

## 遺伝子解析による先天色覚異常の診断

山出新一\*・上山久雄\*\*・田辺詔子\*\*\*

深見嘉一郎\*\*\*・市川一夫\*\*\*・橘 俣子\*\*\*

\* 滋賀医科大学 眼科学教室・\*\* 同 生化学第2教室

〒520-2192 大津市瀬田月輪町

\*\*\* 視覚研究所

〒456-0032 名古屋市熱田区三本松町12-23

(1999年3月29日受付, 1999年5月10日受理)

## Genetic Diagnosis of Congenital Color Vision Deficiencies

Shinichi Yamade\*, Hisao Ueyama\*\*, Shoko Tanabe\*\*\*

Kaitiro Hukami\*\*\*, Kazuo Ichikawa\*\*\* and Machiko Tachibana\*\*\*

\*Department of Ophthalmology and \*\*Medical Biochemistry, Shiga University of Medical Science  
Seta, Ohtsu 520-2192, Japan

\*\*\*Institute of Vision Science

12-33 Sanbonmatu-cho, Atsuta-ku, Nagoya 456-0032, Japan

(received 29 March 1999; accepted 10 May 1999)

**Background and Purpose:** Recent advancements in molecular biology have revealed genetic aspects of congenital color vision deficiencies (CVD). In many cases of CVD the genotypes and phenotypes coincide with each other. But it is also known that there are cases in which the genotype alone can not explain the clinical diagnosis of CVD. So it is still unclear whether routine gene analysis is useful as a clinical diagnostic tool for this anomaly. We evaluated the clinical usefulness of genetic analysis for congenital red-green color vision deficiencies.

**Methods:** The base sequences of red-green pigment genes of 42 CVD cases and 36 color normal males were determined using PCR and a DNA sequencer (ABI PRISM 300 Genetic Analyzer). The CVD cases were diagnosed using clinical color vision tests including an anomaloscope. The color normal subjects were tested with Ishihara plates and, if needed, with an anomaloscope.

**Results:** All normals had two types of exon 5, i.e., both red and green pigment genes. Thirty three (79%) of 42 CVD cases had only one type of exon 5, but 9 cases had both red and green types as did the normals. They could not be differentiated from the normals by exon 5 analysis. Of the 33 cases who had only one type of exon 5, three dichromats (1P and 2D) had two kinds of green pigment gene and one anomalous trichromats (PA) had only one type of red pigment gene. In all 13 cases (31%) had some inconsistencies between the genotype and the phenotype.

**Conclusion:** Pigment gene analysis alone could not fully differentiate CVD from normals.

## 1. はじめに

Nathans ら<sup>1)</sup>により錐体視色素遺伝子の塩基配列が明らかにされ、続けて先天色覚異常の遺伝子レベルでの機序も解明された<sup>2)</sup>。以来この分野の研究が進み、現在では遺伝子を調べれば先天色覚異常の診断は可能であり、さらに程度の判定まで可能であるとする報告<sup>3)</sup>も出ている。確かに赤、緑視色素の遺伝子については、塩基配列やその変異、雑種遺伝子の存在などについてはほぼ調べ尽くされたといえるが、これらを発現するメカニズムがまだまだ十分に解明されたとはいえない。従来<sup>4)</sup>の報告の中にも、赤緑どちらの遺伝子も持っている色覚異常例<sup>5)</sup>や、雑種遺伝子を持つ正常例<sup>6)</sup>などが存在するとされており、遺伝子型と臨床診断との整合性にはまだまだ疑問が残されている。したがって、遺伝子の解析、遺伝子による診断が日々の臨床の場で、個々の色覚異常例の診断や程度の判定にどの程度の役に立つものかはいまだ不明である。この点を明らかにするためわれわれは先天色覚異常の遺伝子解析をルーチンに行うことにした。まだ症例数が少なく何らかの結論を出せる段階では

ないが、現状を報告する。

## 2. 方法

対象は先天色覚異常 42 例および正常色覚の 36 例である。色覚精密検査を希望して受診した先天色覚異常者に対し臨床的諸検査、すなわち各種の色覚検査表、パネル D-15 テスト、ランタンテスト、アノマロスコープによる検査を行い、その後色覚や色覚異常についての説明、どう対処すべきか、職業選択上の注意点などについて説明した後、遺伝子検査のための血液サンプルを採取した。診療行為外であり、研究目的であることをよく説明し、同意を得たうえで採血を行った。42 例の内訳は、第 1 色盲 5 例、第 1 色弱 8 例、第 2 色盲 14 例、第 2 色弱 15 例である。また正常色覚の 36 例についても同様の同意を得たうえで資料血液を採取した。正常者の色覚は原則として石原表にて確認し、必要に応じてアノマロスコープを含む他の諸検査を行った。

試料血液から DNA を抽出し、これを Neitz らの報告<sup>5)</sup>に従って表 1 のようなプライマーを用いて PCR を行った。PCR で増幅すれば用

表 2 今回用いたプライマー

primer 11	5' TCGGTGCTGCAGCCGAGCTCC	intron 1
primer 12	5' TCGAGCCTGGGCCCGACTGGC	intron 2
primer 1	5' GGATCACAGGTCTCTGGTCTC	exon 3
primer 2	5' CTGCTCCAACCAAGATGG	exon 3
primer 3	5' CACGGCCTGAAGACTTCATGC	exon 4
primer 7	5' CATGATGATAGCGAGTGGGATG	exon 4 (赤)
primer 8	5' CACGATGATGCTGAGTGGGGT	exon 4 (緑)
primer 4	5' CGCTCGGATGGCCAGCCA	exon 4
primer 17	5' TCCAACCCCGACTCACTATC	intron 4
primer 9	5' GCAGTACGAAAGATCATCACC	exon 5 (赤)
primer 10	5' AGCAGAATGCCAGGACCATC	exon 5 (緑)
primer 16	5' ACGGTATTTTGATGTGGATCTGCT	intron 5

番号は引用文献との対応をつけるため便宜的につけたもので特別な意味はない。この配列に対応する遺伝子での位置を示してある。(赤)、(緑)としてあるのは配列が赤視色素あるいは緑視色素に特異的であるということを示している。その他は赤、緑に共通のプライマーである。

いた2種のプライマーで決定される塩基配列のDNAの断片が、抽出したDNA中に存在するということになる。プライマーの番号は引用文献との対応のため付したもので特別な意味はない。赤緑遺伝子はX染色体の長腕の一番端の方のXq28に赤遺伝子-緑遺伝子の順に並んで存在しており、1つの遺伝子は6つのエクソンから構成されているが、エクソン1とエクソン6は赤と緑で塩基配列が共通であるから今回はエクソン2から5までの塩基配列を調べた。

まずプライマー17と16でエクソン5を増幅する(図1)。このプライマーはイントロン4とイントロン5の塩基配列に対応しており、赤緑特異性はない。したがってこのPCRでは赤緑どちらのタイプのエクソンも増幅する。得られたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサー(Applied Biosystems社, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)を用いて決定する。赤あるいは緑どちらかのエクソンのみであれば塩基配列は一意的に決まるが、赤緑の両方が混在しているといくつか特定できないところがあり、赤緑両方のエクソン5が存在していることがわかる。次いで、エクソン4に対応するプライマー3(赤緑共通)と、赤のエクソン5に特異的なプライマー9、あるいは、緑のエクソン5に特異的なプライマー10とでエクソン4を増幅すると赤エクソン5あるいは緑エクソン5の上流のエクソン4が得られる(図2)。この塩基配列をまたDNA

シーケンサーにて決定する。同様にしてエクソン2から5までの塩基配列を決定した。

Nathansら<sup>1)</sup>の報告では赤遺伝子と緑遺伝子で異なっているアミノ酸は15カ所であったが、その後まれな変異として異なる塩基が報告されているものを含め、全部で31個所の塩基を特定すれば全配列が決まることになる。この中には塩基配列は異なるが同じアミノ酸をコードしている silent mutation や、アミノ酸は異なっても視色素の吸収特性を変化させないとされている変異もある。塩基配列の詳細を見るといくつかのバリエーションが、とくにエクソン3には多数のバリエーションが見られたが、この点については別に報告するとして、ここでは総合的に見てそれぞれのエクソンが赤型か緑型かという表し方で結果を示す。

### 3. 結果

図3に正常例の結果を示す。典型的な赤遺伝子と緑遺伝子を1つずつというケースが最も多く21例、次の180Alaも典型例とすると25例になる。緑遺伝子を2つ以上持つ例が2例(N1, 21)。残る9例は何らかの形の雑種遺伝子を持っていたが、赤エクソン5を持つ遺伝子(赤型)を1つと緑エクソン5を持つ遺伝子(緑型)を1つあるいは複数持つというケースが35例であり、これらは従来から知られている正常色覚の遺伝子型に一致する。最後の1例(N26)は赤型の遺伝子を2つという

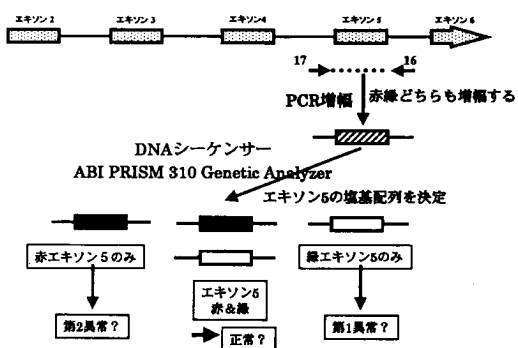


図1 PCRによるエクソン5の増幅

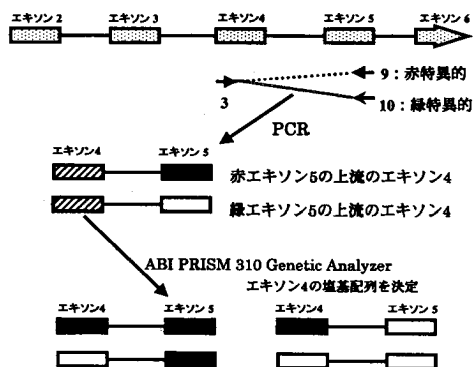


図2 PCRによるエクソン4の増幅

まれな例であった。このケースは表現型が正常であるから図では赤型 - 緑型 - 赤型の順に並べて示したが、遺伝子の並び順は今回の解析では不明である。順序は不明であるので赤型と緑型の両方の遺伝子を持っていれば遺伝子型からは正常と判定することになる。この意味では正常色覚の36例全てが正常と判定されたことになり、specificityは100%になる。

図4は第1異常の結果である。第1色盲の5例中4例(2, 41, 22, 29)は緑型の遺伝子1種類のみを持ち、表現型である2色型と矛盾しないが、最後の1例は緑型の遺伝子を2つ持っており、遺伝子型からは異常3色型と判定することになる。第1色弱の8例も7例までは緑型の遺伝子を2つ以上持つという意味で表現型と矛盾しないが、1種類の緑遺伝子しか持たない1例(ケース4)があり、遺伝子型からは2色型と判定せざるを得ない。

図5に第2異常の結果を示す。第2色盲の14例中10例には矛盾はないが、32と40の2例が異常3色型と、9、10の2例は赤型の遺伝子を1つと緑型を2つ持っており、正常と判定せざるを得ない。第2色弱の15例中8例

では遺伝子型と臨床診断が一致したが、7例(6, 21, 42, 14, 15, 18, 26)には赤型と緑型の遺伝子がそれぞれ1つ以上あり、正常とせざるを得ない結果であった。ケース6は表現型が異常であるので赤型 - 赤型 - 緑型と並べて示したが、順序の情報を欠いているので今回の基準では正常となる。正常者でこれと同じような赤型の遺伝子を2つ持つケース(N26)が存在した(図3)。

#### 4. 討論

第1異常の13例は2色型、異常3色型の判定では矛盾するものもあったが、赤型の遺伝子を欠いているという点では全例第1異常と判定でき、この意味ではsensitivityは100%になる。しかし2色型、異常3色型の判定で一致しないケースが2例見られた。第2異常については正常との区別ができないケースが9例も存在し、sensitivityは69%ということになってしまう。色覚異常の42例全体で見ると異常と判定できたのは33例(79%)、2色型、異常3色型の判定まで含めると13例(31%)に何らかの矛盾が見られた。この意味での

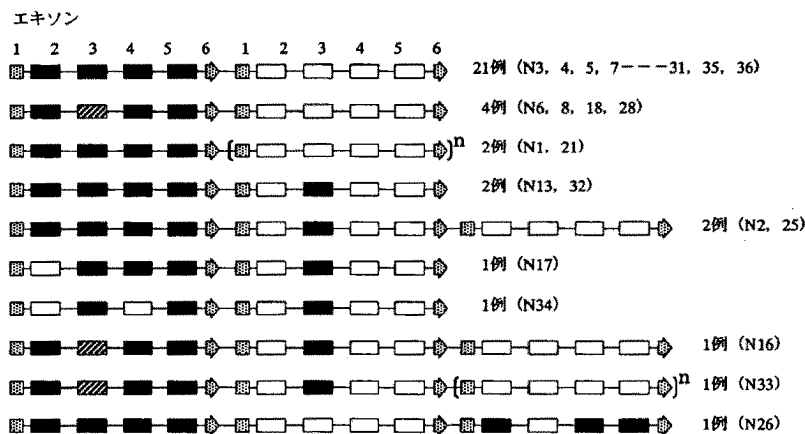


図3 正常色覚36例の遺伝子型

◻ ◻ : エキソン1と6。これらは赤緑に共通である。

■ : 赤型のエキソン。

□ : 緑型のエキソン。

▨ : 180 Alaの赤型エキソン3。

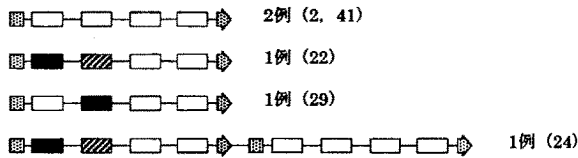
感受性は69%になる。

こういう矛盾のあるケースの何を調べれば正確な判定ができるのか。一つは前述の遺伝子の並び順である。赤緑遺伝子はいくつか直列に並んでおり、先頭と2番目の遺伝子のみが発現し3番目以降は発現しないとされている。この仮説に従いケース6は赤-赤-緑と

並んでいるとすれば第2色弱であることと矛盾しない。しかし他の8例は赤型の遺伝子を1つしか持たず、この仮説でも説明がつかない。

もう一つは遺伝子の数である。今回は塩基配列から区別できた遺伝子の数だけの遺伝子が存在するとの前提で結果を見ているが、

第1色盲 (5例)



第1色弱 (8例)

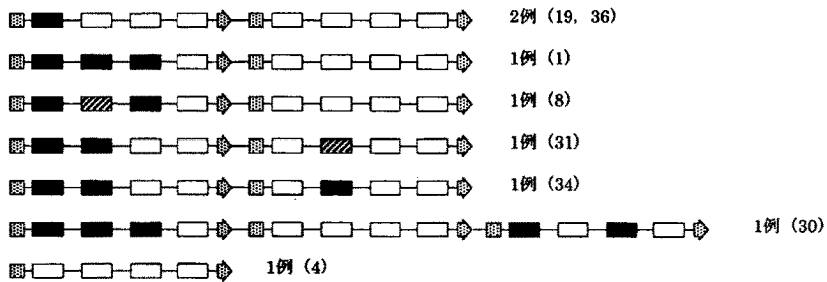
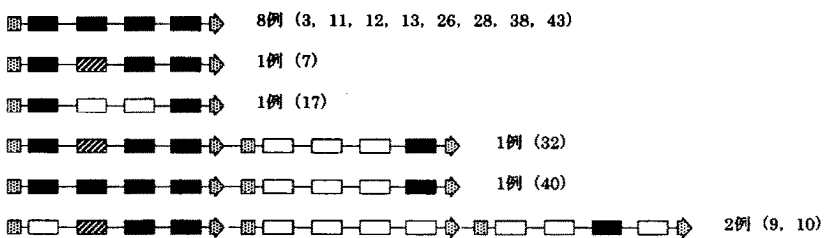


図4 第1異常13例の遺伝子型

第2色盲 (14例)



第2色弱 (15例)

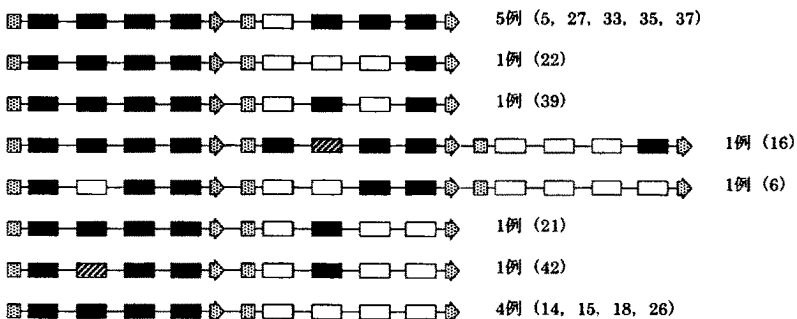


図5 第2異常29例の遺伝子型

赤：緑＝1：1が必ずしも赤遺伝子が1つ、緑遺伝子が1つを意味しない。2：2であったり3：3であることを否定する根拠はないのであるから、例えばケース21, 42, 14, 15, 18, 26は赤：緑＝1：1であったが、これを2：2と考えて、赤赤緑緑の順に並んでいるとすれば、第2異常であるとの説明はつくことになる。しかしそれでも2色型、異常3色型の不一致は残る。

1種類の遺伝子しか持たないが異常3色型である例については、視色素の濃度が異なる2種類の錐体が作られるとする考えが提唱されている<sup>8)</sup>。また遺伝子型が異常3色型で臨床型が2色型である24, 32, 42のようなケースは、ピーク波長の差が非常に小さい2種類の色素が発現するため臨床検査（アノマロスコープ）では検出できないとされている<sup>9)</sup>。そこでMerbsら<sup>10)</sup>の報告にしたがって各遺伝子に対応する視色素の吸収ピーク波長を推定し、その差をとってみた。確かにケース24ではピーク波長差が0.7 nmであり臨床的に第1色盲と誤診される可能性は十分に考えられる。しかしケース32, 42ではそれぞれ7.6, 11.9 nmであり、典型的な異常3色型に見られる波長差0.2～11.9 nmのむしろ大きい方であり、臨床検査の検出限界とする解釈には無理がある。

いずれにしてもエクソン2～5の塩基配列を見ただけでは診断には不十分であることは明らかである。いろいろな仮定は遺伝子による判定と臨床診断との矛盾を説明することはできて、臨床的診断手段としてはあまり意味がない。エクソンの塩基配列だけではなく遺伝子の並び順、数などの解析、さらにはエクソン以外の、遺伝子の発現をコントロールする部分の解析が必要である。今後は症例を

増やすとともに新しい解析アプローチについても検討したい。

## 文 献

- 1) J. Nathans, D. Thomas and D. S. Hogness: Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green and red pigments. *Science*, 232, 193-202, 1986.
- 2) J. Nathans, T. P. Piantanida, R. L. Eddy, T. B. Shows and D. S. Hogness: Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science*, 232, 203-210, 1986.
- 3) J. Neitz, M. Neitz and P. M. Kainz: Visual pigment gene structure and the severity of color vision defects. *Science*, 274, 801-804, 1996.
- 4) S. S. Deeb, D. T. Lindsey, Y. Hibiya, E. Sanocki, J. Winderickx, D. Y. Teller and A. G. Motulsky: Genotype-phenotype relationship in human red/green color vision defects: Molecular and psychophysical studies. *American Journal of Human Genetics*, 51, 687-700, 1992.
- 5) M. Neitz, J. Neitz and A. Grishok: Polymorphism in the number of genes encoding long-wavelength-sensitive cone pigments among males with normal color vision. *Vision Research*, 35, 2395-2407, 1995.
- 6) M. Neitz, J. Neitz and G. H. Jacobs: Genetic Basis of Photopigment Variations in Human Dichromats. *Vision Research*, 35, 2095-2103, 1995.
- 7) J. Winderickx, L. Battisti, A. G. Motulsky and S. S. Deeb: Selective expression of human X chromosome-linked green opsin genes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89, 9710-9714, 1992.
- 8) E. Sanocki, D. Y. Teller and S. S. Deeb: Rayleigh match ranges of red/green color-deficient observers: Psychophysical and molecular studies. *Vision Research*, 37, 1897-1907, 1997.
- 9) 北原健二：色覚の個人差と分子生物学。日本眼科学会雑誌, 102, 837-849, 1998.
- 10) S. L. Merbs and J. Nathans: Absorption spectra of hybrid pigments responsible for anomalous color vision. *Science*, 258, 464-466, 1992.