

16. 遺伝子資源室

室長 橋本雄之

概 要

ヒトゲノム解析プロジェクトの進展で、ヒトゲノム全塩基配列が利用可能となり、ヒト完全長 cDNA や EST の配列情報を基にヒト遺伝子 2 万以上が国際データベースに記載されている。さらに、ゲノム情報に基づく網羅的遺伝子機能解明が転写物、タンパク質レベルで進められているが、まだ、十分な展開を見せるに至っていない。従って、ゲノムの遺伝子部分の確定とその機能解明のために分離した完全長 cDNA クローンとその配列情報を遺伝子機能・発現制御等の研究の材料とすることは依然として必要である。

われわれはヒトに近いモデル動物としてのカニクイザルの完全長 cDNA のカタログに基づいたヒトゲノム遺伝子領域解析をめざして、これまでにカニクイザルの脳（大脳前頭、頭頂、後頭、側頭、小脳、脳幹、延髄）、精巣および肝臓から 90,000 以上の cDNA クローンを分離し、5'末端配列を決定してきた。このうち 5'末端配列が既知の登録配列に相同性を持たない 3,000 クローン強について全長配列を決定した。さらにカニクイザル cDNA の塩基配列とヒトゲノム塩基配列を比較することにより、ヒトゲノム配列中から対応する領域（転写領域相当）を抜き出し、仮想的なヒト cDNA 配列を構築した。ヒトゲノム配列から予測された遺伝子データベース（Ensemble）との比較の結果、全長配列決定クローンのうち約 500 は十分な長さの ORF を持ちながらもそのデータベースには存在しない、新規遺伝子候補であることが示された。さらに、精巣由来 cDNA ライブラリーより単離し、全長配列を決定した 400 クローンについては cDNA マイクロアレイを作製して組織での発現解析を行い、精巣で特に発現の高い 75 遺伝子を見いだした。また、413個のヒト神経疾患関連遺伝子に対応する配列を検索し、54遺伝子について全長塩基配列を決定し、ヒトとの配列比較を行い、進化的に保存・変異しているアミノ酸と疾病成因に関わるアミノ酸との関連を探った。

チンパンジー材料が入手可能となったので、カニクイザルの脳 7 領域、心臓、腎臓、肝臓とチンパンジー大脳、小脳、肝臓、皮膚由来完全長 cDNA ライブラリーから単離したカニクイザル約 4 万に加えて、チンパンジー約 1 万クローンから得られた 5'末端配列について、各々約 4 千、約 2 千種のヒト既知 mRNA に対応する配列を検索・選定した。1 遺伝子につき複数のクローンが得

られたカニクイザル 734 種、チンパンジー 226 種の遺伝子については、コンセンサス配列を決定し、精度の高い配列データベースを構築した。それらのうちから両種に共通の遺伝子 133 種を選び、5'末端配列をヒト mRNA 配列と比較したところ、アミノ酸にしてヒト-カニクイザル 98.8%、ヒト-チンパンジー 99.7%という相同性が見られた。また、全体的に見れば、転写開始点の分布状態についても、類似が見られたが、約 1 割の遺伝子で分布状態の変化が見られた。これらの結果は今後の全長決定による配列比較により、遺伝子進化からヒトの進化を探ること、遺伝子の差異から疾病に成立要因を探ることの有用性を示した。こうした比較ゲノム手法によりヒトゲノム解析の一環としてのヒト遺伝子の機能推定に寄与するとともに、ヒト疾病関連遺伝子の同定から機能解明、さらにその疾病の成因解明そして診断、治療に結びつく研究の発展に資することが期待される。

(通常経費以外に交付された研究費)

* 厚生省ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「サル及びマウス脳完全長 cDNA の分離とその細胞・個体での機能解明のための供給方法等に関する研究」
主任研究者（橋本）

* 厚生省ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「ウイルス性慢性肝疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析」分担（亀岡）

研究業績

1. 遺伝子バンクとしての遺伝子育成・維持、供給業務

ヒト材料からでは分離しにくい cDNA を得ることと、ヒトに近いモデル動物としてのサル cDNA のヒト染色体へのマッピングと新規の機能解析を行い、ヒト相同遺伝子探索のためのカタログ化をめざすとともに、バンクを通じて DNA マイクロアレイで供給するシステムを検討することを目的として、1) カニクイザル脳 各部の 7 組織 (頭頂葉、側頭葉、前頭葉、後頭葉、脳幹、小脳皮質、延髄) および精巣について、オリゴキャップ法により作製した完全長 cDNA に富むライブラリー cDNA クローンを各々 5,000-1 万クローンを分離し、96 穴プレートのアレイにして凍結保存した。自動 DNA シークエンサーを用いて上記の順に 11419, 8736, 13074, 5598, 3211, 11443, 5313 および 10701 の計 70,000 個の 5' 端部分塩基配列を決定し、ホモロジーサーチの自動プログラムを利用して、既知 DNA 配列との相同性や新規性等を調べ、その結果をデータベース化して、バンクから供給可能とした。全クローンの 5' 端配列をもとにクラスタリングを行い、23,000 クラスタとその代表クローンの一覧表を作成した。

2) これらから新規 cDNA クローン約 3,000 を選び、その全長塩基配列を決定して、2,050 配列を公共データベースに登録した。そのうち、一定の ORF を持つ 823 クローンについて、そのコードするタンパク質想定などの解析を行った。それらにはヒトゲノムシークエンス上に配置され、新規のヒト遺伝子の存在を予測できるものがあり、ヒト特定染色体上に新規の遺伝子として登録できるもの約 500 クローンが見出された。また、ヒトゲノム中に見いだされた新規エキソン 455 のうち、43 % はコンピューター予測がされていないかった。

[橋本雄之、楠田 潤、高橋一朗、後藤英介、亀岡洋祐、田沼玲子、平田 誠]

2. カニクイザル脳由来新規完全長 cDNA の分離

これまでにカニクイザル脳 (前頭、頭頂、後頭、側頭、小脳、脳幹、延髄)、精巣由来の cDNA ライブラリーから約 70,000 の 5' 端配列を解読し、約 3,000 の新規遺伝子候補の全長配列を決定した。全長配列を決定し、かつ十分な長さの ORF を持ったクローン 823 のうち、約 500 については、ヒトゲノムのアノテーションデータベース上で遺伝子領域として登録されておらず、ヒト新規遺伝子の候補として記載した。また、これらを利用してヒトゲノム配列中から、これまで記載のない新規遺伝子として転写される領域を予測した。さらに、精巣由来 cDNA ライブラリーより単離し、全長配列を決定した 400 クロ

ーンについては c DNA マイクロアレイを作製して組織での発現解析を行い、精巣で特に発現の高い 75 クローンを識別した。

[長田直樹(東大院・理)、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹(東大院・新領域)、橋本雄之]

3. 新規遺伝子 casein kinase I alpha 2 の起原と発現解析

casein kinase I (CKI) alpha 1 は細胞増殖因子 beta-catenin をリン酸化することで beta-catenin の ubiquitin 化とプロテオソームによる分解を導き、初期胚の分化を調節し、細胞のガン化を防止すると考えられている。既発表のヒトおよびマウスゲノムの全塩基配列を検索するとヒトゲノムでは CKI alpha 1 遺伝子の他にもう 1 コピー相同性の高い遺伝子 (CKI alpha 2) が存在し、マウスゲノムにはその遺伝子はないことが分かった。われわれは PCR 等の解析により (1) CKI alpha 2 が進化の過程で、新世界ザルから旧世界ザルが分岐した後、retrotransposition により出現したこと、(2) CKI alpha 1 が ubiquitous に発現するのに対し、CKI alpha 2 は精巣特異的に発現することを明らかにした。

[楠田潤、平田誠、田沼玲子、橋本雄之]

4. Three-Hybrid System を用いた Xist RNA に結合するタンパク質の Screening

Three-Hybrid System は酵母内で、RNA と結合するタンパク質を Screening する System である。RNA bait として Xist RNA のくり返し配列の 1 つのユニットを用いた。10⁵ の cDNA Library を Screening した結果、34 個の positive コロニーが得られた。これらは、18 種の異なったクローンであった。このうち、タンパク質をコードするフレームのずれのない 12 種のクローンを用い RNA dependency assay を行ったところ 1 個のクローンのみ陽性であった。このクローンは DEAD RNA ヘリカーゼであったが、bait RNA 特異的ではなく bait ベクターとも結合した。従って、求める RNA と特異的に結合するクローンは得られなかった。

[高橋 一朗、橋本 雄之]

5. ヘテロクロマチンタンパク (HP1) と Xist RNA との interaction について

HP1 タンパクは 22Kda のクロモドメイン (CD)、クロモシャドウドメイン (CSD) とその 2 つのドメインをつなぐヒンジ領域の 3 つの部分で構成されている核蛋白質である。HP1 は、ヘテロクロマチン領域に極在し、このヘテロクロマチン化には RNA が関与しているという報

告がある。そこで、RNA がヘテロクロマチン化のひきがねと考えられている Xist RNA と HP1 の interaction について調べた。その結果 HP1 のヒンジ領域が、RNA と結合することが判明した。しかし、Xist RNA 特異的というわけではなかった。

[高橋 一朗、橋本 雄之]

6. MPO 遺伝子エキソン 9 における遺伝子変異

日本で解析された MPO 欠損症のうち完全欠損例 3 例のうち 2 例は点突然変異、Gly501Ser(mRNA ; G1501A) と Arg499Cys(mRNA ; C1495T) に起因し、いずれも MPO 遺伝子のエキソン 9 に位置している。日本人におけるエキソン 9 の変異頻度を解析するため 385 検体のゲノム DNA を解析したが、いずれのタイプの変異も検出することができなかった。新たな変異として non-synonymous で T1469C(Ile490Thr)および synonymous で G1434A, C1478A の 3 つの変異を検出した。これらサンプルはいずれもヘテロ接合体であり、この変異頻度から、これらがホモ接合体として出現する頻度は十万分の 0.25 となり、複数個の変異の存在を考慮すると本欠損症の頻度は数万分の 1 と考えられた。

[亀岡洋祐、Amanda Persad (生物活性物質部・南フロリダ大)、橋本雄之、鈴木和男 (生物活性物質部)]

7. ウイルス性慢性肝疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析

C 型肝炎ウイルス (HCV) に起因する慢性肝炎に対してはインターフェロン療法が中心となっており、この治療への応答の違いが、治療効果に大きく影響することが知られている。本研究ではインターフェロン誘発性の抗ウイルス作用を担う宿主要因を制御する因子がどのような遺伝子的 (genomic) 背景を持つかを解析することを目的とする。本年度は、染色体 1 番および 2 番について、最近利用が可能になった SNP 検出プローブを用いて走査した。染色体 1 番先端から 2.5 MB 付近に位置する SNP では P 値は 0.0012 を示し、染色体 1 番の中では最も高い偏りを示した。2 番染色体には IL1 局在部位に LOD 値の極大を検出し IL1 のプロモーター領域が C 型肝炎発症と強く連鎖していることを確認した。

[亀岡洋祐、鈴木哲郎 (ウイルス 2 部)、橋本雄之]

8. マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング

川崎病罹患児糞便由来のカンジダアルカリ抽出物を用いてマウスに川崎病類似冠状動脈炎を作製した。冠状動脈

炎発生率は、マウス系統により差異があり CBA/JN には冠状動脈炎抑制遺伝子が予想され、その染色体マッピングを行った。F1 マウスより N1 を得、病理組織学的に冠状動脈炎の有無を確認し、43 個のマイクロサテライトマーカーにより解析した。冠状動脈炎発生率は、N1 : 24/103 であり、N1 におけるヘテロ出現数を検討した結果、少なくとも 2 個の染色体上に比較的高い Odds 値を示す領域が確認され、この領域中に、抑制遺伝子がマッピングされる可能性が示唆された。

[亀岡洋祐、大原関利章 (東邦大)、倉 文明 (細菌部)、高橋 啓 (東邦大)、山田仁美 (東邦大)、鈴木和男 (生物活性物質部)、直江史郎 (東邦大)]

9. 化学薬剤による未成熟染色体凝縮法 (PCC) の確立とその応用

染色体は放射線や環境変異原物質などにより損傷を受ける。遺伝子の損傷を評価するために染色体の解析は広く行われている方法であるが、損傷の度合いが大きくなると細胞周期の遅延あるいは停止により、分裂中期染色体を得ることが困難あるいは不可能となり、その結果遺伝子の損傷の解析に限界を与えていた。未成熟染色体凝縮法はこの限界を克服しうる技術であり、カリクリンなどの蛋白質脱リン酸化酵素阻害により効率良く PCC を誘発する方法を開発した。この方法により従来困難であった染色体の解析に広く利用されることとなった。

[後藤 英介]

10. 未成熟染色体凝縮法を利用した簡便な大被曝線量での生物学的線量計の開発

放射線による被曝事故における線量の推定には染色体の損傷を指標とする、生物学的線量計が広く使われている。しかしながら従来のコルセミドを用いた分裂中期染色体を得る方法では、被曝線量が高くなると細胞周期の停止から染色体を得ることが不可能であり、1.0 Gy を超える被曝線量の算定は不可能であった。1996 年に未成熟染色体凝縮法を利用して 4.0 Gy まで被曝線量を推定する方法を発表したが、染色体ペインティング方を使うため、限られた施設でしか施行できなかった。より簡便に線量の推定を行うことを可能とするため、ギムザ染色と組み合わせた簡単で迅速なプロトコルの開発を行っている。

[後藤 英介、高倉 かほる (ICU)]

11. 放射線による DNA 損傷とその修復における DNA-PK の役割の解析

DNA-PK (DNA 依存性プロテインキナーゼ) は DNA 二重鎖切断 (DSB) 特に放射線による DSB の修復に大きく関わっている酵素であるがその詳細は不明である。DNA-PK の阻害剤を用い放射線照射による染色体損傷とその修復の過程を未成熟染色体凝縮法を応用し染色体レベルでの解析を中心に細胞周期に及ぼす影響、生存率曲線などを行い解析している。

[後藤 英介、高倉かほる (ICU)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Nomiyama, H., Egami, K., Tanase, S., Miura, R., Hirakawa, H., Kuhara, S., Ogasawara, J., Morishita, S., Yoshie, O., Kusuda, J., and Hashimoto, K.: Comparative DNA sequence analysis of mouse and human CC chemokine gene clusters. *J. Interferon & Cytokine Res.* 23:37-45, 2003.
- 2) Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., and Inoue, K.: A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO Journal* 22:905-912, 2003.
- 3) Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Suto Y, Hirai M, Terao K, Sugano S, Hashimoto K.: Cynomolgus monkey testicular cDNAs for discovery of novel human genes in the human genome sequence. *BMC Genomics.* 3(1):36.1-36.12, 2002.
- 4) Osada N, Kusuda J, Hirata M, Tanuma R, Hida M, Sugano S, Hirai M, Hashimoto K.: Search for genes positively selected during primate evolution by 5'-end-sequence screening of cynomolgus monkey cDNAs. *Genomics* 79(5):657-662, 2002.
- 5) Cox, L.J., Larman, M.G., Saunders, C.M., Hashimoto, K., Swann, K., & Lai, F.A.: Sperm PLC-zeta from human and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 124(5):611-623, 2002.
- 6) Hu, J., Meng, Q., Roy, S.K., Raha, A., Hu, J., Zhang, J., Hashimoto, K., Kalvakolanu, D.V.: A novel transactivating factor that regulates IFN-gamma

J. Biol. Chem. 277(33):30253-30263, 2002.

7) Takahashi, I., Kameoka, Y., and Hashimoto, K.:

MacroH2A1.2 binds the nuclear protein Spop

Biophys. Biochem. Acta 1591,63-68, 2002.

8) Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD.

New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared

Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan.

Emerg Infect Dis. 9(3):333-337, 2003.

9) Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Kawanaka M.

Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular

discrimination between *Paragonimus westermani* and

P. miyazakii at the metacercarial stage.

Mol Cell Probes. 16(3):231-236, 2002.

10) Ito S, Gotoh E, Ozawa S, and Yanagi K.:

Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized

with 'chromatin prematurely condensed' during interphase

and its newly replicated regions in particular.

J Gen. Virol. 83:2377-2388, 2003.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Hida, M., Sakate, R., Hashimoto, K., Suzuki, Y., Hirai, M., Terao, K., Gojyobori, T. and Sugano, S.: Comparative analysis of 5'-regions of human and cynomolgus monkey mRNA using oligo-capped cDNA libraries. Human Genome Meeting, April 14-17, 2002, Shanghai, China
- 2) Hida, M., Sakate, R., Hashimoto, K., Osada, N., Hirai, M., Suzuki, Y., and Sugano, S.: Monkey full-length cDNA libraries. Cold Spring Harbor Meeting on Genome Sequencing & Biology May 7-11, 2002, Cold Spring Harbor, NY, USA
- 3) Iwashita, S., Itoh, T., Oshima, K., Hashimoto, K. and Makalowski, W.: A transposable element contributes directly to the protein diversity: retroposon-mediated gene diversity that directly produces a novel type protein including the endonuclease domain of RTE-1. 12th International Workshop on beyond the Identification of Transcribed Sequences: Functional, Evolutionary and Expression Analysis. October 25-28, 2002, Viena, Virginia, USA.

2. 国内学会

1) 長田直樹、橋本雄之:

カニクイザル完全長 cDNA の分離ーヒトゲノム配列での新規ヒト遺伝子同定および既知ヒト遺伝子との配列比較.

平成 13 年度哺乳動物遺伝学研究会、千歳、2002 年 6 月

2) 坂手龍一、肥田宗友、菅野純夫、橋本雄之、早坂郁夫、平井百樹:

チンパンジー cDNA の 5' 端配列の解析.

第 18 回 日本霊長類学会大会、東京、2002 年 7 月

3) 長田直樹、肥田宗友、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹、寺尾恵治、菅野純夫、橋本雄之:

カニクイザル cDNA ライブラリーを利用したヒト新規遺伝子の探索

第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月

4) 亀岡 洋祐、Persad Amanda、小池 和彦、堤 武也、松浦知和、須藤 勉、井出 達也、田中 一雄、佐田 通夫、日野 邦彦、神代 正道、橋本 雄之、宮村 達夫、鈴木 哲朗:

C 型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索.

第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月

5) 楠田潤、長田直樹、田沼玲子、平田誠、坂手龍一、肥田宗友、平井百樹、橋本雄之:

非ヒト霊長類における神経疾患関連遺伝子の解析.

第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月

6) 橋本雄之

カニクイザル完全長 cDNA ライブラリーを利用した新規ヒト遺伝子同定と既知ヒト遺伝子との配列比較.

国立遺伝学研究所研究集会「人類集団における遺伝子レベルとゲノムレベルにおける多様性」

2003 年 1 月 10 日、三島

7) 亀岡洋祐、大原関利章、倉 文明、高橋 啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎:

マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング.

第 75 回日本生化学会大会 京都 平成 14 年 10 月

8) Amanda Persad、亀岡洋祐、鈴木和男:

MPO 完全欠損患者で見つかった ARG499CYS 変異.

第 8 回 MPO 研究会、宮崎、平成 14 年 10 月

9) Amanda S. Persad、亀岡洋祐、鈴木和男:

MPO 完全欠損患者で見つかった ARG499CYS 変異

第 25 回日本分子生物学会大会、横浜、平成 14 年 12 月

10) 後藤 英介、加藤 宝光、高倉 かほる:

放射線による染色体損傷の修復における DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)の機能の解析.

理工学研究会、東京、2002 年 7 月

11) 後藤 英介、加藤 宝光、高倉 かほる:

放射線による染色体損傷の修復における DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)の機能の解析.

第 45 回日本放射線影響学会年会、仙台、2002 年 9 月