

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830057

研究課題名(和文)ラット新規小眼球関連遺伝子の同定と、それをターゲットにした新規マウスモデルの樹立

研究課題名(英文) Identification of causative gene mutation for microphthalmia in rat, and its application for establishment of novel mouse models

研究代表者

和田 健太 (Wada, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：20508113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NAK/Nokhラットは完全な眼球欠損を認める無眼球ラット系統であり、その主要な発症原因となる遺伝子変異は、第16番および2番染色体に存在することを明らかとした。そこで、これら染色体領域を対象とした次世代シーケンス解析により、第16番染色体ではTti2およびCyp4v3、第2番染色体ではGja8およびAbca2がNAKの無眼球症に關与する有力な遺伝子であることが示唆された。さらに、Tti2についてはアミノ酸残基の置換を引き起こすミスセンス変異がNAK特異的に同定された。以上の結果から、本研究はTti2がNAKの小眼球症の原因の一つとなることを強く示唆した。

研究成果の概要(英文)：The Nodai aphakia (NAK/Nokh) rat is one of the promising model for human microphthalmia which exhibits complete lack of the eye. We have reported that intercross progenies between NAK rat and other strains showed heterogeneous phenotypes as bilateral or unilateral anophthalmia or microphthalmia, and have suggested that major causative gene mutation is in chromosome 16 and 2. We conducted RNA-seq and WGS analysis in order to identify gene mutations associated with NAK phenotype, and detected four candidate genes. One of them, we determined cDNA sequence, and identified NAK specific missense mutation. Therefore, we suggested that a missense mutation of this gene is one of causative gene mutation associate with NAK phenotype. In addition, we revealed that several marker protein for retinal development decreased in retina of NAK. Therefore, we suggested that loss of NAK embryonic eye is caused by defects of retinal development.

研究分野：実験動物学

キーワード：小眼球症

## 1. 研究開始当初の背景

無眼球症および無水晶体症を含む小眼球症は、ヒト集団において約 10,000 人に一人の割合で発症する極めて重篤な先天性眼球疾患である。また、小眼球症のほとんどは家族性の遺伝性疾患であることは疑いのないものの、しばしばクリアなメンデル遺伝による伝達を示さず、その病態には多様な個人差が存在すること、また左右の眼球間に異なる病態が示されることも知られている。これまでに、このような個体間および左右眼球間の表現型の差、すなわち、表現型の不均一性を引き起こす遺伝的要因が実証された報告例はない。

我々はその最適なモデル動物となりうる新たなモデルラットを樹立し、Nodai aphakia (NAK/Nokh) と命名した (図 1)。

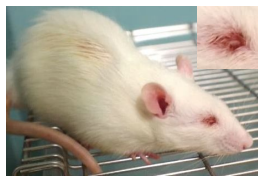


図 1. NAK ラット

また、本ラット系統と他の系統との交配個体が、野生型に加えて両眼性および片眼性の無眼球および小眼球など、ヒトの眼球サイズ異常患者にみられるような多様な表現型が出現し、眼球サイズにも大きなバリエーションが認められた。このことから、NAK ラットはおそらく一つの主働原因遺伝子によって眼球発達不全を発症することが推定されたが、2 種の遺伝的背景が異なるラット系統との交配実験によってラットのゲノムには眼球サイズを修飾する遺伝的要因が存在することが強く示唆された。そこで、戻し交配個体の眼球重量を指標とした連鎖解析を行った結果、高い LOD ピークが第 16 番染色体上に検出され、この領域に主働原因遺伝子が存在することが推定された。

## 2. 研究の目的

本研究は、第 16 番染色体上に同定された NAK ラットの眼球発達不全の主働原因遺伝子、および修飾遺伝子の同定を第一目標に立案した。さらに、第二の目標として、同定した遺伝子群の新規遺伝子改変ラットおよびマウスを作製し、それら遺伝子群の眼球形成への機能の実証を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 連鎖解析

100 個体の  $[NAK \times (NAK \times SD)F_1]N_2$  の眼球重量を測定し、マイクロサテライトマーカーの遺伝子型に基づいた連鎖解析を R/qtl プログラムにより行った。

### (2) RNA-seq 解析による網羅的変異スクリーニング、および遺伝子発現解析

胎齢 12.5 日 (E12.5) および E14.5 の SD、E14.5 の NAK の眼球からトータル RNA を抽出した ( $n = 4 \sim 5$ )。また、BN および Wister 系統からも 1 腹の E14.5 胚から同様にトータル RNA を抽出した。RNA の純度はバイオアライザー (Agilent) により確認し、バイオアライザーにより RIN が 8 以上と診断されたものについて、ライブラリーを作製し、Hiseq 2500 (Illumina) により RNA-seq 解析を行った。また、NAK に特異的な変異が検出された遺伝子については、RT-PCR およびサンガーシーケンスにより塩基配列を決定し、変異解析を行った。

また発現変動が認められた遺伝子については、その検証のために *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的解析を行った。

### (3) WGS 解析

NAK の肝臓組織からゲノム DNA を抽出し、RNA-seq と同様に Hiseq 2500 (Illumina) により全ゲノムシーケンシングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) NAK 小眼球症に関与する複数の遺伝子座

左右眼球重量を区別した連鎖解析により、左眼ではこれまでの結果と同様に 16 番染色体に最も高い LOD スコアが検出されたのに対し、右眼では 16 番染色体よりも高い LOD スコアが 2 番染色体に確認された (図 2)。また、14 番染色体においても LOD スコア 3 を超えるピークが認められたことから、NAK の小眼球症は複数の遺伝子が関与することと推測された。

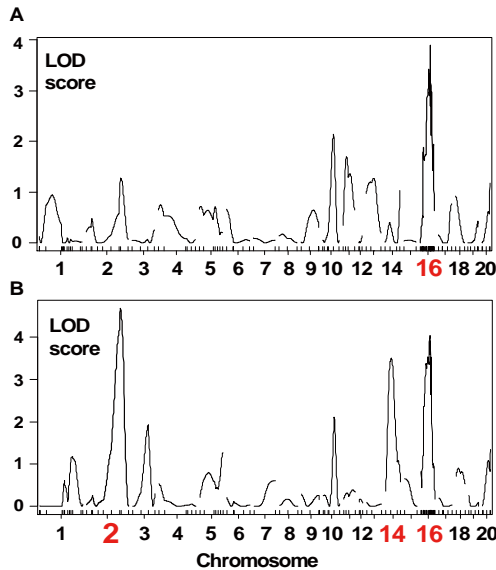


図2. 左右別眼球重量を指標とした連鎖解析. (A) 左眼. (B) 右眼

## (2) RNA-seq による変異スクリーニング・遺伝子発現解析

連鎖解析により NAK の主要な原因遺伝子が存在することと示唆された第 16 番染色体を対象として、RNA-seq により得られた NAK、SD、BN および Wister の塩基配列を比較した結果、*Tti2* 遺伝子において NAK 特異的なミスセンス変異が検出された(図3)。本ミスセンス変異により置換するアミノ酸残基は、マウスから両生類まで保存されていることから、*Tti2* は NAK の小眼球症に関与する遺伝子の一つであることが示唆された。

NAK VVLLKALLKLI~~CDI~~ARDTIPTTEAAKSAVLQETDCLILLDHCSQGQV  
 BN VVLLKALLKLI~~CDI~~ARDTIPTTEAAKSAVLQEA~~TD~~CILLLDHCSQGQV  
 SD VVLLKALLKLI~~CDI~~ARDTIPTTEAAKSAVLQEA~~TD~~CILLLDHCSQGQV  
 Mouse VVLLKALLKLI~~CDI~~SRDTIPTTEAAKSTMLQEA~~TD~~CILLLDHCSQGQV  
 Human LVVLLKALLKLI~~CDV~~ARDPNLTPESVKSALLQEA~~TD~~CILLDRCSQGQV  
 Chicken I~~PV~~LLKALLKMI~~WDV~~HTDQGSTPEPVRAALLQRA~~TE~~CILLDRCSQGQV  
 Frog L~~TLL~~LKALLKLI~~SDV~~SCDPGQTPKSVREALLHSA~~TE~~CILLDRCCNGQV

図3. NAK ラット特異的に検出された *Tti2* のミスセンス変異.

また、E12.5 の SD および E14.5 の NAK 眼球における RNA-seq 解析によって、NAK の発生過程の眼球では *Rax* および *Vsx2* などの網膜発生誘導因子に大幅な発現量の減少がみられた(図4)。

これら遺伝子の発現量の減少を検証するために、*Rax* および *Vsx2* について、それぞれホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的解析を行った。その結果、*Rax* は SD の網膜において強いシグナルが認められたのに対し、NAK においてはそのシグナルの欠失が認められた(図5)。さらに、*VSX2* の免疫組織染色では、SD が網膜に強く発現するのに対し、NAK の網膜にはそのシグナルが認められなかった。一方、眼球形成のマスター分子である PAX6 のシグナルは

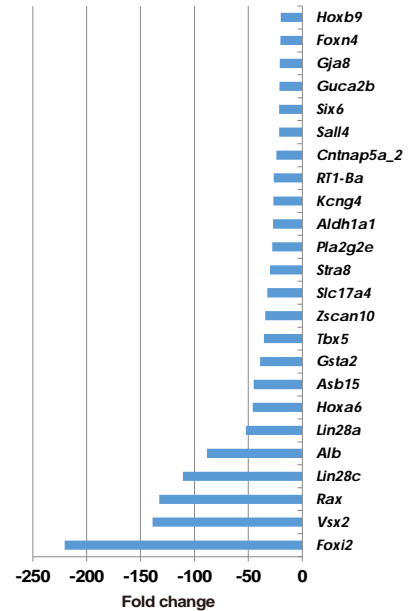


図4. RNA-seq 解析により NAK に減少が認められた遺伝子

SD と NAK の双方の水晶体および網膜に検出され、*SOX2* は NAK の水晶体において発現はみられるものの、それが網膜においては欠失することを確認している。このことから、NAK の無眼球症は網膜の発生異常を原因として引き起こされることと推測した。

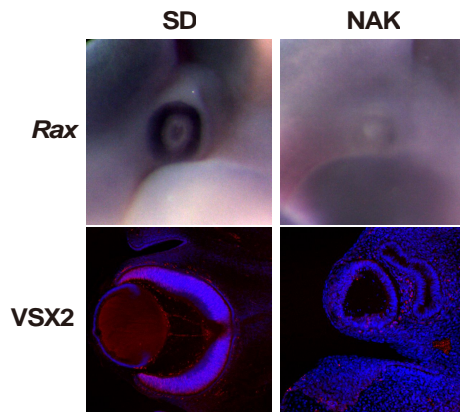


図5. NAK における *Rax* および *VSX2* の発現欠失

## (3) 連鎖解析、WGS および RNA-seq による NAK 小眼球症関連遺伝子のスクリーニング

連鎖解析により絞りこまれた NAK 無眼球関連遺伝子のうち、WGS によって変異が検出され、さらに発現変動した遺伝子、かつ RGD によって眼球機能に関与することが報告されている遺伝子を抽出した。その結果、第 16 番染色体に 2 種類、第 2 番染色体にも 2 種類の候補遺伝子が検出された。

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 4件)

1. \*Gurumurthy CB, Takahashi G, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M. GONAD: A Novel CRISPR/Cas9 Genome Editing Method that Does Not Require Ex Vivo Handling of Embryos. *Curr Protoc Hum Genet.* 2016; 88: Unit 15.8. 査読有り
2. Yoshizawa Y, \*Wada K, Shimoi G, Kameyama Y, Wakabayashi Y, Fukuta K, Hashizume R. A 1-bp deletion in Fgf5 causes male-dominant long hair in the Syrian hamster. *Mamm Genome.* 2015; 26: 630-637. 査読有り
3. Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, Miura H, \*Sato M, \*Ohtsuka M. GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci Rep.* 2015; 5:11406. 査読有り
4. Wada K, Matsushima Y, Tada T, Hasegawa S, Obara Y, Yoshizawa Y, Takahashi G, Hiai H, Shimanuki M, Suzuki S, Saitou J, Yamamoto N, Ichikawa M, Watanabe K, \*Kikkawa Y. Expression of truncated PITX3 in the developing lens leads to microphthalmia and aphakia in mice. *PLoS One.* 2014; 9: e111432. 査読有り

[学会発表](計 3件)

1. Wada, K., Kikkawa, Y. Identification of genetic mutation of the transcription factor encoding genes for lens development in mice. International conference on the lens 2015. December, 2015, Cona, Hawaii.
2. 大久保 咲, 内山博允, 石原真吾, 橋詰良一, 吉川欣亮, 和田健太. 無眼球症ラット NAK/Nokh における RNA-seq 解析. 第 62 回日本実験動物学会総会, 2015 年 5 月, 京都.
3. 大久保 咲, 吉野猛郎, 三瓶 早穂里, 橋詰良一, 吉川欣亮, 和田健太. 無眼球症ラット NAK/Nokh の眼球発生異常と原因遺伝子座の特定. 第 61 回日本実験動物学会総会. 2014. 5. 札幌

[その他]

ホームページ等

[http://dbs.nodai.ac.jp/html/384\\_ja.html](http://dbs.nodai.ac.jp/html/384_ja.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 健太 (WADA, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号: 20508113