

日本人の常染色体優性網膜色素変性患者のロドプシン 遺伝子の分子生物学的検討

堀田 喜裕¹⁾, 塩野 貴²⁾, 早川むつ子¹⁾, 橋本 敏浩¹⁾, 金井 淳¹⁾
中島 章¹⁾, 野呂 充²⁾, 佐久間健彦²⁾, 玉井 信²⁾, 藤木 慶子¹⁾

¹⁾順天堂大学医学部眼科学教室, ²⁾東北大学医学部眼科学教室

要 約

常染色体優性網膜色素変性 (ADRP) の約 18% にロドプシン遺伝子の点突然変異が合併することが報告され, この異常が一部の ADRP の原因ではないかと考えられている. 我々は日本人の 19 家系 28 人の ADRP 患者について末梢血から高分子量 DNA を抽出し, PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて調べたい部分の DNA を増幅し, 制限酵素による切断や, 塩基配列の決定により解析した. 1 家系 2 人にコドン 347 の CCG から CTG への点突然変異を認めた. Dryja らの報告にあった人種と異なった祖先の日本人にも異常が認められたことから, この異常は ADRP の原因の一部と考えられた. (日眼会誌 96: 237-242, 1992)

キーワード: 常染色体優性網膜色素変性, ロドプシン, 遺伝子, 点突然変異, 遺伝的異質性

Molecular Biological Study of the Rhodopsin Gene in Japanese Patients with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa

Yoshihiro Hotta¹⁾, Takashi Shiono²⁾, Mutsuko Hayakawa¹⁾, Toshihiro Hashimoto¹⁾
Atsushi Kanai¹⁾, Akira Nakajima¹⁾, Michiru Noro²⁾, Takehiko Sakuma²⁾
Makoto Tamai²⁾ and Keiko Fujiki¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

Abstract

The author analyzed codon 347 of the rhodopsin gene using PCR (polymerase chain reaction) amplification and restriction enzymes in 19 unrelated Japanese families including 28 patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). An allele of codon 347 mutation was found in a family (father and daughter). Sequence analysis shows that the mutation is from CCG to CTG. This mutation appears to be the cause of one form of ADRP, since it was also found in Japanese cases of ADRP which have a different racial background from families reported by Dryja et al. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 237-242, 1992)

Key words: Autosomal dominant retinitis pigmentosa, Rhodopsin, Gene, Point mutation, Genetic heterogeneity

別刷請求先: 113 文京区本郷 3-1-3 順天堂大学医学部眼科学教室 堀田 喜裕

(平成3年5月31日受付, 平成3年6月27日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihiro Hotta, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine.

3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku 113, Japan

(Received May 31, 1991 and accepted in revised form June 27, 1991)

I 緒 言

網膜色素変性は失明原因として眼科臨床の場で大きな問題であり、その原因の解明、治療法の確立が望まれている網脈絡膜ジストロフィーである。遺伝形式は常染色体劣性が最も多く、常染色体優性、X染色体性のものが知られ、その遺伝的異質性から種々の遺伝子座の異常による疾患群であることが予想される。1989年にアイルランドのグループが常染色体優性の網膜色素変性（以下ADRPと略す）について種々のマーカーと、彼らのもつ大家系と連鎖分析を行い、プローブC17¹⁾とその家系が連鎖していることを報告した²⁾。C17は視機能で最も重要なタンパク質であるロドプシンの座位と近いことから、ADRPにおけるロドプシン遺伝子が注目された。

ロドプシン遺伝子はすでに全構造が1984年に明らかにされており³⁾、ボストンのDryjaら⁴⁾によって彼らのADRPのうち約一割にロドプシン遺伝子の対立遺伝子の一方（アレル）のコードン23のCCCがCACに変異していることが発見された。この変異は疾患と関連しており、この変異がある種のADRPの原因ではないかと考えられた。さらにロドプシン遺伝子のコードン58のACGがAGGに、コードン347のCCGがCTGまたはTCGへ変異している症例が発見された⁵⁾。またBhattacharyaら⁶⁾のイギリスのグループは当初、発見のきっかけとなったアイルランドの大家系も含むヨーロッパの91家系についてコードン23を検討し異常がなかったという報告をしたが、その後コードン255もしくは256の3塩基対の欠失を認めた1家系、コードン347のCCGがCTGへ変異している1家系を報告している⁷⁾。我々は人種の異なる日本人のADRPのロドプシン遺伝子について検討することは重要と考え、日本人の家系についてPCR (Polymerase Chain Reaction) 法⁸⁾を使って増幅したロドプシン遺伝子を、制限酵素を用いたり、塩基配列を決定（シーケンス）することによって異常の有無を検討した。

II 対象と方法

1. 対象

東北大学と順天堂大学の2代または3代発症のADRPと考えられる19家系28症例を対象とした。

2. 方法

1) DNAの抽出

ヘパリン採血した末梢血約10ccからBellらの方

法¹⁰⁾で核のペレットを得た。DNA抽出機(340 A, Applied Biosystems)を用いてProteinase Kを使い¹¹⁾DNAを抽出し、精製した。

2) プライマー

コードン23についてはDryjaら⁴⁾の用いたオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列の20merを用いた。コードン23の塩基配列の決定にはPCRと同じプライマーを用いた。コードン347については5168塩基対から5191塩基対までのセンス5'-TTCCGGAAGTGCATGCTCACCACC-3'と5806塩基対から5829塩基対までのアンチセンス5'-CGGCAGGACCAGGGATCTGGG-ATT-3'（それぞれ24mer）を用いた。6)で述べるシーケンス用のオリゴヌクレオチドも含めてDNA合成機(381 A, Applied Biosystems)を用いて作成し、HPLCによって純度を確認した。

3) PCR法⁸⁾によるDNAの増幅

コードン23については231塩基対から788塩基対までと、コードン347については5168塩基対から5829塩基対までをPCR法によって増幅した。条件は94℃1分、55℃30秒、72℃1分30秒までのサイクルをTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造）を用いて30サイクル行なって増幅した。増幅にはサーマルサイクラー（Perkin Elmer Cetus）を用いた。

4) 制限酵素によるコードン347の検討

増幅された5168塩基対から5829塩基対までの662塩基対のDNAを精製し、制限酵素Nci I, Msp I（ともにBethesda Research Laboratory, BRL）を使ってそれぞれ37℃5時間反応させて消化し、2%アガロースゲルに流した。123塩基対ladder（BRL）をスタンダードとして同時に流した。制限酵素Nci Iは5'-CC/SGG-3'（S:CまたはG）と言う塩基配列を認識しMsp Iは5'-C/CGG-3'と言う塩基配列を認識する。従って正常ではともに消化され103塩基対と559塩基対の二本のバンドになるが、突然変異があれば切断されずに662塩基対のバンドが残る。

5) 突然変異患者の塩基配列決定

コードン347の片方のアレルの異常がわかった者について、増幅したDNAをベクターに組み込み、異常のあるクローンを取り出してシーケンスを行った。pUC118（宝酒造）をSma I（BRL）と一晚37℃で反応させアルカリフォスファターゼ（宝酒造）と65℃30分間反応させた。精製した5168塩基対から5829塩基対までの662塩基対のPCR産物をblunting kit（宝酒造）を用いて末端を平滑化し上記のベクターと混和し、

T_4 ligase(宝酒造)と16°C一晩反応させた。competent cell, HB101(BRL)に移入していくつかのクローンをとり出した。約1 μ gのDNAを調整しユニバーサルRVプライマー(宝酒造)をセンス用に5411塩基対から5430塩基対までの20mer (5'-ACAGGCGCTGCTCCTGGTGG-3')をアンチセンス用にした。二本鎖DNAを α^{32} P-dCTP(Amersham)とKlenow DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)を用いてジデオキシ法¹²⁾によってシーケンシングした。6%ポリアクリルアミドゲル(7M尿素)に流し、XAR-2フィルム(Kodak)を用いてオートラジオグラフを行った。また約1 μ gの上記のベクター(2本鎖DNA)をユニバーサルRVプライマー(宝酒造)をプライマーとし、dye deoxy terminator (Applied Biosystems)を用いてジデオキシ法¹²⁾によってシーケンシングした。解析にはGene ScannerTM (373 A, Applied Biosystems)を用いた。

6) 塩基配列の決定によるコドン23の検討

コドン23については適当な制限酵素がないため、231塩基対から788塩基対までのDNA断片を精製し、非対称PCR¹³⁾を行って94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分を40サイクル増幅した。PCR産物を2%アガロースゲルに流し、切り出してGene Clean[®] (Bio

101)を用いて精製した。231塩基対から251塩基対までのオリゴヌクレオチドを α^{32} P-ATP (Amersham)と T_4 Kinase (宝酒造)を用いて37°C 1時間反応させてラベルし100°C 2分間沸騰させて鋳型DNAと混和し、ジデオキシ法¹²⁾によってシーケンシングを行った。アニールは37°Cで10分間、プライマーの伸長にはPCR法と同じTaq DNAポリメラーゼを使い70°C 10分間行った。シーケンシングゲル、オートラジオグラフは5)と同様に行った。

III 結 果

19家系28症例のうち1家系2例(父と娘)にコドン347の異常と考えられるパターンを認めた(図1, 図2に結果の一部を示した。)図中の1と2で示したレーンで正常と異なったパターンが制限酵素Nci I, Msp Iの両方で見られた。これは正常では103塩基対と559塩基対の二本のバンドが見られるのに対して、この家系ではロドプシン遺伝子の片方のアレルの異常により103塩基対と559塩基対の2本のDNA断片の他に、もう一方のアレルの制限酵素の認識部位を失って切断されなかった662塩基対のバンドが出現している。さらにシーケンシングをすることにより、図3, 4から明らかなように、これはCCGからCTGへの変異で、ア

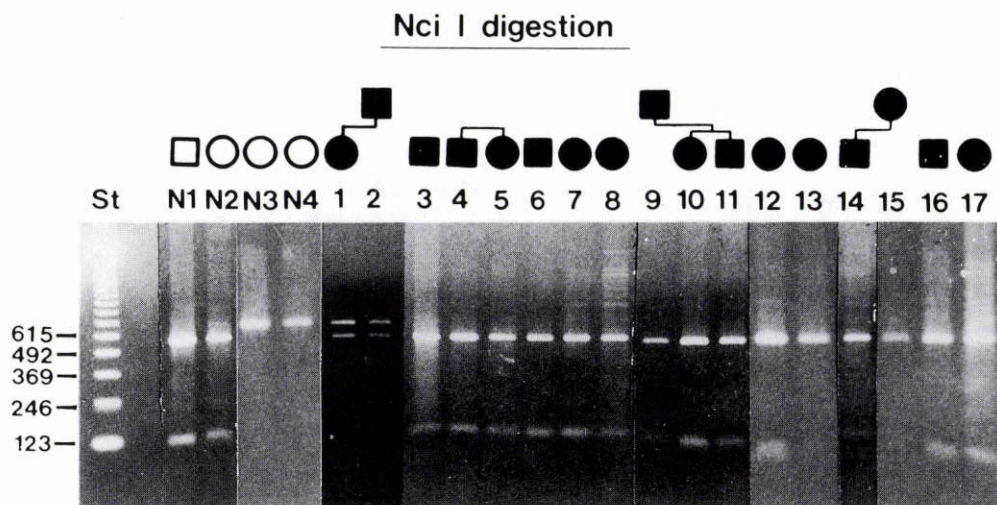


図1 2%アガロースゲルの写真, St, 123塩基対のDNA ladder. レーンN1, N2, PCR法によって正常者のDNAの5168塩基対から5829塩基対までを増幅し、Nci I消化した。レーンN3, N4, PCR法によって正常者のDNAの5168塩基対から5829塩基対までを増幅しそのまま流した。レーン1~17, ADRPの患者のDNAの5168塩基対から5829塩基対までを増幅し、Nci Iで消化した。bp, 塩基対。レーン1, 2にNci Iで消化されないバンドを認める。

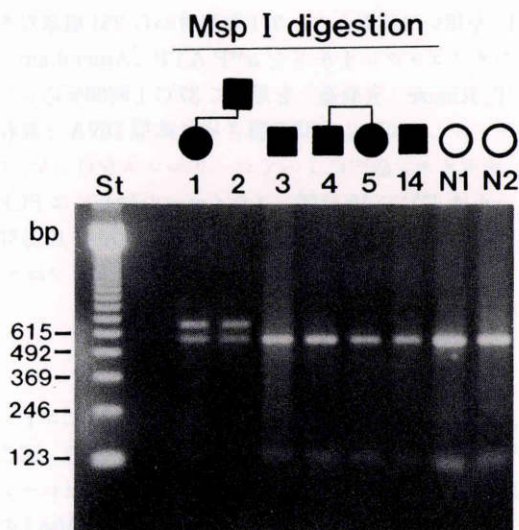


図2 2%アガロースゲルの写真。St, 123塩基対のDNA ladder, N1, N2, PCR法によって正常者のDNAの5168塩基対から5829塩基対までを増幅し, *Msp* I消化した。レーン1~5, 14, ADRPの患者のDNAの5168塩基対から5829塩基対までを増幅し, *Msp* I消化した。レーンの数字は図1と一致させてある。bp, 塩基対。レーン1, 2に*Msp* Iで消化されないバンドを認める。

ミノ酸はプロリンからロイシンに変異していた(Pro-347-Leu)。そしてアンチセンスのオリゴヌクレオチドを用い、逆から読んでこの結果を確認した。コドン23については6家系6症例について結果が得られたが、変異を認めなかった。図5にその結果の1例として、図1, 2のレーン3の患者の塩基配列を示した。

IV 考 按

網膜色素変性はわが国の失明原因として重要であり、その原因の解明が望まれる網脈絡膜ジストロフィーである。病理学的には視細胞の杆体に初期変化が起こると考えられている。種々の遺伝形式があること、種々の全身疾患に合併することなどから、いろいろな遺伝子異常による疾患群と考えられるが、今までその原因についてははっきりとした手がかりがなかった。一方ロドプシンは視覚における光信号の受容体で杆体の円板膜上に存在する膜タンパク質である。その構造は1983年 Hargrave ら¹⁴⁾によってウシの構造が決定され、ヒトは1984年 Nathans ら³⁾によってそのcDNAの全構造が明らかにされ、染色体上の存在は3番染色体の3q21-3q24に位置していることが明ら

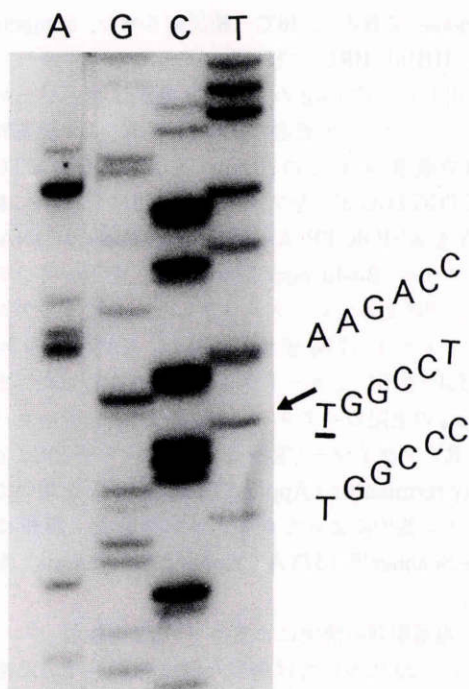


図3 オートラジオグラフ。5256塩基対から5298塩基対までの塩基配列を示す。A(アデニン), G(グアニン), C(シトシン), T(チミン)それぞれに一致する塩基配列を持つとバンドが出現する。5271塩基対はTで、コドン347はCCGからCTGに変異している。

かにされた¹⁵⁾¹⁶⁾。1989年アイルランドの McWilliam ら²⁾は彼らのもつ ADRP の大家系と3番染色体長腕に位置するDNAマーカーC17との連鎖(Lod Score 14.7)を報告し、Dryja ら⁴⁾⁵⁾はこのマーカーがロドプシン遺伝子の位置と近いことから、ADRPのロドプシン遺伝子を解析し、コドン23, コドン58, コドン347(2種類)の4種類の異常を報告した。イギリスの Bhattacharya らのグループ⁶⁾は、彼らのもつ発見の手がかりとなったアイルランドの家系も含めて、ヨーロッパの91家系についてコドン23を検討し異常なしと報告したが、その後の検討からコドン255もしくはコドン256の3塩基対の欠失⁷⁾、コドン347の点突然変異を報告している⁸⁾。我々は人種的背景の異なる日本人においてこの変異が存在するかどうか検討するために、コドン347については19家系28例のADRP、コドン23については6家系6例のADRPについて検討し、コドン347のCCGがCTGへ変異する一家系をみつけた。

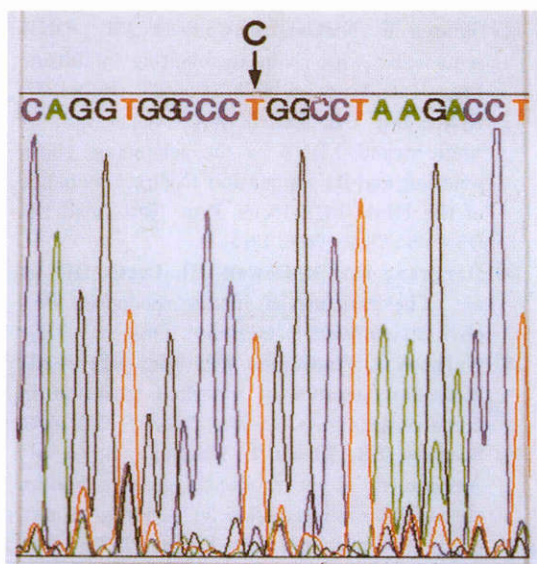


図4 Gene Scanner による解析結果。5261 塩基対から 5283 塩基対までの塩基配列を示す。T (チミン), C (シトシン), G (グアニン), A (アデニン) それぞれに一致する塩基配列を持つと、それぞれの色のピークが出現する。

本症例は遺伝子異常をもつ ADPR の日本人における初めての家系であり、人種的背景の異なる日本人にもこの異常が認められたことから、この遺伝子異常が ADPR の原因の一部と考えられた。またこのコドン 347 の CCG から CTG への変異はヨーロッパの家系、アメリカの家系、日本の家系にみられることから ADPR におけるロドプシン遺伝子異常の“hot spot”であると考えられる。今後、さらに多数例によってロドプシン遺伝子全体が検索されること、この遺伝子異常に一致するコドンの点突然変異をマウスに入れてトランスジェニックマウスを作ることなどによって ADPR におけるロドプシン遺伝子異常の意味がさらにはっきりすると考えられる。

臨床的に ADPR を 2 つのタイプに分ける考え方があり¹⁷⁾¹⁸⁾、早期発症でびまん性の変性を起こす I 型と晩期発症で区画性の変性を起こす II 型に分けられる。C 17 と連鎖するのは最初の家系も含めて I 型であり、II 型は C 17 と連鎖しないことが報告され¹⁹⁾²⁰⁾、2 つのタイプと分子レベルでの遺伝的異質性の関連が検討された。しかし Berson ら²¹⁾はコドン 23 の点突然変異をもつ 17 家系の患者は、コドン 23 の異常のないその他の ADPR の家系より臨床的には視力と ERG の面で



図5 オートラジオグラフ。図1のレーン3の患者のロドプシン遺伝子の 352 塩基対から 377 塩基対までの塩基配列を示す。G (グアニン), A (アデニン), T (チミン), C (シトシン), それぞれに一致する塩基配列を持つとバンドが出現する。コドン 23 に異常を認めない。

軽症で、さらに家系内、家系間でも臨床的に差があると報告しており遺伝子異常と臨床像の関係や遺伝子異常と I 型、II 型の関係等については今後さらに検討が必要であろう。

今回異常の見られた家系では DNA 診断が可能である。例えばこの変異を持った娘の子供について DNA 診断を行い、変異を持った方のアレルが伝わっているかどうか知ることができる。血液から DNA を抽出し、PCR 法を用いて調べたい部分の DNA を増幅し、制限酵素による切断によって調べられる。しかし解っても有効な治療法がないため、知り得た情報を遺伝相談の場でどう生かすかが今後の問題となるであろう。出生前診断については致死の疾患でないことからその是非について議論を要すると考える²²⁾。網膜色素変性の原因の解明にはさらに多くの困難が予想されるが、この発見は網膜色素変性の分子生物学的研究における最初の突破口と考えられる。

本研究は、文部省科学研究費（一般研究 B01480420、

C 02670796, 奨励研究 A 02771222), および厚生省特定疾患調査研究費の補助を受けた。付記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) **Donis-Keller H, Green P, Helms C, et al:** A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51: 319—337, 1987.
- 2) **McWilliam P, Farrar GJ, Kenna P, et al:** Autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): Localization of an ADRP gene to long arm of chromosome 3. *Genomics* 5: 619—622, 1989.
- 3) **Nathans J, Hogness DS:** Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4851—4855, 1984.
- 4) **Dryja TP, McGee TL, Reichel E, et al:** A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 343: 365—366, 1990.
- 5) **Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, et al:** Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 323: 1302—1307, 1990.
- 6) **Farrar GJ, Kenna P, Redmond R, et al:** Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Absence of the rhodopsin proline-histidine substitution (codon 23) in pedigrees from Europe. *Am J Hum Genet* 47: 941—945, 1990.
- 7) **Inglehearn CF, Bashir R, Lester DH, et al:** A 3-bp deletion in the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 48: 26—30, 1991.
- 8) **Bhattacharya S, Lester D, Keen J, et al:** Retinitis pigmentosa and mutation in rhodopsin. *Lancet* 337: 185, 1991.
- 9) **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al:** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350—1354, 1985.
- 10) **Bell GI, Karam JH, Rutter WJ:** Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5759—5763, 1981.
- 11) **Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P:** Isolation of high molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 36: 32—38, 1973.
- 12) **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463—5467, 1977.
- 13) **Gyllenstein UB, Erlich HA:** Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequence of the HLA -DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7652—7656, 1988.
- 14) **Hargrave PA, McDowell JH, Curtis DR, et al:** The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech* 9: 235—244, 1983.
- 15) **Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, et al:** Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 232: 203—210, 1986.
- 16) **Sparkes RS, Klisak I, Kaufman D, et al:** Assignment of the rhodopsin gene to human chromosome three, region 3q21-3q24 by in situ hybridization studies. *Curr Eye Res* 5: 797—798, 1986.
- 17) **Massof RW, Finkelstein D:** Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa. *Doc Ophthalmol* 51: 289—346, 1981.
- 18) **Farber MD, Fishman GA, Weiss RA:** Autosomal dominantly inherited retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 103: 524—528, 1985.
- 19) **Inglehearn CF, Jay M, Lester DH, et al:** No evidence for linkage between late onset autosomal dominant retinitis pigmentosa and chromosome 3 locus D3S47 (C17): Evidence for genetic heterogeneity. *Genomics* 6: 168—173, 1990.
- 20) **Lester DH, Inglehearn CF, Bashir R, et al:** Linkage to D3S47 (C17) in one large autosomal dominant retinitis pigmentosa family and exclusion in another: Confirmation of genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 47: 536—541, 1990.
- 21) **Berson EL, Rosnor B, Sandberg MA, et al:** Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and a rhodopsin gene defect (Pro-23-His). *Arch Ophthalmol* 109: 92—101, 1991.
- 22) **Harper PS:** Practical Genetic Counselling (3rd ed). London, John Wright & Sons Ltd, 94, 1988.