

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19427

研究課題名(和文) キンカチョウを用いた網膜中心窩の形成メカニズムの探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism underlying retinal fovea formation using zebra finch

研究代表者

古川 貴久 (Furukawa, Takahisa)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50260609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々の高精度の視覚が成立するためには、網膜の黄斑の中心に形成される窪み構造である中心窩が重要な役割を果たしている。中心窩の異常は、加齢黄斑変性やスターガルト病といった網膜変性疾患による重篤な視覚障害や失明につながるということが知られている。しかしながら、中心窩の発生や形成の分子メカニズムはほとんど分かっていない。キンカチョウは今まで謎であった中心窩形成の研究に優れたモデルとなることが示された。さらに、中心窩形成に関わる遺伝子の一つとして、中心窩周辺領域のグリア細胞に発現する細胞形態の制御因子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の高精度の視覚が成立するためには、網膜の黄斑の中心に形成される窪み構造である中心窩が重要な役割を果たしている。本成果は、今まで未解明であった、中心窩の発生の分子メカニズムの一端を明らかにするとともに、黄斑変性やスターガルト病といった失明につながるヒト網膜変性疾患の診断法や治療技術の開発の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In humans, high-acuity central vision depends on the fovea, which is a small central pit structure formed at the center of the macula in the retina. Retinal degenerative diseases affecting the fovea, including age-related macular degeneration and Stargardt's disease, lead to blindness. In the current study, we investigated foveal development using the zebra finch retina at several developmental stages. We carried out comparative analysis of gene expression profiles between the fovea and the periphery in the developing zebra finch retina during foveal development. We successfully identified a candidate gene involved in fovea development, which may function in cell and tissue morphogenesis.

研究分野：神経発生学

キーワード：黄斑 中心窩 網膜 キンカチョウ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む真猿亜目の霊長類の網膜の黄斑部には中心窩(ちゅうしんか)と呼ばれる直径1.5mm程度の「窪み」が存在し、目から入った光は正確に中心窩に焦点を結ぶことで高解像度の視力を得ることができる。網膜視細胞は桿体視細胞と錐体視細胞から構成されており、それぞれ暗所視と明所視をつかさどる。錐体視細胞の密度は、中心窩で最大になり、一方、桿体視細胞の密度は中心窩でほぼゼロとなる。中心窩では、明所視と色覚を司る錐体視細胞が他の部分より細長い形態で高密度に配列しており(六角形に配列)同時に高密度な二次ニューロンとの精密な神経回路を形成することで飛躍的に高解像度の視力を得ることができる。また中心窩は、目に入った光の網膜内層から網膜外層にある視細胞への透過性を高める特殊な構造を有している。また脳の視覚野においては、中心窩からの情報が、網膜の他からの情報に比べて非常に大きな領域の活動として反映されている。このような中心窩の特徴が、高精度の視覚を可能にしている。例えば中心窩低形成の患者では、正常者に比べ約2桁オーダー低い視力しか得られず、かつ眼鏡やコンタクトレンズでの視力矯正が不可能であることが知られており、中心窩の重要性がわかる。角膜とレンズを通過した光が焦点を結ぶ位置に、光のない胎生期中から網膜上の正確な位置に形成されはじめる中心窩は「発生上の驚異(A marvel of development)」とも言われ、古くからその発生メカニズムは興味を持たれてきたが、未だにほとんど明らかになっていない。

ヒトにおける中心窩の異常は、加齢黄斑変性やスターガルト病といった網膜変性疾患を引き起こし、重篤な視覚障害や失明につながる事が知られている。今まで、人やサル黄斑の組織学的な解析が報告されている(1,2)。また、成体のマカクザルの黄斑の遺伝子発現解析が報告されている(3,4)。しかし、黄斑の発生に関する解析は進んでおらず、特に中心窩が発生する分子メカニズムはほとんど分かっていない。

中心窩は、鳥類、魚類、は虫類、霊長類を含む一部の動物種の網膜に形成される。中心窩はタツノオトシゴのような真骨魚類でも見られるが、網膜再生時のみで形成されるので、他の種の一般的な中心窩とは異なると考えられている。鳥類の一部でも、中心窩は観察される。猛禽類には網膜に2つの中心窩が形成されるものもある。ニワトリは、発生学の実験にもよく用いられるが、中心窩のような窪みは形成されない。中心窩が形成される鳥類の種のゲノム解読は、まだ進んでいない。

## 2. 研究の目的

中心窩は脊椎動物の複数の種において高機能な視覚を有するのに必須である。しかしながら、中心窩の発生や形成の分子メカニズムは不明のままである。キンカチョウ(zebra finch, *Taeniopygia guttata*)は、網膜に中心窩を形成する鳥類である。本研究においては、中心窩発生の分子機構にアプローチするために、比較的 center窩の形成が遅いと考えられるキンカチョウに注目し、キンカチョウを用いて中心窩の発生を解析した。

## 3. 研究の方法

我々は、キンカチョウの中心窩発生の組織学的な解析を行った。まず、複数の発生ステージのキンカチョウの網膜を単離し、中心窩周辺を含む組織学的な解析を行った。また、中心窩の周辺領域(parafovea)と網膜の周辺領域の遺伝子発現を次世代シーケンス解析によって比較解析した。それらの遺伝子のin situハイブリダイゼーションや組織形態形成に関わる可能性の

ある構造などの基準から、細胞骨格制御因子に属する生体機能未知の遺伝子を同定し、機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

我々は、組織学的な解析から、キンカチョウの中心窩は生後に形成されることを見出した。中心窩周辺領域に特異的に発現する複数の遺伝子を同定した。それらの遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、中心窩を含む領域に発現の特異性があるものを探索した。さらに、候補遺伝子がコードする蛋白質の一次構造から、組織や細胞の形態形成に関わる可能性のあるものといった基準から、低分子量 GTP アーゼ制御因子に属する生体機能未知の遺伝子を同定した。網膜での発現を検証したところ、中心窩周辺領域のミュラーグリア細胞で発現し、生化学的な解析から低分子量 G 蛋白質と直接結合することを確認した。さらに、培養細胞を用いて、低分子量 GTP アーゼ制御因子を過剰発現させると、細胞の形態が有意に変化した。低分子量 G 蛋白質の特異的阻害薬を加えたところ、細胞の形態変化が回復した。以上の結果から、キンカチョウは今まで謎であった中心窩形成の研究に優れたモデルとなることが示された。さらに我々は、中心窩形成に関わる候補遺伝子の一つとして、中心窩周辺領域のミュラーグリアに発現する低分子量 GTP アーゼ制御因子を同定することができた。現在、これらの成果をまとめた論文 (Sugiyama et al.,) を投稿中である。この成果は、今まで未解明であった、中心窩の発生の分子メカニズムの一端を明らかにするとともに、黄斑変性といったヒト網膜変性疾患の診断法や治療技術の開発の基盤となると期待される。

#### < 引用文献 >

1. Provis, J. M., Dubis, A. M., Maddess, T., and Carroll, J. (2013) Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone. *Prog Retin Eye Res.* **35**, 63–81
2. Hendrickson, A. E., and Yuodelis, C. (1984) The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology.* **91**, 603–612
3. Sharon, D., Blackshaw, S., Cepko, C. L., and Dryja, T. P. (2002) Profile of the genes expressed in the human peripheral retina, macula, and retinal pigment epithelium determined through serial analysis of gene expression (SAGE). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 315–320
4. Li, M., Jia, C., Kazmierkiewicz, K. L., Bowman, A. S., Tian, L., Liu, Y., Gupta, N. A., Gudiseva, H. V., Yee, S. S., Kim, M., Dentchev, T., Kimble, J. A., Parker, J. S., Messinger, J. D., Hakonarson, H., Curcio, C. A., and Stambolian, D. (2014) Comprehensive analysis of gene expression in human retina and supporting tissues. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4001–4014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山剛文, 大森義裕, 今鉄男, 吉原大貴, 鈴木穰, 安部健太郎, 渡邊大, 古川貴久
2. 発表標題 キンカチヨウ網膜を用いた中心窩形成の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----