

総 説

遺伝性網膜脈絡膜疾患の分子遺伝学

—疾患遺伝子同定の戦略—

真島 行彦

慶應義塾大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：遺伝性網膜脈絡膜変性症の疾患遺伝子の同定法, クローニング法の戦略を述べる。

対象と方法：疾患遺伝子のクローニングには主にファンクショナルクローニング, ポジショナルクローニングおよび位置的候補遺伝子アプローチの3つの方法が行われてきた。我々のグループは網膜で多く発現している新規遺伝子のクローニングを行い, その遺伝子の染色体マッピング, 組織での発現を明らかにし, 位置的候補遺伝子アプローチにより疾患遺伝子の同定を試みた。

結 果：最近の約10年間にファンクショナルクローニングにより1疾患, ポジショナルクローニングにより9疾患の疾患遺伝子が同定され, 位置的候補遺伝子アプローチにより, 19種類の遺伝子が疾患遺伝子として明ら

かにされた。我々のグループは3つの新規遺伝子をクローニングし, 組織発現部位を明らかにしたが, 現在網膜脈絡膜変性症の疾患遺伝子とは関連がない。

結 論：21世紀にはヒトゲノムの全塩基配列が決定するので, 位置的候補遺伝子アプローチ法が疾患遺伝子同定の主流となる。したがって, 今後疾患遺伝子の同定に重要なことは, 遺伝性疾患の大きな家系の収集および連鎖解析による疾患の染色体マッピングである。(日眼会誌 103: 165—177, 1999)

キーワード：遺伝性網膜脈絡膜変性症, 位置的候補遺伝子アプローチ, ポジショナルクローニング, ファンクショナルクローニング

Molecular Genetics of Inherited Chorioretinal Dystrophy

—Strategy for Identifying Disease-causing Genes—

Yukihiko Mashima

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Purpose : To review the strategies for identifying the causative genes of inherited chorioretinal diseases.

Methods : Three techniques, namely functional cloning, positional cloning, and positional candidate gene approach, have been used for this purpose. Our strategy for identifying the causative genes of inherited chorioretinal diseases is to clone retina-enriched genes, learn their chromosomal map position, and identify their expression in the retina.

Results : In the past 10 years, one gene has been cloned by functional cloning, 9 genes by positional cloning, and 19 genes by the positional candidate gene approach. Our strategy has identified 3 novel genes expressed in the retina, but they have not been

associated with chorioretinal diseases.

Conclusion : In the next century when the Human Genome Project is finished and the human genome has been sequenced completely, the positional candidate gene approach will become the predominant method of disease gene discovery. The future success of this method is predicated on increasingly dense mapping of the responsible genes by linkage analysis of multiple affected families with inherited chorioretinal diseases. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 165—177, 1999)

Key words : Inherited chorioretinal diseases, Positional candidate gene approach, Positional cloning, Functional cloning

別刷請求先：160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 真島 行彦

(平成 10 年 8 月 17 日受付, 平成 10 年 10 月 15 日改訂受理)

Reprint requests to: Yukihiko Mashima, M.D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received August 17, 1998 and accepted in revised form October 15, 1998)

I 緒 言

現在ものすごい勢いで、遺伝性眼疾患の病因遺伝子が明らかにされている。これは1991年に始まったヒトゲノム解析計画により、遺伝子工学の基盤技術の進歩、機器やシステムの開発、そしてデータの収集、管理、情報ネットワークの拡大などの成果である。当初の目標では、2005年までには高密度の遺伝地図、物理地図が作成され、最終的にはヒトゲノムの完全な全塩基配列が決定される¹⁾。

1980年代半ばまでの遺伝性網膜脈絡膜疾患に関する研究は、疾患遺伝子変異の結果生じた臨床像を電気生理学的検査を始め種々の方法で解析し、それらを基に疾患分類を中心に行われており、病因を解明することまではできなかった。1970年代以降の分子生物学の進歩により、遺伝性疾患の分子レベルでの解析が可能になると、まずファンクショナルクローニングが中心となり、生化学的異常が判明した疾患の遺伝子のクローニングが行われた。しかし、この方法で遺伝子がクローニングされた遺伝

性網膜脈絡膜疾患は唯一、次に述べる脳回状網膜脈絡膜萎縮である。一方、1980年代後半から、ポジショナルクローニングや候補遺伝子アプローチという手法により、生化学的異常が不明であっても、病因遺伝子を直接クローニングすることが可能になり²⁾、現在、遺伝性網膜脈絡膜疾患の研究が一気に進んだ³⁾。病気の本体が遺伝子レベルで明らかにされれば、今後は分子レベルでの疾患の解析が可能になり、臨床医学に多くの情報が提供される。さらには、新たな治療または遺伝子レベルでの治療の道が開ける。

疾患遺伝子の同定、クローニングには主に3つの方法(ファンクショナルクローニング、ポジショナルクローニングおよび位置的候補遺伝子アプローチ)があるが(図1)、我々は5年前にこれらの手法に関して当時の現状を総説で述べた⁴⁾。当時は位置的候補遺伝子アプローチによる遺伝子同定が主流であったが、候補となる新規遺伝子の数が限られていたことが問題であり、我々はそれに対して網膜組織に特異的に発現している新規遺伝子のクローニングと染色体上マッピングの必要性を提案した。我々はこの5年間に、その戦略に基づき遺伝性網膜脈絡膜疾患における病因遺伝子の同定を行ってきた。また、この5年間に冒頭でも述べたように、遺伝性網膜脈絡膜疾患に関する情報量が飛躍的に増え続けたので、本総説では遺伝性網膜脈絡膜疾患における病因遺伝子がどのようにして同定され、解析されてきたかを、当科のデータも含めて述べる。

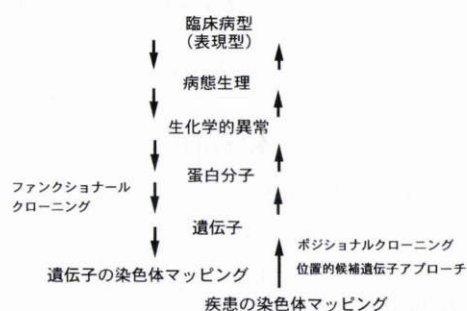


図1 疾患と原因遺伝子を明らかにする方法。

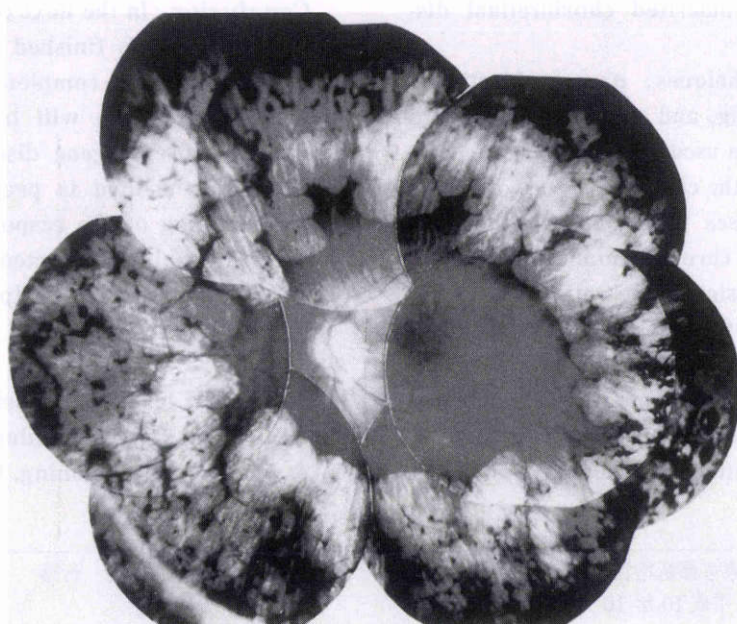


図2 脳回状網膜脈絡膜萎縮の眼底写真。
(Inana 博士のご好意による)

II ファンクショナルクローニングによる疾患遺伝子クローニング

1. 脳回状網膜脈絡膜萎縮の病因遺伝子

脳回状網膜脈絡膜萎縮は、常染色体劣性遺伝形式を呈する、比較的まれな遺伝性眼疾患である。小児期において夜盲を初発症状とする症例が多い⁵⁾。眼底所見は特徴的であり、赤道部を中心に脳表面の脳回を思わせる、白色～黄白色の脈絡膜網膜萎縮病変が多発し、後極部に向かい進行していく(図2)。強度近視、白内障を高頻度に合併する。病変は進行性であり、40～50代までには高度の視力障害をもたらす。本疾患においては、1973年に高オルニチン血症、高オルニチン尿症が報告され、体液中(血液、尿、脳脊髄液)のオルニチンの増量が明らかとなり、その後、1977年にオルニチン代謝経路の中で ornithine-aminotransferase (OAT) 活性の欠損、高度低下が発見された。OAT 蛋白が精製され、抗体を用いて OAT cDNA が 1986 年にクローニングされた⁶⁾。その後、染色体マッピングおよび遺伝子構造も明らかにされた⁷⁾。

2. OAT 遺伝子構造と遺伝子変異の特徴

OAT 遺伝子は第 10 染色体の長腕に存在し(10q26)、サイズは約 22 kb であり、11 個のエキソンから成る。翻訳開始部位はエキソン 3 に存在する。解読枠の転写により 439 個のアミノ酸残基から成る分子量 48 K の OAT 前駆体が形成される。OAT 遺伝子の発現を調節するプロモーター領域には、体中どこでも発現する構造(GC enrichment, Sp 1 binding site)と、組織特異性に発現を調節する構造(atypical TATA box, CCAAT box)の両方の構造が存在する。OAT はミトコンドリアマトリックス酵素であるが、OAT 前駆体(439 個のアミノ酸残基)が細胞質からミトコンドリアへ移行する際に重要なリーダー配列は最初の 32 個のアミノ酸残基であり、プロセッシングにより切り放され 407 個のアミノ酸残基の分子量 45 K の OAT となる。OAT はビタミン B₆ を補酵素としており、コドン 292(エキソン 8)のリジンおよびその周囲のアミノ酸残基がビタミン B₆ の結合部位とされている。

これまでに報告された脳回状網膜脈絡膜萎縮における

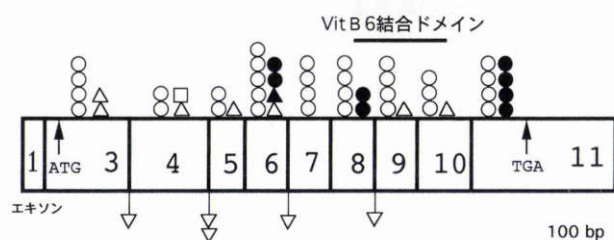


図3 脳回状網膜脈絡膜萎縮にみられる遺伝子変異。

○：ミスセンス変異，●：ノンセンス変異，△：欠失(数塩基)，▲：欠失(数キロ塩基，エキソン6を含む)，▽：スプライシング変異，□：挿入(数塩基)パーは 100 bp

OAT 遺伝子変異を図3に示した。変異は各エクソンに分布している。OAT 遺伝子の変異に関して特徴的なことは、日本人、フィンランド人、英国人、レバノン人、インド人、ユダヤ人、ポルトガル人などそれぞれに特異的な変異が報告され、人種により変異が異なることから、各地域において founder mutation (創始者変異)として存在することを示している^{8)~17)}。OAT 遺伝子内のいろいろな変異が脳回状網膜脈絡膜萎縮という単一の病気を生じる (genetic heterogeneity)。臨床的にビタミン B₆ 投与により、血中のオルニチン値が低下する型としない型が存在するが、多くは後者である¹⁸⁾。ビタミン B₆ 反応型の変異がこれまで3か所報告¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾されている。ビタミン B₆ 反応型の方が進行がやや遅い。

フィンランド人患者の間では少なくとも2種類の変異 (Arg 180 Thr, Leu 402 Pro) が比較的多くみられ、しかも、ホモ接合体(homozygote)の遺伝子変異を示すことが特徴である⁹⁾。したがって、これら2つの変異がフィンランド人の間で比較的多く保因されていることが考えられる。一方、同じようにほぼ単一民族で、地域的に隔離された日本人患者では特有の8種類もの変異が報告され、7人中5人がホモ接合体の遺伝子変異を示している¹⁷⁾。日本人患者の場合は血族結婚が多い。アメリカからの報告は血族結婚は少なく、ヘテロ接合体同士の遺伝子変異をもつ患者が比較的多く (compound heterozygote)、人種的、地域的交流が盛んであることが関係していると思われる。

III ポジショナルクローニングによる遺伝子クローニング

1. ポジショナルクローニングとは

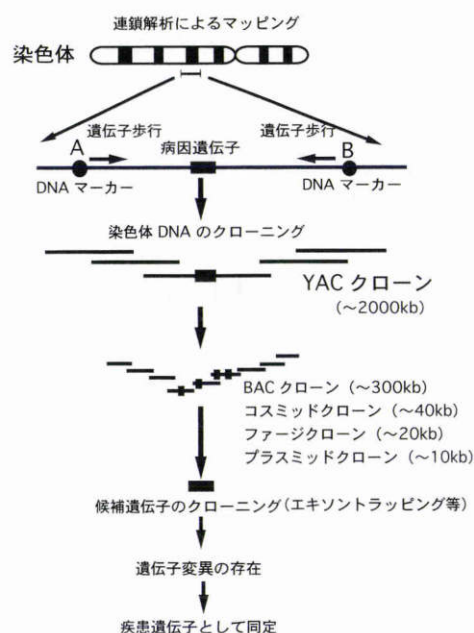


図4 ポジショナルクローニングのストラテジー。

図4にポジショナルクローニング法のシエマを示した。第1のステップは、連鎖解析により疾患遺伝子の染色体上での座位を明らかにする。この場合、連鎖解析で判明する最小の距離である1センチモルガン(1cM:減数分裂時に2つの座位間で1%の確立で組み換えの生じる遺伝子上での最小の距離で、染色体上では約 10^6 塩基または1,000 kbに相当)まで近接するDNAマーカーを単離することが必要である。コロイデミア、ノリエ病、X染色体伴性網膜色素変性(RP3)のように、染色体の部分欠失、転座部分などをもつ症例が存在すれば、遺伝子の座位をより狭い領域に精密に決定でき、遺伝子のクローニングをより有利に進めることができる。第2のステップは、連鎖解析により決定されたDNAマーカー座位から病因遺伝子に向かい担念に染色体上のDNAを調べていく。その場合、染色体上のDNAを200~2,000 kbまでクローニングできる酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)ベクターを用いて、完全整列クローン(コンテイング)地図を作成し、重要と思われるゲノム領域に関しては、さらに高密度なコンテイング地図を作成するために、300 kbまでクローニングできる細菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)ベクター、40 kbまでのコスミッドベクター、20 kbぐらいまでのファージベクターや10 kbまでのプラスミドベクターへと、目的に応じてDNAをダウンサイジングしてクローニングしていく。クローニングされたDNA断片から遺伝子を同定するために、zoo blot, CpGアイランドの同定、エキソントラップなどの手段を用いて遺伝子の一部であるエキソン領域がみつければ、これをプローブとして用いて、網膜のcDNAライブラリーから候補となるcDNAをクローニングすることができ、続いて遺伝子の全構造が決定される。そして対象としている疾患において、その遺伝子内に突然変異の存在を確認することで、最終的に疾患遺伝子として同定される。しかしながら、この方法は膨大な時間と労力が必要である。もし、その領域に既知の遺伝子が存在すれば、次に述べる位置的候補遺伝子アプローチ法を選択する。レーベル先天盲(Leber's congenital amaurosis)の疾患遺伝子は、ポジショナルクローニングの

過程で、後述する候補遺伝子アプローチ法で明らかになった¹⁹⁾。表1にこれまでにポジショナルクローニングによりクローニングされた網脈絡膜疾患を示した。8年間で9個の遺伝子がクローニングされたに過ぎないが^{20)~30)}、最近の3年間で7つの遺伝子がクローニングされたので技術、情報管理の進歩が早い速度で進んでいることを示している。また、多くはX染色体に位置する疾患であり、また、染色体の転座や欠損を伴った疾患に多い。ノリエ病に関しては、本邦では大庭ら³¹⁾の総説があるが、同じ遺伝子の変異で家族性滲出性硝子体網膜症(X染色体伴性)を生じる。

2. X染色体伴性先天網膜分離症

最近、X染色体伴性先天網膜分離症の疾患遺伝子(*XLRS 1*)がクローニングされたが、1985年にGalらがDNAマーカーを報告してから、疾患遺伝子に1 cM以内まで近づくのに約10年を要し³²⁾、1997年に疾患遺伝子(*XLRS 1*)がクローニングされた²⁹⁾。この蛋白のアミノ酸構造をみると、細胞の接着因子であるdiscodinとホモロジーを有し、発生期における細胞と細胞の接着に重要な働きをしていることが想像される。エキソン4~6がdiscodinとホモロジーを有するが、ミスセンス変異はエキソン4~6に存在し、一方、翻訳開始コドン変異、エキソン1およびプロモーター領域の欠失、スプライシング変異といった蛋白の発現を障害する変異がエキソン1~3に存在する²⁵⁾³³⁾³⁴⁾。したがって、エキソン4~6は機能的に重要な領域を意味していると思われる。我々も9人の日本人患者において9つの変異を見出し、同様の結果を得た。また、そのうち4つの変異は欧米人とは全く異なる日本人特有の変異であった。5つは欧米人にみつかった変異と同じであったが、このことは先祖を同じくするというよりは、*XLRS 1* 遺伝子内に各々独自に変異が生じたと考えられる。*XLRS 1* 遺伝子内のいろいろな変異が先天網膜分離症という単一の病気を生じる。

IV 位置的候補遺伝子アプローチによる疾患遺伝子の同定

以下の3つの方法がある。

表1 ポジショナルクローニングされた網脈絡膜変性症の疾患遺伝子

疾患	報告年	遺伝子	染色体	文献
コロイデミア	(1990年)	REP-1 (Rab escort protein-1)	Xq21.2	20
ノリエ病	(1992年)	norrin	Xp11.3	21, 22
X染色体伴性網膜色素変性症(PR3)	(1996年)	RPGR (RP GTPase regulator)	Xp21.1	23
スタルガルト病	(1997年)	ABCR (ATP-binding cassette transport)	1p21-22.1	24
先天網膜分離症	(1997年)	XLRS1	Xp22.2	25
ベスト病	(1998年)	VMD2	11q13	26
X染色体伴性停滯性夜盲(不全型)	(1998年)	CACNA1F (calcium channel α 1-subunit)	X11.23	27, 28
アッシャー症候群IIa型	(1998年)	USH2A	1p41	29
X染色体伴性網膜色素変性症(PR2)	(1998年)	RP2	Xp11.3	30

(1998年10月現在)

1. 網膜特異的な既知の遺伝子からのアプローチ

この方法を用いて最初に疾患遺伝子としてロドプシンが同定されたのは、常染色体優性遺伝網膜色素変性 (adRP) である³⁵⁾。既に染色体マッピング、構造、機能の判明した遺伝子を対象に、その遺伝子と連鎖解析によりマッピングされた疾患とが同じ染色体上に位置している場合、その遺伝子内に疾患に特異的な突然変異が存在するか否かを調べていく方法を位置的候補遺伝子アプローチという。対象疾患の患者において候補となる疾患遺伝子内に、①アミノ酸の変化が存在した場合、正常人には全

く存在せず、ある疾患に特異的に存在し、②元のアミノ酸が種族を越えて保存され重要な意味をもって、さらに、③その変異が家系内で疾患とともに遺伝していれば、単なる多型ではなく突然変異と断定することができ、その遺伝子が疾患遺伝子として同定されることになる。図5にロドプシン遺伝子の同定のシェーマを示す。現在までに約 50 種類のロドプシン変異が報告されている。欧米人では adRP 患者の約 25% がロドプシン変異とされているが³⁶⁾、本邦での報告^{37)~41)}は少なく、日本人ではロドプシン変異の患者は少ないと思われる。図6はロドプシ

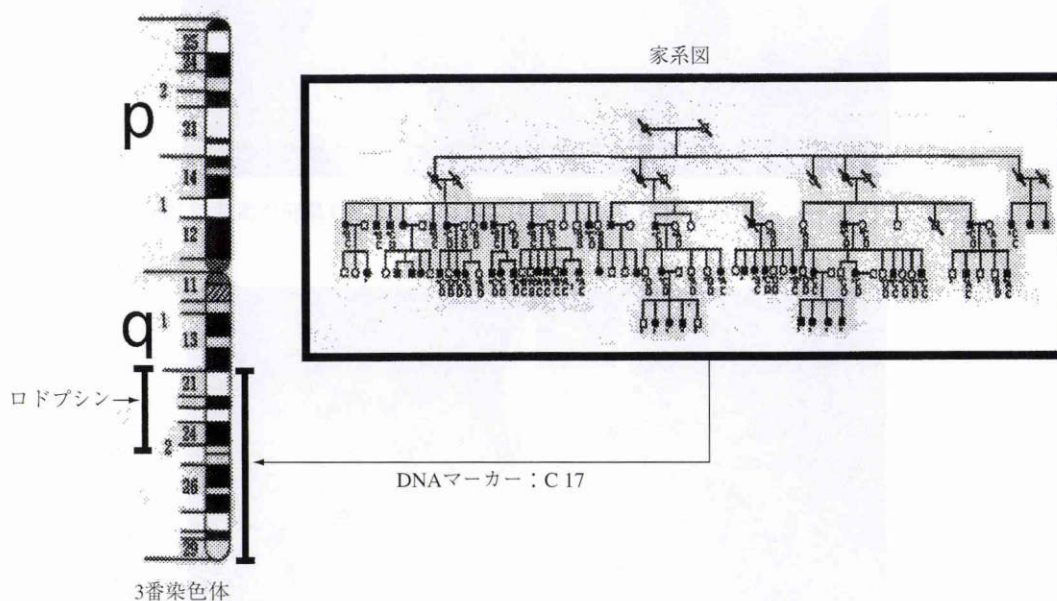


図5 ロドプシンと常染色体優性網膜色素変性。

連鎖解析により、この家系の疾患遺伝子は3番染色体長腕にマッピングされた。次に、候補遺伝子アプローチにより疾患遺伝子としてロドプシンが同定された。

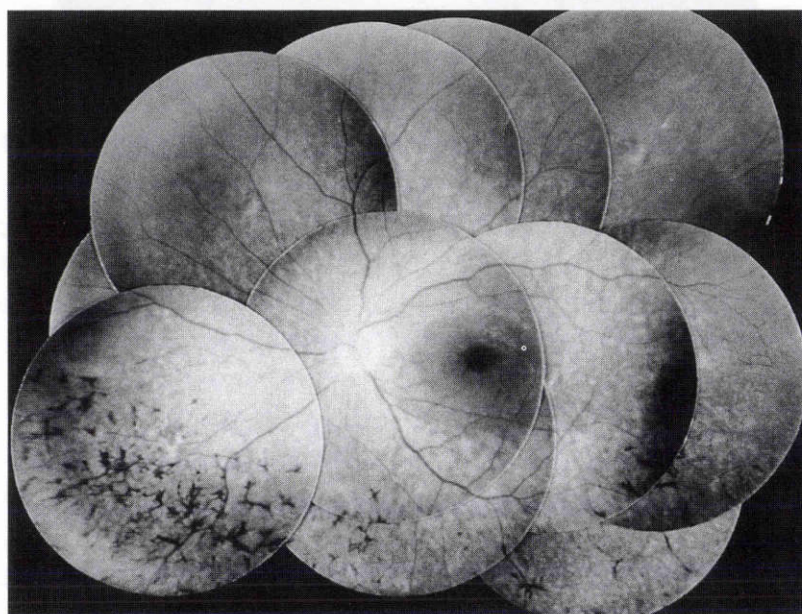


図6 ロドプシン Glu 181 Lys 変異による常染色体優性網膜色素変性の眼底写真 (39 歳)。

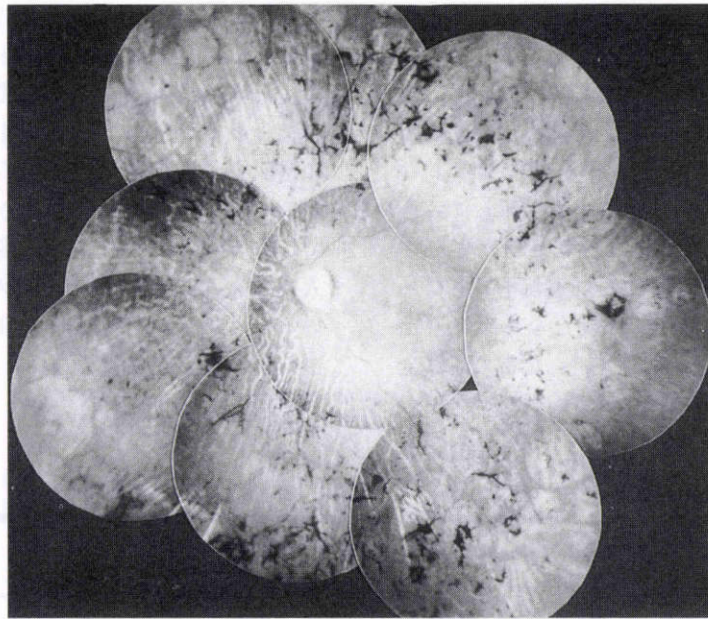


図7 ペリフェリン/RDS Cys 214 Ser 変異による常染色体優性網膜色素変性(52 歳).

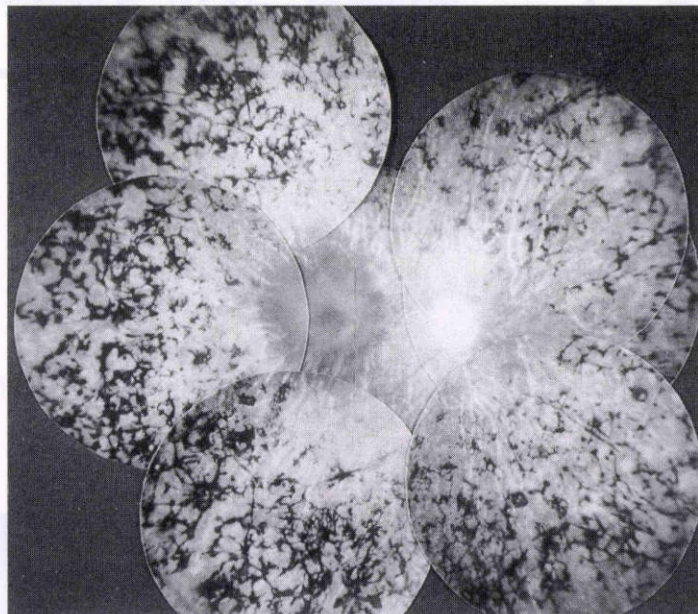


図8 cGMP phosphodiesterase β -subunit Ile 535 Asn 変異による常染色体劣性網膜色素変性(49 歳).

ン遺伝子の Glu 181 Lys 変異がみられた adRP の眼底写真である³⁹⁾. 色素沈着は下方網膜中心にみられる.

2. 遺伝性網脈絡膜変性動物モデルからのアプローチ

ペリフェリン/RDS 遺伝子は遺伝性網膜変性の動物モデルである rds (retinal degeneration slow) マウスから出発した方法である. 優性遺伝するこの動物モデルの疾患遺伝子が 1989 年にクローニングされ, この cDNA プローブを用いてヒトにおいても同じ遺伝子が存在することが 1991 年に明らかにされ⁴²⁾, ヒトでは第 6 染色体短腕にマッピングされた⁴³⁾. ペリフェリン/RDS は 346 個のアミノ酸から成り, ロドプシンと同様に杆体円板膜を 4 回横切る構造をしており, 接着分子として円板膜形成と

安定化に重要な機能をしていると考えられている. さらに, ペリフェリンは錐体外節にも存在する.

連鎖解析により第 6 染色体短腕にマッピングされた adRP 家系においてペリフェリン/RDS 遺伝子との強い連鎖が報告されたので, 数多くの adRP 患者をスクリーニングした結果, 数家系においてペリフェリン/RDS 遺伝子変異がみつき, 疾患遺伝子として同定された⁴⁴⁾⁴⁵⁾. また, 網膜色素変性の亜型である白点状網膜炎や, さらに黄斑部変性症においてもペリフェリン/RDS 遺伝子内に変異がみついている⁴⁶⁾⁴⁷⁾. 今までは, ある一つの遺伝子はその中に種々の突然変異を生じて, 一つの臨床表現型 (phenotype) のみを表現するという考えであったが,

表 2 位置的候補遺伝子検索により同定された遺伝子

遺伝子(染色体座位)	報告年	疾患	文献
RHO(3q21-24)	(1990)	adRP	35
	(1992)	arRP	57
	(1993)	adCSNB	58
RDS(6p11.2-21.1)	(1991)	adRP(動物モデル)	44, 45
	(1993)	macular dystrophy	46, 47
PDEB(4p16.3)	(1993)	arRP(動物モデル)	53
	(1994)	adCSNB	59
norrin(Xp11.3)	(1993)	familial exudative vitreoretinopathy	60
TIMP3(22q13-ter)	(1994)	Sorsby's fundus dystrophy	61
CNGC(4p14-q13)	(1994)	arRP	62
RDS and ROM-1(6p11 and 11q13)	(1994)	digenic RP	63
PDEA(5q31-34)	(1995)	arRP	64
myosin VIIA(11p13.5)	(1995)	Usher syndrome type IB(動物モデル)	65
arrestin(SAG)(2q37.1)	(1995)	Oguchi disease	66
RETGC(17p13.1)	(1996)	Leber's congenital amaurosis	19
	(1998)	ad cone-rod dystrophy	67
GNAT1(3p21)	(1996)	adCSNB(Nougaret form)	68
PHOK(13q34)	(1997)	Oguchi disease	69
CRALBP(15q26)	(1997)	arRP	70
RPE65(1p31)	(1997)	Leber's congenital amaurosis	71, 72
CRX(19q13.3)	(1997)	ad cone-rod dystrophy	73, 74
	(1998)	Leber's congenital amaurosis	75
TULP1(6p21.3)	(1998)	arRP(動物モデル)	54, 55
GUCA1A(6p21.1)	(1998)	ad cone dystrophy	76
CNGA3(2q11)	(1998)	total colorblindness	77

(1998年7月現在)

RHO : rhodopsin , RDS : retinal degeneration slow , PDEB : rod cGMP phosphodiesterase β subunit , TIMP3 : tissue inhibitor of metalloproteinases-3 , CNGC : rod cGMP-gate cation channel α subunit , PDEA : rod cGMP phosphodiesterase α subunit , RETGC : retina-specific guanylate cyclase , GNAT1 : rod transducin α subunit , RHOK : rhodopsin kinase , CRALBP : cellular retinaldehyde-binding prote-in , CRX : cone-rod homeobox , TULP1 : tubby-like protein 1 , GUCA 1A : guanyl cyclase activator 1A , CNGA3 : α -subunit of the cone photoreceptor cGMP-gate cation channel , RP : retinitis pigmentosa , CSNB : congenital stationary night blindness , ad : autosomal dominant , ar : autosomal recessive

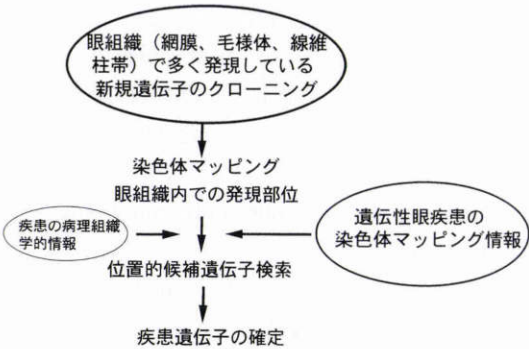


図 9 遺伝性眼疾患の疾患遺伝子解明のためのストラテジー。

ペリフェリン/RDS の場合は異なるいくつかの臨床表現型を表現している。ペリフェリン/RDS は杆体と錐体の両方に存在するため、このようにアミノ酸変異の違いによりどちらか一方が優位に障害されると異なる臨床表現型を呈するものと考えられ、本遺伝子変異の臨床表現型は多彩なことが特徴である。図 7 にペリフェリン/RDS

遺伝子変異の症例の眼底写真を示す⁴⁸⁾。黄斑部にも変性がみられ、明らかにロドプシン遺伝子変異の症例と眼底所見は異なる。現在までにペリフェリン/RDS 遺伝子変異は約 50 種類が報告されているが(網膜色素変性および黄斑部変性症)、本邦においても 5 種類ほど報告^{48)～52)}されている。

同様に、動物モデルからのアプローチにより *BPDE* 遺伝子⁵³⁾、*TULP1* 遺伝子⁵⁴⁾⁵⁵⁾ が同定された。図 8 は *BPDE* 遺伝子変異の常染色体劣性遺伝網膜色素変性患者の眼底写真である⁵⁶⁾。

1. または 2. の方法で主に視細胞で作用している遺伝子が検索され、表 2 に示す遺伝子が疾患遺伝子として同定された^{19)35)44)～47)53)～55)57)～77)}。

3. 新たな網膜特異的遺伝子のクローニングからのアプローチ

遺伝性の網脈絡膜疾患の疾患遺伝子同定のために、網膜特異的 cDNA ライブラリーを作製し、そこから新規遺伝子をクローニングし、さらに染色体にマッピングし、位置的候補遺伝子アプローチを効率良く応用するというも

のである(図9).この戦略により,cone-rod dystrophyの病因遺伝子であるcone-rod homeobox(CRX)遺伝子がクローニングされた⁷³⁾⁷⁴⁾.同様の戦略はマイアミ大学のBascom Palmer Eye InstituteのGeorge Inanaらのグループでも行われ,リカバリン⁷⁸⁾,HRG 4⁷⁹⁾がクローニングされたが,これらの遺伝子は現在疾患遺伝子として同定されていない.

我々の慶應大学グループも疾患遺伝子同定のために,同様の戦略を用いて,1993年からクローニングを開始した⁸⁰⁾.すなわち,以下の5つのステップで我々は現在までに5つの遺伝子のクローニングおよび染色体マッピングを行い,そのうち3つに関しては抗体を作製し,眼組織での発現を明らかにした.

1) 網膜特異的 cDNA ライブラリーの作製

網膜 cDNA ライブラリーから脳 cDNA ライブラリーを差し引き(subtractal hybridization 法)することにより,網膜に特異的に発現している cDNA を集める.さらに,肝,胎児脳,胎児肝および胎盤などの組織の cDNA をプローブとして用い,他の臓器に発現している cDNA を除去し,網膜に強く発現している cDNA を約 100 選択した(differential hybridization 法).

2) 数 100 bp の塩基配列を決定し,データベースから未知のクローンを 30 個選択した.

3) ノーザンブロット法で網膜に多く発現しているクローンを 20 個選択した.

4) 11 個のクローンに関して fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法による染色体マッピングを行った.現在までに報告されている遺伝性眼疾患の染色体マッピング情報と比較した(1994~1995 年当時).

5) 染色体にマッピングされた疾患を基に,5つのクローンに関して全 cDNA の構造解析を行ったが,さらに網膜脈絡膜変性と強く関連すると思われる以下の3つのクローンに注目し,遺伝子構造解析,組織発現,変異検索を行った.

a) ミオシリン(myocilin, 遺伝子名は MYOC)

染色体 1 q 23~24 に存在し,mRNA は約 2.3 kb,ノーザンブロット法で網膜,毛様体,骨格筋,心筋などに発現がみられる.アミノ酸配列(504 アミノ酸)はオルファクトメジンに相同性のある部分(40%)と,ミオシンに相同性のある部分(25%)とから構成されている.この新規遺伝子は運動蛋白質ミオシンに相同性を有していたので,我々はミオシリンと命名した⁸¹⁾.ミオシリンはマウス網膜では外顆粒層で発現し,免疫電子顕微鏡による観察では視細胞の結合線毛の基底器官に存在する細胞骨格蛋白である.結合線毛は杆体内節と外節とを結合する機能をもつ.さらに,ミオシリンは嗅覚組織の感覚上皮,蝸牛の線毛細胞にも発現している.我々は,当初ミオシリンの組織発現部位から,アッシャー症候群 2 A 型の病因遺伝子と考え(1 q 32~q 41),アメリカとの共同研究によりアッ

シャー症候群 2 A 型の 10 家系を検索したが,遺伝子異常は同定できなかった⁸²⁾.その後,1997 年に Stone らのグループは,若年性家族性開放隅角緑内障(染色体 1 q 23~q 25)の病因遺伝子として trabecular meshwork induced glucocorticoid response (TIGR) 遺伝子を報告⁸³⁾した.これは,グルココルチコイド投与後の培養隅角線維柱帯細胞で発現が誘発される蛋白質であるが,ミオシリンと同一のものであった.現在,ミオシリン/TIGR 変異が 20 種類ほど報告⁸⁴⁾されている.我々のグループはマウスのミオシリンをクローニングしたが,ヒトのミオシリンと約 82% の相同性があり,隅角の線維柱帯に発現がみられた⁸⁵⁾.今後はミオシリン遺伝子の過剰発現による影響を調べるトランスジェニックマウスや遺伝子の機能を抑制したノックアウトマウスによる解析を予定している.

b) 網膜特異的アミノキシダーゼ[retina-specific amine oxidase (RAO), 遺伝子名は AOC 2]

染色体 17 q 21 に存在し,mRNA は約 2.3 kb,ノーザンブロット法で網膜だけに発現がみられる.アミノ酸配列(729 アミノ酸)はほ乳類の銅依存性アミノキシダーゼと 60~80% の高い相同性を示したため,我々は網膜特異的アミノキシダーゼと命名した⁸⁶⁾.*In situ* hybridization 法ではマウス網膜の神経節細胞に発現がみられた⁸⁷⁾.当初は染色体 17 q にマップされた常染色体優性網膜色素変性の疾患遺伝子を想定していたが,発現パターンから遺伝性の視神経萎縮症の疾患遺伝子と考え,6 歳までに発症している視神経萎縮,または視神経低形成患者の DNA を検索している.ラット副腎のγ-aminobutyric acid (GABA) を合成することが知られているので⁸⁸⁾,ヒト網膜において RAO は GABA を合成していることが想定され,現在生化学的に検討している.マウス網膜の GABA の染色パターンはアマクリン細胞と一部の神経節細胞が染色される.したがって,この一部に染色された神経節細胞において RAO が関係している可能性がある.

c) Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat (ISLR)

染色体 15 q 23~q 24 に存在し,mRNA は約 2.3 kb,ノーザンブロット法で網膜だけでなく,多くの組織に発現がみられる(心臓,骨格筋,膵臓,胸腺,前立腺,睾丸,卵巣,小腸,甲状腺,副腎,脊髄)⁸⁹⁾.ただし,脳には発現はみられない.アミノ酸配列から,機能として構造蛋白,接着蛋白が考えられる.Bardet-Biedle 症候群は肥満,精神発達遅延,多指症,網膜色素変性,性腺機能低下症を呈する全身疾患であるが,病因遺伝子の 1 つが染色体 15 q 22~q 23 にマッピングされている⁹⁰⁾.ISLR の組織の発現パターンと Bardet-Biedl 症候群の染色体マッピングから考え,ISLR が Bardet-Biedl 症候群の疾患遺伝子である可能性も考えられ,現在解析中である.

V おわりに

21 世紀にはヒトゲノムの全塩基配列が決定され、ある程度機能遺伝子の存在が明らかになるので、ポジショナルクローニング法により遺伝子をクローニングする必要はなくなる。すなわち、ある遺伝性疾患が染色体上に精密にマッピングされれば、目的の領域にいくつかの遺伝子が存在するので、それを 1 つずつ候補遺伝子として検索していくことになる。21 世紀には位置的候補遺伝子アプローチ法が疾患遺伝子同定の主流となり、疾患遺伝子が同定された場合、その遺伝子の機能解析、さらに、疾患の発症機序を解明していくことにつながる。したがって、今後疾患遺伝子を同定していくために重要なことは、遺伝性疾患の大きな家系の収集および疾患の染色体マッピングである。一方、疾患は少ないと思われるが、生化学的異常が判明した疾患に関しては、ファンクショナルクローニング法により、遺伝子がクローニングされることになる。現在、本邦においては遺伝性網膜脈絡膜疾患の大きな家系調査、臨床解析は少なく、遺伝性疾患の染色体マッピングはほとんど行われていない⁹¹⁾。我々のように、網膜で発現している新規の遺伝子をクローニングした場合は、疾患遺伝子の染色体マッピングを進めている海外のグループと共同研究で進めていくしかない。

本論文を終えるに当たり、ご校閲を賜りました小口芳久教授に深謝いたします。

本研究は以下の共同研究による。慶應義塾大学医学部眼科学教室：窪田 良、今村 裕、長沢朱美、高橋弘毅、佐賀正道、緋田芳樹、明尾 潔、小口芳久。国立小児病院眼科：東 典範。慶應義塾大学医学部分子生物学教室：王 軼敏、浅川修一、簗島伸生、工藤 純、清水信義。東海大学健康科学部：野田節子。東北大学医学部眼科学教室：塩野 貴(現塩野眼科)、玉井 信。Bascom Palmer Eye Institute：George Inana。National Eye Institute：J Fielding Hejtmancik。

本論文の主旨は第 102 回日本眼科学会総会、シンポジウム「網膜硝子体疾患の基礎と臨床」で講演した。本研究の一部は文部省研究費補助金基盤研究 B(09470384)、平成 8、9 年度厚生省特定疾患網膜脈絡膜・視神経萎縮症調査研究班補助金、平成 9 年度厚生科学研究費補助金による。

文 献

- 1) **Engel LW** : The human genome project. History, goals and progress to date. Arch Pathol Lab Med 117: 459—465, 1993.
- 2) **Collins FS** : Positional cloning moves from predi-
tional to traditional. Nature Genet 9: 347—350, 1995.
- 3) **Sullivan LS, Daiger SP** : Inherited retinal degeneration : Exceptional genetic and clinical heterogeneity. Mol Med Today 380—386, 1996.
- 4) **真島行彦, 佐賀正道, 小口芳久** : 遺伝性網膜脈絡膜疾患の病因遺伝子クローニング—ポジショナルクローニ
ングと候補遺伝子アプローチ—. 日眼会誌 97: 1253—1264, 1993.
- 5) **Valle D, Simell O** : Hyperornithinemias. In : Stan-
bury JB, et al (Eds) : The Metabolic Basis of Inher-
ited Disease, 7th ed. McGraw-Hill, New York, 1147—
1185, 1995.
- 6) **Inana G, Totsuka S, Redmond M, Dougherty T, Nagle J, Shiono T, et al** : Molecular cloning of hu-
man ornithine aminotransferase mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1203—1207, 1986.
- 7) **Mitchell GA, Looney JE, Brody LC, Steel G, Suchanek M, Engelhardt JF, et al** : Human orni-
thine- δ -aminotransferase cDNA cloning and analy-
sis of the structural gene. J Biol Chem 263 : 14288—14295, 1988.
- 8) **Mitchell GA, Brody LC, Looney J, Steel G, Suchanek M, Dowling C, et al** : An initiator codon
mutation in ornithine- δ -aminotransferase causing
gyrate atrophy of the choroid and retina. J Clin In-
vest 81 : 630—633, 1988.
- 9) **Mitchell GA, Brody LC, Sipila I, Looney JE, Wong C, Engelhardt JF, et al** : At least two mu-
tant alleles of ornithine delta-aminotransferase
cause gyrate atrophy of the choroid and retina in
Finns. Proc Natl Acad Sci USA 86: 197—201, 1989.
- 10) **Brody LC, Mitchell GA, Obie C, Michaud GA, Steel G, Fontaine G, et al** : Ornithine δ -aminotr-
ansferase mutations in gyrate atrophy. Allelic het-
erogeneity and functional consequences. J Biol
Chem 267 : 3302—3307, 1992.
- 11) **Mashima Y, Murakami A, Weleber RG, Ken-
naway NG, Clarke L, Shiono T, et al** : Nonsense-
codon mutations of the ornithine aminotransferase
gene with decreased levels of mutant mRNA in
gyrate atrophy. Am J Hum Genet 51: 81—91, 1992.
- 12) **Mashima Y, Weleber RG, Kennaway NG, Inana G** : A single-base change at a splice acceptor site
in the ornithine aminotransferase gene causes ab-
normal RNA splicing in gyrate atrophy. Hum
Genet 90: 305—307, 1992.
- 13) **Akaki Y, Hotta Y, Mashima Y, Murakami A, Kennaway NG, Weleber RG, et al** : A deletion in
the ornithine aminotransferase gene in gyrate at-
rophy. J Biol Chem 267: 12950—12954, 1992.
- 14) **Mashima Y, Shiono T, Inana G** : Rapid and effi-
cient molecular analysis of gyrate atrophy using
denaturing gradient gel electrophoresis. Invest
Ophthalmol Vis Sci 35: 1065—1070, 1994.
- 15) **Ramesh V, McClatchey AI, Ramesh N, Benoit LA, Berson EL, Shih VE, et al** : Molecular basis of
ornithine aminotransferase deficiency in B-6-re-
sponsive and -nonresponsive forms of gyrate at-
rophy. Proc Natl Acad Sci USA 85: 3777—3780, 1988.
- 16) **Michaud J, Thompson GN, Brody LC, Steel G, Obie C, Fontaine G, et al** : Pyridoxine-responsive

- gyrate atrophy of choroid and retina: Clinical and biochemical correlates of the mutation A 226 V. *Am J Hum Genet* 56: 616—622, 1995.
- 17) **Mashima Y, Shiono T, Tamai M, Inana G**: Heterogeneity and uniqueness of ornithine aminotransferase mutations found in Japanese gyrate atrophy patients. *Curr Eye Res* 15: 792—796, 1996.
 - 18) **Shih VE, Mandell R, Berson EL**: Pyridoxine effects on ornithine ketoacid transaminase activity in fibroblasts from carriers of two forms of gyrate atrophy of the choroid and retina. *Am J Hum Genet* 43: 929—933, 1988.
 - 19) **Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, et al**: Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nature Genet* 14: 461—464, 1996.
 - 20) **Cremers FPM, van de Pol DJR, van Kerkhoff LPM, Wieringa B, Ropers H-H**: Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 347: 674—677, 1990.
 - 21) **Berger W, Meindl A, van de Pol TJR, Cremers FPM, Ropers HH, Doerner C, et al**: Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nature Genet* 1: 199—203, 1992.
 - 22) **Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dorner C, et al**: Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nature Genet* 2: 139—143, 1992.
 - 23) **Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, et al**: A gene (*RPGR*) with homology to the *RCC 1* guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP 3). *Nature Genet* 13: 35—42, 1996.
 - 24) **Alkimets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, et al**: A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature Genet* 15: 236—245, 1997.
 - 25) **Sauer CG, Gehrig A, Warneke Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, et al**: Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nature Genetics* 17: 164—170, 1997.
 - 26) **Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, Li W, Xie G, Marknell T, et al**: Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature Genet* 19: 241—247, 1998.
 - 27) **Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BHF, et al**: An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 19: 260—263, 1998.
 - 28) **Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, et al**: Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp 11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 19: 264—267, 1998.
 - 29) **Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, Ma-Edmonds M, et al**: Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* 280: 1753—1757, 1998.
 - 30) **Schwahn U, Lenzner S, Dong J, Feil S, Hinemann B, van Duijnhoven G, et al**: Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet* 19: 327—332, 1998.
 - 31) **大庭紀雄, 伊佐敷靖**: Norrie 病に関する最近の知見. *日眼会誌* 100: 101—110, 1996.
 - 32) **Huopaniemi L, Rantala A, Tahvanainen E, de la Chapelle A, Alitalo T**: Linkage disequilibrium and physical mapping of X-linked juvenile retinoschisis. *Am J Hum Genet* 60: 1139—1149, 1997.
 - 33) **The Retinoschisis Consortium**: Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis. *Hum Mol Genet* 7: 1185—1192, 1998.
 - 34) **Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, Ohta T, Fujimaki T, Tamaki K, et al**: Japanese juvenile retinoschisis is caused by mutations of the *XLRS 1* gene. *Hum Genet* 103: 142—144, 1998.
 - 35) **Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, et al**: A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343: 364—366, 1990.
 - 36) **Dryja TD, Hahn LB, Cowley GS, McGee TL, Berson EL**: Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9370—9374, 1991.
 - 37) **Shiono T, Hotta Y, Noro M, Sakuma T, Tamai M, Hayakawa M, et al**: Clinical features of Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by point mutation in codon 347 of rhodopsin gene. *Jpn J Ophthalmol* 36: 69—75, 1992.
 - 38) **Hayakawa M, Hotta Y, Imai Y, Fujiki K, Nakamura A, Yanashima K, et al**: Clinical features of autosomal dominant retinitis pigmentosa with rhodopsin gene codon 17 mutation and retinal neovascularization in a Japanese patient. *Am J Ophthalmol* 115: 168—73, 1993.
 - 39) **Saga M, Mashima Y, Akeo K, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N**: Autosomal dominant retinitis pigmentosa, a mutation in codon 181 (Glu→Lys) of the rhodopsin gene in a Japanese family. *Ophthalmic Genet* 15: 61—67, 1994.
 - 40) **尾島 真, 村松徳文, 江木邦晃, 吉田匠子, 大槻美紀, 河野克仁, 他**: ロドプシン遺伝子コドン 296 の変異をもつ常染色体優性網膜色素変性患者の眼所見. 眼

- 紀 48:1067—1071, 1997.
- 41) Yoshii M, Murakami A, Akeo K, Fujiki K, Saga M, Mizukawa A, et al: Visual function in retinitis pigmentosa related to a codon 15 rhodopsin gene mutation. *Ophthalmic Res* 30: 1—10, 1998.
 - 42) Travis GH, Christerson L, Danielson PE, Klisak I, Sparkes RS, Hahn LB, et al: The human retinal degeneration slow (RDS) gene: Chromosome assignment and structure of the mRNA. *Genomics* 10: 733—739, 1991.
 - 43) Farrar GJ, Jordan SA, Kenna P, Humphries MM, Kumar-Singh R, McWilliam P, et al: Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Localization of a disease gene (RP 6) to the short arm of chromosome 6. *Genomics* 11: 870—874, 1991.
 - 44) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, et al: A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478—480, 1991.
 - 45) Kajiwaru K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP: Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 480—483, 1991.
 - 46) Kajiwaru K, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctata albescens. *Nature Genet* 3: 208—212, 1993.
 - 47) Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A, et al: Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genet* 3: 213—218, 1993.
 - 48) Saga M, Mashima Y, Akeo K, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N: A novel Cys-214-Ser mutation in the peripherin/RDS gene in a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 92: 519—521, 1993.
 - 49) Nakazawa M, Kikawa E, Kamio K, Chida Y, Shiono T, Tamai M: Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and transversion mutation in codon 244 (Asn 244 Lys) of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 112: 1567—73, 1994.
 - 50) Nakazawa M, Wada Y, Tamai M: Macular dystrophy associated with monogenic Arg 172 Trp mutation of the peripherin RDS gene in a Japanese family. *Retina* 15: 518—523, 1995.
 - 51) Nakazawa M, Naoi N, Wada Y, Nakazaki S, Maruiwa F, Sawada A, et al: Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with a Val 200 Glu mutation of the peripherin/RDS gene. *Retina* 16: 405—410, 1996.
 - 52) Nakazawa M, Kikawa E, Chida Y, Wada Y, Shiono T, Tamai M: Autosomal dominant cone-rod dystrophy associated with mutations in codon 244 (Asn 244 His) and codon 184 (Tyr 184 Ser) of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 114: 72—78, 1996.
 - 53) McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: Recessive mutations in the gene encoding the β -subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 4: 130—134, 1993.
 - 54) Hagstrom SA, North MA, Nishina PM, Berson EL, Dryja TP: Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP 1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 18: 174—176, 1998.
 - 55) Banerjee P, Kleyn PW, Knowles JA, Lewis CA, Ross BM, Parano E, et al: TULP 1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 18: 177—179, 1998.
 - 56) Saga M, Mashima Y, Akeo K, Kudoh J, Shimizu N, Oguchi Y: A novel homozygous Ile 535 Asn mutation in the rod cGMP phosphodiesterase β -subunit gene in two brothers of a Japanese family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Curr Eye Res* 17: 332—335, 1998.
 - 57) Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP: A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 1: 209—213, 1992.
 - 58) Dryja TP, Berson EL, Rao VR, Oprian DD: Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 4: 280—283, 1993.
 - 59) Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T: Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase β -subunit in autosomal dominant stationary night blindness. *Nature Genet* 7: 64—68, 1994.
 - 60) Chen ZY, Battinelli EM, Fielder A, Bunday S, Sims K, Breakefield XO, et al: A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nature Genet* 5: 180—183, 1993.
 - 61) Weber BHF, Vogt G, Pruett RC, Stohr H, Felbor U: Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP 3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nature Genet* 8: 352—356, 1994.
 - 62) Dryja TP, Finn JT, Peng Y-W, McGee TL, Berson EL, Yau K-W: Mutations in the gene encoding the α subunit of rod cGMP-gate channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10177—10181, 1995.

- 63) **Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP** : Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM 1 loci. *Science* 264: 1604—1608, 1994.
- 64) **Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP** : Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the α subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nature Genet* 11: 468—471, 1995.
- 65) **Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J**, et al: Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60—61, 1995.
- 66) **Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A** : A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nature Genet* 10: 360—362, 1995.
- 67) **Kelsell RE, Gregory-Evans K, Payne AM, Perault I, Kaplan J, Yang R-B**, et al: Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant cone-rod dystrophy. *Hum Mol Genet* 7: 1179—1184, 1998.
- 68) **Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B** : Missense mutation in the gene encoding the α subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nature Genet* 13: 358—360, 1996.
- 69) **Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP** : Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nature Genet* 15: 175—178, 1997.
- 70) **Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ**, et al: Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Genet* 17: 198—200, 1997.
- 71) **Marlhens F, Bareil C, Griffioen J-M, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C**, et al: Mutations in *RPE 65* cause Leber's congenital amaurosis. *Nature Genet* 17: 139—141, 1997.
- 72) **Gu S, Thompson DA, Srikumari CRS, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A**, et al: Mutations in *RPE 65* cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genet* 17: 194—197, 1997.
- 73) **Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L**, et al: Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* 91: 543—45, 1997.
- 74) **Swain PK, Chen S, Wang Q-L, Affatigato LM, Coats CL, Brady KD**, et al: Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 19: 1329—1336, 1997.
- 75) **Freund CL, Wang Q-L, Chen S, Muskat BL, Wiles CD, Szeffield VC**, et al: *De novo* mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nature Genet* 18: 311—312, 1998.
- 76) **Payne AM, Downes SM, Bessant DAR, Taylor R, Holder GE, Warren MJ**, et al: A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA 1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree mapping to a new locus on chromosome 6 p 21.1. *Hum Mol Genet* 7: 273—277, 1998.
- 77) **Kohl S, Marx T, Giddings I, Jagle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E**, et al: Total colorblindness is caused by 7 mutations in the gene encoding the α -subunit of the cone photoreceptor cGMP-gate channel. *Nature Genet* 19: 257—259, 1998.
- 78) **Murakami A, Yajima T, Inana G** : Isolation of human retinal genes: Recoverin cDNA and gene. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 234—244, 1992.
- 79) **Higashide T, Murakami A, McLaren MJ, Inana G** : Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor protein. *J Bio Chem* 271: 1797—1804, 1996.
- 80) **Kubota R, Kudoh J, Minoshima S, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu N** : Isolation and mapping of retina-specific cDNAs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 1264, 1994.
- 81) **Kubota R, Noda S, Wang Y, Minoshima S, Asakawa S, Kudoh J**, et al: A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 41: 360—369, 1997.
- 82) **Kubota R, Kudoh J, Mashima Y, Asakawa S, Minoshima S, Hejtmancik JF**, et al: Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC 1A). *Biochem Biophys Res Commun* 242: 396—400, 1998.
- 83) **Stone EM, Fingert JH, Alward WLM, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SLF**, et al: Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275: 668—670, 1997.
- 84) **真島行彦** : 緑内障遺伝子(総説). *眼科* 40: 1057—1064, 1998.
- 85) **Takahashi H, Noda S, Kubota R, Imamura Y, Nagasawa A, Mashima Y**, et al: cDNA cloning of the mouse homologue of the human myocilin gene and tissue expression. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 104—109, 1998.
- 86) **Imamura Y, Kubota R, Wang Y, Asakawa S, Kudoh J, Mashima Y**, et al: Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression and chromosome mapping. *Genomics*

- 40: 277—283, 1997.
- 87) **Imamura Y, Noda S, Mashima Y, Kudoh J, Oguchi Y, Shimizu N**: Human retina-specific amine oxidase: Genomic structure of the gene (AOC 2), alternatively spliced variant, and mRNA expression in retina. *Genomics* 51: 293—298, 1998.
- 88) **Caron PC, Cote LJ, Kremzner LT**: Putrescine, a source of γ -aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J* 251: 559—562, 1988.
- 89) **Nagasawa A, Kubota R, Imamura Y, Nagamine K, Wang Y, Asakawa S, et al**: Cloning of the cDNA for a new member of the immunoglobulin superfamily (ISLR) containing leucine-rich repeat (LRP). *Genomics* 44: 273—279, 1997.
- 90) **Carmi R, Rokhlina T, Kwitek-Black A, Elbedour K, Nishimura D, Stone EM, et al**: Use of a DNA pooling strategy to identify a human obesity syndrome locus on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 4: 9—13, 1995.
- 91) **Nakazawa M, Xu S, Gal A, Wada Y, Tamai M**: Variable expressivity in a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa closely linked to chromosome 19 q. *Arch Ophthalmol* 114: 318—22, 1996.