

氏 名 米原圭祐

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第1167号

学位授与の日付 平成20年3月19日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Expression of SPIG1 reveals development of a retinal
ganglion cell subtype projecting to the medial
terminal nucleus in the mouse

論文審査委員 主 査 教授 山森 哲雄
教授 野田 昌晴
教授 高田 慎治
名誉教授 藤沢 肇（名古屋大学）

Visual information is transmitted to the brain by roughly a dozen distinct types of retinal ganglion cells (RGCs) defined by a characteristic morphology, physiology, and central projections. However, our understanding about how these parallel pathways develop is still in its infancy, because few molecular markers corresponding to individual RGC types are available. Previously, their group described the dorsal-rich expression of a clone, tentatively named D/Bsp120I #1, in the developing chick retina. D/Bsp120I #1 is a secretory molecule of unknown function, which is composed of a follistatin (FS)-like domain, an extracellular calcium-binding (EC) domain, and two immunoglobulin-like domains. Here he refers to this molecule as SPIG1 after SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine)-related protein containing immunoglobulin domains.

In this study, he generated knock-in mice to visualize *SPIG1*-expressing cells with green fluorescent protein (GFP). He found that the mouse retina is subdivided into two distinct domains for *SPIG1* expression and *SPIG1* effectively marks a unique subtype of the RGCs during the neonatal period. In the pan-ventronasal domain, *SPIG1*-positive cells form a regular mosaic and project exclusively to the medial terminal nucleus (MTN) of the accessory optic system (AOS) that mediates the optokinetic nystagmus as early as P1. Their dendrites costratify with ON cholinergic amacrine strata in the inner plexiform layer (IPL) as early as P3. These findings suggest that these *SPIG1*-positive cells are the ON direction selective ganglion cells (DSGCs).

The spatial organization of the MTN-projecting cells in the pan-ventronasal domain was quantitatively investigated by obtaining the density recovery profile (DRP) from P1 to P12. The DRPs showed that these cells are apparently composed of two distinct but interdependent regular mosaics depending on the presence or absence of *SPIG1*, indicating that they comprise two functionally distinct subtypes of the ON DSGCs. The formation of the regular mosaic appears to be commenced at the end of the prenatal stage and completed through the peak period of the cell death at P6. He postulates that lateral inhibition of the cell fate decision and/or repulsive interaction during the lateral migration are the major factors responsible for the formation of the regular mosaics for the MTN-projecting RGCs, which are already observed at P1. After that spatially selective death of neighboring homotypic cells between P3 and P6 contributes to the completion of the mosaic. The latter is probably induced by an activity-dependent mechanism after the establishment of dendritic stratification on the cholinergic strata at P3, which roughly corresponds to the peak period of cell death (P2-P5).

To verify his speculation that *SPIG1*-positive RGCs in the pan-ventronasal domain correspond to a functional subtype of ON DSGCs, electrophysiological recordings were performed on the GFP-positive RGCs in the ventronasal region of the isolated whole-mount retina of *SPIG1^{gfp/+}* mice at P12. These cells showed ON-sustained responses to a full-field flashing light. Next, direction selective responses of these cells were examined by collecting their responses to drift of square-wave gratings in eight different directions. He found that these cells have directional preference for the stimulus movement along the near-vertical axis, characterized by a dramatic increase in impulse activity for dorsonasal to ventrotemporal movement and only a small,

attenuated response for movement in the opposite (null) direction. Thus, his study demonstrated that SPIG1 marks a functional subtype of ON DSGCs during development, which responds best to upward movements.

In contrast to the pan-ventronasal domain, *SPIG1*-positive RGCs are distributed densely in the dorsotemporal domain. Their axons project to the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN), superior colliculus, and AOS. He found that the dendrites of most GFP-positive RGCs in the dorsotemporal domain were distributed throughout the IPL, suggesting that they are composed of multiple types of RGCs.

SPIG1 mRNA and *gfp* mRNA levels were explored by *in situ* hybridization of P10 brain sections in the wild-type mice and heterozygous mice. The expression was prominent in the glomerular layer and mitral cell layer of the olfactory bulb, purkinje cells in the cerebellum, the CA region of the hippocampus, the granular cell layer of the dentate gyrus, and layer II of the entorhinal cortex. GFP expression in the heterozygous mice thus faithfully reproduced the expression of *SPIG1*. Expression of GFP in non-neuronal tissues of *SPIG1^{gfp/+}* mice was also explored by anti-GFP immunostaining to intensify the signal at P14 and P70 (only for the testis and ovary). The expression was observed in the heart (myocardium), lung (alveolar cells and smooth muscle cells in the blood vessels), stomach (epithelial cells and cells in the muscle layer), intestine (epithelial cells located at the tip of intestinal villi and cells in the muscle layer), and ovary (oocyte).

SPIG1 will thus serve as a useful molecular marker for future studies on the development and function of ON DSGCs. Moreover, expression pattern of SPIG1 in the brain and non-neuronal tissues suggests that this molecule is necessary for the function in restricted types of cells during development and adulthood.

本論文は、SPIG1 遺伝子発現細胞が網膜上で細胞同士が一定の距離を持って配置する、いわゆるモザイク状に分布していること、また、本遺伝子が上方向の ON 中心型方向選択性神経節細胞に選択的に発現することを明らかにするとともに、発生期においてこのモザイク構造が形成される過程を詳細に解析したものである。

網膜で受け取られた視覚刺激は、網膜神経節細胞の長い軸索を通じて脳に伝えられる。ほ乳類の網膜神経節細胞は形態学的に 12 種類以上のサブタイプに分類され、それぞれが異なる視覚情報を脳に伝えることが知られている。各サブタイプは、それぞれ固有の機能を発揮するために独自の機能分子を発現していると考えられるが、このような発現分子の差異はこれまで明らかになっていなかった。

SPIG1 は、申請者が所属する研究グループによって、ニワトリの網膜背耳側において強く発現する遺伝子の 1 つとして同定された。申請者がマウス網膜における SPIG1 mRNA の発現を調べたところ、狭い網膜背耳側領域においては本遺伝子を発現する神経節細胞が高密度に分布するのに対し、広範な腹鼻側領域では一定間隔をもって分布する一部の神経節細胞のみが SPIG1 を発現していることを見出した。この発現分布から、SPIG1 は腹鼻側領域において網膜神経節細胞の特定のサブタイプに特異的に発現していることが予想された。そこで、SPIG1 遺伝子について、GFP ノックインマウスを作成することにより、腹鼻側領域における SPIG1 陽性細胞について詳細な解析を行った。

まず、網膜内の樹状突起の分布から、腹鼻側領域に分布する SPIG1 陽性細胞が ON 中心型方向選択性神経節細胞というサブタイプであることが示唆された。ON 中心型方向選択性神経節細胞は、光の動きの情報を副視覚系と呼ばれる視覚中枢に伝え、視運動反応を引き起こす役割を持つと考えられている。このタイプは更に 3 つの機能的サブタイプに分けることができ、それぞれ上方向、下方向、耳から鼻への方向の光の動きのいずれかに対して選択的に反応する。そこで、GFP 陽性細胞の軸索投射の解析及び、逆行性標識を用いた解析を行い、SPIG1 陽性細胞が、上・下方向への方向選択性を有する ON 中心型方向選択性神経節細胞の投射先である、副視覚系の内側核に投射していることを確認した。さらに、電気生理実験によって GFP 陽性細胞の光応答性を解析し、SPIG1 が上方向への方向選択性を持つサブタイプでのみ発現していることを明らかにした。

また、申請者は、副視覚系の内側核へ投射する神経節細胞サブタイプが発生過程においてモザイク形成を行う様子を詳細に解析した。副視覚系の内側核には、上方向への方向選択性を有する SPIG1 陽性細胞と、下方向への方向選択性を有する SPIG1 陰性細胞が投射するが、SPIG1 陰性細胞も SPIG1 陽性細胞と同様にモザイク状に分布すること、また、両者は網膜上でペアを作って分布する確率が高いことを明らかにした。さらに、これらの細胞のモザイク構造の形成には、細胞移動、同種細胞間の反発作用、細胞死等が関与していることを示した。

以上のように、本研究は、単一の網膜神経節細胞の機能的サブタイプにおいて特異的に発現する遺伝子を初めて同定したものである。本研究の発見は、光の動きを感知する網膜神経回路がどのようにして形成されるのか、視覚情報が網膜内で統合される仕組みを明らかにしていく上で重要な手掛かりになると考えられ、神経科学に対する非常に重要な貢献であると評価される。従って本論文は学位論文として十分な内容を備えていると判断された。