

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592226

研究課題名（和文）網膜錐体サイクリックGMP依存性（CNG）チャネルの機能的解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of the cone photoreceptor cGMP-gated channel in rod monochromatism.

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

研究成果の概要（和文）：

網膜錐体のイオンチャネルの異常は杆体一色覚（生まれつき錐体が働いていない）に関係する。同チャネルの既報告の 68 種のミスセンス変異（アミノ酸が変わる変異）を機能的に調べたところ、16 種は膜電流が記録できたが他は記録できなかった。後者の中には低温処理などにより電流を記録できるようになったものがあり、これらについては変異チャネルを膜発現へと向かわせる方法をさらに工夫し杆体一色覚の治療に結びつけたい。

研究成果の概要（英文）：

Defects of the ion channel in retinal cones are related to rod monochromatism (where functional cones are congenitally absent). When the 68 missense mutations (those causing a change in the amino acid sequence) of the channel so far reported were functionally studied, 16 gave membrane current but the others did not. Among the latter, some gave membrane current when the cells were cultured at lower temperature. With regard to such mutations, we are going to establish easier method to have the abnormal channel transported to the cell surface, for practical use.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：CNGチャネル、杆体一色覚、CNGA3、CNGB3

1. 研究開始当初の背景

杆体一色覚は、錐体が全く～殆ど機能していない遺伝的な病態であり、色覚欠損に加え、低視力、昼盲、羞明、眼振などを呈する。その原因として、錐体 cGMP 依存性カチオンチャンネル（以下、CNG チャンネル）の α サブユニット、 β サブユニットの異常、錐体トランスデューシン α 鎖（その遺伝子は *GNAT2*）の異常（現在では錐体ホスホジエステラーゼ（遺伝子は *PDE6C*）の α サブユニットの異常も見出されている）が報告されている。杆体一色型色覚は先天色覚異常の1種であるが、ロービジョンを呈しQOLが良くない。

α サブユニットの遺伝子(*CNGA3*)ではミスセンス変異が53種知られており、 β サブユニットの遺伝子(*CNGB3*)では同変異が10種知られているが、これらの解析は、杆体一色覚の病態のみならず、錐体CNGチャンネルの構造—機能相関の理解にも役立つと考えられる。

私共は、日本人の杆体一色覚について *CNGA3*、*CNGB3*、および *GNAT2* を解析し、6例中1例において *CNGB3* のミスセンス変異 (Asp633Gly) を見出した。培養細胞を用いた cDNA のトランスフェクション—パッチクランプ実験系において、 α サブユニットは単独でチャンネルを形成できる（以下、 α チャンネル）が、 β サブユニットは常に α サブユニットとの共発現が必要であった（以下、 α/β チャンネル）。 α チャンネルと比較し、 α/β チャンネルでは、cGMP に対する感受性が下がること、内向き電流の細胞外 Ca^{2+} による阻害がかかりにくいこと、などを見出し、 α /変異 β チャンネルではこれらが認められないことを報告した (Invest Ophthalmol Vis Sci. 45: 2324-2332 ,

2004)。他の1例では *CNGA3* のミスセンス変異 (Leu633Pro) が見出されたが、トランスフェクション—パッチクランプ実験系で調べる限りは、チャンネル機能は全く正常であった。

このようにミスセンス変異は、その変異を導入した cDNA を培養細胞で発現させ機能解析して初めてその病態における意義づけができるものである。

2. 研究の目的

本研究は、網膜錐体 CNG チャンネルの変異の機能的解析を通して、チャンネルの構造—機能相関を明らかにするとともに、杆体一色覚の病態の理解を深め、その成果を治療に結びつけることを目的としている。

- (1) α サブユニットのミスセンス変異による障害を明らかにし、障害を克服する方法を検討する。
- (2) 杆体一色覚保因者や複合ヘテロ接合体患者における α チャンネルの性質を明らかにする。
- (3) In vivo における錐体チャンネルの構造を推定する。
- (4) β サブユニットのミスセンス変異による障害を明らかにする。

3. 研究の方法

杆体一色覚で報告された CNG チャンネルのミスセンス変異を cDNA に導入し、トランスフェクション—パッチクランプ法でチャンネル機能を解析する。変異チャンネルの細胞膜発現を HaloTag ベクターを用いたパルスチェイス実験で調べる。また、 α の二連、 α と β の四連コンストラクトを作製し、チャンネル機能を検討する。

- (1) GFP との融合タンパク質の解析

- (2) タンデムに繋いだ CNGA の解析
- (3) ループへのタグの挿入
- (4) CNG α サブユニットの膜発現の検討
- (5) ミスセンス変異を持った CNG α サブユニットの細胞膜発現の検討
- (6) 細胞膜発現誘導の検討
- (7) エピゾーム型ベクターである pEBmulti-Neo に cDNA を移し換え、stable な発現系を構築する。
- (8) CNGA3 での新たに報告されたミスセンス変異の解析
- (9) 細胞膜発現タンパク質の標識

4. 研究成果

- (1) GFP との融合タンパク質の解析

CNGA3サブユニットによるcGMP依存性の膜電流は、今までco-transfectionしたGFPベクターによって蛍光を発する細胞について調べてきた。しかし野生型CNGA3においても光ってはいるが膜電流を記録できない細胞が数十%あり、効率の悪さが問題であった。そこで、野生型CNGA3のcDNAをGFPベクターにクローニングし、CNGA3-GFP融合タンパク質が機能するかどうか調べた。その結果、光っている細胞は100%膜電流を記録できることが判明した。cGMPに対する $K_{1/2}$ はGFPがないものと同様であり、チャンネルの機能はC端に存在するGFPの影響を受けないと考えられた。光っている細胞は必ずCNGA3を発現しているわけであり、発現はあるが機能していない変異型CNGA3の解析が容易になった。

- (2) タンデムに繋いだCNGAの解析

錐体CNGチャンネルは2個ずつのCNGA3サブユニットとCNGB3サブユニットから成るが、CNGA3サブユニットだけでもチャンネルはできあがる。野生型CNGA3-野生型CNGA3-GFPの融合タンパク質がチャンネル機能を発揮できるか調べたところ、cGMPによって活

性化される膜電流が記録できた。杆体一色型色覚の保因者においては、野生型CNGA3と変異型CNGA3の両サブユニットを含むチャンネルが発現しているものと考えられるが、タンデムに繋いだCNGA3の片方を変異型とした場合のチャンネルの性質を解析する系ができた。

- (2) ループへのタグの挿入

CNGA3サブユニットの細胞膜発現の検討のため、野生型CNGA3のループ1/2、ループ3/4、ループ5/6 (=ポア領域) などの細胞外領域にFLAGタグ、mycタグ、Hisタグを導入したが、タンパク質発現はみられる (GFPタグを付けているので蛍光でわかる) もののチャンネル機能は検出されなかった。そこで、CNGA3のN端に別のタンパク質の細胞外領域+膜貫通ドメインを導入し、7回膜貫通型チャンネルとして調べたところ電流が記録できた。細胞外領域に対する抗体を用いて膜発現を検討する系ができた。

- (4) CNG α サブユニットの膜発現の検討

細胞外領域に HA タグと ID4 タグを導入したが、前者はタンパク質発現はみられるもののチャンネル機能が検出されず、また後者は導入自体ができず、いずれも所期の目的を果たせなかった。また、2009年度に、CNG α サブユニットのN端にロドプシンの膜貫通ドメインを導入して7回膜貫通型としたチャンネルが機能することをパッチクランプ法で確認していた。2010年度はこれを受け、細胞膜での発現を抗ロドプシン抗体で検出する試みを行ったが、うまく検出できなかった。

- (5) ミスセンス変異を持った CNG α サブユニットの細胞膜発現の検討

前回の報告時 (Muraki-Oda ら、BBRC (2007)) から後に、 α サブユニット (CNGA3) で 19 種のミスセンス変異が報告された。これらをそれぞれ野生型 cDNA へ導入しパッチクランプ

法を適用した。cGMPによって活性化される膜電流が記録できる変異 (P95L, G228K, T245M, A469T, V540I, R563C, G590K, A619V, L633P) と、記録できない変異 (F249S, D252N, Y263D, V266M, R274S, G397V, S401P, L433W, R439W, G548R) とに分類することができた。

(6) 細胞膜発現誘導の検討

transient な発現-パッチクランプの系では結果を定量的に示すことが難しいことが分かったため、stable な発現-カルシウムセンサーの系を構築中である。

(7) エピゾーム型ベクターである pEBmulti-Neo に cDNA を移し換え、stable な発現系を構築する。

エピゾーム型ベクター pEBMulti-Neo に、myc タグがついた CNGA3 及び FLAG タグがついた CNGB3 の cDNA をクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクションした。G418 で選択した細胞についてウェスタンを行い、いずれも cDNA の産物を発現していることを確認した。CNGA3 発現細胞に関しては Fluo-4 というカルシウムセンサーを細胞に負荷した後、膜透過性の cGMP アナログである 8-Br-cGMP を添加し蛍光を見たところ、CNGA3 発現細胞に 8-Br-cGMP を添加したもののだけが蛍光を示した。CNGB3 発現細胞に関しては、GFP タグのついた CNGA3 の cDNA をトランスフェクションし、cGMP に対する感受性がやや低下した膜電流を記録できた。

(8) CNGA3 での新たに報告されたミスセンス変異の解析

CNGA3 では新たに 10 種のミスセンス変異が見いだされ、知られていた変異と合わせると 68 種となった。これらの 10 種の変異を cDNA に導入し、GFP ベクターにクローニング、HEK293 細胞にトランスフェクションし、パッチクランプ法により cGMP 依存性の膜電流の有無を調べた。その結果、N276S、G329C、Y357C、

L363P、G367V、E376K、D514V、L527M、L527R、S570I のいずれにおいても cGMP 依存性の膜電流は記録されなかった。低温培養 (28°C での培養) や、培地へのタウロウルソデオキシコール酸ナトリウム (1 mM) や 4-フェニル酪酸 (1 mM) の添加を行っても膜電流を記録することはできなかった。

(9) 細胞膜発現タンパク質の標識

SulfoLink NHS-LC-biotin による細胞膜発現タンパク質の標識は以前に行ったがうまく標識できていなかった。すなわち、抗 GFP 抗体によるプルダウン→SDS-PAGE→ブロッティング→アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンによる発色、を行ったがタンパク質の泳動レーン全体が染まっていた。今回、標識温度と細胞の洗いを工夫し CNGA3-GFP 融合タンパク質のバンドを検出できるようになった。

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 3 件)

- ① Ding W-G, Toyoda F, Ueyama H, Matsuura H, Lysophosphatidylcholine enhances IKs currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways, J Mol Cell Cardiol, 50, 58-65, 2011、査読有
- ② Muraki S, Nishida Y, Harada Y, Kinoki M, Sawada O, Yoshida K, Ohji M, A new muscle transposition procedure to correct cyclodeviation without tenotomy, J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 47, e1-e3,

2010、査読有

- ③ Hisao Ueyama, Shoko Tanabe, Sanae Muraki-Oda, Shinichi Yamade, Masahito Ohji and Iwao Ohkubo、Analysis of introns and promoters of L/M visual pigment genes in relation to deutan color-vision deficiency with an array of normal gene orders、Journal of Human Genetics、54、525-530、2009、査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 村木早苗、色覚異常を遺伝子から知ろう、第67回日本弱視斜視学会第36回小児眼科学会合同学会、2011.7.1、京都
- ② 村木早苗、筋移動術とその可能性 麻痺性斜視治療の可能性と限界、第67回日本弱視斜視学会第36回小児眼科学会合同学会、2011.7.2、京都
- ③ 東山智明、村木早苗、石井正宏、西田保裕、大路正人、外斜視術後の戻りに対する両眼内直筋短縮術の手術効果第67回日本弱視斜視学会第36回小児眼科学会合同学会、2011.7.1、京都
- ④ 前田 利長、坂上 倫久、安 麗萍、杜培革、上山久雄、大久保 岩男、ブタ精漿より精製したヒトホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質4類似タンパク質の機能の検討、第83回 日本生化学会大会、第33回日本分子生物学会年会 合同大会、2010.12.7、神戸市
- ⑤ 中島智子、村木早苗、石井正宏、西田保裕、大路正人、弱視症例のマイクローペリメータによる固視検査の試み、第66回日本弱視斜視学会、

2010.7.2、東京

- ⑥ 村木早苗、先天色覚異常と遺伝子、第115回京都眼科学会、2009.9.6、京都
- ⑦ 竹内圭介、上山久雄、大久保岩男、扇田久和、Zn-alpha2-glycoprotein 遺伝子のプロモーター解析、第84回日本生化学会大会、2011.9.23、京都市
- ⑧ 上山久雄、村木早苗、山出新一、田邊詔子、扇田久和、正常遺伝子型を持つ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84回日本生化学会大会、2011.9.23、京都市

[図書] (計2件)

- ① 村木早苗、東京大学出版会、色彩科学ハンドブック 第3版、2011、390-392.
- ② 上山久雄、東京大学出版会、色彩科学ハンドブック 第3版、2011、354-357.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

上山 久雄 (UEYAMA HISAO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30127013