

平成 21 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

視細胞-双極細胞間リボンシナプスの高次構造を形作る
ジストログリカン結合蛋白質ピカチュリン佐藤 茂^{1)~4)}¹⁾東大阪市立総合病院眼科, ²⁾大阪大学大学院医学系研究科眼科学³⁾大阪大学大学院医学系研究科感覚機能形成学, ⁴⁾大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門

要 約

網膜の視細胞は双極細胞や水平細胞との間でリボンシナプスと呼ばれる特殊な構造をもつシナプスを形成する。我々は、視細胞リボンシナプスのシナプス間隙に局在する新規細胞外マトリックス蛋白質を同定し、ピカチュリン(pikachurin)と名付けた。ピカチュリンノックアウトマウスでは双極細胞の樹状突起末端が視細胞リボンシナプスに陥入せず、暗順応下および明順応下網膜電図(ERG)でb波の潜時延長を認めた。視運動性眼球反応測定では対照マウスに比較し有意な反応低下を認めた。さらにピカチュリンは α -ジストログリカンの新規

リガンドであることを免疫組織学的、生化学的手法で明らかにした。本研究から、Duchenne型、Becker型筋ジストロフィの患者で観察されるERG異常はジストロフィンとジストログリカン-ピカチュリン複合体との相互作用異常が一因となっている可能性が示唆された。(日眼会誌 114: 955-967, 2010)

キーワード: ピカチュリン, 視細胞, リボンシナプス, ジストログリカン, 筋ジストロフィ

A Review

Essential Role of Pikachurin, a Novel Dystroglycan-binding Protein,
in Bipolar Dendrite Connection to Photoreceptor Ribbon Synapse in the RetinaShigeru Sato^{1)~4)}¹⁾Department of Ophthalmology, Higashiosaka City General Hospital²⁾Department of Ophthalmology, Osaka University Graduate School of Medicine³⁾Department of Visual Science, Osaka University Graduate School of Medicine⁴⁾Department of Developmental Biology, Osaka Bioscience Institute

Abstract

Photoreceptor cells with bipolar cells and horizontal cells form a specialized synapse, the ribbon synapse. We identified the novel retinal extracellular matrix protein pikachurin, and observed that it is localized in the synaptic cleft of the photoreceptor ribbon synapse. In order to investigate the biological functions of pikachurin, we generated a pikachurin knock-out mouse. These mice showed improper apposition of the bipolar cell dendritic tips to the photoreceptor ribbon synapses, alterations of ERG b waves both under scotopic and photopic conditions and attenuation of optokinetic responses. Using immunohistochemistry and pull-down assay, we

showed that pikachurin is a novel ligand of α -dystroglycan. Our results indicate that the abnormality of interaction between dystrophin and dystroglycan-pikachurin complex may be one cause of the retinal electrophysiological abnormalities observed in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114: 955-967, 2010)

Key words: Pikachurin, Photoreceptor, Ribbon synapse, Dystroglycan, Muscular dystrophy

別刷請求先: 578-8588 東大阪市西岩田 3-4-5 東大阪市立総合病院眼科 佐藤 茂

(平成 22 年 4 月 12 日受付, 平成 22 年 7 月 27 日改訂受理) E-mail: satou-s@higashiosaka-hosp.jp

Reprint requests to: Shigeru Sato, M.D. Department of Ophthalmology, Higashiosaka City General Hospital, 3-4-5 Nishi-iwata, Higashiosaka-shi, Osaka-fu 578-8588, Japan

(Received April 12, 2010 and accepted in revised form July 27, 2010)

I はじめに

視細胞の軸索は外網状層でリボンシナプスと呼ばれる特殊な構造をしたシナプスを双極細胞ならびに水平細胞との間で形成する。名前の由来となったシナプスリボンという特徴的な構造はオスミウム染色強陽性であり、網膜内、外網状層および内耳有毛細胞で認められる¹⁾。リボンシナプスを形成するのに必要ないくつかの前シナプス因子(CtBp 2/RIBEYE, piccolo, bassoon など)が知られている^{1)~4)}が、その形成機構の解明は研究途上にあり、視細胞のシナプス部末端に双極細胞や水平細胞の突起が陥入するメカニズムも解明されていない。一方, dystrophin-glycoprotein complex (DGC) (図 1)の変異はさまざまなタイプの筋ジストロフィの原因となることが知られている⁵⁾⁶⁾。DGC を構成する蛋白質群の中心的存在であるジストログリカンは筋肉のみならず中枢神経系を含むさまざまな組織で発現しているが⁷⁾、網膜では内境界膜と外網状層に発現している^{8)~12)}。さらに DGC の構成蛋白質の一つにジストロフィンがあるが、その異常症である Duchenne 型筋ジストロフィ (Duchenne type muscular dystrophy : DMD ; MIM#310200) や Becker 型筋ジストロフィ (Becker type muscular dystrophy : BMD ; MIM#300376) 患者ではしばしば網膜電図 (ERG) 異常を示す症例があり^{12)~18)}、DGC が網膜の正常な生理機能に必要であることが推測されてきた。しかし、DGC の網膜での機能的役割は未知であった。

我々は、視細胞リボンシナプスのシナプス間隙に局在する新規細胞外マトリックス蛋白質を同定し、ピカチュリンと名付けた¹⁹⁾。ピカチュリンはジストログリカンの生理的リガンドであり、正常な視細胞リボンシナプス形成と視覚情報伝達に必須である。さらに、ピカチュリンの同定ならびに機能解析は DMD/BMD 患者で認められる ERG 異常の分子レベルでの解明に大きく貢献すると考えている。本稿では、この新規蛋白質“ピカチュリン”について述べる。

II 新規細胞外マトリックス蛋白質 ピカチュリンの同定

我々のグループでは、網膜視細胞の細胞運命決定にホメオボックス型転写因子 *Otx 2* が重要であり、*Otx 2* の視細胞特異的コンディショナルノックアウトマウス (*Otx 2* CKO マウス) では視細胞がほぼ完全にアマクリン細胞様ニューロンへと運命転換することを見出し報告した^{20)~22)}。この *Otx 2* CKO マウスの視細胞が発生しないという表現型(図 2 a~f)は、視細胞における遺伝子発現解析の有用なツールとなりえると考えた。すなわち、正常マウス網膜と *Otx 2* CKO マウス網膜の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較することによって、視細胞の発生、機能、維持を司る遺伝子群をまとめて同定でき

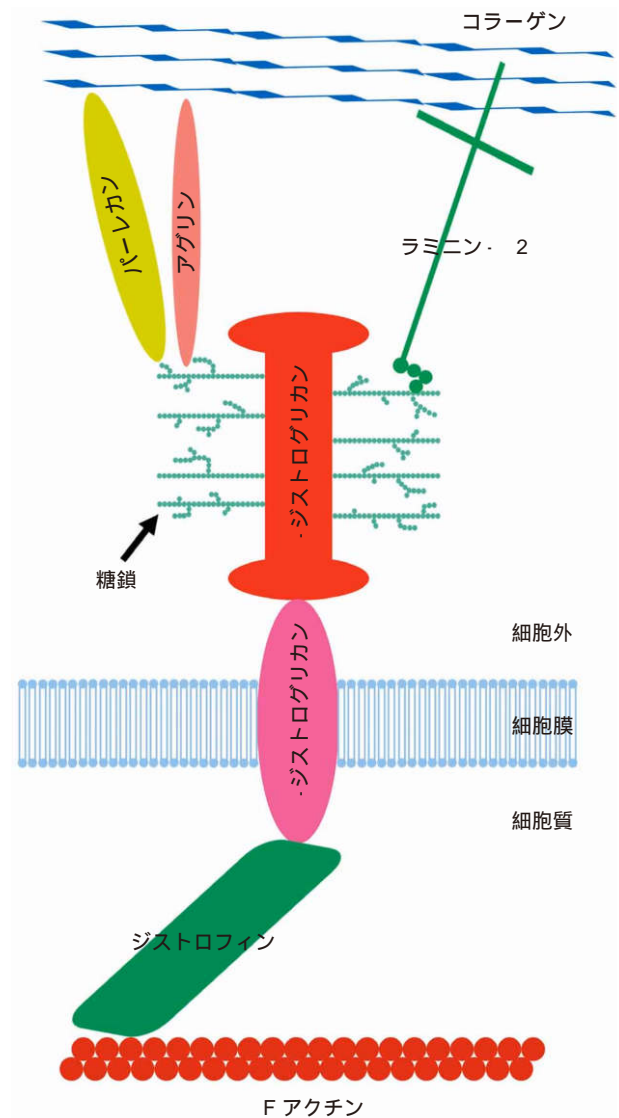


図 1 Dystrophin-glycoprotein complex (DGC) の模式図⁶⁾。

β -ジストログリカンは膜貫通ドメインを有しており細胞膜を貫通し、DGC を細胞膜に固定する。 β -ジストログリカンは細胞内ではジストロフィンと結合する。ジストロフィンはさらに細胞内骨格を形成する F アクチンと結合する。細胞外では α -ジストログリカンと結合する。 α -ジストログリカンは高度に糖鎖修飾を受けており、この糖鎖依存性にラミニン、アグリ、パーレカンなどの蛋白質がラミニン G ドメイン依存性に結合する。

ると想定した。実際、我々はマイクロアレイにて、正常マウス網膜と *Otx 2* CKO マウス網膜の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、多数の未解析視細胞遺伝子群を検出し、その中で新規の細胞外マトリックス蛋白質をコードする遺伝子に注目し、ピカチュリンと名付けた。マウスピカチュリン遺伝子の全長 cDNA をクローニングしたところ 1,017 アミノ酸残基をコードしており、その蛋白質は N 末端にシグナル配列、2つのフィブロネクチン 3 ドメイン、3つのラミニン G ドメイン、2つの

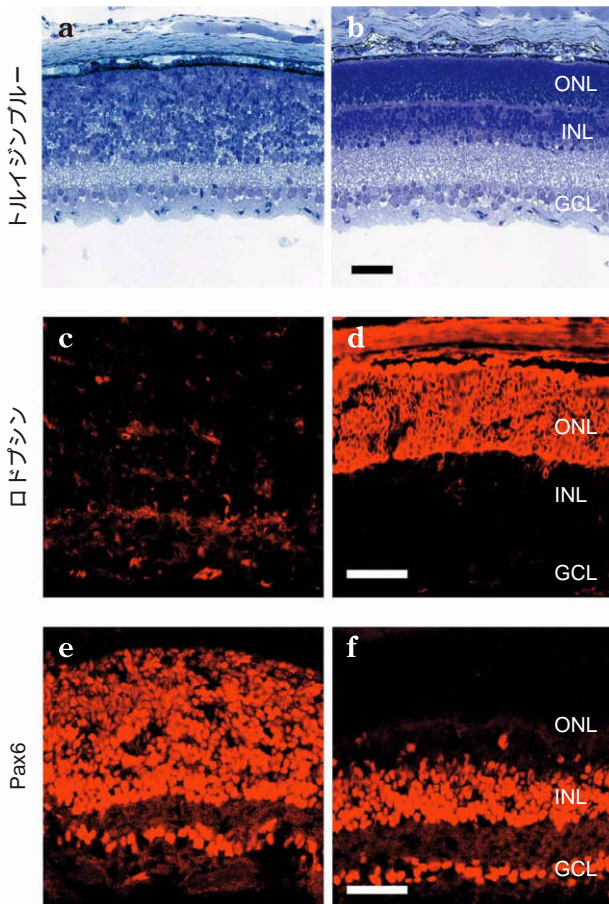


図 2 *Otx2* コンディショナルノックアウトマウスの網膜所見.

生後 9~12 日の *Otx2* コンディショナルノックアウトマウス (a, c, e) と対照マウス (b, d, f) の網膜所見。明らかな視細胞層を認めず、層構造の異常を示す。ロドプシンによって染色される視細胞の消失と Pax6 によって染色されるアマクリン細胞の著しい増加を認める。a, b: トルイジンブルー染色, c, d: 抗ロドプシン抗体による免疫染色, e, f: 抗 Pax6 抗体による免疫染色。GCL: 視神経節細胞層, INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層 (scale bar = 50 μ m)。

(文献 22 より許可を得て転載, 改変)

カルシウム結合 epidermal growth factor (EGF) 様ドメインをもっていた (図 3 a)。ピカチュリンは脊椎動物間で非常に保存されており (図 3 a), C 末端はアグリニンとパーレカンに類似したドメイン構造をもっていた (図 3 b)。アグリニンは運動神経から神経筋接合部のシナプス間隙へ分泌される蛋白質で、神経筋接合部のシナプス形成の重要なプロセスであるアセチルコリン受容体の凝集を起すきっかけとなる蛋白質として知られている²³⁾。また、パーレカンはさまざまな基底膜に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンで、細胞外マトリックス蛋白質や成長因子、受容体と相互作用することにより、細胞内情報伝達に作用するとされている²⁴⁾。

Ⅲ ピカチュリン遺伝子は発生期の視細胞に発現し、蛋白質はリボンシナプスのシナプス間隙に局在する

網膜におけるピカチュリン遺伝子発現プロファイルを調べるため、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ピカチュリンのシグナルは胎生 14.5 日目に網膜外層に初めて検出される (図 3 c)。その後も常に網膜外層に発現を認め、成体網膜でも視細胞層に発現を認めた (図 3 d~f)。ピカチュリン蛋白質の局在を調べるためにピカチュリン特異抗体を作製し、免疫組織染色を行ったところ、外網状層特異的に点状のシグナルを認めた (図 4 a, b)。さらに免疫電顕では、杆体視細胞と双極細胞間のリボンシナプス間隙にシグナルを認めた (図 4 c)。錐体視細胞での局在を調べるために錐体視細胞のシナプス部表面の糖脂質と特異的に結合するローダミンラベル PNA (peanut agglutinin) とピカチュリン抗体で共染色したところ、シグナルが重なった (図 4 d~f)。このことから、ピカチュリンは錐体視細胞でも杆体視細胞と同様にリボンシナプスのシナプス間隙に局在していることが推測された。さらにリボンシナプスの前シナプスマーカーである CtBp 2/RIBEYE 抗体、後シナプスマーカーである mGluR 6 (metabotropic glutamate receptor subtype 6) 抗体を用いた共染色を行った。CtBp 2/RIBEYE はシナプスリボンを構成する主要な蛋白質であり¹⁾、mGluR 6 は外網状層で、ON 型双極細胞の後シナプス部に局限して存在する²⁵⁾。CtBp 2/RIBEYE のシグナルは馬蹄状を示すが、ピカチュリンのシグナルはそれとは完全には重ならず、内顆粒層側にあたる馬蹄内に局在した (図 4 g~i)。また、mGluR 6 のシグナルとはほんの少し重なるものの、ピカチュリンのシグナルは視細胞側に認められた (図 4 j~l)。ピカチュリンは前シナプスマーカーと後シナプスマーカーで挟まれる位置に局在することが示された。以上の結果により、ピカチュリンはリボンシナプスのシナプス間隙に局在していることが明らかとなった。

Ⅳ ピカチュリンは双極細胞の樹状突起が視細胞のシナプス部へ陥入するのに必須である

ピカチュリンの生体内での機能を調べるために、ピカチュリンノックアウト (KO) マウスを作製した。その設計を図に示す (図 5 a)。作製したピカチュリン KO マウスはザンプロット、ノザンプロット、免疫組織染色にてピカチュリンの転写産物や蛋白質が検出されないことを確認したうえで、その後の実験を行った¹⁹⁾。興味深いことに、光学顕微鏡観察ではピカチュリン KO マウス網膜と野生型マウス網膜間に形態的な違いを認めなかったが¹⁹⁾、電子顕微鏡観察ではピカチュリン KO マウス網膜において杆体視細胞、錐体視細胞ともに、リボンシナプス部に双極細胞の樹状突起末端の陥入を認めなかった

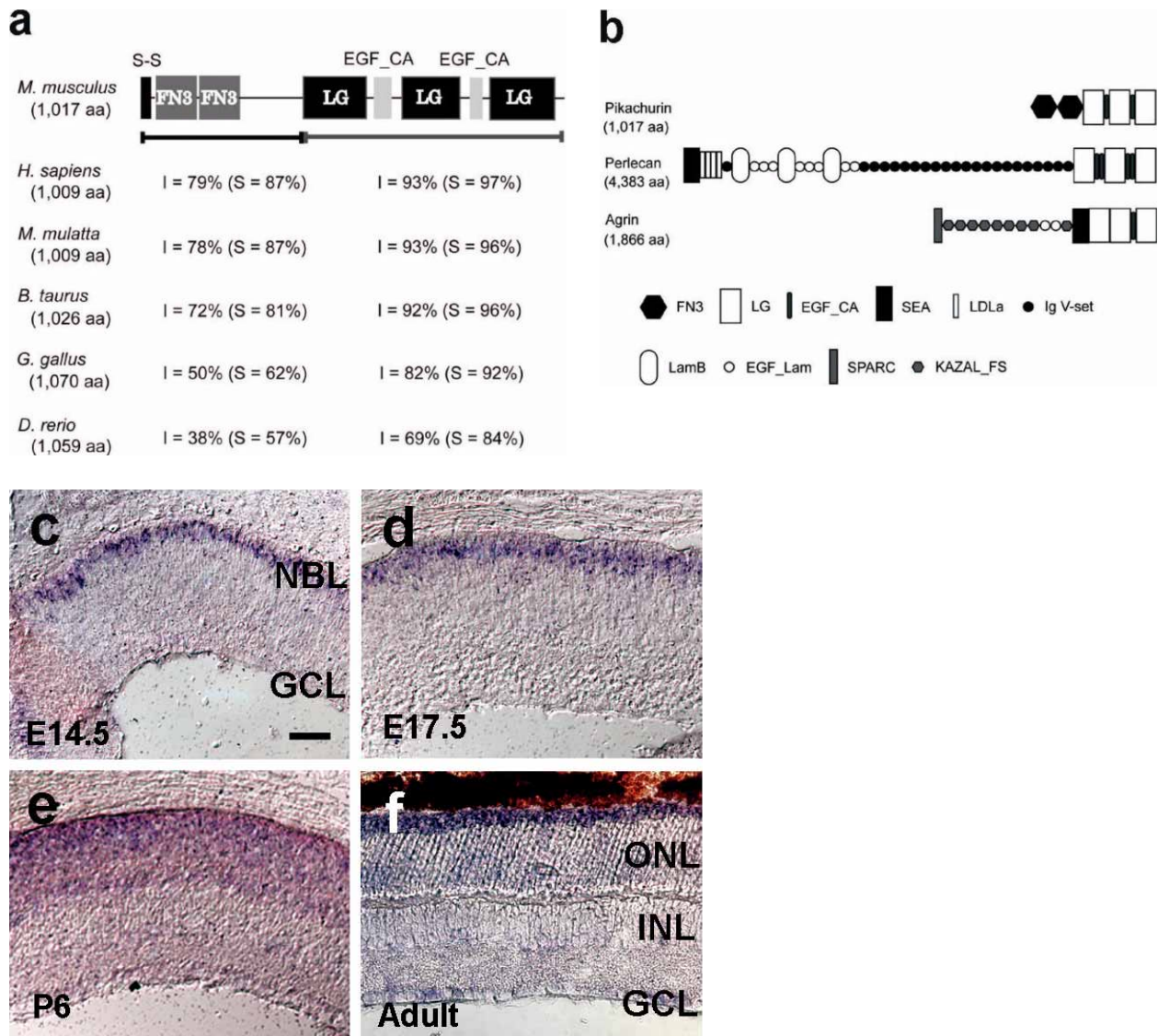


図3 マウスピカチュリンのドメイン構造と遺伝子発現プロファイル。

- a : マウスピカチュリンと比較した場合におけるヒト (*H. sapiens*), サル (*M. mulatta*), ウシ (*B. taurus*), ニワトリ (*G. gallus*), ゼブラフィッシュ (*D. rerio*) のアミノ基側とカルボキシル基側でのアミノ酸の一致率 (I) と類似率 (S) を示す。FN3 : フィブロネクチン3ドメイン, EGF_CA : カルシウム結合 epidermal growth factor (EGF) 様ドメイン, LG : ラミニン G ドメイン, S-S : シグナル配列。
- b : マウスピカチュリン (Pikachurin), マウスパーレカン (Perlecan), マウスアグリニン (Agrin) のドメイン構造。カルボキシル基側末端のドメイン構造に類似性がある。
- c ~ f : マウスピカチュリン遺伝子の網膜内での発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにて解析。シグナルは網膜外層, すなわち視細胞前駆細胞や視細胞に認められる。c : 胎生 14.5 日, d : 胎生 17.5 日, e : 生後 6 日, f : 成体, scale bar = 50 μm 。

(文献 19 より許可を得て転載, 改変)

(図 5 b, c). 外節には形態的違いを認めていない (図 5 d, e). さらに超高压電子顕微鏡を用いて三次元トモグラフィ解析を行って検証した。ピカチュリン KO マウス網膜では杆体シナプス終末に双極細胞樹状突起の陥入を認めなかった (図 5 f~k). 次にピカチュリン KO マウスにおける双極細胞の樹状突起終末がどこまで伸展しているかを調べるため, 双極細胞のマーカである protein kinase C (PKC) 抗体と前述の mGluR 6 抗体で共染色した。その結果, ピカチュリン KO マウスにても

双極細胞樹状突起は外網状層まで進展しており, その末端に mGluR 6 のシグナルを認めた (図 5 l, m). また, CtBp 2/RIBEYE のシグナルは双極細胞の樹状突起先端近傍に存在し (図 5 n, o), PNA のシグナルは mGluR 6 のシグナルと重なった (図 5 p, q). このことから, ピカチュリン KO マウスにおいても双極細胞の樹状突起終末は視細胞シナプス部のすぐ近傍まで伸展しており, 少なくとも視細胞—双極細胞間の接続はある程度保たれていると考えられた。

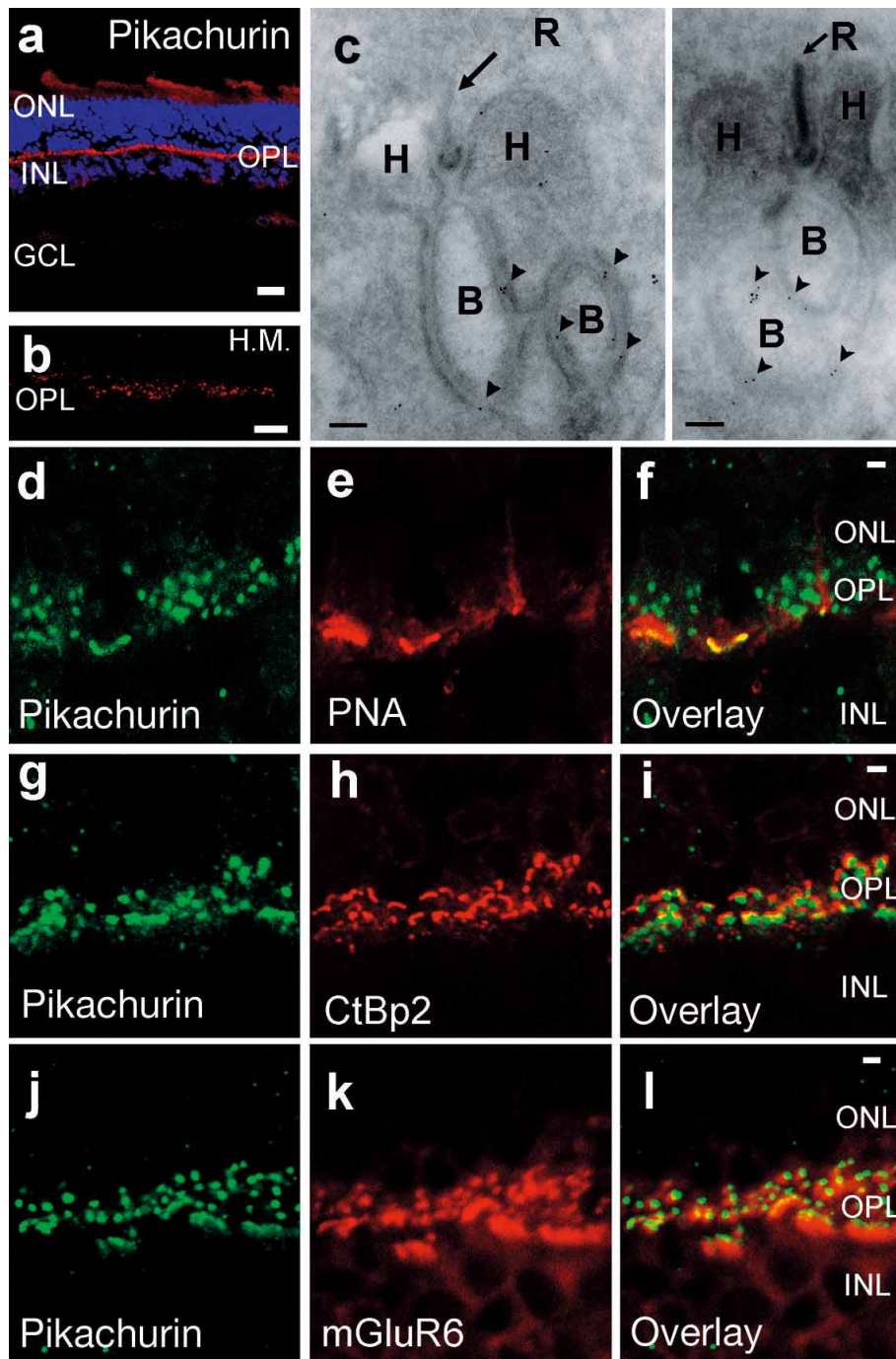


図 4 成体マウス網膜の免疫染色(a, b, d~l)と免疫電顕(c).

- a : ピカチュリンのシグナルは視細胞-双極細胞間リボンシナプスが形成される外網状層(OPL)に局在する。赤:ピカチュリン抗体,青:細胞核(scale bar=20 μm).
- b : 外網状層を拡大し観察するとピカチュリンのシグナルは点状に分布することが分かる(scale bar=10 μm).
- c : 免疫電顕によるリボンシナプスでのピカチュリン蛋白質局在解析。2つの杆体リボンシナプスを示す。シグナルは杆体リボンシナプスのシナプス間隙に認められる。矢頭:ピカチュリンのシグナル,B:双極細胞の突起末端,H:水平細胞の突起末端,R:シナプスリボン(scale bar=100 nm).
- d~f : ピカチュリンとPNA(peanut agglutinin)の共染色。ピカチュリンと錐体細胞のシナプス部のシグナルが重なる。
- g~i : ピカチュリンと前シナプスマーカー CtBp 2/RIBEYE 抗体との共染色。CtBp 2/RIBEYE のシグナルは馬蹄状を示すが、ピカチュリンのシグナルはそれとは完全には重ならず、内顆粒層側に局在する。
- j~l : ピカチュリンと後シナプスマーカー mGluR 6(metabotropic glutamate receptor subtype 6)抗体との共染色。ピカチュリンのシグナルはmGluR 6のシグナルとはほんの少し重なりつつもmGluR 6のシグナルの視細胞側に認める(scale bar=20 μm).

(文献 19 より許可を得て転載)

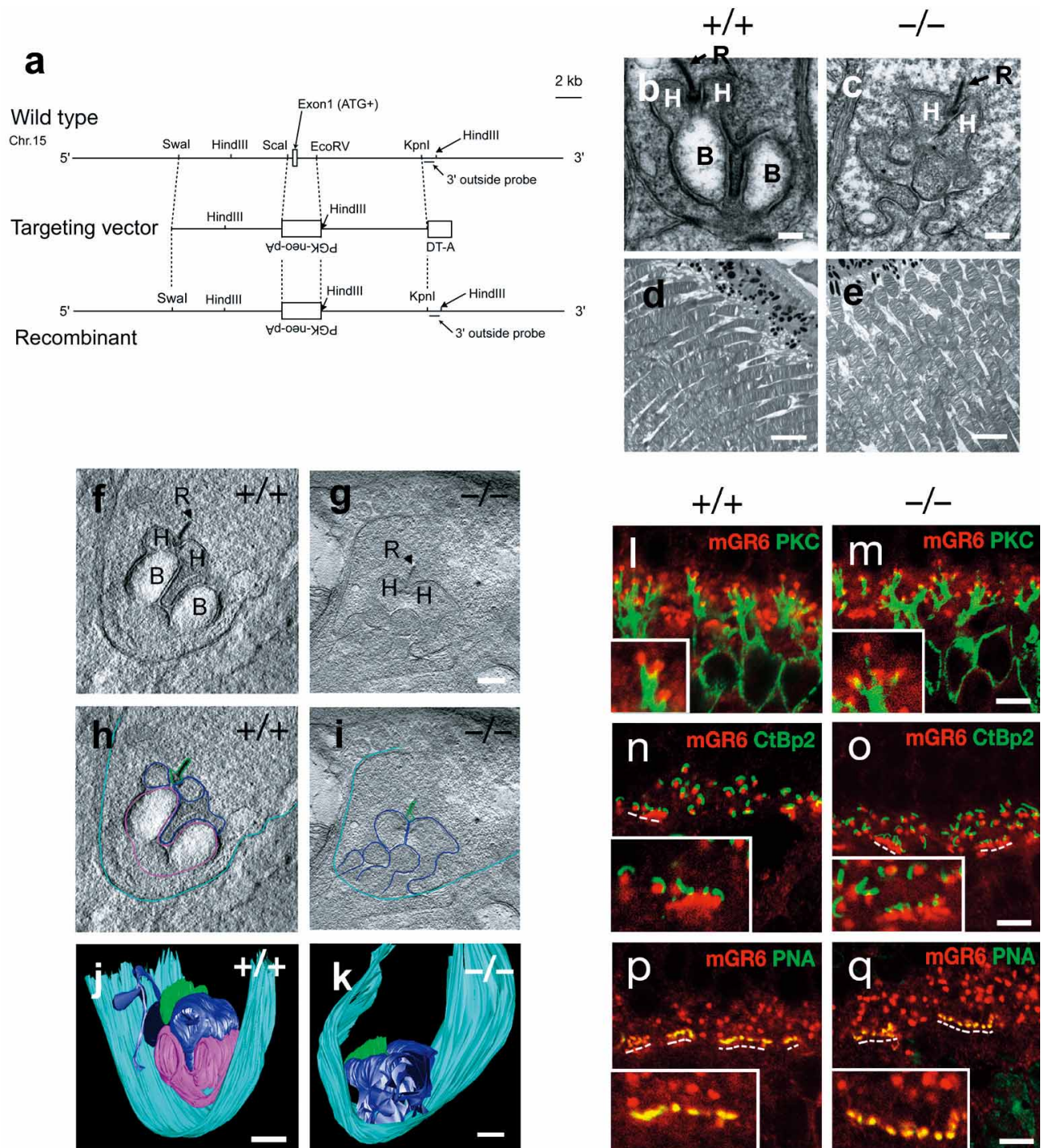


図5 ピカチュリノックアウト(KO)マウスの形態学的解析.

- a: ピカチュリノックアウト(KO)マウスの設計図. 遺伝子組換えによりスタートコドンを含む第1エクソンをPGK-neoカセットで置換した.
- b, c: 電子顕微鏡によるリボンシナプスの観察. 野生型マウス(b)の杆体リボンシナプスでは双極細胞の樹状突起が二本陥入しているが, ピカチュリノックアウトマウス網膜(c)では陥入を認めない. scale bar=200 nm. B: 双極細胞の突起末端, H: 水平細胞の突起末端, R: シナプスリボン.
- d, e: 電子顕微鏡による視細胞外節の観察. 野生型マウス網膜(d)とピカチュリノックアウトマウス網膜(e)とで視細胞外節には明らかな差を認めない. scale bar=5 μ m.
- f~k: 超高压電子顕微鏡による野生型マウス網膜(f, h, j)とピカチュリノックアウトマウス網膜(g, i, k)の三次元解析. f, g: 超高压電子顕微鏡でも野生型マウスの杆体リボンシナプスでは双極細胞の樹状突起が二本陥入しているが, ピカチュリノックアウトマウス網膜では陥入を認めない. h, i: 超高压電子顕微鏡で得られた断面図からそれぞれ各構造の輪郭を抽出. j, k: 輪郭抽出にて得られたデータから三次元画像へ再構築. ピンク: 双極細胞突起, 水色: 杆体視細胞の細胞膜, 緑: シナプスリボン, 青: 水平細胞の突起. scale bar=300 nm.
- l~q: 双極細胞のマーカであるPKC(protein kinase C)抗体(緑)とON型双極細胞樹状突起の後シナプス膜のマーカであるmGluR6抗体(赤)で共染色すると, ピカチュリノックアウトマウスにも双極細胞樹状突起は外網状層まで進展していることが分かり, その末端にmGluR6のシグナルを認める(l, m). また, CtBp2/RIBEYEのシグナル(緑)は双極細胞の樹状突起先端近傍に存在し(n, o), PNAのシグナル(緑)はmGluR6のシグナル(赤)と重なった(p, q). このことから, ピカチュリノックアウトマウスにおいても双極細胞の樹状突起終末は視細胞シナプス部のすぐ近傍まで伸展していることが分かる. scale bar=5 μ m.

(文献19より許可を得て転載)

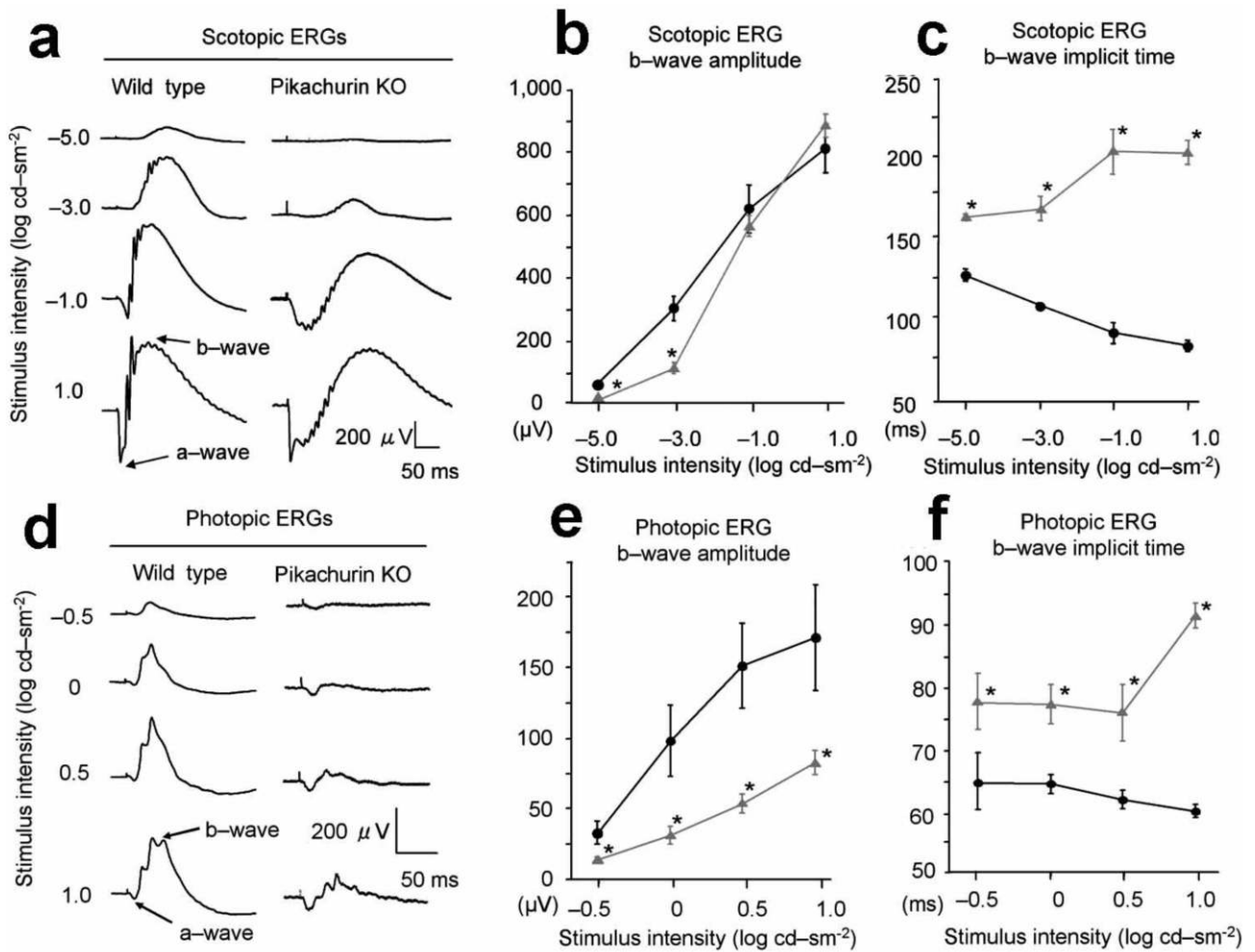


図 6 ピカチュリン KO マウスの網膜電図(ERG)。

a~c: 暗順応下 ERG(4 段階の光刺激強度で測定). ピカチュリン KO マウスでは a 波の振幅, 潜時ともに野生型と有意差を認めない. このことから, ピカチュリン KO マウスでも杆体視細胞は正常に機能していることが推測される. しかし, b 波では振幅が低輝度刺激では減弱しており, 高輝度刺激ではほぼ正常と同じ程度になることが分かる. また b 波の潜時はすべての刺激輝度で有意に延長している. このことからピカチュリン KO マウスでは杆体視細胞から双極細胞へのシグナル伝達が有意に遅いことが推測された. ●—: 野生型マウス, ▲—: ピカチュリン KO マウス. *: $p < 0.05$.

d~f: 明順応下 ERG(4 段階の光刺激強度で測定). ピカチュリン KO マウスはすべての刺激輝度で b 波振幅は有意に減弱し, 潜時は有意に延長していた. このことから錐体視細胞からのシグナル伝達にも障害があることが分かる. ●—: 野生型マウス, ▲—: ピカチュリン KO マウス. *: $p < 0.05$.

(文献 19 より許可を得て転載, 改変)

V ピカチュリンはシナプスの情報伝達に必要である

次に我々は, ピカチュリン KO マウスの ERG を測定した(図 6). 暗順応下において, ピカチュリン KO マウスでは a 波の振幅, 潜時ともに野生型とほぼ同じであった. このことから, ピカチュリン KO でも杆体視細胞は正常に機能していることが推測された. しかし, b 波では振幅が低輝度刺激では減弱しており, 高輝度刺激ではほぼ正常と同じ程度になることが分かった. また b 波の潜時はすべての刺激輝度で有意に延長しており, 最高輝度(1.0 log-cd s/m²)では 100 ms 以上の遅延を認め

た. 以上の結果から, ピカチュリン KO マウスでは杆体視細胞から双極細胞へのシグナル伝達が有意に遅いことが推測された. 錐体機能を反映する明順応下 ERG では, ピカチュリン KO マウスはすべての刺激輝度で b 波振幅は有意に減弱し, 潜時は有意に延長していた. このことから錐体視細胞からのシグナル伝達にも障害があることが分かった. 次にピカチュリン KO マウスの視運動性眼球反応(optokinetic response: OKR)を測定した(図 7). その結果, 低空間周波数では野生型と差を認めないものの, 高空間周波数では KO マウスの OKR が野生型と比較して有意に弱かった. 視力と縞視力は基本的に異なるものの, 両者は相関するとの報告もあること

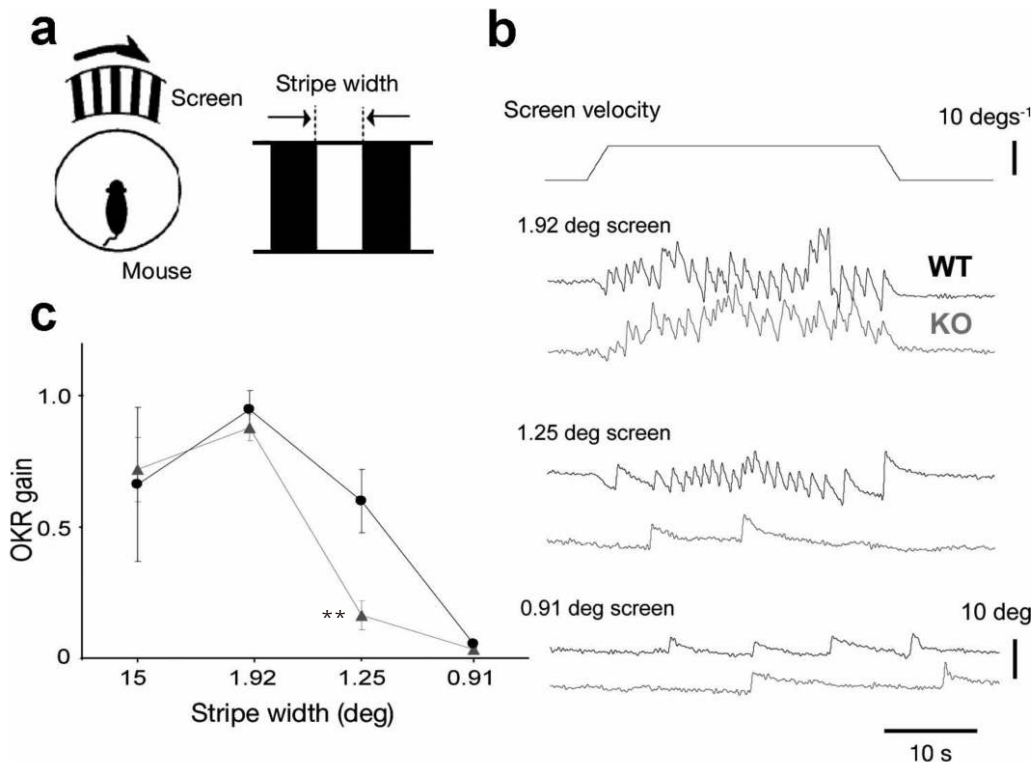


図7 ピカチュリン KO マウスの視運動性眼球反応(OKR)の解析.

OKRは4種類の空間周波数の異なる縞視標を使用して測定した. a: 測定のシェーマ. b: 眼振測定結果の例. WT: 野生型マウス, KO: ピカチュリン KO マウス. c: 低空間周波数では有意差を認めないが, 高空間周波数ではピカチュリン KO マウスに有意な OKR 減弱を認めている. —▲—: ピカチュリン KO マウス, —●—: 野生型マウス. **: $p < 0.01$.

(文献 19 より許可を得て転載, 改変)

から²⁶⁾, ピカチュリン KO マウスでは, 軽度の視力低下があることが推測された.

VI ピカチュリンは α -ジストログリカンの生理的ナリガンドである

ピカチュリンの C 末端側のドメイン構造と類似の構造をもつアグリンやパーレカン, いくつかのラミニンでは, そのラミニン G ドメイン依存的に α -ジストログリカンと相互作用する²⁷⁾²⁸⁾. ジストログリカンは細胞外コンポーネントである α -ジストログリカンと膜貫通コンポーネントの β -ジストログリカンからなる. α -ジストログリカンは高度な糖鎖修飾を受けており, β -ジストログリカンと細胞外で結合することによって細胞表面に固定されている. さらに β -ジストログリカンは, 細胞内ではジストロフィンと結合する(図 1). α -ジストログリカンの糖鎖修飾異常は先天性筋ジストロフィ (type 1 D) (MIM#608840), Walker-Warburg syndrome (MIM#236670), 福山型筋ジストロフィ (MIM#253800), Muscle-eye-brain 病 (MIM#253280) などの原因となり, ジストロフィンの異常は DMD/BMD の原因となる. DMD/BMD 患者の中には暗順応下での ERG b 波異常を示す症例があることが報告されている^{12)~18)}. さらに, 先

天性筋ジストロフィ (type 1 D) や Walker-Warburg syndrome のモデルマウス ($Large^{myd}$, $Large^{vis}$)²⁹⁾³⁰⁾ (図 8 a) や DMD/BMD モデルマウスの一部の系統 (mdx^{Cv2} , mdx^{Cv4})¹³⁾³¹⁾ では ERG b 波潜時の延長が報告されている(図 8 b, c). 以上の報告とピカチュリン KO マウスの ERG の特徴とを考え合わせると, ピカチュリンがジストログリカンと機能的に相互作用することが推測された. このことを示すためまず免疫組織染色を行い, ピカチュリン, ジストログリカン, ジストロフィンが共局在することを示した(図 9 a~f). 次にピカチュリンのラミニン G ドメインが α -ジストログリカンと結合するかを調べるため, 3 つのラミニン G ドメイン (残基 391~1,017) に His タグを接続した組換え蛋白質と α -ジストログリカンに Fc タグを接続した組換え蛋白質を作製しプルダウンアッセイを行った. α -ジストログリカンとアグリンもしくはパーレカンとの結合には二価の陽イオンを必要とすることが知られている^{32)~34)} ので, 結合実験はカルシウムイオンとマグネシウムイオン存在下, あるいは EDTA 存在下で行った. その結果, ピカチュリンのラミニン G ドメインはラミニン, アグリン, パーレカンと同様に二価の陽イオン依存的に α -ジストログリカンと結合することが示された(図 9 g). ラミニンとパーレカンが α -ジ

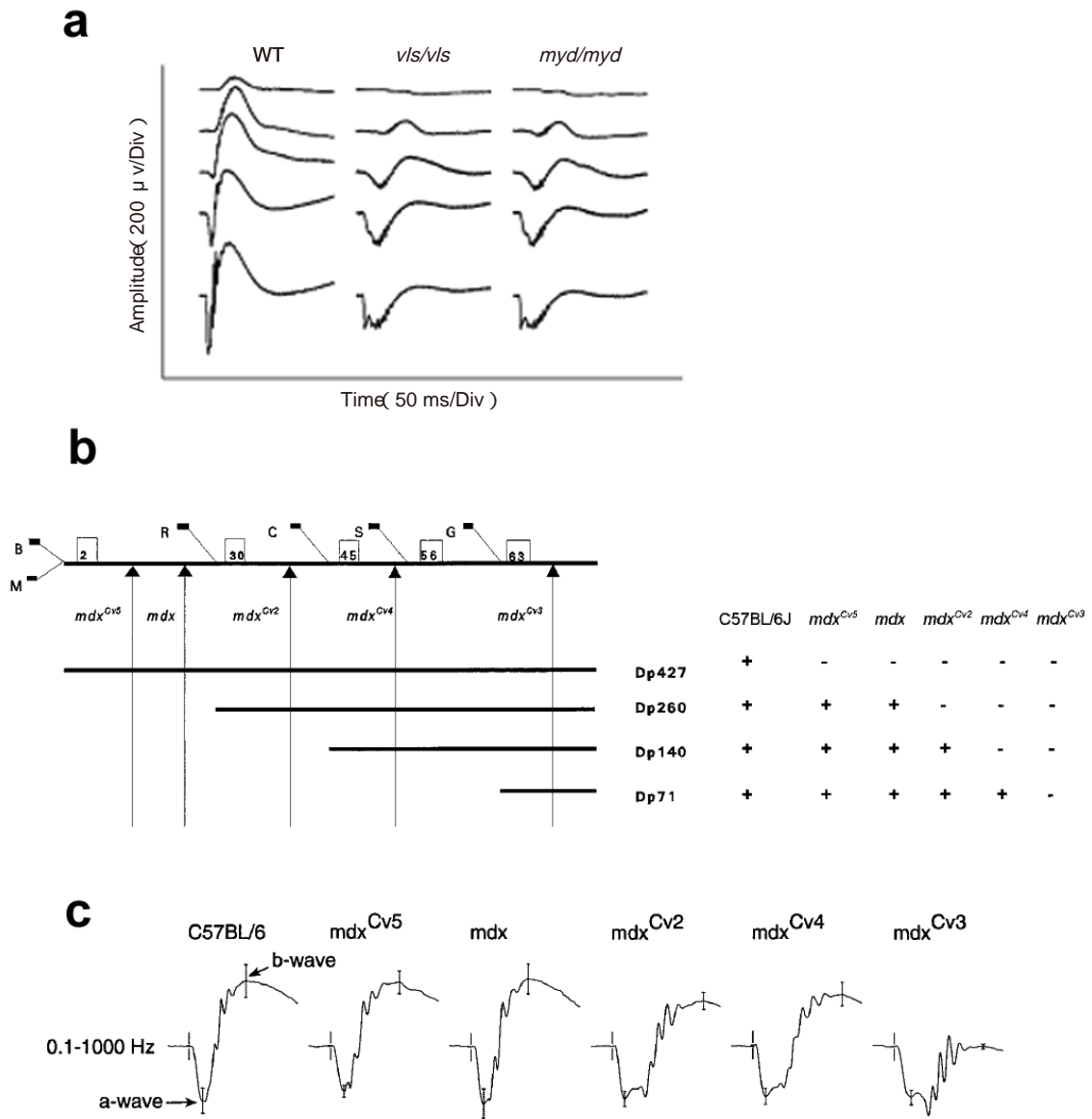


図 8 Large^{vis}, Large^{myd}および各種 mdx マウスの ERG.

a : Large^{vis}, Large^{myd}の暗順応下 ERG. 両者ともに b 波の潜時延長が著しい. WT : 野生型マウス. b : マウスジストロフィン遺伝子のシェーマ. 数字はエクソンの番号. 5 系統のジストロフィン遺伝子異常マウスの変異の位置を矢印で示す. 右は各系統のアイソフォーム欠損の有無を示す. c : 各系統の代表的 bright-flash ERG. *mdx^{Cv2}*, *mdx^{Cv4}* 系統では著明な b 波の潜時延長を認める. *mdx^{Cv3}* 系統では b 波潜時延長に加え振幅低下も認める.

(a : 文献 30 より許可を得て転載, 改変, b, c : 文献 31 より許可を得て転載, 改変)

ストログリカンと結合するには IIH 6 抗体で認識される α -ジストログリカンの糖鎖付加が必要であることが示されている^{34)~36)}. IIH 6 抗体存在下で同様にプルダウンアッセイを行ったところ, 結合が阻害された(図 9 h). このことからピカチュリンと α -ジストログリカンとの結合には α -ジストログリカンの糖鎖付加が必要であることが示された. さらに, 網膜におけるピカチュリンと α -ジストログリカンの生理的な相互作用を示すためにマウス網膜から抽出したジストログリカン蛋白質を用いてプルダウンアッセイを行った(図 9 i). その結果, 抽出ジストログリカンとピカチュリンが二価の陽イオン依

存性に結合することが明らかとなった. 以上の結果から, 網膜ではピカチュリンは α -ジストログリカンの生理的リガンドであることが示された. DMD/BMD 患者の ERG b 波異常はジストロフィンの異常によって, ジストログリカン-ピカチュリン複合体との相互作用に異常を来すことが原因の一端であると推測された.

VII ピカチュリン変異患者は存在するだろうか?

ピカチュリン遺伝子はヒトでも存在し, 5 番染色体短腕(p13.2-p13.1)に位置する. これは, early-onset aut-

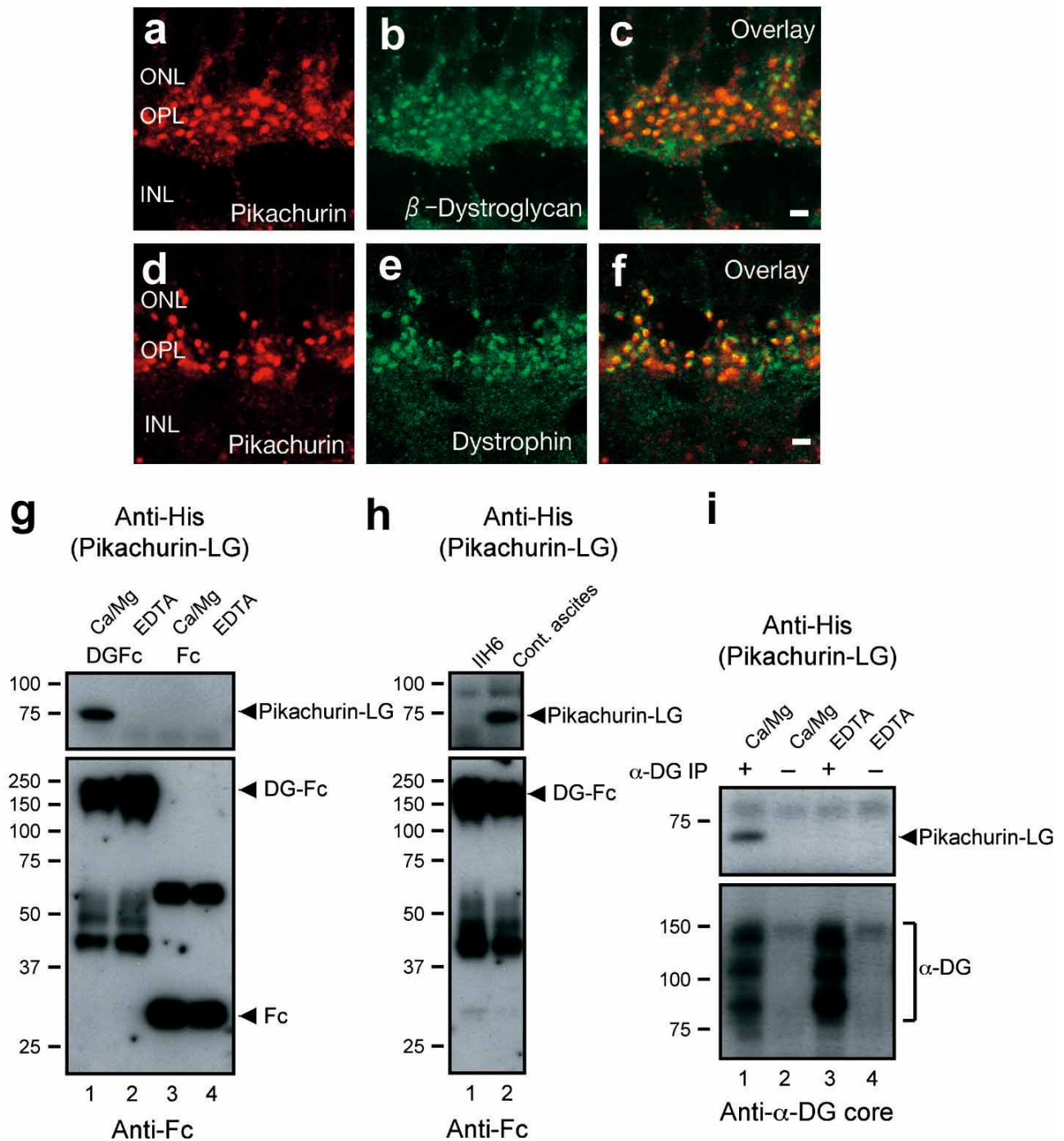


図9 ピカチュリンとジストログリカンの機能的相互作用。

a～f：野生型マウス網膜をピカチュリン抗体(a, d), β -ジストログリカン抗体(b), ジストロフィン抗体(e)にて免疫染色した。重ね合わせるとそれぞれシグナルが重なる(c, f). scale bar=2 μ m.

g：ピカチュリンのLGドメイン(pikachurin-LG)はカルシウムイオン, マグネシウムイオン存在下で α -ジストログリカンと結合する。レーン1： $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 存在下でDG-Fc(Fcタグを接続した α -ジストログリカン)とpikachurin-LGをプルダウン。レーン2：EDTA存在下でDG-Fcとpikachurin-LGをプルダウン。レーン3： $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 存在下でFcとpikachurin-LGをプルダウン(対照1)。レーン4：EDTA存在下でFcとpikachurin-LGをプルダウン(対照2)。

h：ピカチュリンのLGドメインと α -ジストログリカンとの結合は α -ジストログリカンの糖鎖を認識するIIIH6抗体にて阻害される。レーン1：IIIH6抗体存在下にDG-Fcとpikachurin-LGをプルダウン。レーン2：対照 ascites 存在下にDG-Fcとpikachurin-LGをプルダウン(対照)。

i：ピカチュリンと網膜由来 α -ジストログリカン(α -DG)はカルシウムイオン, マグネシウムイオン存在下で結合する。レーン1： $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 存在下で網膜から抽出した α -ジストログリカンとpikachurin-LGを免疫沈降。レーン2： $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 存在下で α -ジストログリカンなしで免疫沈降(対照1)。レーン3：EDTA存在下で網膜から抽出した α -ジストログリカンとpikachurin-LGを免疫沈降。レーン4：EDTA存在下で α -ジストログリカンなしで免疫沈降(対照2)。

(文献19より許可を得て転載)

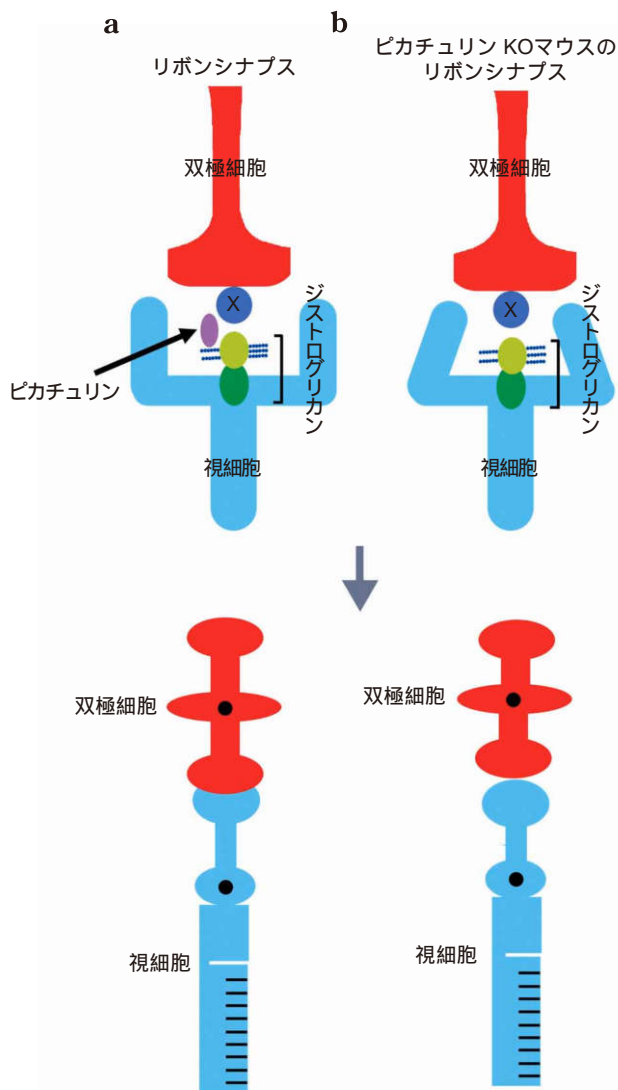


図 10 視細胞リボンシナプス形成におけるピカチュリンの役割³⁹⁾.

- a : 野生型マウスでは、ピカチュリンによる前シナプス膜の形状変化が双極細胞の樹状突起の陥入に必要である、もしくは未知の因子 X とピカチュリンとの相互作用によって樹状突起先端が引き寄せられる可能性が考えられる。
- b : ピカチュリン KO マウスでは前シナプス膜が樹状突起先端の陥入に適した形状に変化しないか、もしくは未知の因子 X との相互作用の欠損により、陥入できない可能性が考えられる。

osomal dominant macular dystrophy (MCDR 3) がマップされた遺伝子座の近傍であるが (RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>), ピカチュリン KO マウスの表現型からこの疾患の原因がピカチュリンの変異にあるとは考えにくい。ピカチュリン異常患者がもし存在するのであれば、「通常の検査では原因を特定できない軽度視力低下」を示すのではないかと考えている。弱視として扱われ、疾患として認識されず見過ごされている可能性がある。また、ピカチュリン KO マウスヘテロ接合体の組織および ERG は対照マウスと有意な差を認めな

かった(データ未掲載)。そのため、ピカチュリン異常患者の遺伝形式は常染色体劣性遺伝をとることが予想される。

VIII 視細胞リボンシナプス形成におけるピカチュリン

神経筋接合部では、ジストログリカン は後シナプス部に局在し、アグリニン、ラミニン、パーレカンのようなリガンドと結合することによりシナプスの分化・成熟を誘導する³⁷⁾³⁸⁾。リボンシナプスでは神経筋接合部と異なり、ジストログリカンは前シナプス部に局在しており^{8)~10)}、ピカチュリンは初めて同定された前シナプスに局在するジストログリカンのリガンドである¹⁹⁾。視細胞シナプス部へ双極細胞樹状突起先端が陥入する際、ピカチュリンがどのような役割を果たしているかは非常に興味あるところである。我々は二つの仮説を立てた(図 10)。第 1 の仮説はピカチュリンが前シナプス膜を樹状突起先端が陥入するのに適した形状に変化させるというものである。もしそうであるなら、軸索末端の正しい形状が軸索と樹状突起のシナプス形成初期の‘位置決め’に重要であることになる。第 2 の仮説はピカチュリンが樹状突起先端に発現する未知の蛋白質との相互作用により樹状突起先端をリボンシナプス内へ引きこむ誘引因子であるというものである。これらの仮説の検証は今後の課題である。

IX おわりに

近年、iPS 細胞や神経幹細胞などを用いた再生医療が注目されているが、神経系では目的とするニューロンへの分化誘導がうまくできても、生体内へ導入後、期待される正しいシナプスがうまく形成されない可能性が指摘され、機能的シナプス形成を生体で誘導することが重要な課題となっている。また同時に、ブレイン・マシン・インターフェイスといった神経工学による視覚補助の研究も盛んになりつつある。こういった研究において、視覚を再構築するために細胞がシナプス形成し、網膜としてのネットワークを形成するメカニズムと原理を理解することは必須である。したがって、再生医学ならびに神経工学の面からも中枢神経シナプス形成の生体レベルでの理解が非常に重要であり、本研究は再生医療や神経工学の実用化に向けてのステップアップにも貢献できると期待される。

稿を終えるにあたり研究をご指導いただきました大阪大学・故田野保雄教授、不二門尚教授、大阪バイオサイエンス研究所・古川貴久博士に深謝いたします。また、大阪大学眼科学教室、感覚機能形成学教室、大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門、名古屋大学・近藤峰生博士、白倉治郎博士、神戸大学・戸田達史博士、大阪大学・澤井 元博士、梶村直子先生の各グループの共同研究者達の協力のもとに本研

究が行われました。ここに深く謝意を表します。

文 献

- 1) **Schmitz F** : The making of synaptic ribbons : how they are built and what they do. *Neuroscientist* 15 : 611—624, 2009.
- 2) **Sudhof TC** : The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27 : 509—547, 2004.
- 3) **tom Dieck S, Brandstatter JH** : Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res* 326 : 339—346, 2006.
- 4) **Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermuller J, Weiler R, Garner CC**, et al : The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37 : 775—786, 2003.
- 5) **Straub V, Campbell KP** : Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10 : 168—175, 1997.
- 6) **Reed UC** : Congenital muscular dystrophy. Part I : a review of phenotype and diagnostic aspects. *Arq Neuropsiquiatr* 67 : 144—168, 2009.
- 7) **Henry MD, Campbell KP** : Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11 : 602—607, 1999.
- 8) **Ueda H, Gohdo T, Ohno S** : β -dystroglycan localization in the photoreceptor and Müller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 46 : 185—191, 1998.
- 9) **Jastrow H, Koulen P, Altmann WD, Kriger S** : Identification of a β -dystroglycan-immunoreactive subcompartment in photoreceptor terminals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 17—24, 2006.
- 10) **Schmitz F, Drenckhahn D** : Localization of dystrophin and β -dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem Cell Biol* 108 : 249—255, 1997.
- 11) **Daloz C, Claudepierre T, Rodius F, Mornet D, Sahel J, Rendon A** : Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina : effect of the mdx (3 Cv) mutation. *Mol Cell Neurosci* 17 : 908—920, 2001.
- 12) **Pillers DA, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR**, et al : Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 4 : 82—86, 1993.
- 13) **Cibis GW, Fitzgerald KM, Harris DJ, Rothberg PG, Rupani M** : The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3646—3652, 1993.
- 14) **Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambrone SA, Harris DJ** : Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy : evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *J Clin Invest* 93 : 2425—2430, 1994.
- 15) **Pillers DA** : Dystrophin and the retina. *Mol Genet Metab* 68 : 304—309, 1999.
- 16) **Pillers DA, Fitzgerald KM, Duncan NM, Rash SM, White RA, Dwinnell SJ**, et al : Duchenne/Becker muscular dystrophy : correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Hum Genet* 105 : 2—9, 1999.
- 17) **Sigesmund DA, Weleber RG, Pillers DA, Westall CA, Panton CM, Powell BR**, et al : Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology* 101 : 856—865, 1994.
- 18) **Cibis GW, Fitzgerald KM** : The negative ERG is not synonymous with nightblindness. *Trans Am Ophthalmol Soc* 99 : 171—175, 2001.
- 19) **Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K**, et al : Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci* 11 : 923—931, 2008.
- 20) **Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I**, et al : Otx 2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6 : 1255—1263, 2003.
- 21) **Koike C, Nishida A, Ueno S, Saito H, Sanuki R, Sato S**, et al : Functional roles of Otx 2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol Cell Biol* 27 : 8318—8329, 2007.
- 22) 西田明弘 : 網膜視細胞の細胞運命決定機構の解析. *日眼会誌* 109 : 708—716, 2005.
- 23) **Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP**, et al : Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85 : 525—535, 1996.
- 24) **Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y** : Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23 : 354—358, 1999.
- 25) **Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S** : Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77 : 361—369, 1994.
- 26) 西信元嗣 : 眼光学の基礎. 金原出版, 東京, 145—181, 1990.
- 27) **Winder SJ** : The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26 : 118—124, 2001.
- 28) **Hohenester E, Tisi D, Talts JF, Timpl R** : The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of α -dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol Cell* 4 : 783—792, 1999.
- 29) **Holzfeind PJ, Grewal PK, Reitsamer HA, Kechvar J, Lassmann H, Hoeger H**, et al : Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large (myd) mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle-eye-brain disorder.

- ders. *Hum Mol Genet* 11 : 2673—2687, 2002.
- 30) **Lee Y, Kameya S, Cox GA, Hsu J, Hicks W, Maddatu TP**, et al : Ocular abnormalities in Large (myd) and Large (vls) mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Mol Cell Neurosci* 30 : 160—172, 2005.
- 31) **Pillers DA, Weleber RG, Green DG, Rash SM, Dally GY, Howard PL**, et al : Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina : genotype-phenotype analysis of Duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol Genet Metab* 66 : 100—110, 1999.
- 32) **Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R** : Binding of the G domains of laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J* 18 : 863—870, 1999.
- 33) **Bowe MA, Deyst KA, Leszyk JD, Fallon JR** : Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes : a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron* 12 : 1173—1180, 1994.
- 34) **Ervasti JM, Campbell KP** : A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122 : 809—823, 1993.
- 35) **Kanagawa M, Michele DE, Satz JS, Barresi R, Kusano H, Sasaki T**, et al : Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Lett* 579 : 792—796, 2005.
- 36) **Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS**, et al : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418 : 417—422, 2002.
- 37) **Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S** : Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 77 : 675—686, 1994.
- 38) **Ervasti JM, Campbell KP** : Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66 : 1121—1131, 1991.
- 39) **Satz JS, Campbell KP** : Unraveling the ribbon synapse. *Nat Neurosci* 11 : 857—859, 2008.
-