

## 第 104 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅳ

## 黄斑疾患

## 黄斑形成と中心視成立の分子細胞生物学

東 範 行

国立小児病院眼科

## 共同研究者

山田 正夫, 田所 恵子, 宮下 俊之, 奥山 虎之, 柳沢比呂子, 浅香 敦子, 大塚 裕子  
 高橋 泉, 開山 麻美 (国立小児医療研究センター先天異常研究部)  
 半田 宏, 山口 雄輝, 渡辺 肇, 澤田 淳 (東京工業大学フロンティア創造共同研究センター)  
 中福 雅人 (東京大学大学院医学系研究科神経生物学教室)  
 伊藤 守, 谷岡 功邦 (実験動物中央研究所)  
 高坂 新一, 赤澤 智宏 (国立精神神経センター神経研究所代謝研究部)  
 安田 國雄, 小椋 利彦 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)  
 渡邊 卓, 松島 早月 (杏林大学医学部臨床病理学教室)  
 Jeremy Nathans (Howard Hughes Medical Institute Research Laboratories)  
 藤沢 肇 (名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻)  
 仁科 博史 (東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室)  
 仁科 幸子, 川瀬英理子 (国立小児病院眼科)

## 要 約

Charles Darwin が「種の起源」を著して以来、複雑な構造をもつ眼も進化の産物であると考えられるようになった。しかし、眼の形態は複眼からカメラ型まであまりに多彩なので、いくつもの系統が独立にできたところ最近まで考えられていた。しかし、眼形成のマスターコントロール遺伝子 Pax 6 が発見され、ほぼすべての動物系統に共通して存在することが明らかにされるに及び、眼は太古の共通祖先において光を感じずる細胞としてただ一度だけ発生し、変異と淘汰選択を繰り返して多彩に分枝してきたという単一起源説が導かれた。そして、ヒトの黄斑低形成において Pax 6 遺伝子の変異が発見され、太古の光感受性細胞に生じた Pax 6 遺伝子が視覚進化の頂点である黄斑の形成に関与していることが示された。

黄斑は進化的には高等魚類の一部から出現し、爬虫類まで耳側網膜に存在しているが、鳥に至って鼻側に黄斑をもつものができ、さらに耳側と鼻側 2 つの黄斑を有するものも出現した。そして哺乳類で黄斑は一度消失し、霊長類で再現した。原始哺乳類における消失と霊長類での再現は、網膜におけるオプシン遺伝子の変性と復元に相関し、黄斑を作る機構はその間 visual streak の中に潜んでいた。我々ヒトの黄斑は、魚類以来の耳側黄斑が維持されたものである。

Pax 6 が眼の形成で働くフィールドは眼球ほぼ全体を網羅しており、網膜では発生初期に広汎に発現して運命づけに大きな役割を果たしている。黄斑形成の運命もごく初期に決定されるが、これには visual streak における細胞密度の集中とともに、顔の正面からシグナル伝達物質が放出されて Pax 6 の発現を制御し、眼球後極に正確な位置づけを行う巧みな機構が存在する。そして、顔を正面に向けるこの単純なシステムによって、黄斑の位置づけだけでなく、ガンマ角や視軸の決定、さらに眼球耳側の発育、視野の成立までをも一元的に説明することができる。

黄斑は中心視におけるレセプターであり、中枢への投射機構を明らかにすることもさらに重要な課題である。黄斑の形成と中枢への投射を決める分子機構が明らかになれば、我々の中心視の起源と意義が理解できるとともに、やがて将来には光を失った人々に、光覚だけでなく形態覚をも甦らせる治療へ通ずることが期待される。(日眼会誌 104:960-985, 2000)

キーワード: 黄斑, 進化, Pax 6 遺伝子, Visual streak, シグナル伝達物質, 顔

別刷請求先: 154-8509 東京都世田谷区太子堂 3-35-31 国立小児病院眼科 東 範行 e-mail nazuma@nch.go.jp  
 (平成 12 年 10 月 4 日受付, 平成 12 年 10 月 11 日受理)

Reprint requests to: Noriyuki Azuma, M.D. Department of Ophthalmology, National Children's Hospital, 3-35-31  
 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8509, Japan e-mail nazuma@nch.go.jp

(Received October 4, 2000 and accepted October 11, 2000)

## A Review

# Molecular Cell Biology on Morphogenesis of the Fovea and Evolution of the Central Vision

Noriyuki Azuma

*Department of Ophthalmology, National Children's Hospital*

### Abstract

Since Charles Darwin wrote "On the Origin of Species by Means of Natural Selection", it had been assumed that various eye types, from the compound eye to the camera eye, had originated independently in at least 40–60 different phyletic lines.

However, the finding of Pax 6, the master control gene for eye morphogenesis, and the fact that its sequence is highly conserved throughout the animal kingdom indicated that the prototype eye in a primitive animal originated only once in evolution, and various eye types arose from the same origin. We recently found a Pax 6 mutation in a pedigree with foveal hypoplasia. Thus, the Pax 6 that appeared in light sensory cells of a primitive animal in ancient times may play a role in morphogenesis of the fovea, the most highly developed visual receptor.

The fovea first appeared in evolution in the temporal retina of fishes. Then, in birds, the nasal fovea and bifoveal system with nasal and temporal foveas developed. The fovea disappeared in primitive mammals, and reappeared in primates. A residue of the fovea is conserved in the visual streak, and the disappearance and reappearance of the fovea, in

primitive mammals and primates respectively, correlates with degeneration and restoration of cone pigment genes in photoreceptors. Humans inherited the temporal fovea that had first originated in fish eyes.

Pax 6 is expressed in the entire eyeball at an early stage of development, and is also expressed widely in the retina to determine its differentiation. To determine the position of the fovea, retinal cells are abundant in the visual streak, probably because expression of Pax 6 is regulated by patterning of the dorsoventral axis of the eyeball. Signaling molecules, discharged from the front of the face, also regulate Pax 6 expression, and determine position of the fovea, visual axis, angle gamma, growth of the eyeball, and shape of the visual field.

Further investigation of nerve pathfinding system from the fovea to the central nervous system will clarify the origin of the central vision, and contribute to human welfare. (J Jpn Ophthalmol Soc 104: 960–985, 2000)

**Key words :** Fovea, Evolution, Pax 6 gene, Visual streak, Signaling molecules, Face

### はじめに

黄斑は網膜において高度な視覚を司るために細胞が密に集中する特殊な部位であるが、眼底の後極に常に正確に作られる。この形成機構には何らかの遺伝子が働いているはずであるが、この点についてこれまでほとんど検討されていなかった。黄斑形成の機序を明らかにするためには、さまざまな実験方法を計画することができるが、この研究では進化論の考えをその基礎に置いた。そして、進化論はその答えとともに、黄斑と中心視が成立してきた壮大なドラマを教えてくれた。ここでは、分子細胞生物学からみた黄斑の進化と形成機構、中心視の成立について述べる。なお、黄斑や中心窩の名称は解剖学的に厳密に決められている上に、その構造や位置は動物種でさまざまな違いがある<sup>1)2)</sup>。しかし、網膜の視感度が特に高い部位という特徴は変わらない。したがって、ここでは動物種

にかかわらず、網膜において視細胞から神経節細胞までが密に集中する、中心視のレセプターを黄斑と呼ぶことにする。

### 眼形成のマスターコントロール遺伝子 Pax 6 と黄斑形成への関与

かつて Charles Darwin はその著書「種の起源」において、「眼はこれ以上ないほど完璧で複雑な器官であり、進化によって作られたとは考えがたい」と述べ、自分の学説に対する最大の脅威とみなした<sup>3)</sup>。眼のような複雑で洗練された器官は、各部分がすべて正常に機能しないと良好な視力を得ることができないので、眼の各部分が別々に作られたのならば視力や生存に寄与しない。したがって、眼が突然変異と自然淘汰によって徐々に進化したとは考えにくく、創造主によって突然作られたとしか思えなかったためである。その後、動物においてさまざまな段

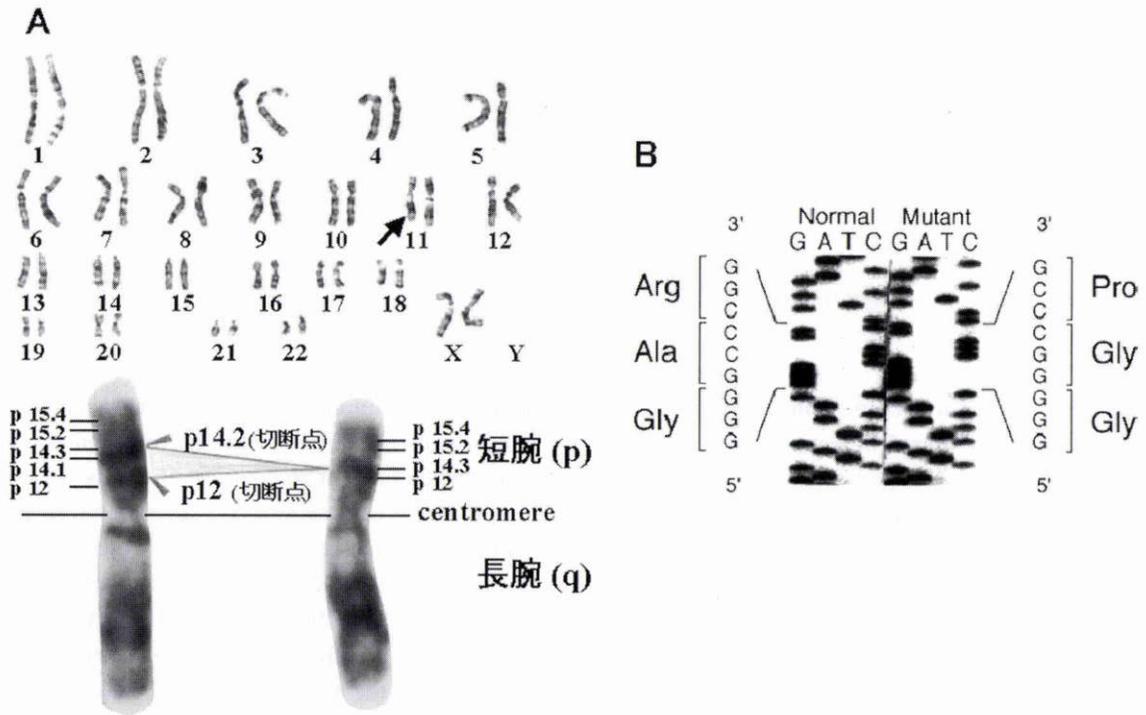


図1 先天無虹彩における染色体異常と Pax 6 遺伝子の変異.

A : 11 番染色体短腕の欠損. B: Pax 6 遺伝子のフレームシフト変異. Pax 6 遺伝子は 11 番染色体短腕(11p13) にあり, この部位の染色体異常あるいは遺伝子の変異によって起こる.



図2 ショウジョウバエにおける Pax 6 の変異と異所性発現による異所眼の形成.

A : ショウジョウバエ正常体. B: Pax 6 遺伝子(ショウジョウバエでは eyeless と呼ばれる)に変異があると眼が形成されない. C: Pax 6 を胚のさまざまな部位に導入すると, 異所性に複眼が形成される. (新見輝幸・Gerhring W: 実験医学増刊転写因子の最前線 97' (羊土社)より許可を得て転載)

階の眼があることが判明し, 今では眼が進化の産物であることを疑う者はほとんどいなくなった. しかし, 動物によってあまりにもさまざまなタイプの眼があるので<sup>4)</sup>, これらはいくつもの系統が別々に進化してきた(収斂進化)とごく最近まで考えられていた. 動物の羽が, 昆虫, トビウオ, 鳥, コウモリなどで違うように, 眼も 40~60 の系統が別々に出現したと思われていたのである<sup>5)</sup>.

しかし最近, これをくつがえす証拠がみつかった. そのきっかけは先天無虹彩の原因遺伝子の発見である. 後に Pax 6 と呼ばれるこの遺伝子は 11 番染色体短腕にあり, 1991 年にポジショナルクローニングによって発見された<sup>6)</sup>. その後, 続々と変異がみつき, 無虹彩の原因遺伝子であることが確立されたが(図 1)<sup>7)~10)</sup>, その間に Wal-

ter Gehring によって, 基礎の領域で驚くべき研究が行われていた.

Gehring はまず先天無虹彩遺伝子が以前別々に発見されていたネズミやショウジョウバエの眼の形成に関わる遺伝子 Small eye あるいは eyeless と同じものであることを明らかにした<sup>11)</sup>. この遺伝子に異常があると眼の形成が障害され, 小眼球や無眼球になるので, これらの動物で眼の形成に重要な役割をもつと考えられた. そして, ゲーリングはこの遺伝子をショウジョウバエの胚のいろいろな場所に注入すると, 体幹や肢, 羽などで異所性に複眼が作られることを示した(図 2)<sup>12)</sup>. これによって, この遺伝子は下等動物といえ, 眼全体を作るほど強力な機能をもつことが明らかになった.

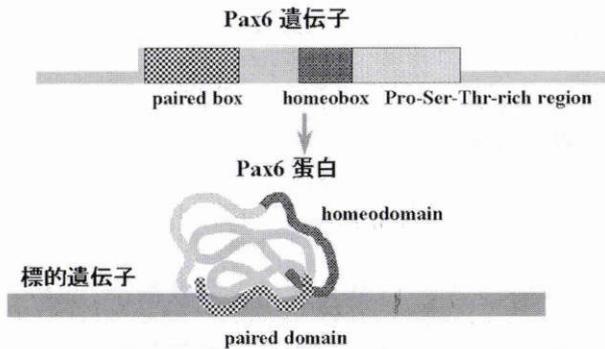


図 3 Pax 6 遺伝子の構造。

Pax 6 遺伝子は 422 のアミノ酸をコードする。Pax 6 蛋白は主要構造として、paired domain (標的 DNA に接触する部位、ここに相当する遺伝子配列を paired box という)、homeodomain (標的 DNA に接触するとともに形態形成遺伝子に特徴的な配列、遺伝子では homeobox)、末尾にプロリン、セリン、スレオニンを多く含む activating domain をもつ。

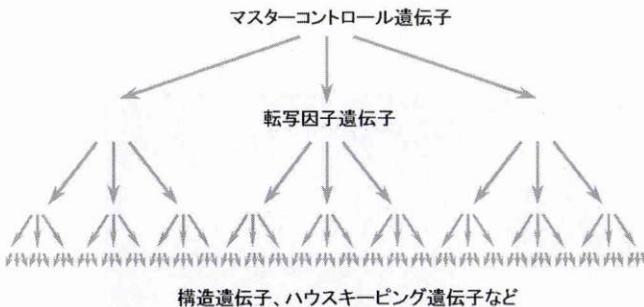


図 4 転写因子遺伝子カスケード。

上流の遺伝子が下流の遺伝子群を支配し、その頂点にマスターコントロール遺伝子が存在する。なお、遺伝子からできる蛋白は省略してある。

Pax 6 遺伝子から作られる Pax 6 蛋白は転写因子である。転写因子は、他の DNA のプロモーターに接触してその遺伝子発現のオンオフを調節する指令役の蛋白で、Pax 6 は paired domain という DNA 結合部位をもっている<sup>13)14)</sup>。さらに、発生において空間の位置を決定する転写因子に特徴的な homeodomain という構造も持っている(図 3)<sup>15)16)</sup>。臓器が作られる時は膨大な遺伝子が働くが、各部位の組織がバラバラに作られるだけでは複雑な器官が統一をもって形成されることはできず、各工程を監督する遺伝子が必要である。そこでは支配するものとされるものの階層があり、その頂点にすべてを統合するマスターコントロール遺伝子が存在する(図 4)。Pax 6 が眼の形成を支配するマスターコントロール遺伝子であった<sup>17)18)</sup>。その後、Pax 6 がヒトを含むほぼすべての動物に共通に存在しており、その塩基配列がほとんど同じであることがわかった<sup>18)</sup>。しかも、Pax 6 は視細胞が僅かしかないプラナリアや、光を感じる細胞だけで眼を持たない線虫にも存在していた<sup>19)20)</sup>。すべての動物種で同じ

遺伝子が働いている以上、さまざまなタイプの眼が別系統に出現したという考えは否定された。Pax 6 の発見によって、眼は太古の共通祖先動物において光を感じる細胞としてただ一度だけ発生し、変異と淘汰を繰り返して現在のように多彩に分かれてきたという、眼の単一起源説が導き出された(図 5)<sup>17)</sup>。Darwin の危惧は杞憂に過ぎなかったのである。

Gehring が Pax 6 を導入してショウジョウバエの全身に眼を作り、この遺伝子がマスターコントロール遺伝子であることを示したことを見て、著者は Pax 6 が黄斑の形成を行っているのではないかと考えた。先天無虹彩はほぼ全例に黄斑低形成を合併しているからである。しかし、先天無虹彩は眼球全体に異常が及んでいるので、何が黄斑の形成に影響しているのかはわからない。Pax 6 が黄斑の形成を行っていることを示すには、黄斑のみに障害がある、孤立性黄斑低形成で Pax 6 の変異を見つける必要があった。そして Gehring の報告から間もなく、我々は孤立性黄斑低形成の常染色体優性遺伝の家系で Pax 6 の変異を発見した(図 6)<sup>21)</sup>。これによって、太古の光感受性細胞に生じた Pax 6 が、視覚進化の頂点である黄斑の形成に関与していることが推定された。

そこで、Pax 6 のモノクローナル抗体を用い免疫染色によって、眼の発生における Pax 6 の働きを検討した<sup>22)</sup>。発生初期は眼球全体が染まり、Pax 6 がマスターコントロール遺伝子であることを裏づけた。網膜は初期では広汎に染まり、後期になると神経節細胞、アマクリン細胞、水平細胞と一部の細胞に局限していた(図 7)。たぶん、Pax 6 は網膜で初期に分化の運命決定を行っており、後期になって細胞が分化して特殊化するとその固有遺伝子(双極細胞は Chx 10、視細胞では Crx など、神経節、アマクリン、水平細胞は Pax 6 のまま)に役割を受け渡すのであろう<sup>23)24)</sup>。しかし、どの時期であっても Pax 6 の染色性が黄斑に局限することはなかった(図 8)。したがって、Pax 6 の働きを左右する何か別の遺伝子が関与していると考えられた。しかし、眼の発生は下等動物でも 1,000 以上の遺伝子が働くといわれており<sup>17)</sup>、黄斑独自の遺伝子を抽出することは最新の分子生物学の技術を用いても至難の技である。第一、Pax 6 の働きを左右する遺伝子が網膜の中にあるという保証もない。成長因子のようなものなら外から働くかもしれず、検討には膨大な労力と時間がかかることが予測された。

## 眼と黄斑の進化の歴史

### —動物種による黄斑の位置の違い、 哺乳類における黄斑の喪失と再現—

黄斑はヒト以外の動物にもあるので、動物を比較して、進化に刻まれた記録を検討するのも一つの方法である。著者はこれを選択した。Duke-Elder<sup>2)</sup>はその大著 System of Ophthalmology の第 1 巻を眼の解剖でなく、生理でも

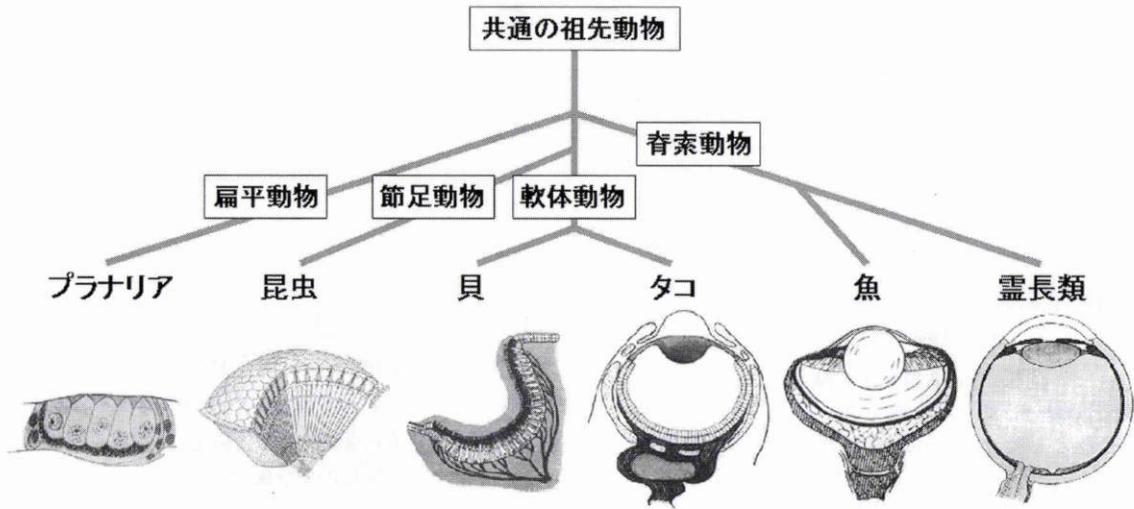


図5 眼の単一起源説.

眼は太古の共通祖先動物において、光を感じる細胞としてただ1度だけ発生し、変異と淘汰を繰り返して多彩に分岐した. その間, Pax 6 は常に眼の形成遺伝子の中心にい続けてきた. (眼の図は Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders) より許可を得て転載)

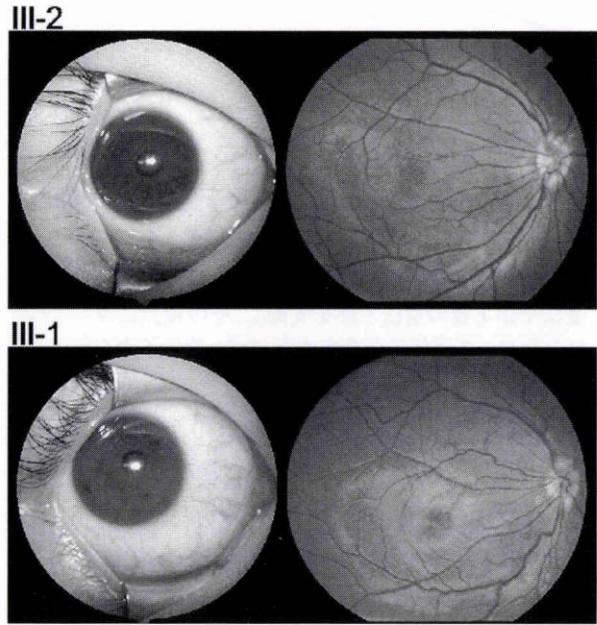
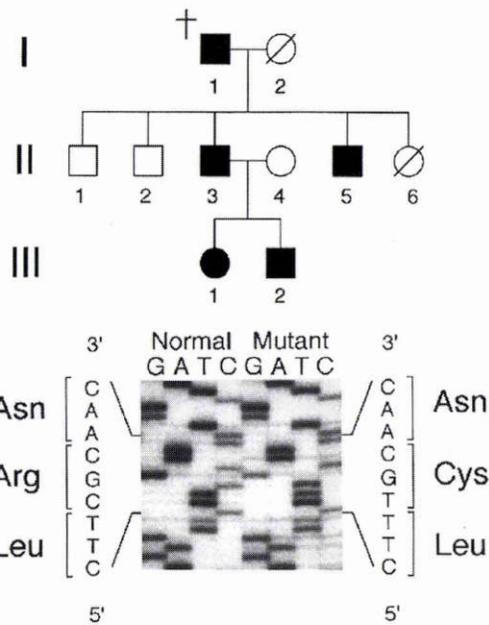


図6 Pax 6 遺伝子の変異が見つかった孤立性黄斑低形成の常染色体優性遺伝家系.

なく、進化から始めているが、これは卓見であるとしかないようがない. 眼の進化に関してこれを超える本は現在までなく、この中にある黄斑の記述はごく僅かであったが、重要なヒントが書き込まれていた. では、まず初めに、System of Ophthalmology と最新の進化論<sup>25)~30)</sup>からみた眼と黄斑の進化について述べる.

地球に生命が誕生したのは38億年前であるが、10億年前に単細胞から多細胞の時代が始まった. 今から6億年前の海の中は、体が扁平で軟らかい無脊椎動物が生息していたが(エディアカラ生物群)、まだ明らかな眼はなかった. 5億3千万年前のカンブリア期になって、突如、

数多くの奇妙な形をした動物が出現した. 形作りの遺伝子がほぼ出揃い、動物のさまざまなデザインが試された時期で、カンブリア爆発と呼ばれている. いずれも無脊椎動物であったが、脊椎動物の先祖(最初の脊索動物、ピカイア)も現れている. この時期は眼をもつ動物が少なくとも7~8種類は化石で見つかっており、中には眼を5つ持つ奇妙な動物(オパビニア)もいた. これらの眼はすべて Pax 6 によって作られていたはずであるが、まだ黄斑はなかったと思われる.

4億8千万年前に魚が現れた. ここから網膜の構造は急激に複雑化し、これとともに黄斑が出現した. 現存の魚

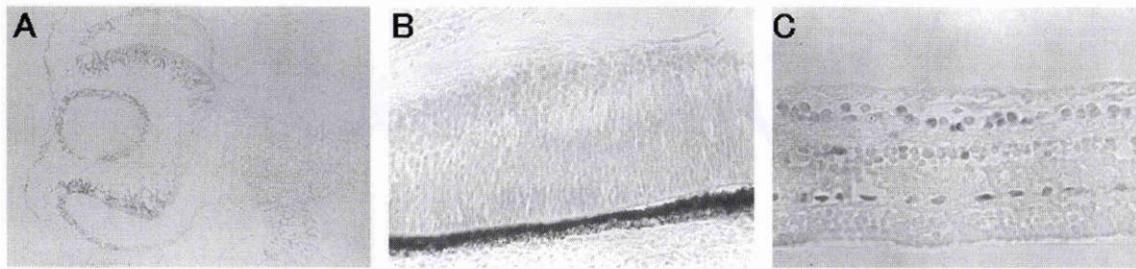


図7 Pax 6 のモノクローナル抗体による発生人眼の免疫染色。

初期(A, 胎齢5週)は表層外胚葉, 水晶体胞, 眼杯, 視茎と, 眼球全体が染まる. 網膜も初期は広汎に染まるが(B, 胎齢10週), 後期になると神経節細胞, アマクリン細胞, 水平細胞のみが染色される(C, 胎齢20週).

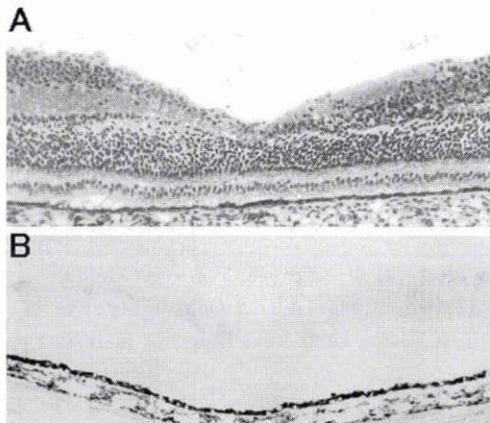


図8 Pax 6 のモノクローナル抗体による発生期黄斑の免疫染色。

A: 出生直後のマーモセット(リス猿)黄斑のH-E染色. B: Pax 6 の免疫染色. 黄斑に Pax 6 の染色性限局はみられない。

では, タツノオトシゴやヨウジウオに軽度の陥凹をもつ黄斑がみられる(図9). そして, 3億6千万年前に魚が陸地上に上がり, 両生類の進化が始まった. この前後の時期に, 動物に顔ができた. この顔ができたということが, 後述するように本研究の大きなテーマになったのである. 現存する両生類, そしてこれに続く爬虫類は, 深い陥凹をもつ高度な黄斑をもっている。

鳥に至ると, 黄斑の形は大差ないが, 存在する場所がさまざまになる<sup>21,31)</sup>. まず, 我々ヒトと同じ耳側網膜に黄斑をもつグループがある(図10). フクロウのように眼が顔の正面にある鳥では黄斑が眼底後部に存在するが, 多くの鳥は眼が横についており, 正面をみるために, 黄斑がかなり耳側周辺部にある. 一方, 横方向を主にみる鳥は, 黄斑が耳側になく, 眼球の前後軸に一致して鼻側に存在する(図11). さらに, ツバメなどは, 耳側と鼻側に2つの黄斑を持って使い分けている(図12). ゆっくり集中して見る時は顔を横に向けて鼻側黄斑を使い, 獲物を捕らえるなどすばやくみる場合は顔を正面に向けて耳側黄斑を使う. 一方, ニワトリやウズラのような地上を歩く鳥は, 黄斑が退化してみられないが, visual streak という感度の高い部分があって, 網膜内を水平方向に帯状に伸びてい

る。

爬虫類や鳥が黄斑を持っている以上, 恐竜も黄斑をもっており, 視力が良かったに違いない. しかし, 2億3千万年前に出現した哺乳類は当時脇役に過ぎず, 夜行性であった. 黄斑は使われることなく退化し, 現存する大部分の哺乳類は黄斑を持っていない. しかし, 地上を歩いて黄斑が退化した鳥と同じように, 眼底には横に走る visual streak が観察される. 最近, この visual streak の細胞密度が調べられて, 耳側に area centralis という高密度な場所が存在することが明らかになった(図13)<sup>32,33)</sup>. 退化したとはいえ, 黄斑の痕跡が残っていたのである。

そして, 我々霊長類に至って, 陥凹をもつ黄斑が再度忽然と出現した. この再現した理由は全く不明である。

以上の黄斑の進化をまとめると, 魚から爬虫類まで黄斑は視神経より耳側に存在していた. 鳥に至って鼻側黄斑ができ, 2つ黄斑があるものも出現した. しかし, ほとんどの動物で黄斑は耳側に存在し, 鳥は特殊であることがわかる. そして, 哺乳類で黄斑は一度消失し, 霊長類で再現したが, その間, 黄斑は visual streak の中に潜んでいた(図19).

#### 哺乳類における黄斑の喪失と復元 —色覚復元トランスジェニックマウスと Pax 6-オプシンの相互関係—

哺乳類で黄斑が消失し, 霊長類で再現したのはなぜだろうか. 哺乳類が最初夜行性だったので使わなくなり, 昼に行動するようになってから再度現れたというのはきわめていい加減な表現である. 霊長類でなくても昼に行動し夜は眠る哺乳類が沢山いるので, もっと早期に黄斑が再現してもよいはずである. 何か遺伝子の変遷が関係したに違いない. そして, その遺伝子は原始哺乳類で機能が失われ, 霊長類で再現したもののはずである。

網膜において哺乳類で失われ, 霊長類で再現した遺伝子が1つある. それは視細胞錐体の色覚を司るオプシンである. そもそもオプシンは光感受性物質として Pax 6 とともに太古の原始的な動物の眼に出現した. そして, 動物によってさまざまな色を識別するべく多岐に分化したが, 原始哺乳類になると青オプシンを残して変異し, 機能



図9 魚の黄斑.

タツノオトシゴ(A)とヨウジウオ(B)は、軽度の陥凹(C)をもつ黄斑がみられる。顔があり眼が比較的正面を向いているタツノオトシゴの黄斑は耳側後部にあるが(A)、眼が横についているヨウジウオでは耳側周辺部に存在する(B)。(Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders)より許可を得て転載)

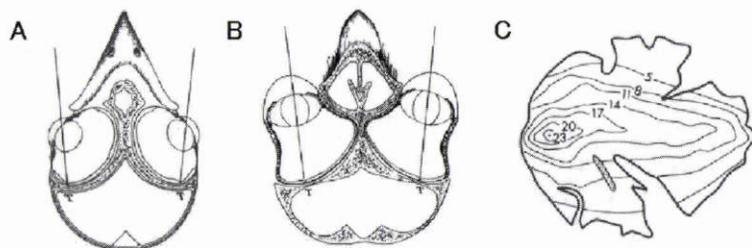


図10 鳥の耳側黄斑.

フクロウのように眼が顔の正面にある鳥は黄斑が後部に存在するが(A)、眼が横についている一般の鳥は正面を見るために、黄斑がかなり耳側周辺部にある(B)。C: 網膜神経節細胞の分布。(A, Bは Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders)より, Cは Vision, Brain, and Behavior in Birds (MIT Press)より許可を得て一部改変転載)

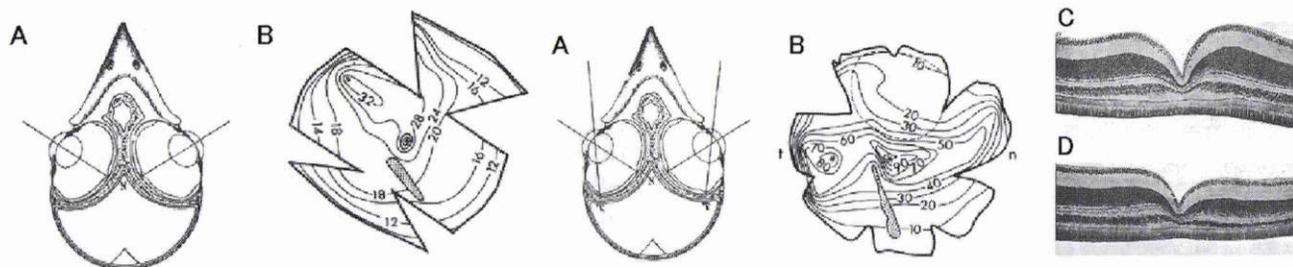


図11 鳥の鼻側(中心)黄斑.

A: 横方向を中心にみる鳥は、黄斑が耳側になく、眼球の前後軸に一致して鼻側に存在している。B: 網膜神経節細胞の分布。(Aは Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders)より, Bは Vision, Brain, and Behavior in Birds (MIT Press)より許可を得て一部改変転載)

図12 鳥の2つの黄斑.

A: ゆっくり集中して見る時は顔を横に向けて鼻側を使い、獲物を捕らえるなどすばやく見る時は顔を正面に向けて耳側黄斑を使う。B: 網膜神経節細胞の分布。鼻側黄斑(C)と耳側黄斑(D)に形態上の差はない。(A, C, Dは Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders)より, Bは Vision, Brain, and Behavior in Birds (MIT Press)より許可を得て一部改変転載)

を失った。原始哺乳類は色覚を失っても夜行性であったため、自然淘汰を免れた。そして、長い間オプシン遺伝子は機能しなかったが、サルのX染色体上でまず赤遺伝子の変異によって再度機能を復元した。次いで、赤遺伝子がX染色体上でその後方に重複し、さらに変異して緑遺伝子となることによって、3色の色覚が再現した(図14)<sup>34)</sup>。

著者は、哺乳類における黄斑の消失と再現が、このオプシン遺伝子の消失・再現によるのではないかと考えた。ネズミは原始哺乳類の子孫で、僅かな青オプシンを持ち、さらにごく微弱ながら緑色方向にシフトした変性赤オプシン遺伝子を持つのみである<sup>35)</sup>。そこで、オプシンの遺伝

子を入れたトランスジェニックマウスを作製して、網膜に変化が起らないかを検討することにした。入れる遺伝子はヒトの青、赤、緑オプシン各々のプロモーターとその遺伝子である<sup>36)</sup>。1つのマウスに3種の遺伝子をまとめて入れても、3つがすべて機能するとは限らず、1つの細胞に3色がまとめて入ってしまえば色の識別ができなくなるのが危惧された。そこで、まず3つのオプシンについて別々のトランスジェニックマウスを作った。そして、進化に従い、青オプシンを補強したマウスに赤オプシン導入マウスを掛け合わせて2色を復元し、次いで緑オプシン導入マウスを掛け合わせて3色の復現を目指した

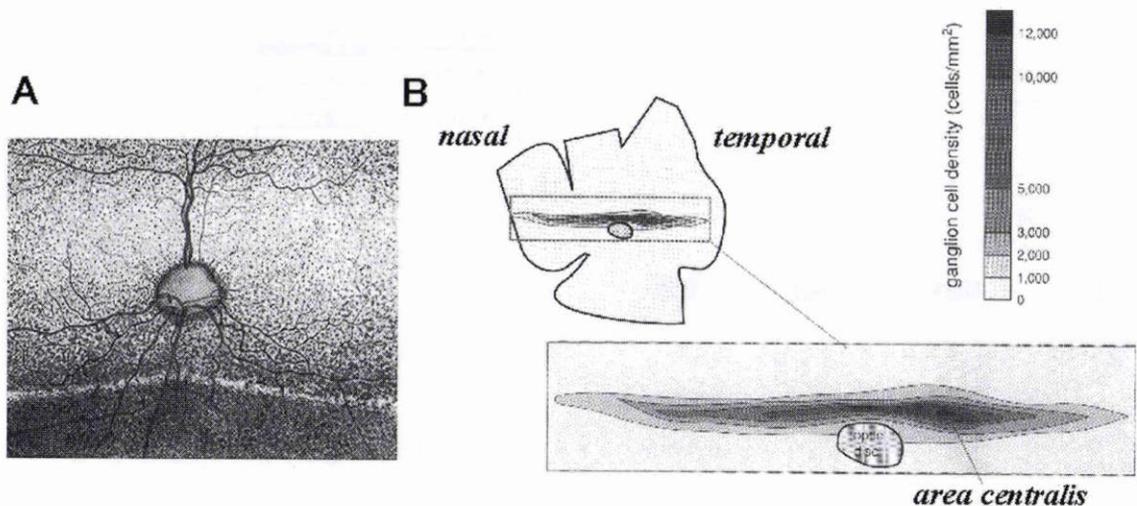


図 13 チーターの眼底図(A)と網膜神経節細胞密度(B).

眼底は横に水平に走る visual streak がみられ、この部位は神経節細胞密度が高い。ことに耳側に area centralis と呼ばれる高密度な場所が存在する。(Rodieck RW: The First Step of Seeing(Sinauer)より許可を得て転載)

(図 15). 現在、実験はまだ途中で、青と赤の掛け合わせまで終了しているが、すでにこの段階で変化が現れた。

青オプシンを導入したマウスでは、カラー網膜電図(ERG)で青色光に対する反応増強がみられたが、赤、緑の反応はなかった。抗青オプシン抗体の免疫染色でも、正常マウスに比べて染色性の増強がみられた。赤オプシン単独導入マウスでは、カラー ERG で赤の反応が出現した。赤と緑のオプシンは 97% アミノ酸配列が同じで<sup>36)</sup>、抗体で区別はできないが、抗赤緑オプシン抗体の免疫染色を行うと、網膜で染色性が出現しており、赤オプシンが発現していると思われた。マウスの眼底は黄斑がないので、血管が乳頭から放射状に出ているが、これら青あるいは赤オプシンを単独に入れただけでは眼底に変化はなかった。しかし、青と赤を掛け合わせると、マウスの 1 系統で、網膜血管が後極をよけて迂回していた。カラー ERG で青、赤ともに反応がみられ、免疫染色では、ことに赤オプシンの発現が後極に集中していた(図 16)。サルでは赤オプシンが再現し青赤 2 色が復元した段階ですでに黄斑が再現しているが、今回のトランスジェニックマウスでは、これと類似のことが起こったと考えられる。これによって、進化においてオプシンの復元が黄斑の再現に関与していたことが強く示唆された。現在、これに緑オプシン導入マウスを掛け合わせて 3 色復元を目指し、後極にさらに変化が起こるかを検討している。

第一、Pax 6 がオプシンに影響を及ぼすかについても、これまで全く知られていない。そこで、これを chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイで生化学的に検討した(図 17)<sup>37)</sup>。この方法の原理は Pax 6 を支配する遺伝子とし、オプシンを支配される遺伝子と仮定して、両方を培養細胞に導入し、相互関係を観察するものである。

Pax 6 が直接あるいは間接的にオプシンに影響するならば、オプシンプロモーターに働きかけ、作られるオプシン蛋白量が変動するので、これを測定する。オプシンプロモーターにつなげる遺伝子はオプシンでもよいのだが検出が難しいため、検出が簡単な CAT をつなげる。Pax 6 とオプシンプロモーターの関係をみるには支障がないからである。Pax 6 がオプシンの発現を亢進するならば、導入する Pax 6 の量を増やすと CAT 蛋白の産生量が増加する。Pax 6 がオプシンを抑制する場合は CAT が減少する。相互に関係がなければ、CAT は変動しない。そして、Pax 6 の量を増やすと、ヒトのオプシンプロモーター-CAT の発現は青、赤、緑いずれも減少し、Pax 6 がオプシンを抑制することがわかった(図 18 A)。亢進でなく抑制するのは意外と思われるかもしれないが、Pax 6 は主に網膜の初期発生を担っているため、早い時期にオプシンができては困るのである。オプシンが作られるのは細胞が分化するもっと後期であり、この頃 Pax 6 は視細胞では発現しておらず、すでに分化の役割をその固有遺伝子(Crx など)に受け渡してしまっている。

次に、逆にオプシンから Pax 6 へフィードバックがあるか、オプシンから Pax 6 への影響を CAT アッセイで調べた。すると、すべてのオプシンが Pax 6 を抑制していた(図 18 B)。オプシン蛋白は細胞膜に存在しており、一方 Pax 6 蛋白は転写因子で細胞核内にあるので、このフィードバックは直接働くのではなく、何らかのシグナル伝達があると考えられる。オプシンと Pax 6 が相互に抑制しており、Pax 6 が初期の運命決定を行っている間はオプシンのような高度に分化した蛋白の発現が抑制され、分化が進むと Pax 6 のような初期に働く遺伝子が抑制されていることが推察される。

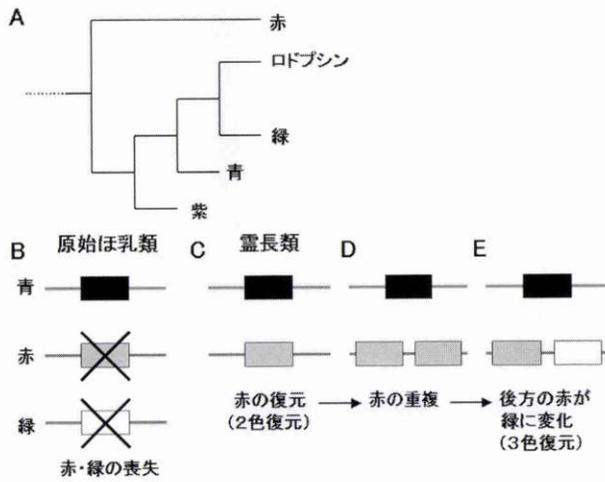


図 14 オプシンの進化.

オプシンは光感受性物質として多岐に分化したが(A), 原始哺乳類になると青オプシンを残して変異し, 機能を失った(B). 霊長類になって, X 染色体上でまず赤遺伝子が変異して機能を復元し(C), 次いで, 赤遺伝子が X 染色体上でその後方に重複し(D), これが変異し緑遺伝子となって3色の色覚が復現した(E).

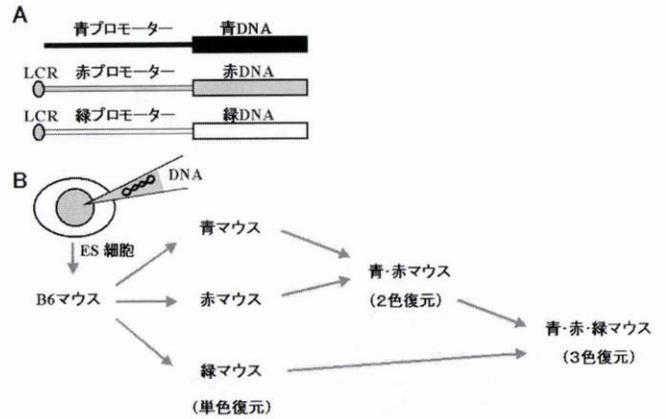


図 15 オプシン遺伝子導入のトランスジェニックマウス.

A: 導入した3種類の遺伝子. B: トランスジェニックマウスの作成順序. まず3種のオプシンについて個別のトランスジェニックマウスを作り, 青オプシン導入マウスと赤オプシン導入マウスを掛け合わせて2色を復元し, 次いで緑オプシン導入マウスを掛け合わせて3色の復元を目指す. 現在, 3種の個別マウスが完成し, 掛け合わせは青と赤まで終了している.

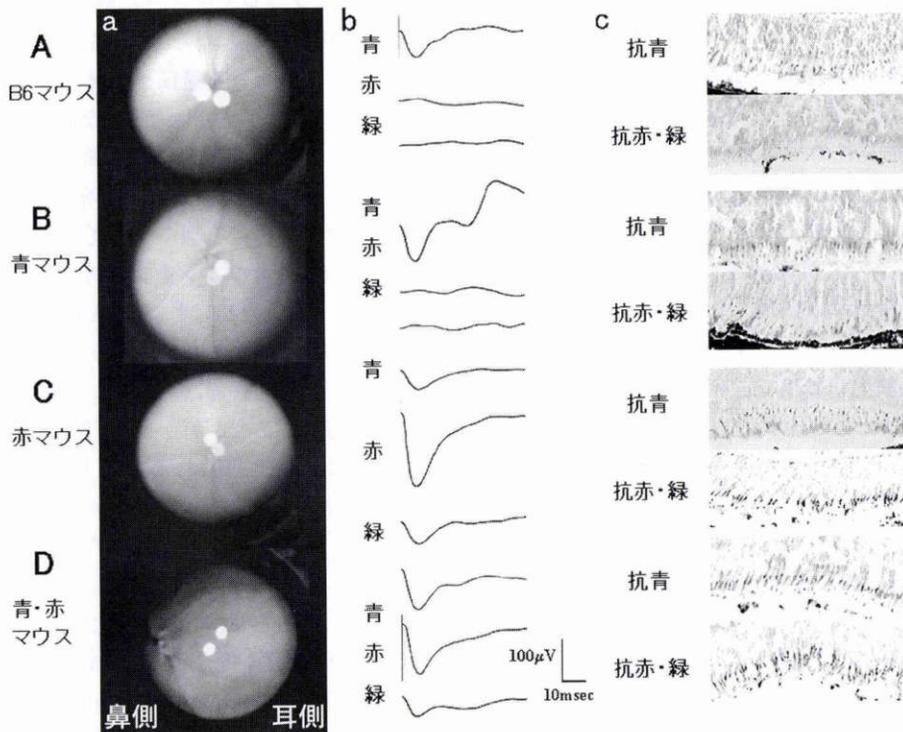


図 16 オプシン導入トランスジェニックマウスの所見.

a: 眼底所見. b: カラー錐体系 ERG(青 470 nm, 赤 644 nm, 緑 525 nm). c: 抗オプシン抗体による免疫染色. A: 正常マウス. 眼底は黄斑がなく, 網膜血管は乳頭から放射状に走行する. カラー ERG では, ごく軽度の青の反応があり, 抗青オプシン抗体の免疫染色でも軽度の青オプシンの染色性がみられる. B: 青オプシン単独導入マウス. 眼底は変化がなく, カラー ERG で青色光に対する反応増強がみられるが, 赤と緑の反応はない. 抗青オプシン抗体の免疫染色で, 正常マウスに比べて染色性の増強がみられる. C: 赤オプシン単独導入マウス. カラー ERG で赤の反応が出現する. 赤と緑は波長が近く, 刺激光の波長に幅があるので, 軽度に緑の反応も出ている. 赤と緑のオプシンは97% アミノ酸配列が同じで, 抗体で区別はできないが, 抗赤緑オプシン抗体の免疫染色を行うと, 網膜での発現が確認される. D: 青と赤を掛け合わせた2色復元マウス. 耳側網膜血管が後極をよけて迂回している. カラー ERG で青, 赤ともに反応がみられ, 免疫染色では, ことに赤緑オプシン抗体に対する発現が後極に集中している.

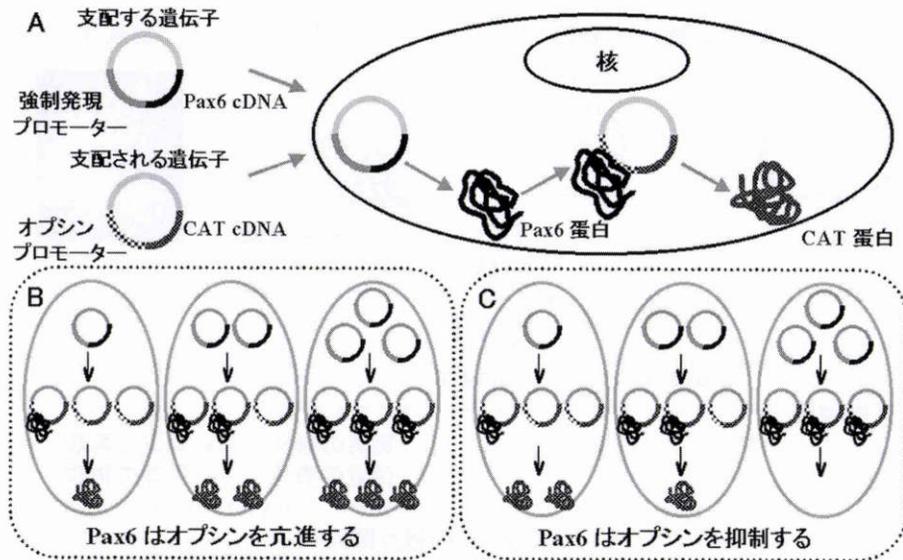


図 17 Pax 6 のオプシンに対する影響を調べる CAT アッセイの原理。

A: Pax 6 を支配する遺伝子, オプシンを支配される遺伝子と仮定する. Pax 6 の強制発現プラスミドとオプシンプロモーター-遺伝子の両方を培養細胞に導入する. Pax 6 は転写因子なので, 直接あるいは間接的にオプシンに影響するならば, そのプロモーターに働きかける (この図では, 直接作用する形で書いてある). オプシンプロモーターつなげる遺伝子はオプシンでもよいのだが, 検出が難しい上, Pax 6 とオプシンプロモーターの関係をみるには支障がないので, 検出が簡単な chloramphenicol acetyltransferase (CAT) をつなげる. Pax 6 の影響を受ければ, 作られる CAT 蛋白量が変動するので, これを測定する. B: Pax 6 がオプシンの発現を亢進するなら, 導入する Pax 6 の量を増やすと CAT 蛋白の産生量も増加する. C: Pax 6 がオプシンを抑制するなら CAT は減少する. 相互に関係がなければ CAT は変動しない.

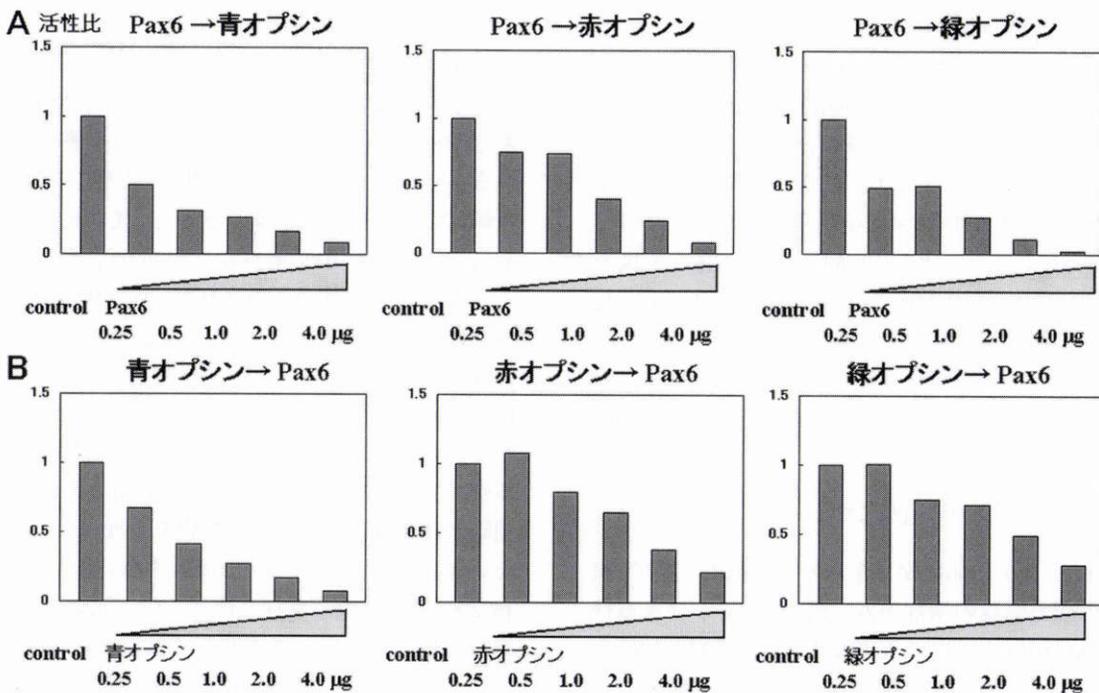


図 18 Pax 6 とオプシンの相互関係を調べた CAT アッセイ。

A: 支配する遺伝子を Pax 6, される遺伝子をオプシンと仮定して, 網膜芽細胞腫由来 WERI 細胞に Pax 6 遺伝子強制発現プラスミドと青, 赤, あるいは緑オプシンプロモーター-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) を導入. 導入する Pax 6 の量を増やすと, CAT の発現は青, 赤, 緑いずれも減少し, Pax 6 はすべてのオプシンを抑制している. B: 支配する遺伝子をオプシン, される遺伝子を Pax 6 と仮定して青, 赤, あるいは緑オプシン遺伝子強制発現プラスミドと Pax 6 プロモーター-CAT を導入. 青, 赤, 緑すべてのオプシンが量依存性に Pax 6 を抑制している.

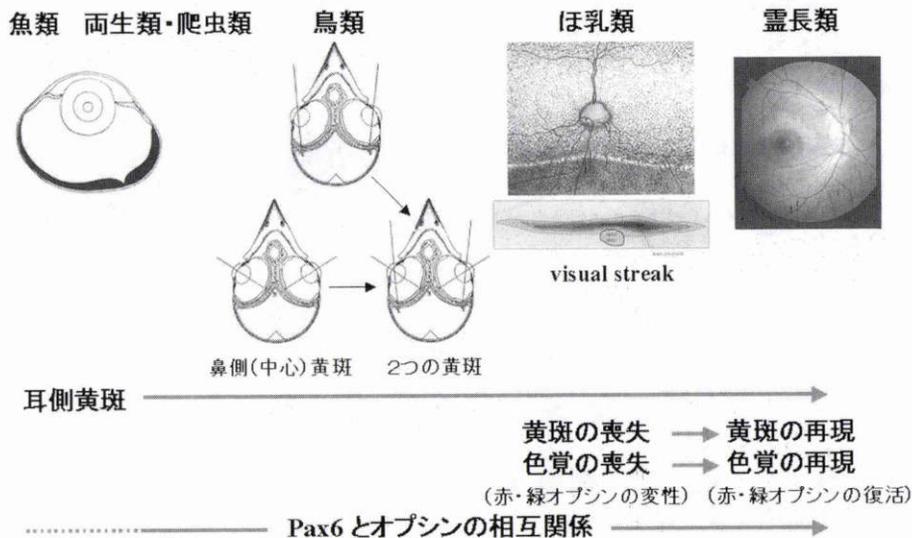


図19 黄斑の進化.

魚から一貫して耳側に黄斑が存在する。鳥では、鼻側(中心)黄斑と耳側鼻側2つの黄斑をもつ種が現れた。哺乳類は一時期黄斑を失い、霊長類で再度獲得した。その間、黄斑を作るシステムは visual streak の中に潜んでいた。哺乳類が一時期黄斑を失い、再度獲得したのと、オプシン遺伝子の消失、復元の時期は一致している。オプシンと Pax6 の相互関係は進化の最初からあったと考えられる。(眼の図は Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders), Rodieck RW: The First Step of Seeing(Sinauer)より許可を得て転載)

オプシンと Pax6 の相互関係は形が違ってても進化の最初からあったと思われ、ヒトに至っても残っていることが明らかになった。哺乳類が一時期黄斑を失い、再度獲得したのは、たぶんオプシン遺伝子の消失、復元によると思われる。では、オプシンが Pax6 を支配する真の黄斑形成遺伝子なのだろうか。そうではなく、オプシンがあると錐体が分化でき、黄斑が形成される環境が整えられたのである。ここでわかったことは、①哺乳類が色覚と黄斑を喪失している間も、黄斑を作るシステムは網膜の中で絶えることなく保存されていた、②我々ヒトの黄斑は、魚に最初に発生した耳側黄斑を受け継いでいる、の2点である(図19)。黄斑形成の作るシステムは、別の面から探らなければならない。

#### 黄斑の陥凹について

個体発生で、黄斑に陥凹ができるのは比較的后期で、初期はむしろ網膜細胞の増加がみられる。陥凹ができる機序は、視細胞が中心に向かって移動し、双極細胞と神経節細胞は逆に外へ向かって移動するためといわれている(図20)<sup>33)</sup>。しかし、著者は、陥凹の形成には、視細胞から神経節細胞までのシナプスが作られた後に、余分な細胞を排除するアポトーシス<sup>38)</sup>が起こっているのではないかと考えた。そこで、サルが発生期黄斑で TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)法<sup>39)</sup>を行うと、黄斑発生領域に強いアポトーシスがみられた(図21)。これは、陥凹が網膜細胞の移動によってできるという説を

否定するものでないが、アポトーシスが一部関与することは明らかである。

しかし、陥凹は黄斑を形成するシステムにおいて本質的なものではない。網膜は進化において、下等動物では視細胞が硝子体側に向いている。これは網膜がカメラにおけるフィルムとして機能する場合、当然の向きなのだが、魚類に至って網膜は表裏が逆転し、光が視細胞に届くまでに一旦網膜の中を通らねばならなくなった(図22)<sup>2)</sup>。このような方向性の急な変化は、旧動物から新動物への体軸の反転やウニ、ヒトデなどの棘皮動物における体幹の放射状化など、進化において何回か起こったが<sup>27)</sup>、何らかの位置決め遺伝子の働きが変わったためと考えられている。網膜の表裏逆転に関与した遺伝子は不明であるが、同様の機転があったことが推測される。しかし、視細胞が反対側にあつて光が網膜を一度通らなければならないという構造は明らかにでき損ないで、視覚的には不利である。光が網膜を通り抜けるのが邪魔なので、余分な細胞が横にどけられて陥凹ができたと考えられる。歴史に「もし……であれば」は許されないといわれるが、もし我々の網膜が表裏逆転していなかったら、黄斑は視細胞から神経節細胞までが集中するだけで、陥凹は必要なかったのではないかと思う。黄斑形成において本質的なのは、この領域に網膜細胞の分化と密度を亢進させ、その位置を決めるシステムなのである。

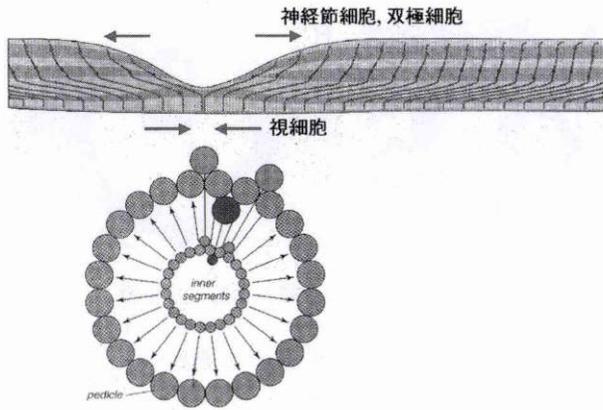


図 20 黄斑の陥凹の発生.

黄斑では、視細胞、双極細胞、神経節細胞がずれることによって陥凹が形成されているが、これは視細胞の分裂が中心に向かうことによって移動し、双極細胞と神経節細胞は逆に外へ向かって移動するためと考えられている。(Rodieck RW: The First Step of Seeing(Sinauer)より許可を得て転載)



図 21 黄斑におけるアポトーシス.

A: 出生直後のマウモセット(リス猿)黄斑の H-E 染色.  
B: TdT-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labelling (TUNEL) 法. 黄斑領域に強いアポトーシスが見られる.

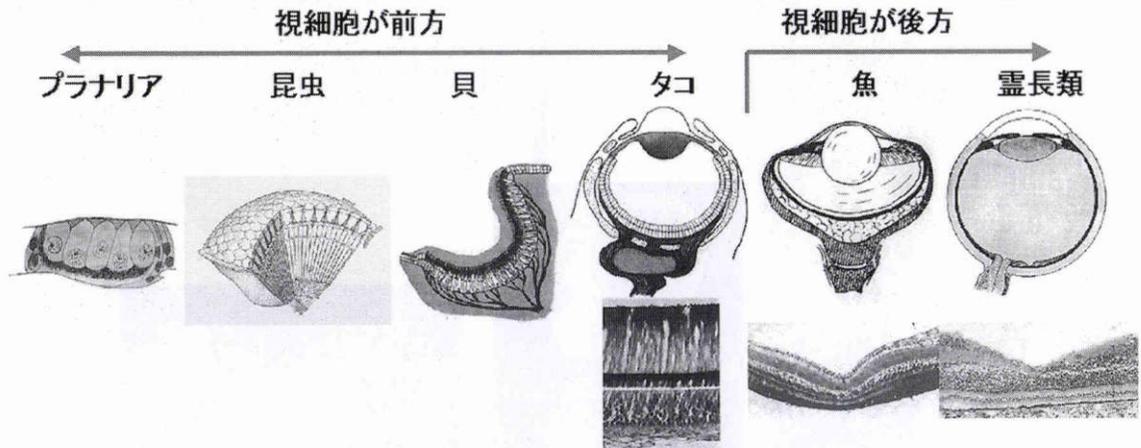


図 22 進化における網膜の表裏逆転.

下等動物では視細胞が硝子体側に向いているが、魚類にいたって網膜は表裏が逆転した。(眼の図は Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders)より許可を得て転載)

### Pax 6 遺伝子の網膜形成能

従来、未熟児の眼底観察などから、黄斑は最初耳側周辺部にでき、後極へ移動するといわれていた。しかし、実際は長後毛様動脈・長毛様神経入口部を黄斑と見誤っていたり、眼球が小さいので相対的にそのようにみえるだけである(図 23 A)。最近の研究は、黄斑の場所は最初から変わらず、従来の考えよりずっと早い胎齢 8 週位に発生が始まると考えている(図 23 B)<sup>41)</sup>。そこで、我々もヒトの初期発生を調べてみると、8 週どころか 5 週ですでに分化が進んでいた(図 24)。黄斑の運命を決定する遺伝子は、非常に早い時期に働いているのである。

免疫染色では、黄斑の運命が決まる初期に、Pax 6 は網膜全層に発現していた(図 7)。Pax 6 が黄斑形成に関与す

るなら、この時期の網膜に Pax 6 を余分に入れば、網膜の形成が進むはずである。しかし、過去の研究報告は逆の結果を示している。Pax 6 の変異をもつマウスは小眼球になるが、Pax 6 を過剰に導入したトランスジェニックマウスを作っても小眼球が生ずる<sup>41)</sup>。ここから、Pax 6 の発現量は少なくとも多過ぎても困るという考えが定着した。しかし、トランスジェニックマウスでは、導入した Pax 6 が眼球だけでなく、中枢や視神経など多くの組織に発現する。小眼球は発生の僅かな均衡がくずれば容易に起こるので、多くの組織に Pax 6 が異常量発現すれば、組織間相互作用が障害され、結果として小眼球になることも考えられる。網膜への Pax 6 の影響を知るためには、網膜だけに遺伝子を導入しなければならない。

そこで、鶏の発生期網膜に Pax 6 を直接導入すること

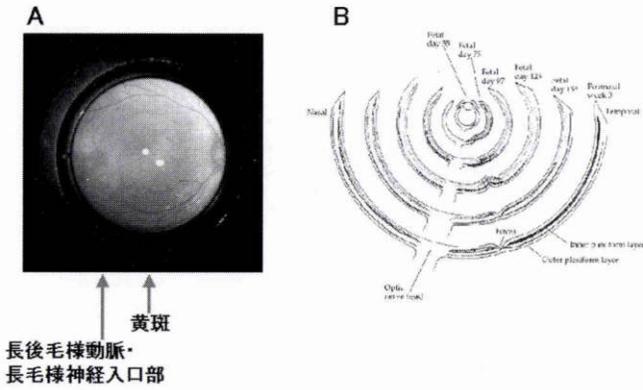


図 23 発生における黄斑の位置。

A: 未熟児の眼底. 長後毛様動脈・長毛様神経入口部を黄斑と見誤りやすい.  
 B: 黄斑の発生は胎齢8週位に始まり, その位置は不変である. (Bは Oyster CW: The Human Eye. Sinauer (Sinauer) より許可を得て転載)

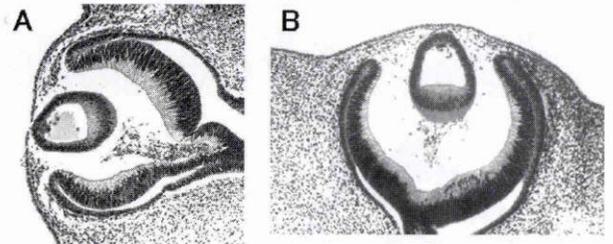


図 24 胎齢5週の人眼矢状断と水平断。

A: 矢状断で上下の網膜発生に差はない. B: 水平断ではすでに後極で分化が進んでいる (H-E 染色).

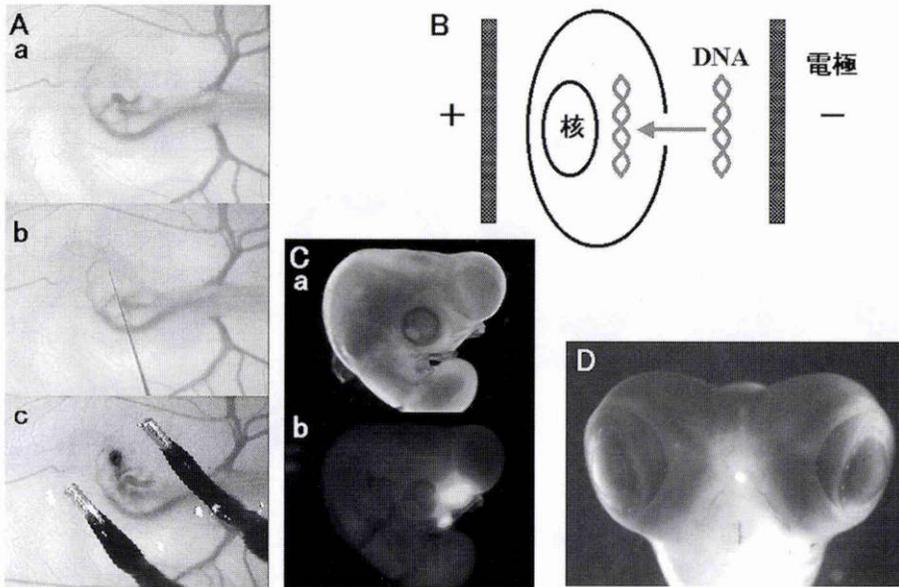


図 25 電気穿孔法。

A: 方法. a: stage 16(受精2日半)の鶏胚, 卵の黄身の上に体を横にして浮いている. b: 眼の中に DNA をマイクロピペットで注入する. c: 通電して DNA を導入する. B: 電流を流すと細胞膜が一瞬こわれ, DNA が細胞内に入る. C: 蛍光で光る蛋白 green fluorescence protein (GFP) の遺伝子を同時に導入すると, 後で遺伝子が入った場所が見える. a: 4日胚. b: stage 16(受精2日半)に遺伝子を眼球の前方に導入すると, 4日胚で入った場所が光っている. D: 受精10日の正常鶏胚頭部, 眼が非常に大きいので観察が便利である.

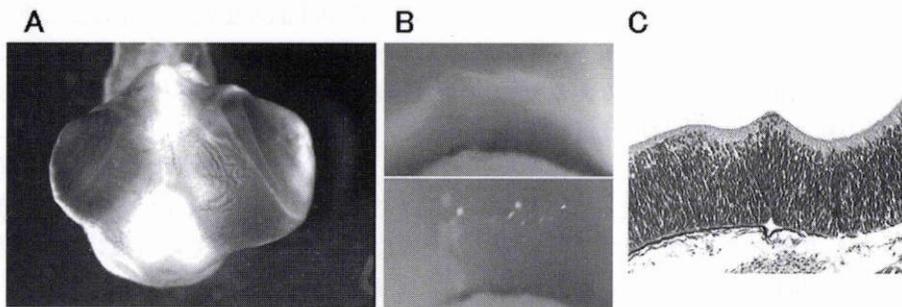


図 26 鶏胚網膜への Pax 6 導入。

A: 発生初期 (stage 12-16) の眼球内に Pax 6 を入れると, 数日後に入れた方の右眼が大きくなった. B: 網膜は厚くなり, GFP で遺伝子の導入が確認される. C: 組織所見で神経節細胞が増加し, 発生が亢進していた.

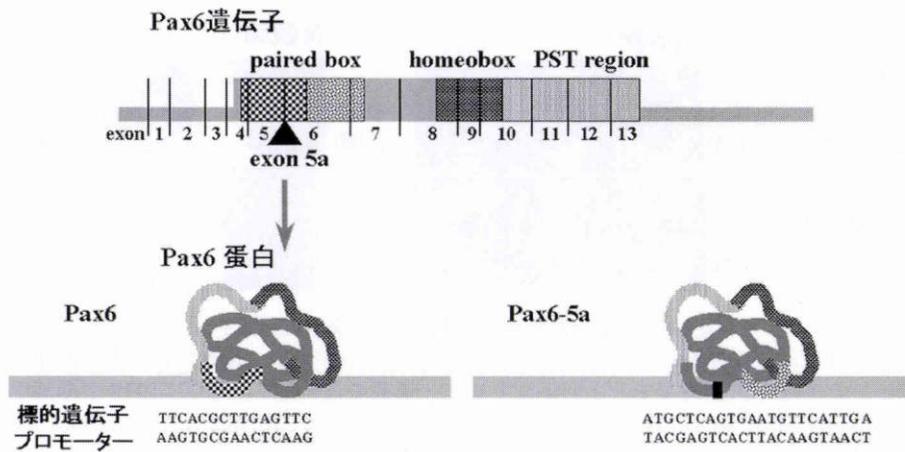


図 27 Pax 6 の選択的スプライス(exon 5a)。

exon 5 と exon 6 の間に 14 のアミノ酸をコードする exon 5a があり、これが読まれるか読まれないかによって、Pax 6 は 14 アミノ酸が入るものと入らないもの 2 種類の蛋白が作られる。Pax 6 蛋白は転写因子として標的 DNA に接着する部位 paired domain があるが、14 アミノ酸はこの中に存在する。paired domain はさらに N-terminal subdomain (NTS) と C-terminal subdomain (CTS) の 2 つに分かれ、接着する標的 DNA が異なる。exon 5a による 14 アミノ酸が入れば CTS が、入らなければ NTS が働く。

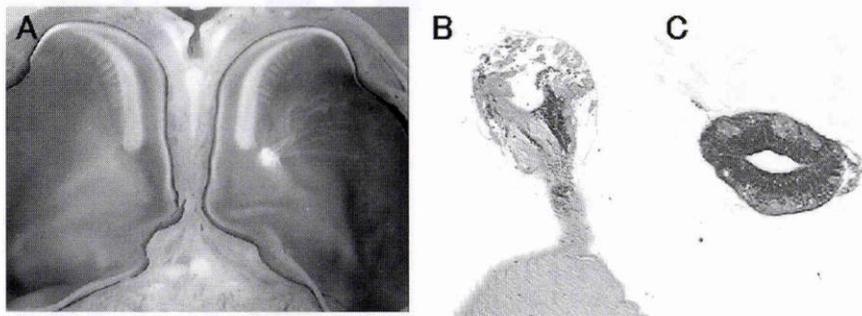


図 28 鶏胚網膜への Pax 6-5a 導入。

A: 発生初期 (stage 12-16) の眼球内に Pax 6-5a を導入すると、数日後に遺伝子を入れた方の右眼で、網膜から多数の索状組織が立ちあがった。B: これはすべて網膜であり、神経細胞と神経線維で構成されている。C: 茎状の組織は管構造となっており、神経線維から視細胞にいたる層構造が比較的保たれている。

にした。鶏は地面を歩く鳥なので、黄斑は退化して存在しない。しかし、網膜の大まかな変化を見るには十分である。しかも、受精卵が簡単に手に入り、発生も早く 1 週間で結果がわかるので便利である。遺伝子を入れる方法は、電流をかけて DNA を細胞内に入れる電気穿孔法を用いた(図 25)<sup>42)43)</sup>。

発生初期 (stage 12-16) の眼球内に Pax 6 を入れると、数日後入れた方の眼が大きくなった。これは、Pax 6 を過剰に入れると眼が小さくなるというトランスジェニックマウスの実験とは逆の結果である。この大きくなった眼では網膜の厚さが変わり、組織は遺伝子導入直後に網膜芽細胞が、その後神経節細胞が増加し、発生が亢進していた(図 26)。

Pax 6 遺伝子は、exon 5 と exon 6 の間に 14 のアミノ酸をコードする exon 5a が存在する。そして、これが読まれるか読まれないかによって、Pax 6 蛋白は 14 アミノ

酸が入るものと入らないもの 2 種類が作られる<sup>44)</sup>。Pax 6 蛋白では、転写因子として標的 DNA に接着する部位として paired domain があるが、14 アミノ酸はこの中に存在する。Paired domain はさらに N-terminal subdomain (NTS) と C-terminal subdomain (CTS) の 2 つに分かれ、異なるタイプの標的 DNA を支配している。そして、exon 5a による 14 アミノ酸が入れば CTS が、入らなければ NTS が働く<sup>45)46)</sup>。Pax 6 の進化からみると、NTS は初期から働いており、標的 DNA も幾つか判明している。一方、exon 5a が加わったのは脊椎動物以降なので<sup>44)47)</sup>、CTS が働きはじめたのは進化的に比較的新しい。しかも、その機能は全く不明で、標的遺伝子もみつからない(図 27)。我々が発見した孤立性黄斑低形成家系の Pax 6 変異は、この CTS の中にあったので<sup>21)48)</sup>、黄斑の形成には CTS が関係している可能性があった。これまで述べてきた鶏胚に導入する Pax 6 は 14 のアミノ酸を含まない

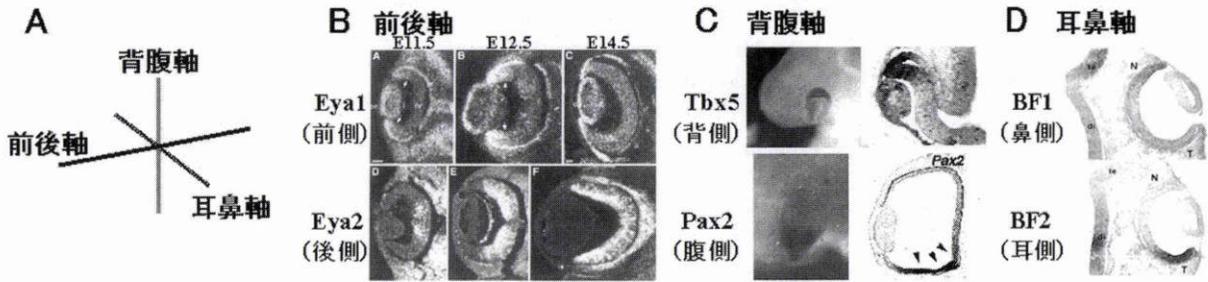


図 29 眼球の前後, 上下, 耳鼻の軸を決める遺伝子.

A : 眼球の 3 次元軸. B : 前後軸では, 眼球前方で Eyes absent 1 (Eya 1) が, 後方で Eya 2 が発現する. C : 上下軸では, 上方で Tbx 5 が, 下方で Pax 2 が発現する. D : 鼻側では BF 1, 耳側では BF 2 が発現する. (B は Xu PX, Woo I, Her H, Beier D, Maas RL : Development 124 : 219-231, 1997, C は Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, Momose T, Uno K, Hoepker V, Ogura K, Takahashi N, Nakamura H, Ogura T : Science 287 : 134-137, 2000, D は Yuasa J, Hirano S, Yamagata M, Noda M : Nature 382 : 632-634, 1996 より許可を得て転載)

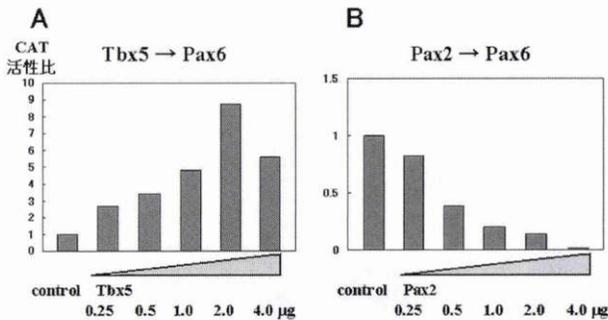


図 30 Tbx 5 と Pax 2 の Pax 6 に対する影響をみた CAT アッセイ.

A : 支配する遺伝子を Tbx 5, される遺伝子を Pax 6 と仮定して, P 19 細胞に Tbx 5 遺伝子強制発現プラスミドと Pax 6 プロモーター-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) を導入. Tbx 5 は量依存性に Pax 6 を亢進する. B : 支配する遺伝子を Pax 2, される遺伝子を Pax 6 と仮定して, Pax 2 遺伝子強制発現プラスミドと Pax 6 プロモーター-CAT を導入. Pax 2 は量依存性に Pax 6 を抑制する.

短い isoform であったので, 次に exon 5 a を含む長い Pax 6 遺伝子 isoform (Pax 6-5 a) を導入した.

Pax 6-5 a の遺伝子を入れると, 網膜から多数の索状組織が立ち上がった. これはすべて網膜で, 神経細胞と神経線維で構成されており, ごく小さい線維組織であっても neurofilament, nestin および musashi の免疫染色で陽性を示した. 茎状に伸びた組織では網膜が管状になっており, しかも視細胞から神経節細胞に至る層構造がほぼ形成されていた (図 28). また, 毛様体付近に Pax 6 を導入すると, 無色素上皮が網膜に変化した. 網膜が折りたたまれたり管腔となるのは, 網膜が水平方向に過剰に発育し, 抵抗の少ない硝子体腔へ伸びたためと考えられる.

Pax 6 が網膜の発育と分化を進めることがわかったが, 水平方向への成長がことに顕著であった. これが硝子体腔へ突出せず, 網膜内の 1 か所に集中すれば黄斑になるのかも知れない. Pax 6 を眼球の半分の領域に入れる

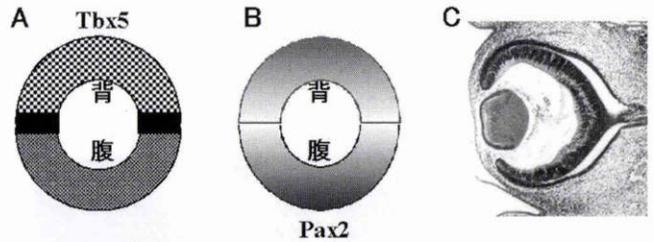


図 31 背腹を決める遺伝子が visual streak を決定する 2 つの仮説.

A : Pax 6 を亢進する遺伝子が眼球上下 (背腹) で働き, これが visual streak で重なってれば, visual streak で網膜の分化発育が亢進する. B : Pax 6 を抑制する遺伝子が眼球の背あるいは腹の頂点で発現し, 濃度勾配をもてば, 最も離れた visual streak では弱いのので, この部位が最も分化発育が進む. C : 胎齢 7 週の眼球矢状断 (H-E 染色). すでに視神経をはさんだ水平方向の visual streak で網膜の分化発育が進んでいる.

と, その部位は拡大し, 角膜と水晶体が対側へ偏位した. 眼球は発生初期には頭の横にあり, 鼻側と耳側が同じ大きさだが, 発生が進むと, 眼球の位置が頭の横から顔の前へ向くとともに耳側が大きくなる<sup>49)50)</sup>. 今回の結果は, 眼球の耳側が鼻側に比べて大きいのは, Pax 6 が耳側後極で強く発現して網膜の発育を進めるためであることを示唆している. また, Pax 6 は exon 5 a によって僅か 14 のアミノ酸が加われば, 網膜を形成する能力が飛躍的に高くなることも明らかになった. 思えば, この exon 5 a が Pax 6 に現れたのは脊椎動物になってからであり<sup>44)47)</sup>, それから間もなく魚類で網膜の構造は急速に複雑化し, 黄斑が生まれたのである<sup>2)</sup>.

### 黄斑の位置づけ

#### —上下 (背腹軸) 方向において—

では, 黄斑はなぜ眼底後極に正確に位置づけられるのだろうか. 最近, 発生において眼球の前後, 上下 (背腹), 左右 (耳鼻) の軸方向を決める遺伝子が同定されてきており

(図 29)<sup>51)~53)</sup>, これらが関係するのかも知れない。黄斑の進化で visual streak が重要なことは先に述べたが<sup>32)33)</sup>, 動物種を比較すると, 黄斑の位置はさまざまだが, どれも水平方向, すなわち visual streak に沿って存在し, 上下にずれているものはない。したがって, 網膜細胞密度が高い visual streak は, 黄斑の原型あるいは亜型と考えられる。著者は, visual streak が眼球の上下, すなわち背腹軸を決める遺伝子によって決定されるのではないかと考えた。

眼球の背側を決める遺伝子としては Tbx 5 が, 腹側を決める遺伝子としては Pax 2 が知られている<sup>52)54)</sup>。電気穿孔法で Tbx 5 を鶏胚の初期眼球の腹側に入れると, 位置情報が変化して腹側が背側化し眼球はひょうたん型になる。そして, 背側化した腹側の網膜神経線維は中枢の背側に相当する部位に投射する<sup>52)</sup>。一方, Pax 2 は腹側で胎生裂に関与し, コロボーマで変異がみついている<sup>54)</sup>。そこで, 今回, Tbx 5 と Pax 2 が Pax 6 に対して影響を及ぼすのか, CAT アッセイを行った。その結果, Tbx 5 は Pax 6 を亢進し, Pax 2 は Pax 6 を抑制することが判明した(図 30)。

背腹を決める遺伝子が visual streak を決定するとすれば, そのシステムには 2 つの仮説が立てられる(図 31 A, B)。もし, Pax 6 を亢進する遺伝子が眼球の上下で働いており, これが visual streak で重複していれば, ここで網膜の分化発育が最も亢進する。一方, Pax 6 を抑制する遺伝子が, 眼球の背あるいは腹の頂点で発現し濃度勾配をもっていけば, 離れている visual streak では弱くなるので, やはりこの部位で最も分化発育が進む。CAT アッセイの結果では, Tbx 5 と Pax 2 が 2 つの仮説の片方ずつを担っているように見える。たぶん, 背腹を決める遺伝子は他にも存在するのであろう。Visual streak と網膜の分化を検討するには, さらに多くの遺伝子がみつかるまで待たなければならない。しかし, 組織を検討してみると, 発生のごく初期にここで網膜の分化発育が進んでいることは事実で(図 31 C), ここに沿って黄斑が作られるのは明らかである。

### 黄斑の位置づけ —水平面において—

次に, 水平面において, 黄斑が視神経乳頭の耳側 15° に正確に位置づけられるのは, なぜだろうか。これにも何らかの遺伝子が関与しているはずである。著者は, まず幾つかの仮説を考えたが(図 32), いずれにも問題があった。

1) 網膜内に位置決め遺伝子が発現する—これは現実的でない。位置決め遺伝子があれば, それを決める遺伝子が必要で, さらにそれを決める遺伝子が要る…, ときりがないのである。

2) 眼球の前後軸に沿って決まる—前後軸を決める遺伝子として Eyes absent (Eya) が発見され, Eya 1 が眼球

前半を, Eya 2 が後半を決めることが知られている(図 29)<sup>51)</sup>。しかし, Eya 2 が眼球後部に発現する領域は広過ぎる。何よりも黄斑の位置は眼球の前後軸に一致していない。黄斑がずれているために視軸と眼球前後軸(眼軸)が異なり, ガンマ角が存在するのは, 我々がよく知るところである。

3) 視神経乳頭が目印になる—しかし, 黄斑と視神経の間隔は動物によって違う<sup>2)</sup>。黄斑が乳頭から非常に離れた場所に存在する動物もあり, 視神経からの距離と法則が求められない。

4) 眼球の鼻側と耳側を決める遺伝子による—視神経を境として眼球の鼻側を決める遺伝子 BF 1, 耳側を決める遺伝子 BF 2 が発見されているが(図 29)<sup>53)</sup>, これも決め手にならない。発生初期に頭の横についている眼球は, 次第に顔の前へ移動する。遺伝子が移動後の最終位置を予測できるとは到底思えない。

5) 網膜や眼球の外から予定黄斑部に向かって発生を更新する物質が放出される—しかし, 黄斑の運命が決まるのはきわめて初期であり, その後眼球は頭の横から前へ移動するので受け取る場所が一定しない。何よりも, 動物によって眼の形がさまざまで, 後ろに共通の発信場所などないのである。

そこで, 進化において黄斑の位置に規則性がないかを再度考えてみた<sup>2)31)</sup>。魚は, タツノオトシゴのように顔が正面に向いているものは黄斑が眼底後部に, 眼が横にあるものは耳側周辺部にある(図 9)。鳥でも同様で, 眼が正面にあるフクロウは黄斑が眼底後部にあるが, これに比べて, 眼が横についている鳥では耳側周辺に存在する(図 10)。これをみると, 視軸が眼球の前後軸とは関係なく, 黄斑の位置だけで決められていることがわかる。正面をみるためにはやむを得ないのだが, 黄斑が極端に周辺部にある動物では, 視軸は角膜, 瞳孔, 水晶体の中心を大きく離れており, どこかを光が通りさえすれば良いほどである。

これを単純に考えて, 種々の動物の眼を視軸の向きにそろえて並べてみると, 視軸は顔の正面を向いて黄斑がその対極にくる。それならば, 顔を正面に向けるシステムが黄斑の位置を決めているのではないだろうか。そして, 顔を正面に向ける遺伝子があるとすれば, 顔を前に向けられない病気を参考にすればよいはずである。Holoprocencephaly という病気があり, 重篤な場合は単眼症を来し, さまざまな程度で眼や顔の位置異常がみられる(図 33)<sup>55)57)</sup>。最近, この疾患がある遺伝子, Sonic hedgehog (Shh) の障害によって起こることが明らかになった<sup>56)57)</sup>。著者は, この遺伝子が黄斑の位置決めに関係があるのではないかと考えた。

Shh は, 両眼がつながっているゲームキャラクターから名づけられた遺伝子であるが, これがコードする蛋白は細胞外シグナル伝達物質で, 中枢神経の腹側に発現し

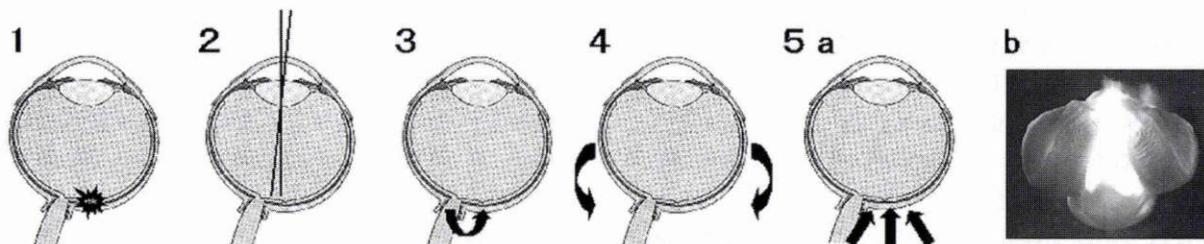


図 32 眼球の水平面で黄斑が視神経乳頭の耳側 15 度に位置づけられる仮説。

いずれも反論がある。

- (1) 網膜内で位置決め遺伝子が発現。しかし、位置決め遺伝子があれば、それを決める遺伝子が不要で、さらにはそれを決める遺伝子が要る……、とぎりが無い。
- (2) 眼球の前後軸にそって決まる。しかし、眼球の後方を決める遺伝子 *Eya 2* の発現領域は広すぎる、黄斑の位置は眼球の前後軸に一致していない。
- (3) 視神経乳頭が目印になる。しかし、黄斑と視神経の位置は動物によって違い、視神経からの距離と法則がない。
- (4) 眼球の鼻側と耳側を決める遺伝子による。しかし、眼球は頭の横から顔の前へ移動する。遺伝子が回転後の最終位置を予測するとは思えない。
- (5) 網膜や眼球の外から予定黄斑部に向かって発生を更新する物質が放出される a: しかし、黄斑の運命が決まるのはきわめて初期であり、その後眼球は頭の横から前へ回転するので受け取る場所が一定しない、動物によって眼の形がさまざま、後ろに共通の発信場所がない (b: 受精後 6 日鶏胚の頭頂からの所見)。

体の正中軸を決定している。Holoprocencephaly ではこの遺伝子異常によって頭部の正中位置情報の障害が起こるのだが、Shh は発生期に他にもさまざまな組織で発現し多彩な役割を果たしている<sup>58)</sup>。眼では初期に視神経の形成に関与し<sup>59)</sup>、中期以降は網膜にも発現して杆体細胞などの分化を亢進する<sup>60)</sup>。Shh は細胞外シグナル伝達物質なので、影響を受ける細胞では Patched というレセプターを介して細胞内にシグナルが伝えられるが、Patched は網膜に発現することが知られている (図 34)<sup>57)60)</sup>。

当初は、この遺伝子が黄斑近傍で発現し、Pax 6 を亢進するのではないかと考えたのだが、合致しない点が多々あった。まず時期が一致しない。Shh が網膜に発現するのは発生中期以降であり<sup>60)</sup>、この頃の網膜における Pax 6 の発現は一部の細胞に限局している上、黄斑の運命づけもすでに終了している。一方、ごく初期に Shh が視神経の運命づけを行っているが、これはまだ第一次眼胞ができる時の視莖においてであり<sup>59)</sup>、黄斑の運命づけとしては時期的には早すぎる。しかも、Shh は Pax 6 を亢進するのではなく、むしろ抑制するという考えが一般的なものである<sup>59)</sup>。ごく初期の視莖に Shh を注入すると、Pax 6 が抑制され、Pax 2 の発現が促されるという。したがって、Shh が Pax 6 を亢進して黄斑の位置を決めるという仮説は、時期的にも機能的にも成立しない。Shh が後極で Pax 6 の発現を亢進させて黄斑の位置を決定しているという仮説はあきらめざるを得なかった。しかし、網膜の発生をみると、初期の眼杯内板は鼻側と耳側で発育に差がないが、網膜の分化が始まると直ちに鼻側より耳側後極の方で分化が進み始める (図 24)。従来、この点はあまり指摘されていなかったのだが、鼻側と耳側後極の発生に差を起こ

すシグナル伝達が何か存在するはずである。

Holoprocencephaly の発生機転については、Shh の異常によって正中軸決定が障害されて前脳が左右 2 分できずに単脳となり、これに伴い視莖、眼胞も単一となって単眼症になり、軽度であれば両眼が近接すると考えられてきた<sup>57)</sup>。しかし、computed tomography (CT) などで両側脳に癒合がみられない microform でも、顔や眼の幅に異常が起こっており (図 33)、その理由は不明だった。これに対し、ごく最近、Shh が顔の正面に発現して顔のオーガナイザーになっているという研究が発表された<sup>61)62)</sup>。まず、*in situ* hybridization によって鶏胚 (stage 20 前後) の顔の正面に Shh が発現していることが示された。これは、ちょうど網膜の分化が始まるとともに、顔における眼球に位置が定まる時期にあたる。そして、この時期の顔面正中に Shh を注入すると顔や眼の幅が広がり、逆に Shh の antagonist を注入すると狭まった。この研究によって、holoprocencephaly の microform における顔面形成異常が、顔の正面に発現する Shh の障害によって起こることが明らかになった。

著者は、ここに至って発想を 180 度転換した。後ろから Pax 6 を亢進するという考えをやめて、前から抑制がかかっているのではないかと考えたのである (図 35)。前から抑制因子が放出されて濃度勾配を作っていれば、眼球の中を通るにせよ外から回り込むにせよ、黄斑の場所が最も濃度が薄くなる。眼球の後ろから Pax 6 を亢進すると、前から抑制するのは、一見同じようにみえるが大きな違いがある。前から抑制がかかるとすれば、そもそも後極網膜を作るため Pax 6 には高度な網膜分化能があるという前提が必要である。しかし、先に示した通り、Pax 6



図 33 Holoprocencephaly のスペクトラム.

重症では単眼症を来す。さまざまな程度で眼や顔の位置・幅異常が起こり、軽症 (microform) でも眼の幅の異常や口唇人中の欠如、第一切歯の癒合や単一がみられる。(Ming JE, Muenke M: Clin Genet 53:155-163, 1998 より許可を得て転載)

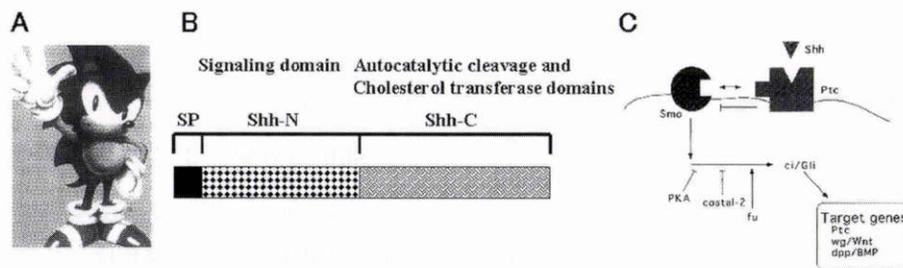


図 34 Sonic hedgehog (Shh) 遺伝子.

両眼がつながっているゲームキャラクターから名づけられた遺伝子で (A), 体の正中軸を決定する細胞外シグナル伝達物質をコードする (B). シグナルは細胞膜にあるレセプター Patched (Ptc) によって細胞内に伝達され、細胞内では Gli 遺伝子-蛋白を介して、下流の遺伝子に影響を与える (C). (Ming JE, Muenke M: Clin Genet 53:155-163, 1998 より許可を得て転載)

は exon 5 a を持てば網膜を形成する能力が飛躍的に高まることが明らかになっている。そして何よりも、抑制という考えをとれば、顔の中心というすべての動物に共通する発信源が存在するのである。

この考えによれば、動物によって眼の位置がどこであろうと、抑制が最も少ない顔の対極に黄斑を位置づけることができる (図 42)。そこで、著者はさらに 1 つの思考実験を行ってみた (図 43)。発生ごく初期 (胎齢 4 週以前) の網膜は、すでに前後方向で発生の程度に差があるが、この時点では耳側と鼻側で差はない。ここに顔の正面から、眼球にとっては斜めから抑制がかかれば、網膜の形成は抑制の程度に応じて変化し、その結果、黄斑の場所が最も高くなる。最初の網膜発生の程度や、抑制の方向と程度が大きく違えば、必ずしもこの形にならないが、ある程度の範囲では共通しており、原始的な黄斑位は作れそうな仮説である。

Shh の Pax 6 発現と網膜形成に対する影響

Shh が Pax 6 を抑制することについて、これまで生化学的には検討されていない。そこで、まず CAT アッセイ

でこれを確認した。支配する遺伝子を Shh, される遺伝子を Pax 6 プロモーター-CAT として培養細胞に導入すると、明らかに Shh が Pax 6 を量依存的に抑制する結果が得られた (図 36)。

次に生体内での変化をみるために、Shh を鶏胚に電気穿孔法で導入した。今度入れる場所は、眼内ではなく眼の外の間葉組織である。Shh を広範囲に入れると、眼球が極端に小さくなり、組織では網膜の分化や発育が遅れていた (図 37)。一方、脈絡膜や強膜はあまり差がなかった。Pax 6 は網膜に発現するが、Shh によってこれが抑制され、網膜の形成が抑さえられたと考えられる。さらに、眼外の限局した部位に Shh を導入すると、やはり眼球が小さくなったが、導入した付近がことに小さくなっており、これに加えて、角膜、水晶体が Shh を入れた部位に向かって偏位していた。組織をみると、Shh を入れた付近の網膜の発育が遅れるとともに、免疫染色で網膜内の Pax 6 の染色が極端に低下していた (図 38)。以上から、Shh が Pax 6 を抑制して網膜の発生を遅らせることが証明された。ここで、眼球が Shh を導入した場所で発育が遅れ、角膜、水晶体がここに向いていたことも重要である。これ

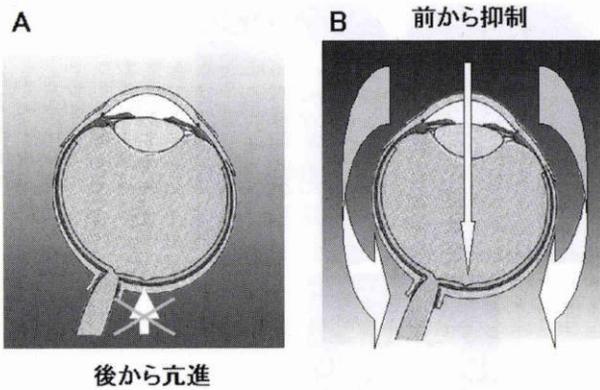


図 35 眼球外からの Pax 6 の亢進と抑制。

A: 後ろから Pax 6 を亢進すると物質が放出されるとすれば、すべての動物で共通な発信源が見当たらない。B: 前から抑制因子が放出されて、これが濃度勾配を作っていれば、眼球の中を通るにせよ外から回り込むにせよ、黄斑の場所が最も濃度が薄くなる。しかも、顔の中心というすべての動物に共通する発信源がある。

は、先に Pax 6 を入れた時に眼が大きくなったことと逆であると解釈できる。Shh が発現していると Pax 6 の網膜形成が抑制されるのでその側が小さくなり、反対側は相対的に Pax 6 が多く発現して、眼球も大きくなるのである。眼球の発育が耳側と鼻側で違うのは、Shh の濃度差によって Pax 6 の発現量が変わり、これによって網膜形成の程度に差が生ずるためと考えられる。

すでに Shh が顔面正面に発現しているという報告があったが<sup>(61)(62)</sup>、黄斑の運命決定時期に一致して Shh が顔に発現しているかを確認する必要がある。そこで、眼球が頭部の横から顔の正面に移動する時期で *in situ* hybridization と免疫染色を行った(図 39)。鶏胚の *in situ* hybridization では、stage 18~24 に顔面正面に明らかな発現がみられた。鶏胚(stage 18~24)とラット(E 13~15)で免疫染色を行うと、Shh の発信源として陽性コントロールになる神経管腹側とともに、顔の正面に染色性が確認された。さらに、これらに加えて水晶体にも染色がみられた。水晶体も Shh を発現していたのである。

以上から、まず眼球が顔の正面に向けられる時期に、Shh が顔の正面から放出されており、眼球の斜め前から Pax 6 を抑制して網膜の発生に差をつくっていると考えられた。そして予想を上回り、Shh は水晶体からも出ている。水晶体から網膜に抑制がかかれば、これに近い前方では抑制が強く遠い後方では少なくなるので、網膜の前と後ろで発生に差ができることも説明できる。眼球前後方向の差は眼杯形成時からあるので、この機転はもっと早期から存在するのであろう。毛様体は、眼杯内板の前方が抑制されているうちに別の組織へと発生して行くのかも知れない。また、鳥で黄斑を 2 つ持つものがあるが(図 12)<sup>(23)(31)</sup>、これは、1 つが水晶体からの抑制によって眼球の前後軸に沿ってでき、1 つは顔の正面からの抑制に応じ

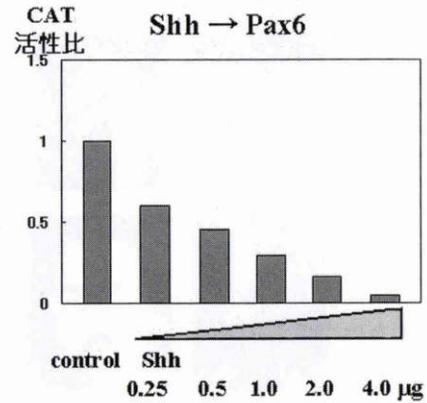


図 36 Shh の Pax6 に対する影響をみた CAT アッセイ。支配する遺伝子を Shh、される遺伝子を Pax 6 と仮定して、P 19 細胞に Shh 遺伝子強制発現プラスミドと Pax 6 プロモーター-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) を導入。Shh は Pax 6 を量依存的に抑制する。

て顔と対側の位置にできると考えれば、非常にわかりやすいのである。

#### Shh の変異による黄斑の形成・位置異常

ここまでわかると、動物の後極網膜に Pax 6 を入れて疑似黄斑を作り、あるいは黄斑をもつ動物を用いて、異所性に Shh を入れることによって黄斑の位置を動かすことができるかという実験を行いたくなる。しかし、これは非常に難しい。Pax 6 を入れ過ぎれば網膜が極端に発育してしまうし、Shh を入れ過ぎれば眼球は極端に小さくなってしまふ。過剰に入れた遺伝子の洪水の中で、黄斑形成の精妙なシステムなどは埋もれてしまうであろう。我々は、まだ適切な量の遺伝子を働かせる手段を持っていないのである。

そこで次なる方法として、Shh の変異によって起こる holopresencephaly の眼底変化を調べてみた。Holopresencephaly の重症例(単眼症)は生後間もなく死亡し、網膜異形成やコロボーマを伴うことが報告<sup>(55)(57)</sup>されている。一方、microform は生存できるが、その眼底の報告はほとんどない。さらに、holopresencephaly とは診断されていなくても、黄斑形成異常の症例を調べれば Shh の変異がみつかるかも知れない。そして、2 例で変異がみつかった。

1 例は明らかな holopresencephaly で、顔の形成障害があった。眼底所見は乳頭が小さく、これは Shh が視神経に発現することで説明できる。しかし、小眼球でないにもかかわらず、黄斑の位置が乳頭のごく近くに存在していた(図 40 A)。他の 1 例は、顔面の形成異常がきわめて軽微であり、黄斑の位置異常も明らかでなかったが、黄斑は低形成を示し、しかも広汎な網膜変性がみられた(図 40 B)。Shh は発生中期以降に網膜にも発現するので<sup>(60)</sup>、これらの網膜の変化すべてを顔から発現する Shh だけ

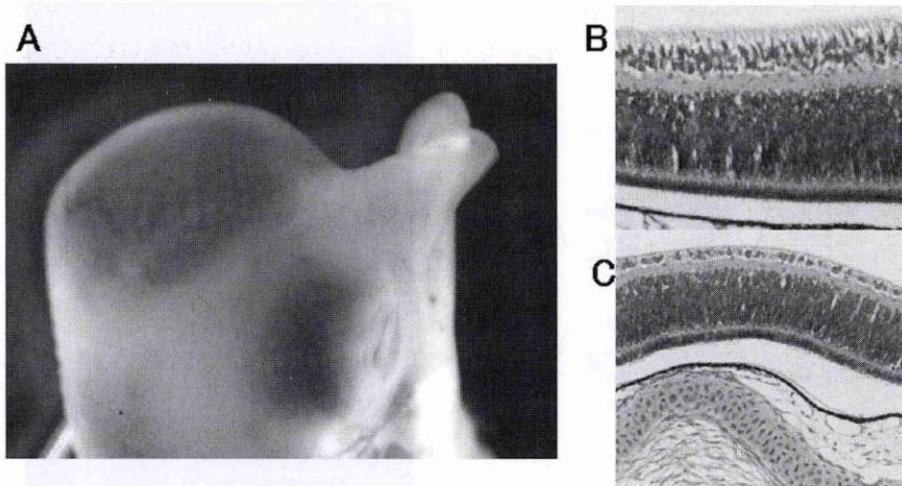


図 37 鶏胚の眼外間葉組織への Shh 導入.

Shh を電気穿孔法で発生初期(stage 12-16)の右眼外の間葉組織に広汎に導入すると、眼球が極端に小さくなった(A). 組織では、コントロール(B)に比べて網膜の分化や発育が遅れている(C).

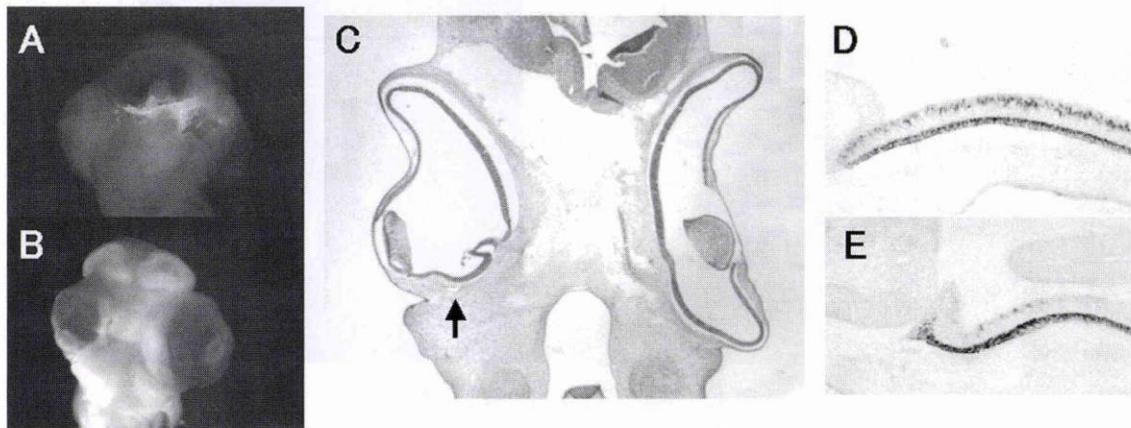


図 38 眼球下方間葉組織への Shh 限局導入.

A: Shh を電気穿孔法で右眼球下方の間葉組織に限局性に導入. 共導入した GFP が光っている部位に遺伝子が発現している. B: 眼球が小さくなるとともに、角膜、水晶体が下に向かって偏位している. C: 組織では、Shh を入れた下方の網膜の発育が遅れている(矢印). E: Pax 6 の免疫染色を行うと、コントロール(D)に比べて Pax 6 の染色が極端に落ちている.

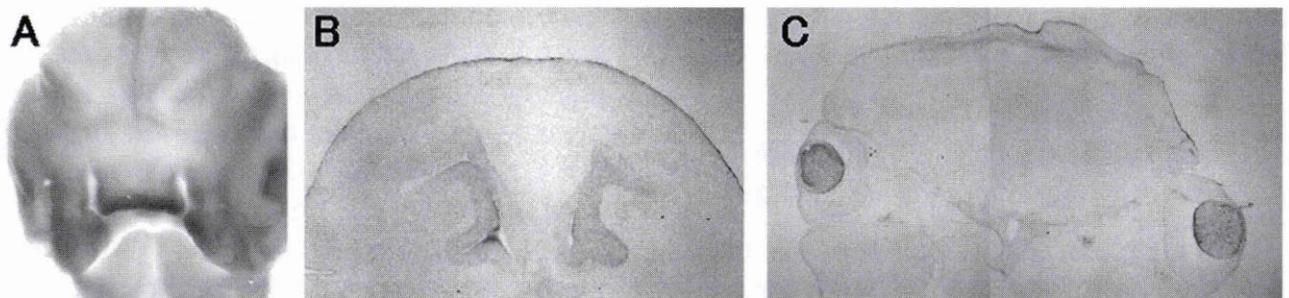


図 39 Shh の発現.

A: 鶏胚(stage 24)の Shh に対する whole mount *in situ* hybridization. 顔面正面に発現がみられる. B: 鶏胚(stage 24)の Shh に対する免疫染色. 中枢神経とともに、顔の正面も染まる. C: ラット胚(E 15)の Shh に対する免疫染色. 顔の正面に加えて水晶体にも染色がみられる.

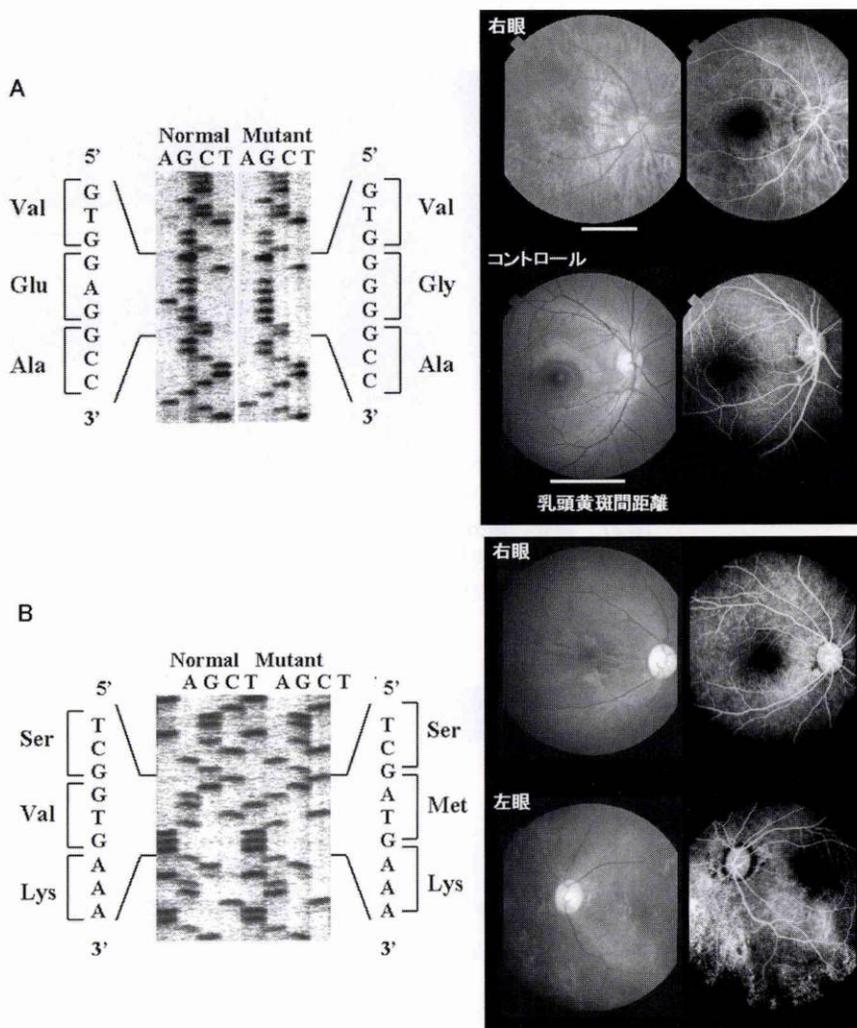


図 40 Shh の変異に伴う眼底の異常.

A: 651 A→G の塩基置換により E 167 G のミスセンス変異がみられた holopresencephaly の microform (17 歳男子). 眼底は乳頭が小さく, 黄斑の位置はコントロールと比較して乳頭のごく近くに存在している. B: 704 G→A の塩基置換により V 185 M のミスセンス変異がみられた 6 歳女兒. 顔面の形成異常は軽微であったが, 黄斑の低形成と広汎な網膜変性がみられる.

で説明することはできない. しかし, Shh が黄斑の形成に関与していることは確かで, ことに黄斑の位置異常は顔に発現する Shh の障害によって起こったと考えられる.

顔を正面に向けるシステム

—黄斑の位置づけ, 視軸, ガンマ角, 網膜と眼球の成長, 視野の成立を統一する理論—

以上をまとめると, 網膜の成長と黄斑の位置づけには 3 つの要因が働いている. それは, ①眼球の背腹軸に伴う visual streak, ②水晶体からの眼杯前方の抑制, ③顔の正面からの網膜形成の抑制, である (図 41). そのうち 2 つにまで Shh が関与していた. しかし, このような重要な機構には複数の遺伝子が関与しているのが普通であり, 今後シグナル伝達物質を含む多くのメンバーが発見されるであろう. この 3 つの要因のうち, 水平面での黄斑の位置決めに必要なのが, 顔の正面からの抑制である. これを

みれば, 眼軸と視軸が一致せず, ガンマ角が存在するのは当たり前である. そして, 動物によって眼の位置がどこにあると, 顔の反対側に自動的に黄斑が刻印されることになる (図 42). まことに自然のしくみは巧妙としかいいようがない. 今からはるかなる昔に, 我々の祖先動物に顔ができ, これが正面に向けられた時に, 黄斑の, そして中心視の進化の歴史は始まったのである.

そして, さらに今回の説は我々の視野の成り立ちをもきわめて明確に説明することができる (図 44). 我々の視野の形が縦より横が長いのは visual streak の名残である. もし, 視野が上下にも広げれば, 動物が上空からくる天敵を認知したり, 地上の食物をみつける上で, いかにも便利だったことであろうか. しかし, 進化の歴史はこれを許さなかった. Visual streak に感度が集中している以上<sup>32)33)</sup>, 視野は上下に伸びようがなかったのである. 同じく, 視野の鼻側が狭く耳側が広いのは, 鼻が邪魔している

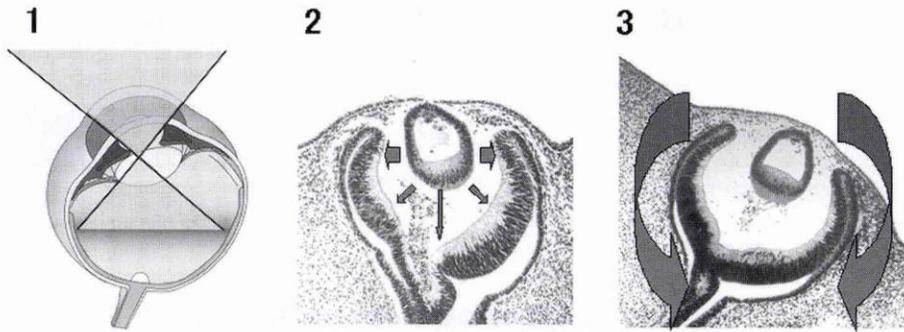


図 41 網膜の成長と黄斑の位置づけに関する 3 つの要因.

(1) 眼球の背腹軸に伴う visual streak. (2) 水晶体からの眼杯前方の抑制. (3) 顔の正面からの網膜形成の抑制. (1 は Rodieck RW: The First Step of Seeing(Sinauer) より許可を得て転載)

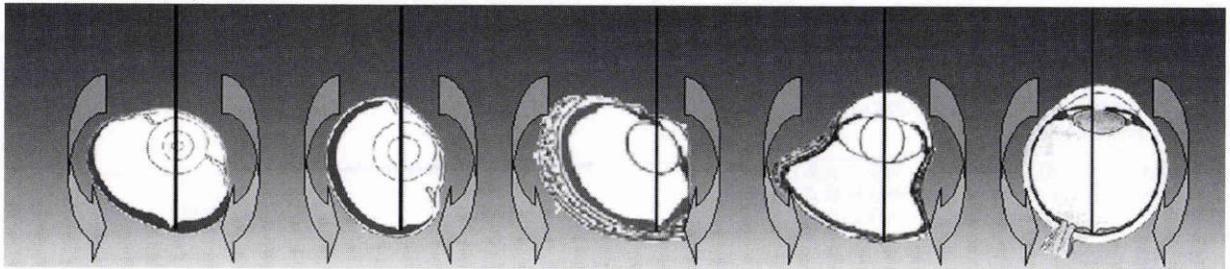


図 42 顔を正面に向けるシステムによる黄斑と視軸の位置づけ.

顔の正面から抑制がかかることにより、動物によって眼の位置がどこにあろうと、顔の反対側に自動的に黄斑の位置が決定される。(眼の図は Duke-Elder: System of Ophthalmology Vol. I(Henry Kimpton, Saunders) より許可を得て改変転載)

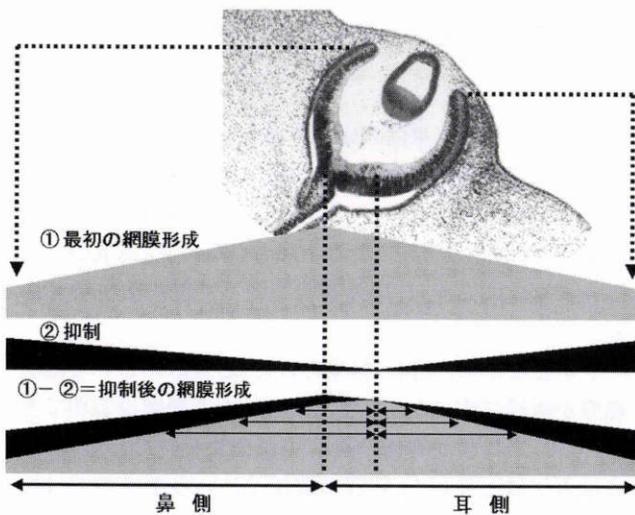


図 43 顔の正面からの抑制が網膜の発育に影響する思考実験.

初期に網膜はすでに前後方向で発生に差があるが、耳側と鼻側で差はない。これを①の厚さで表す。ここに顔の正面から、眼球にとっては斜めから②の抑制がかかる。①から②を削ると、最終的な網膜の発育になり、黄斑の場所が最も高くなる。抑制によって、黄斑より耳側の網膜の発育・細胞密度は急速に削られ、黄斑から鼻側の削られ方はなだらかになる。この等高線をとれば耳側が短く鼻側が長くなり、逆にみれば視野の等高線に他ならない。(眼球は胎齢 5 週人眼)

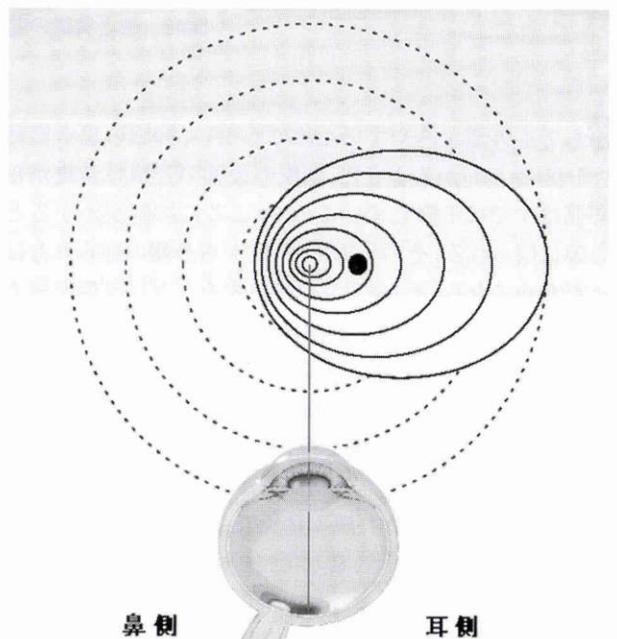


図 44 視野の成り立ち.

我々の視野の形は visual streak に応じて縦より横が長い、図 35 と比べればわかるように、網膜の発育・細胞密度は黄斑より耳側に比べて鼻側の方が高くなり、これに対応して視野は耳側が広がる。もし、進化において最高の視覚を得たのなら、視野は耳側感度を半径とした同心円(点線)となっていたであろう。

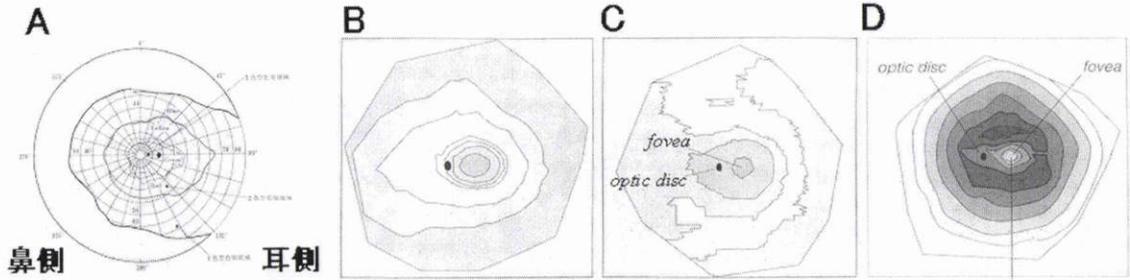


図 45 色視野と網膜神経節細胞・錐体細胞細胞の分布。

A: 色覚別に測定された視野の形. B: 網膜神経節細胞の分布. C: 錐体細胞細胞の分布. D: 杆体細胞の分布. 杆体細胞 (D) は異なるが, A, B, C いずれも, 網膜発育の差 (図 43) や視野の形 (図 44) に一致している. (A は太田安雄・清水金郎: 色覚と色覚異常 (金原出版), B, C, D は Rodieck RW: The First Step of Seeing (Sinauer) より, 許可を得て転載)

|                                |                               |                          |              |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------|
| 多細胞生物出現<br>(10億年前)             |                               | Pax6, Shh などの遺伝子出現       |              |
| カンブリア期<br>(5億3000万年前)          | 眼の出現                          |                          |              |
| 脊椎動物 (原始魚類) の出現<br>(4億8000万年前) | 網膜の表裏逆転<br>網膜層構造の複雑化<br>黄斑の出現 | Pax6に14アミノ酸 (exon 5a) 追加 | 顔の出現         |
| 生物の陸上進出<br>(3億6000万年前)         |                               |                          |              |
| 鳥類の出現<br>(1億5000万年前)           | 鼻側黄斑, 2つの黄斑                   |                          |              |
| 哺乳類の出現<br>(2億3000万年前)          | 黄斑の喪失<br>(visual streak に埋没)  | 赤・緑オプシン (色覚) の喪失         | 視交叉に非交叉線維が発達 |
| 霊長類の出現<br>(5000万年前)            | 黄斑の再現                         | 赤・緑オプシン (色覚) の復元         | 後頭葉視中枢の発達    |

図46 眼と黄斑の進化における主なるできごと。

からでも外側がみやすいためでない. 抑制の思考実験 (図 43) からわかるように, 網膜の最初の形成は黄斑から耳側はすでに下降しているので, ここに抑制がかかると急速に削られる. その一方で, 黄斑から鼻側の削られ方はなだらかになる. そして, この等高線をとれば耳側が短く鼻側が長くなり, これを逆向きにすれば視野の等高線に他ならない. もし, 我々が最高の視覚を得ていれば, 視野は耳側感度を半径とした同心円となり, 鼻側も広がって, 今より優れた両眼視を獲得していたであろう. しかし, 眼球の斜め方向から抑制がかかっている以上, これもかなわぬことであった. 我々は視野においては, 広い耳側の網膜を使うことを放棄して, 狭い鼻側を使うしかなかったのである. このように, 今回の説は, 黄斑の位置づけや視軸, ガンマ角だけでなく, 視野の成立までも一元的に説明することができる.

この網膜の発育の差は, 通常の視野ばかりか色覚別に測定された視野の形, 網膜錐体細胞の分布とも一致している (図 45)<sup>(63)(33)(40)</sup>. さらに, 神経節細胞の分布もこれに一致している<sup>(33)(40)</sup>. 後極網膜では, 錐体から神経節細胞までがほぼ 1:1 に連結しており<sup>(33)(40)</sup>, Pax6 や Shh は初期に

このネットワーク単位の分布や密度を決めているのであろう. Pax6 や Shh を電気穿孔法で鶏胚に導入すると, 網膜の厚みや面積が変わっても層構造が比較的保たれていたが, これはその機転によると思われる. 細胞構成がどのように変化するかは, 培養細胞を使って現在検討中である.

しかしながら, 今回の結果だけでは, 黄斑において網膜細胞が極端に密になって感度が高くなる機構は説明できない. ここに, 何か特別の遺伝子が必要なのだろうか. 著者は否定はしないが, 特別の遺伝子はいらないのではないかと考えるようになった. 組織的に差がみられない鳥の 2つの黄斑が (図 12)<sup>(21)(31)</sup>, 顔の正面と水晶体の別々の場所から抑制を受けて作られるのなら, Pax6 や Shh に関連する網膜の中の割と平凡な遺伝子やその iso-form, あるいは co-factor が関与している程度かも知れない. 何よりも, 鶏胚実験で示したように, Pax6 だけでも大変な網膜形成能をもっているのである. これを硝子体腔へ伸ばさず, 網膜内の 1 極に集中させるシステムが黄斑を作るのであって, これを捜すことが今後の重要な課題である.

## おわりに

黄斑の進化は、それに先立つ網膜の表裏逆転、色覚の喪失と再現など、数々の試練と幸運を経てようやく現在に至ったものであり、その道のりは決して平坦ではなかった(図46)。我々の黄斑は、視覚からみても万物の霊長と自惚れるほど完全ではない。そしてこれは、安易に手を加えるべきでなく、次代へ継承しなければならない大切なものである。

黄斑の形成には、Pax 6による初期網膜の運命決定と、これを制御する3つの機転、① visual streak, ② 水晶体からの抑制, ③ 顔面からの抑制が関わっていることが明らかになった。そして、これによって、黄斑の位置づけとともに、視軸やガンマ角、視野の成り立ち、網膜と眼球の耳側での発育をも説明することができることがわかった。これら、我々の視覚を構成する重要な要素の成立には統一理論があったのである。それは、顔を正面に向けるという、わかってしまえば当たり前なほど単純なシステムであった。

しかし、黄斑は中心視のレセプターに過ぎない。中枢への投射機構を明らかにすることは、さらに重要な課題である。哺乳類に至って、視交叉において非交叉線維が出現し、後頭葉視中枢が発達した。これらにおいても、きわめて単純で強力な成立システムがあるに相違ない。これが明らかになれば、我々の視覚成立を分子の言葉で解釈する真の視覚の統一理論が完成することが期待される。我々の中心視の起源と意義が理解できるとともに、光を失った人々に、光覚だけでなく形態覚をも甦らせる治療へ通ずることになるであろう。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与您にいただきました日本眼科学会の方々、座長を務めていただいた三宅養三名古屋大学教授、ご推薦いただいた小口芳久慶應義塾大学教授に感謝いたします。今回の研究は、厚生省網膜脈絡膜萎縮班で本田孔士班長、松井瑞夫、宇山昌延黄斑分科会長のご指導に始まり、多くの共同研究者の方々(本稿タイトルページに記載)にご協力いただきました。オブシン遺伝子は発見者Dr. Jeremy Nathansから供与を受けました。そして、多くの図や写真の使用について、出版社や著者の方々(各図説明に記載)から許可をいただきました。これらの方々(心から御礼申し上げます。最後に、本研究に至るまでお導き下さいました故植村恭夫慶應義塾大学名誉教授に心から感謝申し上げます。

## 文 献

1) Orth DH, Fine BS, Fagman W, Quirk TC: Clarification of foveomacular nomenclature and grid for quantitation of macular disorders. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 83:506—514, 1977.

2) Duke-Elder S: The eye in evolution. In *System of Ophthalmology*. Vol. I, Henry Kimpton, London, 1958.

3) Darwin C: On the Origin of Species by Means of Natural Selection. (訳書: チャールズ・ダーウィン著・堀伸夫, 他訳: 種の起源. 槇書店, 東京, 1988; Leakey R 編・吉岡晶子訳, 東京書籍, 東京, 1997).

4) 河合清三: いくつもの目—動物の光センサー. 講談社, 東京, 1984.

5) Salvini-Plawen Lv, Mayr E: On the evolution of photoreceptors and eyes. *Evol Biol* 10: 207—263, 1961.

6) Ton CTT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, et al: Positional cloning and characterization of a paired box-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67: 1059—1074, 1991.

7) Glaser T, Walton DS, Maas RL: Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutation in the human PAX 6 gene. *Nature Genet* 1: 232—238, 1992.

8) Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA, Saunders GF: Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 54: 801—811, 1994.

9) Azuma N, Yamada M: Missense mutation in the PAX 6 gene in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2524—2528, 1998.

10) Negishi K, Azuma N, Yamada M: Various phenotypic expressions of familial aniridia with a PAX 6 mutation. *Br J Ophthalmol* 83: 991—992, 1999.

11) Qiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ: Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 265: 785—789, 1994.

12) Halder G, Callaerts, Gehring WJ: Induction of ectopic eye by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788—1792, 1995.

13) Boop D, Burri M, Baumgartner S, Frigerito G, Noll M: Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47: 1033—1040, 1986.

14) Xu W, Rould MA, Jun S, Despan C, Pabo CO: Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 25 Å resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell* 80: 639—650, 1995.

15) Lewis EB: A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565—570, 1978.

16) McGinnis W, Krumlauf R: Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283—302, 1992.

17) Gehring WJ: The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes to Cells* 1: 11—15, 1996.

- 18) **Gehring WJ, Ikeo K** : Pax 6 mastering eye morphogenesis and eye evolution. *TIG* 15 : 371—377, 1999.
- 19) **Callaerts P, Munoz-Marmol AM, Glardon S, Castillo E, Sun H, Li WH, et al** : Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia (G) tigenia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 558—563, 1999.
- 20) **Zhang Y, Emmons SW** : Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue. *Nature* 337 : 55—59, 1995.
- 21) **Azuma N, Nishina S, Okuyama T, Yanagisawa H, Yamada M** : PAX 6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nature Genet* 13 : 141—142, 1996.
- 22) **Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, Azuma N** : PAX 6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* 83 : 723—727, 1999.
- 23) **Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL** : Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91 : 531—541, 1997.
- 24) **Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Plodor L, et al** : Ocular retardation mouse caused by Chx 10 homeobox null allele : impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nature Genet* 12 : 376—384, 1996.
- 25) **NHK 取材班** : 生命 40 億年をはるかな旅. NHK 出版, 東京, 1994.
- 26) **Palmer D** (小島郁生・五十嵐友子・訳) : 生命 30 億年の進化史. Newton Press, 東京, 2000.
- 27) **Duve Cd** (植田充実・訳) : 生命の塵—宇宙の必然としての生命. 翔泳社, 東京, 1996.
- 28) **Gould SJ** (渡辺政隆・訳) : ワンダフルライフ—バージェス頁岩と生物進化の物語. 早川書房, 東京, 1993.
- 29) **宮田 隆** : 眼が語る生物進化. 岩波書店, 東京, 1994.
- 30) **宮田 隆** : DNA からみた生物の爆発的進化. 岩波書店, 東京, 1998.
- 31) **Nalbach HO, Wolf-Oberhollenzer F, Remy M** : Exploring the image. In : Zeiger HP, Boschof HJ (eds) *Vision, Brain, and Behavior in Birds*. MIT Press, Cambridge, 25—46, 1993.
- 32) **Hughes A** : The topography of vision in mammals of contrasting life style : Comparative optics and retinal organization. In : Crescitelli (ed) *Handbook of Sensory Physiology VII/5*. Springer-Verlag 613—756, 1977.
- 33) **Rodieck RW** : *The First Step of Seeing*. Sinauer, Sunderland, 1998.
- 34) **大野 乾** : 続・大いなる仮説—5.4 億年前の進化のビッグバン. 羊土社, 東京, 93—109, 1996.
- 35) **Chiu MI, Wang DJ, Nathans J** : Murine and bovine cone pigment genes : cloning and characterization of two new members of the S family of visual pigments. *Genomics* 21 : 440—443, 1994.
- 36) **Nathans J, Thomas D, Hogness DS** : Molecular genetics of human color vision : The genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232 : 193—202, 1986.
- 37) **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al** : *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 9. 0. 1—9. 5. 5, 9. 6. 1—9. 6. 9, 1990.
- 38) **Penfold PL, Provis JM** : Cell death in the developing of the human retina : phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224 : 549—553, 1986.
- 39) **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA** : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493—501, 1992.
- 40) **Oyster CW** : *The Human Eye*. Sinauer, Sunderland, 1999.
- 41) **Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, et al** : Influence of PAX 6 gene dosage on development : overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86 : 71—82, 1996.
- 42) **Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umehara K, Yasuda K** : Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41 : 335—344, 1999.
- 43) **Itasaki N, Bel-Vialar S, Krumlauf R** : 'Shocking' developments in chick embryology : electroporation and in ovo gene expression. *Nature Cell Biol* 1 : E 203—207, 1999.
- 44) **Epstein JA, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas RL** : Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269 : 8355—8361, 1994.
- 45) **Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL** : Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax 6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8 : 2022—2034, 1994.
- 46) **Yamaguchi Y, Sawada J, Yamada M, Handa H, Azuma N** : Autoregulation of Pax 6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. *Genes to Cells* 2 : 255—262, 1997.
- 47) **Walther C, Gruss P** : Pax 6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113 : 1435—1449, 1991.
- 48) **Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M** : Missense mutation in the alternative splice region of the PAX 6 gene in

- eye anomalies. *Am J Hum Genetics* 65 : 656—663, 1999.
- 49) **Duke-Elder S** : Embryology. In *System of Ophthalmology*. Vol. III part I, Henry Kimpton, London, 1958.
- 50) **Ozanic V, Jakobiec FA** : Prenatal development of the eye and its adnexa. In : Duane TD, Jaeger EA (eds) *Biomedical Foundation of Ophthalmology Vol 1*. Harper & Row, Philadelphia, 1985.
- 51) **Xu PX, Woo I, Her H, Beier D, Maas RL** : Mouse Eya homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax 6 for expression in lens and nasal placode. *Development* 124 : 219—231, 1997.
- 52) **Koshiha-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, Momose T, Uno K, Hoepker V, et al** : Tbx 5 and the retinotectum projection. *Science* 287 : 134—137, 2000.
- 53) **Yuasa J, Hirano S, Yamagata M, Noda M** : Visual projection map specified by topographic expression of transcription factors in the retina. *Nature* 382 : 632—634, 1996.
- 54) **Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, et al** : Mutation of the PAX 2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature Genet* 9 : 358—363, 1995.
- 55) **McKusick** : Mendelian Inheritance in Man. Nos. 236100, 157170, 142945, 142946. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.
- 56) **Roessler E, Bellon E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al** : Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature Genet* 14 : 357—360, 1996.
- 57) **Ming JE, Muenke M** : Holoprosencephaly : from Homer to Hedgrhog. *Clin Genet* 53 : 155—163, 1998.
- 58) **Marti E, Takada R, Bumcrot DA, Sasaki H, McMahon AP** : Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121 : 2537—2547, 1995.
- 59) **Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola I, Wilson SW** : Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121 : 3267—3278, 1995.
- 60) **Jensen AM, Wallace VA** : Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124 : 363—371, 1997.
- 61) **Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G** : Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187 : 25—35, 1997.
- 62) **Hu D, Helms JA** : The role of Sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* 126 : 4873—4884, 1999.