

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791261
 研究課題名（和文） 網膜錐体細胞における色覚オプシン遺伝子の排他的発現機構の分子遺伝学的解析
 研究課題名（英文） Molecular genetic analysis of exclusive expression mechanism of opsin genes in cones
 研究代表者
 王 春霞 (WANG CHUNXIA)
 浜松医科大学・医学部・特任研究員
 研究者番号：70402352

研究成果の概要：

欠失による青錐体一色型色覚 (BCM) 症例で欠失領域を確定することにより、欠失領域内に存在し両オプシンの排他的発現を調節する cis-element を解明することを目指した。BCM 症例 1 では、赤オプシン遺伝子のイントロン 2 内部から上流に向かって、LCR (Locus Control Region) を含む 16,803 塩基を欠失していることを確定した。症例 2 では、赤・緑オプシン遺伝子の間隙から上流に向かって約 50kb を欠失し、同時に不均衡相同組換えと逆位、挿入等が起きた複雑な変異であることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

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：錐体細胞、色覚遺伝子、排他的発現

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む高等霊長類の網膜錐体細胞には、受容できる光の波長が異なる3種類の色覚オプシタンパク質（赤、緑、青オプシン）が存在する。各色覚オプシタンパク質は特異的に発現するため、個々の錐体細胞が受容できる光の波長領域も異なる。脳では、各錐体からの光受容信号を、網膜上で位置および色種情報と合わせて処理することにより、色を伴った像として認識することができる。哺乳類の多くは、青と緑の2種類の色覚オプシンしか持たず、2色型色覚であるが、

我々高等霊長類の3色型色覚は、祖先の哺乳類の2色型色覚から比較的最近（約3,000万年前）進化・獲得したものと考えられる。色数の増加は、祖先の緑オプシンが複数回の遺伝子重複と分子進化によって、現在の緑オプシンと赤オプシンに分化したことで達成されたと考えられる。その仮説を裏付ける事実として、両オプシン遺伝子の相同性が極めて高いこと、それらはX染色体q28に隣接して位置していること、緑オプシン遺伝子は複数持つ人が多く“赤-緑-緑…”と並んでいることなどが挙げられる。それに対し、青オプ

シンは、7p31.3-q32 に単独で存在し、赤・緑オプシン遺伝子との相同性は比較的低い。

これら3種類の錐体細胞からの波長の光受容シグナルを脳で色覚情報として像に再現するためには、個々の錐体細胞は、赤・緑・青のいずれかの色覚オプシンを特異的に発現し、受容する光の波長領域を限定する必要がある。そのため、赤・緑・青オプシン遺伝子の中で、どれか一つが特異的に発現し、他はほとんど（あるいは、全く）発現しないという排他的発現の分子機構が存在する必要がある。隣接する赤・緑に関しては、赤オプシンの上流3.1kbの位置にある約600bpの塩基配列 LCR (Locus Control Region) が、赤と緑のどちらか一方だけが発現することに必須の役割を持つとする仮説が報告された (J. Nathans et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1008-11, 2002)。この LCR を仮定すれば、その領域の欠失により赤・緑の両オプシンが発現しないことによる「青錐体一色型色覚 (BCM, Blue Cone Monochromacy)」が説明できる。

しかし、この「LCR が赤と緑のいずれか一つだけの遺伝子の発現を支配する」という仮説は、未だ分子生物学的に証明されてはいない。赤・緑の各オプシン遺伝子にはそれぞれプロモーターがあるので、離れた上流に存在する LCR は、発現調節のためのタンパク質複合体とプロモーターとの相互作用による転写開始に必須な cis-element を含むことが想定はされるが、cis-element、あるいは、それらの複合体の実体や、それらとプロモーターとの相互作用が示されたわけではない。

研究代表者は浜松医科大学眼科（主宰：堀田喜裕教授）の関連医療機関の BCM 等、多数の遺伝性眼疾患の症例の遺伝子解析を行ってきた。本研究では、BCM の2症例を詳細に解析し、欠失領域内に存在して両オプシンの排他的発現を調節する cis-element を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「各錐体細胞で一種類のみの色覚オプシンタンパク質が特異的に発現する現象の分子機構を解明すること」である。そのために、欠失による BCM の欠失範囲を1塩基レベルで正確に決定し、その欠失領域内の cis-element を抽出して、排他的発現調節を制御するものを明らかにしていくことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 対象

①家系1の発端者（症例1）は9歳男児、視力は両眼とも0.2であり、眼振は認めなかった。発端者の弟（症例2）は、視力右0.3、左0.15であった。この兄弟の伯父（症例3）

は、幼少時より視力不良であり、視力右0.06、左0.08であった。

②家系2の発端者は18歳男性（症例4）であった。幼少時より視力は不良であり、遺伝性黄斑変性症の疑いにて、精査目的で紹介となった。初診時の矯正視力は両眼とも0.4、昼盲があり、眼振は認めなかった。

③色覚検査では、症例1、2、4ともに、第一（赤）と第二（緑）色覚異常を示した。

④ERG 検査では、photopic ERG と 30 Hz flicker ERG はほとんど消失していたが、scotopic ERG は正常であった。

⑤眼底検査では、症例1、2、4は、中心窩反射は認められ、黄斑部には異常は認められなかった。

(2) 2家系5人（うち罹患者4人）について、インフォームドコンセント取得の上で白血球からゲノムDNAを抽出した。

(3) まず、ダイレクトシーケンシング法で各エキソンの点変異の有無を検索した（図3）。

(4) 一方、赤・緑オプシン遺伝子各々の全エキソン1~5とLCRまでを含む上流領域をPCR法で増幅し、欠失の探索と欠失範囲の限定を行った。

(5) さらに、欠失領域を挟むプライマーを作成して、欠失のあった場合のみ増幅産物が得られるPCRを行い、増幅断片の塩基配列から欠失断端を決定した。

4. 研究成果

青錐体一色型色覚の日本人2家系の赤緑オプシン遺伝子の欠失範囲の正確な同定のために、ゲノム構造解析を行った。BCM の患者は男性であるため、必然的にX染色体は1本であり、欠失の有無は、PCRで増幅が得られるかどうかで基本的には判断が可能である。しかし、赤オプシンと緑オプシンは相同性が極めて高いこと、多く（本邦では約60%以上）の個体では緑オプシンは2コピー以上が重複して存在することにより、それらの領域内では多型箇所を選択して増幅しその塩基配列を確認する必要がある（図1）。その方法を用いて、まず家系1の解析を行った。その結果、欠失範囲は赤オプシン遺伝子のイントロン2内部から上流に向かって、16kb以上の長さに及ぶことが判明した。欠失の断点近傍と思われる位置に、欠失領域を挟む向きでプライマーを設計して、欠失がある時のみ増幅可能となるPCR (Junction-PCR) を行った。その結果、増幅が得られるプライマーを見出すことができた。欠失を伴って、その両側を接続した形の増幅産物が得られたので、そのDNA断片の塩基配列を決定した。正常の塩基配列と比較したところ、欠失は16,803塩基であることが判明した（図2）。その領域には、Nathansらによって仮定されたLCR (Locus Control Region) を含むこともわかった。

一方、家系2の患者は、同様の方法で解析を行ってきたが、赤・緑オプシン遺伝子の間に欠失の切断点があること、欠失の長さは50kbと非常に長いことが判明したのみで、Junction-PCRには成功していなかった。しかし、ごく最近になって、この症例は単純な欠失ではなく、欠失の後、逆位したDNA断片の挿入と、下流の残存オプシン遺伝子に非相同組換え等による複雑な変異が同時に起きていることが判明した(図3)。現在、これらの変異を含む領域すべてのクローニングが完了した。それらのクローンの塩基配列を詳細に検討して変異の全貌を決定することが間もなく可能である。

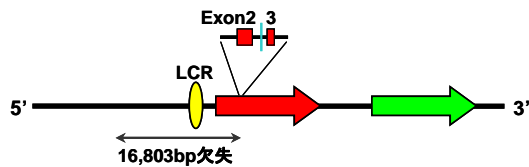


図1.家系1の解析結果

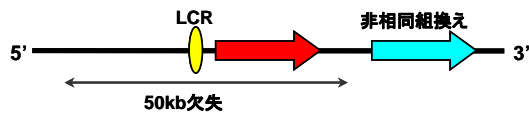


図2.家系2の解析結果

これら両家系の欠失領域の1塩基レベルでの情報は、赤緑オプシン両遺伝子の排他的発現調節機構のみならず、7番染色体上の青オプシン遺伝子との択一発現の分子機構の解析にも有益なものと考えられる。

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 3件)

- ① 王 春霞、小出健郎、細野克博、中西伸夫、蓑島伸生、堀田喜裕. 分子遺伝学的検査により確定診断し得た Best 病の一例. 臨床眼科. 62(9): 1653-1567, 2008. 査読有
- ② Chunxia Wang, Nobuo Nakanishi, Akiko Hikoya, Kenro Koide, Kentaro Ohishi, Miho Sato, Makoto Nakamura, Yoshihiro Hotta, Shinsei Minoshima. Novel RDH5 mutation in family with mother having

fundus albipunctatus and three children with retinitis pigmentosa. Ophthalmic Genet. 29(1):29-32, 2008. 査読有

- ③ Toshio Kawano, Chunxia Wang, Yoshihiro Hotta, Miho Sato, Emi Iwata-Amano, Akiko Hikoya, Naoya Fujita, Norihisa Koyama, Shoichiro Shirai, Noriyuki Azuma, Masafumi Ohtsubo, Nobuyoshi Shimizu, Shinsei Minoshima. Three novel mutations of the PAX6 gene in Japanese aniridia patients. J Hum Genet. 52(7):571-574, 2007. 査読有

[学会発表] (計 4件)

- ① 王 春霞、細野克博、大坪正史、大石健太郎、中西伸夫、堀田喜裕、蓑島伸生. オプチニューリンと NRL タンパクの相互作用の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008. 12. 9-12. 神戸.
- ② 王 春霞、小出健郎、蓑島伸生、堀田喜裕. 分子遺伝学的検査により確定診断し得た Best 病の一例. 第 61 回日本臨床眼科学会. 2007. 10. 11-14. 京都.
- ③ 王 春霞、大坪正史、細野克博、大石健太郎、堀田喜裕、蓑島伸生. オプチニューリンと NRL タンパク質の相互作用の解析. 第 14 回日本遺伝子診療学会大会. 2007. 7. 27-28. 愛媛・松山.
- ④ 王 春霞、大坪正史、細野克博、堀田喜裕、蓑島伸生. オプチニューリンと NRL タンパク質の相互作用の解析. 第 111 回日本眼科学会総会. 2007. 4. 19-22. 大阪国際会議場. 口演.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 春霞 (WANG CHUNXIA)
浜松医科大学・医学部・特任研究員
研究者番号：70402352

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

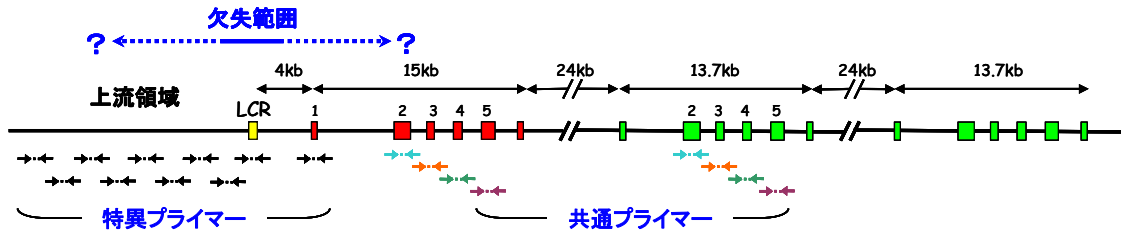


図3.実験方法