
総 説

遺伝性網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—

真島 行彦, 佐賀 正道, 小口 芳久

慶應義塾大学医学部眼科学教室

要 約

遺伝性網脈絡膜変性疾患における病的遺伝子のクローニングには 2 通りの方法がある。生化学的プロセスの異常が判明した脳回転状脈絡膜網膜萎縮の場合は、酵素活性の低下した蛋白質（オルニチンアミノトランスフェラーゼ）に対する抗体を用いて病因遺伝子がクローニングされた。一方、ほとんどの疾患は生化学的異常は不明であり、これらの疾患に対してはポジショナルクローニングや候補遺伝子アプローチなどの分子生物学的手法により、病的遺伝子をクローニングすることが可能となった。前者の手法によりコロイデレミア、ノリエ病の病因遺伝子がクローニングされた。網膜色素変性症は、病因遺伝子が遺伝的異質を示すので後者の方法がとられ、ロドプシン、ペリフェリン、*rom-1* が常染色体優性網膜色素変性症の病因遺伝子として、また β サブユニット cGMP ホスホジエステラーゼが常染色体劣性網膜色素変性症の病因遺伝子としてクローニングされた。今後は後者の 2 つの方法を中心に、病因遺伝子がクローニングされていくものと思われる。（日眼会誌 97: 1253-1264, 1993）

キーワード：分子遺伝学，網脈絡膜変性症，ポジショナルクローニング，候補遺伝子アプローチ，常染色体優性網膜色素変性症

Molecular Cloning of the Genes in Genetic Chorioretinal Diseases

—Positional Cloning and the Candidate Gene Approach—

Yukihiko Mashima, Masamichi Saga and Yoshihisa Oguchi

Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine

Abstract

Two different molecular biological approaches to the disease-causing genes of genetic eye diseases are described. In gyrate atrophy of the chroid and retina where the biochemical defect was identified as inactivation of ornithine aminotransferase, the gene was cloned by using antibody for the enzyme. In most genetic eye diseases, however, the biochemical defects are unknown. Positional cloning and/or the candidate gene approach are used to identify the disease-causing genes for these diseases. The genes of chorioideremia and Norrie disease were cloned by positional cloning. Several genes expressed in the photoreceptor cells have been identified recently and may be the genes causing progressive

別刷請求先：160 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 5 年 2 月 26 日受付，平成 5 年 6 月 11 日受理）

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

（Received February 26, 1993 and accepted in revised form June 11, 1993）

degeneration of the retina and choroid. Rhodopsin, peripherin (RDS), rom-1, and β subunit-cGMP phosphodiesterase are identified as the disease-causing genes for retinitis pigmentosa by the candidate gene approach. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1253-1264, 1993)

Key words: Molecular genetics, Hereditary chorioretinal disease, Positional cloning, Candidate gene approach, Autosomal dominant retinitis pigmentosa

I 緒 言

網膜色素変性症をはじめとする遺伝性の網脈絡膜変性疾患、黄斑部変性疾患は先天性疾患の失明、高度視機能障害の原因の大きな割合を占めるが、その原因、発症機構に関しては未だ十分に解明されていない。これまで、これらの変性症は眼組織における生化学的異常の解明が困難であり、病態解明に手がかりがほとんどなかった。しかしながら、これらの遺伝性疾患に対して最近では分子生物学という新しい方法論を用いることにより、この問題が一気に解決されつつある。すなわち、異常な生化学的プロセスは不明のまま、病気の原因となる遺伝子をまず先に直接研究することができるようになり、そこから逆に病因となる蛋白、さらにその病態が解明されつつある。この方法論は、生化学的異常からその病因遺伝子を解明していくこれまでの分子遺伝学の研究法とは逆の流れであり、その意味でかつては逆向き遺伝学 (reverse genetics) と呼ばれていたが¹⁾、現在では染色体上を検索し病因遺伝子をクローニングするという意味で、ポジショナルクローニング (positional cloning) と呼ぶのが一般的である²⁾。ヒト遺伝子数は 50,000~100,000 個あるとされるが、クローニングされた遺伝子は 10% 以下にすぎず、現在、新しい分子生物学的技法が開発されつつ遺伝子のクローニングが盛んに行われている。今回、遺伝性の網脈絡膜変性疾患に対して、現在までどのようにして病因遺伝子がクローニングされてきたが、その分子生物学的アプローチを述べる。

II 病因遺伝子に対する

分子生物学的アプローチ

図 1 は、遺伝性疾患に対する分子生物学的アプローチを示したものである。あらゆる生命活動は遺伝子によりコントロールされているが、もし遺伝子に異常が生じれば、異常な蛋白が合成され、たとえば作られた酵素は活性を失い、代謝に異常を来し、異常な生理学的現象が生じ、それが病気の発症につながる。したがっ

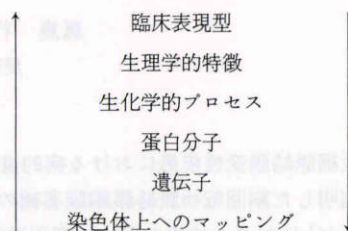


図 1 遺伝性疾患に対する分子生物学的アプローチ

て、我々が日常臨床で見ている病像は遺伝子に異常 (genotype) が生じた結果を見ていることになり、これを臨床表現型 (phenotype) という。我々臨床家は、網脈絡膜疾患を遺伝形式、眼底所見、心理物理学のまたは電気生理学的方法などにより、臨床表現型を研究、分類してきた。また、病因検索に酵素や蛋白質を対象として研究が進められた。その中で、唯一脳回転状脈絡膜網膜萎縮は 1973 年に高オルニチン血症が発見されたため、その後の研究により、オルニチンの代謝経路の中で ornithine aminotransferase (以下 OAT) の活性欠損、高度低下が明らかとなった。ヒト OAT 蛋白が精製され、OAT に対する抗体が作られたので、これを用いてまず OAT の mRNA を表す cDNA (一本鎖のメッセンジャー RNA に相補的な配列をもつ二本鎖の DNA) が網膜の cDNA ライブラリーからクローニングされ (1986 年)³⁾、第 10 染色体長腕 (10 q 26) にマッピングされ、そして OAT の遺伝子構造が決定された (1988 年)⁴⁾。OAT のクローニングに関する本邦の総説としては、OAT の cDNA をクローニングした Inana⁵⁾ のものがある。そして、実際に OAT 遺伝子内に突然変異が存在することが報告された⁶⁾⁷⁾。このように、生理学的特徴、生化学的プロセスの異常、病因となる蛋白の機能障害の解明、蛋白の単離・精製、そして病因遺伝子のクローニング、染色体上へのマッピングという方向に解析が進む方法は、従来から行われてきた古典的な方法である (図 1 の上から下への方向)。小児科領域にみられる多くの先天代謝異常を来す疾患は、このような方法により病因遺伝子がクローニング

され、遺伝性疾患の病態が分子レベルで研究されている。しかしながら、このアプローチにより病因遺伝子がクローニングされた疾患は、眼科領域では脳回転状脈絡膜網膜萎縮だけであり、この方法では新たに病因遺伝子を同定していくには、現時点では限界がある。

一方、ほとんどの網脈絡膜変性症は化学的異常の手がかりがないため、ここから先の研究が長い間進まなかった。このような疾患に対しては、生化学的プロセスは不明のまま、病因となる遺伝子をまず染色体上にマッピングし、次いで染色体上を検索し遺伝子をクローニングする方法が取られるようになった。この方法論はポジショナルクローニングといい、眼科領域では網膜芽細胞腫⁹⁾、コロイデレミア⁹⁾¹⁰⁾、無虹彩¹¹⁾、ノリエ病¹²⁾¹³⁾の病因遺伝子がクローニングされた。また最近では、ボストンの Dryja ら¹⁴⁾のグループが行っている候補遺伝子アプローチ ('candidate gene' approach) により常染色体優性網膜色素変性症の原因となる遺伝子がロドプシンをはじめいくつか同定された。遺伝子がクローニングされれば、逆にその蛋白質の機能が解析され、さらに生化学的プロセスや生理学的機能が明らかとなり、病気との関係も明らかになる(図1の下から上への方向)。

遺伝性疾患を分子生物学的に解明していく場合、図1にあるように大きく2つの方向のアプローチ方法があり、現在では病因となる遺伝子をまずクローニングしていくアプローチが盛んに行われている。

III ポジショナルクローニング (図2)

この方法は、次の2つの原理に基づく。第1のステップは、連鎖解析 (linkage analysis) により疾患遺伝子のおおよその染色体上の座位を決定する。疾患に連鎖していく DNA マーカーを見つけ出すことにより病因遺伝子の存在する染色体、およびその染色体上での座位を、座位の判明している DNA マーカーとの距離で表すことができる。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 (1 cM: 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 マーカーが単離することが必要であるが、現実的には数 cM であることが多い。病因遺伝子との位置関係を把握するためには、遺伝子を中央にはさみ両方向に2つのマーカーが必要である(図2の A, B の DNA マーカー)。さらに網膜芽細胞腫、コロイデレミア、無虹彩、ノリエ病のように、

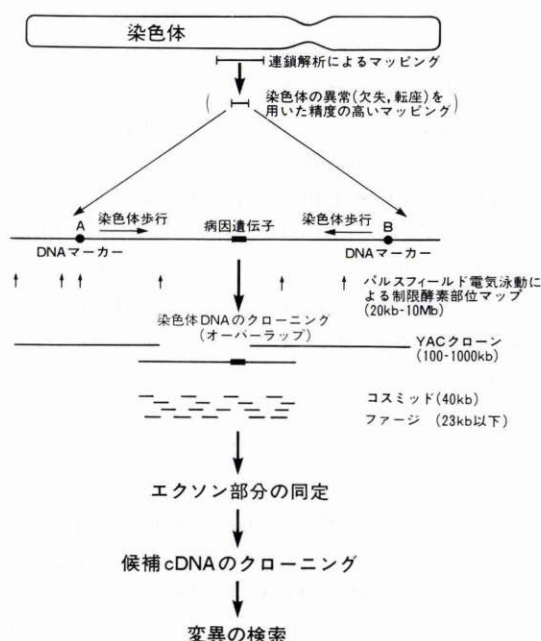


図2 ポジショナルクローニングのストラテジー。

染色体の部分欠失、転座部分などを持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、担体に染色体上の DNA を調べていく (染色体歩行, 跳躍 chromosomal walking, chromosomal jumping という)。その場合、染色体上の DNA を 100~1,000 kb までクローンできる酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome: YAC), 40 kb までのコスミッド, 23 kb ぐらいまでのファージへと DNA をダウンサイジングしてクローニングして、目的の遺伝子に近づいていく。その中で他の種族でも保存されている DNA 配列を見つけ出し (zoo blotting), それがたとえば網膜組織に強く発現しているものであれば (ノーザンブロット法), 目的の遺伝子の一部であるエクソン領域と判断できる。これをプローブとして用いて、その疾患の mRNA を網膜の 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、最終的に病因遺伝子として同定される。しかしながら、この染色体歩行の作業には膨大な時間と労力が必要である。これらの過程の中で、わずかに数百 bp の

エクソン部分をいかに同定していくかが問題であり、現在このための新しい分子生物学的技術が開発されている。また、これまでにクローニングされたすべての遺伝子、DNA断片のシーケンス（塩基配列）のデータは、米国ではGene Bank、欧州ではEuropia Molecular Biology Laboratory (EMBL)、日本では国立遺伝学研究所のDNA Date Base in Japan (DDBJ)に管理されているので、もし染色体歩行中にエクソンと思われるDNA断片や、またcDNAライブラリーから、あるcDNAをクローニングした場合、それが未知のものか既知のものを検索するためには、これらにコンピュータにてアクセスすれば直ちに判明する。このようにして未知の遺伝子のクローニングを進めていく。

コロイデレミアの場合は、1985年に病因となる遺伝子が連鎖解析によりX染色体長腕のXq 13-21にマッピングされ、その時のDNAマーカーと遺伝子との距離は約10 cM (10,000 kb)であった。その後、この領域における染色体の非常に小さな欠失例や染色体の転座例(X;13)の存在によりXq 21.1~21.2へと限局された。さらに、この領域で遺伝子に非常に近いDNAマーカーがクローニングされ、これを用いてコロイデレミアと関係があると思われる45 kbのDNA断片がクローニングされた。後は前述した方法により1990年にcDNAがクローニングされた。mRNA構造は1990年⁹⁾および1992年¹⁰⁾に報告されたが、網膜組織だけではなく、リンパ球にも発現していることが明らかとなった。このコロイデレミア遺伝子産物は、smgp 25 A (またはrab 3 A)-GDP解離抑制蛋白(CDI)と高いホモロジーが認められ¹⁵⁾、細胞内情報伝達系と細胞機能を制御すると考えられている。rab 3 A蛋白とは低分子量G蛋白の1つであるが、標的蛋白質は不明である。rab 3 A-GD 1はrab 3 A-CDP (非活性型)からrab 3 A-GTP (活性型)へのGDP/GTP変換反応を制御している蛋白であり、多くの組織に存在している。したがって、コロイデレミア遺伝子も脳回転状脈絡膜網膜萎縮のOATと同様に、眼組織に特異的に発現している遺伝子ではないことが考えられる。また最近、ラットやマウスのrab 3 Aを触媒するrab geranylgeranyl transferase とのホモロジーも報告され、実際にコロイデレミア患者のリンパ球においてrab geranylgeranyl transferase のコンポーネントAの活性低下が報告されている¹⁶⁾。コロイデレミア遺伝子において遺伝子変異が報告されているが、ノンセンス変異を

来すことが特徴である¹⁷⁾¹⁸⁾。

著者は1989年から2年間ほどアメリカのマイアミ大学でX染色体伴性網膜色素変性症のポジショナルクローニングの仕事に関与したが、当時の現実問題として連鎖解析により1 cMまで病因遺伝子に近接したDNAマーカーは、一般的にはクローニングされていないので自らが見つけださなければならず、また連鎖解析も当時はサザンブロット法により行っていたため、とりあえず染色体歩行の起点となるDNAマーカーのクローニングには2年近くを要したが、まだ数~10 cMの距離にあると思われた。最近では、イントロン領域に存在する繰り返し配列であるVNTR (variable number tandem repeat)、CAリピートなどは多型に富むため、これらをDNAマーカーとして利用でき、polymerase chain reaction (PCR)法により比較的簡単に連鎖解析が行われている。また、従来のRFLP (制限酵素断片長多型 restriction fragment length polymorphism)を用いた方法もPCR法と制限酵素を用いて行われている。1991年までに判明した各染色体上におけるDNAマーカーはHuman Gene Mapping (HGM) 11¹⁹⁾に記載されているので、連鎖解析を行いたい場合はこれで調べDNAマーカーを選択すればよい。また、最も新しい遺伝子マップまたはゲノムマップの情報は、ジョンホプキンズ大学が管理、運営しているGenomic Data Base (GDB)に登録されているので、コンピュータにてアクセスし、情報が得られる。現在、日本においても日本科学技術情報センター(JICST)にてGDBのゲノムマップデータが管理され、ここに直接アクセスできつつある。また、慶應義塾大学医学部の分子生物学教室が開発、運営しているGeneViewという遺伝子マップライブラリーがあり、約1万件のマップデータおよび約2万件の文献データを日本語と英語で一般に公開している。

X染色体伴性網膜色素変性症は1984年から連鎖解析法が行われ、80年代後半には世界中で染色体歩行が開始され、著者が研究に参加していた頃、この領域のYACクローンはすでに取られていたので、遺伝子の単離は時間の問題と考えられていたが、世界中で未だに病因遺伝子はクローニングされていない。この病因として、病因遺伝子が連鎖解析法から少なくとも2か所(Xp 21, Xp 11)に存在することが考えられ²⁰⁾、これが連鎖解析結果を複雑にし、同時に病因遺伝子に非常に近いDNAマーカーがなかなかクローニングできなかったこと、そしてXp 11領域には連鎖解析により

いくつかの疾患がマッピングされており、本症に特異的な染色体の欠失、転座例が見つからないので同定が困難なことなどが考えられる。Xp 21 領域には染色体の部分欠失を持った3症例が存在するにもかかわらず、クローニングされていない。もっと種々の部分欠失、転座をもつ症例が必要と思われる。Xp 11.4 領域にあるノリエ病¹²⁾は病因遺伝子が1992年にクローニングされた。

他に連鎖解析によりマッピングされた主な網膜脈絡膜変性症として Usher 症候群(1型, 2型)^{21)~25)}、網膜分離症(Xp 22.1~p 22.3)²⁶⁾²⁷⁾、家族性滲出性網膜硝子体症(11q および Xq 21.3 または Xq 11)²⁸⁾²⁹⁾、卵黄様黄斑部変性症(ベスト病)(11q 13)³⁰⁾などがある。Usher 症候群は常染色体劣性遺伝し、先天難聴と網膜色素変性症を伴う疾患であるが、1型は第11染色体(短腕と長腕の2か所)²¹⁾²²⁾、第14染色体長腕²³⁾と病因遺伝子が多様(遺伝的異質 genetic heterogeneity という)であり、2型は第1染色体長腕にマッピングされている²⁴⁾²⁵⁾。興味あることに、コロイデミア遺伝子とアミノ酸レベルで76%の相同性をもつ遺伝子が第1染色体長腕で Usher 症候群2型と同じ位置にマッピングされている³¹⁾。

ポジショナルクローニングからのアプローチは、連鎖解析のために多数の、または大きな家系が必要なことと、染色体歩行により遺伝子(またはエクソン)を比較的簡単に捜し出す技術が現在完全には確立していないため、染色体の小さな部分欠失、転座部分などを持った症例が存在しないと病因遺伝子のクローニングには膨大な時間と労力を要する。実際に、前述したようにこれまでに遺伝子のクローニングに成功した疾患は染色体に部分欠失や転座を持った症例が存在したものに限られている。この意味では、臨床家は染色体の異常を持った疾患、症例の発見に努める必要がある。さらに、コロイデミアのように病因遺伝子が1つの場合は、この方法で遺伝子のクローニングが可能と思われるが、網膜色素変性症のように病因遺伝子が遺伝的異質を示す場合、連鎖解析の結果も家系毎に異なり、ポジショナルクローニングだけからのアプローチによる病因遺伝子のクローニングは困難である。したがって、以上の理由により、最近では、網膜色素変性症に対しては候補遺伝子アプローチによる病因遺伝子の同定(クローニング)が行われ、成果をあげている。

IV 候補遺伝子アプローチ

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、ある遺伝子と連鎖解析により新たに染色体上に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、その遺伝子は病因となり得るので、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病因遺伝子内に、①アミノ酸の変化を認めた場合、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いて、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、その遺伝子が病因遺伝子として同定されることになる。網膜色素変性症では遺伝的異質を示すため、現実的にすべての家系毎に連鎖解析によるマッピングの情報を得ることはできない。そこで、もし1家系でも新たな染色体上へのマッピングの情報が得られ、さらに同じ位置に病因遺伝子として候補となり得る既知の遺伝子が存在すれば、その遺伝子を対象に直ちに多数例の網膜色素変性症患者が候補遺伝子アプローチにより解析される。

したがって、このアプローチでは遺伝子変異の有無を多数例において効率よく、かつ100%検出できるスクリーニング方法が必要である。現在、その方法はほぼ確立しており、遺伝子構造が判明していればPCR法を応用して遺伝子内に存在する変異を簡単に検出することができる。その方法論としては、脳回転状脈絡膜網膜萎縮(図3)、および常染色体優性網膜色素変性症(autosomal dominant retinitis pigmentosa, 以下ADRP)(図4)を例に示すが、①病気の原因となる突然変異のほとんどは、アミノ酸配列を決定するエクソン内に存在するため、翻訳開始から翻訳終了までの各エクソン領域を1組のPCRプライマーを用いて増幅する(図3A)。②増幅して得られた各エクソン領域のPCR産物のうち、どのエクソンに変異が存在するのかスクリーニングする。その方法としていくつかあるが、現在ではdenaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)法³²⁾(図3B)またはsingle strand conformation polymorphism(SSCP)法³³⁾(図4A)が主に行われ、後者の方が簡単なのでより一般的であるが、前者の方が検出率は良い。③スクリーニングにより変異の存在が疑われたエクソン領域のPCR産物をシーク

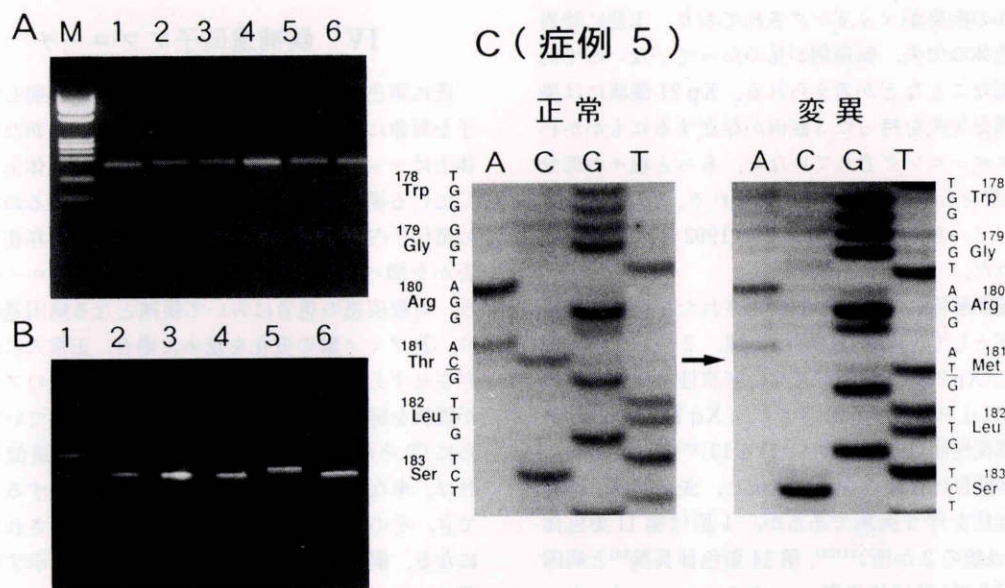


図3 Polymerase chain reaction (PCR) 法, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法および直接塩基配列決定法による遺伝子変異検出。

脳回転状脈絡膜網膜萎縮 6 症例において OAT 遺伝子のエクソン 6 領域を PCR 法にて増幅後, 3% NuSieve+1% Agarose ゲルにて電気泳動し 160 bp のバンドがみられる (A)。6 症例のこの PCR 産物をホルムアルデヒド変性剤濃度勾配アクリルアミドゲルにて電気泳動し, 症例 1 および 5 は症例 2, 3, 4, 6 とは異なる泳動パターンを示し, 塩基置換の存在が確認された (B; DGGE 法)。症例 5 の PCR 産物をサブクローニングすることなく, そのまま塩基配列を決定し, コドン 181 において C→T の塩基置換がみられた (C)。それによりアミノ酸はスレオニンからメチオニンに変化した。

エンス法により塩基配列を調べ, 変異を確認する (図 3 C, 4 B)。図 3, 4 の例は, 既に病因遺伝子が判明した疾患において遺伝子変異を検出したものであるが (臨床的には分子診断学として応用), これらの方法を病因遺伝子が不明な疾患に対して, 病因として候補となり得る遺伝子内に, 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のが候補遺伝子アプローチである。

この方法により ADRP の病因遺伝子として現在 3 つ決定されたが, 候補となった遺伝子の選択は下記に述べるが, 各々異なったアプローチによりなされた。このように ADRP においては生化学的プロセスが不明のまま, 病因遺伝子がまず先に同定された。

1. 連鎖解析法からのアプローチ: ロドプシン遺伝子

10 年にわたり 22 組の常染色体のうち, 半数近くの常染色体を連鎖解析法にて各々調べた結果, ADRP の

1 型 (早期発症) の病因遺伝子が第 3 染色体長腕に位置することが, 1989 年アイルランドのグループ (Humphries ら³⁴⁾) により明らかとなった。ボストンのグループ (Dryja ら¹⁴⁾) は, その部に存在するロドプシンを病因遺伝子として注目し, 148 人の ADRP 患者のロドプシン遺伝子を検索した結果, 17 人の患者に同一の点突然変異が見つかり, 102 人の正常人には全く存在しないこと, また種族を越えて保存されているアミノ酸の変化であることから病因遺伝子として同定された。現在では 30 種類以上のロドプシンの変異が報告されている。Dryja ら³⁵⁾によると, ADRP 患者の約 30% にロドプシン遺伝子変異が存在するとしている。日本人においては現在まで, コドン 17³⁶⁾, 181 (図 4 B), 347³⁶⁾ の 3 種類の遺伝子変異しか報告されていない。第 3 染色体長腕にロドプシン遺伝子以外の病因遺伝子の存在は否定的である。その他, 連鎖解析により第 7 染色体短腕³⁹⁾, 長腕⁴⁰⁾, および第 8 染色体短腕⁴¹⁾にマッピング

A



B (症例 2)

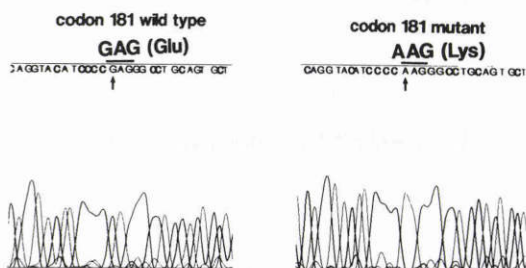


図 4 PCR 法, single strand conformation polymorphism (SSCP) 法および自動塩基配列決定法による遺伝子変異検出.

ADRP 8 症例においてロドプシン遺伝子のエクソン 3 領域を PCR 法にて増幅し, 熱変性後アクリルアミドゲルにて電気泳動し, 症例 2 に他の症例と異なる泳動パターンを認め, 塩基置換の存在が確認された (A; SSCP 法). 症例 2 の PCR 産物をサブクローニングし, 蛍光ラベルによるオートシーケンサーにより塩基配列を決定し, コドン 181 において G → A の塩基置換がみられた (B). それによりアミノ酸はグルタミンからリジンに変化した.

された家系が報告されている. いずれ, ポジショナルクローニングまたは候補遺伝子アプローチ法により, これらの病因遺伝子が明らかになるものと思われる.

また最近では, 常染色体劣性遺伝網膜色素変性症患者のロドプシン遺伝子において, ノンセンス変異のホモ接合体が報告されているが⁴²⁾, 頻度としては稀である.

2. 遺伝性網膜変性の動物モデルからのアプローチ: ペリフェリン (RDS) 遺伝子, β サブユニット cGMP ホスホジエステラーゼ遺伝子

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病因遺伝子が連鎖解析によりマウスの第 17 染色体に存在することがわかっていた. 視細胞にだけ発現している mRNA をサブトラクション法により選り出し, さらにこの中から第 17 染色体に存在するものを選び出し, 病因となる cDNA がクローニングされた⁴³⁾. 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⁴⁴⁾, それは以前にペリフェリンとして報告された視細胞外節に存在する糖蛋白 (膜蛋白) と同じものであった⁴⁵⁾. ペリフェリンは 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 (図 5). さらに, ペリフェリンは錐体外節にも存在する. ヒトでは第 6 染色体短腕に位置している. アイルランドのグループは, 連鎖解析により第 6 染色体短腕にマッピングされたアイルランドの ADRP 家系を報告し⁴⁶⁾⁴⁷⁾, アイルランドとボストンのグループは ADRP 患者においてペリフェリン遺伝子内の突然変異をほぼ同時に報告した⁴⁸⁾⁴⁹⁾. ペリフェリンも ADRP の病因遺伝子として同定された. 最近では, 網膜色素変性症の亜型である白点状網膜炎⁵⁰⁾や, さらに黄斑部変性症⁵¹⁾においてもペリフェリン遺伝子内に変異が見つかっている. 今まででは, ある 1 つの遺伝子はその中に種々の突然変異を生じても, 1 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, ペリフェリンの場合は異なる 2 つの臨床表現型を表現している. ペリフェリンは杆体と錐体の両方に存在するため, このように突然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, 今後, ペリフェリン遺伝子変異と臨床表現型との研究は大変興味がある.

もう 1 つの遺伝性網膜変性の動物モデルである rd (retinal degeneration) マウスは劣性遺伝するが, cGMP ホスホジエステラーゼの活性低下により視細胞に cGMP の蓄積がみられる. 視細胞にだけ発現している mRNA を集め (cDNA ライブラリー), ホモ変異体のライブラリーからヘテロ変異体を差し引くことにより (サブトラクション法), 原因となる cDNA がク

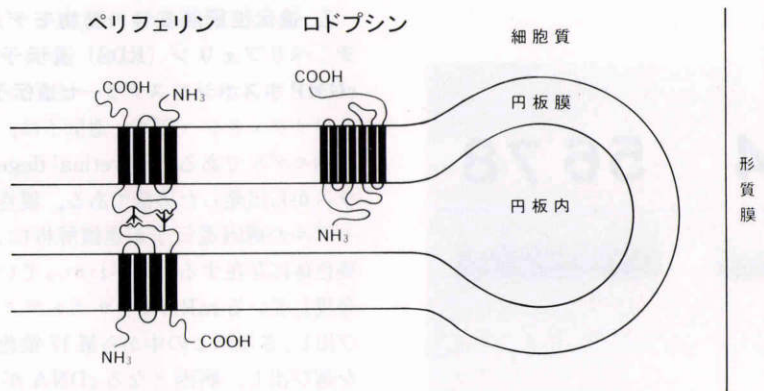


図5 杆体視細胞外節円板膜におけるペリフェリンおよびロドプシンの構造。

モノクローナル抗体染色やアミノ酸配列から予想される位置および構造を示す。ペリフェリンの機能は不明であるが、円板内におけるペリフェリンの相互作用により円板の形成や維持に関係していると考えられる。また、ペリフェリンは錐体視細胞外節にも存在する。rom-1はペリフェリンと35%のアミノ酸が相同性をもつ。rom-1の機能も不明であるが、ペリフェリンとはほぼ同じ構造をしていることから杆体外節の形態保持機能が考えられている。

ローニングされ、病因遺伝子としてcGMPホスホジエステラーゼの3つのサブユニットのうち、 β サブユニットが同定された⁵²⁾。同じ遺伝子はヒトでもクローニングされ第4染色体短腕に存在し⁵³⁾、常染色体劣性網膜色素変性症患者において候補遺伝子として検索され⁵⁴⁾、最近遺伝子変異が報告された⁵⁵⁾。

さらに、新しい遺伝性網膜変性の動物モデルであるrd-3マウスの病因遺伝子がマウスの第1染色体にマッピングされたので⁵⁶⁾、いずれ遺伝子がクローニングされるものと思われる。ヒトでは第1染色体長腕に相当する。

3. 網膜に特異的に発現している mRNA からのアプローチ: rom-1 遺伝子

網膜組織において、種属を超えて多量に発現している遺伝子があるとしても、その遺伝子は網膜組織において構造的、機能的に重要な遺伝子となる。この考えを元に、網膜で発現しているすべての mRNA から皮膚で発現している mRNA を除去し(サブトラクション法)、網膜に特異的な mRNA を選び、さらに牛の網膜で発現している mRNA と反応させ、共通に発現している mRNA を選び出した。その1つが rom-1 と名付けられたが、351個のアミノ酸から成りペリフェリンと約35%相同性を有し、杆体の円板膜にのみ存在しペリフェリンと同様に円板膜を4回横切る構造をしている⁵⁷⁾。第11染色体長腕(11q13)に位

表1 光情報伝達系に関する遺伝子とマッピング

遺 伝 子	染色体上の位置
ロドプシン	3 q 21-q 24
錐体オプシン	
赤	Xq 28
緑	Xq 28
青	7 q 22-qter
杆体トランスジューシン α (1)	3
錐体トランスジューシン α (2)	1
トランスジューシン β (1)	1 pter-p 31.2
杆体 cGMP-PDE	
α サブユニット	5 q 31.2-q 34
β	4 p 16.3
γ	17 q 21.1
杆体 cGMP チャンネル	4 p 14-q 13.3
IRBP	10 p 11.2-p 21.1
S 抗原	2 q 24-q 37
フォスジューシン	1 q 24-q 32
ペリフェリン	6 p 11.2-p 21.2
ROM-1	11 q 13
リカバリン	17 p 13.1

PDE(phosphodiesterase): フォスフォジエステラーゼ
 IRBP(interstitial retinol-binding protein):
 視細胞間レチノール結合蛋白

置する⁵⁸⁾。rom-1もペリフェリンと同様に杆体外節の形態保持に重要な働きをしていることが考えられている。ADRP患者においてrom-1遺伝子内に変異が報告

されている⁵⁹⁾。また、Usher 症候群の1型²¹⁾²²⁾および卵黄様黄斑部変性症病(ペスト病)³⁰⁾は連鎖解析により11q13にマッピングされたので、候補遺伝子として検索されている。

また、リカバリンは(recoverin)⁶⁰⁾、低Ca²⁺濃度下でcGMPの合成酵素であるグアニレートシクラーゼ(guanylate cyclase)を活性化するCa²⁺結合性蛋白質としてウシ網膜から精製された物質で、視細胞の明順応時にcGMP合成を促進し、視細胞電位の回復を速やかにするとされている。ニワトリではビジニン(visinin)⁶¹⁾、カエルではSモジュリンとして類似の蛋白が精製されている⁶²⁾。最近、ビジニンのcDNAをプローブとして利用し、ヒトのリカバリンcDNAがクローニングされた⁶³⁾。また、rom-1と同様に網膜のcDNAライブラリーから上述したサブトラクション法にても、網膜に特異的なmRNAとしてヒトのリカバリンcDNAがクローニングされた⁶⁴⁾。ヒトでは第17染色体短腕(17q13.1)に位置する。現在、この部位にマップされた変性疾患はないが、候補遺伝子として網膜変性症患者において遺伝子変異の解析が行われている⁶³⁾。

現在、候補遺伝子アプローチにより確定された病因遺伝子、遺伝性眼疾患は少ないが、視細胞や網膜色素上皮に特異的に発現する遺伝子は黄斑部変性症や網脈絡膜変性症の病因遺伝子になり得る。表1に、現在までにクローニングされた視細胞の光情報伝達に関連した遺伝子のうち、染色体上での位置が判明しているものを示したが、連鎖解析によりある疾患が同じ位置にマッピングされれば候補遺伝子となり得る。今後、このアプローチにて新たに病因遺伝子を同定していく場合、種々の方法で、網膜組織に特異的に発現している遺伝子のクローニングの数を増やし、そして染色体上にマッピングを進めていくと同時に、臨床家は種々の網脈絡膜変性疾患や黄斑部変性症の大きな家系を集め、連鎖解析により染色体上にマッピングしていく必要がある。一方ではポジショナルクローニングによるアプローチも重要であり、臨床家が染色体の異常をもった症例を見つけて出すことが遺伝子のクローニングに結びつく。今後もこの2つの方法を中心に、病因遺伝子が明らかにされていくものと考え、前述した臨床家と分子生物学者の密接な協力関係が、これまでのこの領域の発展に重要であったが、今後もこの領域のますますの発展には、両者の密接な協力関係がさらに不可欠である。

本論文の主旨の一部は第58回日本中部眼科学会シンポジウム「眼科基礎研究、最近の進歩」にて発表した。

文 献

- 1) Orkin SH: Reverse genetics and human disease. *Cell* 47: 845—850, 1986.
- 2) Collins FS: Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genet* 1: 3—6, 1992.
- 3) Inana G, Totsuka S, Redmond M, Dougherty T, Nagle J, Shiono T, et al: Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1203—1207, 1986.
- 4) Mitchell GA, Looney JE, Brody LC, Steel G, Suchanek M, Engelhardt JF, et al: Human ornithine- δ -aminotransferase cDNA cloning and analysis of the structural gene. *J Biol Chem* 263: 14288—14295, 1988.
- 5) Inana G, (訳)井ノ上逸朗: 脳回転状脈絡網膜萎縮症の分子遺伝。蛋核酵 33: 518—522, 1988.
- 6) 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 Invest* 81: 630—633, 1988.
- 7) Ramesh V, McClatchey AI, Ramesh N, Benoit LA, Berson EL, Shih VE, et al: Molecular basis of ornithine aminotransferase deficiency in B-6-responsive and -nonresponsive forms of gyrate atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3777—3780, 1988.
- 8) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643—646, 1986.
- 9) Cremers FPM, van de Pol DJR, van Kerkhoff LPM, Wieringa B, Ropers H-H: Cloning of a gene that is rearranged in patients with choro-deremia. *Nature* 347: 674—677, 1990.
- 10) Merry DE, Jänne PA, Landers JE, Lewis RA, Nussbaum RL: Isolation of a candidate gene for choro-deremia. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2135—2139, 1992.
- 11) Ton CCT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, et al: Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 67: 1059—1074, 1991.
- 12) Berger W, Meindl A, van de Pol TJR, Cremers FPM, Ropers HH, Döner C, et al: Isolation of a candidate gene for Norrie disease by

- positional cloning. *Nature Genet* 1: 199—203, 1992.
- 13) **Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dörner C, et al:** Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nature Genetics* 2: 139—143, 1992.
 - 14) **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.
 - 15) **Fodor E, Lee RT, O'Donnell JJ:** Analysis of choroideremia gene. *Nature* 351: 614, 1991.
 - 16) **Seabra M, Brown MS, Goldstein JL:** Retinal degeneration in choroideremia: Deficiency of Rab geranylgeranyl transferase. *Science* 259: 377—381, 1993.
 - 17) **Sankila E-M, Tolvanen R, van den Hurk JAJM, Cremers FPM, de la Chapelle A:** Aberrant splicing of the CHM gene is a significant cause of choroideremia. *Nature Genet* 1: 109—113, 1992.
 - 18) **van den Hurk JAJM, van de Pol TJR, Molloy CM, Brunsmann F, Ruther K, Zrenner E, et al:** Detection and characterization of point mutations in the choroideremia candidate gene by PCR-SSCP analysis and direct DNA sequencing. *Am J Hum Genet* 50: 1195—1202, 1992.
 - 19) Human gene mapping (HGM) 11. *Cytogen Cell Gen* 58, 1992.
 - 20) **Ott J, Bhattacharya SB, Chen JD, Denton MJ, Donald J, Dubay C, et al:** Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 701—704, 1990.
 - 21) **Kimberling WJ, Möller CG, Davenport S, Priluck IA, Beighton PH, Greenberg J, et al:** Linkage of Usher syndrome type 1 gene (USH1B) to the long arm of chromosome 11. *Genomics* 14: 988—994, 1992.
 - 22) **Smith RJH, Lee EC, Kimberling WJ, Daiger SP, Pelias MZ, Keats BJB, et al:** Localization of two genes for Usher syndrome type 1 to chromosome 11. *Genomics* 14: 995—1002, 1992.
 - 23) **Kaplan J, Gerber S, Bonneau D, Rozet J, Briard M, Dufier J, et al:** Probable location of Usher type 1 gene on chromosome 14q by linkage with D14S13 (MLJ14 probe). *Cytogenet Cell Genet* 58: 1988, 1991.
 - 24) **Kimberling WJ, Weston MD, Möller C, Davenport SLH, Shugart YY, Priluck IA, et al:** Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q. *Genomics* 7: 245—249, 1990.
 - 25) **Lewis RA, Otterud B, Stauffer D, Lalouel J-M, Leppert M:** Mapping recessive ophthalmic diseases: Linkage of the locus for Usher syndrome type II to a DNA marker on chromosome 1q. *Genomics* 7: 250—256, 1990.
 - 26) **Sieving PA, Bingham EL, Roth MS, Young MR, Boehnke M, Kuo C-H, et al:** Linkage relationship of X-linked juvenile retinoschisis with Xp22.1—p22.3 probes. *Am J Hum Genet* 47: 616—621, 1990.
 - 27) **Alitalo T, Kruse TA, de la Chapelle A:** Refined localization of the gene causing X-linked juvenile retinoschisis. *Genomics* 9: 505—510, 1991.
 - 28) **Li Y, Müller B, Fuhrmann C, van Nouhuys CE, Laqua H, Humphries P, et al:** The autosomal dominant familial exudative vitreoretinopathy locus maps on 11q and is closely linked to D11S533. *Am J Hum Genet* 51: 749—754, 1992.
 - 29) **Fullwood P, Jones J, Bunday S, Dudgeon J, Fielder AR, Kilpatrick MW:** X linked exudative vitreoretinopathy: Clinical features and genetic linkage analysis. *Br J Ophthalmol* 77: 168—170, 1993.
 - 30) **Stone EM, Nichols BE, Streb LM, Kimura AE, Sheffield VC:** Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13. *Nature Genet* 1: 246—250, 1992.
 - 31) **Cremers FPM, Molloy CM, van de Pol DJR, van den Hurk JAJM, Bach I, van Kessel AHMG, et al:** An autosomal homologue of the choroideremia gene colocalizes with the Usher syndrome type II locus on the distal part of chromosome 1q. *Human Molecular Genetics* 1: 71—75, 1992.
 - 32) **Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM:** Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 232—236, 1989.
 - 33) **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K:** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874—879, 1989.
 - 34) **McWilliam P, Farrar GJ, Kenna P, Bradley**

- DG, Humphries MM, Sharp EM, et al: Autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): Localization of an ADRP gene to the long arm chromosome 3. *Genomics* 5: 619-622, 1989.
- 35) 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.
- 36) Fujiki K, Hotta Y, Hayakawa M, Sakuma H, Shiono T, Noro M, et al: Point mutations of rhodopsin gene found in Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). *Jpn J Human Genet* 37: 125-132, 1992.
- 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) Kumar-Singh R, Wang H, Humphries P, Farrar GJ: Autosomal dominant retinitis pigmentosa: No evidence for nonallelic genetic heterogeneity on 3q. *Am J Hum Genet* 52: 319-326, 1993.
- 39) Inglehearn CF, Carter SA, Keen TJ, Lindsey J, Stephenson AM, Bashir R, et al: A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 7p. *Nature Genetics* 4: 51-53, 1993.
- 40) Jordan AS, Farrar GJ, Kenna P, Humphries MM, Sheils DM, Kumar-Singh R, et al: Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nature Genet* 4: 54-58, 1993.
- 41) Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW, Friedman J, Sadler LA, Wagner M, et al: Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. *Genomics* 11: 857-869, 1991.
- 42) 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.
- 43) Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG: Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature* 338: 70-73, 1989.
- 44) 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.
- 45) Travis GH, Sutcliffe JG, Bok D: The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron* 6: 61-70, 1991.
- 46) Farra GJ, Jordan SA, Kenna P, Humphries MM, Kumar-Singh R, McWilliam P, et al: Autosomal dominant retinitis pigmentosa: Localization of a disease gene (RP6) to the short arm of chromosome 6. *Genomics* 11: 870-874, 1991.
- 47) Jordan SA, Farrar GJ, Kumar-Singh R, Kenna P, Humphries MM, Allamand V, et al: Autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP; RP6): Cosegregation of RP6 and the peripherin-RDS locus in a late-onset family of Irish origin. *Am J Hum Genet* 50: 634-639, 1992.
- 48) 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.
- 49) Kajiwar 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.
- 50) Kajiwar 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.
- 51) 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.
- 52) Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB: Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the β subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347: 677-680, 1990.
- 53) Collins C, Hutchinson G, Kowbel D, Riess O, Weber B, Hayden MR: The human β -subunit of rod cGMP phosphodiesterase: Complete

- retinal cDNA sequence and evidence for expression in brain. *Genomics* 13: 698-704, 1992.
- 54) **Riess O, Noerremoele A, Weber B, Musarella MA, Hayden MR**: The search for mutations in the gene for the beta subunit of the cGMP phosphodiesterase (PDEB) in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 51: 755-762, 1992.
 - 55) **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.
 - 56) **Chang B, Heckenlively JR, Hawes NL, Roderick TH**: New mouse primary retinal degeneration (rd-3). *Genomics* 16: 45-49, 1993.
 - 57) **Bascom RA, Manara S, Collins L, Molday RS, Kalnins VI, McInnes RR**: Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disc rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* 8: 1171-1184, 1992.
 - 58) **Bascom RA, Garcia-Heras J, Hsieh C-L, Gerhardt DS, Jones C, Francke U, et al**: Localization of the photoreceptor gene rom-1 to human chromosome 11 and mouse chromosome 19: Sublocalization to human 11q13 between PGA and PYGM. *Am J Hum Genet* 51: 1028-1035, 1992.
 - 59) **Bascom RA, Liu L, Chen J, Duncan A, Kimberling WJ, Moller CG, et al**: ROM1: A candidate gene for autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP), Usher syndrome type 1, and Best vitelliform macular dystrophy (abstract). *Am J Hum Genet* 51: A6, 1992.
 - 60) **Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, et al**: Recoverin: A calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251: 915-918, 1991.
 - 61) **Yamagata K, Goto K, Kuo C-H, Kondo H, Miki N**: Visinin: A novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 2: 469-476, 1990.
 - 62) **Kawamura S, Murakami M**: Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature* 349: 420-423, 1991.
 - 63) **Freund CL, Valle D**: Cloning and initial characterization of the cDNA and gene for human recoverin (abstract). *Am J Hum Genet* 51: A6, 1992.
 - 64) **Murakami A, Yajima T, Inana G**: Isolation of human retinal genes: Recoverin cDNA and gene. *Biochem Biophys Res Comm* 187: 234-244, 1992.

追記

文献(60)の Dizhoor らのリカバリンに関する論文は、その後、リカバリンの機能に関してグアニレートシクラーゼを活性化しないことが判明し、著者らはこれに関して結果を取り下げた。

Hurly JB, Dizhoor AM, Ray S, Stryer L: Recoverin's role: conclusion withdrawn. *Science* 260: 740, 1993.