

16. 遺伝子資源室

室長 橋本雄之

概要

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、精巣から70,000以上のcDNAクローンを分離し、5'末端配列を決定してきた。その5'端配列を元に、ヒト参照遺伝子配列に対して、ホモロジー検索を行ったところ、45,000クローンがヒト参照遺伝子(RefSeq)の8,200種に対応した。一方、23,000のクラスターの代表クローン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2,200の全長配列を決定した。

また、チンパンジーの完全長cDNAライブラリーを作製し、約1.5万クローンから得られた5'端配列から、3,771種のヒト既知mRNAに対応する配列が得られた。5'端配列のうち1遺伝子につき複数のクローンが得られた226種の遺伝子について、コンセンサス配列を決定することにより、ヒトとの配列一致度を比較したところ、5'-cDNA全体は99.30%、5'-UTR領域は98.79%、CDS領域は99.42%、アミノ酸は99.44%の値が得られた。この解析過程で、塩基の挿入・欠失(indel)に注目したところ、indelはCDSより5'-UTRで約13倍多く起こっており、これを考慮するとヒトとの配列の違いは、置換率のみの場合より5'-cDNA全体で1.4倍大きくなることが明らかとなった。カニクイザル配列の解析の結果と比較すると、5'-cDNA全体でカニクイザルはチンパンジーの4倍塩基置換が起こっていることなどが示された。

(独)医薬基盤研究所への移行を控え、研究資源供給部門遺伝子バンクの任務、その遂行に関する基本的考え方をまとめた。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った。この成果はDNA解析技術(オートシーケンサーとコンピュータ処理能力)の飛躍的発展と良質の研究材料(BACクローン)によるものといえる。こうした先導的DNA研究に資する材料として、現段階ではゲノム情報に基づく網羅的遺伝子機能解明のために、分離した完全長cDNAクローンと

その配列情報が求められている。このように、DNA研究材料の需要は研究の進展に伴って変遷するので、それに対応する資源を開発・収集し、供給できるバンクの構築にはオール日本として統一した、相当規模の資金と体制が必要となる。そうしたことが望めない現状においては厚生労働省傘下の遺伝子バンクとしては、ヒトゲノム解析プロジェクトの進展にともない、疾病に係る遺伝子の単離も進み、その構造異常と病気の発生との関係が調べられ、DNA解析による疾病診断も可能となってきたことに鑑み、一般的なライフサイエンスの振興ではなく、ヒトの疾病克服のために特化し、とりわけ、医薬品の開発に寄与する遺伝子DNA資源を開発・収集して、内外の研究者、研究機関の要望に応える安定した体制を確立することをめざすこととする。そのためには本来、供給部門も一体化した体制が必要と考えるが、歴史的経過をふまえて、それに近づけるシステムづくりを図ることとする。

(通常経費以外に交付された研究費)

厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服事業、「難治性血管炎に伴う多臓器不全に係わる病態の解明および治療法の開発に関する研究」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

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 の 7 組織 (頭頂葉、側頭葉、前頭葉、後頭葉、脳幹、小脳皮質、延髄) および精巣から、オリゴキャップ法により完全長 cDNA に富むライブラリーを作製し、cDNA クローン各々 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 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) チンパンジーの完全長 cDNA ライブラリーを作製し、約 15,000 クローンから得られた 5' 端配列について、3,771 種のヒト既知 mRNA に対応する配列が得られたが、これらのクローンをバンクに登録する準備を行った。
[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. カニクイザル完全長 cDNA の配列決定とヒトオルソログとの比較解析

これまでに分離した約 7 万クローンについて、その 5' 端配列をもとに、ヒト参照 (RefSeq) 遺伝子配列に対して、ホモロジー検索を行ったところ、4,500 クローンがヒト参照遺伝子 (RefSeq) の 8,200 種に対応した。一方、23,000 のクラスタの代表クローンの全長配列決定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 2,200 の全長配列を決定し、公共データベースに登録した。

こうしたヒト遺伝子配列と相同性のあるクローンについて、ORF がほぼ一致する精巣由来クローン 588 ペアについて、塩基置換率を求めたところ、同義置換座位及び非同義置換座位における塩基置換率 (K_s 及び K_a) は 5.70% および 1.55% であった。コード領域全体の塩基置換率は 2.54% であり、アミノ酸配列の置換率は 2.78% であった。いずれもチンパンジーのヒト 226 遺伝子に対する値に比べると 4-5 倍高い置換率を示した。

[橋本雄之、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹(東大院・新領域)]

3. カニクイザル神経疾患遺伝子ホモログの転写変異体の収集と解析

カニクイザル脳で発現している神経疾患関連遺伝子ホモログの転写変異体を採集し、ヒト相同遺伝子のもものと比較した。75 種類のカニクイザルの神経疾患遺伝子ホモログに重複する 251 クローンについて挿入配列全長を解読したところ、181 配列 (72%) は完全な ORF をコードしており、50 配列 (20%) はスプライシングの異常によると思われる欠失や挿入を含むことが分かった。なかでも 33 配列は公的データベース中には該当する配列がみつからず、新規のスプライス変異体である可能性が示唆された。このようなスプライス変異体は霊長類のヒト化に伴う脳機能の精緻化や神経疾患の発症との関連性を明らかにする手がかりになるものと思われる。

[楠田 潤、田沼玲子、平田 誠 長田直樹(シカゴ大)、橋本雄之]

4. 神経疾患遺伝子の霊長類ホモログに関する研究

神経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、345 種類のヒト神経疾患遺伝子に相同性のあるカニクイザル遺伝子 72 種と、チンパンジー遺伝子 184 種を収集し、相互に比較解析した。遺伝性血管浮腫の原因遺伝子 C1 esterase inhibitor (C1INH) はヒトゲノム上にイントロンを含むものが 1 コピーしか存在しないのに対し、チンパンジーゲノムにはさらにもうひとつ相同性の高い遺伝子のあることがわかった。この遺伝子にはイントロンがなく、プロセスされた Retropositional 遺伝子であることが予想され、また ORF も完全に保存されているので、発現されれば inhibitor として機能する可能性が高く、炎症の抑制等に関係することが示唆された。

[楠田 潤、田沼玲子、平田 誠、平井百樹(東大院、新領域)、橋本雄之]

5. ヘテロクロマチンタンパク (HP1) と interaction するタンパク及び RNA

染色体のヘテロクロマチン化には、RNA が重要な役割を担っていることが知られている。HP1 タンパクは、クロモドメイン、クロモシャドウドメインと、それを繋ぐヒンジ部分の 3 つのドメインで構成されている。X 染色体不活化も、クロマチンがヘテロクロマチン化する現象であり、Xist RNA が重要な役割を担っている。

そこで、この "RNA" と HP1 との関係性を調べると、HP1 のヒンジ部分に、"RNA" が結合することが認められた。ただし、この結合は、Total RNA で、かな

り阻害されるので、特異性は低いと考えられる。また、このヒンジ部分には、X染色体不活化に関与すmacroH2Aタンパクとも結合することが判明した。

このことより、X染色体不活化におけるヘテロクロマチン化においても、HP1タンパクは、何らかの関与をしているのではないかと思われる。

[高橋 一郎、橋本 雄之]

6. SARSの診断及び手法に関する緊急調査研究 ゲノム疫学

SARSウイルスの遺伝子配列の確認及び、遺伝子変異の検出について、クローニングされた、S, M, N, E各遺伝子DNA及び、RT-PCR反応によって生成されたdsRNAについて、DNAシーケンシングを担当した。

[高橋 一郎、亀岡 洋祐、森川 茂1、山田 靖子2、橋本 雄之 1:ウイルス1部、2:動物管理室]

7. MPO欠損患者からの新規MPO遺伝子変異の検出

マロリーワイズ症候群により来院した患者の血液像解析から、好中球MPOの完全欠損 (Type)であることを見出した。患者好中球画分からのMPO放出測定ではMPO活性は検出されず、完全欠損を確認した。好中球画分を用いたウエスタンブロット解析ではMPOペプチドを検出できなかった。単球画分のmRNAよりMPO転写産物の検出を行ったところ正常鎖長のMPOcDNAを検出した。このcDNAの塩基配列を解析から3点の突然変異を見出し、その一方はアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であった。リーダーペプチドとの切断点から11残基に位置することから、MPOタンパク成熟過程に影響を与え、MPO欠損症を引き起こしているものと考えられた。

[亀岡洋祐、橋本雄之；鈴木和男（生物活性物質部）；Amanda Persad（フロリダ病院）；池田文恵、仁保善之（千早病院）]

8. 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]

9. 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

(1) 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、10 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40 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、ギムザ染色標本の染色体断片数を計測する方法により40 Gyまでの被曝線量を簡単に迅速に推定するプロトコルを開発した。

(2) 前述したギムザ染色標本の染色体断片数を計測する方法により40 Gyまでの被曝線量を簡単に迅速に推定するプロトコルに更に改良を加え、ギムザ染色した染色体断片の最長/最短の比が被曝線量に相関していることに注目し、被曝線量を簡単に迅速に推定するプロトコルの開発を行っている。

[後藤 英介]

10. 放射線によるDNA損傷と、その修復におけるDNA-PKとATM蛋白の役割の解析

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。またATM蛋白は放射線高感受性を示す遺伝性疾患-毛細血管拡張性歩行失調症の原因遺伝子とされており放射線によるDNA損傷修復に関わっているとされるがその詳細な機能は不明である。ATM欠損株と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]

発表業績一覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧 文 発 表

1) Sakate R., Hida, M., Sugano, S., Hayasaka, I., Shimohira, N., Yanagi, S., Suto, Y., Osada, N., Hashimoto, K., Hirai, M.:
Analysis of 5'-end sequences of chimpanzee cDNAs
Genome Research 13:1022-1026, 2003.

2) Iwashita, S., Osada, N., Itoh, T., Sezaki, M., Oshima, K., Hashimoto, E., Kitagawa, Y., Takahashi, I., Masui, T., Hashimoto, K., and Makalowski, W.:

A transposable element-mediated gene divergence that directly produces a novel type protein including the endonuclease domain of RTE-1: gene duplication of bovine *bcl2*

Mol. Biol. Evol. 20(9):1556-1563, 2003.

3) Felix M. Mesak, F.M., Osada, N., Hashimoto, K., Liu, Q.Y. and Ng, C.E.:

Molecular cloning, genomic characterization and over-expression of a novel gene, XRR1, identified from human colorectal cancer cell HCT116^{clone2_XRR} and macaque testis

BMC Genomics 4:32, 2003.

4) Arai M, Yokosuka O, Chiba T, Imazeki F, Kato M, Hashida J, Ueda Y, Sugano S, Hashimoto K, Saisho H, Takiguchi M, Seki N.:

Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration.

J Biol Chem. 278(32):29813-29818, 2003.

5) Han B, Dong Z, Liu Y, Chen Q, Hashimoto K, Zhang JT.: Regulation of constitutive expression of mouse PTEN by the 5'-untranslated region.

Oncogene 22(34):5325-5337, 2003.

6) Gotoh, E., Tanno, Y., and Takakura, K.:

A simple biodosimetry method in case of high dose radiation exposure by scoring chromosome number of Giemsa stained during induced prematurely condensed chromosomes (PCC).

Int J Radiat Biol. 2004 (in press)

7) Ohashi Y Y, Kameoka Y, Persad AS, Koi F, Yamagoe S, Hashimoto K, Suzuki K.:

Novel missense mutation found in a Japanese patient with myeloperoxidase deficiency.

Gene. 2004 Mar 3; 327(2):195-200.

8) Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M, Kameoka Y, Matsushita S, Inada T.:

Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF

5 and ORF 6 proteins.

Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Mar; 27(2):81-92.
9) Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M, Kameoka Y, Matsushita S, Inada T.:

Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein.

Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Jan; 27(1):47-55.

10) Kuzmin IV, Oraciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE.:

Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences.

Virus Res. 2003 Nov; 97(2):65-79.

11) Hanyuda M, Kasama T, Isozaki T, Matsunawa MM, Yajima N, Miyaoka H, Uchida H, Kameoka Y, Ide H, Adachi M.:

Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1 α upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1 mechanism.

Rheumatology (Oxford). 2003 Nov; 42(11):1390-1397.

Epub 2003 Jun 27.

12) Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K.

Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction--study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice.

Free Radic Res. 2003 May; 37(5):481-489.

13) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.:

A multiplex PCR for discrimination

between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage.

Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 35(Suppl.2), 77-80, 2004.

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

Paragonimus ohirai metacercariae in crabs collected along the Arakawa River in Tokyo, Japan.

J. Vet. Med. Sci. 66, 927-931, 2004.

2. 和文発表

1) 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：
開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の1例
Clinical Parasitol., 14、57-60、2003.

2) 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、亀岡洋祐、川中正憲：幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫
獣医寄生虫学会誌、2、13-19、2003.

3) 後藤英介：
未成熟染色体凝縮法とその放射線生物学への応用。
放射線生物研究、39、14-25、2004

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. The 4th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, Bangkok, 2-4 Dec. 2003.

2. 国内学会

1) 坂手龍一 肥田宗友 長田直樹、数籐由美子、菅野純夫、早坂郁夫、橋本雄之、平井百樹：
チンパンジー遺伝子配列データベース
第19回日本霊長類学会大会、仙台、2003年6月

2) 高橋一朗、橋本雄之：
遺伝子発現を抑制するタンパクとRNAとの相互作用について
第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

3) 楠田潤、長田直樹、田沼玲子、平田誠、橋本雄之
カニクイザルにおける神経疾患関連遺伝子のスプライス変異体の解析
第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

4) 橋本雄之：サル完全長 cDNA の分離とヒト相同遺伝子との比較解析
国立遺伝学研究所共同研究集会「霊長類の遺伝学的研究」三島、2004年2月

5) 丹野悠司、高倉かほる、後藤英介：化学薬剤による未成熟染色体凝縮法 (PCC) による全染色体数を指標とした大線量の被曝線量を推定する生物学的線量計
第46回日本放射線影響学会大会、京都、2003年10月

6) 後藤英介、丹野悠司、高倉かほる：

DNA-PKとATM蛋白によるG2/M細胞周期制御について
第46回日本放射線影響学会大会、京都、2003年10月

7) 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木 和男：
ミエロペルオキシダーゼの第8ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度

第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

8) Dawson, Wayne、Ishida, Mie、Kameoka, Yosuke、Yamagoe, Satoshi、Futamura, Yasuhiro、Yamamoto, Kenji、Tanokura, Masaru、Suzuki, Kazuo：

Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies
第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

9) 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男：

新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異

第9回MPO研究会、八王子、2003年10月

10) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐：

東京の荒川河川敷で採集したクロベンケイガニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出

第135回日本獣医学会学術集会、東京 2003年4月

11) 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：

開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の1例

第14回日本臨床寄生虫学会大会、長崎、2003年6月