

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791305

研究課題名（和文） 黄斑におけるトロポミオシンアルファの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of tropomyosin 1 alpha chain in macula

研究代表者

岡本 はる（OKAMOTO HARU）

独立行政法人国立病院機構東京医療センター・（臨床研究センター）・分子細胞生物学研究部・研究員

研究者番号：40374160

研究成果の概要：視力に重要な領域「黄斑」について、カニクイザルの網膜を用いた実験から、黄斑で高発現しているタンパク質として、トロポミオシン 1 α を同定した。本研究では、トロポミオシンの黄斑における特徴を以下の点で明らかにした。1）黄斑では、複数のアイソフォームが発現していた。2）黄斑で高発現しているアイソフォームは、脈絡膜の血管内皮細胞に局在していた。3）黄斑変性モデル動物のカニクイザル網膜において、局在、発現量に変化は観察されなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：遺伝子、タンパク質、プロテオーム、老化、ストレス

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた霊長類の網膜に存在する「黄斑」と呼ばれる領域は、視力を決定する重要な部位であり、黄斑における損傷は視覚機能の重篤な低下を招く。代表的な疾患としては、成長期に発症する各種黄斑ジストロフィや、加齢とともに発症する加齢黄斑変性(AMD)などがある。AMD では、網膜色素上皮(RPE)細胞

とブルッフ膜との間にドルーゼンと呼ばれる多形性物質が蓄積し、網膜の恒常性を乱すことが知られている。ドルーゼンは、黄斑に優先的に蓄積する傾向が見られるが、その原因は明らかではない。そこで、黄斑において、周辺網膜とは異なるタンパク質の発現が、AMD の発症・進行に関与しているのではないかと考え、カニクイザルの網膜を用い、2 次

元電気泳動と質量分析によって、黄斑と周辺網膜の比較を行い、黄斑で高発現しているタンパク質として、トロポミオシン 1 α を同定した。

トロポミオシンは、アクチンフィラメントに結合し、アクチンの安定と調節にかかわるタンパク質である。哺乳類では、 α 、 β 、 γ 、 Δ の 4 遺伝子が存在し、それぞれの遺伝子が転写の際の、スプライシングによって、40 を超える多数のアイソフォームが生成されている。質量分析で同定されたトロポミオシン 1 α のアイソフォームは、測定されたアミノ酸配列の一つから、脳で発現するタイプ (Br-3) である可能性が示された。またその他のアミノ酸配列は、各アイソフォームに共通するものであった。

2. 研究の目的

黄斑で高発現するアイソフォームの絞込みと、網膜における局在を観察し、トロポミオシン 1 α 黄斑における機能を考察する。また、黄斑変性モデル動物である、カニクイザルの網膜切片を用い、トロポミオシン 1 α の発現量と局在の変化を観察し、AMD との関連を考察する。

3. 研究の方法

網膜のタンパク質は、13-19 歳の正常なカニクイザルの眼球 8 個から抽出した。黄斑を含んだ領域と、その周辺部は、それぞれ直径 3mm の円形に切り出した。その際、RPE 細胞および、脈絡膜を含んだ状態で切り取った。

免疫組織染色には、13 歳の正常な雌カニクイザルの網膜切片を用いた。また黄斑変性のモデルとして、下記のカニクイザル 2 個体の網膜切片を用いた。

- ・遺伝型黄斑変性モデル：加齢に伴い、自然発症し、黄斑部にドルーゼンを伴う変化を生ずる。
- ・加齢型黄斑変性モデル：若年性にドルーゼンを伴う黄斑変性を発症する。

①正常なカニクイザル網膜の、黄斑、周辺網膜、各々のタンパク質抽出液に含まれるトロポミオシン 1 α を、ウエスタンブロッティングによって検出した。トロポミオシンの抗体として、下記の 3 種類を使用した。

- ・Br-3：脳に特異的なアイソフォームを検出する。
- ・TM311：Br-3 以外の複数のアイソフォームを検出する。
- ・smooth muscle type：平滑筋に特異的なアイソフォームを検出する。

②正常および疾患カニクイザルの網膜切片を用い、トロポミオシンの局在を調べた。上記の抗体でトロポミオシンを検出した。また

血管内皮細胞のマーカーとして、platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM1) に対する抗体を用いた。

4. 研究成果

①ウエスタンブロッティングの結果、Br-3 および TM311 では、トロポミオシン由来のバンドが検出された。一方、smooth muscle type は、黄斑、周辺網膜の両方の網膜抽出液で、検出されなかった。発現量は、TM311 が明らかに黄斑で高い発現を示したのに対して、Br-3 では、差が見られなかった。このことから、黄斑で高発現しているトロポミオシンのアイソフォームは、脳、あるいは平滑筋で発現するタイプではないことが示された。

②ウエスタンブロッティングで検出可能であった 2 種類の抗体を用いて、正常なカニクイザルの網膜で局在を調べた結果、Br-3 は、視細胞内節と外網状層で検出された。視細胞におけるトロポミオシンの存在は既に報告されているが、脳特異的なアイソフォーム、Br-3 の視細胞での局在は、これまで報告されていない。一方、TM311 は、脈絡膜で検出された。脈絡膜における局在を明らかにするために、血管内皮細胞のマーカーである PECAM1 で共染色を行った結果、TM311 は血管内皮細胞に局在していることが示された。黄斑は、網膜血管が存在せず、無血管領域であるが、脈絡膜での毛細血管の密度は最も高い領域である。血管内皮細胞に発現するトロポミオシンが、黄斑で高発現するタンパク質として、プロテオミクスの手法で同定されてきたのは、脈絡膜の領域間における密度の差に由来するものであると考えられる。

③正常な網膜で観察されたトロポミオシンの局在が、黄斑変性により変化するか観察するために、疾患カニクイザル 2 個体の網膜切片について免疫組織染色を行った。しかし、遺伝型モデル・加齢型モデルの両方について、Br-3 と TM311 のそれぞれ、著しい局在や発現量の変化は観察されず、正常個体との明らかな差異は見られなかった。

血管内皮細胞は、血管内のバリア機能として重要な細胞であり、細胞間の接着が変化して起こる膜透過性の増大は、動脈硬化や糖尿病との関連が報告されている。AMD と脈絡膜の血管内皮細胞との関連は、現時点で、明らかではないが、膜透過性増大における細胞骨格の変化に対して、トロポミオシンがアクチンフィラメントの制御を介して、何らかの役割を有している可能性が考えられる。血管内皮細胞と AMD の関連については、今後、検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：岡本はる

発表表題：Comparative proteome analysis of macula versus peripheral retina in cynomolgus monkey

学会名 Human Proteome Organisation

発表年月日 2007 年 10 月 8 日

発表場所ソウル、大韓民国

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 はる (OKAMOTO HARU)

研究者番号：40374160

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：