

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 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：25462711

研究課題名(和文) 正常遺伝子型の先天性覚異常におけるL/M視物質の遺伝子の解析と発現誘導

研究課題名(英文) Analysis and induction of expression of L/M visual pigment genes in congenital color vision defects having a normal 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本人先天性覚異常51例中、6例が正常遺伝子型であった。これらは、-99T>G、イントロン2の+3A>C、あるいは-71A>Cを持っていた。前2者に関しては、ゲルシフトアッセイやミニジーンを用いての解析を行った。-71Cでは甲状腺ホルモンによる視物質遺伝子プロモーターの活性化が見られなかった。特殊なハプロタイプを持つエクソン3はスプライシングにおいてスキップされるが、保持されるエクソン3とスキップされるエクソン3では、SRタンパク質やhnRNPタンパク質の結合パターンが異なることが明らかになった。また、薬剤を用いて、スキップされるエクソン3をある程度保持させることも可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Among the 51 L/M visual pigment gene arrays in Japanese men with congenital color vision deficiency, 6 arrays had a normal order (L at the first position and M downstream). They had base substitutions such as -99T>G (1 case), +3A>C in intron 2 (1 case) and -71A>C (4 cases). The -99T>G and +3A>C substitutions were analyzed by gel-retardation assay and by using mini-genes, respectively. In the -71C substitution, activation of visual pigment gene promoter by thyroid hormone was not observed. We have already reported that exon 3 with a unique haplotype is skipped at splicing. Exon 3 which is retained at splicing and that skipped showed different pattern in the binding of SR proteins and hnRNP proteins. We found that some drugs can avoid skipping of exon 3 at splicing to some extent.

研究分野：molecular biology

キーワード：cone color vision gene mutation splicing

### 1. 研究開始当初の背景

先天性覚異常は、欧米での研究により、L/M 遺伝子アレー間の不等交差により起こるとされてきた。しかし、日本人の先天性覚異常には、不等交差では説明できない例が少なからず存在することが、われわれの研究により明らかになっていった。すなわち、正常な並びの L/M 遺伝子アレー（先頭が L 遺伝子で後続に M 遺伝子）を持つにもかかわらず色覚異常となっている例が 80 以上存在した。L 遺伝子非発現（あるいは低発現）M 遺伝子非発現（あるいは低発現）の原因を明らかにしたいと考えた。

### 2. 研究の目的

正常な並びの L/M 遺伝子アレーを持つにもかかわらず色覚異常となっている原因を追及するとともに、表現されていない方の遺伝子の発現を誘導する方法を模索することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) L/M 遺伝子アレーの解析

滋賀医科大学附属病院の色覚外来に来られた方から、説明と同意の上採血をさせて頂き、ゲノム DNA を抽出した（滋賀医大倫理委員会承認済）。遺伝子アレーの先頭の遺伝子と後続の遺伝子を別々に、ロング PCR により増幅し、産物を鋳型とした二次 PCR により各エクソンおよびプロモーターを増幅し、それらの配列を決定した。

#### (2) -99T プロモーターの解析

-99T の L 遺伝子プロモーターと -99G のそれをルシフェラーゼレポータープラスミドにそれぞれクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクトした。翌々日に細胞抽出液を得て、そのルシフェラーゼ活性を測定した。標準化には -ガラクトシダーゼ活性を用いた。

-99T を含む L 遺伝子のプロモーター領域と -99G を含む L 遺伝子のプロモーター領域をそれぞれ  $^{32}\text{P}$ -ATP により標識し、WERI 細胞からの核抽出液を用いたゲルシフト法により解析した。

#### (3) イントロン 2 の +3A>C の解析

イントロン 2 の +3 が A であるミニジーンと、C であるミニジーンを調製し、HEK293 細胞にトランスフェクトした。翌々日に RNA を抽出し、オリゴ dT プライマーによる逆転写産物を得て、これを鋳型としたオープン特異的 PCR を行った。増幅産物を電気泳動により解析した。

#### (4) -71C プロモーターの解析

-71A の M 遺伝子プロモーターと -71C のそれをルシフェラーゼレポータープラスミドにそれぞれクローニングし、HEK293 細胞と WERI 細胞にトランスフェクトした。翌日に甲状腺ホルモン ( $\text{T}_3$ ) を添加し、その翌日に細胞抽出液を得てルシフェラーゼ活性を測定した。HEK293 細胞は甲状腺ホルモン受容体 ( $\text{TR}\beta 2$ ) を発現していないので、発現ベクターにクローニングした  $\text{TR}\beta 2$  の cDNA をコトランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性の標準化には -ガラクトシダーゼ活性を用いた。

#### (5) エクソン 3 のスキッピングを回避する薬剤の探索

スプライシングにおいて完全に保持されるエクソン 3 (OK エクソン 3 とする) と完全にスキップされるエクソン 3 (NG エクソン 3 とする) を、前後のイントロンとともにそれぞれ、すでに GFP ベクターにクローニングしてあった L オプシンの cDNA の一部と入れ替えてミニジーンを作製した。これを HEK293 細胞にトランスフェクトし、G418 で選択し、オプシンを恒常的に発現する細胞を得た。

OK エクソン 3 の場合は GFP の蛍光が観察されたが、NG エクソン 3 の場合は蛍光が観察されなかったため、後者を用いて、280 種の生理活性物質を添加し、蛍光を示す細胞が現れるか調べた。

蛍光を示した細胞に関しては、RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて、エクソン 3 を保持した mRNA の発現亢進の程度を解析した。

#### (6) SR タンパク質と hnRNP タンパク質 cDNA のクローニング

HEK293 細胞からの RNA を用いた逆転写 - PCR 反応により、SR タンパク質および hnRNP タンパク質の cDNA を得て、発現ベクターにクローニングした。それぞれ HEK293 細胞にトランスフェクトし、それぞれのタンパク質 (FLAG タグを C 末端に持つ) を発現している細胞抽出液を得た。

#### (7) エクソン 3 の RNA の調製と SR タンパク質および hnRNP タンパク質との結合解析

様々なハプロタイプのエクソン 3 の cDNA を用意し、発現ベクターにクローニングした。エクソン 3 の直下流を切断したプラスミド DNA を鋳型にした、*in vitro* 転写系を用いてエクソン 3 の RNA (U が Br で標識されている) を調製した。抗 BrdU 抗体を結合させたカラムに同 RNA を結合させ、そこへ、(6) の細胞抽出液を加えた。洗いの後、結合しているタンパク質を RNA とともに溶出し、SDS-PAGE により解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) L/M 遺伝子アレーの解析

前回の科研費までに A1~A838 を解析しており、その後、A921 まで例数を増やした。血液が頂けなかった 27 例と女性の 4 例を除く 51 例の解析結果は次のとおりである。

1 型 2 色覚:	10 例	M	5 例
		M-M	2
		M-M'	1
		L-M	2
1 型 3 色覚:	5 例	M-M	2
		M-M'	2
		不明	1
2 型 2 色覚:	17 例	L	13
		L-L	3
		不明	1
2 型 3 色覚:	19 例	L	3
		L-L'	11
		L-M	4
		不明	1

今回の 51 例では、L-M の遺伝子の並びを持つ例が計 6 存在した。1 型 2 色覚の 2 例に関しては L 遺伝子に新規な変異を見出した。1 例はプロモーターに -99T>G の塩基置換、他の 1 例はイントロン 2 に +3A>C の塩基置換を持つことを見出した。両例ともこれ以外の異常はなかった。これらの解析の詳細は(2)項と(3)項で述べる。

2 型 3 色覚の 4 例はすべて M 遺伝子のプロモーターに -71A>C の塩基置換を持っていた。すでに 58 例の同様の例 (-71A>C を持つ 2 型 3 色覚)を見出していたのでさらなる追加例となった。これに関する研究成果は(4)項で述べる。

##### (2) -99T プロモーターの解析

-99T は、網膜での遺伝子の特異的発現に関与するシスエレメントである PCE-1 (photoreceptor conserved element-1) を構成 (<sup>-103</sup>CAATTAA<sup>-97</sup>、下線部) している。ゲルシフトアッセイにおいて、-99T でみられるバンドが -99G ではみられなかったことから、PCE-1 に結合して当該遺伝子発現を保証する転写因子が、-99T>G により結合出来なくなるものと推定された。一方、レポータープラスミドを用いたプロモーターアッセイでは -99T と -99G の間に差は認められなかった。PCE-1 は、錐体への分化には関与するが、プロモーター活性には関与しないものと考えられた。

##### (3) イントロン 2 の +3A>C の解析

ミニジーンを作成しトランスフェクション RNA 抽出 RT-PCR という流れで解析した。+3C では、正常なスプライシングが起らず、エキソン 2 中のコドン 114 (CAG)

にエキソン 3 中のコドン 137 (GG) が続く mRNA のみが作られることが分かった。本来のエキソン 2 - イントロン 2 の配列は GTG/GTAAGC であり、5'スプライスサイトのコンセンサス配列である MAG/GTRAGT と 6 カ所一致しているが、ここに +3A>C が起こると 5 カ所のみ的一致となる。一方、上記のコドン 114-116 の配列は CAGGTCTCT であり、より一致度が高い(こちらは 6 カ所)こちらが選ばれるものと推定された。

本項と前項の成果は Ophthalmic Genet 誌 (2016) に発表した。

##### (4) -71C プロモーターの解析

これまでの解析結果をまとめると、2 型 3 色覚 524 例中の 62 例において -71A>C が見出された。これらの例ではエキソン内やエキソン/イントロン境界に変異はなく、このプロモーターの塩基置換が色覚異常の原因と考えられた。

網膜錐体の分化過程では、まず S 錐体が作られ、これが甲状腺ホルモン (T<sub>3</sub>) などの作用により L 錐体あるいは M 錐体へと分化する。そこで、-71A プロモーターあるいは -71C プロモーターを挿入したレポータープラスミドを、WERI 細胞にトランスフェクトし、1 日後に T<sub>3</sub> (10 μM) を添加してその翌日ルシフェラーゼ活性を測定した。-71A では T<sub>3</sub> 添加により約 2 倍に活性が上昇したが、-71C では全く効果が見られなかった。甲状腺ホルモン受容体 2 (TRβ2) を発現させた HEK293 細胞を用いた解析においても同様の結果であった。

これらのことより、T<sub>3</sub> による M 視物質の発現誘導が、-71A>C により起こりにくくなっていることが示唆された。従って、M 錐体が分化しにくい、あるいは M 錐体が分化してもその M 視物質の濃度が極端に低い状況が考えられた。

これまでの欧米での研究により、2 型 3 色覚は、S 錐体と、極大吸収波長がわずかに異なる 2 種の L 錐体による色覚と考えられてきたが、それに加え、S 錐体と L 錐体、および少数の M 錐体、あるいは光学密度の低い (= 視物質の濃度が低い) M 錐体によるものが存在する可能性を示唆した。これらの結果は、J Biochem 誌 (2015) に発表した。

##### (5) エキソン 3 のスキッピングを回避する薬剤の探索

われわれはすでに、エキソン 3 の特殊なハプロタイプにより、当該エキソンがスプライシングにおいて完全にスキップされることを示していた (Biochem Biophys Res Commun 424: 152-157 (2012))。今回はこのエキソンスキッピングを回避する方法を模索した。

調べた薬剤の中では、微小管の重合を阻害

するコルセミドにより光る細胞が出現することが分かった。その後、ノコダゾールやピンブラスチンなどの微小管重合阻害薬、あるいはパクリタキセルなどの微小管脱重合阻害薬でも同様の効果があることが判明した。

リアルタイム PCR で解析すると、OK エキソン 3 での、エキソン 3 を保持した mRNA の量を 100 とすると、NG エキソン 3 では 1 であったのが、これらの薬剤により 10 程度まで増量することが分かった。さらに詳しく調べたところ、これらの薬剤によるエキソン 3 の保持促進は高々 2 倍であり、L 視物質 mRNA の安定化の方が大きく寄与していることが判明した。今後は、今回確立した恒常発現細胞を用いて微小管阻害薬以外の、細胞毒性の少ない薬剤をスクリーニングする予定である。

これらの成果は、BMB2015 のワークショップ「RNA 病」(2015)において発表した。

#### (6) スプライシングにおけるエキソン 3 スキッピングの機構解明

前項に記したように、エキソン 3 が特殊なハプロタイプを持つとそのエキソンはスプライシングにおいてスキップされてしまう。これがどのような機序で起こるのかを明らかにするため、エキソン認識に重要な SR タンパク質、イントロン認識に重要な hnRNP タンパク質の cDNA を発現ベクターにクローニングし、それらを発現した細胞からの抽出液を用いて解析した。

SR タンパク質の cDNA は、SR1 ~ SR7、SR9、SR11 のすべてが単離でき、これらを用いて調べたところ、OK エキソン 3 の RNA には、SR1、SR2、SR3 すべてが結合可能であるが、NG エキソン 3 の RNA には SR2 しか結合できないことが分かった。一方、hnRNP タンパク質の cDNA は、A1、C1、F、H1、H2、K の 6 種しか単離出来なかったが、これらを調べたところ、F、H1 あるいは H2 が NG エキソン 3 の RNA にのみ結合できることが分かった。

今後は hnRNP タンパク質のさらなるクローニングを進め、エキソン 3 スキッピングの機構を解明して行きたい。なお、これらの成果も、BMB2015 のワークショップ「RNA 病」(2015)において発表した。

#### (7) ゲノム編集と iPS 細胞の調製

色覚異常における -71A>C の意義を明らかにするため、視物質を発現している WERI 細胞を用いたゲノム編集を予定していたが、以下の理由により取りやめた。1 つは WERI 細胞が女性由来の網膜芽細胞腫であり、X 染色体が 2 本 (L-M のアレーと、L-M-M のアレーがあることを確認した) であることであり、もう 1 つは L 視物質と M 視物質の遺伝子の構造がよく似ているため、M 視物質の遺伝子

のみの改変が難しいことであった。

iPS 細胞の調製も -71A>C の意義を明らかにするためであった。-71C を持った色覚異常の方のリンパ球から iPS 細胞を調製し、視細胞への分化過程における -71C の影響を調べる予定であった。ボランティアの色覚異常を 31 例募って解析したところ、6 例が正常な遺伝子の並び (L-M) であることが分かったが、-71A>C は 1 人もいなかったため、iPS 細胞を調製することができていない。今後さらにボランティアを募り、-71C の意義を追及して行こうと考えている。なお、これらの 6 例 (1 型 3 色覚 3 例、2 型 2 色覚 1 例、2 型 3 色覚 2 例) に関しては、変異は見つからないので色覚異常の原因は全く不明である。さらに解析を続けたい。

#### 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 9 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  $\alpha$ -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  
doi: 10.1007/s10384-016-0424-6.

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*. 37(3): (2016) in press. 査読有  
doi: 10.3109/13816810.2015.1120319

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* 40: 146-149 (2016). 査読有  
doi:10.3109/01658107.2016.1162174

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  
doi: 10.1093/jb/mvv034.

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- $\alpha_2$ -glycoprotein for the regulation of blood

pressure. *Hypertens Res.* 38: 244-251 (2015).  
査読有

doi: 10.1038/hr.2014.165.

6. 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-Ophthalmol* 39: 26-29 (2015). 査読有  
doi: 10.3109/01658107.2014.970284

7. 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  
doi: 10.1167/iovs.14-14079

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  
doi: 10.1002/humu.22679.

9. 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  
doi: 10.1016/j.ajo.2013.05.020

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 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ンスキッピングによる先天性色覚異常. BMB2015 (第 88 回日本生化学会大会, 第 38 回日本分子生物学会年會合同大会) ワークショップ「RNA 病」、2015 年 12 月 1 日、神戸市

2. Kurita S, Takeuchi K, Ueyama H, Ohkubo I, Ogikubo O, Ogita H. Correlation of serum Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein concentration with blood pressure and biochemical analysis on the correlation. 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、京都市

3. 上山久雄, 村木早苗, 田邊詔子, 山出新一, 扇田久和. 日本人先天性色覚異常における 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、2014 年 10 月 18 日、京都市

4. 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、2014 年 5 月 17 日、京都市

5. 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, May 7 (2014), Orlando (USA)

6. 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 「小児における先天性色覚異常の診療」 第 118 回日本眼科学会、2014 年 4 月 6 日、東京都

7. Yuichi Niwa, Sanae Muraki, Masahito Ohji . Evaluation of acquired color vision defects of glaucoma using cone contrast test. WOC 2014, 2014 年 4 月 4 日, 東京都

8. 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、2014 年 11 月 29 日、京都市

9. 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、2013 年 4 月 4 日、東京都

〔図書〕(計 6 件)

1. 上山久雄. 118. 色覚. 「光と生命の事典」、240-241 頁、朝倉書店(東京)、2016 年

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. 48-51 頁, 中山書店(東京), 2015 年

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. 87-90 頁, 中山書店(東京), 2015 年

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. 156-158 頁, 診断と治療社(東京), 2015 年

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. 219-225 頁, 中山書店(東京), 2015 年

6. 村木早苗. 小児眼科書 第 2 章 視機能の発達と検査「色覚」28-33 頁、第 28 章 色覚異常 525-531 頁, 三輪書店(東京), 2015 年

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

(3) 連携研究者

なし