

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. 未同定疾患原因遺伝子候補ゲノム領域の精密転写物マップの作成

原因遺伝子未知の遺伝子疾患のリンケージ解析等の情報を基礎として染色体特定領域を Mb オーダーの長さで選択し、自ら確立した「ゲノム悉皆解析法」により網羅的に遺伝子を探索し、新規遺伝子、新規転写物を予測して、実験による裏付けも行なって精密な転写マップを作成する。

「ゲノム悉皆解析法」は以下のとおりである。

- (a) 注目するゲノム領域内で反復配列、CpG 配列、公共データベースとの BLAST による相同性検索、ドットマトリクスによる欠失・重複・相同性検索、*ab initio* ソフトウェアによるエクソン予測、他生物とのゲノム塩基配列比較等の可能な限りの解析を行なう。
- (b) (a) の結果を手作業で綿密に検討し、転写物 (cDNA や EST) の統合・連結による「真の全長遺伝子の確定」、転写物未同定なるも遺伝子存在可能性の高い領域における転写物検出を実験により行い、領域内全遺伝子の全長 cDNA の単離・ゲノム構造の確定を目指す。さらにドメイン構造等から機能の推定を可能な限り進める。

対象疾患は、緑内障、加齢黄斑変性 (AMD) 等、遺伝要因の大きい失明疾患とする。対象ゲノム領域は、次の 3 種類とする。

- (1) 既報告のリンケージ解析による候補領域
- (2) 本研究で収集する患者家系を用いて得られる予定の新規候補領域
- (3) 解析予定の疾患動物モデルから得られる疾患関連領域のヒト相同領域群

2. 疾患原因/関連遺伝子の探究

眼、皮膚など、光に関連する器官や組織で起こる遺伝子疾患の原因遺伝子探索及び既知原因遺伝子を含めた機能解析を行う。既知原因遺伝子の産物タンパクと相互作用するタンパクを新規の疾患原因候補として解析するアプローチ (「拡張候補遺伝子アプローチ」と命名) を考案したので、それを積極的に用いて開放隅角緑内障 (OAG)、AMD の原因遺伝子探索を進める。相互作用タンパクは、酵母 2-hybrid 法 (Y2H)、およびプルダウン-MS 法にてスクリーニングする。プルダウン-MS 法は、目的タンパクや、それに付けて発現させたタグに対する抗体を用いてプルダウン (タンパク複合体の一括取得) を行い、その成分タンパクを質量分析計 (MS) で同定する方法である。得られる相互作用タンパクのうち、その遺伝子が既報告の原因遺伝子候補領域にマップされるものについては、新規原因遺伝子の候補として、患者での変異を解析して、その可能性を追究する。また、遺伝子のマップ位置にかかわらず、それ以外の遺伝子も含めて、当該疾患の発症との関連を考慮して機能解析、発現抑制、過剰発現、変異の導入等による表現型変化の解析を行い、原因遺伝子・関連遺伝子としての可能性を追究する。

一方、前項のゲノム悉皆解析法により得られる高精度転写物

マップから、機能や発現組織を考慮して疾患関連/原因遺伝子として可能性の高いものを選択してこの項での解析対象とする。前項 (2) のために、ヒト症例検体を用いるリンケージ解析を独自に行い、新たな疾患候補ゲノム領域の同定を目指す。また、前項 (3) のために、疾患モデル動物の表現型を解析し、交配により責任ゲノム領域を狭小化して解析対象とする。

3. 器官形成に関わる新規遺伝子の同定

感覚器の中でヒト個体に最も多くの情報を与えるとされる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。モデル動物を採用し、関連既知遺伝子のオルソログ、パラログ遺伝子同定、それらとタンパク間相互作用する遺伝子の Y2H 等による探索を行なって、タンパク機能ネットワークの解明を目指す。

4. 遺伝子変異・表現型データベース構築

1～3 の研究から得られる情報を含めた疾患原因・関連の遺伝子とその変異、タンパク相互作用の変化、疾患症状等に関するビジュアルデータベースを構築する。

<研究開始時の研究計画>

1. 未同定疾患原因遺伝子候補ゲノム領域の精密転写物マップの作成

OAG、AMD に関し、以下を対象としてゲノム悉皆解析法により精密転写物マップを作成する。

- (1) 既報告のリンケージ解析による候補領域
既報告領域のうち、領域長が短い以下の 2 箇所について解析する。
 - (a) OAG 候補領域 GLC1F (7q35-q36) 領域長は約 4Mb
 - (b) OAG 候補領域 GLC1C (3q22-q23) 領域長は約 8Mb
- (2) 本研究で収集する患者家系を用いて得られる予定の新規候補領域

次項 2-1-4 で行う OAG のリンケージ解析結果が得られ、領域長が数 Mb に狭小化できたら対象とする。

- (3) 解析予定の疾患動物モデルから得られる疾患関連領域のヒト相同領域群

次項 2-2 で行う AMD のラット実験モデルで得られる予定の関連候補ゲノム領域を 5Mb 以下に狭小化して対象とする。

2. 疾患原因/関連遺伝子の探究

2-1 OAG原因遺伝子の探究

2-1-1 緑内障患者家系の収集

以下の目的のために、家族性発症を示す緑内障家系の情報と患者及び非発症者の末梢血検体を収集する。

- (a) 本研究で同定する新規 OAG 原因候補遺伝子の患者における変異・多型の存在確認のため
- (b) リンケージ解析による新規 OAG 候補領域の同定または既知 OAG 候補領域の狭小化のため

上記したように、主たる対象疾患は OAG であるが、家系収集は OAG 以外にも含めて、広く緑内障家系について行うこととする。検体から DNA を調製するとともに、B細胞を EB ウィルスで不

死化して細胞株を樹立する。

2-1-2 オプチニューリン相互作用タンパク

既知のOAG原因遺伝子であるオプチニューリン (OPTN) に相互作用するタンパクを同定し、その遺伝子を新たなOAG原因遺伝子候補として解析する。OPTNのcDNAのアミノ酸翻訳領域全長をベイトとし、ヒト網膜cDNAライブラリーをプレイトとしてY2Hを行う。また、HEK293細胞にFLAGタグ付きOPTNを導入し、プルダウン-MS法により、OPTN複合体の成分タンパクを同定する。プルダウンは抗FLAGタグ抗体を用いる免疫沈殿で行う。タンパク複合体をSDS-PAGEにて分離し、個々のタンパクをバンドから抽出後、質量分析計にてアミノ酸配列を決定して、タンパクを同定する。

2-1-3 ミオシリン相互作用タンパク

前項のOPTNと同様、OAG原因遺伝子であるミオシリン (MYOC) に関しても、その相互作用タンパクの遺伝子を新たなOAG原因遺伝子候補として解析する。MYOCのcDNAのアミノ酸翻訳領域全長をベイトとし、ヒト網膜cDNAライブラリーをプレイトとしてY2H法を行う。

2-1-4 収集家系検体を用いるリンケージ解析

2-1-1で収集するOAG家系のうち大きな家系については、単独で用いてリンケージ解析を行う。

2-2 AMD原因遺伝子の探求

AMDの危険因子として長期の太陽光への曝露が挙げられている。ラットに強い可視光を長時間照射すると網膜光障害を起こし、視細胞と網膜色素上皮細胞がアポトーシスで死滅する現象が知られており、AMDでの網膜障害と共通点が多い。この動物実験モデルで起こる現象に関与する遺伝子を解析することで、ヒトAMDの原因追究への糸口が得られることが期待できる。このモデルでの網膜光障害の程度はラットの系統により大きく異なることが知られているので、我々は、網膜光障害の起き易さ (感受性) を遺伝学的に解析することを目指した。

2-2-1 ラット実験モデルでの網膜光障害感受性測定法の確立

網膜光障害を起こさせるための照射光の照射時間等、基礎的な条件検討を行う。ラットの近交系を検討して、網膜光障害感受性・耐性の系統を決定する。また、遺伝学的なアプローチをとるため、交配への影響を考えて、侵襲の小さい網膜光障害感受性の査定方法の確立を目指す。

2-2-2 メンデル遺伝形質としての評価および交配

網膜光傷害感受性・耐性がメンデル遺伝としての遺伝形質であるのか、そうであるとして、その優性・劣性等の検討を行う。メンデル遺伝として扱えることが判明したら、優性・劣性の純系のF-1に劣性の純系を戻し交配して、戻し交配各個体 (BC-1) での表現型の分離を確認する。優性の表現型を示す個体にさらに劣性の純系を交配して戻し交配第2世代 (BC-2) を作製する。この操作を繰り返して、「優性の表現型を示し、優性の純系親のゲノムの存在率が低い戻し交配個体」を作製する。

2-2-3 網膜光傷害感受性原因遺伝子領域のマッピング

前項で得られる戻し交配個体群のゲノムを、純系親のゲノムを識別できる多型マーカーで解析して、共通して残存する優性純系親のゲノム領域を決定する。5Mb以下のゲノム長に狭小化するまで、戻し交配の個体数、戻し交配の世代数を増やして継続する。

2-2-4 網膜光障害感受性原因遺伝子の同定

前項で得られるラットのゲノム領域に対してゲノム悉皆解析法を適用し、転写物マップを作製する。得られる遺伝子の中から、コードするタンパクの機能や発現組織情報等をもとにして、網膜光障害感受性原因遺伝子の候補を選択する。それらの遺伝子の多型を優性・劣性の純系親と比較して原因遺伝子を決定する。同遺

伝子のヒト相同遺伝子における多型を調べ、AMD患者と非発症者で出現頻度が異なる多型の同定を目指す。そのような多型を示すヒト遺伝子が得られたら、ヒトのAMD発症の易罹性を担っているとして、診断に活用できる。また、発症機構の解析や、治療法、治療薬の開発にも発展できる可能性がある。

3. 器官形成に関わる新規遺伝子の同定

モデル動物としてメダカを採用し、時期特異的及び組織器官特異的cDNAライブラリーの作製を検討する。ヒトの猫目症候群原因遺伝子領域に存在する未知の眼形態形成遺伝子群等のメダカにおける相同遺伝子の存在を追究する。

4. 遺伝子変異・表現型データベース構築

我々が従来から行ってきた「研究者の手作業による論文の詳細な解釈と情報抽出」によるデータ構築を継続する。データの種類を、従来までの遺伝子変異・多型に加えて、タンパク機能ドメイン情報、変異や多型による表現型 (疾患の症状、薬効、薬副作用等) 変化にまで拡大する。それらの新規データ項目は、用語の標準化等も不十分であるため、用語の分類、階層化を行ない、必要に応じてオントロジー構築も進める。従来の変異のデータとは別のレイヤーで表現型や症状等の検索が行えて、変異のデータと相互参照が可能なシステムを目指す。

<研究期間の成果>

1. 未同定疾患原因遺伝子候補ゲノム領域の精密転写物マップの作成

(1) 既報告のリンケージ解析による候補領域

(a) OAG候補領域GLC1F (7q35-q36) 領域の解析

GLC1F領域はマーカーD7S2442-D7S483間の4Mbで、この領域にゲノム悉皆解析を施行したところ、機能未知のcDNA/ESTを含めて何らかの転写物が高い相同性を示した遺伝子または推定遺伝子73個を確認した。このうち眼での発現が見られる遺伝子 (EST) は47個であった。また今回の解析により、① GLC1F領域はD7S2442の下流約400kb~1100kbの位置にZnフィンガータンパク遺伝子が密集して存在すること (8/73個)、② D7S2442の下流約1200kb~1700kb間はアクティブな遺伝子が存在しない領域であるということがわかった。73個の遺伝子のうち3個の遺伝子の近傍には、エキソンの配列を持つ転写物の登録がない領域があった。CpGアイランド等の情報を参考に新たな遺伝子または隣接する遺伝子の新規エキソンの存在可能性を実験によって検討した。予測したエキソン上でPCRプライマーを設計し、眼由来cDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、新たな転写物を3種類 (GLC1FN1~3) 同定した。限られた組織、タイミングで発現する転写物である可能性があることがわかった。

(b) OAG候補領域GLC1C (3q22-q23) 領域の解析

GLC1C領域はマーカーD3S3637-D3S3694間の8Mbである。同様に、この領域にゲノム悉皆解析を施行したところ、推定遺伝子を含めて60個の遺伝子を同定した。このうち眼での発現が見られる遺伝子は39個であった。この領域は、前記GLC1Fと比較して遺伝子の存在密度が半分以下であった。

(2) 本研究で収集する患者家系を用いて得られる予定の新規候補領域

以下の2-1-4項に記載のとおり、研究期間内には領域の限定が十分には行えなかったため、未だこの解析の対象とはできない。

(3) 解析予定の疾患動物モデルから得られる疾患関連領域のヒト相同領域群

以下の2-2項に記載のとおり、ラットで10Mb未満の領域が2箇所同定できたが、さらに数Mb程度に狭小化した後、この解析を施行する計画である。

2. 疾患原因/関連遺伝子の探求

2-1 OAG原因遺伝子の探求

2-1-1 緑内障患者家系の収集

家系性発症を示す緑内障症例を収集した。現在までに、日本人69家系(患者166人)を収集し、111例(患者106人、非発症者5人)から採血しDNAを抽出した。患者の病型内訳は、開放隅角緑内障57人、正常眼圧緑内障39人、高眼圧症3人、その他12人であった。全例についてB細胞株樹立に成功した。

2-1-2 オプチニューリン相互作用タンパク

研究計画に記載した2種類の手法(Y2H法とプルダウン-MS法)で、OPTNと直接・間接に結合するタンパクをスクリーニングした。ヒト網膜RNAを入手してY2H法のプレライブラリーに用いるcDNAライブラリーを構築した。得られたタンパクは機能、遺伝子マップ等から以下のように分類された。

- | | |
|--------------------------|----|
| ① 遺伝子座が7q35-q36の中に存在するもの | 2種 |
| ② 眼、神経等に特異的な発現を示すもの | 多数 |
| ③ OPTNの核での機能を想起し得るもの | 多数 |
| ④ ユビキチンに関連するもの | 多数 |

このうち、①の2遺伝子(OIP-F01とOIP-F02)は、1の(1)の(a)で解析した緑内障候補領域GLC1F内に存在していた(図1)。これらの遺伝子の翻訳領域全長のcDNAをタグ付きベクターでクローニングし、培養細胞でOPTNと共発現させて、タグに対する抗体で共免疫沈殿し、ウェスタンブロットで確認したところ、両遺伝子ともにOPTNタンパクとの結合が確認できた。これらのどちらかが新たな緑内障原因遺伝子である可能性を検証するために、GLC1F領域をマップした研究者(米国オレゴン州キャセイ眼研究所のMary K. Wirtz博士)と共同研究で患者検体を入手して変異解析を行った。その結果、患者のOIP-F02で5種類の塩基配列変化を同定した。そのうち、77G/Aはアミノ酸置換(G26E)を伴う。また、630A/Tはsilentであるが、Aの場合ESE(Exonic Splicing Enhancer)コンセンサス配列を構成する一方、Tではコンセンサスからはずれるため、スプライシング変異となる可能性がある。77G/Aは当該家系内では、発症・非発症と関連していたが、我々が収集している(上記2-1-1項)緑内障家系および正常対照を用いた解析では、発症との相関は有意でなかった。他の遺伝要因と複合して発症原因となる場合、この遺伝子の相対的な寄与の大きさが小さくなる可能性は考えられる。

②に含まれるNRL(Neural Retina Leucine-zipper)は網膜色素変性の原因遺伝子である。培養細胞での共免疫沈殿法でOPTN-NRLの結合は確認した。両タンパクのラット生体眼組織での発現を免疫染色法で解析したところ、NRLは既報告どおり視細胞の核に存在したが、OPTNは既報告の神経節細胞、内網状層の細胞以外に、NRLと同じく視細胞にも検出された。そこで、ラット眼組織の核画分における両者の結合を調べた。同画分に対して抗OPTN抗体を用いて共免疫沈殿を行ったところ、ウェスタンブロット法によりNRLが検出されたので、両者は生体内でも結合していることが強く示唆された。なお、他の抗体を併用した検討で、OPTNは視細胞のうち、杆体のみで発現していることも判明した。

③には核内で機能するタンパク、核内外の物質輸送に関連するタンパクが含まれており、ストレス時に起こることが知られているOPTNの核への移行現象、あるいは移行後の核内での機能に関連する可能性がある。

④にはユビキチンやユビキチン化関連タンパクが含まれており、OPTNによるユビキチン関連現象の調節機構の存在が示唆される。

2-1-3 ミオシリン相互作用タンパク

MYOCをベイトとし、Y2H法により、網膜cDNAライブラリーから多数のMYOC相互作用タンパクを同定した。それらの中から、以下のカテゴリーの遺伝子を探り上げて研究対象とした。

- ① 遺伝子座が緑内障候補領域内に存在する遺伝子(9種)(図1)
- ② 他の眼疾患の原因遺伝子あるいは関連遺伝子(9種)(図2)
- ③ 細胞外(ECMおよびECR)で機能すると考えられているタンパクの遺伝子(11種)(図3)。

①のカテゴリーのうち、GLC1L(3p21-p22)領域にマップされたMIP-F01とMIP-F02については、前記のWirtz博士からの供与検体を、GLC1F(7q35-q36)領域にマップされたMIP-L01、MIP-L02、MIP-L03の3種については、メルボルン大学のP. N. Baird博士との共同研究で入手した検体を用いて変異解析を行った。しかし、現在までのところ、患者での変異や有意な多型は得られていない。

②に関しては、黄斑変性症、網膜色素変性症等の他の重要な失明疾患の発症機構が緑内障と関連する可能性を想起させ、今後、別途本格的な解析を行う必要性を示唆する。

③に含まれる遺伝子(OPTC、FBLN5等)は、分泌タンパクとして報告されてきたMYOCの機能を推測する上で有効であると考えられるため、その中から特にSERPINF1遺伝子を選択し、性状解析を行った。SERPINF1は、Pigment Epithelium-Derived Factor(PEDF)と同じもので、糖尿病網膜症やAMDとの関連が報告されている。PEDFに関して以下の結果を得た。

- 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、MYOCとPEDFが結合していることが判明した。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の免疫蛍光染色により、これまで報告が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。

2-1-4 収集家系検体を用いるリンケージ解析

項目2-1-1で収集した緑内障家系のうち、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行った。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。

2-2 AMD原因遺伝子の探求

2-2-1 ラット実験モデルでの網膜光障害感受性査定法の確立

種々の条件でラットに光照射を行い、眼組織の網膜光障害を病理学的に観察して、照射条件や用いる系統等を決定した。その結果、このモデルでは、光照射条件として、「午前0時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

を決定した。用いるラットの系統は、この照射条件にて網膜光障害感受性を示すWKYと耐性を示すLEWとした。この照射条件でWKYは視細胞およびRPE細胞がアポトーシスを起こしてAMD様の病理所見（網膜光障害）を呈することがわかった（図4）。各個体の網膜光障害の程度は、モリス水迷路での泳ぎの所要時間を測定して判断する行動学的な手法を独自に開発した。すなわち、水迷路上で島状の標的に泳ぎ着く時間が長いほど視力障害が大きいと判断した。この方法は、測定自体は低侵襲であるため、光照射、測定後も子孫を残すことができる。実際の測定では、各個体の泳ぎの所要時間には比較的大きな「ばらつき」を示すため、各群の所要時間 vs 個体数のヒストグラムを描き、そのプロファイルの変化で、集団として網膜光障害の程度を査定することとした。

2-2-2 メンデル遺伝形質としての評価および交配

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。これにより、光感受性・耐性はメンデル遺伝形質で、感受性は耐性に対して優性であることがわかった。それゆえ、F-1に対して劣性純系であるLEWを戻し交配してBC-1を得た。BC-1個体群には、感受性と耐性の個体が混在していた。感受性個体の中で、泳ぎの所要時間が長い個体を選び、さらにLEWと戻し交配を行い、BC-2を得た。同様の方法で、BC-4の作製まで完了し、現在BC-5を作成している。

2-2-3 網膜光障害感受性原因遺伝子領域のマッピング

BC-1 (71匹)、BC-2 (40匹)、BC-3 (41匹)、BC-4 (96匹)についてヒストグラム解析を行ったところ、BC-1～BC-4のどの世代でも個体数比が感受性:耐性=1:3となり、2遺伝子の同時関与が想定された。そこで、感受性個体で共通に保持されているWKYゲノムを、系統間で多型を示すマイクロサテライト座位を利用して解析した。その結果、行動学的表現型解析手法から得られた関連遺伝子数と一致する2遺伝子の存在を示す、2箇所のゲノム領域(5番および19番染色体)が各戻し交配個体に残存していることがわかった。当該ゲノム領域は、それぞれ10Mb未満の長さであった。これらを、光感受性原因遺伝子候補領域と定義し、それぞれRetinal Photic Injury-susceptibility (RPI)-1、RPI-2と命名した(図5、6)。RPI-1とRPI-2にそれぞれ含まれる2遺伝子が同時に感受性タイプである時のみ、網膜光感受性を示すと考えられる。この知見は、AMDが多因子遺伝子疾患と考えられていることと整合性があると考えている。現在、BC-5(82匹)を得ており、BC-6を作製するための光感受性BC-5をスクリーニングする予定である。

3. 器官形成に関わる新規遺伝子の同定

メダカCAB系統を飼育し、卵、胚、稚魚、成魚の材料蓄積を行った。さらに、それらから発生時期特異的mRNAを抽出して、cDNAを調製した。一方、トータルRNAからRACE用cDNAも調製した。24～72hpfのcDNAからヒトの猫眼症候群原因遺伝子領域に存在するCECR1、CECR5a、CECR6遺伝子のメダカ相同遺伝子cDNA断片を単離し、RACE法も併用して、少なくとも翻訳領域全長をカバーするクローニングを行った。

4. 遺伝子変異・表現型データベース構築

平成16年度まで行ってきた単一遺伝子疾患の変異データベースのコンテンツ構築は、慶應義塾大学医学部清水信義教授との共同研究として本研究でも継続した。その結果、平成17年度当初から平成21年12月までに、480疾患、135遺伝子、14,005の症例データを4,002報の文献から抽出して、データベース構築を行った。現在の総計データは、928疾患、403遺伝子、症例数29,374、文献数5,839報である。これらのデータは疾患カテゴリー別に収集

しており、その内訳を図7に示す。

一方、疾患症状の体系化と遺伝的要因への関連づけを目的としたオンロジーデータベースSYMPHONIE (SYMPtomics Hamamatsu Ontology for New Investigative Etiology)のシステム設計を行い、ウェブで公開した。現在、眼科、皮膚科、耳鼻咽喉科疾患に関してデータベース構築が完了した。

(これらのデータベースのURLは下記参照。)

<国内外での成果の位置づけ>

- (1) ゲノム悉皆解析法と拡張候補遺伝子アプローチを組み合わせることにより、ユニークな成果が得られつつある。外国の研究者との共同研究が即時に成立したことからわかるように、この方法には一定の説得力があると考えている。ゲノム塩基配列の意味を深く読み解くことは、これからも大いに必要なことであり、我々の方法を用いて、OAG、AMD他の重要な疾患の原因・関連遺伝子を解明していく計画である。
- (2) AOGの原因遺伝子は、現在までに3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。本研究でのアプローチは、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発見しようとするもので、世界の先端の研究者と競っていると考えている。
- (3) AMD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AMD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。
- (4) 我々の構築している遺伝子疾患変異データベースは、順調にデータ数が増加している。このような、グラフィクスを活用した特徴あるデータベースは世界的に見ても、我々のみが構築している。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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- (1) 拡張候補遺伝子アプローチによる緑内障原因遺伝子の同定は未完了である。これはOAGが多因子遺伝子疾患であることに原因があると考えている。すなわち、OAGとして収集している症例群は、実際には多くの原因遺伝子が複数、しかも家系ごとに異なった組み合わせで関与していると考えられ、それらを合わせて解析することに無理がある可能性が高い。今後、OAG診断の他のパラメーターの発見を期待し、それによる症例群の細分化を行って、再度遺伝子解析を行うことにより、関連遺伝子が同定できる可能性が高まると考える。また、遺伝学的アプローチの前に、関連する現象やタンパクを明らかにし、そこからの演繹で関連遺伝子群を予測して、候補遺伝子アプローチを行っていくことが、一見遠回りのようで、実は着実な方法と考えられ、我々はそのアプローチも行っている。

(2) データベース構築のうち、疾患症状オントロジーデータベース SYMPHONIE の構築には、各診療科別の専門知識を持つ医師の協力が必須であるが、医師による症状の体系的記述には長い時間と多くの努力が必要であり、5～6診療科のデータを構築する計画であったが達成できなかった。所属研究機関の内部で今後自助努力して構築を継続する計画である。

<今後の課題、展望>

- (1) 成果欄の2-1-2項の③および④の継続：OPTNのユビキチン関連機能、核内移行後の機能に関してはまったく報告がないので、それらを解明すれば、緑内障発症機構の理解のためのプレイクスルーになる可能性があるため、積極的に研究継続する。
- (2) 成果欄の2-1-3項に記載したPEDFとMYOCとの相互作用は、従来言われてきたMYOCの線維柱帯での機能や眼圧上昇との関連以外の新しい現象への関与を示唆する可能性がある。MYOCの網膜での機能、MYOCの変異による網膜の性質変化、それらへのPEDFの関与等に関して、今後も研究を継続する予定である。
- (3) 成果欄の2-2-3項の継続：間もなく得られる追加のBC-6個体も用いてRPI-1とRPI-2の候補領域をさらに狭小化し、5Mb以下の領域にまで限定することを目指す。両領域内のゲノム塩基配列をゲノム悉皆解析法で解析して精密な転写物マップを作成し、含まれる遺伝子の発現組織、機能などを考慮して候補遺伝子を選択し、WKYにあってLEWにない変異や多型を探索する。それを満足する遺伝子が得られたら、ヒト相同遺伝子の多型を解析し、AMD患者と非発症者で出現頻度が異なる多型を探索する。これが得られれば、その遺伝子はヒトAMD発症の原因/感受性遺伝子であることが結論でき、発症機構解析や遺伝子診断開発への道が開ける。
- (4) データベース構築は今後も積極的に継続発展させていく計画である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0912072335. Nakanishi, H., Ohtsubo, M., Iwasaki, S., Hotta, Y., Mizuta, K., Mineta, H., Minoshima, S.: Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin. Genet.* **76**(4):383-91 (2009).
2. 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).
3. 0811141921. Yamaguchi-Kabata, Y., Shimada, M.K., 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).
4. 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).
5. 0912170256. 王 春霞、小出健郎、細野克博、中西伸夫、蓑島伸生、堀田喜裕. 分子遺伝学的検査により確定診断し得たBest病の一例. *臨床眼科.* **62**(9): 1563-1567 (2008).
6. 0802041604. Genome Information Integration Project and H-Invitational 2 (2008) (including Minoshima, S. and Ohtsubo, M.): The H-Invitational Database (H-InvDB), a

comprehensive annotation resource for human genes and transcripts. *Nucleic Acids Res.*, (Database issue):D793-9 (2008).

7. 0801291502. 大平明弘、植田俊彦、大石健太郎、平光忠久、明尾潔、小原喜隆: 酸化ストレスと眼. *日本眼科学会雑誌* **112**(1) 22-29 (2008).
 8. 0702141159. Shimizu, N., Ohtsubo, M., Minoshima, S.: *MutationView/KMcamcerDB*: a database for cancer gene mutations. *Cancer Sci.* **98**(3), 259-267 (2007).
 9. 0702141729. Kato, M., Haku, T., Hibino, T., Fukada, H., Mishima, Y., Yamashita, I., Minoshima, S., Nagayama, K., Shimizu, N.: Stable minihairpin structures forming at minisatellite DNA isolated from yellow fin sea bream *Acanthopagrus latus*. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **146**(3), 427-37 (2007).
 10. 0705081539. Kawano, T., Wang, C., Hotta, Y., Sato, M., Iwata-Amano, E., Hikoya, A., Fujita, N., Koyama, N., Shirai, S., Azuma, N., Ohtsubo, M., Shimizu, N., Minoshima, S.: Three novel mutations of PAX6 gene in Japanese aniridia patients. *J. Hum. Genet.* **52**(7), 571-574 (2007).
 11. 0710301208. Yang, H., Sasaki, T., Minoshima, S., and Shimizu, N.: Identification of three novel proteins (SGSM1, 2, 3) which modulate small G protein (RAP and RAB)-mediated signaling pathway. *Genomics* **90**, 249-260 (2007).
 12. 0710301454. Shiohama, A., Sasaki, T., Noda, S., Minoshima, S., and Shimizu, N. Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins. *Exp. Cell Res.* **313**(20):4196-207 (2007).
 13. 0801291429. Ohishi, K., Zhang, X.M., Moriwaki, S., Hiramitsu, T., Matsugo, S.: In the presence of ferritin, visible light induces lipid peroxidation of the porcine photoreceptor outer segment. *Free Radic. Res.* **40**(8), 799-807 (2006).
 14. 602020203. Ohishi, K., Zhang, X.M., Moriwaki, S., Hiramitsu, T., and Matsugo, S.: In the presence of ferritin, visible light induces lipid peroxidation of the porcine photoreceptor outer segment. *Free Radic. Res.* **40**:799-807 (2006).
 15. 602020155. Koide, K., Zhang, X.M., Ohishi, K., Usami, Y., Hotta, Y., Hiramitsu, T.: Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery. *Exp. Eye Res.* **82**(5):868-73 (2006).
 16. 602020038. Nusbaum, C., Mikkelsen, T.S., Zody, M.C., ---, Minoshima, S., *et al.*: DNA Sequence and Analysis of Human Chromosome 8. *Nature* **439**:331-335 (2005).
 17. 602020152. Ohishi, K., Zhang, X.M., Moriwaki, S., Hiramitsu, T., Matsugo, S.: Iron release analyses from ferritin by visible light irradiation. *Free Radic. Res.* **39**:875-882 (2005).
- 2) 学会発表
〔発表者名、発表標題、学会等名、発表年月日、発表場所〕
1. Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: The new version of *MutationView* : Enhanced Search Function and Significant

- Increase in the Number of Gene Entries. *20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009)*, 2009.12.14-16, 横浜.
2. 大坪正史, Thanseem Ismail, 細野克博, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 緑内障原因遺伝子産物オプチニューリンと相互作用するタンパクの同定. 第32回 日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜.
 3. 大石健太郎, 細野克博, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害感受性の責任遺伝子探索. 第32回 日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜.
 4. Minoshima, S.: *MutationView*. *International Symposium on Applied Genomics 2009 Medical Genome Science in the Personal Genome Era*, 2009.12.3-4, Tokyo (Japan).
 5. Ohtsubo, M., Shimizu, N., Minoshima, S.: A new version of MutationView: Enhanced searching function and significant increase of the number of genes with variation data. *Human Genome Variation Society 2009*, 2009.10.20, Honolulu (USA).
 6. 蓑島伸生, 大坪正史, 清水信義: ヒト遺伝子多様性データベースの構築の現状. 第16回 日本遺伝子診療学会大会, 2009.7.30-8.1, 札幌.
 7. 大石健太郎, 細野克博, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ (2). 第31回 日本光医学・光生物学会, 2009.7.24-25, 大阪 (プロシーディング: Ohishi, K., Hosono, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Regression analysis of swimming time of rats with retinal photic injury using lognormal distribution model. *Photomed. Photobiol.* in press).
 8. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ ---- 病理組織所見と行動学所見の関係比較 ----. 第20回 眼科酸化ストレス研究会, 2009.7.25, 大阪.
 9. Wang, C., Hosono, K., Ohtsubo, M., Ohishi, K., Nakanishi, N., Hikoya, A., Sato, M., Hotta, Y., Minoshima, S.: Interaction between optineurin and bZIP transcription factor NRL. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*, 2009.5.3-7, Florida (USA).
 10. 大坪正史, 中西伸夫, Thanseem Ismail, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 緑内障原因遺伝子ミオシリンの相互作用蛋白の同定 発症を修飾する因子としての可能性. 第113回 日本眼科学会総会, 2009.4.16-18, 東京.
 11. Ohtsubo, M., Minoshima, S., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N.: Construction of independent LSDBs with smooth user-interface and real-time analysis function using MutationView softwares, *MV4LSDB*. *The 2008 Annual Conference of the Japanese Society for Bioinformatics (JSBi2008)*, 2008.12.15-16, Osaka (Japan).
 12. 王春霞, 細野克博, 大坪正史, 大石健太郎, 中西伸夫, 堀田喜裕, 蓑島伸生: オプチニューリンとNRLタンパクの相互作用の解析. 第31回 日本分子生物学会年会 第81回 日本生化学会大会 合同年会, 2008.12.9-12, 神戸.
 13. 中西伸夫, 大坪正史, 大石健太郎, Ismail Thanseem, 細野克博, 王春霞, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 緑内障発症機序の分子レベルでの解明: 緑内障原因遺伝子ミオシリンの産物蛋白質が細胞外で相互作用する蛋白質の探索. 第31回 日本分子生物学会年会 第81回 日本生化学会大会 合同年会, 2008.12.9-12, 神戸.
 14. Minoshima, S., Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N.: Construction of independent LSDBs using *MutationView* softwares, *MV4LSDB*. *Human Genome Variation Society 2008*, 2008.11.11, Philadelphia (USA).
 15. 大石健太郎, 平光忠久, 蓑島伸生: ラット網膜光障害の感受性遺伝子検索のための遺伝学的アプローチ. 第30回 日本光医学・光生物学会, 2008.7.11-12, 松江 (プロシーディング: 0811141859. Ohishi, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Genetic approach for mapping genes responsible for susceptibility to photic injury in the rat retina. *Photomed. Photobiol.* **30**, 3-4 (2008)).
 16. 大坪正史, 細野克博, 朝岡亮, 王春霞, 中西啓, WirtzMary K., 峯田周幸, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 緑内障候補領域に座し既知原因遺伝子OPTNと相互作用するタンパク遺伝子の変異解析. 第112回 日本眼科学会総会, 2008. 4.17-20, 横浜.
 17. Ohtsubo, M., Wang, CX., Hotta, Y., Nakanishi, H., Mineta, H., Moriwaki, S., Kawaguchi, K., Nakanishi, N., Adachi, K., Horisawa, T., Terao, T., Minoshima, S.: *SYMPHONIE*, a knowledge-base of symptoms exhibited in diseases with genetic factors. *The 2007 Annual Conference of the Japanese Society for Bioinformatics (JSBi2007)*, 2007.12.17-19, 東京.
 18. 大坪正史, 細野克博, 中西伸夫, Thanseem Ismail, 王春霞, 大石健太郎, Mary K. Wiltz, 堀田喜裕, 蓑島伸生: 新規緑内障原因遺伝子の探索: 既知原因遺伝子タンパクと相互作用し、緑内障候補領域に座するタンパク遺伝子の変異解析. 第30回 日本分子生物学会年会 第80回 日本生化学会大会 合同年会, 2007.12.11-15, 横浜.
 19. Ohtsubo, M., Hosono, K., Wang, C., Hotta, Y., Minoshima, S.: Myocilin interacting proteins: Screening of a human retina yeast two hybrid cDNA library. *American Society of Human Genetics (ASHG) 57th Annual Meeting*, 2007.10.23-27, San Diego (USA).
 20. Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: MutationView. A DATABASE FOR HUMAN DISEASE-ASSOCIATED MUTATIONS: ARCHIVING AND DISTRIBUTION OF CUSTOM SOFTWARES. *Human Genome Variation Society 2007*, 2007.10.23, San Diego (USA).
 21. 大坪正史, 王春霞, 堀田喜裕, 中西啓, 峯田周幸, 森脇真一, 中西伸夫, 寺尾俊彦, 蓑島伸生: 遺伝性疾患に関する症状データベースSYMPHONIEの構築. 第52回 日本人類遺伝学会大会, 2007.9.12-15, 東京.
 22. 大坪正史, 河村隆, 満山進, 清水信義, 蓑島伸生: 遺伝子変異データベースMutationView: 遺伝性聴覚障害の原因遺伝子に関する変異情報. 第14回 日本遺伝子診療学会大会, 2007.7.27-28, 松山.
 23. 王春霞, 大坪正史, 細野克博, 大石健太郎, 堀田喜裕, 蓑島伸生: OptineurinタンパクとNRL タンパクの相互作用の解析. 第14回 日本遺伝子診療学会大会, 2007.7.27-28, 松山.
 24. 王春霞, 大坪正史, 細野克博, 大石健太郎, 堀田喜裕, 蓑島伸生: オプチニューリンとNRL タンパク質の相互作用の解析. 第111回 日本眼科学会総会, 2007.4.19-22, 大阪.
 25. Ohtsubo, M., Kawamura, T., Mitsuyama, S., Shimizu, N., Minoshima, S.: *MutationView*: An integrated database of mutations in human disease genes. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006.6.18-23, Kyoto (Japan).

26. Ohtsubo, M., Kawamura, T., Mitsuyama, S., Shimizu, N., Minoshima, S.: New Features of *MutationView*: A module to search for disease-causing genes from protein functional domain. *GIW 2006 The 17th International Conference on Genome Informatics*. 2006.12.18-20, Yokohama (Japan).
27. 大坪正史, 河村隆, 満山進, 清水信義, 蓑島伸生: 遺伝子変異データベース *MutationView*: 眼疾患の原因遺伝子に関する変異情報, 第13回 日本遺伝子診療学会大会, 2006.7.28-29, 東京.
28. Ohtsubo, M., Moriwaki, S., Wang, C. X., Hotta, Y., Horisawa, T., Shimizu, N., Terao, T., Minoshima, S.: *SYMPHONIE*: A knowledge-base to hierarchically classify symptoms associated with gene-related diseases. *The 11th International Congress of Human Genetics*. 2006.8.6-10, Brisbane (Australia).
29. Minoshima, S.: Human genomics and disease mutation database. *JSPS COLLOQUIUM on Frontiers of Genome Science and Challenges to Medical Application*, 2006.8.30, Stockholm (Sweden).
30. Ohtsubo, M., Kawamura, T., Mitsuyama, S., Shimizu, N., Minoshima, S.: New Features of *MutationView*: Implementation of Various Protein-oriented Tools to Find out the Relation, *16th International Conference on Genome Informatics (GIW2005)*, 2005.12.19-21, Yokohama (Japan).
31. 大坪正史, 満山進, 河村隆, 清水信義, 蓑島伸生: *MutationView* による疾患変異情報の分類と可視化, 第28回 日本分子生物学会年会, 2005.12.7-10, 福岡.
32. Ohtsubo, M., Mitsuyama, S., Kawamura, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: Recent Progress on *MutationView*: Displaying Relationship between Protein Functional Domains and Mutations in Human Diseases, *Human Genome Variation Society 2005 Scientific & Annual General Meeting*, 2005.10.25, Salt Lake City (USA).
33. Ohtsubo, M., Moriwaki, S., Wang, C., Hotta, Y., Horisawa, T., Daicho, K., Kawaguchi, K., Miura, N., Mori, N., Sato, K., Shimizu, N., Terao, T., Minoshima, S.: *SYMPHONIE*: A knowledge-base to systematically connect symptoms with gene-related diseases, *The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting*, 2005.10.25-29, Salt Lake City (USA).
34. 大坪正史, 大長克江, 川口浩一, 満山進, 河村隆, 堀澤知義, 清水信義, 蓑島伸生: 遺伝子疾患変異データベース *MutationView*: 新規検索機能の開発とデータ構築の現状, 第49回 日本人類遺伝学会大会, 2005.9.19-22, 倉敷.
36. 大坪正史, 満山進, 河村隆, 清水信義, 蓑島伸生: 遺伝子変異データベース *MutationView*: 骨系疾患の原因遺伝子に関する変異情報, 第12回 日本遺伝子診療学会大会, 2005.8.5-6, 長野.

3) 図書

無し

4) データベース/ソフトウェア

1. 0608082249 *MutationView*

(<http://mutview.dmb.med.keio.ac.jp/>)

慶大清水信義名誉教授との共同研究で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。

2. 0801291353 *SYMPHONIE*

(<http://symphonie.mpb.hama-med.ac.jp/>)

遺伝的要因がある疾患の症状オンロジーデータベース。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。現在は、眼科、皮膚科、耳鼻科疾患を収載。

5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

無し

6) 新聞発表、その他顕著なもの

無し

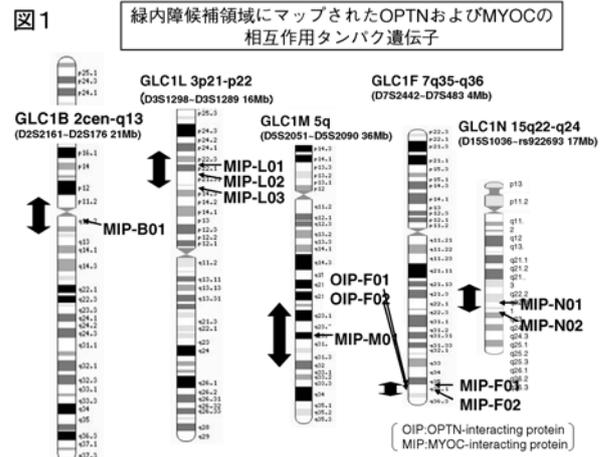


図2 MYOC相互作用タンパクと他の疾患との関連

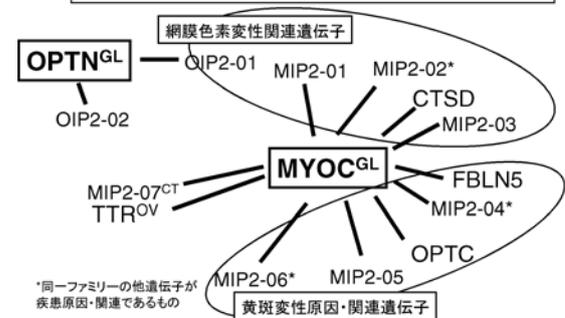


図3 細胞外で機能するMYOC相互作用タンパク

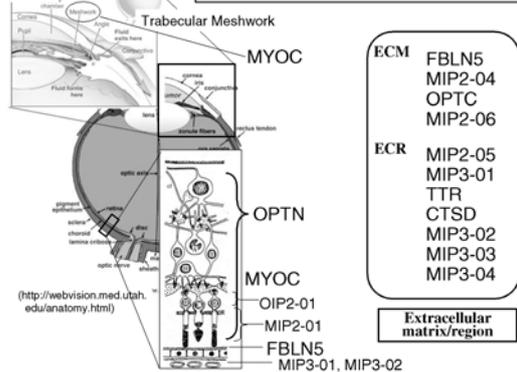


図4 **Retinal Photic Injury**
< Haematoxylin-Eosin staining >

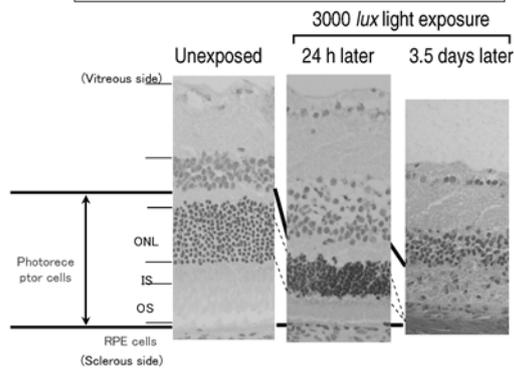


図7 Data amount in *MutationView*

Gene	403
Disease	928
Mutation/Polymorphism (27,541/1,833)	29,374
Data source (Literature)	5,389

(Oct 2009)

disease categories	#genes	(typical diseases)
Eye :	166	(retinitis pigmentosa, glaucoma, corneal dystrophy)
Ear :	59	(deafness)
Heart :	34	(cardiomyopathy, heart dysmorphism)
Muscle :	35	(DMD/BMD, MD Fukuyama type)
Bone :	47	(craniometaphyseal dysplasia)
Brain/Neuron :	79	(familial Parkinsonism, Alzheimer disease)
Cancer-related :	61	(breast cancers, retinoblastoma)
Blood :	47	(CML, citrullinemia)
Kidney :	27	(Bartter syndrome)

図5. 加齢黄斑変性との関連が検討された(ている)代表的な遺伝子のラット・ゲノム上の配置とRPI-1およびRPI-2領域

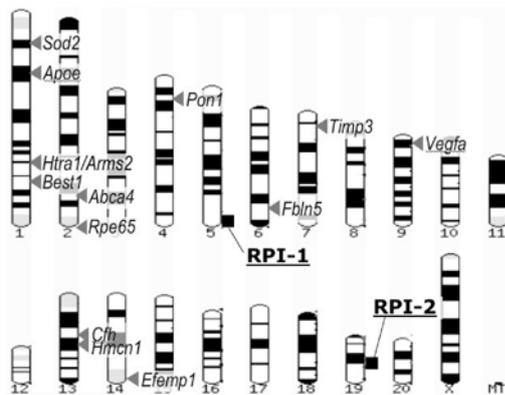


図6. 網膜光感受性および耐性を示す戻し交配個体の水迷路実験とマイクロサテライト解析

戻し交配世代	BC-3			BC-4				
	Susceptible			Resistant				
ラットID	371	522	555	537	565	554	566	535
モリス水迷路結果	14.0	14.3	14.7	2.7	3.3	3.3	4.0	4.7 (秒)
<5番染色体>								
(telomere)	-	-	-	-	-	-	-	-
(centromere)	-	-	-	-	-	-	-	-
マーカー A	□	□	□	□	□	□	□	□
# B	■	□	□	□	■	■	■	□
# C	■	■	■	■	■	■	■	□
# D	■	■	■	□	■	■	■	□
# E	■	■	■	■	■	□	■	□
(telomere)	-	-	-	-	-	-	-	-
<19番染色体>								
(telomere)	-	-	-	-	-	-	-	-
マーカー F	□	□	□	□	□	□	□	□
(centromere)	-	-	-	-	-	-	-	-
マーカー G	■	■	■	□	■	■	■	□
# H	■	■	■	□	■	■	■	□
# I	■	■	■	□	■	■	■	□
# J	□	□	□	□	□	□	□	□
(telomere)	-	-	-	-	-	-	-	-

↑ RPI-1領域
約 10 Mbp
↓ 約 240 遺伝子

↑ RPI-2領域
約 9 Mbp
↓ 約 150 遺伝子