【総 説】

1. 遺伝性白内障モデルラット (SCR) に認められた ラノステロール合成酵素の突然変異と修飾遺伝子

森 政 之 朱 宮 正 剛¹⁾ 李 桂 馨
阿 部 郁 朗²⁾ 芹 川 忠 夫³⁾ 樋 口 京 一

信州大学大学院医学研究科 加齢生物学, 東京都老人総合研究所 実験動物¹⁾,
静岡県立大学薬学部 生薬学²⁾, 京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設³⁾

Lanosterol Synthase Mutations and a Modifier Gene Identified in the Hereditary Cataractous SCR Rat

Masayuki MORI, Seigo SHUMIYA¹⁾, Guixin LI, Ikuro ABE²⁾,
Tadao SERIKAWA³⁾, and Keiichi HIGUCHI

*Department of Aging Biology, Institute on Aging and Adaptation, Shinshu University
Graduate School of Medicine, Department of Laboratory Animal Science,
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology¹⁾, School of Pharmaceutical
Sciences, University of Shizuoka²⁾, Institute of Laboratory Animals,
Graduate School of Medicine, Kyoto University³⁾*

Summary

The Shumiya cataract rat (SCR) is a hereditary cataractous strain. Previous crossing experiments revealed that one genetically recessive locus and one copy of a recessive gene associated with embryonic lethality were a prerequisite for cataract onset in the SCR. In this study, we revealed unique molecular genetic features of cataract onset in the SCR by identifying a gene responsible for cataract and embryonic lethality in the SCR. Genetic linkage analysis and positional cloning revealed mutations of the gene for lanosterol synthase (*Lss*) on chromosome 20 in SCR, which functions in the cholesterol biosynthesis pathway. Accordingly, the cataract in SCR could be classified under cholesterol deficiency-associated cataracts. Cataract onset in SCR was uniquely regulated by a specific combination of different mutant (*Lss*^l) and polymorphic alleles (*Lss*^s) on the *Lss* locus. *Lss*^s was a hypomorphic allele with a G to A nucleotide substitution in exon 4 that reduced LSS activity to about 40% of normal by substituting an amino acid (D139N). The G to A nucleotide substitution also caused aberrant splicing, which led to transcripts with a deletion of a sequence corresponding to the last 47 nucleotides of the exon 4. Thus, the *Lss*^s allele was unique in that one nucleotide substitution acted synergistically to reduce enzyme activity. *Lss*^l was a null allele with a deletion of thirteen consecutive nucleotides (1405-1407del) plus a single nucleotide insertion (1419-1420insT), leading to a deletion of four consecutive amino acids (H469-C472del). Thus, *Lss*^s and *Lss*^l could be assumed to be cataract and embryonic lethal alleles, respectively. These observations indicated that the cataract onset in the SCR complied with a threshold model. The prerequisite for cataract onset was the *Lss*^s/*Lss*^l genotype, which reduced LSS activity below the threshold, that is about 12-24% of normal. Furthermore, the linkage analysis revealed that a locus on chromosome 15 of normal ACI rat strain (*Cats2*^A) suppressed cataract onset with incomplete penetrance, indicat-

ing that cataract in SCR is an oligogenic trait. The through elucidation of the mechanisms for cataract in SCR might afford an excellent insight into the studies of threshold diseases as well as of other oligogenic traits.

緒 言

白内障はレンズの透明性が失われる病態すべてを含む一つの疾患群である。遺伝性白内障は眼球/レンズの発生・分化にかかわる遺伝子の異常により発生する。これまでにヒトやマウス、ラットの染色体上にマップされた白内障遺伝子は数十にのぼる。これらの原因遺伝子の分子生物学的解析により、眼球/レンズの生化学的・細胞生物学的特性に関する多くの知見が得られつつある。

我々は遺伝性白内障モデル動物の一つである SCR 系ラットの白内障原因遺伝子を同定し、その極めてユニークな分子遺伝学的特性を明らかにした。

遺伝性白内障ラット SCR の特性

Shumiya Cataract Rat (SCR) は成熟期に核性白内障を発症する近交系ラットである¹⁾。高血圧自然発症モデルである SHR 系ラットに Zucker-fatty 系ラットから肥満遺伝子である *Lepr^{fa}* を導入したコンジュニク系の SHR-*Lepr^{fa}* を育成中に発見された白内障個体から分離、確立された。SCR における白内障は 8 週齢で既に水晶体での後縫合周囲皮質に円盤状の液化混濁として観察される。10 週齢半ばで後縫合の解離と周囲皮質の混濁化が観察され、11 週齢までに核周囲帯および深部皮質に沿って前極に波及し、肉眼的に白内障として観察できるようになる (Fig. 1)。

SCR は白内障個体どうしの兄妹交配により維持されるが、白内障の発症率は常に 1 腹の仔の約 2/3 にとどまり、残りの約 1/3 は正常となる。このことから SCR の白内障発症には白内障遺伝子 (cataract shumiya 1; *Cats1^S*) に加えて胎生致死遺伝子 (*Cats1^L*)

Fig. 1 Typical feature of cataractous SCR.

がヘテロで存在することが必須であることが示唆されていた。

SCR の白内障の原因遺伝子のポジショナルクローニング

そこで我々は SCR の白内障原因遺伝子の染色体マッピングから、その同定を試みた。SCR 系ラットと正常系統である ACI 系ラットとの戻し交雑仔 (SCR×ACI)×SCR, および (SCR×ACI) F2 交雑仔を作製した。305 匹の戻し交雑仔のうち 80 匹が 12 週齢で肉眼的に白内障発症個体と診断された。この 80 匹について各染色体上のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定した結果、第 15 番染色体上の *D15Mor3* と第 20 番染色体上の *D20Rat3* に SCR に由来する対立遺伝子のホモ型への有意な分離の偏りを認めた

Fig. 2 Distribution of haplotypes for chromosomes 15 (A) and 20 (B) observed among the 80 cataractous rats from the backcross of (cataractous SCR×ACI) F₁ (putative genotype was *Cats1^S/Cats1^A*)×cataractous SCR. S and H represent homozygosity for the SCR allele, and heterozygosity for the ACI allele, respectively. Map positions of marker loci are based on the data in the Rat Genome Database.

(Fig. 2). 特に *D20Rat3* においては全ての白内障発症個体が SCR のホモ型であり、このマーカーの近傍に SCR の白内障 (胎生致死) 原因遺伝子である *Cats1* が存在することが強く示唆された。次いで (SCR × ACI) F2 交雑仔でのデータを併用して *Cats1* の存在領域をさらに絞り込むことにより、それがコレステロール生成経路において酸化スクアレンからラノステロールへの変換を触媒するラノステロール合成酵素をコードする遺伝子 (lanosterol synthase; *Lss*) の突然変異であることを突き止めた。

ラノステロール合成酵素遺伝子の突然変異

SCR 系ラットの肝臓から *Lss* 遺伝子の cDNA を PCR 増幅し、その塩基配列を ACI 系ラットのものと比較すると、「SCR 系ラットが *Cats1^S* と *Cats1^I* の 2 タイプの対立遺伝子をもつ」との予測と一致して、2 つのタイプの cDNA が見出された (Fig. 3 A)。 *Lss^S* 対立遺伝子には ACI 系ラットの *Lss^A* 対立遺伝子からの D139N, G189A, Q481R の 3 カ所のアミノ酸置換が生じる塩基置換が認められた。 *Lss^I* 対立遺伝子には、これらのアミノ酸置換に加えて cDNA 内の 1405～1417 番目の 13 塩基の欠失とその 3 塩基下流での 1 塩基挿入が生じていた。この変異の結果として 469～472 番目の 4 つの連続するアミノ酸の欠失 (H469-

C472del) が予測された (Fig. 3 B)。

Lss^S と *Lss^I* に生じる異常スプライシング

SCR の *Lss^S* と *Lss^I* 対立遺伝子からは、上記の完全長型の cDNA に加えて 385～431 番目の 47 塩基の欠失をもつ配列も得られた。この 47 塩基の欠失の結果として 130 番目のアミノ酸で翻訳停止した LSS 蛋白が予測された。欠失する 47 塩基は *Lss* 遺伝子の第 4 エクソンの 3' 端の配列に一致し、かつその 5' 端の配列は GT であった (Fig. 4 A)。 *Lss^S* と *Lss^I* 対立遺伝子の第 4 エクソンには D139N アミノ酸置換の原因となる塩基置換 (415G > A) が存在する。3 タイプの対立遺伝子の第 3～5 エクソンの染色体 DNA 断片をクローニングして COS 細胞中で強制発現させ、転写される mRNA を RT-PCR 法により解析したところ、 *Lss^S* と *Lss^I* 対立遺伝子からは第 4 エクソンの 3' 端の 47 塩基を欠失した産物が転写されることが確認された (Fig. 4 B)。以上の結果より、「415G > A 塩基置換により、何らかのメカニズムでその上流にある潜在的スプライスドナー配列が活性化され、その結果、第 4 エクソンの 3' 端の 47 塩基を欠失した異常スプライス mRNA が生じる」との機構が推察された。完全長型と欠失型 mRNA の比率は約 6 : 4 であった。

Fig. 3 (A) Summary of mutations and polymorphisms observed in the rat *Lss* locus. Eight nucleotide substitutions in exons are indicated. (B) Partial nucleotide sequence of exon 15 of the rat *Lss* gene. The nucleotide sequence of the mutant *Lss^I* allele is aligned with that of the normal *Lss^A* allele. Nucleotide matches are indicated by asterisks (*). The four amino acid deletion (H469-C472del) are indicated by bold letters.

Fig. 4 (A) Exon truncation due to a G to A substitution in exon 4 of the rat *Lss* gene. Exon and intron sequences are indicated in upper- and lower-case letters, respectively. The A substitution in exon 4 is indicated by a bold letter. The forty-seven bases deleted by exon truncation are in parentheses. Also shown are sequences of normal (below) and aberrant (above) mRNA and the predicted amino acids. The asparagine substitution at the 139th residue is indicated in bold letters. (B) Measurement of aberrant splicing by *in vitro* transcription of the rat *Lss* minigene constructs. Left panels are schematic illustrations of the minigene constructs. Only inserts in the pEF6/V5-His-TOPO vector are shown. The positions of cryptic and normal splice donors, and G/A substitution in exon 4 are indicated. Right panels are electropherograms of RT-PCR products from each construct. Percent ratio are shown for aberrant (left peak) and normally spliced products (right peak).

Lss^S 型対立遺伝子のユニーク性

酵母内で変異型 *LSS* アイソフォームを強制発現させ、その活性を測定した。*Lss^L* にコードされる H469-C472del をもつアイソフォームおよび 130 番目のアミノ酸で翻訳停止したアイソフォームには活性は認められなかった。したがって *Lss^L* は活性喪失型対立遺伝子であることが証明された。一方、*Lss^S* にコードされる 3 カ所のアミノ酸置換をもつ全長型 *LSS* の酵素活性は正常型の約 40% に低下していた。さらに 3 カ所のアミノ酸置換のうち、D139N アミノ酸置換を導入するだけで同じ活性低下が認められたことから、この置換が活性低下の原因であることが確認された。

D139N 置換の原因である 415G>A 塩基置換は同時に異常スプライシングの原因でもある。したがって、*Lss^S* は 2 つの独立した機構により相加的に酵素活性の低下を惹起する極めてユニークな対立遺伝子である

ことが判明した。

対立遺伝子の由来

様々な近交系ラットの *Lss* 遺伝子を調査した結果、*Lss^S* 対立遺伝子は SCR 系ラット以外の近交系ラットにも広く分布する遺伝的多型であることが判明した。また、SCR の一方の祖先系統である SHR 系ラットにも認められたことから、SCR の *Lss^S* 対立遺伝子は SHR に由来することが推測された。

一方、*Lss^L* 対立遺伝子の cDNA に認められた 13 塩基の欠失とその 3 塩基下流での 1 塩基挿入は第 15 エクソンに生じている欠失/挿入変異であることが判明した (Fig. 3 A)。*Lss^S* と *Lss^L* 対立遺伝子の塩基配列を比較してみると、*Lss^L* は第 4 イントロンの 593 番目の塩基が *Lss^S* での G から T に変異している。この T 置換をもつ対立遺伝子は SCR 系ラットのもう一方の祖先系統である Zucker-fatty 系ラットにも認められ

Fig. 5 Schematic illustration of the relationship among genotype, LSS activity, and phenotype in the SCR and ACI strains.

た。しかしながら Zucker-fatty 系ラットには第 15 エクソン内の欠失/挿入変異は認められなかった。したがって Lss^l 対立遺伝子は SHR- $Lepr^{fa}$ コンジェニック系の育成中に Zucker-fatty 系ラットに由来する対立遺伝子の第 15 エクソンに新たな突然変異が生じてきたものであることが推測された。

SCR における白内障発症の閾値モデルと活性低下型対立遺伝子の重要性

以上のデータから、各対立遺伝子の LSS 活性ポテンシャルは以下のように計算することができる。正常型である Lss^A の 1 対立遺伝子の活性ポテンシャルを 50 とする。 Lss^S からは完全長型と欠失型の mRNA 産物が約 6:4 の比率で転写される。完全長型 mRNA にコードされる LSS の活性は Lss^A からの産物の約 40% に低下しており、欠失型 mRNA にコードされる LSS は活性を喪失している。したがって、 Lss^S の 1 対立遺伝子の活性ポテンシャルは $50 \times 0.4 \times 0.6 = 12$ と予測される。 Lss^l からも完全長型と欠失型の mRNA 産物が転写されるが、どちらの mRNA にコードされる産物も活性を喪失している。したがって、 Lss^l の 1 対立遺伝子の活性ポテンシャルは 0 である。

さらに SCR 系ラットにおける Lss 遺伝子型、LSS 活性と表現型の関係は Fig. 5 のように説明できる。白内障 SCR 系ラットの遺伝子型は活性低下型 Lss^S と活性喪失型 Lss^l 対立遺伝子とのヘテロ型であり、その LSS 活性ポテンシャルは Lss^S による 12 と Lss^l による 0 の合計で 12 となる。SCR 系ラットの維持のためのヘテロ個体同士の交配では、 $Lss^{S/S}$ 、 $Lss^{S/l}$ 、 $Lss^{l/l}$ の

Fig. 6 Comparison of tissue and serum cholesterol levels in ACI, normal SCR, and cataractous SCR (all $n=3$). ** $p<0.01$.

3 タイプの遺伝子型の個体が 1:2:1 の比率で予測される。 $Lss^{l/l}$ 遺伝子型をもつ個体は LSS 活性を完全に喪失しているためにコレステロールを合成できず、胎生致死となる。生まれてくる仔のうち 1/3 は $Lss^{S/S}$ 遺伝子型をもつ。この個体での潜在 LSS 活性は 2 つの Lss^S による合計で 24 となり、見かけ上は正常となる。誕生仔の 2/3 は $Lss^{S/l}$ をもち、再び白内障を発症する。このモデルから、LSS 活性ポテンシャルの 24 と 12 の間に白内障の発症閾値があり、12 と 0 の間に胎生致死となる閾値があると推測される。実際に正常 SCR および白内障 SCR のレンズのコレステロール含量は正常 ACI 系ラットのそれぞれ約 76%、57% に低下していた (Fig. 6)。

多くの“閾値形質 (疾患)”では SCR 系ラットでの白内障と同様に酵素活性などが正常の 0~50% に低下することが重要なかもしれない。活性低下型とノックアウト型対立遺伝子とのヘテロとすることでそのような状況を構築することが可能と推測される。そのためには標的とする遺伝子に関して活性低下型対立遺伝子を探索して活用すること、あるいは人為的に作製するための方法の確立が重要と考えられる。現在疾患モデル作出の主流となっているノックアウトマウスでは理論的には活性 100% (正常型対立遺伝子のホモ型) か 0% (ノックアウト型対立遺伝子のホモ型) か 50% (正常型とノックアウト型対立遺伝子のヘテロ型) か、を再現できるにすぎない。実際、遺伝性コレステロール合成低下症のモデル確立を目的としてコレステロール生合成系に関与するいくつかの遺伝子に関してノックアウトマウスが作出されている。ノックアウト遺伝子と正常型遺伝子のヘテロ個体では何ら異常は認められ

ない。また、ノックアウトホモ個体とすると胎生致死となるか生後1日以内に死亡してしまい、ヒトの疾患モデルとしての有用性は限定されている²⁾。

コレステロールと白内障

現在までにコレステロール生合成系に関与する他の酵素をコードする遺伝子の変異による6個のヒト遺伝性疾患が報告されており、そのうちの4疾患で白内障が併発する²⁾。したがって、SCR系ラットは“遺伝性コレステロール欠乏性白内障”の新たな一例であるとも言える。コレステロール生合成の低下が白内障を惹起する機構は完全には解明されていない。水晶体細胞の形態、あるいは機能にはコレステロールが重要であり、コレステロール含量の低下によりこの維持に破綻が生じると白内障を発症するものと推察されている。今後はSCR系ラットを用いてこれらの点の解明を進めていきたい。

ヒトの遺伝性コレステロール合成低下症においては、奇形や神経系の異常に起因する精神遅滞、行動異常などの多彩な症状が認められる。一方、SCR系ラットには現在まで白内障以外の異常は認められていない。SCR系ラットのレンズ以外の臓器でのコレステロール含量を測定してみると、大脳皮質でのコレステロール含量は正常SCRおよび白内障SCRともにACIの約76%に低下していた (Fig. 6)。この程度の低下では神経系に異常をきたすのには不十分であるのかもしれない。一方、肝臓では3群間に有意な差は無く、血清中のコレステロール含量は正常SCRおよび白内障SCRでACIの約1.2倍と逆に有意に高い値を示した。コレステロール代謝は臓器により異なり、肝臓はコレステロール合成の低下に代償的に働く機構をもっているのかもしれない。また、ラットを含むげっ歯類とヒトを含む霊長類のコレステロール代謝には大きな違いがあることも考慮しなければならない³⁾。

第15番染色体上の白内障抑制遺伝子

(SCR×ACI)×SCR戻し交雑仔の中で白内障非発症群225匹に関して *Lss* の遺伝子型を調査してみると、22匹は白内障発症型のはずである *Lss*^{S/t} 遺伝子型をもっていた。これらの個体の各染色体上のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を決定した結果、全22個体が第15番染色体上の *D15Mor3* においてヘテロ型であることが判明した (Table 1)。白内障発症群では *D15Mor3* において逆にSCRのホモ型に有意な偏りがあったものの、28個体は *D15Mor3* において

Table 1 Segregation at *D15Mor3* of (SCR×ACI)×SCR backcross rats with the *Lss*^{S/t} genotype.

Genotype at <i>D15Mor3</i>	Phenotype		
	Cataract	Normal	Total
S/S	52	0	52
S/A	28	22	50
Total	80	22	102

ヘテロ型であっても白内障を発症した。以上の結果はSCR系ラットにおける白内障はオリゴジェニックであり、ACI系ラットの第15番染色体上に白内障発症を不完全ながら抑制することのできる遺伝子 (cataract shumiyu 2; *Cats2*⁴⁾) が存在することを示唆した。本研究で使用したのは戻し交雑仔であり、期待される遺伝子型はSCR由来の対立遺伝子のホモ型かACIとSCR由来の対立遺伝子のヘテロ型に限られる。もしもACI由来の対立遺伝子のホモ型であれば、より強力に白内障発症を抑制できた可能性がある。

現在、*Cats2* 遺伝子の同定を試みている。SCRとは異なる遺伝性白内障モデルであるIER系ラットにおいても2個の遺伝子座の関与が明らかとされている⁴⁾。興味深いことに、IERを用いた遺伝交雑試験では白内障発症の主な原因遺伝子 *Cati1*ⁱ に加えて第15番染色体上の *Cati2* による白内障発症を遅延する効果が検出されている。*Cats2* と *Cati2* の候補領域は互いに近く、同一の遺伝子である可能性もある。*Cati1*ⁱ が同定されていないので、IERにおける白内障発症の一義的原因は明らかではない。もしも *Cati1*ⁱ がSCRとは異なるメカニズムで白内障を発症させるものであり、かつ *Cats2* と *Cati2* が同一の遺伝子であるとする、*Cats2* (*Cati2*) は白内障を一義的原因の違いにかかわらず普遍的に抑制あるいは遅延する効果をもつものかもしれない。*Cats2* 遺伝子の同定は白内障の新たな予防法の確立などにつながる可能性を秘めている。

おわりに

SCR系ラットにおける白内障発症は①変異遺伝子による活性低下機序、②オリゴジェニックである点、③閾値モデルが適合する点が極めてユニークである。SCR系ラットにおける白内障発症と類似した閾値疾患や多因子疾患は他にも多く存在する。SCR系ラットにおける白内障原因遺伝子の作用機序の全容解明

は、これらの疾患の研究にも新たな洞察を与えるものと期待される。

文 献

- 1) Shumiya S. Establishment of the hereditary cataract rat strains (SCR) and genetic analysis. *Lab. Anim. Sci.* **45**: 671-673, 1995.
- 2) Nwokoro NA, Wassif CA, Porter FD. Genetic disorders of cholesterol biosynthesis in mice and humans. *Mol. Genet. Metab.* **74**: 105-119, 2001.
- 3) Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* **34**: 1637-1659, 1993.
- 4) Yokoyama M, Amano S, Tsuji A et al. Genetic analysis of cataract in Ihara epileptic rat. *Mamm. Genome* **12**: 207-211, 2001.