

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19362

研究課題名(和文) 眼の不合理な構造の謎: 視細胞内レンズの進化的起源から迫る

研究課題名(英文) Apparently inefficient structure of vertebrate eyes: microlens in photoreceptor cells as a possible cause

研究代表者

古賀 章彦 (Koga, Akihiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：80192574

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)：夜行性の哺乳類の多くで、視細胞の核の中央部にヘテロクロマチンが凝集し、これがレンズとして機能して夜間視力の増強をもたらす。このような核の状態を、ここでは夜行性型とよぶ。夜行性型の視細胞は哺乳類でしかみつかっていないため、その起源は哺乳類と爬虫類が分岐した後と、広く考えられている。これに対し、暗環境への適応という点を考慮して、脊椎動物で眼ができ始めたときにすでに夜行性型であったとの仮説を立てた。この仮説が正しいならば、哺乳類以外でも夜行性型が見つかることが予想される。爬虫類、両生類、魚類の計8種で視細胞の状況を調べ、そのうちの魚類1種で、夜行性型に近い状態を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の眼では、光は視細胞の光受容部位に達する前に、視神経の層を通過し、さらに視細胞の核の部分を通り過ぎる。その間に情報の減衰や散逸が起こることが想像され、不合理な構造であるといえる。いったん成立した発生過程を変えられないための制約と、考えられる。しかし、夜行性型の核を現出するためには、この構造は必要である。この点を考慮すると、脊椎動物が眼を獲得した時点ではこの構造はむしろ合理的であったとの仮説が、成り立つ。得られた結果は、この仮説を積極的に支持しないとはいえ、否定するものではない。仮説をさらに追求するための足掛かりが得られたといえる。外洋の深海魚を調べることが効率的であるとの示唆である。

研究成果の概要(英文)：In photoreceptor cells of many nocturnal mammals, heterochromatin localizes to the central region of the nucleus and serves as a lens that leads to elevated night vision. This situation of the nucleus is called the nocturnal type. Photoreceptor cells of this type have hitherto been observed only in mammals. It is therefore widely believed that the nocturnal type emerged in the mammalian lineage after its divergence from reptiles. Considering that the nocturnal type is an adaptation to dark environments, it is a possible hypothesis that the nocturnal type already existed at the time point of the eye acquisition by an early vertebrate. This hypothesis is supported if the nocturnal types is found in a taxon other than mammals. Photoreceptor cells of 8 species, which belonged to reptiles, amphibians, or fishes, were examined by immunostaining experiments. One of these species was found to have photoreceptor cells that exhibited a situation close to the nocturnal type.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：眼 視細胞 夜行性 ゲノム ヘテロクロマチン 進化 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

1.1. 目の構造

器官としての眼には、それぞれの役割をもった部品が、役割を果たすのに適した場所に配置されている(図1)。入射した光は、水晶体の凸レンズの作用で集められ、網膜の位置で像を結ぶ。網膜には、受光素子としての視細胞が密に分布しており、個々の視細胞は光を受容して電気信号に変換する。電気信号は視神経を通して脳に送られる。

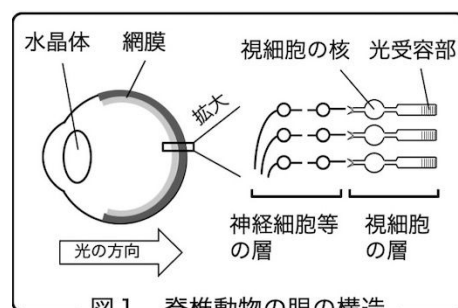


図1. 脊椎動物の眼の構造

1.2. 不合理な点

視細胞の光受容部位は、細胞の後端部にある。光は視神経の層を通過して、さらに視細胞の核の部分を通じた後に、光受容部位に到達する。この構造では、視神経の層、また視細胞の核の部分を通じたときに、情報の減衰や散逸が起こることが、想像される。もし視細胞の前後の向きが逆で、そのうえ視神経が視細胞の後方にあれば、より効率のよい情報収集が可能と推測できる。タコやイカの眼では、実際にそのような向きになっている。加えて、脊椎動物の眼には視神経の束が眼内から脳に向けて出るために、盲点が存在する。タコやイカの眼には、盲点も必要ない。以上から、脊椎動物の眼は、タコやイカの眼との比較で、視細胞や視神経の配置に関して不合理な構造になっているといえる。

1.3. 夜行性哺乳類の視細胞

夜行性の哺乳類の多く(マウス、ネコ、ムササビなど)にみられる適応的な現象がある。視細胞のうち、微弱な光を効率よく捕らえる桿体細胞で、核が凸レンズとしてはたらき、これが夜間視力の増強をもたらす(図2)。

レンズの役を担うこの構造物を、ここでは核内微小レンズとよぶ。実体は、ヘテロクロマチンが核の中央部に凝集したものである。ヘテロクロマチンは、染色体で冗長な構造になっている領域で、タンパクをコードする遺伝子をほとんど含まない。通常は、邪魔者が押しやられるがごとく、核の周縁部に局在する。夜行性哺乳類の桿体細胞で、例外的に核の中央部に凝集する。ここでは、このようなヘテロクロマチンの配置を夜行性型とよぶ。昼行性の哺乳類では、ヘテロクロマチンは核の周縁部にある。これを昼行性型とよぶ。

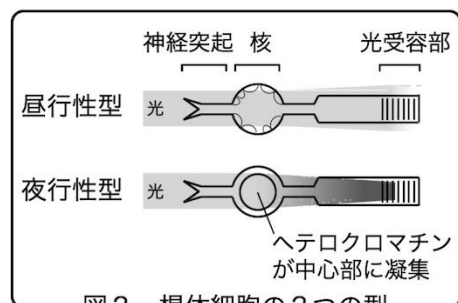


図2. 桿体細胞の2つの型

1.4. 進化の観点からの仮説

研究代表者は、核内微小レンズの実体と進化的起源を長らく追求していた。その成果を通して、脊椎動物の眼の不合理な構造に関して、説明をするための仮説を考えた。脊椎動物全体の祖先で眼ができたとき、生息場所は海中で、暗い環境であったと推測される。したがって、現在不合理と思える視細胞の向きは、夜行性型を現出できるという点で、当時は適応的であったと考えられる。以上から、脊椎動物が最初に獲得した眼がこの構造であったとの仮説が成り立つ(図3)。そして、以後明るい環境に生息するようになって、核の状態は昼行性型に移行できたものの、眼全体の部品の配置は変更できなかったと、想定する。

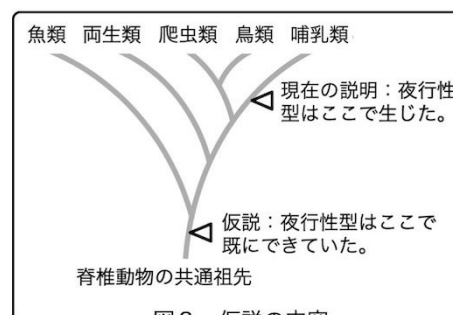


図3. 仮説の内容

2. 研究の目的

2.1. 仮説からの予想

夜行性型の視細胞は、これまでに哺乳類でのみ、報告がなされている。このため、夜行性型は哺乳類と爬虫類が分岐した後に哺乳類の系統で生じたとの推測が、現在は大勢となっている(図3)。ここで考慮を要する点がある。哺乳類以外(爬虫類や魚類など)でどの程度調べられたかが定かでないことである。仮説では、脊椎動物の共通祖先の時点ですでに夜行性型があったこと

を想定する。これが正しいならば、哺乳類以外でも夜行性型の視細胞をもつ種が存在するとの予想が成り立つ。

2.2. 本研究課題の目的

この予想に基づき、哺乳類以外で夜行性の視細胞をもつ種を見つけることを、目的に設定した。明確に夜行性を示す種、および常時暗い環境に生息する種を選定し、調査の対象とした。

3. 研究の方法

3.1. 材料

下記の計8種を用いた。入手方法は、自然で発見した死亡個体、他の研究者が用いた材料の剰余部分、または市販されている食材であり、眼球を取り出して用いたものの、動物実験には該当しない。

呼称	和名	学名	分類
・ヤモリ	ニホンヤモリ	<i>Gekko japonicus</i>	爬虫綱 有鱗目
・ツメガエル	アフリカツメガエル	<i>Xenopus laevis</i>	両生綱 無尾目
・イモリ	アカハライモリ	<i>Dryophytes japonic</i>	両生綱 有尾目
・ヒラメ	ヒラメ	<i>Paralichthys olivaceus</i>	硬骨魚綱 カレイ目
・オコゼ	オニオコゼ	<i>Inimicus japonicus</i>	硬骨魚綱 カサゴ目
・カエルアンコウ	イロカエルアンコウ	<i>Antennarius pictus</i>	硬骨魚綱 アンコウ目
・キンメダイ	キンメダイ	<i>Beryx splendens</i>	硬骨魚綱 キンメダイ目
・ポリプテルス	ポリプテルスセネガルス	<i>Polypterus senegalus</i>	硬骨魚綱 ポリプテルス目

以降では、これらの種の呼称を用いる。

3.2. 抗体

免疫染色に用いた抗体は下記の3種類である。

- ・トリメチル化ヒストン H3K4me3 に対する抗体 (abcam 社、ab8580): ユークロマチンを検出
- ・トリメチル化ヒストン H4K20me3 に対する抗体 (abcam 社、ab9053): ヘテロロマチンを検出
- ・ロドプシンに対する抗体 (abcam 社、ab5417)

3.3. 切片標本の作製

眼球を固体より取り出し、前方(網膜を含まない部分)を切開してそこからガラス体を吸い出した後、組織固定液(Superfix KY-500)に浸漬した。浸漬の状態ですべて12時間経過した後、洗浄液(PBS)で3回洗浄した。このサンプルを0.5%アガロースゲルに包埋して、アルコールシリーズおよびキシレンで脱水し、その後パラフィン置換を施した。これを回転式マイクローム(MICROM HM325)で5 μm厚に薄切し、切片をスライドグラスに載せた。

3.4 免疫染色

スライド上の切片に対し、ブロッキング(5% milk)の処理を行った後、1/500に希釈した抗体で覆って37℃で60分反応させた。続いて、0.1% NP-40で3回洗浄し、標識抗ウサギ IgG 抗体で発色の処理を行った後、0.1% NP-40で3回洗浄した。さらに、DAPIでの染色を行い、退色防止剤を加えたうえでカバーグラスで封入した。

3.5. シグナルの検出

顕微鏡のシステムとして Keyence BZ-9000 と Leica CW-4000 を用いて、シグナルの検出を行った。対物レンズには10倍、40倍、100倍を用いて、異なる倍率での画像を取得した。

4. 研究成果

4.1 研究全体の流れ

研究期間の1年目の大部分は、免疫染色の方法の開発に費やした。開始時点での実験法は、研究代表者がそれまでに哺乳類で用いていたものであり、これをヤモリに適用してみたところ、検出感度の不足を認識し、実験条件の調整が必要となったためである。1年近くの試行錯誤の後、検出感度の数倍の上昇を達成した。3.節に記す実験法は、このような改良を施したものである。

1年目の終わる頃から2年目にかけて、改良した実験法で8種の材料を調べた。具体的な画像データを4.2.項に示すが、8種のうちの1種で夜行性型に近い様相を示す視細胞が見出された

というのが、結果の概要である。

当初の予定では研究期間は2年であった。期間終了が近づいた頃でも、明確な夜行性型の検出には至っていなかったため、より有望な材料を用いて調べるために、手続きをして研究期間を1年延長した。より有望な材料とは、外洋の深海魚である。しかし、3年目(2020年度)はウイルスの蔓延という状況に遭遇し、深海魚の入手ができず、追加の実験は実施できなかった。これについては4.3.項に詳しく記す。

4.2. 免疫染色の結果

網膜には異なる細胞の層があり、免疫染色で得られた画像では、核のシグナルが層となる。どの層が視細胞の核に該当するかを特定するために、ロドプシンに対する抗体も含めて、免疫染色を行っていた。そして、ロドプシンのシグナルに最も近い層として、視細胞の核の層を特定した。さらに、網膜を平面とみなした場合、周縁部に桿体細胞が密に分布しているため、周縁部を分析の対象とした。図4は、該当する領域で典型的なシグナル分布を示す核の拡大写真である。

キンメダイ以外の7種では、ユークロマチンの密度は核の中央部で、ヘテロロマチンの密度は核の周縁部で高く、昼行性型と判定してよい状態であった。キンメダイでは、他の7種との比較で、ユークロマチンの中央部への集中が緩い状態が、観察された。また、ヘテロロマチンは核全体に分布していた。これは、昼行性型と夜行性型の間の中状態であるとみなすことができる。

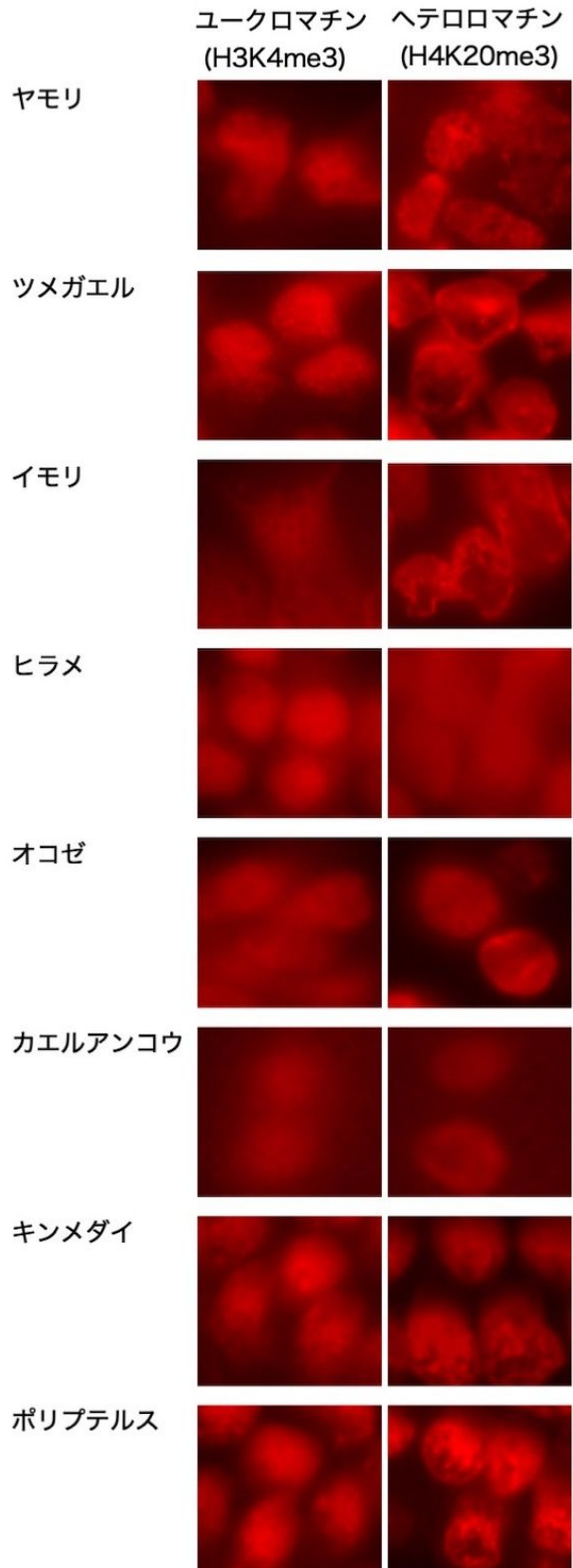
4.3. 予定した追加実験と経過

キンメダイは、調べた8種のうちでは唯一、深海に生息する種である。昼行性型と夜行性型の間の中状態がみられたことから、深海という生息環境に焦点を移すことでより効率のよい探索となることが、期待された。キンメダイでの免疫染色が完了したのが、当初予定の研究期間である2年の終了近くであったため、研究期間を1年延長して深海魚を用いた追加実験を行うことを、計画した。キンメダイが近海の深海魚であることを踏まえ、海溝などより深い環境に適応している種での探索を行う計画である。

計画に基づき、深海魚の生理を専門とし、自身で深海魚の調査を行う研究者に、本課題のためのサンプルの捕獲を、2年目のうちに依頼した。しかしこの計画は予定どおりに進まなかった。通常は年に2回ほどの航海でサンプル収集を行うのであるが、3年目に当たる令和2年度はウイルス蔓延の世情のために、調査船の出航ができなかった。

4.4. 結論および意義

本研究課題で調べた8種で、明確な夜行性型の視細胞をもつものはみつからなかった。しかしこれは、夜行性型の起源は初期の脊椎動物



にまで遡るとの仮説を、支持しないとはいえ否定するものではない。仮説をさらに追求するための効果的な方策としては、2つが考えられる。

1つは、今回計画して社会状況のために実現できなかった探索の実施である。すなわち、外洋の深海魚を対象にして調べることである。

もう1つは、キンメダイでのDNAレベルでの解析である。研究代表者は本研究課題に先立ち、夜行性の霊長類であるヨザル（夜猿）で、DNAレベルでの解析を行っていた。ヨザルの場合も、メチル化を指標とする免疫染色では、ヘテロクロマチンの分布は明確に中央部に集中といえる状態ではなかった。ヨザルにはヘテロクロマチンが3種類あることを突き止め、それぞれをプローブとするハイブリダイゼーションを行ったところ、そのうちの1つが中央部で球に近い形状をとっていることが、判明した。メチル化を指標とする免疫染色では、ヘテロクロマチンの種類に関わらずシグナルが出る。これが弱点となったのであるが、DNAレベルでの解析を行うことで、これを克服した。

弱点とはいえ、メチル化を指標とする免疫染色は、最初のスクリーニングとして不可欠の段階である。その結果に基づくことで、DNAレベルでの解析へ進めることができる。本研究課題はこのスクリーニングの段階を目的としたものであり、次の段階へ進めるための候補が1つみつかったことが、本研究課題での中心となる成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Thongchum R, Nishihara H, Srikulnath K, Hirai H, *Koga A	4. 巻 94
2. 論文標題 The CENP-B box, a nucleotide motif involved in centromere formation, has multiple origins in New World monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 301-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.19-00042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 *Hirai H, Hirai Y, Udon T, Matsubayashi K, Tosi AJ, Koga A	4. 巻 27
2. 論文標題 Structural variations of subterminal satellite blocks and their source mechanisms as inferred from the meiotic configurations of chimpanzee chromosome termini	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 321-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-019-09615-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoue Y, Kumagai M, Zhang X, Saga T, Wang D, Koga A, *Takeda H	4. 巻 4
2. 論文標題 Fusion of piggyBac-like transposons and herpesviruses occurs frequently in teleosts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-018-0089-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe H, Kusakabe KT, Imai H, Yokota SI, Kuraishi T, Hattori S, Kai C, *Koga A	4. 巻 13
2. 論文標題 The heterochromatin block that functions as a rod cell microlens in owl monkeys formed within a 15-Myr time span	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 evab021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gbe/evab021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古賀章彦
2. 発表標題 中央アルプスの白タヌキは黒色素合成に必須の遺伝子で5個のエクソンのうちの1個が欠けている
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koga A, Nishihara H, Stanyon R, Hirai H
2. 発表標題 Adaptation of owl monkeys to nocturnal lifestyle driven by rapid expansion of simple repeat sequence to form megasatellite DNA
3. 学会等名 Society for Molecular Biology and Evolution 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koga A
2. 発表標題 Recruitment and co-option of megasatellite DNAs coordinately facilitated adaptation of owl monkeys to nocturnal lifestyle
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koga A
2. 発表標題 Dynamic role changes among three megasatellite DNAs associated with adaptation of owl monkeys to nocturnal lifestyle
3. 学会等名 会等名 2018 International Joint Conference on Genetics and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古賀章彦・久川智恵美・吉澤未来
2. 発表標題 シャム猫みたいなマントヒヒ
3. 学会等名 第36回日本; 霊長類学会大会(オンライン開催)
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イタリア	University of Firenze			
タイ	Kasetsart University			