氏　　名（本　籍）	岡　田　　明　（兵庫県）
学 位 の 種 類	博　士　（医　学）
学 位 記 番 号	博　士　第４８２号
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
学位授与年月日	平成１６年　９月　８日
学 位 論 文 題 目	Functional role of hCNGB3 in regulation of human cone CNG channel: effect of rod monochromacy-associated mutations in hCNGB3 on channel function （ヒト錐体細胞 cyclic GMP 依存性カチオンチャネル機能の電気生理学的検討）
審　査　委　員	主査　教授　　陣　内　皓之祐
	副査　教授　　堀　池　喜八郎
	副査　教授　　岡　村　富　夫

別紙様式3

論 文 内 容 要 旨

*整理番号	485	氏　名 (ふりがな)	岡田　明 (おかだ　あきら)
学位論文題目	**Functional role of the hCNGB3 in regulation of human cone CNG channel: effect of rod monochromacy-associated mutations in hCNGB3 on channel function** (ヒト錐体細胞 cyclic GMP 依存性カチオンチャネル機能の電気生理学的検討)		

[目的]

ヒト錐体細胞の cyclic GMP (cGMP) によって制御される陽イオンチャネルは，CNGA3 (α) サブユニット，CNGB3 (β) サブユニットによって構成されるヘテロ４量体である (CNG; cyclic nucleotide gated channels). これらをコードする遺伝子の変異は杆体一色型色覚の原因になると考えられている．ヨーロッパ人やピンゲラップ島人の患者においては多くの変異 (α で 46ヶ所，β で 6ヶ所) が既に報告されている．また，申請者も日本人の杆体一色型色覚４例を解析し，β サブユニットの遺伝子で新たな変異 (1897 A>G (Asp 633 Gly)) を見出した．しかし，それらの変異の機能解析を行った報告は今までにない．

本研究はこの新たな変異を含めた既報の β サブユニットの変異の機能的意義を明らかにするため，ヒト網膜から cDNA を単離し，培養細胞にタンパクを発現させ，変異体チャネルの電気生理学的特性を検討するものである．既報の変異としては (1304C>T (Ser 435 Phe)) について解析を行った．

[方法]

日本人の杆体一色型色覚患者４名における CNGA3 (α) および CNGB3 (β) の全エキソン及びエキソン/イントロン境界の塩基配列を PCRとダイレクトシーケンシング法によって解析した．

ヒト網膜から単離した α および β サブユニットの complementary DNA (cDNA，以下それぞれ α および β) を，発現ベクター (pCR 3.1) に繋ぎ，human embryonic kidney (HEK) 293細胞に，α 単独あるいは β 単独で，または α と β を同時 (以下 α/β) にトランスフェクトし，α サブユニット単独，β サブユニット単独を発現，あるいは α/β サブユニットを共発現させ，パッチクランプ法 (inside-out mode) を用いて cGMP 誘発性電流の電気生理学的ならびに薬理学的特性について解析した．

また，変異を導入した cDNA (β m1 (Ser 435 Phe)，β m2 (Asp 633 Gly)) も HEK293細胞にトランスフェクトし，変異 β サブユニットを発現させ，パッチクランプ法 により同様に電流記録を行った．

[結果]

1. 日本人の杆体一色型色覚患者４名においては既報の変異はいずれも認められなかった．しかし，β サブユニットの遺伝子に新たな変異 (1897 A>G (Asp 633 Gly)) を見出した．

(備考)　１．論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、２千字程度でタイプ等で印字すること。
２．※印の欄には記入しないこと。

2. α単独あるいは α/β を導入した HEK293細胞において，cGMP によって活性化される電流を記録した．一方，β単独導入細胞においてはこのような電流は誘発されなかった ($n = 30$ cells).
3. α単独および α/β を導入したいずれの細胞においても cGMPは濃度依存性に電流を活性化し，$K_{1/2}$ (半最大活性化濃度) はそれぞれ 11.1±1.0 μM, 26.2±1.9 μMであった．β が α に会合すると cGMPに対する感受性が下がることが示唆された (P<0.001).
4. β変異導入細胞における $K_{1/2}$ は α/βm1 で 12.0±2.1 μM, α/βm2 では 11.1±1.0 μMであった．変異 β が α に会合すると cGMP に対する感受性が α/β よりも上がることが示唆された (P<0.001).
5. α単独ならびに α/β 導入細胞において，cGMP誘発性電流の細胞外 Ca^{2+} に対する感受性に差異が認められた．過分極側での内向き電流に対する Ca^{2+} の抑制効果については，α/β 導入細胞は α 単独導入細胞に対してよりも少なかった (P<0.01). β変異導入細胞においても，内向き電流に対する細胞外 Ca^{2+} の抑制効果は α 単独導入細胞に対してよりも少なかった (α/βm1; P<0.01, α/βm2; P<0.05). これらのことは，内向き電流に対する Ca^{2+} の抑制効果を軽減するという野性型 β の性質が βm1, βm2 でも保持されていることを示している．またこのことは同時に βm1, βm2 がともに α と会合していることも示している．またこの会合は，免疫沈降反応により確認することが出来た．
6. さらに，変異 β の当該アミノ酸を変更した cDNAを導入した細胞の $K_{1/2}$ は α/βm1-Ala (Ser 435 Ala) で 19.6±3.0 μM, α/βm2-Thr (Asp 633 Thr) では 24.8±1.7 μM であった．細胞外 Ca^{2+} による内向き電流抑制の軽減は正常および変異 β と同程度であった．

[考察]

α/βm1 において cGMP に対する感受性が α/β よりも上がることは，チャネルの gating hinge から 5番目にあたる position 435 のアミノ酸が，かさ高い芳香環を持つものに変わったことにより不安定になったためと考えられる．実際，α/βm1-Ala では cGMP に対する感受性が下がった．また，α/βm2-Thr で cGMP に対する感受性が下がったことから α/βm2 における cGMP 感受性変化にはアミノ酸の非極性化が関与している可能性が考えられる．

内向き電流に対する細胞外 Ca^{2+} の抑制効果の差異は α の pore loop にのみ存在する負荷電イオンのグルタミン酸により説明できると考えられる．

[結論]

ヒト錐体細胞の cGMP によって制御される陽イオンチャネルにおいて，CNGB3 (β) サブユニットは cGMP および細胞外 Ca^{2+} 感受性において重要な調節的役割を果たしていると考えられた．

βサブユニットの変異は，チャネルの cGMP に対する感受性を下げることが出来ないため，光子受容が起こり錐体内 cGMP 濃度が低下してもチャネルは閉じず過分極応答が発生しない結果，光受容のシグナルが上位に伝達されず，杆体一色型色覚を引き起こしているものと考えられる．

別紙様式8

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	485	氏名	岡田　明

（学位論文審査の結果の要旨）

ヒト錐体細胞のcGMP依存性陽イオンチャネルは，*CNGA3*と*CNGB3*がそれぞれコードするα,β subunitによって構成されている．本研究では，まず杆体一色型色覚症例における両遺伝子の解析を行い，*CNGB3*に新たな変異(D633G)を見出した．次にヒト網膜から得られたcDNAに同変異と既報の変異(S435F)を導入し，培養細胞に発現させパッチクランプ法を適用してチャネルの電気生理学的特性について検討した．

その結果，cGMPによる50%活性化濃度がα/正常βチャネルはαチャネルより約2.5倍高いことが判明した．これは，αに正常βが会合してcGMP感受性を低下させるという正常βの機能を明らかにしたものである．２つの変異はいずれもcGMP感受性を低下させることができなかった．これは，錐体において光子受容により細胞内cGMP濃度が低下してもチャネルが閉じない可能性を示唆している．

このように本論文は，杆体一色型色覚の原因遺伝子を解析し，新規の変異を見出し，さらにその変異を電気生理学的に機能解析したものである．これらの成果は杆体一色型色覚の発症機構について重要な示唆を与えたものであり，博士（医学）の学位論文に値するものである．

（平成16年9月1日）