

網膜色素変性症患者におけるスプライシング因子の遺伝子解析

研究所 障害工学研究部 押川未央、加藤誠志、西田朋美

網膜色素変性症 (RP) とは網膜の視細胞および色素上皮細胞の変性により、夜盲や視野狭窄を経て最終的に失明に至る進行性の遺伝子疾患である。この疾患に関与する遺伝子はすでに 50 種類ほど報告されており、米国では大規模な家系解析によって常染色体優性 RP の主要な原因遺伝子が同定されている。一方、日本人における主要な原因遺伝子は未だ報告されておらず、原因遺伝子が特定されていない患者が数多く存在する。そこで本研究では当センターに来院した RP 患者 69 名および対照明眼者 68 名のゲノム解析を行っている。

これまでに行った既知の RP 原因遺伝子の塩基配列解析で、RP 患者のみに変異が見いだされた遺伝子に PRPF31 がある。この遺伝子はスプライシング因子と呼ばれる遺伝子ファミリーの 1 つで、どの細胞にも発現している遺伝子であるにも関わらず、PRPF31 遺伝子の変異は RP のみを引き起こす。このほかに PRPF3, PRPF8 のスプライシング因子も RP の原因遺伝子として知られている。本研究では PRPF3 には変異は見いだされず、また PRPF8 については現在解析中である。

PRPF31 遺伝子について、血縁関係のある RP 患者 2 名において、第 4 イントロンの 5' スプライイス部位に新規の一塩基置換 (IVS4+1G>A) を検出した。ゲノムから転写された遺伝子の mRNA の配列はエクソンとイントロン (介在配列) を含む。mRNA はイントロンが除去 (スプライシング) されて成熟した構造となり、正常なタンパク質へと翻訳される。イントロンの両端の配列は非常に高度に保存されており、この部位に変異が生じるとスプライシングが正常に起こらなくなる可能性がある。IVS4+1G>A の置換を有する場合に生じる PRPF31 の成熟 mRNA の構造は主に 2 種類考えられる。1 つは第 4 イントロンがスプライシングされずに残存し、タンパク質の合成が第 4 イントロン中で停止する構造である。この場合、mRNA はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) によって分解されると推測される。もう 1 つは第 4 エクソンがスキッピングされ、異常タンパク質が合成される構造である。これらを検討するために、第 3 イントロンから第 5 イントロンまでを含む完全長の PRPF31cDNA 発現ベクター (PRPF31IVS3-5) を構築し、解析を行った。

野生型または変異型 PRPF31IVS3-5 をヒト培養細胞に導入し、発現した PRPF31 の mRNA の構造および発現量を調べた結果、変異型 PRPF31 遺伝子では第 4 エクソンがスキップされた構造と第 4 イントロンが残存した構造の mRNA を検出した。つまり、PRPF31 遺伝子は IVS4+1G>A の置換によってスプライシングが正常に起こらなくなることが明らかとなり、この置換が RP の病因変異である可能性が示唆された。