

変異ヒト網膜遺伝子4を網膜で発現するトランスジェニックマウスにおける視細胞シナプス伝達障害と網膜変性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4570

変異ヒト網膜遺伝子4を網膜で発現するトランスジェニックマウスにおける視細胞シナプス伝達障害と網膜変性

金沢大学医学部医学科眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

小 林 顕

ヒト網膜遺伝子4 (human retinal gene 4, HRG4) は視細胞に豊富に存在するシナプスタンパク質である。HRG4の機能と病原遺伝子としての可能性を調べることを目的として、晩期発症型錐体桿体ジストロフィーの患者に見られたHRG4変異と同様のアミノ末端側の停止コドンを含むHRG4トランスジーンを作成し、不完全長のHRG4を網膜で発現するトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスは年齢依存性の網膜変性を呈し、この網膜は電子顕微鏡的に著明なシナプス変性および経シナプス変性を呈した。網膜電図においてはa波、c波は正常にもかかわらずb波は減弱し、視細胞からのシナプス伝達が障害されていると推論された。以上の結果より、HRG4カルボキシ末端側3/4の欠失は優性陰性の性質を示し、病原性を有することが判明した。

Key words transgenic mouse, ribbon synapse, human retinal gene 4, retina, photoreceptor

網膜に特異的に発現している遺伝子の分離・解析によって多くの網膜変性疾患の原因遺伝子が発見された^{1)~7)}。しかし現時点においては諸種の遺伝性網膜変性症のうちその原因遺伝子が判明しているのは約4分の1にすぎない。サブトラクティブcDNAクローニング法⁸⁾を用いて網膜に特異的に発現する遺伝子が分離され、網膜変性疾患の新しい原因遺伝子の探索とそれらの遺伝子の網膜における機能が調べられてきた⁹⁾。ヒト網膜遺伝子4 (human retinal gene 4, HRG4)はこの方法によって分離された視細胞に発現している遺伝子である¹⁰⁾。HRG4の発現は調べた14の異なる組織のうち網膜にのみ特異的に発現しており、また視細胞の発達と空間的・時間的相関性を有している¹⁰⁾。240個のアミノ酸よりなるHRG4は、構造的に2つのドメインより成り立つ¹⁰⁾。すなわち、プロリンとグリシンに富みヒトとラットで68%の相同性が見られるアミノ末端側1/4と、100%の相同性を示す残り3/4で構成される¹⁰⁾。当初HRG4はどの塩基配列にも相同性を示さなかったが¹⁰⁾、HRG4の最初の論文の印刷中に、HRG4と57%の相同性を示す新しい線虫遺伝子であるunc-119が、協調性運動障害や化学的感受性の障害による食作用異常などを引き起こす変異遺伝子として報告された¹¹⁾。免疫蛍光染色によると、HRG4は桿体と錐体のシナプスに局在している¹²⁾。このことから、HRG4は視細胞に存在しているシナプスタンパク質であることが判明し、これは初めての視細胞特異的シナプスタンパク質の報告となった¹²⁾。さらにHRG4遺伝子は第17染色体長腕11.2に存在し5つのエクソンとGCボックスを含むプロモーターを有している¹³⁾ことが判明した。本研究では、HRG4の機能と病原遺伝子としての可能性を調べることを目的として、HRG4に相当するマウスの遺伝子

(マウスHRG4相同遺伝子, mouse retinal gene 4, MRG4)に変異を導入したトランスジェニックマウスを作成し、その表現型を解析した。

材料および方法

動物を用いたすべての実験はThe Association for Research in Vision and Ophthalmologyの眼科研究における動物の使用に関する声明に従って行われた。

I. トランスジーンを作成

HRG4が2つのドメインから成り立つことを利用して、そのドメインの接合部に停止コドンを含むマウス-ラット雑種HRG4をトランスジーンとして設計した。MRG4の完全長cDNAが使用出来なかったため、発現されるmRNAの長さを同程度にする必要性からマウス-ラット雑種HRG4を使用した。MRG4をLambda Fix IIマウスゲノミックライブラリーからクローニングし、エキソン1における翻訳開始コドンの僅かに上流からコドン57までをPCRによって増幅し、その際第57コドンが停止コドンへ変わるように人為的な変異を加え、*Pst* I制限酵素切断部位も両端に付加した。このDNA断片を*Pst* Iで切断したラットHRG4に相当するラットの遺伝子 (HRG4相同遺伝子, rat retinal gene 4, RRG4)¹⁰⁾に結合させ、マウス-ラット雑種cDNAを得た。pGEX-GSTベクター (Pharmacia, Uppsala, Sweden)に挿入したマウス-ラット雑種cDNAを大腸菌内で発現させ、不完全長の56アミノ酸よりなるMRG4タンパク質が発現することを確認した。このマウス-ラット雑種cDNAを2.2kbpのウシロドプシンプロモーター¹⁴⁾を含むプラスミド (gBR200-lacF, Donald Zack氏の好意による)に挿入してトランスジーンを作

平成12年10月13日受付, 平成13年2月2日受理

Abbreviations: ERG, electroretinogram; HRG4, human retinal gene 4; RRG4, rat retinal gene 4; MRG4, mouse retinal gene 4

成した。

II. トランスジェニックマウスの作成

トランスジェニックマウスの作成はマイアミ大学トランスジェニック施設において行われた。マウスを使った全ての実験は、動物の保護と使用に関する委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) の承認を得た実験計画書に基づいて行われた。トランスジーンへの注入は1回の実験でおおよそ100個のC57BL6J/SJL系統のマウス受精卵に対して行われ、1つの卵につきDNAを5から10ngずつ注入し、合計4回の実験を行った。独立したトランスジェニックマウスの系統を作成するため、それぞれのトランスジェニックマウスを正常マウス (C57BL6J) と交配し、それらの子孫を正常マウスまたは同一系統内のトランスジェニックマウスと交配させた。また、SJL系統のマウスによりもたらされるrd網膜変性対立遺伝子は、ホモ接合体の場合マウスに網膜変性を起こすため、トランスジーンによって引き起こされた網膜変性症と区別するために交配の過程で除去されたことを確認した。この際、rdマウス網膜変性対立遺伝子の有無の確認はPittlerら¹⁹⁾の報告に従って行った。具体的にはrdマウス網膜変性症の原因遺伝子であるマウスサイクリックGMPホスホジエステラーゼβサブユニット遺伝子の変異部位をPCR増幅し、変異がある場合に新たな制限酵素部位 (*DdeI*) が付け加えられることを利用して、PCR産物を*DdeI*で切断して変異の有無を調べた。

III. トランスジーンのゲノムへの組み込みの検出

1. PCRによる増幅

ウシロドプシンプロモーターからのプライマー (BRP-2, 5'-AGGCCCATCAGCTGAGATGC-3') とトランスジーン内のRRG4 cDNA領域からのプライマー (10R-13, 5'-GAGCACAGGTAGTCGCCGGT-3') からなる二組のプライマーを用いて、マウスの尾部生検により得られた染色体DNAをテンプレートとしてトランスジーンに特異的なDNA配列を検出した。

2. サザンブロットによる解析

10 μgのマウス染色体DNAが尾部生検により得られ、制限酵素の*EcoRI*または*BamHI*によって切断され、電気泳動を行いブロッティングを行った。ブロットは³²PでラベルされたトランスジーンのエコRI切断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

IV. トランスジーンが発現の検出と定量

1. RT-PCR

マウス網膜におけるトランスジーンが発現を確認するため、トランスジーン転写産物をRT-PCR法により検出できるプライマーを作成した。一方のプライマー (TGRT-2, 5'-CTCAGAAGCATCCCCGGGTT-3') は転写開始部位より後のウシロドプシンプロモーター領域にあり、もう一方のプライマー (10R-13) は前述のようにRRG4cDNA中にある。トランスジーン転写産物が存在すれば、これらプライマーセットにより239bpのPCR産物が生じる。RT-PCRにより内因性のMRG4転写産物を検出するため、翻訳開始コドンより始まるプライマー (MRG4F-1, 5'-GAAGGTGAAGAAAGCGCGC-3') と、エクソン1と2をまたぐよう設計したMRG4転写産物の塩基配列よりなるプライマー (MRG4B-1, 5'-AGGGGAGCACAGGTAGTCAC-3') を作成した。内因性MRG4の転写産物が存在すれば、これらプライマーセットにより234bpのPCR産物が生じる。1 μgのマ

ウス網膜のRNAを使い、逆転写反応を行う場合、または行わない場合の両方でPCR増幅を行った。トランスジーンプラスミドは234bpのPCR産物を生じる陽性コントロールとして用いられた。

2. 半定量逆転写PCR

1 μgのトランスジェニックマウスの網膜RNA (全網膜または上、下、鼻側、耳側に4分割した網膜) を用いて逆転写反応を行い、反応産物は12等分から18等分された。それぞれの反応産物はトランスジェニックマウス網膜におけるトランスジーンと内因性のMRG4を検出するプライマーを用いて異なるサイクル (26, 28, 30, 32, 34, 36サイクル) でPCRで増幅した。βアクチンはRNAから逆転写PCRにより増幅され、実験に用いたRNAの質と量を確認するために用いられた。逆転写PCRによる産物はデンシトメトリーによって解析され、その結果から増殖曲線を作成し直線的増加期におけるトランスジーンと内因性MRG4転写産物のRNA量の比較に用いられた。

V. 眼底検査

マウスはケタミン (11mg/kg)、キシラジン (14mg/kg)、ウレタン (500mg/kg) の混合物0.1ml筋注により麻酔され、虹彩は5%フェニレフリンと1%アトロピンの点眼により散瞳した。

A



B

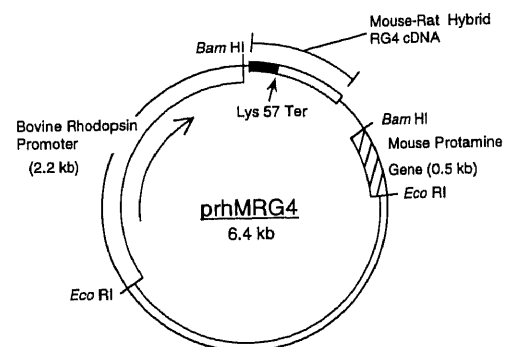


Fig. 1. The putative two-domain structure of HRG4 and the transgene construct. (A) A schematic diagram of HRG4 is shown with the proximal 1/4 that is rich in proline and glycine and moderately conserved between human and rat (67% identical, white area). The distal 3/4 that is perfectly conserved between the two species (100%, slashed area). Overall homology between human and rat is 92%. (B) The structure of the transgene (prhMRG4) containing the 2.2 kbp bovine rhodopsin promoter upstream of the hybrid mouse-rat HRG4 cDNA with a termination codon at codon 57 and the mouse protamine sequence containing an intron and a polyA addition site is shown.

眼底写真の撮影はRC2眼底カメラ (Kowa, 東京) を用いて行った。

Ⅵ. 網膜電図検査 (electroretinogram, ERG)

マウスの ERG の記録方法は前報¹⁶⁾に準じた。要約すると、

マウスに前記の如く麻酔を施した後散瞳し、角膜上に置いた銀-塩化銀電極と頭部皮下に刺入した30ゲージ針を介してERGを導出した。首の皮下に接地電極を置いた。ERG電位は0Hzから10kHz (直流増幅) または0.1Hzから10kHz (交流増幅) の条件

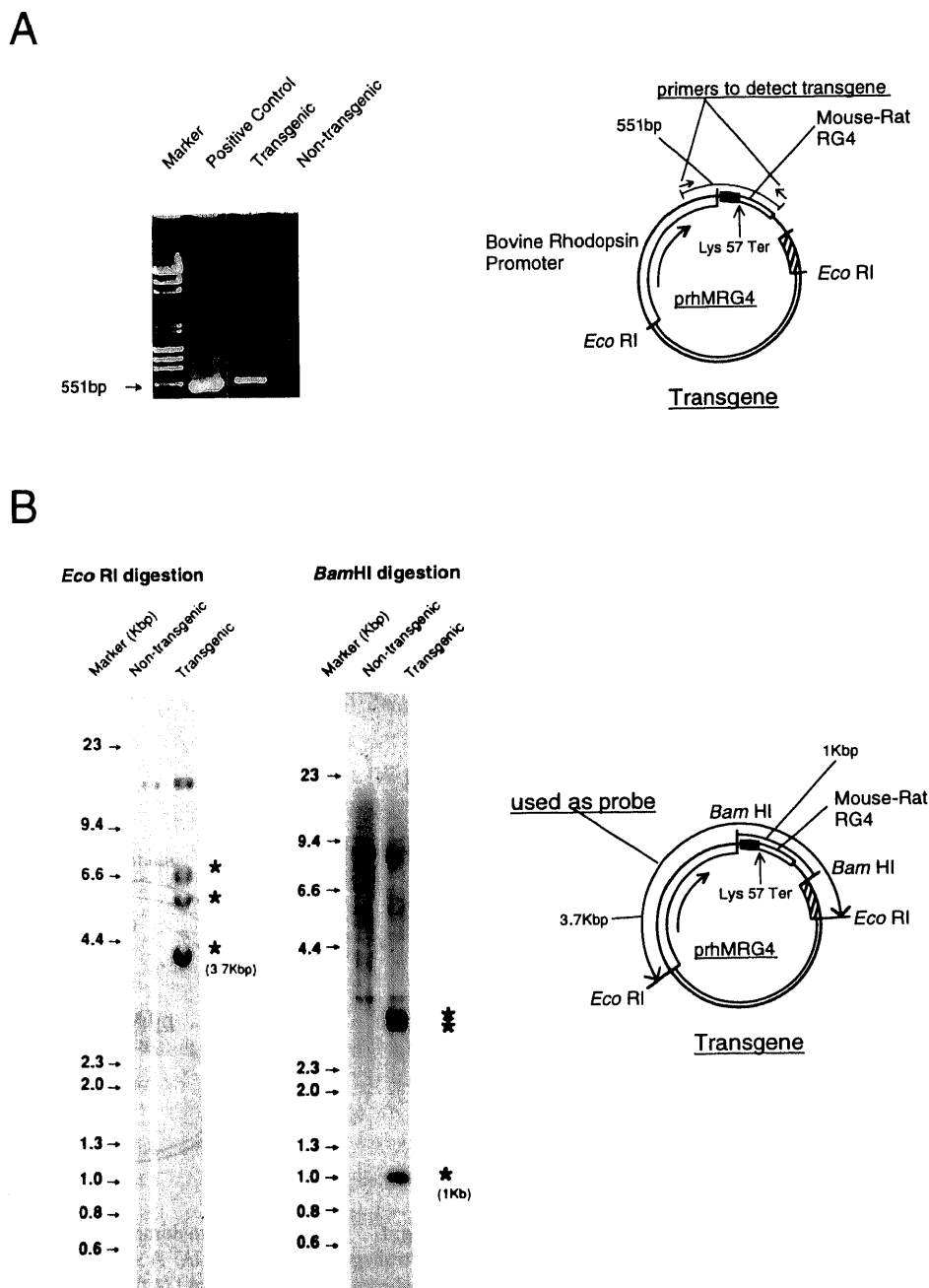


Fig. 2. Integration of the transgene in HRG4 transgenic mice.

(A) The presence of integrated transgene in the mouse genome is demonstrated by PCR-amplification of a 551 bp transgene-specific product from genomic DNA, using primers from the bovine rhodopsin promoter and rat HRG4 cDNA sequence contained in the transgene. The transgene plasmid was used as the PCR amplification template for positive control. (B) The presence of integrated transgene in the mouse genome is demonstrated by genomic Southern blot hybridization, using the partial transgene plasmid as probe. As shown in the diagram, *Eco* RI or *Bam* HI digestion of genomic DNA would result in the production of a 3.7 or 1.0 kbp transgene-specific fragment, respectively, if the transgene is integrated. The presence of these and other transgene-specific fragments (★) is shown in addition to the endogenous mouse HRG4 gene fragments in the transgenic mouse.

Table 1. Summary of HRG4 transgenic production

DNA injection ^{a)}	Pups	Transgenics	Designation (Line #)	Progeny ^{b)}	Transgenics in progeny
1st	20	2	452	188	94
			456 (sterile)	0	0
2nd	26	0			
3rd	32	2	914	45	25
			919 (sterile)	0	0
4th	17	4	1439	38	4
			1441	26	9
			1446	25	15
			1453	15	3

^{a)} Approximately 100 eggs were injected each time. Progeny^{b)} includes mating of transgenic male and female and of transgenics with normal control. Transgenic offsprings of mating with normal controls were mated with other transgenics thereafter.

で1/2振幅バンドパスセットを持った前増幅装置 (A39, Tektronix, Beaverton, USA) に取り込まれた。前増幅装置からの出力はオシロスコープ上に表示され、信号平均化プログラム (M100, Biopac, Goleta, USA) に取り込まれた。ERG用刺激光源 (クオーツハロゲンランプ, 150W) からの光はガラス繊維束の先端に集光させ、ガラス繊維束の他端は角膜前面より2mmに設置された。刺激光強度は角膜の位置に置かれた光度計 (UDT Instruments, Orland, USA) により測定された。最高刺激光強度は 1.59×10^3 cd/m² であり、刺激光強度を調節するために光路に中性フィルター (neutral density filter, ND) を置いた。刺激光強度を0.5logずつ増加させてERGを記録した。弱刺激光 (ND=6.0から3.5) では2個のERG応答を加算平均し、強刺激 (ND=3.0から0) では加算平均しなかった。刺激光の反復頻度は0.2Hzであり、持続時間は250ミリ秒であった。振幅の有意差の検定はStudentのt検定によった。

Ⅶ. 光学顕微鏡・電子顕微鏡

年齢を一致させたトランスジェニックマウスと非トランスジェニック対照マウスについて、生後9ヶ月から30ヶ月の間に網膜の組織学的検査を行った。マウスを二酸化炭素によって安楽死させた後に両眼球を摘出し、2.0%のパラホルムアルデヒドと2.5%のグルタルアルデヒドを含んだ0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) に浸した。眼球をパラフィン包埋した後HE染色を行い、光学顕微鏡検査による組織学的検査を行った。電子顕微鏡検査をするために、トランスジェニックマウス網膜の病変部とそれに対応する対照マウスの網膜を、上記の如く固定した後、1% OsO₄により後固定し、アルコールによって脱水を行い標準的手法にしたがってエポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛によって染色され、電子顕微鏡 (JEM-100 CXII, 日本電子, 東京) による観察を行った。

成 績

Ⅰ. トランスジーン的设计

通常トランスジェニックモデルは、変異を持つトランスジーンによる優性陰性効果 (変異産物発現により、正常産物の発現・機能を抑制すること) や機能の獲得などを調べることに用いられる。このような効果は、正常な内因性遺伝子産物が存在

するにもかかわらず、表現型として観察することが出来なければならない。HRG4が優性陰性効果を持つ可能性を考慮する時、この遺伝子が2つのドメインから成り立つことが以下に示す仮説を導き、トランスジェニックモデルの利用を可能にした (図1A)。タンパク質構造のうちプロリンに富む領域は他のタンパク質と反応する領域として知られている¹⁷⁾。そのことよりHRG4のアミノ末端のプロリンに富む領域は他のタンパク質との結合部位である可能性がある。また完全に保存されているカルボキシ末端側の構造は、このタンパク質の機能を実行する"効果器" かもしれない。その仮説が正しければ、アミノ末端側領域のタンパク質のみを発現させれば、標的タンパク質に結合はするが機能しないはずである。さらに標的タンパク質がこの様に競合阻害され得るならば、正常HRG4タンパク質は標的タンパク質との相互作用を失い機能を発揮することができず全体としてHRG4タンパク質の不活化につながるであろう。このHRG4不活化がシナプスの機能に著明な障害を与えれば、トランスジェニックモデルにおいて病気の表現型が見られるはずである。網膜変性症患者におけるHRG4変異の予備的スクリーニングの最中に、HRG4の2つのドメインのちょうど間である57コドンにヘテロ接合体の停止コドンを持つ患者がみつかり (未発表)、この仮説は強力な傍証を得た。このため筆者は、HRG4の最初の56アミノ酸のみからなり、不完全長のHRG4を発現するトランスジーンを作成した (図1B)。マウスHRG4相同遺伝子 (mouse retinal gene 4, MRG4) をクローニングし、翻訳開始コドンを含むエキソン1の塩基配列を決定した。MRG4のエキソン1のうち、第57コドンのリジンが停止コドンに人為的に変異しているものをPCRにより作成し、MRG4 cDNAにアミノ酸の読み取り枠が一致するように挿入し結合した。こうしてできたマウス-ラット雑種cDNAを2.2kbpのウシロドブシンプロモーター¹⁴⁾を含むgBR200-lacFベクターに挿入し、トランスジーン (prhMRG4) を作成した (図1B)。正常HRG4のプロモーターはGCボックスを含んでおり、これは視細胞以外の組織での発現を示唆しているが¹³⁾、今回のトランスジェニックモデルでは網膜における変異HRG4の影響を調べるのが目的のためロドブシンプロモーターが使用された。このトランスジーンは網膜変性症の患者で見出されたのと同じく、プロリンに富む最初の56

アミノ酸よりなる短いタンパク質を発現する。このことは、トランスジーンを原核生物用発現ベクターの pGEX (Pharmacia) に挿入し、そのベクターが短い MRG4 タンパク質を *in vitro* で発現することで確認した。

II. トランスジェニックマウスの作成

トランスジーン DNA をマウス受精卵に 100 個づつ合計で 4 回注入した。4 回の注入でそれぞれ 20, 26, 32, 17 匹のマウスが誕生した。トランスジェニックマウス、非トランスジェニック

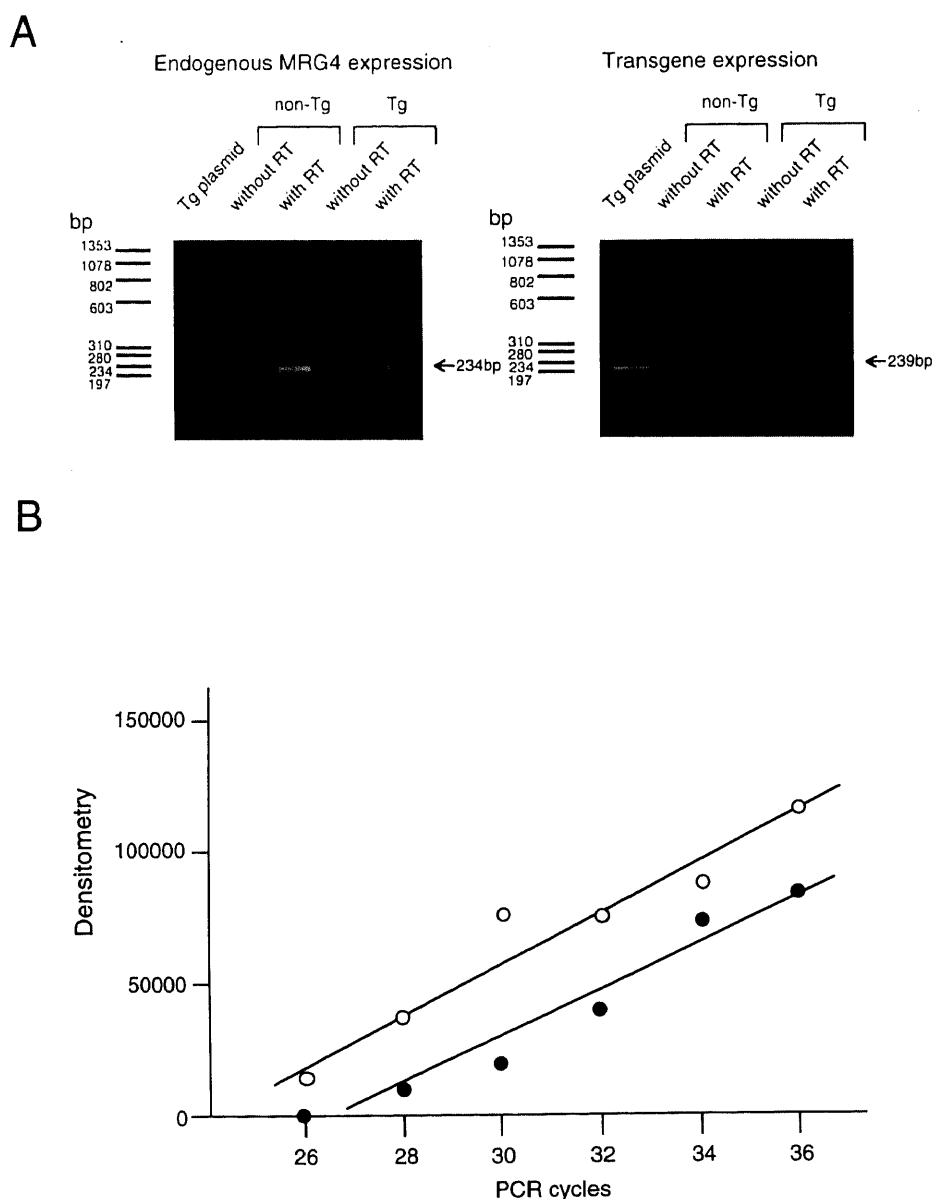


Fig. 3. Expression of the transgene in HRG4 transgenic mouse retina. (A) The presence of a 239 bp RT-PCR amplification product, obtainable only from the transgene transcript, is demonstrated in transgenic but not non-transgenic mouse retinas. A 234 bp RT-PCR amplification product from the endogenous mouse HRG4 gene transcript is shown for both types of mouse retina. The absence of a product without RT signifies the absence of genomic DNA contamination in the RNA used for the analysis. (B) A semi-quantitative RT-PCR analysis comparing the levels of the transgene (●) and the endogenous gene transcript (○) is shown. RNA from a transgenic retina was reverse-transcribed, divided into equal portions, and subjected to PCR amplification for a varying number of cycles to obtain transgene- and endogenous gene-specific products. The kinetics of the PCR amplification is shown, and a comparison in the linear phase of the reaction indicates that the transgene is expressed at 60 % of the level of the endogenous gene. The same analysis was also performed on RNA isolated from the four quadrants of the transgenic retina, to determine the regional differences in the transgene expression. This analysis demonstrated highest expression in the superior temporal region (data not shown, see text).

マウスの識別は、尾部生検により得られた染色体DNAを分析することにより行われた。染色体DNAの分析の方法としてはトランスジェニックマウスに特異的な塩基配列をPCRにて増幅し、トランスジェニックマウスのみにもみられる551bpのPCR産物を検出する方法と(図2A)、トランスジェニックマウスに特異的な塩基配列をプローブとして行うサザンブロット法(図2B)の二つの方法で行った。サザンブロット法では*EcoRI*または*BamHI*で切断された内因性のMRG4染色体バンド以外に、トランスジェニックマウスでは挿入されたトランスジーンに特異的なバンド(★)が見られた(図2B)。4つのグループのうちそれぞれ2, 0, 2, 4匹のトランスジェニックマウスを得た(表1)。独立したトランスジェニックマウスの系統を作成するため、それぞれのトランスジェニックマウスを正常マウス(C57BL6J)

と交配し、それらの子孫を正常マウスまたは同一系統内のトランスジェニックマウスと交配させた。また、SJL系統のマウスによりもたらされるrd網膜変性対立遺伝子は、ホモ接合体の場合マウスに網膜変性を起こし、トランスジーンによって引き起こされた網膜変性症と区別できない可能性がある。そのため、全ての系統のトランスジェニックマウスにおけるrd網膜変性遺伝子型のヘテロ接合体化または完全な除去をPittlerら¹⁰⁾の方法で確認し、rd網膜変性遺伝子によって引き起こされる網膜変性症の可能性を除外した。得られた8系統のうち、2系統のトランスジェニックマウス(No.456, No.919)は不妊であり繁殖させられなかった。繁殖可能な6系統のうち、5系統はわずかのトランスジェニックマウスの子孫しか得られなかったが、452番マウスの系統(No.452系統)では繁殖性が良く、94匹ものト

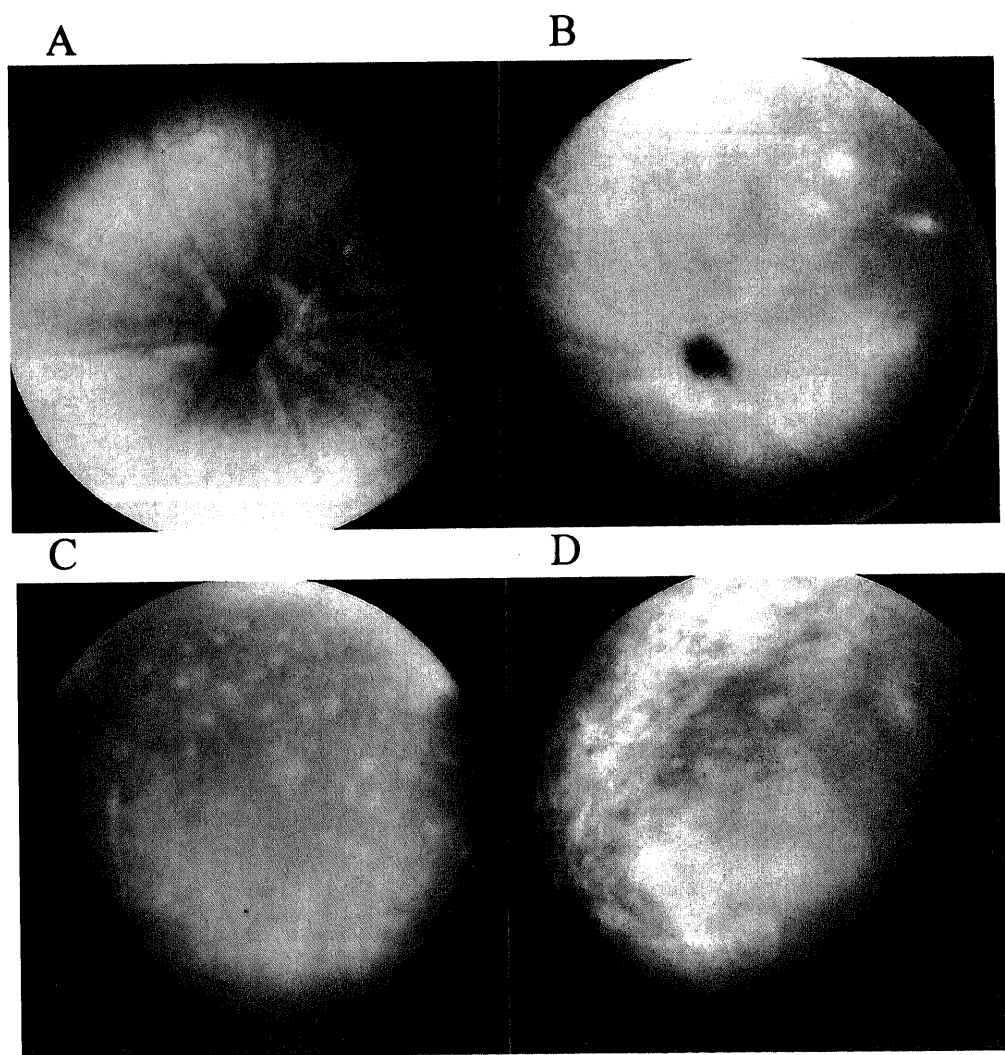


Fig. 4. Fundus abnormalities in HRG4 transgenic mice. Fundus photographs show the range of fundus lesions observed at different ages. At 9 months of age, a few white spots are often seen in the superior temporal quadrant of transgenic mice (B), which are not observed in age-matched normal control mice (A). More significant pathologic changes, consisting of multiple white lesions (C, 23 months) or outright degeneration and atrophy (D, 24 months) are observed in older transgenic mice.

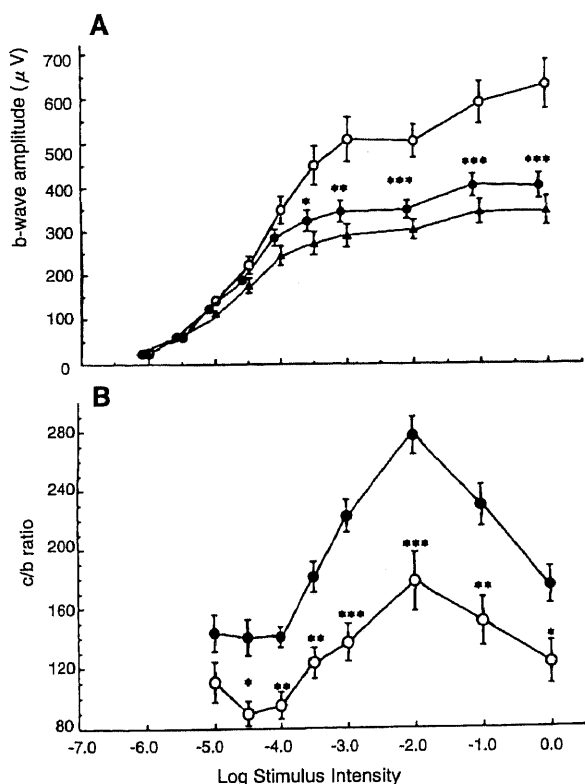


Fig. 5. Electrophoretography of HRG4 transgenic mice. (A) The b-wave amplitude is shown as function of the log of stimulus intensity. The age of the transgenics examined ranged from 9 to 24 months ($\bullet$, $n = 34$), and age-matched normals ($\bigcirc$, $n = 14$) were used as controls. The transgenic mice show a decrease in the b-wave amplitude, statistically significant at stimulus intensities above -4.0 log units. The transgenic mice, older than one year ($\blacktriangle$, $n = 23$), show a further decrease in the b-wave amplitude. (B) The ratio of the c-wave amplitude to the b-wave amplitude in the transgenics ($\bullet$, $n = 15$) and age-matched controls ($\bigcirc$, $n = 7$) is shown. The ratio is significantly increased in the transgenics due to a decrease in the b-wave in the presence of an intact c-wave. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Mean $\pm$ standard deviation.

ランスジェニックマウスを作り出したため、本研究ではこの系統のマウスを主に分析した。

Ⅲ. トランスジェニックマウスの解析

1. トランスジェン発現の証拠

No.452系統のトランスジェニックマウスの網膜におけるトランスジェンの発現は逆転写PCRによって確認された。すなわちNo.452系統のトランスジェニックマウスの網膜よりRNAを抽出後に逆転写酵素反応を行い、トランスジェンに特異的な転写産物についてPCRによる増幅を行った(図3)。逆転写酵素反応によってのみ得られる239bpのトランスジェン特異的な産物により、トランスジェニックマウスにおける挿入されたトランスジェンの発現を確認した(図3A)。逆転写反応なしでPCR増幅産物が見られなかったことより、RNAへのゲノムDNAの混入がないことが確かめられた。トランスジェンの優性陰性効果

の獲得とその評価に、トランスジェンの発現量の定量は重要なため、PCRを用いて内因性の正常MRG4遺伝子とトランスジェンの発現量の半定量的解析を行った(図3B)。No.452系統のトランスジェニックマウスの網膜より得られたRNAは逆転写酵素反応の後二分し、一つは内因性遺伝子のMRG4よりの転写産物を示すため、そしてもう一つはトランスジェンよりの転写産物を示すためにPCRによる増幅を行った。PCRによる増幅の経過は時間を追って調べられ、内因性MRG4遺伝子とトランスジェンの転写産物量を比較するため増殖曲線が描かれた(図3B)。その結果、トランスジェンの発現量は内因性MRG4遺伝子の発現量の約60%であることが判明した。トランスジェニックマウスの異なった網膜部位におけるトランスジェンの発現量を調べるため、トランスジェニックマウスの網膜を4分割し、同様の半定量的逆転写PCRを内因性MRG4、トランスジェン、アクチンの転写産物に対してそれぞれ行った。 β アクチンで補正されたトランスジェンからのPCR産物量をデンストメトリーにより比較したところ、外側上方で最も多くこれを1とすると、外側下方で0.72、鼻側上方で0.37、鼻側下方で0であった。トランスジェンの内因性MRG4に対する割合は、鼻側上方で1.1、外側下方で0.74、外側上方で0.6、鼻側下方で0であり、4象限の平均が61%となり、上述した網膜全体からの結果と一致した。この結果はトランスジェンの過剰発現はないことを示しており、またこのトランスジェンがロドプシンのトランスジェンで示されたように、部位によって様々な異なった量の発現をしていることがわかった。

2. 眼底検査

トランスジェニックマウスの眼底は倒像検眼鏡によって観察され、RC2眼底カメラを用いて眼底写真を撮影した。眼底の観察を行った25匹のトランスジェニックマウスのうち、No.452系統のトランスジェニックマウスは19匹で、残りのマウスはその他の5系統からのマウスであった。それらの全ての眼底において、わずかな限局した白点や白線病変から多数の斑点、明らかな網膜変性像まで様々な網膜異常を示した(図4B-D)。網膜の限局した白点病変は通常上方耳側網膜に認められ、網膜変性病変は高齢トランスジェニックマウスにより多く認められた。9匹の正常マウスまたはトランスジェニック系統内の非トランスジェニックマウス(6-22月齢)では眼底に異常は認めなかった(図4A)。

3. 網膜電図(electroretinogram, ERG)

No.452系統の34匹のトランスジェニックマウスにおいて、年齢を一致させた正常対照マウスと比べてa波、c波は正常にもかかわらず(未発表)、著明なb波の減弱を認めた($p < 0.001$)(図5A)。b波の減弱は刺激光を強くするほど明らかになり正常マウスでの平均値に比べて64%から76%に減弱していた。眼底の異常の程度がトランスジェニックマウスの年齢と相関しているように見えたことから、生後1年未満と1年以上の2群にわけて、トランスジェニックマウスのERGを年齢を対応させた正常対照マウスと比較検討した。高齢群のトランスジェニックマウスではa波は正常にもかかわらず、b波はより著明に減弱し(図5A)、ERG異常の年齢依存性が明らかになった。また正常対照マウスに比べてトランスジェニックマウスではc波振幅/b波振幅比が高いことが判明した(図5B)。他のトランスジェニックマウスの系統でのERGの統計学的検討は、繁殖数が不十分のため施行出来なかったが、少数の検査可能なトランス

ジェニックマウスにおいてERG検査を施行した。例えば不妊であったNo.919のマウスでも同様な著明なb波の減弱が見られた。他の系統からの若いトランスジェニックマウス(No.914系統から5匹, No.1441系統から4匹, No.1446系統から5匹)のERGでは著明な異常は見られなかった。

4. 組織病理

1) 光学顕微鏡

トランスジェニックマウスの網膜では、年齢、眼底所見、ERG所見の重症度などに応じて様々な程度の病理学的な変化が観察された。わずかなb波異常や眼底病変を示す若いトランスジェニックマウスでは年齢を一致させた正常対照マウスに比べて、外顆粒層の配列が不規則で散漫となり、多くの視細胞の核が内節や外網状層へと遊走しているように見えた(図6A,B)。眼底に多くの斑点状病変や変性病変を示し、b波の著明な減弱を伴う高齢のトランスジェニックマウスでは網膜の外顆粒層は

年齢を一致させた対照マウスの持つ10層の核に比べて4から5層程度に菲薄化し、明瞭な変性像を呈した。視細胞外層から広がった強い空胞化が、内顆粒層の著明な数の減少を伴いながら神経節細胞までも到達しており、生き延びていた多くの内顆粒層の細胞は核濃縮を伴うアポトーシスの様相を呈した(図6C, E)。HRG4の局在部位である外網状層内では¹²⁵I光学顕微鏡で広範囲な空胞化が見られた。

2) 電子顕微鏡

トランスジェニックマウスにおいて光学顕微鏡的に広範な空胞化を示した外網状層では、電子顕微鏡的には視細胞のリボンシナプス領域が多くの破片を含む空胞に完全に置換されていた(図7B)。残存した桿体シナプス球状体の外観は、水平細胞か双極細胞かの判別が不能な巨大化した樹状突起の存在で大きく歪められていた(図7B)。また異常な球状体のシナプス前領域の様々な部位は、直径15から20nmの円形のオスミウム酸親和性

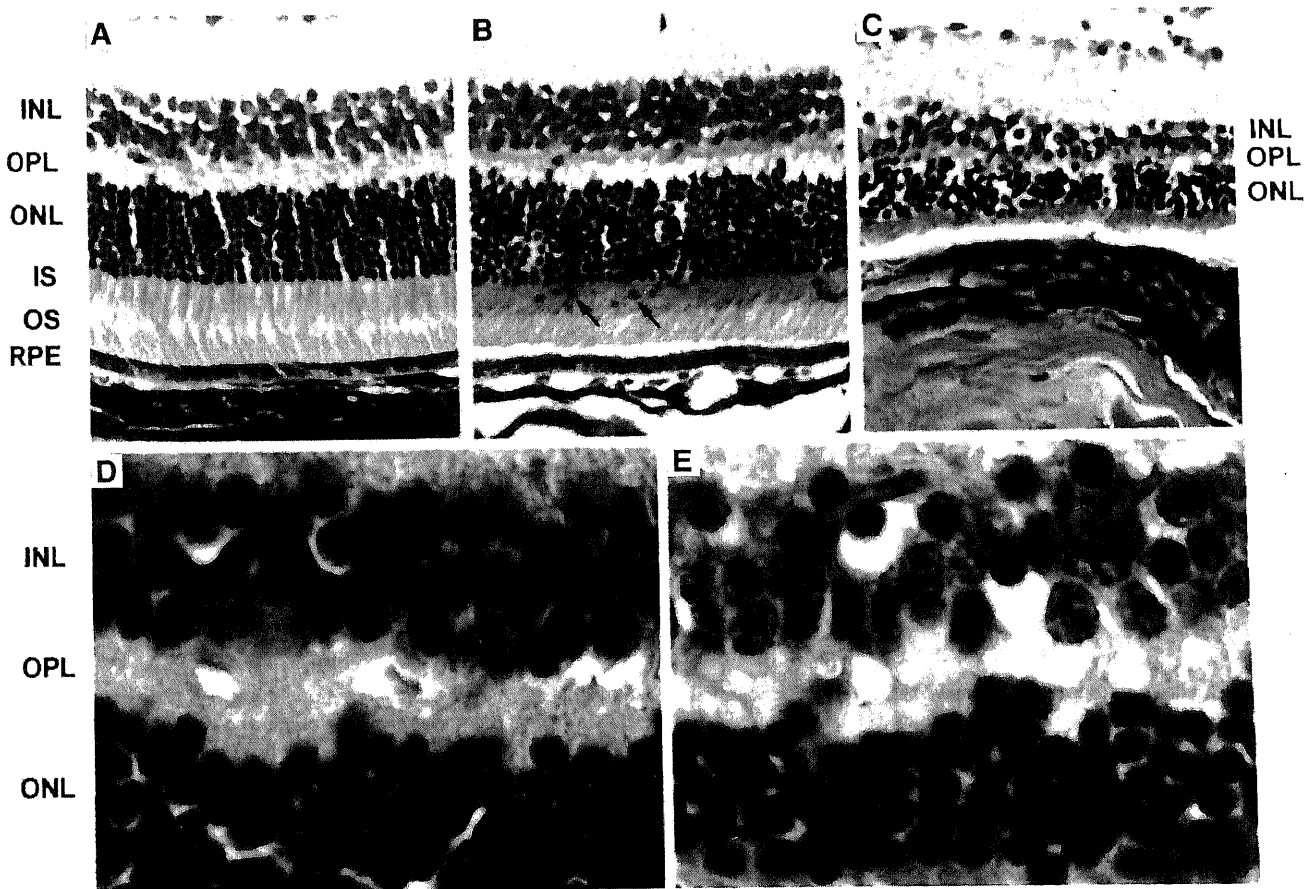


Fig. 6. Light microscopic findings of HRG4 transgenic mouse retinas. A variety of retinal structural findings is observed in transgenic mice of different ages. Compared to the intact retina of a normal 12-month-old mouse (A), a 9-month-old transgenic retina revealed a disorganized, loosely packed outer nuclear layer with some migrating photoreceptor nuclei (arrows) (B). (C) A 24-month-old transgenic retina showing clear evidence of photoreceptor degeneration, with the outer nuclear layer consisting of only 4-5 rows of nuclei instead of the usual 10-12. There were also reduction in the number of inner nuclear layer cells and extensive vacuolation of the entire inner retina. (E) At higher magnification, extensive vacuolation was evident in the outer plexiform layer, the site of the photoreceptor ribbon synapses. Numerous inner nuclear layer cells showed evidence of apoptosis with pyknotic nuclei, which are not seen in the normal mouse retina of this age (D). INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; IS, inner segment; OS, outer segment; RPE, retinal pigment epithelium.

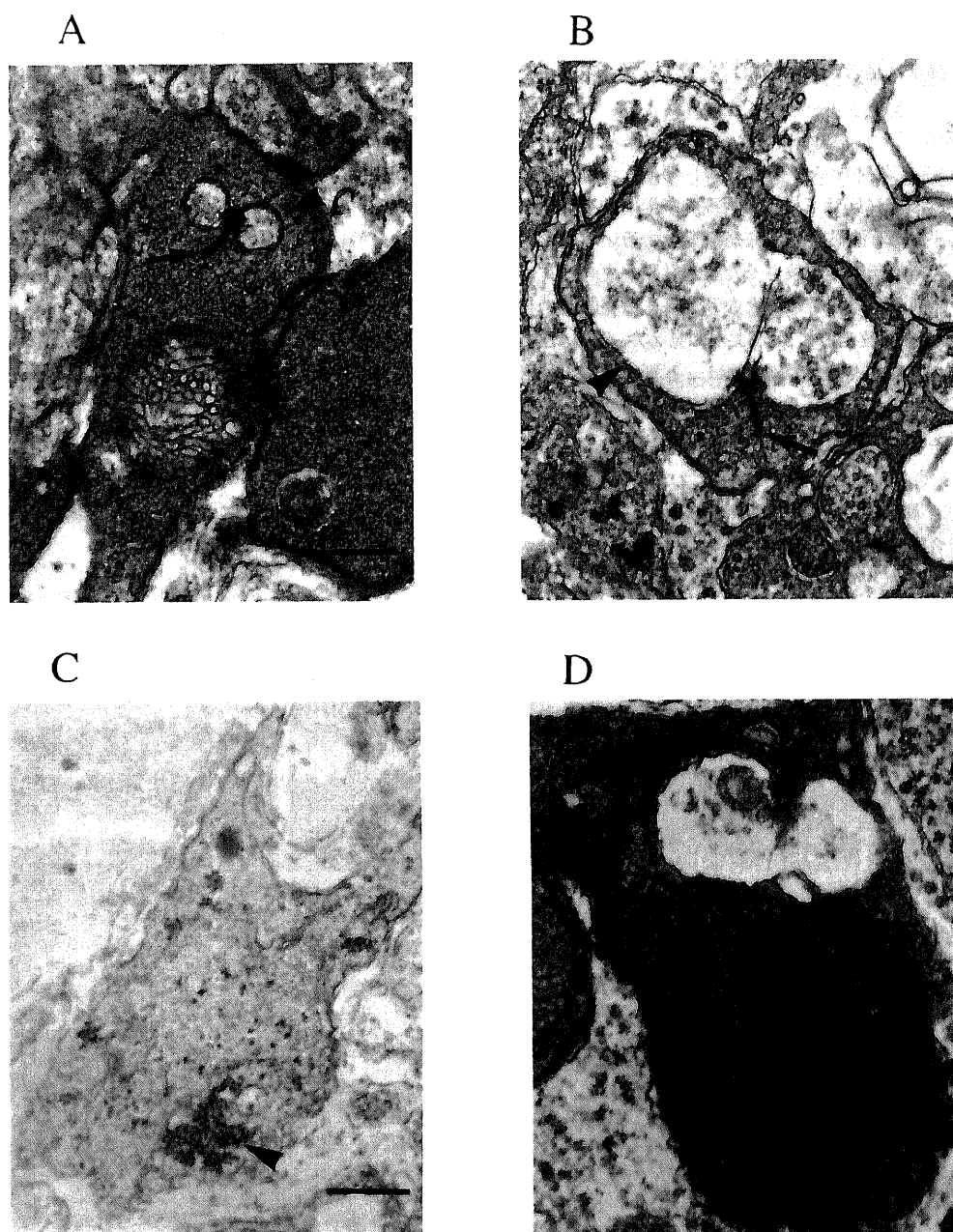


Fig. 7. Electron microscopic findings of HRG4 transgenic retina. The outer plexiform layer containing the photoreceptor ribbon synapses was examined in 24-month-old transgenic (B-D) and normal (A) mice. (A) A typical rod photoreceptor ribbon synapse (spherule) with the electron dense ribbon (arrow) and horizontal cell dendritic process (arrowhead) in the normal mouse retina (Bar = 0.5 μ m). (B) An abnormal ribbon synapse containing the ribbon (arrow) and grossly swollen "watery" dendritic processes containing flocculent debris (arrowhead) in the transgenic retina (same magnification as A). (C) An abnormal spherule containing clusters of 15-20 nm circular osmiophilic structures in the presynaptic space (Bar = 0.2 μ m). (D) Abnormal spherule containing watery dendritic processes and osmiophilic structures almost replacing the presynaptic space, consistent with "dark degeneration" of the terminal (same magnification as C).

の破片を含んでおり (図7C), いくつかのシナプスではこれらの破片がほぼ全てのシナプス前領域を埋め尽くしているように見えた (図7D). これらの変化は黒色変性 (dark degeneration) とよばれるニューロンの高密度変化に対応し, 変性過程の所見に一致しており, 主に視細胞リボンシナプスに障害が生じていた.

考 察

現在までに30種類以上もの異なったタンパク質が, シナプス小胞の生産やそれからの神経伝達物質の放出を連続的に可能にするためのシナプス小胞サイクルに関係していることが明らかにされた¹⁷⁾. HRG4は当教室の Higashide ら¹⁰⁾によりクロー

ニングされたタンパク質であり、視細胞のリボンシナプスに豊富に存在するという点¹²⁾で従来のシナプスタンパク質にない特徴を有する。HRG4の正確な機能は未だ明らかではないが、本研究における電子顕微鏡所見はHRG4と視細胞のシナプス小胞との関連を示唆しており、シナプス小胞の機能に関与した役割が考えられる¹²⁾。変異HRG4を網膜に発現するトランスジェニックマウスではERGのa波およびc波は異常を示さずに進行性のb波の減弱を示し、c波振幅/b波振幅の比は増大した。これらの本報知見とERG諸波の主発生母体(a波、b波、c波でそれぞれ視細胞、網膜の後シナプス細胞、網膜色素上皮細胞)^{19) 20)}とを鑑案すれば、本マウスにおいては視細胞から二次ニューロンへのシナプスに伝達障害があると推論される。また本マウスは著明なシナプス変性を伴う網膜変性像を呈したことより、HRG4のシナプス機能における重要性が推論される。このような観点より、ノックアウトモデルで異常な表現型を示す他のシナプスタンパク質^{21) 22)}とHRG4は似ているといえる。シナプタグミン (synaptotagmin) のノックアウトマウスは、カルシウム依存性の同位相神経伝達物質放出を欠如し、哺乳不全により早期に死亡する²¹⁾。munc-18はシンタキシン (syntaxin) と反応し、シナプス小胞の接合において重要な役割を果たしているが、そのノックアウトマウスは致死性であることが示されている¹⁸⁾。驚いたことに、動物モデルにおける多くのシナプス関連タンパクの不活化は表現型の異常はないか、あっても軽微にとどまる。このような例としてシナプシン I, II^{22) 23)}、シナプトフィジン²⁴⁾、Rab3A²⁵⁾などがある。これを説明する一つの推論として機能的な冗長性 (redundancy) があるためであると考えられている。変異HRG4の有害な作用を明らかに補うタンパク質がないと考えられるので、HRG4の機能は視細胞リボンシナプスにおいて特徴的と思われる。これは現在のところHRG4に関連したファミリータンパク質が検出されていないことと一致する。もちろんHRG4の視細胞リボンシナプスにおける特徴的で重要な役割の直接的な確認は、HRG4のノックアウトによる病変の検証に待たねばならない。

HRG4トランスジェニックマウスの視細胞リボンシナプスで観察された著明な変性像は変異HRG4の発現部位と一致した。シナプスにおける病的変化として、空胞化、柔毛状物質を含み膨張した樹状突起の水腫性変化、15から20nmのオスミウム酸親和性顆粒の蓄積などが見られたが、これらは過去に報告^{26) 27)}された他の神経変性の所見と一致する。例えば同様の病的変化はアカゲザルにおける眼球摘出後の外側膝状核の神経終末、ウサギやラットの臭覚粘膜除去後の臭球などにおいて観察される^{26) 27)}。これらの変化は黒色変性と呼ばれるニューロンの高電子密度変化を来し、これはHRG4トランスジェニックマウスのいくつかの視細胞リボンシナプス終末において明らかであった。トランスジェニックマウスの網膜の電子顕微鏡的所見において印象的であったのは、恐らく視細胞のシナプス変性の結果として起こった経シナプス変性 (transsynaptic degeneration) の程度である。経シナプス変性は、ブルキンエ細胞変性マウス²⁸⁾の深部大脳皮質核、眼球摘出したアカゲザルの外側膝状核²⁹⁾、ウサギとラットの臭覚粘膜除去後の臭球²⁷⁾などにおいて、前方向、後方向性に見られる広く知られた現象である。視神経細胞層の消失は、恐らくは経シナプス変性によると思われ、網膜外層の障害である錐体桿体ジストロフィーや桿体錐体ジストロフィーでも報告されている²⁹⁾。トランスジェニックマウスの網膜にお

いて観察された網膜の微細構造の異常はこれらの報告に矛盾しない。これらの異常を惹起する機序に関する仮説の一つとして、シナプス後のニューロンを障害する神経活性物質が変性したニューロン終末から放出されていることが考えられ、この仮説の検証にはトランスジェニックモデルを使用した研究が待たれる。

本研究で作成したトランスジェニックモデルは、プロリンに富む推定上のタンパク結合領域のみを含む不完全長のHRG4タンパク質を発現することによる優性陰性効果を目指して設計された。優性陰性効果を達成するために不完全長のタンパク質を発現させた同様なトランスジェニックモデルとしては、cAMP応答因子結合タンパク質結合タンパク質 (cAMP response element-binding protein-binding protein, CBP) の不完全長なタンパク質を発現させたRubinstein-Taybi症候群の臨床症状を呈するマウスモデル³⁰⁾やカルボキシ末端の欠損したp65/RelAタンパク質をアデノウイルスを介して内皮細胞で発現させ炎症性物質前駆体の発現を抑制するモデル³¹⁾などがある。HRG4トランスジェンによりカルボキシ末端側のタンパクを欠く不完全長のタンパク質を網膜において発現することが可能である。このトランスジェンはトランスジェニックマウスの網膜の部位によって内在性のHRG4タンパク質の60%から110%のレベルで発現されているが(未発表)、HRG4の標的タンパク質との推定上の相互作用の直接的な証拠は酵母ツーハイブリッドシステム^{32) 33)}などの方法による標的タンパク質の同定が必要であろう。免疫細胞学的電子顕微鏡検査によるHRG4の局在から示唆されるシナプス小胞との関連性¹²⁾を考慮すると、HRG4はシナプス小胞関連タンパク質との相互作用を有する可能性がある。しかしHRG4が網膜の水溶性分画に存在し、膜への挿入に必要な典型的な疎水性の構造を欠くこと^{10) 12)}より、HRG4のシナプス小胞との相互作用はシナプス小胞膜との直接的な反応ではないであろう。HRG4と相互作用するタンパク質は最近報告された19個のリボンシナプス関連タンパク質³⁴⁾の一つかもしれないし、または新しい他のシナプスタンパク質かもしれない。標的タンパク質がいずれであるにせよ、正常内在性遺伝子の60%の発現率を示す不完全長のアミノ末端側HRG4の発現は、視細胞の活性化や過分極する能力は障害せずに、ERGのb波の減弱に反映されるように視細胞シナプスでの信号伝達の緩やかな進行性の障害を来す。トランスジェニックマウスの網膜において正常内在性遺伝子の発現があることを考慮すると、この障害を来す病理学的な機序としては、不完全長HRG4タンパク質による正常HRG4タンパク質の機能の障害、すなわち優性陰性効果が考えられる。この優性陰性効果は推定上の標的タンパク質との競合によるものかもしれないし、不完全長HRG4タンパク質による正常HRG4タンパク質に対する直接的な障害などのような異なった機序によるものかもしれない。また完全な正常内在性HRG4がトランスジェニックマウスで発現されているにもかかわらず、網膜変性が惹起されたことを考えると、病理学的な機序は正常HRG4遺伝子の不足によるものとは考えにくい。このような変異HRG4の病態生理学的機序に関する仮説の検証や、それに引き続いて起こる網膜変性症の発症機序などの研究にこのトランスジェニックモデルが有用である。

HRG4と疾患との関連は、線虫において化学受容感覚の欠損に基づく協調性運動障害や食作用異常を遺伝子変異により引き起こす線虫遺伝子のunc-119とHRG4が相同体であることより、

最初に示唆された¹¹⁾。眼球の無い線虫は周りの環境を化学受容器官により感じ取る。このように線虫において化学受容の機能に重要であるタンパク質が、哺乳類において基本的な感覚器(視覚器)において重要なタンパク質と相同体を持つことは充分考えられることである。疾患との関連は、網膜変性症患者におけるHRG4の変異の予備的スクリーニングによって強力な傍証を得た。すなわち49歳の晩期発症型錐体桿体ジストロフィーの症例において、HRG4の2つのドメインの境界である第57コドンにヘテロ接合体の停止コドンを持つことが発見された(Richard G. Weleber, 私信)。これと同じ部位に変異を持つ28歳の娘は、母(患者)と同様に、若い頃より光視症を訴えたが明らかなERG異常は示さなかった(Richard G. Weleber, 私信)。これは恐らくこの疾患が晩期発症であり(40歳代後半)、娘が比較的若いためと考えられる。これらの症例に見られる変異をマウスに導入することにより、アミノ末端側のプロリンに富む領域のみよりなる不完全長のHRG4タンパク質がトランスジェニックマウスの網膜において発現するはずである。しかし、この症例では正常遺伝子と変異遺伝子の発現比率が1対1であるのに対して、トランスジェニックマウスでは上記のように、変異遺伝子の発現は正常遺伝子の平均60%であった。この事実にもかかわらず、この患者(母)とトランスジェニックマウスモデルにおける網膜病変にはいくつかの同じ特徴が認められた。上記の2名の患者において見られる年齢依存性の病態は、1年齢以上のトランスジェニックマウスと全部のトランスジェニックマウスまたは1年齢未満のマウスとを比較すると、高齢群のマウスの方がより強いERG異常を示した本報の結果に良く符合する。トランスジェニックマウスにおいて、明らかな網膜変性所見は少なくとも“中年”である1歳を超えないと現れず、組織学的にも年齢依存性が明らかである。また、HRG4は錐体と桿体の両方の視細胞シナプスに発現する¹⁰⁾¹²⁾。このことから、錐体と桿体の両方で発現されるrds/peripherin^{35)~38)}の場合のように、HRG4が障害された場合にも錐体優位障害(macular pattern dystrophy)と桿体優位障害(網膜色素変性症)との両方の特徴が現れる可能性が高い。実際に、上記の患者のうち母親は現在のところ錐体桿体ジストロフィーを呈しており、これはHRG4が錐体と桿体の両方に発現すること¹⁰⁾¹²⁾に符合する。さらに視細胞シナプス神経伝達の障害に矛盾しないERGのb波の著明な減弱は、上記の患者(母)とトランスジェニックモデルの両方で認められた。患者(母)で見られたa波の中等度の減弱は、著明な網膜機能障害を伴う高齢のトランスジェニックマウスに見られたような、おそらく著明な数の変性視細胞を伴う錐体桿体ジストロフィーの進行した病態のためと考えられる。これらの患者とマウスとの類似点を勘案すると、トランスジェニックマウスモデルは網膜変性疾患の解析に有用であろう。

本研究では全部で8系統のトランスジェニックマウスが作られたが、2系統の不妊と5系統の繁殖不全のため、No.452の系統だけが完全な分析対象になった。不妊の系統の一つであったNo.917はERGのb波の著明な減少と網膜における組織異常を示した(未発表)。No.452系統以外の5つの系統でもまた、経過とともに明らかな進行性の眼底異常を示し、これは年齢依存性の病理を示した。これらの著明なERGの異常はこれらの5系統では検出できなかったが、検査したほとんどのマウスは1歳以下であり、年齢依存性のERG異常はおそらくまだ出現していなかったであろう。ERG異常が初期に検出困難であったもう

一つの因子として、網膜病変所見が限局性または点状であったことが考えられる。すなわち網膜における初期の病的変化は網膜の上外側領域にほぼ限局し、広範囲の網膜からの集積電位を測定するERGでは限局した網膜領域の異常を検出出来なかった可能性がある。本報のトランスジェニックマウスにおける網膜病変の限局性については、トランスジーンを駆動するために使用したプロモーターが網膜の上外側により発現しやすい傾向を持つウシロドプシンプロモーターの性質と一致する¹⁴⁾。これはトランスジェニックマウスの網膜の上外側領域でのトランスジーンが発現が最も多いことによって確認された。したがってHRG4自身のプロモーターを使って作成したトランスジェニックマウスは、この変異のより生理的な表現型を生じることが期待される。

HRG4の正確な機能はまだ明らかではない。しかし視細胞シナプス伝達におけるHRG4の重要性や病原遺伝子としての可能性は、今回作成したトランスジェニックモデルの表現型や錐体桿体ジストロフィーの患者におけるHRG4の変異の存在、線虫におけるHRG4の相同体遺伝子変異株の表現型¹¹⁾などによって十分に示された。その正確な機能は酵母ツーハイブリッドシステム³²⁾³³⁾などを使った方法による標的タンパク質の同定によって、さらに明らかになると期待される。HRG4は視細胞リボンシナプスにおいて豊富に特異的に存在する視細胞シナプスタンパク質を代表する最初の例であり、本研究によりHRG4のカルボキシ末端側3/4の欠失は優性陰性の性質を示し、病原性を有することが判明した。

結 論

1. HRG4の機能と病原遺伝子としての可能性を調べることを目的として、晩期発症型錐体桿体ジストロフィーの患者に見られたHRG4変異と同様の停止コドンを含むHRG4トランスジーンを作成し、不完全長のHRG4を網膜で発現するトランスジェニックマウスを作成した。

2. トランスジェニックマウスは年齢依存性の網膜変性を呈し、この網膜は電子顕微鏡的に著明なシナプス変性および経シナプス変性を伴っていた。網膜電図においてはa波、c波は正常にもかかわらずb波は減弱し、視細胞からのシナプス伝達が障害されると推論された。

3. 本研究により、HRG4カルボキシ末端側3/4の欠失は優性陰性の性質を示し、病原性を有することが判明した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜りました恩師の河崎一夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また多大な御教示を賜りましたMiami大学Bascom Palmer眼研究所のInana博士および金沢大学眼科学教室の東出朋巳博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Nathans J, Hogness DS. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4851-4855, 1984
- 2) Inana G, Totsuka S, Dougherty T, Redmond M, Nagle J, Shiono T, Ohura T, Kominami E, Katunuma N. Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1203-1207, 1986
- 3) Yamaki K, Tsuda M, Shinohara T. The sequence of human

- retinal S-antigen reveals similarities with α -transducin. *FEBS Lett* 234: 39, 1988
- 4) 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
 - 5) 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 disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron* 8: 1171-1184, 1992
 - 6) 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
 - 7) Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Paslier DL, Frezal J, Dufier JL, Pittler S, Munnish A, Kaplan J. Retina-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 14: 461-464, 1996
 - 8) Murakami A, Yajima T, Inana G. Isolation of human retinal genes: recoverin cDNA and gene. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 234-244, 1992
 - 9) Inana G, Murakami A, Sakuma H, Higashide T, Yajima Y, McLaren MJ. Isolation of candidate genes for retinal degenerations. In MM La Vail, JF Hollyfield, RE Anderson (eds), *Degenerative Retinal Diseases*, p205-226, Plenum Press, New York, 1997
 - 10) Higashide T, Murakami A, McLaren MJ, Inana G. Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor protein. *J Biol Chem* 271: 1797-1804, 1996
 - 11) Maduro M, Pilgrim D. Identification and cloning of unc-119, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics* 141: 977-988, 1995
 - 12) Higashide T, McLaren MJ, and Inana G: Localization of HRG4, a photoreceptor protein homologous to Unc-119, in ribbon synapse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 690-698, 1998
 - 13) Higashide T, Inana G. Characterization of the gene for HRG4 (UNC119), a novel photoreceptor synaptic protein homologous to UNC-119. *Genomics* 57: 446-450, 1999
 - 14) Zack DJ, Bennett J, Wang Y, Davenport C, Klaunberg B, Gearhart J, and Nathans J. Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-lacZ fusion gene expression in transgenic mouse retinas. *Neuron* 6: 187-199, 1991
 - 15) Pittler SJ, and Baehr W. Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase β -subunit gene of the rd mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8322-8326, 1991
 - 16) Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N, Goletz P, Ma J-X, Crouch RK, Pfeifer K. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20: 344-351, 1998
 - 17) Williamson MP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 297: 249-260, 1994
 - 18) Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653, 1995
 - 19) Brown KT. The electroretinogram: It's components and their origin. *Vision Res* 8: 633-677, 1968
 - 20) 米村大蔵, 河崎一夫. 臨床網膜電図学, 医学書院, 東京, 1985
 - 21) Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC. Synaptotagmin I: A major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-727, 1994
 - 22) Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC. Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75: 661-670, 1993
 - 23) Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375: 488-493, 1995
 - 24) McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Sudhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4760-4764, 1996
 - 25) Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, Camill PD, Hammer RE, Sudhof TC. The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369: 493-497, 1994
 - 26) Ghatti B, Horoupian DS, Wisniewski HM. Transsynaptic response of the lateral geniculate nucleus and the pattern of degeneration of the nerve terminals in the rhesus monkey after eye enucleation. *Brain Res* 45: 31-48, 1972
 - 27) Pinching AJ, Powell TPS. Ultrastructural features of transneuronal cell degeneration in the olfactory system. *J Cell Sci* 8: 253-287, 1971
 - 28) Triarhou LC, Norton J, Ghatti B. Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res* 66: 577-588, 1987
 - 29) Newman NM, Stevens RA, Heckenlively JR. Nerve fibre layer loss in diseases of the outer retinal layer. *Br J Ophthalmol* 71: 21-26, 1987
 - 30) Oike Y, Hata A, Mamiya T, Kaname T, Noda Y, Suzuki M, Yaue H, Nabeshima T, Araki K, Yamamura K. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: Implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet* 8: 387-396, 1999
 - 31) Soares MP, Muniappan A, Kaczmarek E, Koziak K, Wrighton CJ, Steinhauslin F, Ferran C, Winkler H, Bach FH, Anrather J. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J Immunol* 161: 4572-4582, 1998
 - 32) Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246, 1989
 - 33) Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9578-9782, 1991

- 34) von Kreigstein K, Schmitz F, Link E, Sudhof TC. Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *Eur J Neurosci* 11: 1335-1348, 1999
- 35) Farrar GJ, Kenna P, Jordan SA, Kumar-Singh R, Humphries MM, Sharp EM, Sheils DM, Humphries P. A three-base-pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 478-480, 1991
- 36) Kajiwaru K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354: 480-482, 1991
- 37) Nichols BE, Sheffield VC, Vandenberg K, Drack AV, Kimura AE, Stone EM. Butterfly-shaped pigment dystrophy of the fovea caused by a point mutation in codon 167 of the RDS gene. *Nat Genet* 3: 202-207, 1993
- 38) Wells J, Wroblewski J, Keen J, Inglehearn C, Jubb C, Eckstein A, Jay M, Arden G, Bhattacharya S, Fitzke F, Bird A. Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nat Genet* 3: 213-218, 1993

Defective Photoreceptor Synaptic Transmission and Retinal Degeneration in Transgenic Mice Expressing a Truncated Human Retinal Gene 4 Akira Kobayashi. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 〒920-8640 — J. Jusen Med Soc., **110**, 136 — 148 (2001)

Key Words transgenic mouse, ribbon synapse, human retinal gene 4, retina, photoreceptor

Abstract:

The human retinal gene 4 (HRG4) is a photoreceptor-enriched protein localized in the rod and cone ribbon synapses. The purpose of the present study is to demonstrate the pathogenicity of HRG4 when it is mutated. Transgenic mice were constructed expressing in their retinas a truncated HRG4 protein caused by a premature termination codon identical to that found in a patient with late-onset cone-rod dystrophy. The transgenic mice developed age-dependent fundus lesions, accompanied by electroretinographic defects in photoreceptor synaptic transmission (the depressed b-wave), despite normal photoactivation in the photoreceptors (the intact a- and c-waves), and retinal degeneration with marked synaptic and transsynaptic degeneration. Thus HRG4, the only synaptic protein known to be highly enriched in photoreceptor ribbon synapses, is demonstrated to be pathogenic when c-terminal 3/4 is deleted.