

# 光量子医学研究センター 光環境医学研究分野

## 1 構 成 員

	平成22年3月31日現在
教授	1人
准教授	0人
講師（うち病院籍）	0人（ 0人）
助教（うち病院籍）	2人（ 0人）
助手（うち病院籍）	0人
特任教員（特任教授，特任准教授，特任助教を含む）	0人
医員	0人
研修医	0人
特任研究員	2人
大学院学生（うち他講座から）	3人（ 2人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	0人
その他（技術補佐員等）	2人
合 計	10人

## 2 教員の異動状況

- 蓑島 伸生（教授）（H15. 7. 1～現職）
- 大石健太郎（助教）（H14. 7. 1～現職）
- 大坪 正史（助教）（H17. 8. 1～現職）

## 3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成21年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	4編（ 0編）
そのインパクトファクターの合計	15.98
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	2編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	0編（ 0編）
そのインパクトファクターの合計	0.00
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0編（ 0編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0編（ 0編）
そのインパクトファクターの合計	0.00

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet*. 76 (4): 383-91, 2009.

インパクトファクターの小計 [3.21]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Maruyama, S., Cheng, J., Shingaki, S., Tamura, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, Y., Shimizu, N., Saku, T.: Establishment and characterization of pleomorphic adenoma cell systems: an in-vitro demonstration of carcinomas arising secondarily from adenomas in the salivary gland. *BMC Cancer*. 9: 247, 2009.
2. Asakawa, S., Hattori, N., Shimizu, A., Shimizu, Y., Minoshima, S., Mizuno, Y., Shimizu, N.: Analysis of eighteen deletion breakpoints in the parkin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 389(1): 181-6, 2009.
3. Kawamura, T., Ohtsubo, M., Mitsuyama, S., Ohno-Nakamura, S., Shimizu, N., Minoshima, S. KMeyeDB: A Graphical Database of Mutations in Genes That Cause Eye Diseases. *Hum Mutat*. (in press).

インパクトファクターの小計 [12.77]

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: The new version of *MutationView*: Enhanced Search Function and Significant Increase in the Number of Gene Entries. *The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009)*. pP126: 1-2, 2009.
2. Ohishi, K., Hosono, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Regression analysis of swimming time of rats with retinal photic injury using lognormal distribution model. *Photomed. Photobiol*. 31: 21-2, 2009.

#### 4 特許等の出願状況

	平成21年度
特許取得数（出願中含む）	1件

1. ヒトUSH2A突然変異体 中西啓 特願2009-172503 2009年7月23日申請、国内

#### 5 医学研究費取得状況

	平成21年度
(1) 文部科学省科学研究費	4件 (1830万円)

(2) 厚生労働科学研究費	0件 (0万円)
(3) 他政府機関による研究助成	3件 (380万円)
(4) 財団助成金	0件 (0万円)
(5) 受託研究または共同研究	0件 (0万円)
(6) 奨学寄附金その他(民間より)	4件 (115万円)

(1) 文部科学省科学研究費

蓑島伸生 (代表者) 大石健太郎, 大坪正史, 堀田喜裕, 森脇真一 特定領域研究(ゲノム医科学)

(2) 「ゲノム塩基配列の網羅的解析法による疾患遺伝子探索と新規分子生命現象の発掘」 1270万円(計画研究)(継続・平成17~21年度).

大石健太郎 (代表者) 若手研究(B) 「社会の夜型化傾向に着目した加齢黄斑変性症の新たな分子基盤動物モデルによる追究」 180万円(継続・平成20~21年度).

中西 啓 (代表者) 若手研究(B) 「アッシュー症候群本邦症例の遺伝子変異解析:変異病態スペクトラムの構築と臨床への応用」 130万円(継続・平成20~21年度).

大坪正史 (代表者) 細野克博, 大石健太郎 基盤研究(C) 「緑内障の分子機構追究: オプチニューリン結合蛋白の*in utero*機能抑制解析」 250万円(新規・平成21~23年度)

(3) 他政府機関による研究助成

大坪正史 (代表者) 若手研究プロジェクト経費(学内) 「緑内障原因遺伝子オプチニューリンの関与する核内応答とユビキチン化の解析」 30万円, 平成21年度.

中西 啓 (代表者) 若手研究プロジェクト経費(学内) 「臨床応用を目指した本邦アッシュー症候群患者の変異解析: 新たな高頻度変異の探索と臨床症例に影響を与える候補遺伝子の追求」 50万円, 平成21年度.

蓑島伸生 (代表者) 細野克博, 大石健太郎, 尾花 明, 堀田喜裕 学術研究プロジェクト経費(学内) 「加齢黄斑変性責任遺伝子の追究: 動物モデルでの候補遺伝子のクロニングとヒト症例での多型タイプ-発症相関解析」 300万円, 平成21年度.

## 7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	1件	1件
(2) シンポジウム発表数	0件	1件
(3) 学会座長回数	0件	2件
(4) 学会開催回数	0件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	4件
(6) 一般演題発表数	5件	

(1) 国際学会等開催・参加

2) 国際学会・会議等における基調講演・招待講演

1. Minoshima, S.: MutationView. *International Symposium on Applied Genomics 2009 "Medical Genome Science in the Personal Genome Era"* Dec., 2009, Tokyo (Japan).

5) 一般発表

口頭発表

1. Ohishi, K., Hosono, K., Hiramitsu, T., Minoshima, S.: Genetic Analysis of Rat Strain-Dependent Difference in the Susceptibility to Retinal Photic Injury and Mapping Possible Susceptibility Loci. *The 9th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting*. Sep., 2009, Daegu(Korea).
2. Ohtsubo, M., Thanseem, I., Hosono, K., Asaoka, R., Wang, C., Nakanishi, H., Mineta, H., Hotta, Y., Minoshima, S.: Isolation of proteins interacting with optineurin, a product protein of glaucoma-causative gene. *The 9th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium, Hamamatsu Meeting*. Sep., 2009, Daegu(Korea).

ポスター発表

1. Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: A new version of MutationView: Enhanced searching function and significant increase of the number of genes with variation data. *Human Genome Variation Society 2009 (HGVS2009)*, Oct., 2009, Honolulu (USA).
2. Ohtsubo, M., Kawaguchi, K., Adachi, K., Horisawa, T., Shimizu, N., Minoshima, S.: The new version of MutationView : Enhanced Search Function and Significant Increase in the Number of Gene Entries. *20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009) & JSBi2009*. Dec., 2009, Yokohama (Japan).
3. Nakanishi, H., Ohtsubo, M., Iwasaki, S., Hotta, Y., Hosokawa, S., Mizuta, K., Mineta, H., Minoshima, S.: Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Association for Research of Otolaryngology*. Feb., 2010, Anahaim (USA).

(2) 国内学会の開催・参加

2) 学会における特別講演・招待講演

1. 蓑島伸生：ゲノム医療の現状・将来について。第119回遠江医学会 特別講演 2009年11月 (浜松)。

3) シンポジウム発表

1. 蓑島伸生, 大坪正史, 清水信義：ヒト遺伝子多様性データベースの構築の現状. 第16回日本遺伝子診療学会大会 シンポジウム 1「遺伝子診療におけるデータベースの活用とHuman Variome」 2009年7月 (札幌)。

4) 座長をした学会名

1. 蓑島伸生：第16回日本遺伝子診療学会大会 ワークショップ 3「遺伝子診療の基礎と臨床」 W-12～W-16, 2009年7月 (札幌)。
2. 蓑島伸生, 隅山健太：第32回日本分子生物学会年会 ポスターディスカッサー ポスター

セッション「1. 分子構造・生命情報 e プロテオミクス/f 分子進化」 4P-0101～4P-0110, 2009年12月（横浜）.

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

1. 蓑島伸生：日本人類遺伝学会 英文誌編集委員会委員
2. 蓑島伸生：日本遺伝子診療学会 情報委員長
3. 蓑島伸生：日本遺伝子診療学会 理事
4. 蓑島伸生：日本分子生物学会 第32回年会組織委員会委員

## 8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリース数は除く）	0件	1件

(1) 国内の英文雑誌の編集

1. 蓑島伸生: *Journal of Human Genetics*(Editorial Boardメンバー)(2003. 7. 1～)  
[PubMedの登録あり、インパクトファクター：2.43]

(3) 国内外の英文雑誌のレフリース

1. Human Mutation（米国）1回

## 9 共同研究の実施状況

	平成21年度
(1) 国際共同研究	1件
(2) 国内共同研究	4件
(3) 学内共同研究	9件

(1) 国際共同研究

1. David Wilson（ペンシルバニア大学）：画像解析的酸素濃度測定法の研究

(2) 国内共同研究

1. 清水信義（慶應義塾大学医学部分子生物学教室）：ヒト22番染色体のゲノム塩基配列情報を基盤とした網羅的遺伝子同定と新規遺伝子YPEL, DGCR8等の機能追究
2. 清水信義（慶應義塾大学 先端研 GSPセンター）：ヒト疾患関連遺伝子の原因変異及び関連多型に関する総合知識ベースMutationViewの構築／真核生物で高度に保存された新規細胞分裂関連タンパク質YPELファミリーの機能追究／錐体・杆体細胞の培養系確立と網膜疾患の試験管内モデル系構築
3. 森脇真一（大阪医科大学 皮膚科学講座）：遺伝性光線過敏症の原因遺伝子追究とデータベース構築／ミオシリンの機能追究：緑内障原因変異による性状変化とPEDF結合による挙動の解析
4. 加藤幹男（大阪府立大学 理学部 生物科学科）：DNA, クロマチンおよび染色体の構造解析

## 研究

### (3) 学内共同研究

1. 眼科：眼科遺伝性疾患の原因遺伝子追究と突然変異の解析
2. 耳鼻咽喉科：難聴関連疾患の原因遺伝子追求と突然変異の解析（難聴関連疾患）
3. こどものこころの発達研究センター：In vivo Cross-link法によるセロトニントランスポーター結合分子の分離と質量分析計を用いた同定
4. 精神科：CNVマイクロアレイ解析（自閉症遺伝子探索）
5. 解剖学：錐体・杆体細胞の培養系確立と網膜疾患の試験管内モデル系構築
6. 医療情報部：データベースHARMONIEの構築
7. 光量子医学研究センター（細胞イメージング研究分野）：錐体・杆体細胞の培養系確立と網膜疾患の試験管内モデル系構築 / 細胞イメージングの手法を用いるMYOC結合タンパクの性状解析
8. 光量子医学研究センター（ゲノムバイオフォニクス研究分野）：錐体・杆体細胞の培養系確立と網膜疾患の試験管内モデル系構築 / 動物モデルを用いた加齢黄斑変性の罹患感受性候補遺伝子の同定と遺伝子診断への応用
9. 光量子医学研究センター（光化学治療寄附研究部門）：錐体細胞における視物質遺伝子の排他的発現機構の分子遺伝学的解析

## 11 受賞

### (1) 国際的な授賞

1. Wang, C.: 2009 ARVO Santen Pharmaceutical Travel Grant Award by ARVO(The Association for Research in Vision and Ophthalmology) for "Interaction between optineurin and bZIP transcription factor NRL", 2009 May.

### (3) 国内での受賞

1. 大坪正史, 中西伸夫, Thanseem Ismail, 堀田喜裕, 蓑島伸生：「緑内障原因遺伝子ミオシリンの相互作用蛋白の同定：発症を修飾する因子としての可能性」. 第113回日本眼科学会総会 座長賞, 2009年4月.
2. 王 春霞：「新規緑内障原因遺伝子の探索と変異・機能解析」, 財団法人日中医学協会 2008年度共同研究等助成事業 優秀賞, 2009年6月.
3. 中西 啓：「本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析」. 第29回学内研究発表会 優秀研究賞, 2009年12月.
4. 大石健太郎, 細野克博, 堀田喜裕, 平光忠久, 蓑島伸生：「ラット網膜光障害感受性に関わる染色体領域の同定」. 第14回 眼科分子生物学研究会 奨励賞, 2010年2月.

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 緑内障発症機序および新規原因遺伝子の追究

オプチニューリン(OPTN)に関して以下のように研究を進めた。

(1) OPTN相互作用タンパクのスクリーニング

昨年度までのY2H(酵母ハイブリッドスクリーニング法)に加えて、プルダウンMS法による相互作用タンパクのスクリーニングを実施した。ユビキチン(Ub), E3-リガーゼを含むUb化に関するタンパクの一群および、転写調節タンパク, ヒストンおよびRNAに関するタンパク等, 核に局在するものを多く得た。これら同定した相互作用タンパクの遺伝子の翻訳領域全長cDNAのクローニング, 培養細胞におけるOPTNとの共発現および共免疫沈殿による結合の確認をおこなった。また, Truncate OPTN発現ベクターとY2Hの系を用いて, 核移行関連タンパクRANBP(OPTN N端部へ)および, Ub(OPTN C端部411-577aa)との結合に必要なOPTN領域を検討した。RANBPの結合はOPTNのN端部で, Ubの結合はOPTN C端部(411-577aa)で起こることが判明した。

(大坪正史, Thanseem Ismail)

(2) ユビキチンとの相互作用の検討

OPTNと機能の類似性を示すNEMOタンパクとのアミノ酸保存領域のうち, 緑内障患者で検出されている変異H486R周辺領域が, Ubとの結合に必須であることを見出した。また, 相互作用の機能的意味づけを行った。すなわち, シグナル活性化に関するLys63分岐poly-Ubと, タンパク分解に関わるLys48分岐poly-Ubに関して, *in vitro*において, OPTNとの結合を検討した。

(大坪正史)

(3) タンパク品質管理系との関連の検討

SLC4A2とOPTNの共発現による, Vacuole(空胞)様の異常構造の出現を見出した。この現象がタンパク品質管理系の異常に起因する可能性を検討し, OPTNがERAD(小胞体分解)系で機能している可能性を見出した。また, E50K変異ではタンパク品質管理系の破綻によるERストレスの発生が, また, H486R変異については, Ub結合能の低下によるユビキチン化およびプロテアソーム分解系(これらもERAD系に含まれる)の機能低下によるERストレスの増大が起因する可能性を見出している。

(大坪正史)

2. 加齢黄斑変性症責任遺伝子の探求: 動物モデルにおける網膜光傷害重篤度の系統差の利用

ラットに過度の光を照射すると視細胞や網膜色素上皮細胞のアポトーシスを伴う網膜変性が起こる(網膜光障害モデル)。この網膜変性は系統差により発症しやすさに違いが認められる。前年度において, 我々は光障害感受性系統と耐性系統を交配させ, F-1ラットを作製し, さらに10週齢以上に成長したラットに対して過度の光を照射し, 視機能スクリーニングを行った。さらに, 視機能が顕著に障害されたと判断された個体と耐性系統を戻し交配(BC)することでBC-1ラットを作製していた。本年度は, BC-4~BC-6ラットを作製し, 個々のラットが網膜光感受性または耐性であるかについて視機能スクリーニングするまでに至った。現在, これらのラットのゲノムDNAを用いてマイクロサテライト解析することで責任遺伝子を含むゲノム領域の絞り込みを始め, 網膜光障害感受性に関わる責任遺伝子のマッピングにより, 2染色体のそれぞれ10 Mbほどの2領域に

まで絞り込むことに成功している。

(大石健太郎, 細野克博)

### 3. 遺伝性・先天性眼疾患の遺伝子解析

#### (1) 眼白子

眼皮膚白子症と眼白子症の鑑別を要した本学眼科症例について、遺伝子変異検索を行った。眼白子症の原因遺伝子GPR143のエクソン5とイントロン5の境界にスプライス異常(c.658+1G>A)を認めた。父親は正常、母親はheterozygoteであった。遺伝子産物の第5膜貫通部位以降の構造異常によるメラノソーム形成の低下が示唆される。また、すでに報告のある2つの多型も認めた。

(大坪正史)

#### (2) 青錐体一色型色覚

過去に解析した青錐体一色型色覚(BCM)の日本人2家系のうち、家系Wでは赤緑オプシン遺伝子の発現調節領域からコーディング領域にかけて16,803 bpの欠失を検出していた。しかし、家系Nに関しては、少なくとも約40 kbの欠失を伴うこと以外に、変異の詳細は不明であった。今回、家系Nの欠失断端周辺をクローニングするためにウォーキングを行い、得られたクローンの塩基配列を解析したところ、欠失の左端は赤オプシン遺伝子の翻訳開始コドンの上流28,144 bpの位置に存在すること、他方の断端は緑オプシン遺伝子上流に位置すること、欠失長は標準ヒトゲノム塩基配列を基準とすると87,355 bpであることが判明した。さらに、欠失領域中の330 bpと全く同じ配列が欠失断端間に逆位挿入されていた。同挿入配列の一部は反復配列AluSzであった。一方、ハイブリッド遺伝子が2種類存在することも確認した。これにより、BCMの2家系とも、赤緑オプシン遺伝子の発現調節領域が大規模に失われて発症に到ったことが確定できた。

(王春霞\*, 細野克博) \*眼科特任研究員

### 4. 錐体・杆体細胞の培養系確立と網膜疾患の試験管内モデル系構築

錐体、杆体特異的遺伝子のプロモーターをヒトゲノムから単離し、それらの下流にSV40 Large T 抗原遺伝子を連結して発現ベクターを構築した。これらをC57BL/6 Crマウス受精卵に顕微注入しトランスジェニックマウスを作製した。得られたトランスジェニックマウスの眼及び他の組織における癌の発生を観察し、得られた癌組織を摘出して培養を行い、株化細胞の樹立に成功した。現在、得られた培養細胞株の性状解析を遂行している。

(細野克博, 大石健太郎)

### 5. 真核生物で高度に保存された新規細胞分裂関連タンパク質YPELファミリーの機能追究

YPELファミリータンパク(YPEL1~YPEL5)のうち、特にYPEL5は、YPEL1~4 タンパクとは明瞭に異なる細胞内局在を示し、動物細胞に特有の中心体、細胞質分裂に関連することが推測された。YPEL5の機能解析のためにY2H法を行い、YPEL5結合タンパクとしてRanBPM(Ran Binding Protein in Microtubule-organizing center)を同定した。またsiRNAを用いた発現抑制実験に

よりYPEL5が細胞周期の進行に機能していることも明らかにした(Hosono, K., *et al.*, *Genomics*, 2010, in press)。

(細野克博)

#### 6. 本邦におけるアッシャー症候群患者の遺伝子解析

アッシャー症候群は、感音難聴に網膜色素変性症を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。難聴に視覚障害を合併する疾患は約40種類知られているが、本疾患は全患者数の約半数を占める最多の疾患である。現在までに、アッシャー症候群の原因遺伝子として9種類の遺伝子が報告されており、欧米では本疾患患者の遺伝子解析が進んでいるが、日本人症例では未だ報告がない。本年度は、10家系の患者においてアッシャー症候群の原因遺伝子の1つであるUSH2Aの遺伝子解析を行い、8人の患者で11種の新規の遺伝子変異を同定した。さらに、1種の変異(c.8559-2A>G)が4人の患者で同定され、本邦患者における高頻度変異であることを同定し、報告した(Nakanishi, H., *et al. Clin Genet.*, 76(4):383-91, 2009)。

(中西啓)

#### 7. 遺伝子疾患変異データベースの構築と公開

##### (1) 遺伝子疾患症状オンロジーデータベースの構築と公開

MutationView Hamamatsu：遺伝子変異データベースのデータの増補と公開

慶應義塾大学医学部分子生物学教室との共同研究で以前から構築してきた遺伝子変異データベースMutationViewに関して、本学独自の疾患サーバーを構築している。現在の総計データは、公開中である929疾患、403遺伝子、26,977件の変異データ(5,081報の文献から構築)である。本学独自のDisease Serverのデータ増補もおこない、現在までに、皮膚疾患、眼疾患を中心としたRDH5(眼底白点症)、XPB, XPD, XPE, XPF, XPG(色素性乾皮症)、TTDA(トリコチオディストロフィ)、CRYAB, CRYDG, LIM2(白内障)など、29遺伝子、65疾患に達した(URLは、<http://hama-mutv.mpb.hama-med.ac.jp/>)。

(大坪正史, 杉山将隆)

※ 教員以外の研究室メンバー

特任研究員：

細野 克博 (平成21年4月～12月)