研　究　報　告　書

「網膜 ON・OFF 回路基盤と視覚行動制御メカニズムの解析」

研究期間:　平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月
研　究　者:　小池千恵子

1，研究のねらい

ものの形（輪郭）を捉えるために重要な視覚情報は、網膜における基本処理により抽出される。脊椎動物網膜において、全ての視覚情報は双極細胞においてON型・OFF型経路に分解される。神経系のON・OFF回路は脊椎動物網膜のみならず、ショウジョウバエの視覚中枢、線虫の嗅覚・味覚、昆虫の嗅覚などにも存在し、ひとつの入力刺激に対し二つの情報経路が正反対に応答することにより微妙な変化を強調し、最適化するという優れた回路である。

本研究は、コントラストの強調に関わる網膜ON型・OFF型情報経路と視覚応答との関係を明らかにし、得られた情報を元に網膜ON・OFF回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作製、網膜機能再構築の基盤情報とすることを最終目的としている。

2，研究成果

ほ乳類において網膜は光シグナルを神経シグナルに変換する唯一の組織である。視細胞において変換された光情報は、中間ニューロンである双極細胞においてON型・OFF型経路に分解される。ON型経路は光刺激の増加に対して作動し、OFF型経路は光刺激の減少に対して作動する（図1）。網膜視覚情報のON・OFF分解は、双極細胞におけるグルタミン酸応答の違いにより引き起こされる。

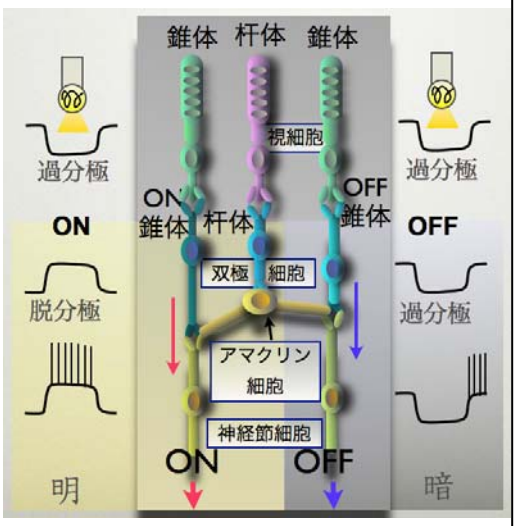

図1　視覚情報の ON・OFF 分解

視細胞は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出している。ON 型・OFF 型双極細胞の後シナプス膜には異なるグルタミン酸受容体が発現しており、グルタミン酸に対し正反対の応答を示す。ON 型双極細胞（ON 型錐体双極細胞および杆体双極細胞）は代謝型グルタミン酸受容体である mGluR6 を発現している一方、OFF 型双極細胞はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現している。暗所において OFF 型双極細胞はグルタミン酸を受け取り脱分極するが、ON 型双極細胞は mGluR6 が活性化する結果、視覚伝達チャネルが閉じることにより過分極応答する。長い間 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルは明らかとされていなかった。私たちは感覚受容器に広く発現するカチオンチャネルである Transient receptor potential(TRP)ファミリーに属する遺伝子であり、生理学的意義が不明であった TRPM1(Melastatin related transient receptor potential 1)が ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルであることを明らかにした（図2）。TRPM1 にはイオンチャネル型の long form と N 末のみからなる short form が存在し、イオンチャネル型 TRPM1 はマウスにおいて網膜 ON 型双極細胞のみに発

現していた。TRPM1 ノックアウト(KO)マウスの網膜では OFF 型双極細胞の機能は正常である一方、ON 型双極細胞の視覚応答は消失していた。網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルは mGluR6 と共役している三量体 G タンパク質 Go により制御されていると推定されていたが、パッチクランプ的解析により、TRPM1 チャネルが mGluR6 におけるグルタミン酸刺激により抑制されること、Go α により抑制制御されることが明らかとなった(図2)。また、TRPM1 は先天性停止性夜盲症の原因遺伝子であった。

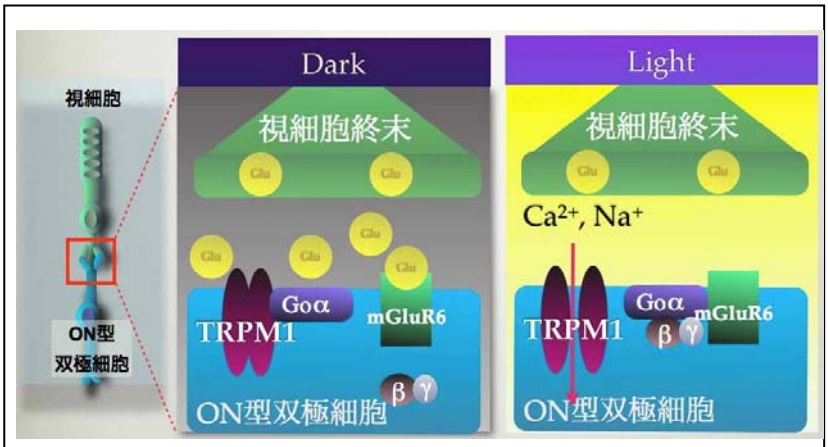

図2　TRPM1 は ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルである。視細胞は光刺激により過分極応答し、神経終末からのグルタミン酸の放出を抑制する。グルタミン酸存在下では mGluR6 が活性化され、共役している三量体 G タンパク質 Go のサブユニット Go α が活性型となり TRPM1 チャネル活性を抑制しているが、光刺激によりグルタミン酸放出が抑制されると TRPM1 チャネルは mGluR6 カスケードからの抑制から解除されて活性化される結果、ON 型双極細胞は脱分極する。

ところで、視覚は知覚に基づいた応答であるイメージ形成応答だけでなく、眼球運動・瞳孔反射などの生理的作用を生じさせる非イメージ形成応答も担うことが知られている。さきがけ研究では、ON 型双極細胞あるいは OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウスを用いての視覚応答の定量的・定性的解析を試みた。ON 型双極細胞の機能欠損モデルマウスとしては TRPM1 および mGluR6 KO マウスを用い、OFF 型双極細胞の機能欠損モデルマウスは特異的遺伝子が報告されていないことから、OFF 型双極細胞欠損を誘導するコンディショナル KO マウスを作製中である(図3)。

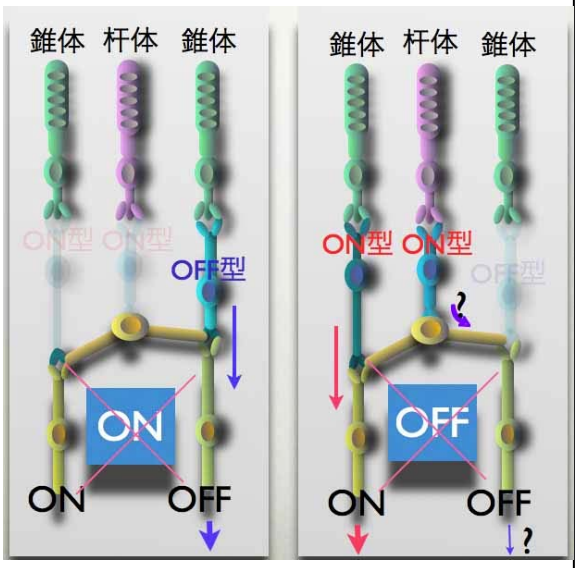

図3　ON 型 OFF 型双極細胞機能欠損モデルマウスの網膜回路モデル図

視覚応答解析としては、Microelectrode Array(MEA)法を用いた摘出網膜に対する microERG 解析およびスパイク解析と、マウス個体の視覚応答である、非イメージ形成応答およびイメージ形成応答解析を行った。光刺激そのものを情報とする非イメージ形成応答としては、

光同調、自発運動活性、睡眠活動などの解析を行った。イメージ形成応答に関しては簡便でストレスの少なく、かつ高空間・時間分解能のイメージを提示できるマウスの解析系がないことから、120Hz のリフレッシュレートで解像度 1920x1080 までのイメージが提示可能な新規視覚イメージ形成応答解析装置の作製を行った。本解析装置においては一定の距離からイメージを提示することにより視力測定が可能である。さらに解析装置を改良し、高時間分解能で持ち運びが簡便な点滅光刺激提示を可能とした。工学系研究者の協力の元マウスの視線を検出できるプログラムを作製済みであり、本プログラムを視覚イメージ形成応答解析装置に適用することにより、視覚応答の各試行においてマウスの視線を特定することによりイメージを認識し正解を認識しているかどうかを確認する予定である。

3, 今後の展開

本研究は、網膜ON型・OFF型情報経路と視覚応答との関係を解析し、網膜ON・OFF回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作製、網膜機能再構築の基盤情報とすることを最終目的としている。今後新規視覚イメージ形成応答解析装置を用い、提示イメージの空間・時間周波数のパラメーターを変動させることにより野生型マウスの応答を定量的に解析し、ON型・OFF型双極細胞機能欠損モデルマウスの応答を比較解析することにより、網膜回路と視覚応答のシミュレーションモデルを作成したいと考えている。得られたデータを元に網膜変性モデルマウスにおいて網膜の機能的再構築を段階的に行い、理論的な再構築が自然な知覚にどこまで近づけることができるか、検証していきたいと考えている。また、得られた結果を工学系の研究者との共同研究により人工網膜研究に適用し、人工網膜での応答と動物の本来の視覚応答の比較解析を行うことによる視覚再構築研究にも貢献したいと考えている。

学術的には、特にOFF型双極細胞が視覚イメージ応答においてどのような役割を果たしているのか注目して解析を進めていきたいと考えている。錐体双極細胞の一部のみがOFF型応答を担うが、ヒトをはじめとした黄斑を形成している動物では最も視力の良い中心窩に錐体視細胞が集中しているため、OFF型情報経路が視覚情報において重要な機能を担う可能性がある。しかしながらマウスには黄斑が存在しないため、将来的にサルを用いた解析への展開も視野に入れていきたいと考えている。

4, 自己評価

さきがけ研究期間においては共同研究のモデルマウスの作製や Microelectrode Array 装置の立ち上げ、新規視覚応答解析装置の開発に時間が掛かり思うように進まなかったが、特に視覚イメージ応答解析装置は広い範囲の応用解析が期待できると考えており、今後の発展のための基礎がある程度できてきたのではないかと考えている。視覚再構築への展開には困難もあるかと思うが、内外の共同研究者と協力していきたいと考えている。

5, 研究総括の見解

網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルの本体が TRPM1 であることを解明したことは大きな成果として挙げられる。その後も、ON 双極細胞の ON 反応の生成機構を明らかにしており、さらに、OFF 反応の生成機構への取り組みを楽しみにしている。他方、進行中の視覚イメージ形成応答解析装置を用いた網膜回路と視覚応答のシミュレーションモデルの提案を期待している。

6，主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. 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 U S A. 107(1):332-7.2010 Epub 2009

2. Chieko Koike, Tomohiro Numata, Hiroshi Ueda, Yasuo Mori, Takahisa Furukawa ″TRPM1: a vertebrate TRP channel responsible for retinal ON bipolar function ″Cell Calcium (Review)2010 Aug-Sep 48(2-3)95-101

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物等）

1. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience(Chicago) ″TRPM1 is a candidate transduction channel for visual signal transmission in retinal ON bipolar cells″

2. FASEB Summer Research Conference（Vermont,USA） ″Functional roles of mouse and human TRPM1-L″

3. 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology（Philadelphia） “TRPM1 Is a Component of the Retinal on Bipolar Cell Transduction Channel in the mGluR6 Cascade″

4.第 157 回生物科学セミナー（大阪大学） ″網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネル TRPM1″