

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462712

研究課題名(和文) 杆体一色覚に関連した錐体cGMP依存性チャネルの変異解析と機能回復の研究

研究課題名(英文) Analysis of structure-function relationships of rod monochromacy-associated missense mutations in the CNGA3 subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel.

研究代表者

村木 早苗 (Muraki, Sanae)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：90335175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：錐体サイクリックヌクレオチド依存性チャネル 鎖の変異は杆体一色覚をもたらすが、ミスセンス変異は約90知られており構造-機能相関を探るよいモデルと考えられた。ミスセンス変異を持った 鎖を恒常的に発現する細胞を樹立し、カルシウムセンサーを用いた機能解析を行った。機能(+)の変異に関してはパッチクランプ法で詳細な解析を行い、一方、機能(-)の変異に関しては低温培養によるチャネル機能のレスキューを検討した。いくつかの変異チャネルはレスキュー可能であることが明らかになったが、この効果は、細胞膜タンパク質の標識と、変異 鎖の標識とを組合わせて調べた結果、細胞内トラフィッキングの改善によることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the subunit of cone cyclic nucleotide-gated channel cause rod monochromacy. About 90 missense mutations are known in the subunit, and they are thought to be useful for elucidation of structure-function relationships in the subunit. HEK293 cells that constitutively express subunit with a missense mutation were established, and function of the mutant channel was assessed by using a Ca²⁺-sensor. With regard to function (+) channels, their function was studied in detail by using the patch-clamp technique. With regard to function (-) channels, it was examined whether culture of the cells at low temperature (28 °C) could rescue channel function. Some mutant channels showed function by the culture. It was found from the analysis using labeling of cell surface proteins and mutant channels by biotin and HaloTag ligand, respectively, that such a rescue is a consequence of improvement of intracellular trafficking.

研究分野：眼科学

キーワード：杆体1色覚 cGMP依存性カチオンチャネル CNGA3 CNGB3 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

杆体一色覚は、錐体が全く機能していない病態であり、低視力、眼振、羞明などを来す。その責任遺伝子として、現在のところ、CNGA3 (錐体サイクリックヌクレオチド依存性カチオンチャンネル (CNG チャンネル) の鎖の遺伝子)、CNGB3 (同チャンネルの鎖の遺伝子)、GNAT2 (錐体トランスデュースン鎖の遺伝子)、PDE6C (錐体ホスホジエステラーゼ鎖の遺伝子)、PDE6H (同鎖の遺伝子)、および ATF6 (小胞体ストレスに関与する遺伝子) の6種が知られている。杆体一色覚の原因として、遺伝子異常がいくつか見つかっているが、遺伝子異常と機能異常との関連は明らかにされていない点が多い。

2. 研究の目的

CNG チャンネルの鎖は単独でチャンネルを構成できるので機能解析が容易であり、また、そのミスセンス変異は 90 近く報告されている。これらを用いて CNG チャンネル鎖の構造 - 機能相関を探るのが本研究の目的である。ミスセンス変異の中には、細胞膜まで運ばれない、いわゆる細胞内トラフィッキングの障害を示すものが存在する。細胞内トラフィッキングの障害を克服する方法を探るのも本研究の目的である。

3. 研究の方法

ミスセンス変異を持った鎖を恒常的に発現する細胞の樹立

エピゾーム型発現ベクター (pEBMultiNeo) に CNGA3 の cDNA (ミスセンス変異 (-) と (+)) をクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトして、G418 を用いて CNG チャンネル鎖を恒常的に発現する細胞を選択・単離した。

カルシウムセンサー (Fluo 4) を用いた機能解析

前項で樹立した細胞に、Fluo 4-AM を負荷し、1 時間後 8-Br-cGMP (300 μ M) を添加した。cGMP によって活性化されるチャンネルが機能しておれば、細胞内に流入した Ca イオンが Fluo 4 と結合して蛍光が検出されるはずであり、チャンネル機能がない、あるいはチャンネルの細胞膜での発現がない場合には蛍光は検出されない。

蛍光が検出されなかった変異チャンネルは、培養温度を 28 に下げ、蛍光が検出されるかどうかを検討した。

パッチクランプ法を用いた機能解析

チャンネル機能が検出された細胞を用いて、cGMP に対する感受性をパッチクランプ法を用いて検討した。

チャンネル機能レスキュー法の検討

前々項で低温培養でのチャンネル機能レスキュー法を検討したが、これ以外の方法がないか調べた。野生型錐体 CNG チャンネル鎖の共発現、4-フェニル酪酸やトリメチルアミン N オキシド、L-cis-ジルチアゼムの添加などを検討した

⑤ HaloTag ベクターと細胞膜タンパク質のピオチン化を用いた解析

HaloTag ベクター (pFC14A CMV Flexi vector) に CNGA3 の cDNA (ミスセンス変異 (-) と (+)) をクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトし、翌日 HaloTag リガンド (TMR) を添加して培養を続け、その翌日に細胞膜タンパク質をピオチン化した後、細胞を溶解し、アビジンカラムに結合したタンパク質を溶出後 SDS-PAGE で分離し、チャンネルタンパク質を、結合した TMR の蛍光で検出した。

新規に報告されたミスセンス変異のパッチクランプ法による解析

本研究の遂行中に新しく 15 種の CNGA3 のミスセンス変異が報告されたが、機能的に全く解析されていなかったため、変異が入った cDNA を GFP ベクターにクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトしてパッチクランプ法で解析した。

日本人杆体一色覚における責任遺伝子の解析

日本人の杆体一色覚で報告されたミスセンス変異は、これまでのところ CNGA3 の L633P と CNGB3 の D633G だけである。今回、新たな日本人の杆体一色覚患者について、ATF6 以外の 5 種の責任遺伝子を調べた。

4. 研究成果

ミスセンス変異を持った鎖を恒常的に発現する細胞の樹立

この時点で報告されていたミスセンス変異 68 種のすべてを作成できた。

カルシウムセンサー (Fluo 4) を用いた機能解析

蛍光が検出されたチャンネルは 19 種であった。蛍光が検出されなかった変異チャンネルは、培養温度を 28 に下げ、蛍光が検出されるかどうかを検討した。結果をまとめると次のようになった。

蛍光 (+) (=チャンネル機能 (+)): 19 種
P95L、E228K、T245M、V266M、T369S、M406T、R427C、A469T、N471S、D485V、V529M、V540I、G557R、R563C、T565M、E590K、E593K、A619V、L633P

蛍光 (-) 28 培養で蛍光 (+): 7 種
F249S、R283Q、T291R、S401P、R439W、F547L、R563H

パッチクランプ法を用いた機能解析

感受性が低下していたもの (30 μ M 以上):
T291R、T369S、G557R、T565M

感受性が亢進していたもの (3 μ M 以下):
D485V、E590K、E593K

感受性が低下していたものでは、*in vivo* の錐体において、cGMP 濃度が上昇してもチャンネルが開いていない可能性があり、感受性が亢進していたものでは、cGMP 濃度が低下してもチャンネルが閉じない可能性があり、いずれの場合も、十分な錐体機能が発揮できないものと考えられた。T291R は、細胞内トラフィ

ッキングの障害に加えてチャネル機能の障害もあることが示唆された。

チャネル機能レスキュー法の検討

R563H が野生型錐体 CNG チャネル 鎖の共発現で機能レスキューされた以外は無効であった。

⑤ HaloTag ベクターと細胞膜タンパク質のビオチン化を用いた解析

野生型のみならず、どの変異体においても、28 の培養では、37 の培養と比較して細胞膜画分へ移行するチャネルタンパク質の量が増えていた。従って、28 の培養でもチャネル機能が検出できない場合は、チャネル機能が損なわれている、すなわち、機能喪失型の変異であるといえる。しかし、細胞内トラフィッキングの障害がこれに加わっているかどうかについては不明なままである。

新規に報告されたミスセンス変異のパッチクランプ法による解析

解析の結果、

チャネル機能 (+): T247M、R436Q

28 での培養でチャネル機能(+): R223Q、T224I、S334F

であった。

残る 10 種は機能喪失型変異と考えられた。

日本人杆体一色覚における責任遺伝子の解析

CNGA3 の M424V の変異とコドン 333 における 2 塩基欠失 (GAC における GA の欠失) の複合ヘテロ接合体であることが判明した。いずれの変異とも新規なものであった。他の 4 種の責任遺伝子には変異は見られなかった。

M424V のミスセンス変異はパッチクランプ法を用いて機能解析した。37 では殆どチャネル機能が検出されなかったが、28 での培養ではわずかに機能が検出された。cGMP に対する感受性を検討したところ、15.6 μM であり、野生型 (11.0 μM) とあまり違わなかった。従って、M424V を持つ 鎖は、ほぼ正常な機能を持つが、殆ど細胞膜に発現されないことが分かった。M424V は細胞内トラフィッキングの障害を引き起こす変異と考えられた。

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 12 件)

1. Kuniyoshi K, Muraki-Oda S, Ueyama H, Toyoda F, Sakuramoto H, Ogita H, Irifune M, Yamamoto S, Nakao A, Tsunoda K, Iwata T, Ohji M, Shimomura Y. Novel mutations in the gene for α -subunit of retinal cone cyclic nucleotide-gated channels in a Japanese patient with congenital achromatopsia. *Jpn J Ophthalmol* 60 : 187-197, 2016 査読有
2. Muraki S, Ueyama H, Tanabe S, Yamade S, Ogita H, Ohji M. Novel mutations in the L visual pigment gene found in Japanese men with protan color-vision defect having a normal order L/M gene array. *Ophthalmic Genet*. 2016, in press. 査読有
3. Higashiyama T, Ichiyama Y, Muraki S, Nishida Y, Ohji M. Optical Coherence Tomography Angiography in a Patient with Optic Atrophy after Non-arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy. *Neuro-Ophthalmology*, in press. 査読有
4. Ueyama H, Muraki S, Tanabe S, Yamade S, Ogita H. A new subset of deutan colour vision defect associated with an L/M visual pigment gene array of normal order and -71C substitution in the Japanese population. *J Biochem* 158: 197-204, 2015 査読有
5. Kurita S, Takeuchi K, Hayashi Y, Ueyama H, Zankov DP, Pang X, Otsuka T, Ohkubo I, Ogikubo O, Ogita H. Significance of serum Zn-2-glycoprotein for the regulation of blood pressure. *Hypertens Res* 38: 244-251, 2015 査読有
6. Tomoaki Higashiyama, Yasuhiro Nishida, Sanae Muraki, Masahito Ohji: Long-term outcomes of three cases that underwent a muscle transposition procedure without tenotomy caused by abducens palsy. *Neuro Ophthalmol* 39: 26-29, 2015 査読有
7. Higashiyama T, Nishida Y, Muraki S, Ohji M: Long-term outcomes of three cases that underwent a muscle transposition procedure without tenotomy caused by abducens palsy. *Neuro-Ophthalmology* 39:26-29, 2015 査読有
8. Gardner JC, Liew G, Quan YH, Ermetal B, Ueyama H, Davidson AE, Schwarz N, Kanuga N, Chana R, Maher ER, Webster AR, Holder GE, Robson AG, Cheetham ME, Liebelt J, Ruddle JB, Moore AT, Michaelides M, Hardcastle AJ. Three different cone opsin gene array mutational mechanisms with genotype-phenotype correlation and functional investigation of cone opsin variants. *Hum Mutat* 35: 1354-1362, 2014 査読有
9. Niwa Y, Muraki S, Naito F, Minamikawa T, Ohji M. Evaluation of acquired color vision deficiency in glaucoma using the

Rabin cone contrast test. Invest Ophthalmol Vis Sci 55: 6686-6690, 2014 査読有

10. 岩佐真紀、村木早苗、東山智明、西田保裕、大路正人 . 外斜視術後周期性内斜視の1例 . 臨眼 68 : 207-211, 2014 査読有
11. 森 崇正、村木早苗、東山智明、西田保裕、大路正人 . 小児の眼筋麻痺性片頭痛の一例 . 眼臨紀 7 : 283-286, 2014 査読有
12. Muraki S, Nishida Y, Ohji M. Surgical results of a muscle transposition procedure for abducens palsy without tenotomy and muscle splitting. Am J Ophthalmol 156: 819-824, 2013 査読有

[学会発表](計 36 件)

1. 村木早苗: 合同教育セミナー 網膜硝子体疾患の撮りかた、見かた「色覚を診る」. 第 54 回日本網膜硝子体学会・第 32 回日本眼循環学会 合同学会 東京 2015.12.6.
2. 上山久雄、村木早苗、田邊詔子、山出新一、扇田久和: スプライシングでのエキソスキッピングによる先天色覚異常 . BMB2015 (第 88 回日本生化学会大会、第 38 回日本分子生物学会年会合同大会) ワークショップ「RNA 病」, 神戸市 2015.12.1.
3. 村木早苗: 診断後の指導 遺伝について . インストラクションコース 学校健診における色覚検査のあり方と臨床診断および指導 . 第 69 回日本臨床眼科学会、名古屋、2015.10.24.
4. 藤川正人、丹羽雄一、村木早苗、大路正人: 年代別健常眼における Cone Contrast Test を用いた色覚検査 . 第 119 回日本眼科学会総会 学術展示優秀賞受賞講演、第 69 回日本臨床眼科学会、名古屋、2015.10.23.
5. 藤川正人、村木早苗、丹羽雄一、山出新一、大路正人: 先天色覚異常 2 色覚における Cone Contrast Test の検討 . 一般講演、第 69 回日本臨床眼科学会、名古屋、2015.10.23.
6. 南 真弓、村木早苗、東山智明、大路正人: UBM の所見が診断に有効であった単純水晶体偏位の一例 . 第 71 回日本弱視斜視学会総会・第 40 回日本小児眼科学会総会 合同学会 神戸市 2015.7.3.
7. 東山智明、西田保裕、村木早苗、大路正人: ステロイド治療を施行した甲状腺眼症の外眼筋信号強度と眼球運動の相関 . 第 71 回日本弱視斜視学会総会・第 40 回日本小児眼科学会総会 合同学会 神戸市 2015.7.3.
8. 村木早苗: 「眼科検査法 色覚検査」第 27 回日本小児眼科学会講習会 神戸市 2015.7.4.
9. 村木早苗: 「ひとりのできる小児弱視斜視外来 経過観察の仕方 フレネル膜を使ってみよう」第 31 回日本弱視斜視学会講習会 神戸市 2015.7.4.
10. 村木早苗、上山久雄、田邊詔子、山出新一、扇田久和、大路正人: 正常な並びの視色素遺伝子アレーを持つ 1 型色覚における L 遺伝子の解析 . 一般講演、第 119 回日本眼科学会総会 札幌市 2015.4.16.
11. 藤川正人、丹羽雄一、村木早苗、大路正人: 年代別健常眼における Cone Contrast Test を用いた色覚検査 . 学術展示 第 119 回日本眼科学会総会 札幌市 2015.4.16.
12. Tomoaki Higashiyama, Yasuhiro Nishida, Sanae Muraki, Masahito Ohji. The Relationship between Orbital Fatty Tissues and Proptosis in Thyroid-Associated Ophthalmopathy before and after Methylprednisolone Pulse Therapy. International Strabismological Association, Kyoto, 2014.12.3.
13. 村木早苗. Surgical Results of a Muscle Transposition Procedure for Abducens Palsy without Tenotomy and Muscle Splitting. 日本弱視斜視学会 (弓削賞) 受賞講演、第 70 回日本弱視斜視学会総会、京都、2014.11.30.
14. 村木早苗. 斜視の長期経過 調節性内斜視 第 39 回日本小児眼科学会総会講習会、京都、2014.11.30.
15. 村木早苗. 迷うことが多い小児疾患の診かた 色覚異常の検査と考え方 第 70 回日本弱視斜視学会総会 講習会、京都市、2014.11.29.
16. 小幡峻平、西田保裕、東山智明、村木早苗、大路正人. 外傷性内直筋断裂に内直筋整復術が有効であった 1 例 . 第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.14.
17. Kurita S, Takeuchi K, Ueyama H, Ohkubo I, Ogikubo O, Ogita H.: Correlation of serum Zn- α 2-glycoprotein concentration with blood pressure and biochemical analysis on the correlation. 第 87 回日本生化学会大会、京都市

- 2014.10.18.
18. 上山久雄, 村木早苗, 田邊詔子, 山出新一, 扇田久和. 日本人先天色覚異常における L/M 視物質遺伝子アレーの解析. 第 87 回日本生化学会大会, 京都市, 2014.10.18.
 19. 上山久雄, 村木早苗, 田邊詔子, 山出新一, 扇田久和. M 視物質遺伝子の L 型エキソン 2 は M 視物質の発現量を減少させる. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 京都市, 2014.5.17.
 20. Gardner JC, Liew G, Quan Y, Ueyama H, Liebelt J, Ruddle JB, Moore AT, Michaelides M, Hardcastle AJ. Genotype-phenotype comparison and functional investigation of cone opsin variants. ARVO2014, Orlando (USA), 2014.5.7.
 21. 村木早苗. サブスペシャリティサンデー小児眼科診療のトピックス「小児における先天色覚異常の診療」第 118 回日本眼科学会, 東京都, 2014.4.6.
 22. Yuichi Niwa, Sanae Muraki, Masahito Ohji. Evaluation of acquired color vision defects of glaucoma using cone contrast test. WOC 2014, 東京都, 2014.4.4.
 23. Tomoaki Higashiyama, Yasuhiro Nishida, Sanae Muraki, Masahito Ohji. Three cases with abducens palsy undergone muscle transposition procedure and followed for 12 years or longer. WOC 2014, 東京都, 2014.4.2-6.
 24. 東山智明, 西田保裕, 村木早苗, 大路正人. ステロイド治療を実施した甲状腺眼症の外眼筋信号強度と体積の計測 第 51 回神経眼科学会, 秋田, 2013.11.22 -23.
 25. 東山智明, 西田保裕, 村木早苗, 大路正人. ステロイド治療を施行した甲状腺眼症の眼窩組織体積と眼球突出度の計測. 第 67 回日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.11.1.
 26. 村木早苗, 上山久雄, 山出新一, 田邊詔子, 扇田久和, 大路正人 日本人先天色覚異常の 2 型 3 色覚における遺伝子型とアノマロスコープ結果との比較. 第 67 回日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.11.1.
 27. 村木早苗. 先天色覚異常の遺伝と遺伝子. インストラクションコース 色覚メカニズムの解説と色覚異常の臨床診断および指導, 第 67 回日本臨床眼科学会, 横浜, 2013.10.31.
 28. 丹羽雄一, 村木早苗, 内藤文之, 南川貴之, 大路正人. Cone contrast test を用いた緑内障に伴う後天色覚異常の検討. 第 24 回日本緑内障学会, 東京, 2013.9.21.
 29. 森崇正, 村木早苗, 西田保裕, 大路正人. 眼筋麻痺性片頭痛の一例. 第 38 回日本小児眼科学会総会, 広島, 2013.7.5.
 30. 東山智明, 西田保裕, 村木早苗, 大路正人. 外転神経麻痺に外眼筋移動術を施行後, 長期経過観察した 3 例. 第 69 回日本弱視斜視学会, 広島, 2013.7.5.
 31. Sanae Muraki, Tomoaki Higashiyama., Yasuhiro Nishida, Masahito Ohji. Bilateral medial rectus resection for surgical correction of recurrent exotropia after bilateral lateral rectus recession. Poster AAPOS&SNEC 2013 Joint meeting. Singapore, 2013.7.14-16.
 32. Maki Iwasa, Sanae Muraki, Tomoaki Higashiyama, Yasuhiro Nishida, Masahito Ohji. A Case of Consecutive Cyclic Esotropia after Surgery for Intermittent Exotropia. Poster AAPOS&SNEC 2013 Joint meeting. Singapore, 2013.7.14-16.
 33. T. Higashiyama, Y. Nishida, Y. Ichiyama, S. Muraki, M. Ohji. The MRI measurements of signal intensity and cross-sectional area of extraocular muscles in thyroid-associated ophthalmopathy before and after steroid pulse therapy. Paper AAPOS&SNEC 2013 Joint meeting. Singapore, 2013.7.14.
 34. 村木早苗. 麻痺性斜視の複視にはこう対処する - 麻痺性斜視の画像診断 - 教育セミナー 第 117 回日本眼科学会, 東京都, 2013.4.7.
 35. 村木早苗, 上山久雄, 豊田太, 山出新一, 扇田久和, 大路正人. 杆体一色覚における網膜錐体 cGMP 依存性カチオンチャネルの変異の機能的解析. 第 117 回日本眼科学会, 東京都, 2013.4.4.
 36. 東山智明, 西田保裕, 一山悠介, 村木早苗, 大路正人. 甲状腺眼症の眼窩脂肪組織及び全眼窩組織の信号強度計測. 第 117 回日本眼科学会, 東京都, 2013.4.4.
- 〔図書〕(計 10 件)
1. 上山久雄. 118. 色覚. 『光と生命の事典』, p240-241, 朝倉書店(東京) 2016

2. 村木早苗．眼科診療クオリファイ 26 ロービジョンケアの実際．マイクロペリメトリ．p48-51，中山書店（東京），2015
3. 村木早苗．眼科診療クオリファイ 26 ロービジョンケアの実際．偏心視訓練．p87-90，中山書店（東京），2015
4. 村木早苗．こどもの病気 遺伝について聞かれたら 61 色覚異常 p156-158，診断と治療社（東京），2015
5. 村木早苗．総合小児医療カンパニア 移行期医療 子どもから成人への架け橋を支える．p219-225，中山書店（東京），2015
6. 村木早苗．小児眼科書 第2章 視機能の発達と検査「色覚」p28-33、第28章 色覚異常 p525-531，三輪書店(東京)2015
7. 村木早苗：今日の治療指針 2015年版 斜視 p1366-1367，医学書院，2015．
8. 東山智明、村木早苗：OCULISTA 特集/斜視診療のコツ 画像診断．p27-36，株式会社 全日本病院出版会，2015．
9. 村木早苗．眼科診療クオリファイ 22 弱視・斜視診療のスタンダード．p175-177 中山書店，2014
10. 村木早苗：OCULISTA No19 眼科外来標準検査 実践マニュアル p15-22 全日本病院出版社 2014

6．研究組織

(1)研究代表者

村木 早苗

(滋賀医科大学・医学部・講師)

研究者番号：90335175

(2)研究分担者

上山 久雄

(滋賀医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：30127013