

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591940

研究課題名（和文）表現型－遺伝子型不一致の先天色覚異常における L/M 視物質遺伝子の解析

研究課題名（英文）Analysis of L/M visual pigment genes in congenital color vision defects with a discrepancy between phenotype and genotype

研究代表者

上山 久雄（UEYAMA HISAO）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30127013

研究成果の概要（和文）：2色覚の表現型で異常3色覚の遺伝子型は30例あった。正常遺伝子型の色覚異常は85例あり、表現型－遺伝子型不一致は全725例中計115例であった。82例は－71A→Cの塩基置換を持ち、これが当該視物質遺伝子の非発現～低発現を引き起こしているものと推定された。エキソン内の変異は11例であった。エキソン3の特殊なハプロタイプにより、スプライシングにおいて当該エキソンの完全なスキップの起こる例が2あった。

研究成果の概要（英文）：Thirty dichromats had a genotype of anomalous trichromacy, and 85 color-deficient subjects had a normal genotype; a total of 115 among the 725 subjects showed a discrepancy between their phenotype and genotype. Among them, 82 subjects had a base substitution of -71A→C, which is thought to cause no or little expression of the corresponding visual pigment gene. Eleven subjects had a mutation in the exons. Two had a unique haplotype in exon 3, which causes complete skipping of the exon at splicing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：網膜、錐体、色覚異常、視物質遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2002年度～2004年度の基盤研究（C）において、463例の日本人先天色覚異常のL/M視物質遺伝子アレーを解析し、欧米での報告と異なり、正常遺伝子型を持つ例が多いことを見出していた。2007年度～2008年度の基盤研究（C）において、さらに197例を追加解析し、異常3色覚の遺伝子型を持つにも関わらず2色覚の表現型を示す例が多いことを見出していた。

2. 研究の目的

日本人先天色覚異常における表現型－遺伝子型不一致例では、L/M視物質遺伝子アレーの後続遺伝子のプロモーターに－71A→Cの塩基置換を持つ例が多かった。ミスセンス変異も6例認められていたので、本研究は色覚異常におけるこれらの塩基置換や変異の意義づけを目指した。塩基置換が認められなかった例については、遺伝子全体をクローニングし、その欠陥を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は、滋賀医科大学附属病院あるいは日本赤十字名古屋第一病院の色覚外来を訪れた色覚異常の方から、同意を得た上で採血させて頂き、その末梢血白血球から抽出した。

(2) L/M 視物質遺伝子アレーの解析

まずロング PCR により、L/M 視物質遺伝子アレーの先頭遺伝子と後続遺伝子を別々に増幅し、それぞれの産物中のエクソン 5 をみることで L 遺伝子か M 遺伝子かを判定した。

後続遺伝子が増幅されない場合は、「single L アレー」あるいは「single M アレー」（いずれも 2 色覚の遺伝子型）と判定した。

先頭、後続の遺伝子がいずれも L、あるいはいずれも M の場合は、それぞれのエクソン 2、3、4 を PCR 増幅・解析し、これらが同じであれば「L - L アレー」あるいは「M - M アレー」の 2 色覚の遺伝子型と判定した。異なれば、「L - L' アレー」あるいは「M - M' アレー」の異常 3 色覚の遺伝子型と判定した。

先頭の遺伝子が L、後続の遺伝子が M であれば正常遺伝子型であり、発現がない、あるいは低いと推定される方の遺伝子について、プロモーター、エクソン 1~6（エクソン/イントロン境界を含む）をシーケンシングし、塩基置換を検索した。

(3) プロモーターの解析

プロモーター活性は、ヒト網膜芽細胞腫培養細胞 WERI-Rb1 を用い、pGL4 ベクターを用いるルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。-71 を含む領域をプローブとしたゲルシフトアッセイは、WERI-Rb1 細胞の核抽出液を用いて行った。

(4) 視物質再構成実験

ミスセンス変異に関しては、当該変異を導入した L オプシンの cDNA を発現ベクターの pFLAG-CMV-5a に繋ぎ、HEK293 細胞にトランスフェクトして、変異錐体オプシンを発現させ、2 日後に集めた細胞に 11-シス-レチナルを加えて視物質を再構成し、CHAPS-ホスファチジルコリン溶液により抽出した液の吸収スペクトルを測定した。

(5) 視物質遺伝子全体を用いたスプライシングの解析

視物質遺伝子全体をロング PCR で増幅し、pFLAG-CMV-5a にクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトした。2 日後の細胞か

ら全 RNA を抽出し、錐体オプシン cDNA をプローブとするノーザンブロットを行った。

(6) ミニジーンを用いたスプライシングの解析

ゲノム DNA から L または M 視物質遺伝子のエクソン 2~エクソン 4 の領域を PCR 増幅し、*BbsI* で切断した。L オプシン cDNA (pFLAG-CMV-5a にクローニングしてある) を *BbsI* で切断し、そのエクソン 2-3-4 部分を上記の遺伝子断片で置き換えた。これを HEK293 あるいは WERI-Rb1 にトランスフェクトし、2 日後に集めた細胞から全 RNA を抽出した。

FLAG の R プライマーを用いて逆転写、次いでエクソン 1 の F プライマーとの間で PCR を行い、どのような mRNA が作られているかを調べた。

(7) *in vitro* mutagenesis によるエクソン 3 の多型 (ハプロタイプ) クローンの作製

エクソン 3 には多型が 8 か所あるが、最初の 3 か所、次の 2 か所をそれぞれまとめて、6 か所目は C を採用することにより全 16 通りのミニジーンを作製し、(6) に記した系でスプライシングを解析した。

(8) 日本人以外での -71 の解析

CIMR から購入した様々な人種のゲノム DNA を鋳型として、視物質遺伝子のプロモーター領域を PCR 増幅し、*HhaI* により -71 の塩基を解析した。-71 が C であれば *HhaI* 認識配列となり切断されることを利用して A か C か、あるいは両方持つかを判定した。

4. 研究成果

(1) L/M 視物質遺伝子アレーの解析

本研究期間内に、100 名以上の方が色覚外来にいられた (A712~A838 と番号づけを行った)。ゲノム DNA を頂けなかった方が含まれるので、L/M 遺伝子アレーの解析数は 92 であった。次にその内訳の例数を示すが、() 内は本研究までの例数と合計したものである。

1 型 2 色覚 : 24 (128)

異常 3 色覚の遺伝子型 : 12 (28)

正常遺伝子型 : 1 (6)

1 型 3 色覚 : 18 (95)

正常遺伝子型 : 2 (6)

2 型 2 色覚 : 27 (220)

異常 3 色覚の遺伝子型 : 0 (2)

正常遺伝子型 : 1 (9)

2 型 3 色覚 : 23 (282)

正常遺伝子型 : 9 (64)

今回新たに見出された表現型-遺伝子型不一致は計 25 例 (92 例中 27.1%) であった。

(2) プロモーター、エキソン、エキソン/イントロン境界の解析

上記 25 例において次の塩基置換やミスセンス変異、ナンセンス変異が見出された。

1 型 2 色覚：

異常 3 色覚の遺伝子型：12 例中 6 例において後続 L 遺伝子に -71A→C

正常遺伝子型：1 例中 1 例において

先頭 L 遺伝子に Trp177STOP

1 型 3 色覚：

正常遺伝子型：2 例中 1 例において

先頭 L 遺伝子に His300Tyr

2 型 2 色覚：

正常遺伝子型：1 例中 1 例において

後続 M 遺伝子に -71A→C

2 型 3 色覚：

正常遺伝子型：9 例中 8 例において

後続 M 遺伝子に -71A→C

残る 1 例において

後続 M 遺伝子に Pro307Leu

残る 7 例には塩基置換や変異は見出されなかった。

(3) 視物質再構成実験

今回見出されたミスセンス変異 (His300Tyr) と、以前に見出していた Pro187Leu、及び、米国からの報告 (Vis Neurosci 21: 205- (2004)) にあった Pro187Ser とイスラエルからの報告 (Invest Ophthalmol Vis Sci 51: 3884- (2010)) にあった Val120Met のミスセンス変異をそれぞれ L オプシンの cDNA に導入し、視物質再構成実験を行った。

野生型再構成 L 視物質が 560 nm に極大吸収を持つスペクトルを呈したのに対し、これらの変異を持つ再構成 L 視物質は全く吸収を示さなかった。

以上の結果は、これらのミスセンス変異が視物質の機能に悪影響を及ぼすことを示している。Pro187Leu は正常遺伝子型の L 遺伝子の方であったが、表現型-遺伝子型の不一致はこの変異で説明可能であった。しかし His300Tyr に関しては、この遺伝子から機能を持った産物が作られないのであれば、表現型は 2 色覚となるはずであるが、実際は 3 色覚 (アノマロスコープでは 50-55 の等色値) であり、表現型と遺伝子型の不一致はこの変異だけでは説明できなかった。

(4) ゲルシフトアッセイ

-71A→C の塩基置換は、今回の解析でも頻繁に見出され (25 例中 15 例、60.0%)、これまでの累計においても 115 例中 82 例 (71.3%) と、これが当該遺伝子の非 (あるいは低) 発現に関与していることは間違いのないものと考えられる。その機序に関してはすでにレポータープラスミドを用いたプロモ

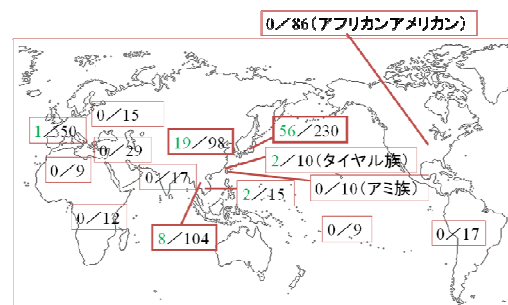
ーターアッセイにおいて、-71C のプロモーターは-71A のプロモーターの 30% 程度の活性しか持たないことを見出していた (Ueyama ら、J Hum Genet 54: 525- (2009))。

今回は、-71 を含むプロモーター領域を ³²P で標識し、WERI-Rb1 細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイを行った。

-71A プロンプと-71C プロンプ及び、これらのコンペティターを用いて解析したところ、-71C プロンプの方でのみ、競合のかかるバンドが見られた。このことは、-71C を含む領域にある種のタンパク質が結合してしまい、そのために本来結合すべき転写因子が疎外されるために転写効率が落ちるという可能性を示唆している。

今後は、この仮説を実証すべく、-71C に結合するタンパク質の同定を行う予定である。

(5) 様々な人種における視物質遺伝子プロモーター-71 の解析



日本人の先天色覚異常において我々が頻繁に見出している -71A→C の塩基置換は、外国では殆ど報告されていない。そこで、様々な人種のゲノム DNA について -71 を調べてみた。

正常色覚の日本人 230 名では 56 名が -71C を持っていた。ただし、-71C を持つ者は必ず -71A も持っていた (= 後続 M 遺伝子が必ず複数あった)。網膜で発現する M 遺伝子の -71 が A であることは、ロング PCR を用いて証明済である (Ueyama ら、Proc Natl Acad Sci 100: 3357- (2003))。

正常色覚の中国人 98 名では 19 名が、正常色覚のタイ人 104 名では 8 名が -71C を持っていたが、これらの 27 名も必ず -71A も持っていた。色覚は不明であるが、カンボジア人 45 名では 2 名、台湾原住民計 20 名では 2 名が -71C を持っていた。

これらに対し、オセアニア (0/9)、南アメリカ (0/17)、米国 (アフリカンアメリカン、0/86)、インド・パキスタン (0/17)、アラビア (0/29)、北アフリカ (0/9)、南アフリカ (0/12)、東ヨーロッパ (0/15)、西ヨーロッパ (1/50) では、西ヨーロッパの 1 名だけが

-71C を持っていた（この例は-71A も持っていた）。

以上のことから、日本や中国を含めた東アジアでは-71C は低くない頻度で存在するが、その他の地域では殆ど見られず、-71C を原因とする色覚異常も東アジア人に特有のものと推測された。

(6) スプライシングの解析

今回の7例を含め、これまでに蓄積された、表現型-遺伝子型不一致の原因が全く分からない色覚異常例は次の通りであった。

1型2色覚： 12例

1型3色覚： 4例

2型2色覚： 0例

2型3色覚： 5例

これらについて、視物質遺伝子全体を発現ベクターにクローニングして培養細胞にトランスフェクションし、スプライシングに異常がないか調べた。

その結果、1型2色覚の12例中2例については、エキソン3に特殊なハプロタイプを持ち、これが原因で、スプライシングにおいて当該エキソンが完全にスキップされることが判明した。1型3色覚の4例中3例も上記のハプロタイプとよく似た特殊なハプロタイプを持ち、エキソン3がかなりの割合(半分以上)でスキップされることがわかった。

エキソン3のハプロタイプを構成する多型は次のようなものである。

コドン						
151	153	155	171	174	178	180
G	C	G	GG	C	A	T
A	A	C	AT	T	G	G

ハプロタイプはこれらの組み合わせであるが、上記1型2色覚2例のハプロタイプは、
G C G A T C G G
であり、上記1型3色覚3例のそれは、
G C G G G C G G
であった。

われわれはこれまでに725例の色覚異常、230例の正常色覚におけるL/M遺伝子を解析してきたが、この2種のハプロタイプはこれらの5例にしか存在せず、極めて稀なものであることを確認した。

ハプロタイプは、多型(=正常のバリエーション)の組み合わせであり、それぞれは異常ではないわけであるが、その組み合わせによってはスプライシングに影響する可能性があることを示した。われわれの成果は、色覚異常の理解にとどまらず、先天性の表現型を遺伝子から考察する場合の新たな視点を提供したものと考えている。

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 Ueyama H, Muraki-Oda S, Yamade S, 他4名: Unique haplotype in exon 3 of cone opsin mRNA affects splicing of its precursor, leading to congenital color vision defect. *Biochem Biophys Res Commun*, 424 : 152-157, 2012 (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.094.
- ② 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)
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.10.006.
- ③ Sanae Muraki, Yasuhiro Nishida, Yuri Harada, 他4名 : A New Muscle Transposition Procedure to Correct Cyclodeviation without Tenotomy. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 46 : e1-e3, 2010 (査読有)
DOI : 10.3928/01913913-20100324-11

[学会発表] (計12件)

- ① 上山久雄, 村木早苗, 他3名 : 杆体一色覚で見出された網膜錐体 cGMP 依存性カチオンチャンネルα鎖のミスセンス変異の機能的解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡市
- ② 村木早苗, 上山久雄, 他4名 : 正常遺伝子型を持つ1型2色覚の遺伝子解析、第66回日本臨床眼科学会、2012年10月26日、京都市
- ③ 村木早苗 : 「色覚異常の診断と治療」先天色覚異常の遺伝と遺伝子。第66回日本臨床眼科学会 (インストラクションコース) 2012年10月25日 京都市
- ④ 村木早苗 : 色覚異常を理解する。第37回日本小児眼科学会総会 (シンポジウム)、2012年6月30日 名古屋市
- ⑤ 上山久雄, 村木早苗, 他3名 : L, M両錐体視物質遺伝子を持つ先天色覚異常-エキソン3の塩基多型ハプロタイプがスプライシングのパターンに影響する、第59回日本生化学会近畿支部例会、2012年5月19日、宇治市
- ⑥ 竹内圭介, 上山久雄, 他2名 : 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年9月23日、京都市
- ⑦ 上山久雄, 村木早苗, 他3名 : 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

学会大会、2011年9月23日、京都市

- ⑧ 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年7月2日、京都市
- ⑨ 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年7月1日、京都市
- ⑩ 東山智明、村木早苗、他3名：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年7月1日、京都市
- ⑪ 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年12月7日、神戸市
- ⑫ 中島智子、村木早苗、他3名：弱視症例のマイクロ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年7月2日、東京都

[図書] (計6件)

- ① 上山久雄：§2 色覚の研究方法「2.5 分子生物・生化学的手法」新編 色彩科学ハンドブック 第3版 (日本色彩学会 (大田登編集長) 編), 東京大学出版会 (東京), 354-358, 2011 (査読有)
- ② 村木早苗：§7 色覚異常 7.2 後天色覚異常「(e) 心因性色覚異常」新編 色彩科学ハンドブック 第3版 (日本色彩学会 (大田登編集長) 編), 東京大学出版会 (東京), 390-392, 2011 (査読有)
- ③ 村木早苗：「麻痺性斜視の治療方針」あたらしい眼科, 27: 1671-1675, 2010 (査読無)
- ④ 村木早苗：「心因性視覚障害」チャイルドヘルス, 13: 39-42, 2010 (査読無)
- ⑤ 村木早苗：「視力の問題と弱視」小児科臨床, 63: 917-922, 2010 (査読無)
- ⑥ 村木早苗：「調節性内斜視の治療－滋賀医大の症例から－」眼科臨床紀要, 3: 33-39, 2010 (査読無)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqophth/far>
be

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

村木早苗 (MURAKI SANAE)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：90335175