

ゲノム塩基配列の網羅的解析法による疾患遺伝子探索と新規分子生命現象の発掘

● 藪島 伸生¹⁾ ◆ 大石 健太郎¹⁾ ◆ 大坪 正史¹⁾ ◆ 堀田 喜裕²⁾ ◆ 森脇 真一³⁾

1) 浜松医科大学光量子医学研究センター 2) 浜松医科大学眼科 3) 大阪医科大学皮膚科

<研究の目的と進め方>

- (1) 未同定の疾患原因遺伝子の候補領域の詳細な解析による正確な転写物マップの作成：緑内障等の疾患原因遺伝子候補領域を、我々が開発したゲノム悉皆解析法で解析し、より完全なトランスクリプトマップの作成と転写物の遺漏無き同定・単離を行う、疾患原因遺伝子探索に供する。
- (2) 疾患原因・関連遺伝子の探究：老化とともに増加する二大失明疾患（緑内障、加齢黄斑変性）の発症関連・原因遺伝子を探索し、背景にある現象を解明して医療への活用を目指す。◆緑内障の原因遺伝子は3種類知られているが、それらに変異が見つかる症例は数%にすぎない。本研究では、我々が収集している本邦家系のリンケージ解析と、拡張候補遺伝子アプローチおよびゲノム悉皆解析法により新規原因遺伝子を探索する。また、関連する遺伝子産物群の相互作用等の解析を行い、発症の背景で機能する分子ネットワークを追究する。◆加齢黄斑変性の原因は不明であるが、長期間の太陽光への曝露がリスクファクターの一つとして報告されている。明瞭な遺伝性の症例は少ないが、動物モデルを利用して発症に関連する遺伝子産物を同定して機能を解析することで発症機構解析を目指す。
- (3) 眼の発生と視覚実現に寄与する遺伝子群の同定と相互作用の解析：眼の発生と視覚実現に寄与する遺伝子群の同定と相互作用の解析を行う。モデル動物としてメダカを採用し、「猫目症候群」の原因候補遺伝子のメダカ相同遺伝子を単離して、その機能を解析することで同症候群の発症機序に迫る。
- (4) 遺伝子変異・表現型データベース構築：上記の研究から得られる情報を含めた遺伝子とその変異、タンパク相互作用の変化、疾患症状等に関するグラフィカルなデータベースを構築する。従来から構築している疾患遺伝子変異データベース *MutationView* と遺伝子疾患症状統合データベース *SYMPHONIE* の両方に関して、システム構築を継続し、インターネットでの公開を行う。

<2008年度の研究の当初計画>

1. 緑内障の新規遺伝子探索と背景現象の解明
 - 1-1 リンケージ解析：収集した緑内障家系をゲノムワイドな多型マーカーを用いてリンケージ解析する。
 - 1-2 既知原因遺伝子ミオシリン (MYOC) の相互作用タンパクの機能解析：細胞外で機能するタンパクに関してマウス等の生体眼組織における相互作用を共免疫沈殿とウェスタンブロット法で確認する。眼組織内での各遺伝子の発現分布を、免疫組織染色、ノーザンブロット、RT-PCR 等により解析する。他の眼疾患の原因・関連遺伝子に関しては、それぞれの発症機構の関連も考察する。
 - 1-3 既知原因遺伝子オプチニューリン (OPTN) の相互作用タンパクの機能解析
 - 1-3-1 OPTN のストレスによる核移行に関連が想定できるタンパク：OPTN の神経脆弱性保護機能とストレス負荷時の核への移行に注目し、その現象に関連が想定される相互作用タンパクの性状解析を行う。
 - 1-3-2 網膜色素変性原因 NRL タンパク：生体眼組織での相互作用を検出するために、共免疫沈殿とウェスタンブロット法を行う。NRL の変異で起こる網膜色素変性との関連も考察する。
2. 加齢黄斑変性の関連遺伝子探索

同疾患のラット実験モデルを利用する。すなわち、ラットに白色光を照射することで、視細胞および網膜色素上皮細胞がアポトーシスを起こして加齢黄斑変性様の症状（網膜光障害）を呈するモデルである。網膜光障害の感受性が系統により異なるため、それらを交配して当該感受性遺伝子を同定する。
3. データベース構築

疾患遺伝子変異データベース *MutationView* と遺伝子疾患症状オントロジーデータベースの *SYMPHONIE* の構築を継続する。

SYMPHONIE は、現在の眼科、皮膚科、耳鼻咽喉科の疾患データを充実するとともに、泌尿器科、精神・神経科領域の疾患も構築を開始し、逐次インターネットで公開する。

<2008年度の成果>

1. 緑内障の新規遺伝子探索と背景現象の解明
 - 1-1 リンケージ解析：収集した症例のうち、比較的大きな家系について多型マーカーを用いてリンケージ解析を開始した。連鎖が推測される領域が複数得られているが、中でも 8p21.3 付近の D8S258 は LOD 値 2.50 を示し、新たな緑内障原因遺伝子の存在可能性を示唆した。
 - 1-2 既知原因遺伝子ミオシリン (MYOC) の相互作用タンパクの機能解析：細胞外で機能する 3 種類の相互作用タンパク (SERPINF1, Fibulin 5, Opticin) を培養細胞にて MYOC と共発現相互作用を確認できた。これらのタンパクは、他の眼疾患 (SERPINF1, 糖尿病性網膜症; Fibulin 5 と Opticin, 加齢黄斑変性) との関連が報告されている。このうち、SERPINF1 (=Pigment Epithelium-Derived Factor, 以下 PEDF) についてはさらに検討を加えており、現在までの主な結果を以下に挙げる。
 - a) カニクイザルの眼組織からの抽出タンパクを用いて共免疫沈殿を行ったところ、同組織においても MYOC と PEDF は結合した。生体内で MYOC が他のタンパクと結合することを示した報告は今までにない。
 - b) 変異 MYOC は細胞内に沈着して分泌されないとされているが、培養細胞での強制発現では可溶性の順に TritonX-100 可溶性 (画分 I)、SDS 可溶性 (画分 II)、ギ酸可溶性 (画分 III) の 3 画分にわたって存在することがわかった。そして、興味深いことに、MYOC の変異によっては、PEDF との共発現により、画分 II、III 中の量が減少し、画分 I 中の量が増加していることも明らかになった。
 - c) PEDF は糖鎖修飾を受ける前の分子が MYOC に対してより高い結合能を有することが判明した。
 - d) 若年マウスの眼組織を用いた MYOC の免疫組織蛍光染色により、これまで報告されていなかった網膜色素上皮 (RPE) 細胞 (特に神経網膜側) において、MYOC の局在を確認した。一方、PEDF 遺伝子の産物は網膜内毛細血管および一部の神経節細胞に認められ、さらに RPE 層に隣接する脈絡膜毛細血管においても強く認められた。この結果は、網膜、特に RPE 及び脈絡膜における MYOC と PEDF の相互作用の可能性をさらに補強すると考えられた。
 - 1-3 既知原因遺伝子オプチニューリン (OPTN) の相互作用タンパクの機能解析
 - a) OPTN のストレスによる核移行に関連が想定できるタンパク：ストレス負荷に伴って OPTN のゴルジから核への移行、OPTN の発現上昇、他遺伝子の発現変化等が報告されており、それらの各過程に関連が想定される OPTN 相互作用タンパクを同定した (下記例示)。
 - (1) 機能不全で細胞死を誘導し得るタンパク：SLC4A2, ATP6V0E2, VDAC2
 - (2) ゴルジ装置へ核移行に関与し得るタンパク：rootletin, DYNLL1, CETN2, TAGLN, RANBP10
 - (3) 核移行後の機能に関与するもの：UBC, WSB2, FALZ
 - b) 網膜色素変性原因 NRL タンパク：ラットの生体眼組織の核画分を用いて共免疫沈殿とウェスタンブロット法により、OPTN - NRL の相互作用を示すことができた。
2. 加齢黄斑変性の関連遺伝子探索

加齢黄斑変性のラット実験モデルを利用して、同疾患関連遺伝子の同定を目指している。この実験モデルでは、白色ラットに「午前 0:00 より白色蛍光灯の光を 3000 lux の明るさで頭上より 3 時間照射する」ことにより、視細胞および RPE 細胞がアポトーシ

スを起こして加齢黄斑変性様の病理所見（網膜光障害）を呈する（図1）。網膜光障害の感受性がラットの系統により異なる（図3）ため、戻し交配および光感受性スクリーニングを繰り返すことで、当該感受性遺伝子を含むゲノム領域を遺伝学的に狭めることを試みた。光照射の条件と、水迷路を用いた行動学的手法による網膜光障害のスクリーニング法（図2）は確立できた。そこで、光感受性の系統(WKY)と耐性の系統(LEW)を交配したところ、F-1は雌雄に関わらず光感受性（優性）を示した。以後、LEWとの戻し交配を繰り返し、現在までに戻し交配(BC)世代1~3(BC-1~BC-3)を得ている。さらにBC-4の作製を行っている。各BC集団の光感受性プロファイルは3世代に渡り高度に類似していた。さらに2種類の対数正規分布曲線を組み合わせることにより光感受性および耐性を呈するBCラットの構成比率をシミュレーションしたところ、各世代(BC-1, -2, -3)において、約46%、42%、59%の個体に光感受性遺伝子が受け継がれていることが明らかとなった。この結果から、WKYラットの光感受性形質は、常染色体優性の遺伝子1種類が担うことが推定された。

3. データベース構築

MutationView と SYMPHONIE のデータ構築を継続している。前者については、データの大幅な増補が成り、現在 403 遺伝子、698 疾患に関して 5,081 篇の文献から収集した 26,977 件の変異データを後述の URL から公開している。

<国内外での成果の位置づけ>

開放隅角緑内障の原因遺伝子は、現在までに4種類同定されたが、家族性の症例でそれらの遺伝子に変異が見つかるのは数%に過ぎない。また、各原因遺伝子の機能解明、発症の分子機構の統一的な理解はほとんどなされていない。本研究は、既知原因遺伝子の相互作用タンパクの機能と、相互作用の意義を追究し、緑内障の未知の背景現象を探る、それらに関与する遺伝子の中から新たな原因遺伝子を見出そうとするもので、世界の先端の研究者と競っていると考えている。また、遺伝子疾患を対象とした症状-病名-原因遺伝子のデータベースは世界に類型を見ない。

加齢黄斑変性症は多因子遺伝の様式を取り、これまでに患者ゲノムの連鎖解析などにより30を超える候補遺伝子が報告されてきたが、発症機序との関係が解明されていない。本研究におけるラット網膜光障害モデルを用いた遺伝学的アプローチにより、網膜光障害の感受性遺伝子が同定でき、その遺伝子の性状解析を進めることにより網膜光障害機序の推定、さらにヒトでの太陽光が関係する加齢黄斑変性の発症機序解明への発展ができると考えられる。我々が開発した網膜光障害の行動学的スクリーニング法は、感受性の確認後に次世代を作成できるという大きな特徴があり、これまでに報告されていない。また、別のスクリーニング法による、マウスを用いた遺伝学的アプローチが、海外の研究室で試みられたが、発症機序に本質的に関連する遺伝子は報告されていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

SYMPHONIE のデータ構築は、各臨床科別に疾患の症状や鑑別を熟知している経験豊富な医師の力に頼る部分が大きい、人材の確保が容易でない。そのため、データベースの拡充が予定より遅れている。

<今後の課題>

1. 緑内障の新規遺伝子探索と背景現象の解明
 - 1-1 8p21.3付近に集中して多型マーカーを追加設定し、新たに得た検体も加えて詳細な解析を継続する。
 - 1-2 MYOC と PEDF の発現と相互作用は隅角近傍の他、網膜でも起きている可能性が高いので、免疫染色や FRET を用いて証明を試みる。
 - 1-3 単離した OPTN 相互作用遺伝子については、細胞の抗体染色、共免疫沈殿等の方法で相互作用の確認と機能解析を進める。
 - 1-4 組織レベルでの MYOC-PEDF 間の相互作用の可能性を追究するために、老齢マウスおよび高眼圧マウスの眼組織における共局在の有無について検討する。
2. 加齢黄斑変性の関連遺伝子探索

BC-4 以降の光感受性スクリーニングおよび戻し交配を継続する。BC-3 では WKY ゲノム中の感受性遺伝子領域の濃縮度が相当増加していることが期待できるので、WKY と LEW の系統を区別できる多型マーカーを用いてその領域の決定を開始し、同遺伝子のクロニングを目指す。
3. データベース構築

MutationView と SYMPHONIE のデータ構築を継続する。
<成果公表リスト>

- 1) 論文
1. 0801291423

Wang C, Nakanishi N, Hikoya A, Koide K, Ohishi K, Sato M, Nakamura M, Hotta Y, Minoshima S: Novel RDH5 mutation in family with mother having fundus albipunctatus and three children with retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet.* 29(1):29-32,(2008).

2. 0811141921
Yamaguchi-Kabata Y, Shimada MK, Hayakawa Y, Minoshima S, Chakraborty R, Gojobori T, Imanishi T: Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes. *PLoS ONE.* 3(10):e3393,(2008).
3. 0802041604
Yamasaki C, Murakami K, Fujii Y, Sato Y, Harada E et al (Minoshima S, Ohtsubo Mを含む): *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D793-799,Epub,(2008).

2) データベース/ソフトウェア

1. 0608082249
MutationView (<http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp/>) (慶大との共同研究で10年来構築しているヒト遺伝子疾患における変異のデータベース。高度なGUIと分散データベース機能を有する。本年度データの大幅な増補を行った。)
2. 0801291353
SYMPHONIE (<http://symphonie.mpb.hama-med.ac.jp/>) (遺伝的要因が関与する疾患の症状オンロジーデータベース。遺伝的要因が関与する疾患を対象とし、それらの疾患の患者が示す症状をオンロジーとして記述してオブジェクトデータベースに収納した上で、症状からあるいは疾患や遺伝子からオンラインでビジュアルに検索を可能にしたシステム。現在

図1 Retinal Photic Injury < Haematoxylin-Eosin staining >

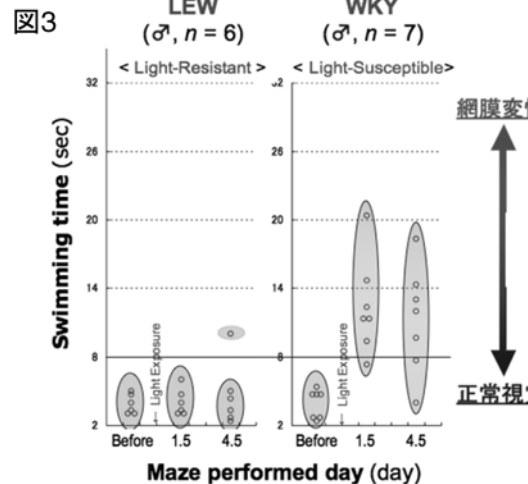
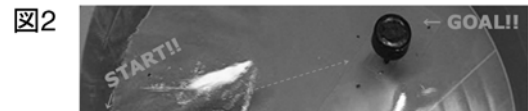
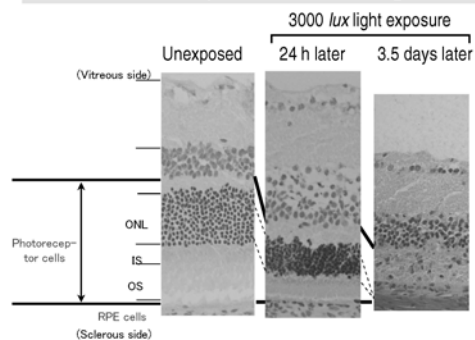


図1 ラットに光照射すると視細胞とRPE細胞がアポトーシスを引き起こし、網膜外層が菲薄化し、瘢痕化する。

図2 モリス水迷路装置を用いた光照射後のラットの視覚査定の様式。ゴールまでの所要時間のみを測定・評価。

図3 光照射前後での視覚査定の結果の系統差。