

16 . 遺伝子資源室

室長 橋本雄之

概要

遺伝子資源室の主業務である遺伝子バンクでは 1984 年より対がん 10 力年総合戦略事業の一環として、主にがん遺伝子、染色体特異的 DNA マーカーや多型マーカー-DNA 断片の収集を行い、1985-94 年の 10 年間で、延べ 5,000 人をこえる内外の研究者に 20,000 サンプル以上を供給してきた。そうした業務を担う国立感染症研究所遺伝子資源室は平成 17 年 4 月に大阪府彩都地区に発足する独立行政法人医薬基盤研究所に移転し、生物資源研究部遺伝子資源研究室として活動することになっている。

2004 年にヒトのゲノム配列がほぼ解読され、ヒトの個体が約 25,000 の遺伝子の働きで形成されることが判明した。それを土台とした今後の医科学研究の方向として、個々の遺伝子の機能解明、ヒトの遺伝的多様性の解明、ヒトに近縁な非ヒト霊長類のゲノム情報の解読があげられ、それらを利用した疾病要因の解明と創薬への応用が大事な課題となると思われる。

ヒトはそれぞれ異なったゲノムを持っており、平均して約 0.1%の塩基配列の違いがある。ヒトの遺伝的多様性は疾患原因遺伝子の解明、テーラーメイド医療などの目的に広く利用されている。また、解析精度の向上により、一塩基多型 (SNP) がこれまで用いられたマイクロサテライトなどの多型マーカーよりも重要な役割を占めるようになると予想される。当バンクでは移行後もこの方向性に沿って、遺伝的多型情報 (SNP データ) を付加した DNA サンプル (クローン) の研究開発を行っていくことを予定している。

これまで、当バンクではカニクイザル (*Macaca fascicularis*) とチンパンジー (*Pan troglodytes*) の cDNA クローンを大量に開発・収集し、一部は解析して内外の研究者に供給してきた。ヒトとチンパンジーとは DNA レベルで約 1%、ヒトとカニクイザルとは 5-7%程度異なっており、ヒトとマウスとの違い (30-40%) に比

べるとその差は小さく、チンパンジーとカニクイザルは非常にヒトに近い動物であるといえる。ヒトに近縁な類人猿は倫理的に実験動物として使うことは困難だが、カニクイザルは実験霊長類として使用が許可されており、これからの創薬研究にとって不可欠なモデル動物といえる。我々はこれまでに約 70,000 個の cDNA クローンをカニクイザルの脳・精巣から、またチンパンジーの皮膚材料として、約 2,000 個の cDNA クローンを作製し、これらを保存・分譲できる体制を整えてきた。

ヒトゲノムにコードされている約 25,000 個の遺伝子のうち、疾患の原因もしくは発症に関係することが明らかにされている遺伝子は約 1,500-2,000 個ある。疾患研究の基盤を整備する目的でこれらの遺伝子の完全長 cDNA を収集すると同時に、ヒト疾患遺伝子に対応するカニクイザル cDNA も上記コレクションから集めて、疾患遺伝子バンクを構築し、両者の配列を比較することで疾患の起源を推定することを行ってきた。また、疾患遺伝子の機能を解明するために完全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、大腸菌や哺乳動物で疾患遺伝子タンパク質を大量に作らせ、疾患の発症機構や予防医学の研究に活用することを基盤研での活動として行う準備をしてきた。それらをセットとして利用することにより疾病の診断・治療が可能になることが期待される。

(通常経費以外に交付された研究費)

HS 財団科学研究費補助金、エイズ医薬品等開発研究「HIV 由来 nef タンパク質の細胞形質転換作用を抑制する新規な AIDS 脳症抑制剤の開発」分担(亀岡)

厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)「サル完全長 cDNA の配列決定とヒト遺伝子との比較解析および配列情報に基づく cDNA アレイ作製と応用に関する研究」主任、橋本

業績

調査・研究

1. 遺伝子バンクとしての遺伝子育成・維持、供給業務

これまでに分離した約7万クローンの5'末端配列を元に、ヒト参照(RefSeq)遺伝子配列に対してホモロジー検索を行い、45,000 クローンがヒト参照遺伝子の 8,200 種に対応することを明らかにした。それらの全長配列を決めることを台湾アカデミアシニカのグループと共同で進め、脳由来約 5,000、精巣由来約 2,000 の全長配列を決定し、公共データベースに登録した。ヒトとの配列比較解析を行った結果、脳で発現している遺伝子約 2,000 についてみると、他の組織の値と比べて、 K_s (同義置換率) はほぼ6%と同じなのに対し、 K_a (非同義置換率) は脳で1%と他組織に比べて1/2になっていることが分かった。脳では平均的に遺伝子の変化が少なくなっているとみられる。ヒト相同遺伝子をもつカニクイザル cDNA について、その5'UTRを比較すると、配列がアラインできないような領域が存在し、その領域の相同配列はヒトゲノム配列には存在するが、通常のヒト転写物にみられなかった。そうしたエキソン領域をスタートエキソンとするなどの変化型5'UTRが精巣cDNAでは27%の割合で存在したが、脳由来cDNAでは14%でそれほど高くなかった。ヒトやチンパンジーの精巣転写物にはそのような高率で変化型が見られないので、カニクイザル精巣特有のことと思われ、遺伝子発現の差を調べるよい材料になる。

疾患遺伝子の機能と霊長類の進化との関係を知るため、アミノ酸置換と発症との関係が明白な1300個のヒト疾患関連遺伝子に相補性をもつ309個のカニクイザル遺伝子cDNAを全長配列決定遺伝子コレクションから選別した。このなかで、ヒトでは病因となるアミノ酸置換がカニクイザル遺伝子の正常配列となる例が9遺伝子で11カ所に認められ、これらは発症機構の解明に役立つものと思われる。

[橋本雄之、楠田 潤、高橋一郎、亀岡洋祐、長田直樹、田沼玲子、平田 誠]

2. カニクイザル完全長 cDNA とヒト相同遺伝子との塩基配列比較による、5'非翻訳領域の進化解析

ヒトゲノム配列が解読された現在、ヒトゲノムの機能

解析・疾病研究は、単なるタンパク質コード配列に注目するだけでなく、遺伝子発現ネットワークを含めた発展的研究が必要だと考えられる。これに着目し、遺伝子発現に関係すると思われる5'非翻訳領域が進化上どのように形作られてきたかについて解析を行った。302のカニクイザル脳由来cDNA、622の精巣由来cDNAをヒト相同配列と比較した。その結果、5'非翻訳領域には、タンパク質をコードしている翻訳領域と同様に、正の淘汰・負の淘汰の両方の選択圧がかかっていることが示された。また、塩基配列の置換パターンだけでなく、5'非翻訳領域でのイントロン-エキソン構造のヒト-サル間の違いというものも多く発見され、これらがヒトの生物学的特異性に大きく寄与していることが推測された。

[長田直樹、楠田 潤、田沼玲子、平田 誠、橋本雄之]

3. 非ヒト霊長類におけるヒト疾患遺伝子ホモログの網羅的解析

ヒト疾患の原因遺伝子がどのように進化してきたかを知るため、Human Gene Mutation Data Base(HGMD)に登録されている1351個の疾患遺伝子に相補的なカニクイザルおよびチンパンジー遺伝子を収集し、ヒトや他の哺乳類の相補遺伝子と比較解析した。約7,000個のカニクイザル完全長cDNA配列および公開されているチンパンジーゲノム配列中にはそれぞれ294個及び621個の疾患遺伝子ホモログが見いだされた。そのうち、ヒトの病因となるアミノ酸置換をもつものがカニクイザルで9遺伝子(11アミノ酸置換)、チンパンジーで27遺伝子(33アミノ酸置換)みつかった。これらのアミノ酸置換の約58%はカニクイザル、チンパンジーとも疾病型をもち、チンパンジーからヒトに進化する過程でヒト正常配列が獲得され、ヒトへの進化に貢献したことが予想される。

[楠田 潤、長田直樹、田沼玲子、平田 誠、橋本雄之]

4. 単鎖の核酸の挙動を追跡する試み

細胞内で、non-coding RNA の挙動を調べるため、タンパクにFLAGタグ、HAタグをつけるように、単鎖の核酸にタンパクを認識するタグ-アプタマーをつけることを検討した。このアプタマー配列としては、GST タンパクを認識するもの、ストレプトアビジンタンパクを

認識するものなどが知られている。単鎖の核酸の3次構造に関しては、tRNAの構造以外あまり知られていない。そこで、今回は、単鎖の核酸として Xist RNA の一部を用い 5 側あるいは 3 側にアプタマー配列を挿入したプラスミドを構築し、T7 プロモーターで RNA に転写するように組み込んだ。結果は、この系では、ストレプトアビジンビーズに結合する RNA は得られなかった。これは、Xist RNA の3次構造により、5 側、3 側のアプタマーが、タンパク質を認識できなかったことと思われる。

[高橋一朗、橋本雄之]

5. MPO リーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は好中球の殺菌・殺ウイルス作用を担い、炎症反応で重要な役割を果たしている。MPO コード領域に Val53Phe (V53F) の変異があり、頻度は Phe 型がほぼ 0.112 と推定される。この変異は成熟 MPO には影響せず、成熟過程に影響する可能性がある。炎症性疾患としてリウマチ、MPO-ANCA 関連腎炎、C 型肝炎と健常対照での変異頻度の解析を行った。53F の出現頻度は C 型肝炎で 9.9%と対照 9.6%と差はなかった。リウマチ群全体では 10.7%であったが、病状進行度、では 12.5%で、では平均 7.5%と重症例で増加するが有意の差ではない。MPO-ANCA 関連腎炎群では 53F 保持率は 38.5%と高く、アレル頻度は 0.205 を示し、有意ではないが関連が示唆された。

[亀岡洋祐、伊東玲子、笠間 毅 (昭和大・医)、鈴木哲朗 (ウイルス 2)、猪原登志子 (京大・院医)、武曾恵理 (北野病院)、橋本雄之、鈴木和男 (生物活性物質)]

6. *Drosophila melanogaster* マイクロアレイを利用した cis 制御による遺伝子発現多型の研究

遺伝子発現のパターンが個体間・種間で異なるということはこれまでの研究で良くわかっているが、その遺伝子発現の違いの原因である突然変異が、発現量の違いがある遺伝子近傍の発現調節因子上にあるか (cis 制御)、またはその遺伝子の発現を制御する別の遺伝子上にあるのか (trans 制御) について区別することは難しかった。この問題を明らかにするために、Z30 と Fr という二つ

の系統を用い、各染色体を別の系統で置き換えた *Drosophila melanogaster* について遺伝子発現量の違いと染色体の遺伝子型との相関を見た。その結果、遺伝子発現量の違いは主にその遺伝子が乗っている染色体の遺伝子型により決定されている (cis 制御されている) ことがわかった。

[長田直樹、Michael Kohn (Rice 大)、Chung-I Wu (シカゴ大)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Osada, N., Hirata, M., Tanuma, R., Kusuda, J., Hida, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Gojobori, T., Shen, C.-K. J., Wu, C.-I., Hashimoto, K.: Substitution rate and structural divergence of 5'UTR evolution: Comparative analysis between human and cynomolgus monkey cDNAs.

Mol. Biol. Evol. 22(10):1976-1982(2005)

2) Osada, N., Wu, C.-I.: Inferring the mode of speciation from the genomic data: A study of the great apes.

Genetics 169(1): 259-264 (2005).

3) Imanishi, T., et al (Hashimoto, K.): Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. PLoS Biol 2(6): e162(2004)

4) Oharaseki T, Kameoka Y, Kura F, Persad AS, Suzuki K, Naoe S.: Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. Microbiol Immunol. 49(2):181-189(2005).

5) Kameoka Y, Persad AS, Suzuki K.: Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population.

Jpn J Infect Dis. 57(5):S12-13(2004).

6) Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Arakawa K, Kawanaka M.:

Paragonimus ohirai metacercariae in crabs collected along the Arakawa River in Tokyo, Japan. J Vet Med Sci. 66(8):927-931(2004).

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Naoki Osada, Makoto Hirata, Jun Kusuda, Reiko Tanuma, Katsuyuki Hashimoto:

Rate and pattern of 5' UTR evolution: comparative analysis between human and cynomolgus monkey.

International Workshop on Encoding Information in DNA Sequences, Okinawa, February 2005.

2) Yosuke Kameoka, Genomic Variations in Myeloperoxidase Gene in a Japanese Population.

4th International Peroxidase Meeting,
Kyoto, Japan, October 27-30, 2004

3) Yosuke Kameoka, Reiko Itoh, Tsuyoshi Kasama, Tetsuro Suzuki, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso and Kazuo Suzuki, A polymorphism on myeloperoxidase coding region and severity of inflammation.

4th International Peroxidase Meeting,
Kyoto, Japan, October 27-30, 2004

2. 国内学会

1) 坂手龍一, 今西 規, 平井百樹, 橋本雄之, 五條堀孝: ヒトとチンパンジーの cDNA 配列の比較解析から探るヒト遺伝子の進化

日本遺伝学会第 76 回 大会、吹田、2004 年 9 月

2) 長田 直樹, Kohn Mickael, Greenberg Anthony, Shapiro Joshua, Wu Chung-I:
Gene expression of *Drosophila melanogaster* head with sexual isolation - cis-associated difference and pattern of sex, virginity and genotype.

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

3) 高橋一朗、橋本雄之:

Xist RNA の反復配列に結合する蛋白の screening
第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

4) 橋本雄之、長田直樹、平田 誠、田沼玲子、楠田潤:
カニクイザル精巣 cDNA とヒト相同遺伝子との配列比較 -28% の 5'UTR に変化

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

5) 楠田 潤、長田直樹、田沼玲子、平田 誠、平井百樹、橋本雄之:

神経疾患遺伝子の霊長類ホモログに関する研究

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

6) 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男: ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチド内の多型と炎症性疾患との関連

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸 2004 年 12 月

7) 伊東玲子、亀岡洋祐、Persad Amanda、池田文恵、仁保善之、橋本雄之、鈴木和男: マロリーワイズ症候群患者で観察されたミエロペルオキシダーゼ欠損を起こす遺伝子変異

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

8) 三川浩輝、亀岡洋祐、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男: cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に關与する炎症性分子の遺伝子発現

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

9) 三川浩輝、亀岡洋祐、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男: cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖 CAWS 投与による脾細胞に発現する遺伝子解析

第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、札幌、2004 年 12 月