシロチョウは、紫外線・紫・青・緑・赤・暗赤の6種の視細胞を持つ(Qiu & Arikawa, 2003ab)。一方、モンシロチョウ複眼には、視物質オプシンが4種(紫外型1種、青型2種、長波長型1種)ある(Arikawa et al 2005, Wakakuwa et al 2004)。分光感度、とくに緑、赤、暗赤の3種については明らかに、ひとつの長波長視物質だけでは説明できない。また雄は二峰性青受容細胞という視細胞をもつ。この起源も視物質だけでは説明が困難である。

モンシロチョウで青視物質が2種発現しているのは、遺伝子重複による。青視物質の重複はシジミチョウ科でもある。またアゲハ類では長波長視物質が、ドクチョウ類では紫外視物質が重複している。こうした視物質遺伝子の多様化が視細胞分光感度の多様化とどう関係しているか、興味深い。

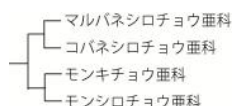
ここでは、モンシロチョウ視細胞の多様な分光感度が生じる仕組みと、シロチョウ類における青視物質の進化に関する最近の結果を紹介する。

方 法

実験には、室内で飼育したモンシロチョウ(*Pieris rapae crucivora*)の雌雄を用いた。その他のシロチョウ類は、野外で採集した。

視細胞分光感度は細胞内微小電極法で記録した。視細胞には光子数を揃えた単色光を300–700nmの範囲で20nmおきに照射し、各波長に対する反応を記録した。記録後、視細胞には色素を注入し、個眼内での局在を同定した。視細胞に発現する視物質は、オプシン mRNAの分布を *in situ* hybridization 法で調べ、分光感度との対応を検討した。

シロチョウ科における青視物質の多様性については、シロチョウ科に含まれる4つの亜科(下図参照)のうち、国産種がいる3つの亜科について調べた。コバネシロチョウ亜科のヒメシロチョウ、モンキチョウ亜科のColiadinaeのキチョウとモンキチョウ、モンシロチョウ亜科のツマキチョウを選定し、定法に従って視物質遺伝子の塩基配列を決定した。



結 果 と 考 察

1) 長波長受容細胞の生成機構

緑・赤・暗赤受容細胞にはすべて、共通の長波長視物質 PrL が発現している。緑受容細胞の分光感度は563nmに極大をもつ視物質の吸収スペクトルで説明できた。赤と暗赤はいずれも、個眼の感桿周囲に存在する色素のフィルター効果によって生成していることが分かった。

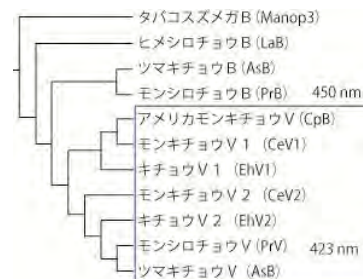
2) 紫受容細胞の性的二型

雌雄ともに、紫受容型視物質 PrV を発現する視細胞を2つ含む個眼が存在する。雌ではこの視細胞は423nmに極大をもつ紫受容細胞で、感度はやはり423nmの視物質で説明できた。

雄の二峰性青受容細胞は、分光感度が極端に狭く、極大は460nmである。この視細胞を含む個眼を調べたところ、420nmの励起光の下で強い蛍光を発した。また、この細胞には PrV が発現していた。二峰性青受容細胞の感度は、PrV に蛍光物質のフィルター効果が加わって生成されたものであることが分かった。

3) シロチョウ科青視物質の進化

ヒメシロチョウでは青視物質は1つのみ、他の種ではすべて青視物質が2種類あった(下図)。したがって、青視物質はモンキチョウ亜科とモンシロチョウ亜科の共通祖先で重複したと考えられる。



また、青視物質の起源はガ類とも共通で、吸収極大が450nm付近のいわゆる青だったとみられる。重複した遺伝子はより短い波長を吸収する視物質へと進化し、紫外線との間を埋めつつ、短波長領域の波長弁別能を向上させる効果があったものと考えられる。

引用文献

- Arikawa 2003 *J. Comp. Physiol. A* **189**, 791-800
 Arikawa, Wakakuwa, Qiu, Kurasawa, Stavenga 2005 *J. Neurosci.* **25**, 5935-5942
 Briscoe 2008 *J. Exp. Biol.* **211**, 1805-1813
 Briscoe, Bybee, Bernard, Yuan, Sison-Mangus, Reed, Warren, Llorente-Bousquets, Chiao 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3628-3633
 Qiu, Arikawa 2003a *J. Exp. Biol.* **206**, 2787-2793.
 Qiu, Arikawa 2003b *J. Comp. Physiol. A* **189**, 81-8.
 Wakakuwa, Stavenga, Kurasawa, Arikawa 2004 *J. Exp. Biol.* **207**, 2803-2810

核膜電位と細胞内カルシウム濃度変化の同時測定

山下勝幸

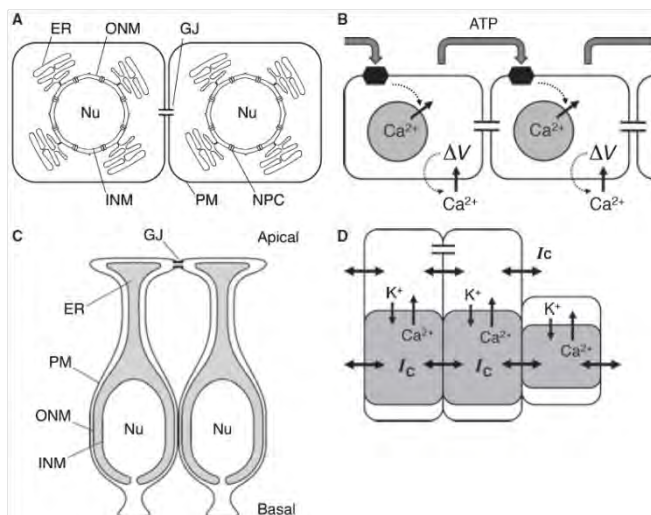
(奈良医大第一生理)

Key words: nuclear envelope, calcium store, membrane potential

目 的

核膜は内外2枚の膜から構成され、その内腔は小胞体の内腔と連続し、細胞内 Ca^{2+} ストアとして機能する(下図 A)。発生初期の網膜神経上皮細胞、網膜神経節細胞では核膜が細胞膜と密着する(下図 C)。核膜の膜電位変化はオルガネラをラベルする電位感受性蛍光色素[$\text{DiOC}_5(3)$]を用いて検出可能となった(Yamashita et al., 2006)。核膜の膜電位変化は細胞間で同期することから、 Ca^{2+} 放出にともなう核膜の膜電位変動が細胞膜を介する容量性電流(I_c)により細胞間で同期すると考えられる(下図 D, Yamashita, 2008; 2006)。しかし、 $\text{DiOC}_5(3)$ の蛍光特性をさらに明確にする必要性があった。

そこで本研究では、 $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光と、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Fura-2、及び、Fura Red を用いて、核膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の同時測定を行い、両者の関係を明らかにすることを目的とした。



細胞間連絡様式の模式図。ER, endoplasmic reticulum; GJ, gap junction; I_c , capacitive current; INM, inner nuclear membrane; Nu, nucleoplasm; ONM, outer nuclear membrane; PM, plasma membrane. 灰色部分が Ca^{2+} ストアを示す(Yamashita, 2010b より引用)。

方 法

鶏胚網膜神経層を Fura-2 AM、または、Fura Red AM により染色し(10 μM , 1 h)、次に $\text{DiOC}_5(3)$ で染色した(2 μM , 20 min)。OSP-3 (Olympus) を用いて Fura-2(380 nm 励起)と $\text{DiOC}_5(3)$ (480 nm 励起)の同時蛍光測定を行った。Fura Red と $\text{DiOC}_5(3)$ の同時測定には、470 nm の青色 LED (5 mW) で励起し、660 nm のロングパスフィルターを用いて蛍光を分離した。蛍光強度の測定にはフォトマルチプライア(H5784, 浜松ホトニクス)を用いた。 Ca^{2+} 放出はムスカリン受容体のアゴニスト(carbamylocholine, CCh, 100 μM) 投与により誘起した(Yamashita et al., 1994)。

結 果

CCh 投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、Fura-2(380 nm) 蛍光の減少、及び、Fura Red 蛍光の減少により表示された。一方、 $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光は、Fura-2、及び、Fura Red の蛍光減少に

先行して増加した。細胞内 Ca^{2+} 濃度が元に戻る時には、 $\text{DiOC}_5(3)$ の蛍光は急激に減少した。そこで、 Ca^{2+} 放出と取り込みにより生じる細胞内 Ca^{2+} ストアの膜電位変化が、 $\text{DiOC}_5(3)$ の蛍光変化により表示されるか検討した。細胞内 Ca^{2+} ストアに存在する Ca^{2+} ポンプの阻害剤であるタプシガルギン(1 μM in Ca^{2+} -free solution)を投与すると $\text{DiOC}_5(3)$ の蛍光は増加し、タプシガルギンの washout と細胞外 Ca^{2+} の添加により $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光は急激に減少した。また、ミトコンドリアを特異的にラベルする膜電位感受性蛍光色素(rhodamine 123)で染色し、ミトコンドリアを脱分極させるプロトノフォア(FCPP, 10 μM)を投与すると、rhodamine 123 の蛍光は持続的に増加したが、 $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光は一時的にわずかな増加を示した。高 K^+ 溶液(50 mM)投与により細胞膜の膜電位を持続的に脱分極させた場合、 $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光は一時的な減少を示した。

考 察

細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} が放出されるとストアの内腔の電位は負方向に変化すると考えられる。また、 Ca^{2+} ストアに Ca^{2+} が充填される時は、 Ca^{2+} ポンプが起電性であることから正方向に変化する。今回の結果から、 $\text{DiOC}_5(3)$ の蛍光増加は Ca^{2+} ストアの膜電位の負方向の変化を表し、その減少は正方向の変化を表すと結論される。また、 $\text{DiOC}_5(3)$ 蛍光はミトコンドリアの膜電位変化、或は、細胞膜の膜電位変化を直接的には表示しないことが示唆された。

細胞間連絡様式にはギャップ結合や細胞外伝達物質(ATP 放出など)が想定される(図 B, Yamashita, 2010a; 2010b)。これらに対し、容量性電流による細胞間同期(図 D)は新規なモデルである。核膜の膜電位は自発的なオシレーションを示すことから、このモデルにより自発的な Ca^{2+} オシレーションの細胞間同期を説明することが可能と考えられる。今後は、容量性電流による細胞間同期の機能的意義を、細胞膜の膜電位変化の面から検討する必要がある。

引用文献

- Yamashita M. Synchronization of Ca^{2+} oscillations: Is gap junctional coupling sufficient? *FEBS J* 277:277. 2010a.
 Yamashita M. Synchronization of Ca^{2+} oscillations: a capacitive (AC) electrical coupling model in neuroepithelium. *FEBS J* 277:293-9. 2010b.
 Yamashita M. Synchronous Ca^{2+} oscillation emerges from voltage fluctuations of Ca^{2+} stores. *FEBS J* 275:4022-32. 2008.
 Yamashita M. 'Quantal' Ca^{2+} release reassessed — a clue to oscillation and synchronization. *FEBS Lett* 580:4979-83. 2006.
 Yamashita M, Sugioka M, Ogawa Y. Voltage- and Ca^{2+} -activated potassium channels in Ca^{2+} store control Ca^{2+} release. *FEBS J* 273:3585-97. 2006.
 Yamashita M, Yoshimoto Y, Fukuda Y. Muscarinic acetylcholine responses in the early embryonic chick retina. *J Neurobiol* 25:1144-53. 1994.

マウス網膜における杆体信号経路のシナプス構築

○塚本吉彦¹・臣尚子¹

(¹兵庫医科大学・生物学教室)

Key words: Rod bipolar cell, AII amacrine cell, Signal and noise

目 的

暗所視下では、数多くの杆体からの信号が杆体双極細胞、AII アマクリン細胞、(ON, OFF) 錐体双極細胞を経て最終的に (ON, OFF) 神経節細胞に集められる。絶対光覚に近いレベルでは、大多数の杆体は雑音のみを送るため、累積した雑音の中に光吸収に関するわずかな信号が埋もれ勝ちとなり、雑音が信号と混同される可能性が高い。この問題に対して、杆体視細胞から杆体双極細胞へのリボンシナプスにおいては非線形閾値 (threshold nonlinearity) による雑音除去機構が提唱されている (van Rossum and Smith, 1998; Field and Rieke, 2002)。閾値を比較的に高く設定して振幅の大きな信号のみを通過させることにより信頼性を保つ方式である。さらに、杆体双極細胞から AII アマクリン細胞へのリボンシナプスにおいては、複数個のシナプス小胞を同時に開口分泌 (multivesicular release: MVR) させることによって信号の増幅を図るしくみが示唆されている (Singer et al., 2004)。しかしながら、雑音回避が死活的に重要なこの経路において、多数あるリボンシナプスが複数の細胞間でどのように配分されているかについてはほとんど知られていない。同一の杆体双極細胞から特定の AII アマクリン細胞に多数のリボンシナプスを介して信号が伝達されるとすれば、MVR と同様の信号増幅効果が得られるはずである。われわれは、杆体双極細胞と AII アマクリン細胞について入力・出力シナプスの分布を定量的に調べて、その可能性を検討した。

方 法

マウス (C57BL/6J) 網膜の固定組織標本から 366 枚の連続超薄切片を作成し、電子染色のあと 3000 倍でモンタージュ EM 撮影した (JEM1200EX)。細胞輪郭の X, Y 座標を PC に取り込み、画像ソフト (TRI3D, RATOC 社) で 3 次元再構築した。

結 果

1) 1 個の杆体視細胞は 2 個の杆体双極細胞へリボンシナプスを介して信号を送る。逆に、1 個の杆体双極細胞は約 20 個の杆体から信号を集める。

2) 1 個の杆体双極細胞は約 50 個のリボンシナプスを有するが、その 60% 余を介して 1 個の特定の AII アマクリン細胞にシナプス伝達する。残りの 40% 弱を介して 2~3 個の他の AII アマクリン細胞が信号を受け取る。

3) 1 個の AII アマクリン細胞は約 12 個の杆体双極細胞から信号を集めるが、きわめて偏った重み付けがされている。わずか 2 個の杆体双極細胞が当該の AII アマクリン細胞への全入力の 50% 以上をまかなう。

4) AII アマクリン細胞はすべての型 (5a, 5b, 6, 7, 8, 9) の ON 錐体双極細胞と程度差はあるもののギャップ結合をもつ。また、AII アマクリン細胞は相互にギャップ結合をもつ。

5) AII アマクリン細胞は大部分の型 (1, 2, 3a, 4) の OFF 錐体双極細胞にシナプス信号を送るが、なかでも 2 型の OFF 錐体双極細胞に 70% を超えるリボンシナプスを充当する。3 例の AII アマクリン細胞について、特定の 2 型 OFF 錐体双極細胞に与えるシナプスの最大個数は 18, 22, 23 (n=3) であった。3b 型 OFF 錐体双極細胞への AII アマクリン細胞からの

シナプス入力は今までのところ観察されなかった。

6) 内網状層上部において、少なくとも 2 種類の神経節細胞が直接に AII アマクリン細胞からシナプス入力を受ける。

第 1 種は、第 1 亜層 (深さ 0~20%) に樹状突起が分布する OFF 神経節細胞で、AII アマクリン細胞に加えて 2 型 OFF 錐体双極細胞から多数の、また 1 型 OFF 錐体双極細胞から少数のシナプス入力を受ける。

第 2 種は、第 2 亜層 (深さ 20~40%) に樹状突起が分布する OFF 神経節細胞で、AII アマクリン細胞に加えて 3a, 3b, 4 型 OFF 錐体双極細胞から多数の、また 2 型 OFF 錐体双極細胞から少数のシナプス入力を受ける。

考 察

1) 1 個の AII アマクリン細胞はほぼ 1 ダースの杆体双極細胞から信号を受けるが、そのうち 2 個の杆体双極細胞が主要な経路となり、それぞれ 30 個余のリボンシナプスを動員して同一信号の伝達に関与する。信号加算に関する平方根法則によれば、1 個のシナプスで伝達される信号の S/N 比と比べて約 5~6 倍 ($\sqrt{36}=6$) の改善を施していると推定される。

2) AII アマクリン細胞から OFF 錐体双極細胞へのシナプス伝達のうち、70% 余が 2 型 OFF 錐体双極細胞に集中する。1 個の 2 型 OFF 錐体双極細胞が受けるシナプス数が多い場合 (18, 22, 23) には約 4~5 倍 ($\sqrt{25}=5$) の S/N 比改善が推定される。マウス OFF 錐体双極細胞の中でも、2 型は軸索の直径が他型のものと比べて約 2 倍であり、軸索終末におけるリボンシナプス数も 2 倍余である (Ishii et al., 2009)。これら 2 型細胞の形態的特徴は軸索情報伝達の容量が比較的に大きいことを示唆しており、杆体信号に関する入力シナプス数が多いことと矛盾しない。

3) AII アマクリン細胞からすべての型の ON 錐体双極細胞への信号伝達はギャップ結合による。この電氣的伝達は元来雑音がきわめて小さい方式である。

4) 神経節細胞は数多くの杆体からの信号を加算する経路の下流に位置するために常に数多くの雑音を集めるが、暗所視下では少数の杆体しか光吸収に関する信号を発しない。そのわずかな信号を雑音から選り分け増幅するために、非線形閾値と線形加重の 2 つの機構が巧みに杆体信号経路のシナプス構築に組み込まれていると考えられる。

引用文献

- Field GD, Rieke F (2002) Nonlinear signal transfer from mouse rods to bipolar cells and implications for visual sensitivity. *Neuron* 34:773-785.
- Ishii M, Morigiwa K, Takao M, Nakanishi S, Fukuda Y, Mimura O, Tsukamoto Y. (2009) Ectopic synaptic ribbons in dendrites of mouse retinal ON- and OFF-bipolar cells. *Cell Tissue Res* 338:355-75.
- Singer JH, Lassová L, Vardi N, Diamond JS (2004) Coordinated multivesicular release at a mammalian ribbon synapse. *Nat Neurosci* 7:826-833.
- van Rossum MC, Smith RG (1998) Noise removal at the rod synapse of mammalian retina. *Vis Neurosci* 15:809-821.

キンギョ Mb1 型双極細胞における EGTA 感受性の異なるグルタミン酸放出経路

○田中雅史¹・立花政夫¹

(¹東京大学大学院人文社会系研究科)

Key words: ribbon synapse, goldfish retinal bipolar cell, transient / sustained glutamate release

目 的

網膜の双極細胞は、視細胞からの入力に緩電位応答し、軸索終末部の Ca^{2+} チャンネルを活性化させてグルタミン酸を開口放出し、シナプス後細胞であるアマクリン細胞や神経節細胞に視覚信号を送っている。従来、双極細胞からのグルタミン酸放出は、 Ca^{2+} チャンネルが局在するシナプスリボン近傍においてのみ起こると考えられてきた。ところが、キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞 (ON 型) の軸索終末部における開口放出イベントの時空間分布を全反射顕微鏡でイメージングした結果、開口放出はリボン近傍のみならずリボンから離れた部位でも生じることが明らかになった (Midorikawa et al., 2007)。また、リボン近傍からの開口放出は Ca^{2+} 流入の直後から一過性に生じたが、リボンから離れた部位からの開口放出は、 Ca^{2+} 流入後、遅れて持続性に生じた。この結果は、Mb1 型双極細胞からのグルタミン酸放出の一過性成分と持続性成分が、それぞれ異なるシナプスを介してシナプス後細胞に出力している可能性を示唆している。

本研究では、Mb1 型双極細胞から神経節細胞層に細胞体を持つ神経細胞 (GCL 細胞) への入力における、リボンシナプスとリボン無しシナプスの特性について検討した。EGTA は、Mb1 型双極細胞の一過性の放出成分に影響を与えることなく、持続性の放出成分のみを抑制することができる (Sakaba et al., 1997)。しかし、Mb1 型双極細胞は、樹状突起に存在するギャップ結合を介して隣接する Mb1 型双極細胞と電気的に結合しており (Arai et al., 2010)、1 個の Mb1 型双極細胞にパッチ電極から EGTA を導入しても、脱分極刺激の際に隣接する Mb1 型双極細胞群で生じる持続性の放出成分を抑制することはできない。そこで、膜透過性の EGTA-AM を灌流投与し、多数の Mb1 型双極細胞のリボン無しシナプスにおけるグルタミン酸放出を選択的に抑制することによって、GCL 細胞へのシナプス入力の特性を解析した。

方 法

キンギョの網膜スライス標本を用いた。GCL 細胞への入力の時間特性を解析するために、spontaneous EPSC (sEPSC) の自己コレログラムを計算した。また、GCL 細胞を Lucifer Yellow で染色し、内網状層における樹状突起の分布を調べた。

Mb1 型双極細胞と GCL 細胞からホールセル記録を行い、EGTA-AM の灌流投与によって、GCL 細胞の EPSC がどの程度減少するか調べた。細胞外液には、GABA 受容体、グリシン受容体、NMDA 受容体の阻害剤と、AMPA 受容体の脱感作阻害剤を加えた。EGTA-AM の灌流投与によって Mb1 型双極細胞で持続性放出が抑制されることは、穿孔パッチクランプ法を適用して、Mb1 型双極細胞の開口放出に伴う膜容量変化を測定することによって確かめた。

結 果

GCL 細胞からは、何も刺激をしない状態でも、sEPSC を記録することができた。遅い持続性の sEPSC が主体の GCL 細胞や、速い一過性の sEPSC が主体の GCL 細胞が存在した。sEPSC の時間特性を定量的に解析するために、sEPSC の自己コレログラムを計算した結果、GCL 細胞は、速い sEPSC が高頻度に生じる fast 細胞、遅い sEPSC が低頻度に生じる slow 細胞、速い sEPSC と遅い sEPSC が混在する complex 細胞に分類された。内網状層における樹状突起の分布を調べたところ、fast 細胞では単層に、slow 細胞と complex 細胞では 2 つの層に樹状突起を伸ばす傾向が認められ、とりわけ slow 細胞は 1 層と 5 層に樹状突起を伸ばすものが多かった。

Mb1 型双極細胞を脱分極刺激したときに GCL 細胞に発生する evoked EPSC (eEPSC) は、fast 細胞や complex 細胞では、刺激終了とともにただちに減衰した。これらの細胞では、EGTA-AM 灌流投与による eEPSC の抑制は小さかった。さらに、Mb1 型双極細胞を 3.3 Hz で連続刺激した際、これらの細胞はよく追従して応答した。

一方、slow 細胞での eEPSC は、刺激終了後も持続する非同期的特性を示した。EGTA-AM の灌流投与によって eEPSC は減少し、eEPSC の非同期的特性も抑制された。slow 細胞の一部は (sluggish 細胞)、eEPSC の潜時が 50 ms と長く、EGTA-AM による eEPSC の減少も顕著であった。また、slow 細胞や sluggish 細胞は、Mb1 型双極細胞の 3.3 Hz での連続刺激に十分に追従できなかった。

考 察

本研究の結果、Mb1 型双極細胞からリボン無しシナプスを介して入力を受ける割合は、GCL 細胞によって異なることが示された。リボン無しシナプスからの入力を比較的多く受ける GCL 細胞では、非同期的な持続性 eEPSC が見られ、リボン無しシナプスからの入力をあまり受けない GCL 細胞に対し、遅くて、持続的な視覚情報を処理している可能性が示唆された。

引用文献

- Arai I, Tanaka M, Tachibana M. Active roles of electrically coupled bipolar cell network in the adult retina. *J Neurosci* 30(27): 9260-70. 2010.
- Midorikawa M, Tsukamoto Y, Berglund K, Ishii M, Tachibana M. Different roles of ribbon-associated and ribbon-free active zones in retinal bipolar cells. *Nat Neurosci* 10(10): 1268-76. 2007.
- Sakaba T, Tachibana M, Matsui K, Minami N. Two components of transmitter release in retinal bipolar cells: exocytosis and mobilization of synaptic vesicles. *Neurosci Res* 27(4): 357-70. 1997.

コリン作動性アマクリン細胞で見られる二種類のコリン輸送

○金田 誠¹・重松 康秀²・霜田 幸雄²

(¹慶應義塾大学医学部生理学教室・²東京女子医科大学総合研究所)

Key words: cholinergic amacrine cell, P2X₂-purinoceptor, choline transporter

目 的

Invitro の発現系を用いた実験では、P2X₂ 型プリン受容体陽イオンチャネルが、N-methyl-D-glucamine のような巨大陽イオンに対しても透過性を有することが報告されている (Fujiwara et al., 2004)。しかしながら in vivo の P2X₂ 型プリン受容体陽イオンチャネルが、巨大陽イオン分子に対する透過性を持っているかどうかは検討されていない。

マウス網膜では、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞に P2X₂ 型プリン受容体が存在すること (Kaneda et al., 2004)、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では ATP を投与すると P2X₂ 型プリン受容体が活性化されて陽イオン電流が生じるが、P2X₂ 型プリン受容体がほとんど発現していない ON 型コリン作動性アマクリン細胞では小さな陽イオン電流しか生じないことが報告されている (Kaneda et al., 2008)。

本研究では、マウス網膜コリン作動性アマクリン細胞に存在する P2X₂ 型プリン受容体チャネルが、1) 細胞外コリンに対する透過性を有するかどうか、2) またコリンの細胞内取り込み経路として働いているのかどうかについてパッチクランプ法と免疫組織化学的手法を用いて検討を行った。

方 法

実験には GFP がコリン作動性アマクリン細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス網膜を用いた。網膜薄切切片標本または単離網膜神経細胞標本にホールセルパッチクランプ法を適用し、ATP 投与で誘発される P2X₂ 型プリン受容体を流れる陽イオン電流を記録し、解析に用いた。コリン作動性アマクリン細胞は、蛍光顕微鏡下で GFP 蛍光像陽性の細胞として同定した。逆転電位の観察は、電位依存性イオンチャネルをブロックした条件 (30mM tetraethylammonium Cl, 3mM 4-aminopyridine, 100 μM CdCl₂) で行った (Kaneda et al., 2007)。ATP は bath application 法を用いて投与した。免疫組織化学的観察は、マウス網膜凍結切片標本を用いて行った。凍結切片はマウス網膜を、4%paraformaldehyde を含む 0.1M 燐酸バッファー中で 15 分固定後、10, 20, 30% sucrose を含む 0.1M 燐酸バッファー中で各 1 日ずつ 3 段階に脱水したサンプルから作製した。免疫染色は choline transporter 抗体 (x300) を 4°C で 3 日間反応させた後、Alexa546 を室温で 2 時間反応させるというプロトコールで実施した。写真用の画像は、GFP と Alexa546 の singal threshold 等を共焦点顕微鏡 (Zeiss) のマニュアルに従って設定し、専用の offline コンピューターに取り込んだ。Alexa546 蛍光強度定量用の画像は、GFP と Alexa546 の蛍光最大強度が飽和しないレベルに取り込み感度を調節した後、画像の取り込みを行った。

結 果

OFF 型コリン作動性アマクリン細胞を -70mV に保持して 100 μM の ATP を投与すると内向き電流が観察された。この内向き電流は、細胞外液中の NaCl を choline Cl に置換した条件でも choline acetate に置換した条件でも観察された。一方 ON 型コリン作動性アマクリン細胞では、choline Cl 溶液中で ATP を投与しても内向き電流は観察されなかった。細胞外液中の choline acetate を等浸透圧の sucrose に置換して

逆転電位を観察すると、choline 濃度を 10 倍変化させたときに 25mV の逆転電位の移動が観察された。ATP で誘発されるコリン電流の濃度反応曲線は EC₅₀ が 46 μM、Hill 係数が 1.9 の曲線でフィットできた。これらの値は NaCl 溶液を用いたときに ATP で誘発される陽イオン電流の EC₅₀ (36 μM)、Hill 係数 (1.8) に近い値を示した。しかしながら最大応答値は NaCl 存在下に ATP で誘発される陽イオン電流の 30% であった。コリン電流は ATP-γ-S で誘発することができたが、α,β-methylene ATP や benzoyl, benzoyl ATP の投与では誘発されなかった。また ATP で誘発される choline 電流は PPADS 存在下では誘発されなかった。これらの薬理学的性質はマウス網膜 P2X₂ 型プリン受容体の薬理学的性質と一致するものであった (Kaneda et al., 2008)。

コリントランスポーターの免疫反応陽性像は、ON 型コリン作動性アマクリン細胞と OFF 型コリン作動性アマクリン細胞で観察された。ON 型と OFF 型各サブタイプ樹状突起におけるコリントランスポーター発現量を比較定量するため、GFP シグナルを用いて Alexa546 のシグナルを正規化し比較した。その結果コリントランスポーターは ON 型で有意に多く発現していることが明らかとなった。

考 察

本研究から、マウス網膜 OFF 型コリン作動性アマクリン細胞の P2X₂ 型プリン受容体はコリンに対してイオン透過性を有すること、コリントランスポーターは ON 型コリン作動性アマクリン細胞に多く存在することが明らかになった。これらの結果から ON 型コリン作動性アマクリン細胞ではコリントランスポーターが、OFF 型コリン作動性アマクリン細胞では、コリントランスポーターと P2X₂ 型プリン受容体がコリンの細胞内取り込みの経路として機能している可能性が示唆された。

引用文献

Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2004) Density-dependent changes of the pore properties of the P2X₂ receptor channel. *J Physiol (Lond)* 558, 31-43.

Kaneda, M., Ishii, K., Morishima, Y., Akagi, T., Yamazaki, Y., Nakanishi, S., and Hashikawa, T. (2004) OFF-cholinergic-pathway-selective localization of P2X₂ purinoceptors in the mouse retina. *J Comp Neurol* 476, 103-111.

Kaneda, M., Ito, K., Morishima, Y., Shigematsu, Y., and Shimoda, Y. (2007) Characterization of voltage-gated ionic channels in cholinergic amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol* 97, 4225-4234.

Kaneda, M., Ishii, T., and Hosoya, T. (2008) Pathway-dependent modulation by P2-purinoceptors in the mouse retina. *Eur J Neurosci*, 128-136.

サル V2 野細胞の色と運動方向の組み合わせに対する選択的応答

○田村弘・荒殿航輔

(大阪大学大学院生命機能研究科)

Key words: 色選択性、運動方向選択性、結びつけ問題

目 的

これまでの解剖学的、神経生理学的、そして心理物理学的研究の多くは、それぞれの視覚属性、すなわち、色、形、運動方向、両眼視差などの情報は、並列で独立な経路によって処理されていること示してきた (Nassi & Callaway 2009)。特に網膜から一次視覚野に至る経路では、独立・並列性は厳密に保たれている可能性が指摘されている。さらにこの独立・並列性は、前頭前野にまで至る可能性も示唆されている (Wilson et al. 1993)。一方、日常生活において、我々は統一した視覚経験を多くの場合維持している。例えば、視野に二つの視覚対象、右に動く赤い物体と上に動く青い物体、が存在する時に、色と運動方向の組み合わせを取り違えることはない。このような統一された視覚体験を維持するためには、独立・並列に処理されるそれぞれの視覚属性の情報が、何らかの方法で統一される必要がある。このような問題は「結びつけ問題」と呼ばれ、多くの研究者の興味を集めてきた。この問題の一つの解決方法は、単一の神経細胞による異なる視覚属性の情報の統合である。実際いくつかの研究は、一次視覚野以降において、従来考えられていたほど、各経路間の独立性は維持されておらず、異なる視覚属性の情報が単一細胞において混在する可能性を示している (例えば、Tamura et al. 1996)。しかしながら、実際に「結びつけ問題」の解決に必須である、特定の視覚属性の組み合わせに対して選択的な応答を示す神経細胞は報告されていない。そこで本研究では、特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的な応答を示す神経細胞が存在するのか、サル V2 野において検討した。

方 法

神経活動は、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) の V2 野より計測した。実験の手順は、NIH および日本神経科学会のガイドラインに従い、大阪大学動物実験委員会の承認を受けた。動物の頭部は、あらかじめ装着したヘッドポストを用いて固定した。計測実験中は、クエン酸フェンタニルにより鎮痛を行った。視覚刺激呈示のために眼球運動を停止する目的で、臭化パンクロニウムを動物に投与した。動物の心拍、血圧、呼吸二酸化炭素濃度、血中酸素飽和度を連続的に監視した。動物の体温はヒートパッドにより 37 度に維持した。V2 野から効率よく神経活動を計測するために、8 本のシャフトからなるテトロード電極アレー (A8X1 tetrode-2 mm 200-312, NeuroNexus, MI, USA) を用いて計測を行った。それぞれのシャフトの先端には 4 つの計測点が菱形に配置され、一組のテトロードを構成する。計測信号は 10000 倍に増幅し、フィルター (500-3000 Hz) を通過した後、50 μ 秒の分解能で計算機に保存した。オフラインでの自動弁別手法 (Kaneko et al. 1997; Tamura et al. 2004) を用いて、計測信号から、活動電位 (スパイク) の検出と、単一神経細胞活動への分類を行った。特定の刺激の組み合わせに選択的に反応する細胞は活動がまばら (スパース) である。従来の単一プローブ単一細胞計測手法は、このようなスパースな活動を示す細胞からの計測には不適当である。なぜなら、単一プローブ単一細胞計測手法は、比較的自発活動が高く、様々な刺激に反応する選択性の低い細胞から計測する傾向がある。一方、複数プロー

ブ複数細胞同時計測技術は電極周辺の細胞を全て計測する比較的バイアスの無い手法であるため、スパースな活動を示す細胞からの計測を可能とする。視覚刺激として、互いに等輝度 (20 cd/m²) の 15 または 29 色と 12 の運動方向の組み合わせからなる合計 180 または 348 種類の刺激を黒背景 (0.03 cd/m²) に呈示した。各刺激は、様々な空間周波数を含む一次元ノイズグレーティングで構成される。実験終了後、抗生物質、鎮痛剤の投与を行い、動物はケージへと戻した。一週間以上の期間をおいて、次の計測実験を行った。

結 果

これまで V2 野の 259 細胞より計測を行い、特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的に応答する細胞を見いだした。視覚刺激セットに対して、136 細胞 (53%) が視覚応答 ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis test) を示した。特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的に応答する細胞は、12 細胞 (9% of visually responsive neurons) 存在した。特定の色に対して選択的に応答する細胞 ($p < 0.05$, K-W test at optimal motion direction) は、61 細胞 (45% of visually responsive neurons)、特定の運動方向に対して選択的に応答する細胞 ($p < 0.05$, U-test at optimal color) は、25 細胞 (18% of visually responsive neurons) 存在した。刺激の輝度と背景の輝度を同一にした条件 (20 cd/m²) では、視覚応答を示す細胞は減少し、47 細胞 (24%, $n=195$ 細胞) となった。この条件で、視覚応答性細胞の多くは、色選択性を示したが (34 細胞、72%)、方向選択性を示す細胞はごく少数であった (3 細胞、6%)。これら少数の方向選択性細胞は色にも選択性を示した。つまり、色と方向の組み合わせに対して選択性を示す細胞であった。よって、刺激との輝度を背景と等輝度にした条件でも、色と運動方向の組み合わせに対する選択性は存在した。

考 察

サル V2 野に、特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的に反応する細胞が存在していたことから、V2 野または V2 野に入力を与える細胞において、色と運動方向の情報が統合されていることが明らかになった。これらの細胞は、背景との輝度コントラストが存在しない条件でも、選択性を維持した。特定の組み合わせに選択性を持つ細胞の出現頻度 (9%) は、運動方向選択性細胞の出現頻度と色選択性細胞の出現頻度の積 (0.45 × 0.18 = 8%) と同程度であったことから、ある視覚属性は、他の属性とは無関係に、各細胞に与えられていると考えられる。V2 野または V2 野以前での、単一細胞における視覚属性間の情報統合が「結びつけ問題」を解決するための一つの方法となる。

引用文献

- Kaneko et al. (1999) IEEE Trans Biomed Eng 46:280-290.
- Nassi & Callaway (2009) Nature Rev Neurosci 10:360-372.
- Tamura et al. (1996) Eur J Neurosci 8:300-309.
- Tamura et al. (2004) J Neurophysiol 91:2782-2796.
- Wilson et al. (1993) Science 260:1955-1958.

初期視覚野の機能的構造は半球を隔てて保存されているか？

○朝田雄介¹・西本伸志²・眞田尚久³・大澤五住^{1,4}

(¹大阪大学大学院生命機能研究科・²カリフォルニア大学バークレー校・³ロチェスター大学・⁴JST CREST 吉岡プロジェクト)

Key words: 皮質表現、受容野

目 的

ネコやサルなどの高等動物の視覚領野において、左視野の情報は右半球で、右視野のものは左半球で別々に処理されており、視野の正中線付近の情報だけは左右両半球で処理されている。したがって、物体がこの正中線付近にあるとき、視覚情報は二つの半球の間で繋ぎ合わせられなければならない。この時、方位および空間周波数のコラム構造などの大脳皮質における皮質表現は、半球内では視野網膜再現にしたがって、ほぼ連続性を保っている。この連続性は半球を隔てても保存されているのであろうか。例えば、受容野が近接している神経細胞ペアの応答特性は、半球を隔てても類似しているものであろうか。受容野の空間位置と応答特性の類似性および相関関係について検討した。

方 法

動物の飼養、管理、及び実験はすべて、米国国立衛生研究所が定めたガイドラインに従い、大阪大学動物実験委員会によって承認されたものである。

麻酔・不動化したネコの左右の大脳皮質 17/18 野境界領域において、2、3本のタングステン電極による単一ユニット記録を複数の神経細胞に対して同時に行った。単一ユニットを単離した後、まず、その優位眼と、優位眼における受容野のおおよその位置をバー刺激やグレーティング刺激を用いて決めた。フラッシュグレーティング刺激や運動するグレーティング刺激を用いて最適方位、最適運動方向、および最適空間周波数を計測した。そして、受容野の2倍から4倍程度の範囲に2次元のダイナミックノイズ刺激を呈示し、スパイクを記録した。

ノイズ刺激フレームは $36 \times 36 \sim 51 \times 51$ ドットからなり、ドットの大きさは神経細胞の最適空間周波数を元に、最適グレーティング刺激の明領域ないし暗領域（つまり半周期）にドットが2個から4個程度入るように決めた。

スパイクをトリガーとして、その直前の刺激フレームを取り出し、その局所領域を2次元フーリエ変換して、振幅スペクトルを求め、スパイク加算することで、空間周波数領域での応答特性をLSRC法（局所周波数領域逆相関法）により求めた（Nishimoto et al., 2006）。

同時記録された神経細胞の応答特性の類似度を、空間周波数領域の応答特性の相関係数で定義した。

さらに、LSRC法における局所領域を刺激フレーム内で走査し、空間位置に対する振幅スペクトルの強さの分布を求めることにより、神経細胞の受容野の大きさを見積もった。同時計測された受容野の空間的な位置関係を定量化するために、重畳度を計算した。受容野の重畳度は、二つの受容野の面積の平均に対する二つの受容野の重なり合う領域面積の割合で定義する。

結 果

両半球から同時記録され、振幅スペクトルの強さがZ-coreで6以上、かつ最大の応答を示す遅れ時間が20msから150msの間にある、という条件を満たす細胞ペアに対して以下の解析を行った。

半球を隔てて同時記録することができた神経細胞のペアは受容野の重畳範囲が占める割合が高くなるにつれて、空間周波数領域での応答特性が類似してくることがわかった。また、重畳範囲の狭い神経細胞ほど、応答特性が類似しないことも示された。

考 察

初期視覚野における皮質表現の連続性は、半球内に留まらず、半球を隔てて保存されている。

二つの大脳半球内の視覚情報を、同時に正確に一つの視覚像へ繋ぎ合わせるために、このような半球を隔てた皮質表現の連続性は重要な役割を果たしているかもしれない。

引用文献

Nishimoto S, Ishida T, Ohzawa I. (2006). Receptive field properties of neurons in the early visual cortex revealed by local spectral reverse correlation. *J Neurosci.* 26, 3269–80.

素材カテゴリ識別に関わるヒト視覚関連領域

○郷田直一^{1,2}・平松千尋^{1,3}・小松英彦^{1,2}

(¹生理学研究所・²総合研究大学院大学・³京都大学大学院文学研究科)

Key words: 視覚 fMRI 質感

目 的

我々は、日常的に、複雑な視覚入力から物体やシーンの情報を瞬時に抽出し理解している。このとき、多くの場合、物体の形状だけでなく、金属、石、木など、その多様な素材についても瞬時に認識することができる。素材の認識は、物体に対して適切な行動を選択するためにも重要である。しかしながら、このような素材の認識機能が脳においてどのように実現されているかはほとんど明らかになっていない。本研究では、種々のカテゴリの素材画像を観察したときの脳活動を機能的MRI (fMRI) で計測し、様々な脳領域の活動が、方位・空間周波数成分や輝度・色ヒストグラムなどの画像特徴と心理的(感性的)判断のいずれと関連しているかを検討した。特に、素材カテゴリ間の関係(非類似度)に着目し、様々な脳領域の活動パターンから素材カテゴリ間の非類似度を求め、これらを心理的印象及び画像特徴の素材カテゴリ間の非類似度と比較した。

方 法

被験者: 正常視力・三色型色覚を有する5名の被験者が実験に参加した。

視覚刺激: CG ソフトウェア (Lightwave3D) を使用し、9種類の素材カテゴリ画像(金属、ガラス、セラミックス、毛、石、木目、樹皮、皮革、布)を作成した。各カテゴリは異なる8つの画像から構成される(例: 右下図)。

fMRI 実験: 被験者が各素材カテゴリ画像を観察している時の脳活動を計測した (Siemens Allegra 3T)。各素材画像はカテゴリ毎に異なるブロックにおいて呈示され、各ブロック内では8つの素材画像が各2回ずつランダムな順序で呈示された。各画像の呈示時間は500ms、画像間の間隔は500msであった。被験者は、画像中央に置かれた注視点の色が変化したときに右手のスイッチを押すよう求められた。

fMRI 解析: 視覚関連領域を V1/V2、V3/V4、腹側高次領野(紡錘状回、側副溝周辺)、外側高次領野(外側後頭溝周辺)、背側高次領野(頭頂間溝周辺)の5つの領域に分割し、各領域内の視覚応答性の高いボクセルを関心領域とした。もし、ある脳領域の活動パターンが素材カテゴリによって大きく異なるならば、その脳活動パターンから被験者が観察している素材カテゴリを判別できると考えられる。そこで、機械学習の手法(線型サポートベクタマシン)を用いて、各被験者毎に各領域の脳活動パターンからある素材カテゴリ対がどの程度判別できるかを求め、得られた判別率を被験者間で平均し、その素材カテゴリ間の非類似度とした。

心理実験: fMRI 実験の後、各素材画像の心理的・感性的印象、及びその素材画像間の関係を意味微分法(SD法)を用いて計測した。各被験者は、光沢なしー光沢あり、不透明ー透明、単調ー複雑、不規則ー規則的、地味ー派手、粗いー滑らか、さらさらー湿った、冷たいー暖かい、柔らかいー硬い、軽いー重い、弾力なしー弾力あり、ナチュラルー人工的からなる12の形容詞対を用い、各画像(呈示時間500ms)の印象を5段階で評定した。12形容詞対の評定値(5名の平均値)についてカテゴリ平均を求め、それらの間のユークリッド距離を素材カテゴリ間の心理的非類似度とした。

画像解析: 各画像の中央部を切り出し、その輝度成分を4方位・3空間周波数の帯域に分解し、それぞれの帯域の平均強度を求めた。また、切り出した画像の輝度・色度の統計量(L*, a*, b*の平均、標準偏差、及びLの歪度、尖度)を求めた。これら20種類の低次統計量をそれぞれ標準化した後、これらのカテゴリ平均値の間のユークリッド距離を求め、画像特徴の素材カテゴリ間非類似度とした。

結 果

5つの視覚関連脳領域について得られた素材カテゴリ間非類似度を心理的印象及び画像特徴の素材カテゴリ間非類似度と比較したところ、画像特徴との相関はV1/V2において非常に高く、V3/V4、腹側高次領野の順に低くなることが明らかになった。一方、心理的印象との相関は腹側高次領野において最も高くなり、統計的に有意であった。また、各脳領域における非類似度について階層的クラスタ解析を行ったところ、腹側高次領野における9種の素材カテゴリに対する活動は3つの上位カテゴリに分けることができ、それらは心理的印象においてみられる3つの上位カテゴリと一致することが明らかになった。このような心理的印象と一致したカテゴリ構造は他の領域ではみられなかった。

考 察

以上の結果から、V1/V2では低次画像特徴に基づいた情報表現がなされており、腹側高次視覚野において心理的な素材カテゴリの基礎となる情報表現が形成されていると考えられる。また、我々が用いた心理的印象の尺度は、視覚的印象だけでなく、柔らかいー硬いなどの非視覚的な印象を含むものであり、腹側高次領野において異なる感覚モダリティの情報が統合されていることが示唆される。



イモリの網膜再生メカニズムはどこまで解ったか

○千葉 親文

(筑波大学・大学院生命環境科学研究科)

Key words: Newt, Regeneration, RPE, FGF2, MEK-ERK, Transgenesis

目 的

イモリ(有尾両生類)は、一生を通じて、四肢や尾(脊髄)、顎のみならず、心臓や脳の一部、眼球組織(水晶体や網膜)までも完全に再生する能力を保持している。18世紀以来、生物学者はこの動物の驚異的な再生能力に着目し、そのメカニズムの解明に挑んできた。その目的は一貫している。すなわち、究極の再生医療の実現である。イモリが見せる再生の様式は、事故等によって大規模に失われたボディ・パーツ(body-parts)を治療により再生させるにあたり、私たちが目指すべき理想である。

イモリは、眼球から神経性網膜をすべて失っても、これを完全に再生し、視覚を回復することができる。この再生に特徴的なことは、再生した神経組織の大部分が網膜色素上皮(RPE)細胞に由来する点である。すなわち、RPE細胞という単一の細胞種から複雑な神経回路網がつくられるのである。

成体イモリの網膜再生研究は伝統的に発生生物学領域で行われてきたが、モデル動物の導入とともに衰退し、1991年以降、途絶えてしまった。このような中、イモリの重要性を認め、その後の研究を支えたのは、他でもない視覚生理学の領域である。ここでは、網膜再生系を脳・中枢神経組織形成のモデルととらえ、緻密な免疫組織化学と電気生理学、さらには細胞培養技術をも組み合わせることで、網膜神経組織の再生過程(ニューロンの機能分化と神経回路網の構築過程)を初めて明らかにした(斎藤建彦教授・筑波大)。

この一連の研究から、イモリの網膜再生戦略の一端が垣間見えてきた。すなわち、この動物は成体の眼球内で発生の遺伝子プログラムを操ることで網膜神経組織を再生するのである。では、再生は発生と同じなのだろうか？それはあり得ない。何故なら、イモリの網膜再生は終分化したRPE細胞から始まるのである。では、どこまでが再生で、どこからが発生なのだろうか？もし、再生特有のメカニズムが存在するとしたら、イモリから学ぶべき最も重要な点はそれであろう。

この疑問に答えるべく、私たちはこれまで、新たな研究手法を開発しつつ、イモリ網膜再生の研究に尽力してきた。今回の報告では、それらの成果を概説するとともに、イモリ網膜再生に固有のメカニズムは何なのかを議論する。さらに、現在開発中の新技術についても紹介する。

方 法

成体イモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の網膜再生過程を記載する目的で、終分化RPE細胞に特異的に発現するRPE65遺伝子を同定し、抗体を用いて免疫組織化学解析を行った。

イモリの示す網膜再生のプロセスのうち、どこまでが再生特有で、どこからが発生と共通なのかを探る目的で、脊椎動物の網膜発生中に発現する遺伝子、特に網膜幹細胞/前駆細胞を特徴づける遺伝子を単離し、網膜再生過程におけるそれらの発現様式と機能について調べた。

未成熟RPE細胞の神経性網膜への分化転換誘導に関わるFGF2→MEK1/2-ERK1/2→Pax6経路が成体イモリの網膜再生誘導に関わり得るか、成体イモリRPE細胞のFGF2に対する応答を独自の無血清培養系で解析した。

イモリのトランスジェニック技術の開発を試みた。

結 果 と 考 察

RPE65をトレーサーとして解析した結果、網膜再生過程が少なくとも9段階に分かれることが判った。また、RPE65タンパク質が2-3層の再生網膜(網膜前駆細胞)にまで残存することから、網膜再生過程には完全な脱分化段階が存在しないことが判った(Chiba et al., 2006)。

網膜幹細胞/前駆細胞を特徴づける遺伝子としてPax6、Musashi1、Chx10-1、Notch1を同定し、その発現と機能について解析した。その結果、次のような仮説が導出された：RPE細胞は、神経性網膜の除去後5-10日をかけて網膜幹細胞様の細胞に転換(cell-type switch)し、神経性網膜とRPE両方の前駆細胞を生み出す；その後、それぞれの前駆細胞から発生と共通のプロセスを経て神経性網膜とRPE自身が再生する(Nakamura and Chiba, 2007; Mitashov and Chiba, 2007; Susaki et al., 2008; Kaneko et al., 2008)。

成体イモリの網膜再生に対するFGF2→MEK1/2-ERK1/2→Pax6経路の関与について、RPE細胞の無血清培養系を用いて解析した結果、FGF2がMEK1/2-ERK1/2細胞内シグナル経路の活性化を介して、RPE細胞の増殖を促進することが判った。しかし、RPE細胞の細胞周期(S期)進入やPax6発現には影響しないことから、再生の誘導には別のシグナル経路が関与すると考えられる。実際、RPE細胞がFGF2に対して応答するようになるのは培養5日以降である(Susaki and Chiba, 2007)。

以上の結果から、成体イモリのRPE細胞は神経性網膜の外傷を感知してから5-10日以内に遺伝子プログラムを書き換え(リプログラム)、網膜幹細胞様の細胞に変化すると考えられる。この過程こそがイモリ固有であり、明らかにされるべきメカニズムである。現在、その解明に向けて、リプログラム誘導に関わるシグナル経路と即初期遺伝子、エピジェネティックな遺伝子発現制御の解析を始めている。

イモリは様々なボディ・パーツが再生するユニークな実験動物である。しかし、遺伝子レベルでの解析技術が乏しいため、研究は遅々としている。しかし、私たちはすでに効率のよいイモリ・トランスジェニック・ライン作製技術を確認し、網膜再生の初期過程に関わる遺伝子群を解析する準備に入った。網膜再生系は、他のボディ・パーツ再生系と異なり、RPE細胞という単一の細胞種を再生の起源とすることや、その細胞に特異的な遺伝子RPE65のプロモーターが利用できる点で有利である。今後、この系を用いて、再生の主幹分子メカニズムを解明したい。

引用文献

- Kaneko & Chiba (2009) *Neurosci. Lett.* 450: 252-257.
- Susaki et al. (2009) *Exp. Eye Res.* 88: 347-355.
- Chiba & Mitashov (2007) In: *Strategies for Retinal Tissue Repair and Regeneration in Vertebrates: from Fish to Human*. Chiba, C. (Ed.) India, Research Signpost, pp. 15-33.
- Susaki & Chiba (2007) *Pigment Cell Res.* 20: 364-379.
- Nakamura & Chiba (2007) *Brain Res.* 1136:28-42.
- Chiba et al. (2006) *J. Comp. Neurol.* 495:391-407.

網膜変性マウスにおける移植網膜視細胞の神経活動計測

○本間耕平¹・万代道子¹・高橋政代¹

(¹理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チーム)

Key words: Retinal transplantation, Rod photoreceptor, Ca(2+) imaging

目 的

網膜色素変性、加齢黄斑変性などの網膜疾患では、光刺激を受取る視細胞が変性、細胞死を引き起こし、失明に至る場合もある。しかし、現在これらに対する実用的な治療方法は存在しない。現在、この有力な候補として網膜細胞移植が考えられている。最近の研究で、マウスの幼若な網膜から取得した網膜前駆細胞が移植した網膜細胞がホスト側の網膜の視細胞層に進入していき、視細胞様の形状を示し、一部の光応答が回復したという報告がある (Lamba et al. 2009; MacLaren et al. 2006)。しかし、移植した細胞のホスト細胞へのシナプス結合や、個々のドナー細胞の視細胞としての詳細な機能は未だ明らかではない。そこで我々はこれらの細胞が視細胞としての機能を持っているかどうかを調べるために、カルシウムイメージング、多点電極アレイ、パッチクランプ計測を適用した。

方 法

Nrl は桿体視細胞の分化にかかわる転写因子であり、Nrl プロモーター制御の GFP は、桿体視細胞前駆細胞を選択的にラベルすることができる (Akimoto et al. 2006)。そこで、Nrl-GFP のトランスジェニックマウスの幼若細胞を移植に用いた。生後 3-7 日後の Nrl-GFP マウスの眼球から網膜を取り出し、accutase で処理して細胞を分散させ、 2×10^5 cells / μ l 程度に培地に懸濁した。ホストのマウスを麻酔後、実態顕微鏡下でマウス眼球内を観察しながら、マウスの網膜下に微小ガラスピペットで細胞懸濁液を 2μ l 注入した。2-3 週間後、移植されたマウスは実験に用いられた。マウスから眼球を摘出し網膜が取り出され実験に用いられた。取り出された網膜は硝子体側を下にして多点電極アレイのチップの上に乗せてスライスアンカーで固定され、LED のフラッシュライトを照射させたときの網膜の細胞外電位を記録した。また、網膜は厚さ 150μ m スライスされ、パッチクランプ計測実験に用いられた。さらにカルシウム指示薬である Fura-2 によって網膜を染色してカルシウムイメージングを行った。

結 果

移植されたマウスを固定して抗体染色を行うと、ドナー細胞は、視細胞様の形状を示しており、視細胞マーカーである、Rhodopsin を発現していた。また、視細胞のターゲットである双極細胞の付近に神経突起を伸ばしており、突起の先端ではシナプスマーカーを発現していた。そこで、多点電極アレイによって網膜の光応答を計測してみたが、移植部分のところに有意な応答を確認できなかった。次に、これらの細胞の神経応答を調べるために、カルシウムイメージングを行った。一般に視細胞は、他の網膜細胞より比較的カルシウム濃度は低く抑えられていた。網膜スライスを 100μ M グルタミン酸と 80 mM KCl に曝露すると、他の網膜細胞より弱いながらも、グルタミン酸と脱分極刺激に対してカルシウム応答を示した。これら刺激に対して、ホストの細胞と同様に移植した細胞もカルシウム応答を示した。また、電気生理実験を行うた

めに、視細胞分化を制御する Crx という転写因子のノックアウトマウス (Crx-KO) への移植を試みた。Crx-KO マウスの前駆細胞は視細胞に分化することができず、このマウスは光に対して応答性がない。この網膜に Nrl-GFP マウスの網膜細胞を移植すると、Crx-KO マウスの網膜組織で定着していることが確認されたが、ERG と MEA で光応答を確認したが、明らかな応答は確認されなかった。さらに、細胞レベルでドナー細胞の性質を確認するために、パッチクランプを行った。Nrl-GFP マウスの初代培養系で GFP 陽性細胞の膜電位応答を調べると、これらの細胞は視細胞に特徴的である、過分極誘因性電流を示すことが分かった。さらに Nrl-GFP を網膜下に移植した Crx-KO マウスの網膜で GFP 陽性のドナー細胞の膜電位応答を調べると、視細胞と同様の過分極誘因性電流を示すことが分かった (図 1)。

考 察

これらの結果から、移植されたドナー細胞は、グルタミン酸及び脱分極に対するカルシウム応答性や、膜電位の過分極誘導性電流の存在など、いくつかの視細胞としての特徴を示すことがわかった。しかし、網膜全体の機能を回復させるためにはさらに多くの移植細胞が必要となると考えられる。

引用文献

- Akimoto M, Cheng H, Zhu D, Brzezinski JA, Khanna R, Filippova E, Oh EC, Jing Y, Linares JL, Brooks M, Zarepari S, Mears AJ, Hero A, Glaser T, Swaroop A. 2006. Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3890-3895.
- Lamba DA, Gust J, Reh TA. 2009. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* 4(1):73-79.
- MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR. 2006. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444(7116):203-207.

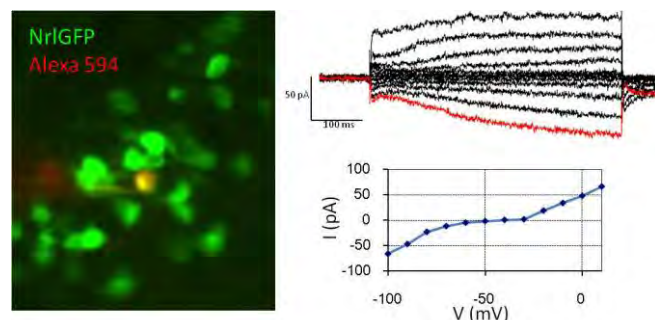


図 1 移植網膜視細胞の過分極誘導性電流

慢性低血糖マウスの月齢依存的視覚低下の原因の1つは桿体入力型双極細胞の応答低下である

○田丸文信¹・海野由美子²・Drew Everhart²・Yuning Sun²・Eduardo Solessio²・渡辺修一¹・The Late Robert Barlow Jr²
(¹埼玉医科大学医学部生理学・²Center for Vision Research, Department of Ophthalmology, SUNY Upstate Medical University)

Key words: Rod bipolar cell, Hypoglycemia, Patch-clamp

目的

グルカゴン受容体ノックアウト ($Gcgr^{-/-}$) マウスは慢性的に低血糖状態であり、月齢依存的に視覚が低下することが報告されている (Umino et al., 2006)。これらのマウスでは、生後 10 ヶ月齢から加齢に伴い網膜電図 (ERG) の b 波が減少し、Optomotry を用いた行動実験でも同時期に視覚感度が低下する (Umino et al., 2006)。さらに、12~13 ヶ月齢の $Gcgr^{-/-}$ マウスでは、網膜の外網状層の厚みとシナプス数がコントロール ($Gcgr^{+/+}$ マウス) に比べて約 20% 減少することがわかった (unpublished data)。

$Gcgr^{-/-}$ マウスでは ERG の b 波がもっとも早く減衰することと外網状層が薄くなることから、月齢依存的な視覚低下の原因として双極細胞の変性が考えられる。そこで、我々は桿体入力型双極細胞をターゲットにして whole-cell patch-clamp 法を用いて応答を記録するとともに、外網状層における桿体視細胞と桿体入力型双極細胞間のシナプスの分布を調べた。また、 $Gcgr^{-/-}$ に高炭水化物食を与えて血糖値を正常レベルに上げることで、月齢依存的な視覚機能の低下に及ぼす効果を調べた。

方法

実験には生後 11~13 ヶ月の同腹仔の $Gcgr^{-/-}$ マウスと $Gcgr^{+/+}$ マウスを用いた。免疫組織実験では、抗 Bassoon 抗体と抗 PKC α 抗体で presynapse と桿体入力型双極細胞をそれぞれ染色し、細胞核から樹状突起のシナプス部位までの距離を定量的に解析した。電気生理実験では、灌流溶液にあらかじめ 4 μ M の L-AP4 を加えておくことで網膜標本全体に薬理的な暗闇を作りだし、桿体入力型双極細胞の樹状突起に 600 μ M の CPPG を局所投与することで薬理的に光刺激を行った時の応答を voltage-clamp 法と current-clamp 法で記録をした。また、網膜機能が低下した 12~13 ヶ月齢の $Gcgr^{-/-}$ マウスに高炭水化物食を 1 ヶ月間与え、血糖値を正常レベルに戻したマウスをにおける視覚感度 (視力とコントラスト感度) と網膜感度 (ERG の b 波が 50 μ V に達する光強度) を測定し、ダイエットによる影響を評価した。

結果

桿体入力型双極細胞の核から樹状突起のシナプス部分までの平均距離は $Gcgr^{+/+}$ マウスで 13.7 μ m、 $Gcgr^{-/-}$ マウスで 11.5 μ m であった。CPPG に対する桿体入力型双極細胞の最大電流量は $Gcgr^{+/+}$ マウスで 18.3 ± 13.8 pA、 $Gcgr^{-/-}$ マウスで 6.83 ± 4.67 pA であった。同様に、電位応答の最大振幅は $Gcgr^{+/+}$ マウスで 31.1 ± 17.6 mV、 $Gcgr^{-/-}$ マウスで 18.4 ± 13.5 mV であり、電流応答と電位応答ともに有意な差が見られた ($P < 0.001$; $Gcgr^{+/+}$; $n = 38$, $Gcgr^{-/-}$; $n = 35$)。 $Gcgr^{-/-}$ マウスに高炭水化物食を 1 ヶ月与えたところ血糖値は正常レベルに戻り、視力は 0.42 ± 0.041 cycles/degree から 0.52 ± 0.27 cycles/degree に回復し ($P < 0.001$; $n = 12$)、コントラスト感度も 10 ± 3.0 から 31 ± 9.7 に回復した ($P < 0.001$; $n = 12$)。ダイエットによって網膜感度は $-\log 2.3$

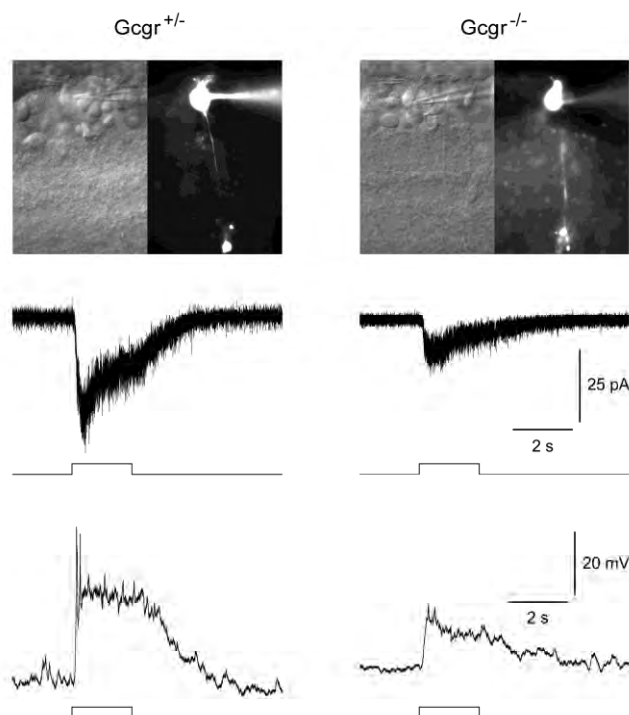
から $-\log 3.0$ になったが ($P = 0.017$; $n = 7$)、桿体入力型双極細胞の核から樹状突起のシナプス部分までの平均距離は 11.6 μ m のままであり、ダイエット前とほぼ同じであった。

考察

$Gcgr^{-/-}$ マウスでは双極細胞の形態学的変化を伴って応答も低下していることがわかった。これらの結果から、 $Gcgr^{-/-}$ マウスの月齢依存的な視覚低下は双極細胞の応答低下によるものと考えられるが、ERG の b 波の減少幅と比較すると低下幅が小さいので双極細胞だけに原因があるとは考えにくく、恐らく他の神経細胞の応答も同様に減衰しているものと思われる。高炭水化物食で血糖値を上げることで低下した視覚感度が回復可能であることが示されたが、外網状層ではダイエットによる形態学的変化はみられなかったことから、網膜シナプス層以外の場所で視覚の回復が起こっていることが考えられる。今後は、この回復のメカニズムの解明を含め、他の網膜神経細胞についても同様に解析するとともに、低血糖によって細胞内で引き起こされる生化学的な経路を明らかにしたい。

引用文献

Umino Y, Everhart D, Solessio E., Cusato K, Pan, JC, Nguyen, TH, Brown, ET, Hafler, R, Frio, BA, Knox, BE, Engbretson, GA, Haeri, M, Cui, L, Glenn, AS, Charron, MJ, and Barlow, RB. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19541-19545.



げっ歯類成熟網膜組織培養と遺伝子導入法

○城宝 浩¹, 森藤 暁², 田中謙二², 池中一裕², 小泉 周²
(¹ アステラス製薬・安全性研究所 ² 自然科学研究機構・生理学研究所)
Key words: organotypic culture, retina, rodent

目的 及び 方法

網膜研究におけるげっ歯類網膜を用いた遺伝子改変技術の応用がますます重要となっているが、これまでげっ歯類網膜組織そのものを培養し、遺伝子改変技術を応用する方法は確立されていなかった。in vitroで遺伝子改変技術を用いたバイオアッセイを効率よく行うため、げっ歯類（ラットやマウス）網膜組織培養法の確立と遺伝子銃による遺伝子導入法の確立を行った。

結果

小泉ら（2007）が開発したウサギ網膜インターフェース培養法を改変し応用したところ、ラットおよびマウス網膜を組織構造を保ったまま少なくとも4日間培養させることに成功した。遺伝子銃によるEGFPの遺伝子導入では導入後1日でEGFPの発現を網膜神経節細胞等で観察することができた。

パッチクランプ法やin vitro ERG（網膜電図）を用いて培養網膜の電気生理学的な性質を確認したところ、ラット培養4日目でもパッチクランプ法を行った全ての神経節細胞（n=10）にて活動電位の発生がみられた。光応答については、10細胞のうち4細胞で光応答が見られたが、非常に小さく微弱なものであった。in vitro ERGでも、9網膜のうち4網膜で微弱ではあるが光応答が確認できた。今後、この手法を用いて改変遺伝子の発現やその機能についてバイオアッセイを行う予定である。

マウスおよびヒト網膜 ON 双極細胞における TRPM1-L チャネルの機能解析

○古川 貴久

((財)大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門)

Key words: 網膜双極細胞、TRP チャネル、夜盲症

目 的

TRP(transient receptor potential)チャネルは脊椎動物、無脊椎動物の様々な動物種において感覚受容に重要な役割を担っている。TRP スーパーファミリーで最初に同定された *trp* 遺伝子産物はショウジョウバエの光応答を司っている。その後、脊椎動物においても様々な TRP スーパーファミリー分子が種々の感覚受容に必須の機能を発揮していることが明らかになってきたが、視覚情報系において TRP チャネルが決定的に重要な働きをしている例は知られていなかった。

視覚経路の入り口器官である網膜において、ON 双極細胞の情報伝達カチオンチャネルの実体は、多くの研究者の努力にも関わらず長らく謎であった。我々は、脊椎動物における中枢神経系の発生と機能原理を解明する目的で、網膜の発生、回路形成や機能について、視細胞と双極細胞の細胞運命決定、網膜前駆細胞の増殖機構、視細胞の細胞極性の形成と層構造の構築、視細胞の神経終末の形成といった様々な面から研究を行っている (Sato et al., 2008; Katoh et al., 2010)。我々は網膜に特異的あるいは高レベルで発現する分子群のスクリーニングから、網膜に TRPM1 が特異的に発現することを見出し、組織学的解析ならびに機能解析を行った。さらに、我々はヒト TRPM1 遺伝子の変異が ON 型双極細胞の機能欠損の疾患と考えられる遺伝性完全型停止性夜盲症 (CSNB) の原因遺伝子となっている可能性を検討した。

方 法

TRPM1 の抗体作製による TRPM1 蛋白質の組織レベルならびに細胞レベルでの局在の検討、CHO 細胞での再構成系によるチャネルとしての機能解析、mGluR6 ならびに Go 蛋白質との機能相互作用の解析、TRPM1 KO マウスにおける双極細胞の生理学的機能、ヒト遺伝性完全型停止性夜盲症患者 DNA の TRPM1 の変異解析などを行った。

結 果

TRPM1 は ON 双極細胞に特異的に発現し、mGluR6、

Go α と共局在した。TRPM1 のノックアウトマウスを作成し、網膜電位図を測定したところ、暗順応条件下、明順応条件下とともに b 波が完全に消失していた。網膜スライス標本にホールセルクランプ法を適応した結果、TRPM1 ノックアウトマウス網膜においては ON 型双極細胞のみが光刺激に応答しなかった。再構成系で TRPM1 は mGluR6、Go α によって負に制御されるカチオンチャネルであることが明らかとなった (Koike et al., 2009)。また複数の完全型停止性夜盲症の患者 DNA で TRPM1 の変異を同定し、それらの変異は TRPM1 チャネルの機能欠失を生じることを示した (Nakamura et al., 2010)。

考 察

我々の解析から、TRPM1 が長らく探されてきた ON 双極細胞の情報伝達チャネルの実体であることが明らかとなった。また、TRPM1 の変異はヒト CSNB の原因の一つとなっていることを示した。ヒト CSNB 患者で同定された様々な変異と TRPM1 の機能との関連を解析することで、TRPM1 の詳細な機能作用機構の理解の進展が期待される。

引用文献

- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., Funabiki, K., Koyasu, T., Kajimura, N., Miyoshi, T., Sawai, H., Kobayashi, K., Tani, A., Toda, T., Usukura, J., Tano, Y., Fujikado, T. & Furukawa, T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11: 923-931. 2008.
- Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M. & Furukawa, T. Blimp1 suppresses *Chx10* expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J. of Neurosci.* 30(19): 6515-6526. 2010.
- Koike, C., Obara, T., Uriu, Y., Numata, T., Sanuki, R., Miyata, K., Koyasu, T., Ueno, S., Funabiki, K., Tani, A., Ueda, H., Kondo, M., Mori, Y., Tachibana, M. & Furukawa, T. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(1): 332-337. 2010. Epub 2009 Dec.4.
- Nakamura, M., Sanuki, R., Yasuma, T. R., Onishi, A., Nishiguchi, K. M., Koike, C., Kadowaki, M., Kondo, M., Miyake, Y. & Furukawa, T. *TRPM1* mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol. Vision*, 16: 425-437. 2010.

参加者リスト

朝田 雄介	大阪大学 大学院生命機能研究科 脳神経工学講座 視覚神経科学研究室
蟻川 謙太郎	総合研究大学院大学
今井 啓雄	京都大学霊長類研究所
海野 修	東邦大学理学部情報科学科
金子 章道	畿央大学大学院健康科学研究科
金田 誠	慶應義塾大学医学部生理学教室
河村 悟	大阪大学大学院生命機能研究科
黒川 れいこ	国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部
郷田 直一	生理学研究所
小島 大輔	東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻
近藤 雄介	東邦大学理学部情報科学科
澤井 元	大阪大学医学系研究科統合生理学講座
七田 芳則	京都大学大学院理学研究科
島口 真菜	筑波大学大学院生命環境科学研究科
城宝 浩	アステラス製薬, 安全性研究所
世古 裕子	国立成育医療研究センター
田上 博章	筑波大学理工学群物理学類
高柳 美也子	筑波大学生命環境学群生物学類
立花 政夫	東京大学大学院人文社会系研究科心理学研究室
田中 雅史	東京大学大学院人文社会系研究科
田淵 理史	東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻
田丸 文信	埼玉医科大学医学部生理学
田村 弘	大阪大学大学院生命機能研究科
千葉 親文	筑波大学大学院生命環境科学研究科
塚本 吉彦	兵庫医科大学・生物
董 笠	東北師範大学（筑波大学）
中畠 崇	東邦大学理学部情報科学科
永田 崇	大阪市立大学大学院理学研究科
中谷 敬	筑波大学大学院生命環境科学研究科
中村崇志	東邦大学理学部情報科学科
新倉 弥幸	筑波大学大学院生命環境科学研究科
古川 貴久	大阪バイオサイエンス研究所
星 秀夫	東京大学大学院人文社会系心理学
本間 耕平	理化学研究所 発生再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チーム
松嶋 優	東京大学文学部行動文化学科心理学専修課程
松本 紘明	東京大学文学部行動文化学科心理学専修課程
松本 美貴子	筑波大学生命環境学群生物学類
宮地 栄一	藤田保健衛生大学 医学部 生理学Ⅱ
三好 智満	大阪大学医学系研究科統合生理学講座
森 麻衣	筑波大学生命環境学群生物学類
安室 博文	筑波大学生命環境学群生物学類
八畑 謙介	筑波大学大学院生命環境科学研究科
山下 勝幸	奈良医大第一生理
山田 雅弘	理化学研究所・脳科学総合研究センター・ニューロインフォマティクス技術開発チーム
吉田 岳人	筑波大学大学院生命環境科学研究科
渡辺 修一	埼玉医科大学医学部生理学