

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19614006
 研究課題名（和文） 正常（赤－緑）の遺伝子アレーを持つ先天性覚異常における錐体視物質
 遺伝子の解析
 研究課題名（英文） Analysis of cone visual pigment genes in congenital color vision
 deficiency with a normal-order array of red and green genes
 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：

正常遺伝子型の1型色覚6例のL遺伝子イントロンに変異はなく、5例のエキソン3に稀な多型が認められた。これが当該L遺伝子の非（低）発現に関連している可能性が考えられた。正常遺伝子型の2型色覚のうち-71Cを持っていた3例においてもM遺伝子イントロンに変異はなかった。しかし-71Cを持つM遺伝子プロモーターは、通常のものである-71Aを持つM遺伝子プロモーターの30～40%の活性しかなく、-71Cが当該M遺伝子の非（低）発現に直接的に関与している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：網膜錐体、視物質遺伝子、先天性覚異常、プロモーター

1. 研究開始当初の背景

研究課題名では「赤」、「緑」を用いたが、本報告書では、日本眼科学会の「眼科用語集第5版」に合わせ、「赤」の代わりに「L」、「緑」の代わりに「M」を用いる。

Nathans らによる視物質遺伝子の単離以来、先天性覚異常の原因はL/M遺伝子間の不等交差であるとされてきた。すなわち、正常色覚者では先頭のL遺伝子に続いてM遺伝子が存在する（「L-M」アレー、と表すことにする）が、先天性覚異常では不等交差により、アレーが「Lのみ」、「L-L」、「Mのみ」、あるいは「M-M」となってしまうのである。

しかし、われわれによる、日本人先天性覚異常463例における視物質遺伝子の解析では、L/M遺伝子が正常に（L-M）並んでいる例が53（11%）も存在していた。先天性覚異常が不等交差だけでは説明できないことを示していた。この53例のうち4例はミスセンス変異を持っており、それで表現型が説明できたが、残る49例はエキソンやエキソン/イントロン境界に変異がなかった。この49例中、2型色覚は44例であったが、41例のM遺伝子に-71A→Cの塩基置換が認められた。正常の並びの遺伝子アレーを持つ先天性覚異常は、欧米では殆ど報告がない状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、不等交差では説明がつかない先天性色覚異常の原因を明らかにすることにある。本研究の進展により、遺伝子型-表現型相関の理解が深まるものと期待された。

3. 研究の方法

(1) ゲノム DNA

滋賀医科大学附属病院および日本赤十字名古屋第一病院の色覚外来を訪れた先天性色覚異常の方、および日本人正常色覚者からインフォームドコンセントを得て採血させて頂き、ゲノム DNA を抽出した（滋賀医科大学倫理委員会承認、承認番号 13-7）。

中国人正常色覚男性、タイ人正常色覚男性のゲノム DNA は、それぞれ傳教授、Lertrit 教授から頂いた。欧米人男性、アフリカン（アメリカ在住）男性のゲノム DNA は Coriell Cell Repositories から購入した。

(2) ロング PCR

ロング PCR で先頭の遺伝子（通常は L 遺伝子）と後続の遺伝子（通常は M 遺伝子）を別々に PCR 増幅し、その産物を鋳型にした二次 PCR で各エクソンを増幅した。ロング PCR は、QIAGEN 社の LongRange PCR Kit を用いた。増幅領域の大きさは、L 遺伝子が 15,634 bp、M 遺伝子が 14,285 bp である。

(3) エキシソンの PCR とシーケンシング

① ロング PCR で後続遺伝子が増幅されなければ、視物質遺伝子アレーには 1 個の遺伝子しかない。L か M かをエクソン 5 で判定した。

② 先頭、後続遺伝子がいずれも増幅された場合は、それぞれからエクソン 5 を増幅した。エクソン 5 の解析により、「L のみ」か「M のみ」か、あるいは「先頭遺伝子-後続遺伝子」が「L-L」か「M-M」か、または「L-M（正常）」か、を明らかにした。

③ 「L-L」や「M-M」の場合はエクソン 2、3、4 を増幅し先頭と後続で異なるか否かを見た。「L-M（正常）」の場合のみ、いずれかの遺伝子（1 型色覚であれば発現していない L 遺伝子、2 型色覚であれば M 遺伝子）について変異の有無を調べた。

(4) プロモーターの解析

正常の並び（L-M）を持った例についてはプロモーターの PCR 増幅を行い塩基置換がないか検討した。

(5) プロモーターの機能的解析

レポータープラスミドを用いたプロモーターアッセイを行った。そのために、後続遺伝

子のプロモーターの、-888 ~ +41、-748 ~ +41、-317 ~ +41、-190 ~ +41 の領域を pGL2-Basic プラスミド（Promega 社）にクローニングした。ヒト網膜芽細胞腫培養細胞である WERI-Rb-1 に、作製したプラスミド DNA を、Fugene HD を用いてトランスフェクトした。2 日後に細胞を遠心して集め溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性の測定には東洋ビーネット社（東京）のピッカジン発光キットを用いた。ルミノメーターはマイクロテックニチオン社（船橋）の NU-1422ES を使用した。標準化のための β -ガラクトシダーゼプラスミドは、cDNA を pCR3.1 にクローニングし作製した。 β -ガラクトシダーゼの活性は、ONPG を基質とし、生じる *o*-nitrophenyl を 404 nm で吸光測定した。L/M 遺伝子プロモーターをつないだ pGL2-Basic プラスミドの *Sal*I - *Bam*H I、あるいは *Bam*H I サイトに視物質遺伝子のイントロンをクローニングし、イントロンにおけるエンハンサー活性の有無を検討した。

(6) ミニジーンを用いたスプライシング解析

視物質遺伝子の断片（-53 ~ -46 の *Srf*I サイト~エキソン 2 内の *Bam*H I サイト）を、pFLAG-CMV5 の *Eco*RV - *Bam*H I にクローニングした。作製したミニジーンクローンは、WERI 細胞あるいは HEK293 細胞にトランスフェクションし、2 日後に ISOGEN を用いて RNA を抽出した。RT-PCR は、SuperScript III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq を用いて行った。

プライマー F としてエキソン 1 に、プライマー R として FLAG タグに対応したプライマーを用いた。RNA 抽出のコントロールとして、 β アクチン用のプライマーも用いた。

(7) 視物質遺伝子イントロンの解析

視物質遺伝子アレーの先頭遺伝子と後続遺伝子それぞれをロング PCR で増幅した産物を鋳型とし、二次 PCR でイントロンを増幅し、シーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) 日本人色覚異常では、「L-M」の正常遺伝子型が 10%以上存在することが確認された。

前回の科学研究費報告書（「先天性色覚異常における赤緑視色素遺伝子変異の機能的解析」（代表）山出新一）では、日本人先天性色覚異常 463 例（A514 まで）における視物質遺伝子の解析結果について記した。ここでは、その後の 197 例（A515~A711）について述べる。

① 1型2色覚 (35例)

「M」アレー： 13例

「M-M」アレー： 14例

「M-M'」アレー*： 5例 - 5例
とも後続遺伝子に-71A→Cの塩基置換

「L-M」アレー#： 2例 - 1例に
ミスセンス変異

確定不能： 1例 - 2色覚か3色覚
か確定不能

* 「M-M'」アレー (先頭のM遺伝子と後続のM'遺伝子の構造が異なり、産物の吸収特性にも違いがある)は1型3色覚の遺伝子型であり、遺伝子型-表現型不一致が存在した。しかし、5例とも後続遺伝子に-71A→Cの塩基置換が存在し、後続遺伝子の発現が弱い、あるいはないため、2色覚になっているものと推測された。

「L-M」アレーの2例中1例にはL遺伝子にPro187Leuのミスセンス変異が認められ、これが当該L遺伝子の産物の機能障害を引き起こしているものと推定された。残る1例(A642)のL遺伝子には変異が認められなかった。

② 1型3色覚 (16例)

「M-M'」アレー： 16例

全例、遺伝子型と表現型が一致した。ただし、「M視物質においてはエキソン2によってコードされるアミノ酸配列は分光吸収特性に影響しない」とされているが、先頭M遺伝子と後続M遺伝子でエキソン2のみが異なっていたのは7例もあり、M視物質においてもエキソン2は波長の弁別に関与していると考えないと表現型の説明がつかない。

③ 2型2色覚 (41例)

「L」アレー： 29例

「L-L」アレー： 4例

「L-M」アレー： 1例 - M遺伝子
に-71A→Cの塩基置換

確定不能： 7例 - 2色覚か3色覚
か確定不能

④ 2型3色覚 (64例)

「L」アレー*： 5例

「L-L」アレー#： 2例

「L-L'」アレー： 35例

「L-M」アレー： 4例 - 4例とも
M遺伝子に-71A→Cの塩基置換

確定不能： 18例 - 2色覚か3色
覚か確定不能

「L」アレー* (アレーを構成する遺伝子がLの1個のみ)と「L-L」アレー# (先頭のL遺伝子と後続のL遺伝子の構造が同じ、あるいは、産物の吸収特性に違いがない)は2型2色覚の遺伝子型である。いずれも等色幅は広く本当は2色覚であるが3色覚に分類され

たものと推測された。

⑤ PCD (pigment color defect、2型3色覚の特殊型) (10例)

「L-M」アレー： 10例 - 全例、
M遺伝子に-71A→Cの塩基置換

PCDの定義としてわれわれは、「アノマロスコプでの等色中央値が30-50にあり、等色幅が15を超えない2型3色覚」を採用している。今回の10例を含め、全部で26例がこれに当てはまっているが、全例が「L-M」アレーを持ち、しかもM遺伝子に-71A→Cの塩基置換を持っていた。

④で「L-L'」アレーを持っていた典型的な2型3色覚の35例では、等色中央値が18.1であり、30を超えた例も1例しかなく、PCDは明らかにこれとは異なった表現型であることが確認された。

⑥ まとめ

A515~A711で、31例は対象から除外(女性、採血させて頂けなかった例、兄弟、正常色覚など)されたので、これらを除いた166例中、

遺伝子型と表現型が一致： 111例
(66.9%)

2色覚と3色覚の不一致： 12例(7.2%)

正常遺伝子型： 17例(10.2%)

遺伝子型確定不能： 26例(15.7%)
であった。

(2) 視物質遺伝子イントロン内に新規な多型を15か所に見出した。

日本人先天色覚異常では10%以上が「L-M」の正常遺伝子アレーを持っていたが、その殆どはエキソンやエキソン/イントロン境界に変異がなかった。

M遺伝子のプロモーターには-71A→Cの塩基置換が多数例で見られたが、これが当該M遺伝子の発現低下に直接関わっているのか、あるいは、イントロン内の未知の変異と連鎖不平衡の関係にあるのかについては不明であった。

そこで、視物質遺伝子のイントロン内の変異を検索する計画を立てたが、それに当たっては、正常の多型を知る必要が生じた。

NCBIのSNPデータベースには視物質遺伝子の多くの多型が登録されてはいるが、

① L遺伝子とM遺伝子を区別していない

② 表現型(色覚)を確認していない

③ 頻度を示していない

点に問題があると思われた。

また、正常の視物質遺伝子アレーには、L-M、L-M-M、L-M-M-M、L-M-M-M-Mなどのバリエーションがあるが、3番目以降の遺伝子は網膜で発現せず、有害な変異を持

っている可能性があり、それが多型として登録されている可能性もあった。

そこでまず、2 遺伝子 (L-M) のアレーを持つ日本人正常色覚男性 30 名から、先頭の L 遺伝子、後続の M 遺伝子をロング PCR で増幅してそれぞれ多型を調べた。その結果、多型を 3 種類に分類することができた。

それらは、

[NJ] データベースに登録されている多型であるが、多型を確認できなかったもの (no polymorphisms in Japanese)

[LM] L 型と M 型に分類可能な多型 (L/M 遺伝子間の多型)

[PO] L/M 遺伝子のいずれか、あるいは両方で多型 (polymorphisms) であり、[LM] と [PO] には今回新たに見出された 15 の多型が含まれる。

これらの結果が欧米人や (アメリカ在住) アフリカンにも当てはまるかどうかを知るため、それぞれから男性 13 名ずつ選び、同様の解析を行った。なお、これらの男性の色覚は不明である。

[NJ] : 23 種がこれに分類された。欧米人 13 名とアフリカン 13 名 (後続遺伝子では 4 名) の解析では、10 か所で多型が確認できたが、そのうち 9 か所はアフリカンでだけ、残る 1 か所は欧米人でだけ多型が確認できた。他の 14 か所ではやはり多型は確認できなかった。

[LM] : 15 種がこれに分類された。日本人での結果をもとに、L 遺伝子特異的な塩基、M 遺伝子特異的な塩基を 15 か所リストアップしたわけであるが、うち 14 か所は欧米人でも確認できた。アフリカンは後続遺伝子の解析数が 4 と少ないが、非アフリカンと比べると多型の頻度が高いことが示唆された。それでも、L/M 遺伝子間に多型の偏りが見られたのは 6 か所あった。

[PO] : 残る 29 種類はこれに分類された。サイト 46 とサイト 47 の多型は日本人のみならず、欧米人やアフリカンにおいても完璧に連鎖していた。

(3) イントロンにも、エキソンと同じように L 型と M 型とがあることを見出した。

これは、前項の [LM] に分類された多型のことである。エキソンには L 型と M 型とがあるが、イントロンにも L 型と M 型とがあることを示したのはわれわれが最初である。

(4) エキソンやエキソン/イントロン境界に変異がなかった正常遺伝子型の 1 型色覚 6 例では、L 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが、意義のある変異は見出せなかった。

正常な遺伝子の並び (L-M) であるにも関わらず 1 型色覚で、かつ、エキソンやエキソン/イントロン境界やプロモーターに変異がなかった 6 例について L 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが、塩基置換は 1 例

(A185) でのみ検出された。GG が AG となる塩基置換であり、新たなスプライシングのアクセプターサイトとなる可能性があったが、ミニジーンを用いたスプライシングの解析の結果、この可能性は否定された。

しかし、5 例において、エキソン 3 の多型が当該 L 遺伝子の非発現 (あるいは低発現) に関連している可能性を見出した。すなわち、エキソン 3 に注目すると、5 例が、Leu¹⁵³-Ala¹⁷⁴-Val¹⁷⁸-Ala¹⁸⁰ の多型を持っていた (塩基では C¹⁵³-C¹⁷⁴-G¹⁷⁸-G¹⁸⁰)。われわれの解析例や外国での解析例 (合計して 2,000 遺伝子以上) を詳細に検討した。Leu¹⁵³-Ala¹⁷⁴-Val¹⁷⁸-Ala¹⁸⁰ は 7 例 (そのうち 5 例はわれわれの解析例) であり、全例で当該遺伝子の非発現 (あるいは低発現) が示唆されていた。一方、Met¹⁵³-Ala¹⁷⁴-Val¹⁷⁸-Ala¹⁸⁰ (塩基では A¹⁵³-C¹⁷⁴-G¹⁷⁸-G¹⁸⁰) は 9 例あったが、全例で当該遺伝子の発現が確認できた。

以上のことより、Leu¹⁵³/Met¹⁵³ や、Ala¹⁷⁴/Val¹⁷⁴、Ile¹⁷⁸/Val¹⁷⁸、Ser¹⁸⁰/Ala¹⁸⁰ 自体は正常な多型であるが、その組み合わせによっては、視物質遺伝子の発現に影響する可能性が考えられた。今後は、これらの多型を持った cDNA を作製し、その発現を検討してゆく予定である。

(5) 正常遺伝子型の 2 型色覚のうち、-71C を持っていなかった 3 例中 2 例について M 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが、意義のある変異は見出せなかった。

全 3 例中 2 例 (A42 と A303) について、その M 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが、全く変異が見いだされなかった。これらでは、プロモーターを含め全く異常が検出されなかったことになる。なぜ M 遺伝子の非発現が起こっているのか、未だに不明である。

(6) 正常遺伝子型の 2 型色覚のうち、-71C を持っていた 47 例中 3 例について M 遺伝子の全領域をシーケンシングしたが、意義のある変異は見出せなかった。

A315 でのみ、イントロン 5 に CT から GT への塩基置換が認められたが、前後の塩基配列から、スプライシングの新たなドナーサイトにはなり得ないと推定された。また、イントロン 5 にエンハンサー活性があるか、M 遺伝子のプロモーターをつないだルシフェラーゼプラスミドにさらにイントロン 5 をつないで検討したが、エンハンサー活性は認められ

なかった。従って、この変異がエンハンサー活性を損なうという可能性も否定された。

(7) プロモーター活性を調べたところ、-71Cを持つM遺伝子プロモーターは-71Aを持つM遺伝子プロモーターの30～40%のプロモーター活性しかなく、L遺伝子プロモーターと同程度であることを見出した。

M遺伝子のプロモーターが、L遺伝子のプロモーターの数倍高い活性を持つことが確認できた。LCR (locus control region) にL遺伝子は近く、M遺伝子は遠いので、LCRの作用を受けるためにM遺伝子プロモーターはL遺伝子プロモーターよりも活性があるものと考えられた。しかし、-71Cを持つM遺伝子プロモーターは、L遺伝子プロモーターと同等の活性しかなかった。-71Cを持つM遺伝子プロモーターはLCRの作用を受けにくくなっているのではないかと推定され、-71Cが、当該M遺伝子の非発現(あるいは低発現)の原因であることが示唆された。

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 6件)

- ① Seiko Ohno, Futoshi Toyoda ら 15 名 (Hisao Ueyama は 9 番目): Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. Hum Mutat 30: 557-563 (2009) 査読あり
- ② 村木早苗: 【小児眼科診療】 疾患特性と診療指針 心因性視障害. 眼科プラクティス. 20: 276-279 (2008) 査読なし
- ③ 村木早苗: 【目の病気における看護ケアのポイント 入院治療を要する重症眼疾患を対象に】 知っておきたい知識 子どもの斜視と弱視. 小児看護 31: 1725-1729 (2008) 査読なし
- ④ 村木早苗: 【間欠性外斜視・続発性外斜視・廃用性外斜視・A-V型外斜視・交代性外斜視・不同視弱視・屈折異常弱視・心因性視力障害】 今日の眼疾患治療指針 第2版 (2007) 査読なし
- ⑤ 村木早苗: 眼科誌上グラウンドラウンド 先天色覚異常. 日本眼科紀要 58: 111-112 (2007) 査読あり
- ⑥ Sanae Muraki-Oda, Futoshi Toyoda, Akira Okada, Shoko Tanabe, Shinichi Yamade, Hisao Ueyama, Hiroshi Matsuura, Masahito Ohji: Functional analysis of rod monochromacy-associated missense mutations in the CNGA3

subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel. Biochem Biophys Res Commun 362: 88-93 (2007) 査読あり

[学会発表] (計 10件)

- ① 村木早苗, 西田保裕, 柿木雅志, 大路正人: 回旋斜視に切臍せず直筋筋腹を回転移動した2例. 第62回日本臨床眼科学会 一般講演, 2008年10月26日 於東京.
- ② 西川亜希子, 南川貴之, 村木早苗, 西田保裕, 大路正人: 治療時期の異なった鼻性視神経症の2例. 第114回京都眼科学会 一般講演, 2008年6月1日 於京都.
- ③ 中島智子, 西田保裕, 村木早苗, 大路正人: 強度近視性内斜視の片眼例. 第114回京都眼科学会 一般講演, 2008年6月1日 於京都.
- ④ 西田保裕, 村木早苗, 安田周子, 須賀美保子, 大路正人: 強度近視性内斜視の術中外眼筋の偏位計測. 第112回日本眼科学会総会 一般講演, 2008年4月18日 於横浜.
- ⑤ 村木早苗: 色覚異常のアップデート 色覚異常と遺伝. 第112回 日本眼科学会大会. 教育セミナー, 2008年4月17日 於東京.
- ⑥ 上山久雄, 豊田太, 村木早苗, 松浦博, 大久保岩男: 網膜錐体 cGMP 依存 (CNG) チャネル α サブユニットの杆体一色型色覚における変異の電気生理学的解析. 第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会 合同大会. 2007年12月12日 於横浜.
- ⑦ 村木早苗, 西田保裕, 三田実千代, 石井正宏, 三宅太一郎, 大路正人: 成人における外斜視手術症例の検討. 第61回日本臨床眼科学会 ポスター, 2007年10月13日 於京都.
- ⑧ 村木早苗, 中村真理子, 長谷川結子, 植松久美子, 菅江繁幸, 伊藤 拓, 西田保裕, 大路正人: MP-1 を用いた偏心視訓練の試み. 第8回日本ロービジョン学会学術総会 一般講演, 2007年9月23日 於大阪.
- ⑨ 中村真理子, 村木早苗, 長谷川結子, 植松久美子, 西田保裕, 大路正人: MP-1 を用いた偏心視訓練を試みた1例. 第63回日本弱視斜視学会総会 一般講演, 2007年6月15日 於名古屋.
- ⑩ Sanae Muraki, Hisao Ueyama, Shoko Tanabe, Shinichi Yamade, Masahito Ohji: Analysis of L-cone/M-cone visual pigment genes in Japanese color-vision deficient men with a

normal array. 2007 ARVO Annual Meeting.
2007 May 7 at Fort Lauderdale (USA)

〔図書〕（計 3件）

- ① 上山久雄：8章 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]（東京大学出
版会、太田登編）.（2009）. 印刷中
- ② 村木早苗：8章 8. 色覚異常 8.2.4
心因性色覚異常. 新編色彩科学ハンドブ
ック[第3版]（東京大学出版会、太田登
編）.（2009）. 印刷中
- ③ 上山久雄：正常（赤－緑）の遺伝子アレ
ーを持つ先天色覚異常における錐体視物
質遺伝子の解析. 平成19年度～平成20
年度 科学研究費補助金（基盤研究（C）
（2））（課題番号19614006）研究成果報
告書 全81ページ（2009年3月）.

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

山出 新一 (YAMADE SHINICHI)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40117916