

特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

網膜視細胞の細胞極性と細胞内オルガネラの制御 —外節形成，繊毛内輸送，核のポジショニングから網膜変性症まで—

小池 千恵子，古川 貴久

網膜視細胞は哺乳類において視覚のための光を感受する唯一の細胞であり，そのユニークな形態から細胞内オルガネラの制御機構を解析する優れたモデルであると考えられる。視細胞に細胞運命が決定したニューロンは，細胞周期離脱時に形成される繊毛から伸長するようにして外節が発生し，外節・内節・核・神経終末からなる極性を持った構造を形成する。外節の形成・維持には光を感受する視物質ロドプシンが必要であり，内節で合成されたロドプシンは内節と外節を結ぶ結合繊毛と呼ばれる領域を通じて外節へと運搬される。また視細胞の自律的な極性形成・維持にはaPKC λ が必要である。本稿では，網膜視細胞の形態形成について，外節形成・ロドプシン輸送・細胞核のポジショニング・細胞極性の観点から概説し，さらに視細胞と網膜層構造の形成に関して考察する。

脊椎動物の網膜は発生学的に中枢神経系に属し，脳と比較して構造が比較的単純かつ生体レベルでの実験操作を容易に行えることから，中枢神経系の良いモデル系として考えられている。しかしながら網膜と脳は多くの相違点があり，網膜は固有の神経細胞を持つことが知られている。特に視細胞は外部から入力された光シグナルを神経シグナルに変換する第一のニューロンであり，極性に富んだ特徴的な形態を持つ細胞である。したがって，我々は視細胞がニューロンをはじめとする細胞の形態形成メカニズムを解析する上で優れたシステムであると考えている。本総説においては網膜視細胞を中心に，網膜細胞の極性形成およびオルガネラの制御について，最新の知見を概説したい。

1. 網膜の構造と機能

網膜は眼球の後方に位置する薄いシート状の組織で，明確な層構造を形成し，形態学的にも比較的シンプルで発生

期のニューロンの形態を観察するのに適している（図1）。網膜は脊髄や脳と同様に神経上皮由来である。網膜を構成する細胞としては，神経節細胞，アマクリン細胞，双極細胞，水平細胞，視細胞，ミューラークリアの6種類が存在する（図1）。

これらの細胞はそれぞれ独特の形態をとっており，局在も明確に分かれている。網膜視細胞は網膜に入力された光を神経情報に変換する役割を持ち，情報は双極細胞，神経節細胞へと伝達される。水平細胞，アマクリン細胞はこの経路を修飾する働きをする。そして，神経節細胞から視神経が脳へと投射し，外側膝状体，大脳皮質の視覚野へと情報の伝達が行われる。

2. 網膜視細胞の構造と機能

視細胞は，哺乳類では，視覚のための光を感受する唯一の細胞である。我々は以前，視細胞の細胞運命は転写因子Otx2により決定づけられ，成熟を視細胞特異的転写因子Crxが制御することを明らかにし報告した¹⁻⁴⁾。

視細胞は，脊椎動物では杆体と錐体の2種類が存在する（図2）。杆体は暗所視，錐体は明所視と色覚に機能する。錐体はヒトでは長波長の光に感受性を持つ赤錐体，中波長の光に感受性のある緑錐体，短波長の光に感受性のある青錐体の3種類が存在する（マウスでは赤緑錐体，青錐体の

大阪バイオサイエンス研究所 発生生物学部門 (〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-4)

Regulation of cell polarity and intracellular organelles in retinal photoreceptor cells

Chieko Koike and Takahisa Furukawa (Osaka Bioscience Institute, Department of Developmental Biology, 6-2-4 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan)

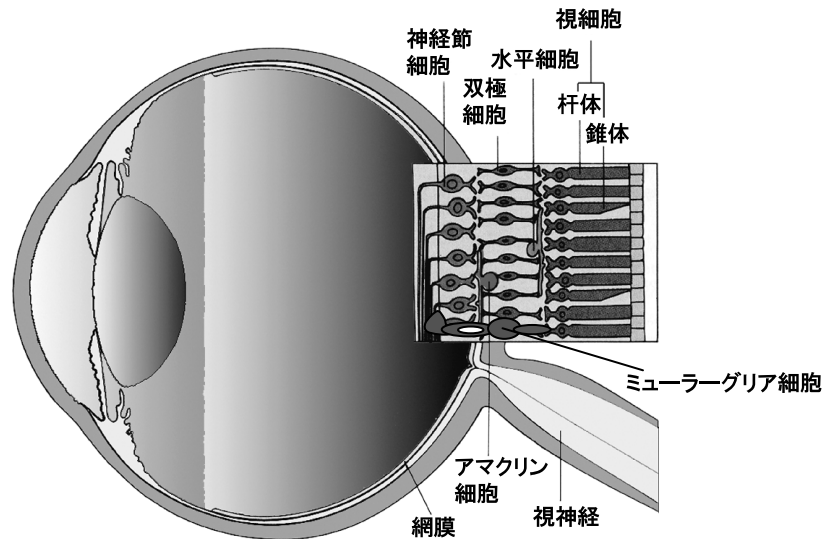


図1 眼と網膜の構造

網膜は、視細胞・水平細胞・双極細胞・アマクリン細胞・神経節細胞・ミュラーグリア細胞の6種類の細胞から構成され、整然とした層構造を形成する。

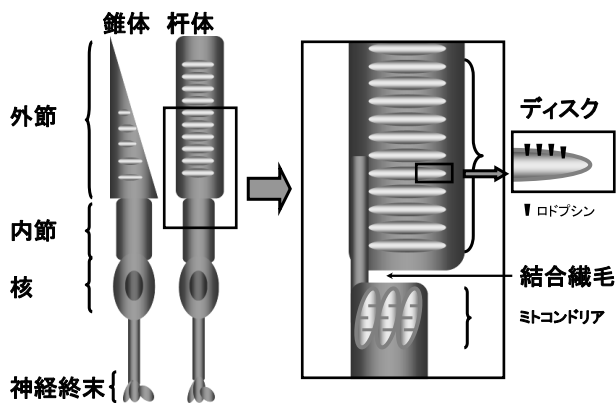


図2 視細胞の構造

視細胞は大きく分けて、外節・内節・(細胞)核・神経終末の四つのパーツから構成され、外節と内節の間には結合繊毛が存在する。外節のディスクにはロドプシンが局在する。

2種)。いずれの視細胞も、光受容部の外節、内節、核、神経終末から構成され、極性を持った構造を形成している(図2)。桿体外節内部には扁平な袋状のディスクが1,000個ほど積み重なっており、ディスク膜には光に感应する視物質であるロドプシンが組み込まれている(図2)。内節には巨大な楕円形のミトコンドリアが局在し、外節と内節の間は結合繊毛(connecting cilia)と呼ばれる繊毛状の構造によりつながっている(図2)。

視細胞の神経終末には水平細胞と双極細胞が陥入し、リボンシナプスと呼ばれる特徴的な構造を形成する。視細胞側にはシナプティックリボンと呼ばれる大きな表面積を持つプレート状構造が構築され、ここに多数のシナプス小胞が整列している。視細胞と双極細胞の種類によってリボンの形態や係留されるシナプス小胞の数に変化する。桿体終

末は通常一つの200nmの高さの大きなリボン構造を形成し、アクティブゾーンの大きさは1-2 μ mである。錐体終末は桿体終末より大きく、いくつものリボンを含み、それぞれのアクティブゾーンは桿体終末より小さいことが知られている。

3. 網膜視細胞の外節形成

視細胞の最も特徴的な構造として、外節が上げられる。外節は視細胞分化の際に形成される繊毛から伸長するようにして形成される。視細胞桿体の外節には扁平な袋状のディスク膜が約1,000個積み重なっており、一つのディスク膜には 10^{4-6} 個の視物質ロドプシンが存在している(図2)。ロドプシンは光受容体であり、光がロドプシンに作用すると下流のシグナルカスケードが活性化され、その結果、細胞膜は過分極となり双極ニューロンへのシナプス伝達が阻害される。ロドプシンは光伝達のレセプターとしてだけでなく、視細胞の外節形成にも重要な役割を果たすことが知られていることから、以下外節形成とロドプシン輸送を関連づけて述べたい。

3.1 結合繊毛

網膜視細胞の外節は結合繊毛から発生する。繊毛は構造の核をなす軸索と基底小体、移行帯、繊毛膜と繊毛端から構成される。ほとんどの細胞は細胞周期から離脱する際に単繊毛を形成することが知られている。繊毛の形成や維持には繊毛内輸送(IFT)が重要な働きをしており、繊毛内ではモータータンパク質であるキネシンによる順行性輸送とダイニンによる逆行性輸送により、巨大分子や膜小胞などが移行している(図3)⁵⁾。

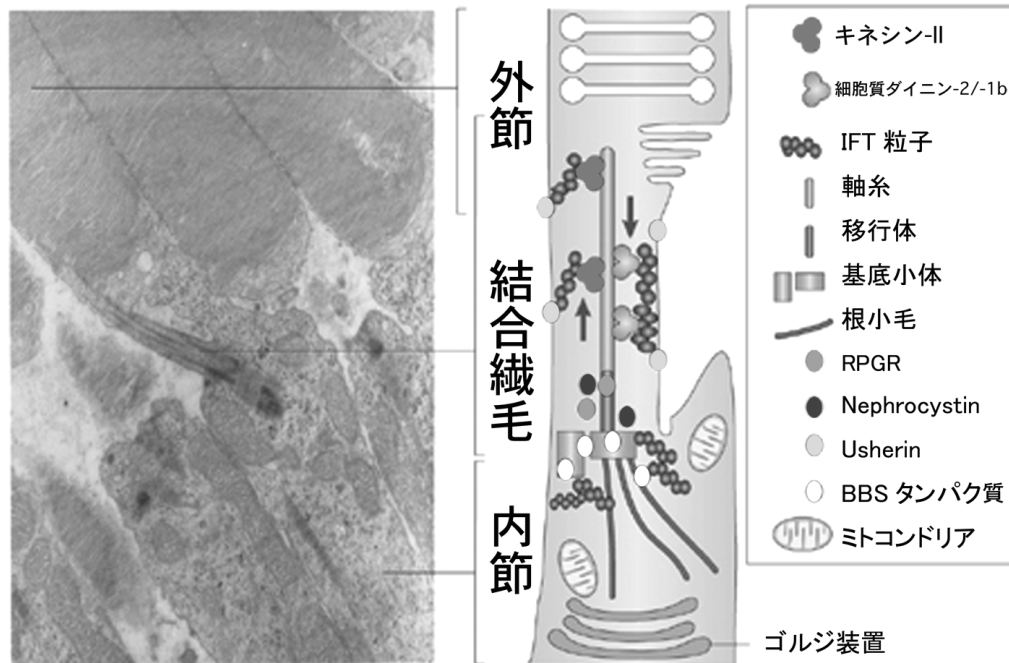


図3 結合繊毛の構造と繊毛内輸送 (IFT)

電子顕微鏡写真 (左) とモデル図 (右)

繊毛の形成や維持には繊毛内輸送 (IFT) が重要な働きをしており、繊毛内ではモータータンパク質であるキネシンによる順行性輸送とダイニンによる逆行性輸送により、巨大分子や膜小胞が移行している。(文献5より改変・転載)

網膜視細胞 (杆体, 錐体) の結合繊毛は九つの軸系から構成されており, 外節の構築・維持・代謝に必要な全ての構成成分は繊毛を介して IFT により運搬される. *KIF 3A*, *IFT 88* など IFT に関わる遺伝子を欠損させたマウスモデルでは視物質等外節を構成する成分が選択的に正常に移行しなくなり, 網膜変性症が生じることが明らかとなっている^{6,7)}.

またヒト網膜変性症と結合繊毛の機能異常の関連性が報告されている. *retinis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)* の変異は網膜色素変性症の原因の約 20% を占めるが, *RPGR* は結合繊毛に局在し *IFT88* と相互作用することが明らかとなった^{8,9)}. またバルデー・ピードル症候群 (*Bardet-Biedl syndrome, BBS*) の主な症状として杆体錐体ジストロフィーがある¹⁰⁾. *BBS2* 欠損マウスではロドプシンの局在が異常となり網膜変性症が引き起こされるが¹¹⁾, 現在報告されている全ての *BBS* 遺伝子が軸系あるいは繊毛基底部に局在していることが明らかになっている^{12,13)}.

3.2 外節ディスク形成

外節ディスク膜形成メカニズムには「ディスク辺縁部形成モデル」および「小胞ターゲティングモデル」の二つの説が存在する. 「ディスク辺縁部形成モデル」は基底部において外節膜から楕形にディスク膜が形成され, 続いて辺縁部が結合することにより, 結果的に膜の内外が反転する

ようにしてディスクが形成されるという仮説である. 本説は広く引用されているが, サポートする知見は少ない. 「小胞ターゲティングモデル」は外節基底部で形成されたり, あるいは結合繊毛を通して内節から運ばれた小胞が膜融合することにより新しいディスクを形成するというものである. 急速凍結ディープエッチング法により調製された網膜試料を用いた電子顕微鏡解析から管状小胞の存在が確認されており, 小胞が繊毛膜や基底部の外節膜由来であることが示唆されている^{14,15)}. また最近, 電子顕微鏡解析により外節軸系細胞質領域に多数の管状小胞が局在すること, さらにディスク膜制御に関わる分子の発現を抑制するとディスク膜形成が不完全となり, 外節基底部において管状小胞が充満することからも, ディスク膜は小胞の膜融合により形成されるという考えが支持されている¹⁶⁾.

3.3 視物質ロドプシンの輸送メカニズム

ロドプシンは, 光伝達だけではなく外節形成にも重要な役割を果たすと考えられている. ヒトロドプシン変異は網膜色素変性症の原因の一つであり, マウスロドプシン変異モデルでは外節が形成されず最終的に視細胞は消失する^{17,18)}. ロドプシン変異モデルマウスにロドプシンを発現させると視細胞の形態形成は回復するが, C 末が欠損しているロドプシンを発現させても外節形成は回復しないことから, 正常なロドプシン発現が視細胞の形態形成に必須で

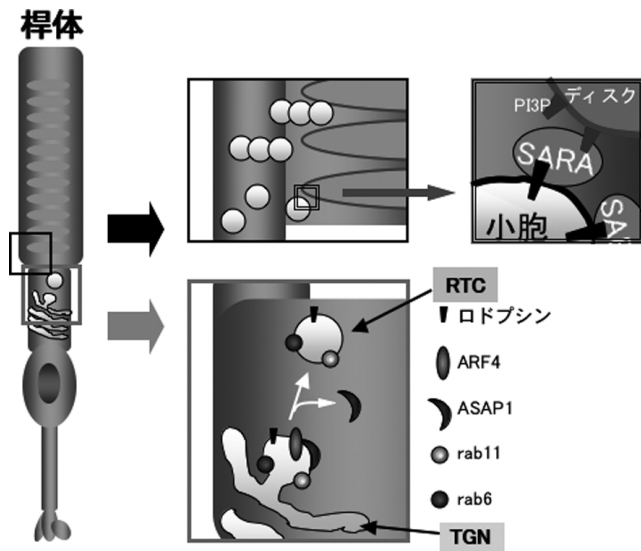


図4 ロドプシンの輸送メカニズム

まず視細胞内節においてTGNからロドプシン運搬体（RTC）が形成される。RTC出芽に関わるARF4はASAP1により解離する（右下）。続いてロドプシンは繊維毛内輸送を介して外節に輸送される。ロドプシンが局在する小胞はロドプシンC末に結合するSARAを介し、PI3Pと相互作用することによりディスク膜と融合する。

あると考えられる^{19,20)}。ロドプシンの代わりにC末をロドプシンのC末に置換したS-オプシンをロドプシン変異マウスに発現させると外節形成が回復することから、C末ターゲティング配列の認識は細胞内輸送を方向付けるだけでなく、外節形成開始のトリガーとなるものと考えられている。

ロドプシンは他の膜タンパク質同様ERで生合成され、ゴルジ装置で修飾される。これらのオルガネラは桿体の細胞体である内節に局在し、外節まで長い道のりを運ばれることとなる。トランスゴルジネットワーク（trans-Golgi network, TGN）で合成されたロドプシンは、ロドプシン運搬体（rhodopsin transport carriers, RTCs）と呼ばれる多形構造体によって外節に運ばれる（図4）²¹⁾。

ロドプシンの運搬体への取り込みと正しい外節輸送へのアドレスシグナルとして、C末VXPX-COOH配列が同定されている²²⁾。VXPX-COOH配列は視細胞の生存に関わることが明らかとなっており、重篤な網膜色素変性症において本配列の変異が確認されている²³⁾。マウスモデルから、VXPX-COOH配列が変異しているロドプシンは光伝達系において正常に機能するが、RTCに特異的に輸送されないため内節やシナプスにも輸送されることが明らかとなっている。異所性に輸送された変異ロドプシンが光活性化されることが網膜変性の原因ではないかと考えられてきたが、この仮説に対して懐疑的な報告がなされている²⁴⁾。現在、シナプス終末に異所性に蓄積された変異ロドプシンが膜の蓄積を引き起こし、これによってシナプス膜の代謝回

転が抑制されることが、視細胞変性を誘導しているのではないかと考えられている²¹⁾。VXPX-COOH配列以外にもロドプシン輸送の制御配列として、ADP-ribosylation factor (ARF) GTPases結合部位として知られるNPXXY配列や繊維毛ターゲティングシグナルであるFRモチーフが輸送シグナルとして知られているが、その機能は明らかとなっていない。

最近、VXPX-COOH配列とsmall GTPaseであるARF4が機能的に相互作用することが明らかとなった²⁵⁾。ARF4はロドプシンC末と直接結合することにより、TGNからのロドプシン運搬体の出芽形成を制御する（図4）。変異ロドプシンは選択的にロドプシン運搬体に移行できず、内節やシナプスに輸送されるが、この異常はARF4がロドプシンC末に結合できないことに起因すると考えられている。

ARF4を制御するGTPase activating protein (GAP) としてはASAP1が同定された。ASAP1は視細胞に高く発現している。ARF4はTGNからロドプシン運搬体が出芽した後、ASAP1により解離される。ARF4はsmall GTPaseのひとつであるrab11と協調的に働くことも明らかとなっているが、rab11はロドプシン運搬体形成後も解離しない。現在視細胞内節におけるTGNからのロドプシンの輸送において、rab11の制御のもとARF4によりリクルートされるロドプシン運搬体の形成にASAP1は機能するのではないかと考えられている（図4）。

このように運搬体に取り込まれたロドプシンは結合繊維毛でのIFTを介して外節に輸送され、ディスク膜構築とともに外節内を移行するものと考えられる。最近Sungらのグループは、ロドプシンC末と相互作用する分子としてSmad anchor for receptor activation (SARA)を同定した¹⁶⁾。SARAはトランスフォーミング増殖因子-β (TGF-β) シグナル伝達系に関わる分子として報告されてきた分子である。最近、細胞内膜輸送においてタンパク質-脂質間相互作用による制御が注目されている。例えばホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) は、初期エンドソーム膜においてEEA1 (early endosomal antigen 1) との相互作用を介してエンドサイトーシス経路の制御に中心的な役割を果たすことで知られている。EEA1は小胞をつなぎ止めSNARE (soluble NSF attachment receptor) 複合体の構築を制御することによりエンドサイトーシス膜の融合を促進する。EEA1はPI3Pとの特異的結合配列であるFYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1) ドメインを持つが、SARAもFYVEドメインを持つことからエンドソーム膜ダイナミクスの制御に重要な役割を果たすのではないかと予想された。

SARAは酵母ツーハイブリッド法により、ロドプシンC末39アミノ酸配列に結合する分子として同定された。HEK293細胞にロドプシンとSARAを強制発現させると、

内在性の EEA1 と共局在する。網膜視細胞においては免疫染色により、内節の頭頂部側から結合繊毛と基底小体、軸糸に強く局在することが明らかとなった。電子顕微鏡解析により、SARA は軸糸の中でも外節ディスク膜の端近傍に、管状小胞状に局在することが明らかとなり、ロドプシンのディスク膜取り込みやディスクの構築を制御している可能性が考えられた。

SARA はリン脂質の中でも PI3P に特異的に結合する。網膜視細胞において、PI3P を産生する PI3K の一つ Vps34 は外節基底部に局在する。Vps34 はディスク膜に局在するが内節には局在しないことから、外節基底部に新しく形成されたディスク膜上で局所的に合成されるのではないかと考えられた。SARA が軸糸内に局在する小胞に発現し、PI3P が新生ディスク上に局在することは、SARA の FYVE ドメインと PI3P の相互作用によりこの二つの膜ドメインがドッキングする可能性を示唆している。

生体でのロドプシンターゲティングにおける SARA の役割を解析するために、FYVE ドメイン-RFP (red fluorescent protein) 融合タンパク質をラット網膜に強制発現させると、ロドプシンの発現が異常となることが確認された。さらに電子顕微鏡解析により、視細胞外節基底部に於ける、正常外節ではみられないような様々なサイズの小胞が検出され、SARA-PI3P の相互作用がロドプシンの外節ディスクへの輸送だけではなく、ディスク膜形成に生理学的役割を果たすことが示唆された。また SARA の発現をラット網膜で抑制させた結果、ロドプシン、アレスタチンの外節へのターゲティングおよび外節ディスク膜形成が損なわれることが明らかとなった。

SNARE タンパク質の一つであるシンタキシン 3 が SARA 同様外節で顕著な発現を示すこと、培養細胞での共発現で共局在が認められることからシンタキシン 3 のロドプシン輸送への関与を解析したところ、シンタキシン 3 は SARA と直接相互作用すること、網膜で発現を抑制することによりロドプシンが正しく外節に局在できなくなることが明らかとなった。また、SARA はシンタキシン 3 とともに、SNARE のコア複合体のコンポーネントである SNAP25 や VAMP2 と複合体を形成することが、免疫沈降法により明らかとなった。

以上より外膜ディスク膜形成は、外節基底部に於いて、まず軸糸に局在する小胞が膜表面のロドプシンの C 末により SARA をリクルートし、続いて SARA が基底部ディスク膜の PI3P と相互作用し、小胞を外節ディスクに連結・融合させることによりなされるのではないかと考えられている (図 4)。

4. 網膜視細胞の細胞核のポジショニング

視細胞は網膜最外層に位置し、外境界膜から外節を網膜

色素上皮細胞側に伸長し、また外網状層において双極細胞・水平細胞とシナプスを形成する。視細胞の核は、視細胞層において整然と列を形成している (図 1)。最近辻川らにより視細胞核の位置情報獲得メカニズムに関する知見が報告された²⁶⁾。

ゼブラフィッシュの変異体 *mikre oko* (*mok*) は一見正常に発生するが、生後 5 日目にして視細胞層がほぼ完全に欠落することが知られていた^{27,28)}。*mok* 変異体由来の視細胞を野生型ゼブラフィッシュ網膜に移植すると、*mok* 由来視細胞は一見正常に発生し外節も形成されるものの、その細胞体は正常視細胞とは異なる形態を示す。この形態変化は *mok* 変異視細胞において、核が正しい位置にポジショニングしないことが原因ではないかという予測の元に解析が行われた結果、移植された *mok* 変異細胞の核のほとんどが外網状層側に留まること、また正常細胞では楕円形の形状を示す核が *mok* 変異体では円形であることが明らかとなった (図 7)。ポジショナルクローニングにより *mok* はダイニンモーター複合体として知られるマウスダイナクチン 1 サブユニットのホモログをコードしていることが明らかとなり、ゼブラフィッシュ *mok* 変異体では *mok* アレルの点変異が生じ、Mok ポリペプチドの全長が翻訳されないことが明らかとなった。

ダイナクチンはダイニン制御サブユニットとして機能し Mok はダイナクチン複合体の構成タンパク質の一つであるが、Mok がダイナクチンを介して核のポジショニングに関わっているか否か、ダイナクチン複合体構成タンパク質の一つであるダイナミチンに注目し解析が行われた。ダイナミチンの強制発現によりダイナクチン複合体が解離することが知られている。ゼブラフィッシュ網膜にダイナミチンを強制発現させたところ、*mok* 変異体と同様、外網状層側への核のポジショニングの異常が誘導された。またダ

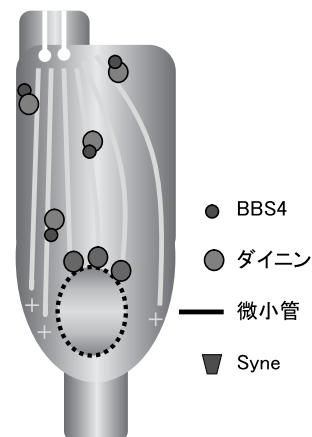


図 5 視細胞における核のポジショニング

視細胞核のポジショニングはダイニンモーター複合体と核膜成分 Syne/ANC により制御される。(Syne とダイニンの相互作用は仮説) (文献 26 より改変・転載)

イニンモーターのコファクターである Lis1 遺伝子をノックダウンすると、やはり視細胞核ポジショニングの異常が確認された。以上よりダイニン複合体が視細胞核のポジショニングを制御していることが明らかとなった。

核膜成分である KASH ドメインタンパク質は、ショウジョウバエや線虫において核のポジショニングに必要であることが知られている。KASH ドメインタンパク質の一つである Syne/ANC に注目し、ドミナントネガティブとして働く C 末のみをゼブラフィッシュ網膜で強制発現した結果からも、視細胞核ポジショニングの異常が確認された。以上よりゼブラフィッシュ網膜において、視細胞核の正しいポジショニングはダイニンモーター複合体と核膜成分 Syne/ANC により制御されることが明らかとなった (図 5)。

ところで Mok ポリペプチドはマウスダイナクチン 1 とそのアミノ酸配列において 64% 同一であり、74% の相同性がある。ショウジョウバエ、マウスはともに、微小管結合ドメイン、ダイニン中間鎖結合ドメイン、BBS4 結合ドメインを持つ。BBS は先に説明したように視細胞欠落により失明を引き起こす色素性網膜症である。BBS4 は中心体周辺部に位置するポリペプチドであり、正常視細胞においては結合繊毛近傍に局在する。mok 変異体においては BBS4 の正しい局在は確認できなかったことから、mok 変異は BBS に何らかの形で関わっている可能性もあると考えられている。

5. 網膜視細胞の極性形成と網膜層構造形成

以上記述したように視細胞は極性に富んだ形態を形成する。網膜視細胞の極性形成メカニズムを明らかにするため、我々は上皮細胞の極性形成に重要な役割を果たすことで知られる aPKC-Par3-Par6 複合体に着目し、atypical protein kinase C (aPKC)λ が網膜視細胞において特異的に欠失するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作成した²⁹⁾。

脊椎動物において aPKC には λ/ι (本総説では λ と表記)、ζ の 2 種類が存在する。aPKCζ のノックアウトマウスは一見正常に発生するものの、生後 2 週間で回腸のパイエル板の数の著しい減少が認められる³⁰⁾。一方 aPKCλ のノックアウトマウスは胎生期致死に至ることから³¹⁾、マウス発生においては aPKCλ が機能的に優位であると考えられる。我々は網膜視細胞特異的に aPKCλ を欠損するマウスを作成した。電子顕微鏡解析により、aPKCλ を欠損した網膜視細胞は外節、内節、神経終末を形成せず、極性が完全に消失することが明らかとなり、aPKCλ が網膜視細胞の極性形成に必須であることを個体レベルで明らかとした (図 6)。aPKCλ を欠損した網膜視細胞にはディスク構造は認められず、また神経終末においてリボンシナプスの

形成は確認されないが、視細胞側のシナプティックリボンの形成は認められた (図 6)。さらに、視細胞成熟マーカーである、外節に局在することで知られる視物質ロドプシン、コーンオプシン、Rom1 や CNCG といった構造タンパク質、転写因子 Crx の発現は aPKCλ を欠損した網膜視細胞において確認され、視細胞成熟は極性形成と独立したメカニズムによることが明らかとなった (図 6)。

また興味深いことに、aPKCλ を網膜視細胞のみで特異的に欠損させたにも関わらず、網膜層構造の異常は視細胞層に留まらず全層において引き起こされることが明らかとなった。脊椎動物網膜においては構成する網膜細胞が極性を持ち、神経終末を介してネットワークを形成することにより整然とした層構造を形成する (図 1)。視細胞は網膜最外層で視細胞層を形成するが、aPKCλ の欠損により視細胞が極性を失った結果、すべての層構造が異常となることが明らかとなった (図 7)。層構造の異常は発生段階を追ってみられ、最も早く分化し最内層に位置することで知られる神経節細胞は、aPKCλ CKO マウス網膜発生初期においては正しい位置に局在する。今まで網膜層構造の形成には支持細胞としてのミュラーグリア細胞の役割が重要だと考えられてきたが、網膜視細胞はミュラーグリア細胞より早く分化し、また視細胞発生に伴い全層構造の異常が見られたことから、筆者らは網膜視細胞の正しい極性形成および正しい位置情報獲得が、網膜全層構造形成に重要なのではないかと考えている (図 8)。

網膜層形成に関しては硬骨魚類であるゼブラフィッシュの変異体を用いた解析が進んでいる。Mosaic eye (moe), oko meduzy (ome), nagie oko (nok), heart and soul (has) といった極性形成に関わるタンパク質をコードしている遺伝子の変異体は類似の表現型を示す。has は aPKCλ/ι をコードしており、その変異体においては網膜全層構造が異常となる³²⁾。最近 has 変異体由来の網膜細胞を野生型ゼブラフィッシュ網膜に移植すると、視細胞以外の網膜細胞は野生型網膜の正しい位置に移動することが明らかとなり、has 変異体の視細胞以外の網膜細胞の位置異常は細胞自律的でないことが明らかとなった³³⁾。しかしながら、網膜視細胞だけは例外であった。has 変異体の網膜視細胞を野生型ゼブラフィッシュ網膜に移植した場合、正しい視細胞層に移動する細胞数は著しく低下した。また移植先においても has 変異体の網膜視細胞は極性を欠いていた。このように、網膜視細胞の位置情報獲得および極性形成において aPKCλ は細胞自律的に働くことが明らかとなった。

ところで脳の発生過程においては、細胞周期を離脱した神経細胞が順に最内層に移行することが知られているが、網膜は脳と異なり内層側の決められたポジションに移行する。神経細胞の前駆細胞である神経上皮細胞は、脳・網膜ともに頂端側 (apical side)・基底膜側 (basolateral surface)

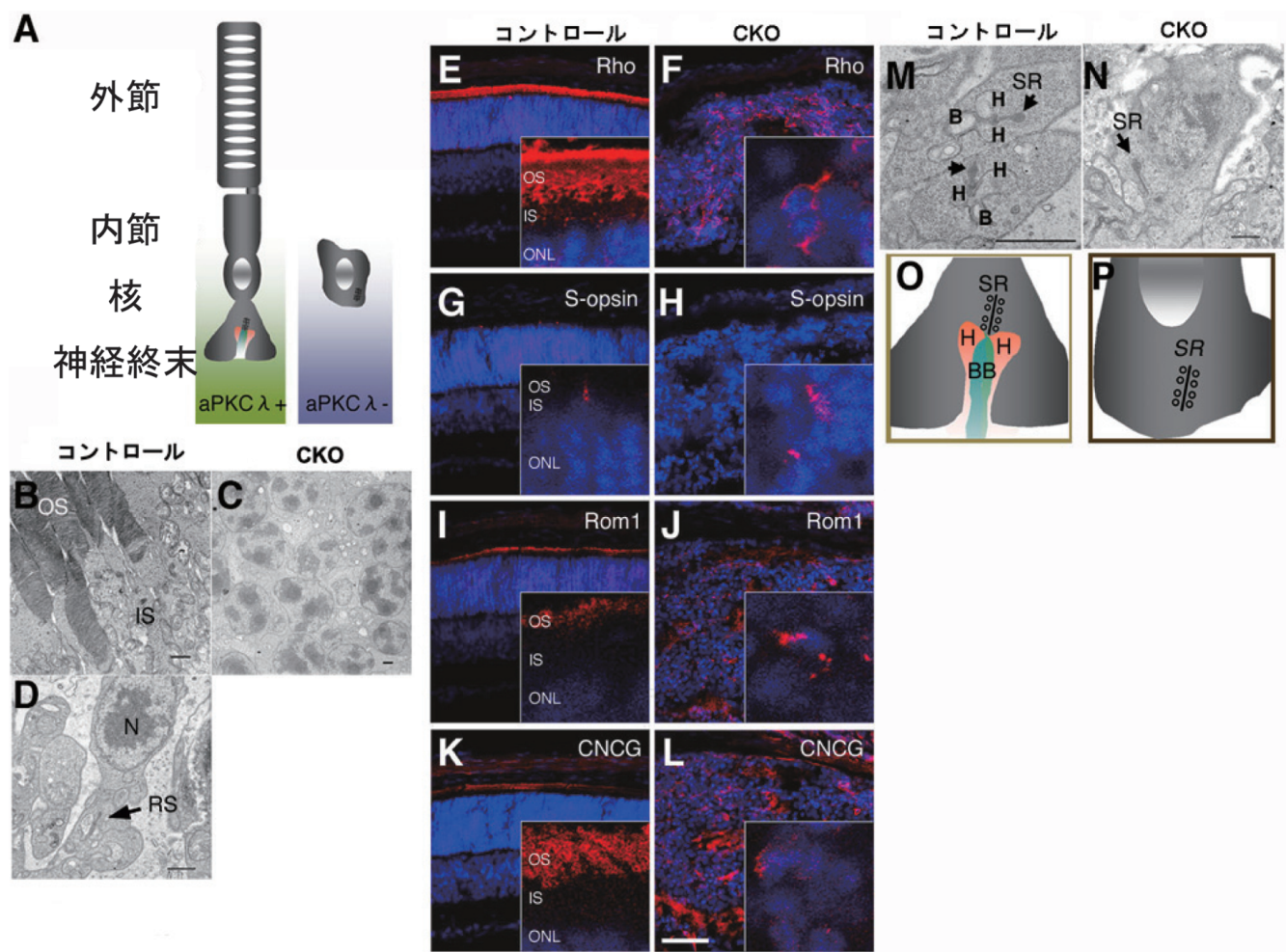


図 6

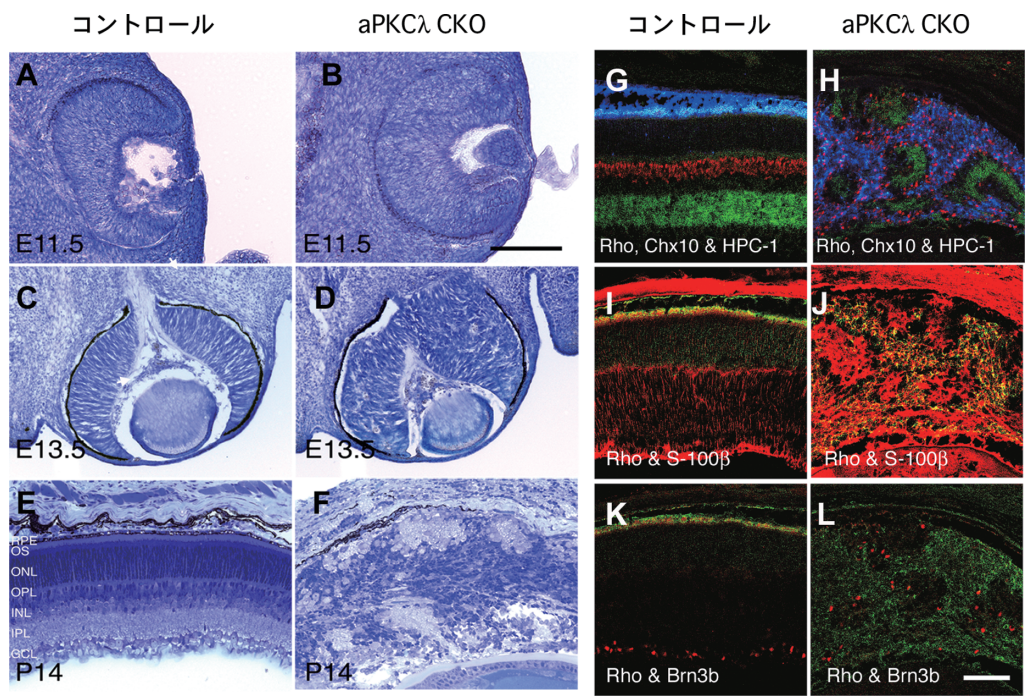


図 7

に細胞体を伸ばし、核は細胞周期に伴いエレベーター様に移行する。中間ニューロンである網膜双極細胞に分化決定した細胞は中間層に移行するが、頂端側・基底膜側に伸びていた細胞体の突起が両端から離れるようにして、視細胞側・神経節細胞側でそれぞれシナプスを形成する³⁴⁾。細胞周期の離脱時には全ての細胞が繊毛を形成するが、頂端側に局在する網膜視細胞は頂端側近傍にて分化決定した後、その繊毛から伸長するようにして外節が発生する。筆者らが解析を行った aPKC λ CKO マウスにおいては網膜視細胞の極性は失われ、網膜全層構造が異常となる。ゼブラフィッシュ *has* 変異体の解析から得られた aPKC λ が視細胞においては細胞自律的に機能するという知見も我々の結果をサポートするものである。我々は分化途中の網膜視細胞において aPKC λ が欠損すると、神経上皮細胞の持っていた細胞極性が失われ、さらに周囲の神経上皮細胞と正しい接着構造を形成できないことが、全層構造の異常を引き起こすのではないかと考えている (図 8)。

6. お わ り に

網膜は哺乳類において唯一の光受容器であり、視細胞は光を神経シグナルに変換する第一のニューロンである。現代のような高度情報化社会では、視覚を通じた情報量が非常に多く、視覚の維持は極めて重要な問題である。網膜は同じ中枢神経系でも脳と異なり生体レベルでの実験操作が比較的容易である。さらに視細胞は繊毛が発達した特徴的な構造を持ち、オルガネラの形成や繊毛内輸送という点からも非常に興味深い研究対象である。現在、視細胞の極性・オルガネラ形成メカニズムの解明が急速に進んでおり、網膜変性症との密接な関連も明らかになりつつある。従って、網膜視細胞の研究から様々な新しい知見が生み出されるものと期待される。

謝辞

本稿でご紹介しました視細胞極性に関する筆者らの研究

は、横浜市立大学医学部の大野茂男教授、秋本和憲博士との共同研究によるものです。研究協力者である大阪バイオサイエンス研究所発生生物学部門の皆さんに感謝致します。本稿を執筆するにあたって助言をいただいた大森義裕博士に感謝致します。また本稿でご紹介させていただいた、視細胞の構造・ロドプシン輸送・細胞核ポジショニングの研究者の方々に、この場をお借りしてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., & Furukawa, T. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6 (12), 1255–1263.
- 2) Freund, C.L., Gregory-Evans, C.Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J.A., Duncan, A., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S.G., Cepko, C.L., Bhattacharya, S. S., & McInnes, R.R. (1997) *Cell*, 91 (4), 543–553.
- 3) Furukawa, T., Morrow, E.M., & Cepko, C.L. (1997) *Cell*, 91 (4), 531–541.
- 4) Furukawa, T., Morrow, E.M., Li, T., Davis, F.C., & Cepko, C. L. (1999) *Nat. Genet.*, 23 (4), 466–470.
- 5) Fliegauf, M., Benzing, T., & Omran, H. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8 (11), 880–893.
- 6) Pazour, G.J., Baker, S.A., Deane, J.A., Cole, D.G., Dickert, B. L., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., & Besharse, J.C. (2002) *J. Cell Biol.*, 157 (1), 103–113.
- 7) Marszalek, J.R., Liu, X., Roberts, E.A., Chui, D., Marth, J.D., Williams, D.S., & Goldstein, L.S. (2000) *Cell*, 102 (2), 175–187.
- 8) Hong, D.H., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K.J., Yang, J., Tulloch, B., Wright, A.F., Arshavsky, V.Y., & Li, T. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44 (6), 2413–2421.
- 9) Khanna, H., Hurd, T.W., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S.K., He, S., Akimoto, M., Wright, A.F., Margolis, B., Williams, D. S., & Swaroop, A. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280 (39), 33580–33587.
- 10) Katsanis, N., Beales, P.L., Woods, M.O., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Ansley, S.J., Davidson, W.S., & Lupski, J.R. (2000) *Nat. Genet.*, 26 (1), 67–70.

図 6 aPKC λ は視細胞の極性形成・維持に必須である

A 正常視細胞 (aPKC λ +) と aPKC λ コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの視細胞 (aPKC λ -) の形態モデル図 (B–D を参照)

B–D 視細胞の電子顕微鏡像。コントロール (B・D), aPKC λ CKO (C)

E–L aPKC λ CKO では視細胞は正しい形態を形成しないが、視細胞分子は発現している。Rho: ロドプシン, CNCG: 錐体 cGMP チャネル

M–P 視細胞の神経終末の電子顕微鏡像 (M, N) とそのモデル図 (O, P)。コントロール (M) では視細胞は水平細胞 (H) および双極細胞 (B) とリボンシナプスを形成するが、aPKC λ CKO (N) では形成されない。ただし視細胞内にシナプティックリボン (SR) と呼ばれる装置は形成されており、視細胞が成熟していることがわかる。

図 7 aPKC λ CKO マウス網膜では全層構造が異常になる

A–F コントロール (A, C, E) と aPKC λ CKO (B, D, F) の網膜組織像。胎生期 11.5 日 (E11.5) では変化はみられないが、E13.5 から aPKC CKO で層構造の乱れが認められ、出生後 14 日 (P14) めでは網膜全体での層構造異常が認められる。

G–L コントロール (G, I, K) と aPKC λ CKO (H, J, L) の免疫組織染色像 (P14)。Rho (ロドプシン, 視細胞に発現), Chx10 (双極細胞), HPC-1 (アマクリン細胞), S-100 β (ミューラーグリア細胞), Brn3b (神経節細胞) に対する抗体を用いた。

スケールバー: 100 μ m。

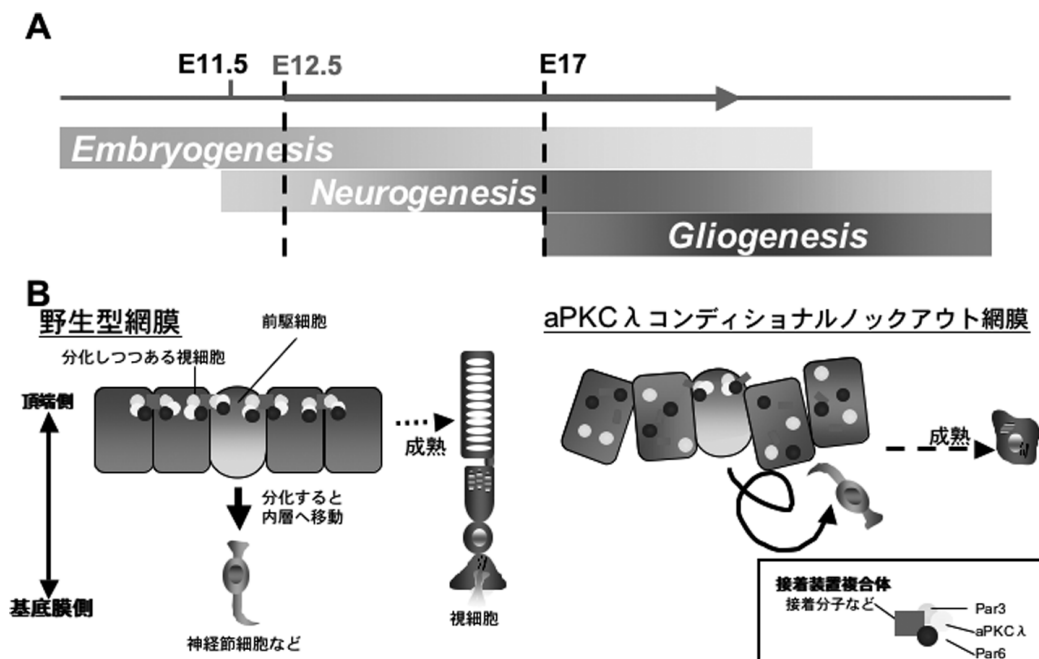


図 8 網膜層構造形成における視細胞の役割

A 網膜発生におけるニューロン分化とグリア分化の時期。APKCλ CKO の異常はミューラーグリア細胞の分化以前に観察される。

B 正常網膜では、視細胞と前駆細胞の間で接着装置が形成されて、前駆細胞が頂端側に保持され、その後分化し正常な位置に移動する。APKCλ CKO では、接着装置が形成されず、その結果前駆細胞は網膜内で分散する。分化は正常に進行するが、正しい位置に移動できず層構造が形成されない。

- 11) Nishimura, D.Y., Fath, M., Mullins, R.F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J.L., Myktytn, K., Swiderski, R.E., Yang, B., Carmi, R., Stone, E.M., & Sheffield, V.C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (47), 16588–16593.
- 12) Beales, P.L. (2005) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15** (3), 315–323.
- 13) Sun, G. (2007) *Omics*, **11** (1), 25–40.
- 14) Obata, S. & Usukura, J. (1992) *Cell Tissue Res.*, **269** (1), 39–48.
- 15) Miyaguchi, K., Kuo, C.H., Miki, N., & Hashimoto, P.H. (1992) *J. Neurocytol.*, **21** (11), 807–819.
- 16) Chuang, J.Z., Zhao, Y., & Sung, C.H. (2007) *Cell*, **130** (3), 535–547.
- 17) Rosenfeld, P.J., Cowley, G.S., McGee, T.L., Sandberg, M.A., Berson, E.L., & Dryja, T.P. (1992) *Nat. Genet.*, **1** (3), 209–213.
- 18) Humphries, M.M., Rancourt, D., Farrar, G.J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R.A., Sieving, P.A., Sheils, D.M., McNally, N., Creighton, P., Erven, A., Boros, A., Gulya, K., Capecchi, M.R., & Humphries, P. (1997) *Nat. Genet.*, **15** (2), 216–219.
- 19) McNally, N., Kenna, P., Humphries, M.M., Hobson, A.H., Khan, N.W., Bush, R.A., Sieving, P.A., Humphries, P., & Farrar, G.J. (1999) *Hum. Mol. Genet.*, **8** (7), 1309–1312.
- 20) Concepcion, F., Mendez, A., & Chen, J. (2002) *Vision Res.*, **42** (4), 417–426.
- 21) Deretic, D. (2006) *Vision Res.*, **46** (27), 4427–4433.
- 22) Deretic, D., Traverso, V., Parkins, N., Jackson, F., Rodriguez de Turco, E.B., & Ransom, N. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15** (1), 359–370.
- 23) Berson, E.L., Rosner, B., Weigel-DiFranco, C., Dryja, T.P., & Sandberg, M.A. (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43** (9), 3027–3036.
- 24) Tam, B.M., Xie, G., Oprian, D.D., & Moritz, O.L. (2006) *J. Neurosci.*, **26** (1), 203–209.
- 25) Deretic, D., Williams, A.H., Ransom, N., Morel, V., Hargrave, P.A., & Arendt, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** (9), 3301–3306.
- 26) Tsujikawa, M., Omori, Y., Biyanwila, J., & Malicki, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (37), 14819–14824.
- 27) Doerre, G. & Malicki, J. (2001) *J. Neurosci.*, **21** (17), 6745–6757.
- 28) Malicki, J., Neuhauss, S.C., Schier, A.F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Abdelilah, S., Zwartkruis, F., Rangini, Z., & Driever, W. (1996) *Development*, **123**, 263–273.
- 29) Koike, C., Nishida, A., Akimoto, K., Nakaya, M.A., Noda, T., Ohno, S., & Furukawa, T. (2005) *J. Neurosci.*, **25** (44), 10290–10298.
- 30) Leitges, M., Sanz, L., Martin, P., Duran, A., Braun, U., Garcia, J.F., Camacho, F., Diaz-Meco, M.T., Rennert, P.D., & Moscat, J. (2001) *Mol. Cell*, **8** (4), 771–780.
- 31) Soloff, R.S., Katayama, C., Lin, M.Y., Feramisco, J.R., & Hedrick, S.M. (2004) *J. Immunol.*, **173** (5), 3250–3260.
- 32) Horne-Badovinac, S., Lin, D., Waldron, S., Schwarz, M., Mbamalu, G., Pawson, T., Jan, Y., Stainier, D.Y., & Abdelilah-Seyfried, S. (2001) *Curr. Biol.*, **11** (19), 1492–1502.
- 33) Cui, S., Otten, C., Rohr, S., Abdelilah-Seyfried, S., & Link, B. A. (2007) *Mol. Cell. Neurosci.*, **34** (3), 431–444.
- 34) Morgan, J.L., Dhingra, A., Vardi, N., & Wong, R.O. (2006) *Nat. Neurosci.*, **9** (1), 85–92.