

かが最近の筆者の関心事の一つである。これを理解するためには、生合成酵素の構造・機能・調節の相関や遺伝子発現ネットワーク、さらには酵素の翻訳後修飾などを含めた統合的な解析が必要であろうと考えている。

- 1) Kobashi, N., Nishiyama, M., & Tanokura, M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1713–1718.
- 2) Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T., & Yamane, H. (1999) *Genome Res.*, **9**, 1175–1183.
- 3) Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 673–679.
- 4) Vogel, H., Ed. (1965) *Lysine Biosynthesis and Evolution*, Academic Press, New York.
- 5) Schäfer, S., Paalme, T., Vilu, R., & Fuchs, G. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **186**, 695–700.
- 6) Lomakin, I.B., Xiong, Y., & Steitz, T.A. (2007) *Cell*, **129**, 319–332.
- 7) Wulandari, A.P., Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., Hoshino, T., & Yamane, H. (2002) *FEBS Lett.*, **522**, 35–40.
- 8) Feller, A., Ramos, F., Piérard, A., & Dubois, E. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **261**, 163–170.
- 9) Andi, B. & Cook, P.F. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31633–31640.
- 10) Okada, T., Tomita, T., Wulandari, A. P., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 4195–4205.
- 11) Qian, J., Khandogin, J., West, A.H., & Cook, P.F. (2008) *Biochemistry*, **47**, 6851–6858.
- 12) Zhang, P., Ma, J., Zhang, Z., Zha, M., Xu, H., Zhao, G., & Ding, J. (2009) *Biochem. J.*, **421**, 133–143.
- 13) Tsubouchi, T., Mineki, R., Taka, H., Kaga, N., Murayama, K., Nishiyama, C., Yamane, H., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 18511–18516.
- 14) Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., & Yamane, H. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5067–5073.
- 15) Miyazaki, J., Kobashi, N., Fujii, T., Nishiyama, M., & Yamane, H. (2002) *FEBS Lett.*, **512**, 269–274.
- 16) Fujiwara, K., Tsubouchi, T., Kuzuyama, T., & Nishiyama, M. (2006) *Microbiology*, **152**, 3585–3594.
- 17) Quintela, J.C., Pittenauer, E., Allmaier, G., Aran, V., & de Pedro, M.A. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 4947–4962.

西山 真

(東京大学生物生産工学研究センター)

Regulatory mechanisms of novel lysine biosynthesis in thermophile

Makoto Nishiyama (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan)

網膜の運動方向選択性神経回路の機能と構造及び発達

1. はじめに

脳に機能のおよび構造的な左右差があるように、局所神経回路あるいは単一ニューロンの機能や構造にも空間的な非対称性が存在する。大脳皮質の方位選択性細胞や網膜の運動方向選択性神経節細胞 (Directionally Selective Ganglion Cells: DSGCs) などの例が示すように、神経接続の空間的非対称性は視覚情報処理の重要な基盤となる。網膜のDSGCsは、視覚対象が特定の方向 (嗜好方向) に動く時に最大の発火で応答するが、逆方向 (無方向) に動くときには最小の応答しかしない¹⁾。DSGCsの鍵となる神経回路は、空間的に非対称な抑制性シナプス入力であるが、その回路の結合様式の全容あるいは発達機構については分からない点が多い。

そこで筆者らは、遺伝学的解析に適したマウス網膜をモデルとして用い、これらの問題に取り組んでいる。網膜の運動方向選択性神経回路は脳の中でも最も扱いやすい局所神経回路である。回路への入力は網膜の視細胞に当たる光子のパターンであり、これらの情報は興奮性の双極細胞を経由して、続いて神経節細胞と呼ばれる脳への出力細胞によりスパイク列として符号化される (図 1a)。この垂直方向の興奮性経路に対して水平方向の抑制性の入力を送り網膜の演算に深く関与するのが水平細胞とアマクリン細胞である。このミニレビューでは、網膜の運動方向選択性神経回路の機能と構造、および最近明らかになってきた回路の発達様式について述べたい。

2. Directionally Selective Ganglion Cells

マウスの網膜には20種類以上の型の神経節細胞が存在すると考えられており、そのうちの少なくとも3種類がDSGCsである。ON-OFF型のDSGCsは増加する光と減少する光の両方に応答し、早い速度の局所的な動き (獲物や敵に対応すると思われる) に対して効率よく発火する。軸索を外側膝状体や上丘に伸ばし、情報が脳視覚皮質に届くと考えられている。四つのサブタイプが存在し、それぞれ上方向、下方向、前方向、後方向 (レンズにより視野が反転されて網膜上に投影されるため、網膜上では腹方向、背方向、耳方向、鼻方向にそれぞれ対応) のいずれかの方

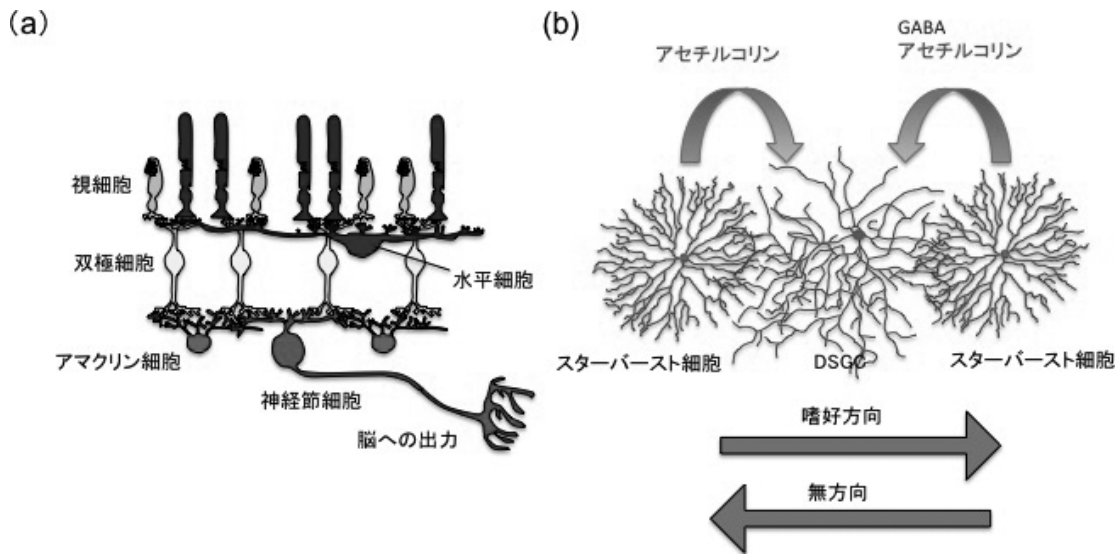


図1 DSGCs へのシナプス入力

(a) 視細胞でとらえられた光の情報は興奮性の双極細胞を経由して脳への出力細胞である DSGCs などの神経節細胞に伝えられる。双極細胞の軸索末端や神経節細胞の樹状突起はアマクリン細胞からの入力を受ける。DSGCs の場合はスターバーストアマクリン細胞からの入力を受ける。

(b) スターバースト細胞から DSGCs への空間的に非対称的な抑制性入力。スターバースト細胞は興奮性のアセチルコリンと抑制性の GABA の両方を放出する。DSGCs は無方向を向くスターバースト細胞の突起から GABA の入力を受けるが、嗜好方向を向く突起からは GABA の入力を受けない。一方、アセチルコリンの入力は空間的に対称的である。

向に動く視覚対象に応答する。ON 型の DSGCs は増加する光に応答し、ゆっくりとした視野全体の動きに対して効率よく発火する。動物自身が動いた時に生じる網膜上の像のズレを効率よく検知すると考えられている。軸索を中脳の副視覚系に伸ばし、視線を安定化するための視運動性眼球運動の制御に重要であると考えられている。三半規管の反応性の向きに対応した、上方向、下方向、前方向に応答する三つのサブタイプがある。近年マウス網膜で発見された OFF 型の DSGCs は減少する光に応答し、軸索を外側膝状体や上丘に伸ばす²⁾。上方向に応答するサブタイプのみがある。これら三つの型のうち、ON-OFF 型と ON 型は共にスターバーストアマクリン細胞と呼ばれる介在性神経細胞から空間的に非対称的な抑制性入力を受け、似たような回路機構により運動方向選択性が達成されていると考えられている。また ON-OFF 型と ON 型の DSGCs の樹状突起の形態は空間的に対称的であり、形態から嗜好方向を予想することは出来ない。以下、ON-OFF 型と ON 型の区別をつけない場合は単に DSGCs と記述する。

3. スターバーストアマクリン細胞からの空間的に非対称な抑制性入力

DSGCs の演算の鍵となる神経回路モジュールは、スターバーストアマクリン細胞からの空間的に非対称的な抑制性入力である。スターバースト細胞は GABA とアセチルコリンの両方を合成し放出するので、抑制性でありかつ興奮性でもある非常にユニークな神経細胞である。神経突起を細胞体から水平方向に放射状に伸ばし、突起の遠位部のみから神経伝達物質を放出する。神経突起からのカルシウムイメージングにより、光刺激が細胞体から突起遠位部の方向へ動く時に効率よく神経伝達物質を放出することが明らかになっている³⁾。DSGCs は無方向を向いているスターバースト細胞の突起から GABA を介した抑制性のシナプス入力を受けるが、嗜好方向を向いている突起からは抑制性入力を受けない⁴⁾(図 1b)。なので光刺激が DSGCs の受容野を無方向に横切る場合は、まず興奮したスターバースト細胞から DSGCs の樹状突起に GABA が放出され、この抑制性入力が双極細胞から DSGCs へのグルタミン酸を介した興奮性入力を相殺するため、DSGCs は最小の発火で応答することになる。なお、スターバースト細胞

から DSGCs へのアセチルコリン性の興奮性入力は一対称的であり、その役割は明確でない。スターバースト細胞をトキシシンにより除去すると網膜の運動方向選択性および視運動性眼球運動は消失する⁵⁾。

先に述べたように、ON-OFF 型 DSGCs には四つのサブタイプがあり、それぞれが異なる嗜好の方向をもつ。そのため、それぞれのサブタイプが特異的な方向から抑制性入力をうけるようにする機構が存在することになる。Serial block-face 電子顕微鏡による回路の三次元構築を利用した最近の研究から、異なる方向を向いているスターバースト細胞の突起は、異なるサブタイプの DSGCs にシナプスを形成しているという構造的証拠が提出され、これらのシナプスが抑制性シナプスに対応すると考えられている⁶⁾。スターバースト細胞からのアセチルコリンを介した対称的な興奮性入力はパラクラインである可能性が高い。それでは、このような特異的なシナプス結合を達成するために、異なる方向を向くスターバースト細胞の突起は異なる細胞接着因子により標識されているのだろうか？ しかしこれまでそのような分子は見えていない。

4. 双極細胞からの運動方向選択性の興奮性入力

DSGCs はスターバースト細胞からのアセチルコリンを介した興奮性入力と双極細胞からのグルタミン酸を介した興奮性入力を受けるが、双極細胞からの興奮性入力は運動方向選択性を示す⁷⁾。すなわち、光刺激が DSGCs の受容野を嗜好方向に横切る場合に、双極細胞からの入力が最大になる。しかしどのような回路機構により双極細胞からの入力が運動方向選択性を示すことができるのかは謎である。双極細胞の軸索末端がスターバースト細胞あるいは他の抑制性細胞から空間的非対称的な抑制性入力を受けている可能性が考えられる。双極細胞の軸索末端は網膜を隙間無くタイリングしていることから、双極細胞に異なる嗜好方向を持ったサブタイプが存在するとは考えにくいので、双極細胞の軸索末端の個々の放出部位が独自の嗜好方向を持つ可能性がある。双極細胞の軸索末端からのカルシウムイメージングがこれらの謎を解くと期待されている。

5. 視覚経験に非依存的な網膜の運動方向選択性の発達

それでは網膜の運動方向選択性はどのような機構で発達するのだろうか。マウスの開眼は生後 13 日頃に起こるが、開眼前の動物や暗黒下で飼育された動物の網膜も運動方向選択性を示すことから、視覚経験は回路の発達には必須でないことが示唆されてきた。また GABA 受容体のブロッ

カー⁸⁾や神経節細胞の発火を抑制するテトロドトキシシン⁹⁾を発達期に眼球に投与しても網膜の運動方向選択性は正常に発達することから、神経活動は回路の発達に必須でないことが明らかになってきている。また、開眼前のマウス網膜ではニコチン性アセチルコリン受容体ベータサブユニットを介した神経細胞の自発発火の波が起きているが、ベータサブユニットノックアウトマウスの網膜でも運動方向選択性は正常に発達することから、自発発火の波も回路の発達に必須でないことが示唆されている¹⁰⁾。

大脳皮質視覚野にも運動方向選択性 (DS) 細胞が存在する。興味深いことに、フェレットを用いた実験ではこれらの細胞の運動方向選択性の発達には視覚経験が重要であることが示されているが、マウスを用いた実験では視覚経験が必要でないことが示されている¹¹⁾。マウスにおいては網膜の DSGCs からの出力が外側膝状体を經由して大脳皮質の DS 細胞に運動方向選択性がある程度保たれたままりレーされて、DS 細胞の受容野が形成されている可能性がある。

6. DSGC サブタイプの分子マーカーの発見

局所神経回路の発達機構の詳細な解析を行うためには神経細胞サブタイプの分子マーカーが必要であると考えたため、筆者らはその同定から開始した。そして、ON 型 DSGCs のサブタイプで発現する遺伝子、SPIG1 を同定することに成功した。まず始めに SPIG1 の発現が *in situ hybridization* によりごく少数の神経節細胞で発現することが確認されたので、発現細胞を GFP で標識するために SPIG1-GFP ノックインマウスを作製し、発達期において GFP 陽性細胞の樹状突起の形態や軸索投射を詳細に解析した結果、GFP 陽性細胞が ON 型 DSGCs であることが示唆された¹²⁾。ON 型 DSGCs の一部のサブタイプは軸索を中脳の medial terminal nucleus (MTN) に投射し、視運動性眼球運動の制御に関与することが知られていた。蛍光神経トレーサーを MTN に注入することにより、MTN 投射細胞は同数の GFP 陽性細胞と陰性細胞から構成されることが分かり、それぞれのポピュレーションの細胞体が網膜上において独立したモザイク状の分布を示すことが明らかになった。

次に MTN 投射細胞の光応答性を電気生理学により解析した。生後 12 日目の網膜を生きたまま取り出し、神経節細胞層を上側にして顕微鏡下に置き、電極を用いて GFP 陽性細胞からスパイク応答を記録した。プロジェクターからの映像を網膜上に投影することにより網膜を光刺激し

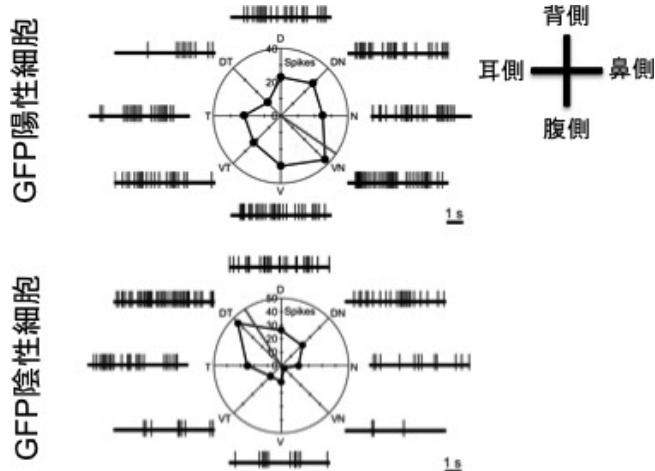


図2 MTN 投射細胞の運動方向選択的なスパイク応答¹³⁾

蛍光ラベルされた逆行性の神経トレーサーで標識された MTN 投射細胞から細胞外記録法によりスパイク応答を記録した。顕微鏡下に置いた単離網膜上で光刺激を八つの異なる方向に動かして応答を調べ、それぞれの方向ごとのスパイク数を円グラフの中にプロット（ポーラープロット）した。円グラフの中心から離れるほどスパイク数が多いことを示す。8点のプロットを線で結び、運動方向選択性の空間的非対称性が見やすくなるようにした。またポーラープロットの外側にはスパイク応答の生データを示した。GFP 陽性細胞は腹方向（あるいは腹鼻方向）への光の動きに対して最大のスパイク応答を示す。一方で、GFP 陰性の MTN 投射細胞は背方向（あるいは背耳方向）への光の動きに対して最大のスパイク応答を示す。なお、無傷の眼球においては視野はレンズにより反転されて網膜上に投影されるため、GFP 陽性細胞は上方向、GFP 陰性細胞は下方向の光の動きに対して最大のスパイク応答を示すことに留意されたい。

た。光刺激を八つの方向に動かして運動方向選択性を調べたところ、驚いたことに、GFP 陽性細胞は上方向の光の動きに応答し、GFP 陰性細胞は下方向の光の動きに応答することが明らかになった¹³⁾ (図2)。また、暗黒下で飼育した動物を解析することにより、GFP 陽性細胞の運動方向選択性の発達には視覚経験が必要ないことを明らかにした。更には、GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞は脳の中の異なる経路を通して MTN に軸索を伸ばすことを明らかにした。MTN 投射細胞における GFP の特異的発現は出生直後の網膜においても観察されたことから、DSGCs の嗜好方向は発達の早い時期において既に決定論的な遺伝学的機構により運命づけられていることが示唆された。

7. 空間的に非対称な抑制性入力のリ編成により運動方向選択性回路が形成される

運動方向選択性の鍵となる回路モジュールの一つは、スターバースト細胞から DSGCs への空間的に非対称な抑

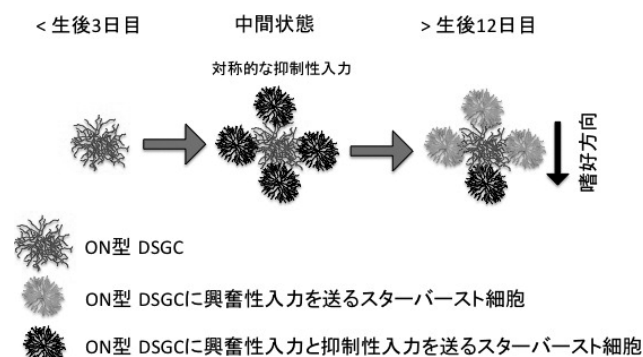


図3 抑制性入力のリ編成¹⁴⁾

生後6日目ではスターバースト細胞から ON 型 DSGCs への抑制性入力は空間的に対称的であるが、生後8日までは抑制性入力のリ編成が起これ、空間的に非対称な抑制性入力完成する。一方で興奮性入力は発達期を通して空間的に対称的である。

抑制性入力であるが、この回路の非対称性が発達期のいつ、どのようにして形成されるのかは不明であった。抑制性入力非対称性の形成機構として、いちど形成された空間的に対称的な入力がのちに再編成されて非対称的となる可能性、あるいは、非対称的な入力のはじめから形成される可能性の二つが考えられた。どちらのモデルが正しいかを明らかにするために、網膜が光応答性を獲得する以前の生後発達期におけるスターバースト細胞から個々の SPIG1-GFP 細胞（上方向の動きに応答する ON 型 DSGCs）へのシナプス入力の空間マッピングを行った¹⁴⁾。

まずスターバースト細胞特異的に光感受性の陽イオンチャンネルであるチャンネルロドプシン2を発現させることにより、スターバースト細胞の活動を光で制御できるようにした。次にこれらの細胞を光パターンで刺激しながら、二光子励起顕微鏡で同定した SPIG1-GFP 細胞にボルテージクランプを行い、GABA を介した抑制性入力とアセチルコリンを介した興奮性入力を記録した。抑制性シナプス入力は生後6日目では空間的に対称的であったが、生後8日までは腹側に位置するスターバースト細胞から抑制性入力を受けようになることが明らかになった。興味深いことに、スターバースト細胞からのアセチルコリンを介した興奮性入力は一貫して空間的に対称的なままであった (図3)。またスターバースト細胞が SPIG1-GFP 細胞に直接シナプス結合していることを、G 遺伝子欠損狂犬病ウイルスによるトランスシナプス標識法を用いて確認した。ニューロンへの抑制性入力が発達期において空間的に対称的な状態から非対称的な状態へと急速にスイッチする事例が示さ

れた。機能の分かっている局所神経回路の結合様式の発達を前例にないほど詳細に明らかにすることができた。また、他のグループにより、GFP標識されたON-OFF型DSGCsとスターバースト細胞からのダブルパッチクランプが行われ、やはり発達期に抑制性結合が空間的に対称的な状態から非対称的な状態に変化するという結果が、我々の結果とほぼ同時に出版された⁸⁾。

8. おわりに

これらの知見から、スターバースト細胞からDSGCsへの抑制性入力、網膜がまだ光応答性を獲得する以前の早い時期において、2日間という非常に短い期間で再編成されて対称的な状態から非対称的な状態へとスイッチすることが明らかになった。それではどのような内在的な遺伝子プログラムによりこの抑制性入力のスイッチングが達成されるのだろうか？ DSGCsの嗜好方向の軸が決定される際の、スターバースト細胞あるいはDSGCsに方向の情報を与える分子機構として、bone morphogenetic proteinのように網膜上で背腹軸あるいは耳鼻軸に沿って非対称的な勾配を持って発現する分子¹⁵⁾が関与することが想定される。神経領域の体軸に沿った非対称性を基盤にして神経接続の空間的非対称性が生み出される分子機構の解明が、網膜のDSGCsの研究からもたらされることが予想される。更にそれらの知見は、大脳皮質の方位選択性細胞などが持つ神経接続の空間的非対称性の構造や発達の基本原理を明らかにする上で役に立つと期待される。

- 1) Barlow, H.B. & Hill, R.M. (1963) *Science*, 139, 412-414.
- 2) Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Meister, M., & Sanes, J. R. (2008) *Nature*, 452, 478-482.
- 3) Euler, T., Detwiler, P.B., & Denk, W. (2002) *Nature*, 418, 845-852.
- 4) Fried, S.I., Muench, T.A., & Werblin, F.S. (2002) *Nature*, 420, 411-414.
- 5) Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., & Nakanishi, S. (2001) *Neuron*, 30, 771-780.
- 6) Briggman, K.L., Helmstaedter, M., & Denk, W. (2011) *Nature*, 471, 183-188.
- 7) Fried, S.I., Muench, T.A., & Werblin, F.S. (2005) *Neuron*, 46, 117-127.
- 8) Wei, W., Hamby, A.M., Zhou, K., & Feller, M.B. (2011) *Nature*, 469, 402-406.
- 9) Sun, L., Han, X., & He, S. (2011) *PLoS One*, 6, e19477.
- 10) Elstrott, J., Anishchenko, A., Greschner, M., Sher, A., Litke, A. M., Chichilnisky, E.J., & Feller, M.B. (2008) *Neuron*, 58, 499-506.
- 11) Rochefort, N.L., Narushima, M., Grienberger, C., Marandi, N., Hill, D.N., & Konnerth, A. (2011) *Neuron*, 71, 425-432.

- 12) Yonehara, K., Shintani, T., Suzuki, R., Sakuta, H., Takeuchi, Y., Nakamura-Yonehara, K., & Noda, M. (2008) *PLoS One*, 3, e1533.
- 13) Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiji, N.L., Usui, S., & Noda, M. (2009) *PLoS One*, 4, e4320.
- 14) Yonehara, K., Balint, K., Noda, M., Nagel, G., Bamberg, E., & Roska, B. (2011) *Nature*, 469, 407-410.
- 15) Sakuta, H., Takahashi, H., Shintani, T., Etani, K., Aoshima, A., & Noda, M. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 10868-10878.

米原 圭祐

(Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research)

Function, structure and development of directionally selective circuits in the retina

Keisuke Yonehara (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Maulbeerstrasse 66, 4058, Basel, Switzerland)

細胞分化をコントロールする翻訳後修飾： O-GlcNAc

1. はじめに

核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質には、Ser/Thr残基側鎖水酸基を介して1分子のN-アセチルグルコサミンが付加する翻訳後修飾が起こる(O-GlcNAc修飾, 図1)¹⁾。発見当初、O-GlcNAc修飾の標的としてSp1などの転写因子や核膜孔複合体タンパク質が同定されたのを契機に続々とO-GlcNAc修飾タンパク質がリストアップされ、現在ではその数は1,000に上る¹⁾。最近、名古屋大の岡島徹也らにより、Notch受容体など細胞膜タンパク質の細胞外ドメインにもO-GlcNAc構造の糖修飾が見出されているが²⁾、これは小胞体で行われる分泌系タンパク質への糖修飾であり、核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質のO-GlcNAc修飾とは修飾・代謝のメカニズムや生理機能が本質的に異なると考えられる。本稿では、核・細胞質・ミトコンドリアタンパク質のO-GlcNAc修飾について述べる。

2. O-GlcNAc修飾と細胞分化

O-GlcNAc修飾は、ヘキソサミン生合成経路(hexosamine biosynthetic pathway, HBP)の最終代謝産物であるUDP-GlcNAcをドナーとして、O-GlcNAc transferase (OGT)により付加され、O-GlcNAcaseによって遊離される(図1)¹⁾。