

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650243

研究課題名(和文)種差に起因する疾患発症の遺伝様式メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanism underlying the genetic modes of species-specific phenotypic differences

研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト/マウスとラット間に存在する白内障発症責任遺伝子Mipの変異による病態発症の遺伝様式の種差を実証するため、新たなMip変異マウスおよびラットを樹立し、表現型を解析し、以下の主要な結果を得た。1) MIP欠損ラットKFRS4と類似したMip変異をもつモデルマウスをゲノム編集により作製・解析した結果、変異マウスはラットとは異なり、優性の白内障発症が認められた。また、2) ENUにより2系統のMipミスセンス変異ラットを樹立・解析した結果、両ENU変異ラットのヘテロ個体においては白内障発症が確認できなかった。これらの結果から、Mip変異によるラットの白内障発症は厳密に劣性遺伝するものと予想された。

研究成果の概要(英文)： Although cataract formation caused by major intrinsic protein of lens fiber (Mip) mutations in humans and mice has a dominant mode of inheritance, cataractogenesis in a rat model KFRS4, which has a 5-bp insertion in Mip that truncates the protein, is recessively inherited. To confirm the species-specific differences in the genetic mode of cataractogenesis between humans/mice and rats, we generated new mouse and rat Mip mutants and analyzed their lens phenotypes. First, we created mouse mutants with mutations similar to that in the KFRS4 rat by performing genome editing using CRISPR/Cas9. The heterozygous Mip mutants exhibited severe lens opacity. Next, we screened an ENU mutagenesis library for novel rat Mip mutations and identified two missense mutations located at sites analogous to known mutation sites in human patients. In phenotypic analyses of the lenses, no lens opacity was observed in the rats heterozygous for either Mip mutation.

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：総合領域

キーワード：育種遺伝 遺伝学 ゲノム 種差 遺伝様式 Mip 白内障モデルラット 白内障モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

我々は最近ポジショナルクローニングによって新規白内障ラット KFRS4 (Kyoto Fancy Rat Stock 4) の病態発症が、水晶体特異的な水チャンネルタンパク質であるアクアポリン0をコードする *Mip* (major intrinsic protein of eye lens fiber) に存在する 5-bp 挿入変異であることを明らかにした。これまで *Mip* 突然変異による白内障は数多く報告されており (Chepelinsky *Handb Exp Pharmacol* 2009)、KFRS4 は *Mip* に突然変異をもつ初めてのラットモデルであった。加えて、KFRS4 の白内障はこれまで同定されたヒト・マウスが優性遺伝するのに対し、その病態発症は劣性遺伝することが明らかとなった。当初、我々は KFRS4 に生じた突然変異の部位および挿入変異により 3 つの膜貫通ドメインを含めた C 末端側の欠損が KFRS4 の白内障発症が劣性遺伝する原因であると考えた。これまで *Mip* 遺伝子にはヒトおよびマウスにおいては白内障発症の原因となる様々な突然変異が報告されているが、KFRS4 の突然変異が最も MIP タンパク質の大きな構造変化をもたらす。また、他の突然変異による優性遺伝は優性ネガティブ効果によって説明することができ、すなわちこれまで報告されたヒト・マウスの白内障は異常 MIP タンパク質が正常 MIP タンパク質と結合することで優性遺伝し、KFRS4 ラットは C 末端欠損により正常 MIP タンパク質との結合能が失われたことで劣性遺伝すると仮定することができた。ところが、*Mip* ノックアウトマウスの白内障は優性遺伝することが報告されており (Shiels *et al. Physiol Genet* 2001)、我々の仮説は否定された。一方、KFRS4 は研究分担者の庫本らがアメリカの愛玩用ラットから樹立した系統である (Kuramoto *et al. Exp Anim* 2010)。従ってこの独特な遺伝的背景が白内障発症の遺伝様式に影響をもたらす可能性が考えられたことから、複数の近交系ラットとの交配実験を行った。その結果、KFRS4 の突然変異による白内障発症は厳密に劣性遺伝することが示され、KFRS4 突然変異をヘテロにもつ個体では白内障発症はいまだ確認されていない。これらの結果から我々はラットそのものの遺伝的背景に *Mip* 突然変異による白内障発症を劣性遺伝に導く原因があるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は (1) 詳細な表現型解析、遺伝子発現解析および交配実験により、KFRS4 ラットの白内障発症の劣性遺伝を実証し、次に、(2) KFRS4 突然変異をマウスに導入したマウス変異体の作製および白内障発症の遺伝様式の検証し、さらに (3) ENU ラットミュータントライブラリーから *Mip* に点突然変異をもつ個体を単離し、白内障発症の遺伝様式を検証することにより「種差」に起因した遺伝様式の差異の存在を実証するものである。

3. 研究の方法

(1) 表現型解析、遺伝子発現解析および交配実験による KFRS4 ラットの白内障発症の劣性遺伝を実証

表現型解析

表現型解析は、経時的な散瞳剤点眼による外部形態観察、眼球摘出後の暗視野顕微鏡観察、および眼球の組織切片作製により行った。

遺伝子・タンパク質発現解析

RNA レベルでの遺伝子発現解析は、野生型 (+/+), KFRS4/+ヘテロおよび KFRS4/KFRS4 ホモ個体からの眼球から抽出した RNA を cDNA 合成し、リアルタイム定量的 RT-PCR (qRT-PCR) により *Mip* の発現量を定量することにより行った。

一方、タンパク質レベルでの遺伝子発現解析は、+/+、KFRS4/+ヘテロおよび KFRS4/KFRS4 ホモ個体からの眼球から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析および蛍光免疫組織染色により行った。解析に用いた抗体は市販の MIP タンパク質の C 末端側を認識する抗体と、本研究で新たに作製した MIP の N 末端側を認識する抗体を使用した。また、遺伝子型が異なるラット間の発現定量のための内部標準は N-カドヘリンおよび β -カテニンを用いた。

交配実験

KFRS4 ラットは DOB/Oda, BN/CelCrlj および WIAR/Lar の 3 系統とそれぞれ交配し F₁ 個体を作製した。また、DOB/Oda および WIAR/Lar 系統間で作製した F₁ 個体においては KFRS4 ラットを交配し、戻し交配個体を作製した。作製した F₁ および戻し交配個体は前述した方法で表現型解析を実施した。

(2) KFRS4 突然変異を導入したマウス変異体の作製および白内障発症の遺伝様式の検証

KFRS4 突然変異を導入した *Mip* 変異マウスの作製は CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集により実施し、マウス *Mip* 遺伝子のコーディング配列の 368-390 bp を標的として合成したガイド RNA (sgRNA) と Cas9 mRNA を C57BL/6J マウスの前核期卵の前核へマイクロインジェクションすることにより産仔を得た。得られた産仔はサーベイヤーPCRにより変異導入を確認し、サンガーシーケンシングにより変異部位を検証した。変異が認められた個体については、水晶体の表現型を解析した。

(3) ENU ラットミュータントライブラリーからの *Mip* 点突然変異個体の単離および白内障発症の遺伝様式の検証

ENU ラットミュータントライブラリーからの *Mip* 点突然変異個体の単離は、MuT-POWER 法による全エクソン領域の変異探索により実施し、得られたサンプルについては、サンガーシーケンシングにより変異導入を検証した。変異導入が確認された DNA

由来の凍結保存精子から顕微授精法 (ICSI) により個体を作製した。得られた個体は F344 系統との交配により系統化し、表現型解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 表現型解析、遺伝子発現解析および交配実験による KFRS4 ラットの白内障発症の劣性遺伝を実証

表現型解析

KFRS4 ラットの白内障発症の病理学的特徴を明らかにするため、散瞳剤点眼により水晶体の混濁度を経時的に調査した。その結果、KFRS4/KFRS4 ホモ個体においては、生後 1 ヶ月齢で明確な白内障の発症を確認できたが、KFRS4/+ヘテロ個体においては、生後 11 ヶ月齢を超えても水晶体の混濁は認められず、同様の表現型が眼球の暗視野顕微鏡下の観察結果からも得られた。また、胎生 15.5 日齢～生後 5 ヶ月齢の間で経時的に水晶体の組織切片を作製し、病理学的観察を実施した結果、KFRS4/KFRS4 ホモ個体は、胎生 15.5 日齢において既に水晶体核領域の水晶体繊維細胞の組織の崩壊の兆候が認められ、その変性は水晶体形成過程でより明確に観察され、生後 4 週齢では水晶体繊維細胞の肥大および水晶体の空胞が検出され、さらに 9 週齢においては、線維細胞が水晶体上皮および赤道部において残存しているものの、核領域では完全に崩壊し、巨大な空胞も観察された (図 1A)。一方、KFRS4/+ヘテロ個体における水晶体の組織構造は厳密に維持されており、図 1B には 17 週齢の KFRS4/+ヘテロ個体においては、線維細胞の変性は認められず、+/+ラットとほぼ同様の形態を示し、これらの結果から *Mip* 突然変異による KFRS4 ラットの白内障発症は厳密に劣性遺伝するものと考えられた。

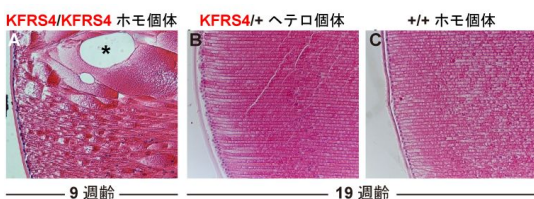


図 1. *Mip* 変異をもつ KFRS4 ラットの KFRS4/KFRS4 ホモ (A)、KFRS4/+ヘテロ (B)、および野生型 (+/+, C) の水晶体組織像の比較。KFRS4/KFRS4 ホモ個体においては水晶体線維細胞の崩壊および空胞化 (*) が認められたが (A)、ヘテロ個体の水晶体は正常に組織されており (B)、野生型 (C) と類似した表現型を示した。

遺伝子・タンパク質発現解析

Mip における KFRS4 変異は、*Mip* 第 2 エクソンの末端部に AACAC の 5 bp の挿入変異であり、この変異は MIP タンパク質の 2 つ目の膜外ドメインに存在しており、AQP0 タンパク質の 127 番目のアミノ酸残基が終止コドンになるフレームシフト変異である。この変異からは、C 末端側を欠損した欠損型異常タンパク質が発現することによる MIP 機能低下、または、終止コドン出現によるナンセンス変異依存的 RNA 分解による MIP 機能欠損が予

想された。そこで qRT-PCR によって +/+、KFRS4/+ヘテロおよび KFRS4/KFRS4 ホモ個体間の *Mip* の発現量においては、図 2A に示すような +/+、KFRS4/+ヘテロおよび KFRS4/KFRS4 ホモ個体における段階的な発現減少が検出され、野生型と比べ、F₁ では約 50%、KFRS4 では 10%以下に *Mip* の発現量が減少していた。

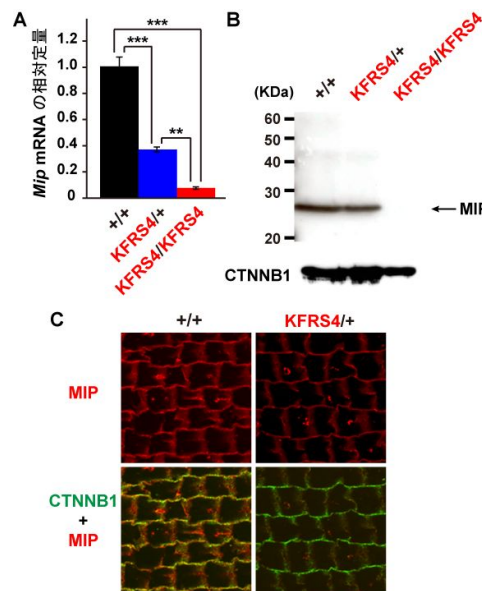


図 2. KFRS4/KFRS4 ホモ、KFRS4/+ヘテロ、および野生型ラット間の *Mip* mRNA および MIP 蛋白質の発現量比較 (B-D)。図 B は *Mip* mRNA の発現量、図 C はウェスタンブロットによる MIP 蛋白質の発現量、および図 D は水晶体における MIP の免疫組織染色像を示している。

一方、KFRS4 変異による MIP のタンパク質レベルでの発現変動を調査するため、MIP の C 末端を認識する抗体を用いたウェスタンブロットによる発現解析を行った結果、+/+および KFRS4/+ヘテロ個体においては、図 2B に示すような 28-kDa 付近に MIP のバンドが認められたのに対し、KFRS4/KFRS4 ホモ個体においてはそのバンドが欠損していた。また、同様の解析を MIP の N 末端を認識する抗体を用いて行った結果においても KFRS4/KFRS4 ホモ個体においてバンドが欠損しており、さらに、両抗体により検出した KFRS4/+ヘテロ個体のバンドを定量した結果、野生型と比べ、その発現量は約半分程度に減少していた。加えて、免疫組織染色により水晶体における MIP の発現を野生型、KFRS4/+ヘテロおよび KFRS4/KFRS4 ホモ個体間で比較した結果、野生型および KFRS4/+ヘテロ個体においては水晶体線維特異的なシグナルが検出されたが、KFRS4/+ヘテロ個体においては発現減少が認められ (図 2C)、KFRS4/KFRS4 ホモ個体において MIP の発現を示すシグナルは検出されなかった。これらの結果から KFRS4 ラットの白内障発症は、異常な AQP0 タンパク質の翻訳による機能欠失が原因ではなく、KFRS4 変異に依存するナンセンス RNA 分解が生じ、AQP0 が欠損することに起因すると推察され、以上の結果は *PLoS One* 誌 (Watanabe *et al.* 2012) に報告した。

また、1 の背景にも前述したように、MIP 欠損の *Mip* ノックアウト (KO) マウスが報告されており (Shiels *et al. Physiol Genomics* 2001)、この KO マウスは KFRS4 ラット同様に核白内障を発症するが、*Mip*^{+/-}ヘテロ個体においてもハプロ不全によりやや軽度化した水晶体混濁が検出される。また、ヒトにおいても KFRS4 ラットと極めて類似したナンセンス変異依存的 RNA 分解に起因する白内障患者が報告され、この患者の白内障発症も優性変異であった (Yu *et al. BMC Med Genet* 2014)。これらの報告と本研究の結果を統合すると、ヒト/マウスとラット間は MIP 欠損変異においては白内障発症の遺伝様式に種差が存在することが強く示唆された。

(2) KFRS4 突然変異を導入したマウス変異体の作製および白内障発症の遺伝様式の検証

KFRS4 および前述したヒト白内障患者と同様 (類似) の変異をもつ *Mip* マウス変異体を作製するため、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集による変異導入を試みた。マイクロインジェクションの結果、22 頭の産仔が得られ、そのうちの 18 頭で変異導入が確認された。そのうちの 2 個体は 7 塩基 (c.330_336del7) および 22 塩基 (c.314_335del22) の欠失変異をもち、KFRS4 およびヒト患者と同様に MIP タンパク質の 2 つ目の膜外ドメインの C 末端側を欠損する変異であった (図 3)。そこで、このマウスの表現型を解析した結果、軽度ではあるが、12 週齢の *Mip* 変異/+ヘテロ個体において水晶体の混濁が認められた (図 4)。現在詳細な表現型解析および発現解析によって解明を進めているが、この *Mip* 変異/+ヘテロマウスはハプロ不全によって優性の白内障を発症したものと推察され、ラットとは異なる白内障発症の遺伝様式を示した。

A	101	130
ヒト (野生型)	AAVLYSVTPP	AVRGNLALNT LHPAVSVGQA
マウス (野生型)AG.....
ラット (野生型)AG.....
ヒト (Arg123X)	AAVLYSVTPP	AV*
マウス (Ala111GlufsX3)	AAVLYSVTPP	EET*
マウス (Ala105SerfsX4)	AAVLSEET*	
ラット (Leu121ThrfsX6)	AAVLYSVTPP	AVRGNLALNT TRCMLG*

図 3. 種間における野生型および変異 MIP 蛋白質の配列比較。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により樹立したマウスはヒト白内障患者および KFRS4 ラットと類似した変異をもつ。

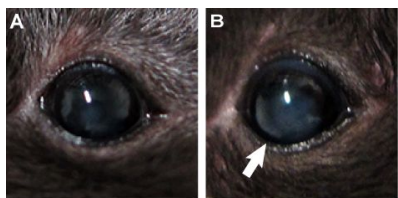


図 4. 野生型マウス (A) と CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集により作製した *Mip* 変異ヘテロマウス (+/Ala111GlufsX3) の水晶体の外部観察像。矢印は水晶体の混濁部位を示している。

(3) ENU ラットミュータントライブラリーからの *Mip* 点突然変異個体の単離および白内

障発症の遺伝様式の検証

これまでヒト 7 家系において連鎖解析で裏打ちされた *MIP* ミスセンス変異が報告されており (Berry *et al. Nat Genet* 2000, Gu *et al. Mol Vis* 2007, Lin *et al. Mol Vis* 2007, Wang *et al. Mol Vis* 2010, 2011, Yang *et al. Mol Vis* 2011)、また、マウスにおいても古典的な変異体である Lens Opacity (*Lop*) が *Mip* におけるミスセンス変異により白内障を発症し (Shiels & Bassnett *Nat Genet* 1996)、また、これらヒト白内障患者および *Lop* マウスは、優性ネガティブまたは機能獲得により優性の白内障を発症することが報告されている。そこで本研究においては、点突然変異をもつラット変異体を樹立するため、ENU ラットミュータントライブラリーからの変異探索を実施した。その結果、3 種の *Mip* 変異をもつラットがスクリーニングされ、そのうちの 1 系統は 3' 非翻訳領域の変異であったが、他の 2 系統は翻訳領域にミスセンス変異が検出された。そのミスセンス変異の 1 つは、511 番目のグアニンがシトシンに置換するものであり、この変異によって MIP 蛋白質の 171 番目のアミノ酸であるグリシンがアルギニンに置換していた (p.171Gly>Arg)。また、もう 1 つの変異は 557 番目のチミンがグアニンに置換するものであり、この変異によって 189 番目のフェニルアラニンがバリンに置換していた (p.189Phe>Val)。これらラット p.171Gly>Arg および p.189Phe>Val はいずれも細胞膜ドメインに検出され、ともに優性の白内障を発症するヒト患者と極めて近傍の領域に存在していた (p.177Tyr>Cys および 187Arg>Cys, Yang *et al. Mol Vis* 2011, Wang *et al. Mol Vis* 2011)。そこでこれらのラットの水晶体の表現型を観察した結果、現時点では外部形態観察のみのデータではあるが、図 5 に示すように、両ラット変異体は生後 40 週齢を超えても水晶体の透明性が維持されていた。この結果から、ヒト/マウスとラット間の *Mip* 変異による白内障発症は、ミスセンス変異においても病態発症に種差を示すことが確認された。

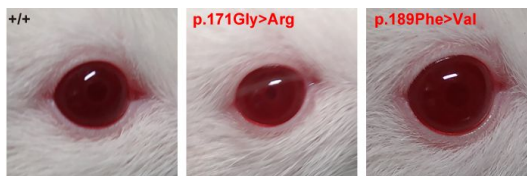


図 5. 野生型 (+/+) ラットと ENU ラットミュータントライブラリーから単離した *Mip* 変異 p.171Gly>Arg および p.189Phe>Val をもつラットの水晶体の表現型比較。

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 1 件)

Watanabe K[#], Wada K[#], Ohashi T, Okubo S, Takekuma K, Hashizume R, Hayashi JI, Serikawa T, Kuramoto T and Kikkawa Y: A

5-bp insertion in *Mip* causes recessive congenital cataract in KFRS4/Kyo rats. PLoS One, 7, e50737, 2012. #共同筆頭著者. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0050737.

〔学会発表〕(計 4 件)

渡部 桂 他：愛玩ラット由来近交系 KFRS4 ラットの白内障の遺伝様式についての検証. 第 10 回北海道実験動物研究会 学術集会. 2013. 7. 13, ニセコいこいの村
Watanabe K *et al.* A 5-bp insertion in *Mip* gene causes recessive congenital cataract in a Kyoto Fancy Rat Stock, *kfrs4*. 26th International Mammalian Genome Conference. October 22, 2012, Florida, USA
渡部 桂 他：*Mip*^{*kfrs4*}における発現および表現型解析. 第 26 回モロシヌス研究会. 2012. 6. 15, 東京大学弥生講堂 一条ホール
渡部 桂 他：*Mip*^{*kfrs4*}突然変異におけるラット白内障発症の遺伝様式の検証. 日本実験動物科学・技術九州 2012 (第 59 回日本実験動物学会総会, 第 46 回日本実験動物技術者協会総会). 2012. 5. 25, 別府国際コンベンションセンター

〔その他〕

ホームページ：<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

本研究課題に関する受賞：Young Scientist Awards (研究協力者・渡部 桂), 26th International Mammalian Genome Conference. October 25, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号：20280787

(2)研究分担者

庫本 高志 (KURAMOTO, Takashi)
京都大学・医学(系)研究科(医学院)・准教授
研究者番号：20311409

和田 健太 (WADA, Kenta)
東京農業大学・生物産業学部・助教
研究者番号：20508113

多屋 長治 (TAYA, Choji)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・動物実験開発室室長
研究者番号：90175456

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

渡部 桂 (WATANABE, Kei)
筑波大学・生命環境科学研究科・博士後期課程