

Z00500145A

厚生労働科学研究費補助金

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

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋本雄之

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 1
主任研究者:橋本 雄之 (国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター客員研究員)

II. 分担研究報告書

1. カニクイザルおよびチンパンジーcDNAとヒトオルソログとの比較解析
およびカニクイザルcDNAマイクロアレイ作製 9
橋本 雄之 (国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター客員研究員)
2. カニクイザルとヒト疾病関連遺伝子比較解析 15
楠田 潤 (独立法人医薬基盤研究所遺伝子資源室研究リーダー)
3. チンパンジー完全長cDNAの解析 27
平井 百樹 (東京女子医科大学国際統合医科学インスティテュート 教授)
4. カニクイザルcDNAライブラリー作製とヒト疾病関連cDNA分離 35
菅野 純夫 (東京大学新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻
ゲノム制御医科学分野 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

平成17年度

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）総括研究報告書

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 課題番号：H15-ゲノム-003

主任研究者：橋本 雄之 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター客員研究員

カニクイザル cDNA 9,000以上の全長配列を決定し、ヒト相同配列との比較解析の結果、1) ヒトゲノム配列で遺伝子領域として注釈されていない、タンパク質をコードする400以上のカニクイザル cDNA を見いだした。これらをもとに種特異的遺伝子を探索した。2) ヌクレオチド置換と構造上の変化の両方で、トランスクリプトの制御領域(5' UTR)にヒトとカニクイザルで相違が見られ、そのレベルは組織に依存していた。3) カニクイザルのトランスクリプトームで600以上 Nc (non-coding) RNA を見いだした。チンパンジー精巣ライブラリーから分離した cDNA の全長配列決定を行い、ヒトと蛋白コード領域のほぼ一致する1,077配列について、16.8% (181/1077) に5' UTR の変化が見られた。これはカニクイザルに比べて低い率であるが、カニクイザルと同様、精巣において同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特異的に変化しているものと思われる。

Human Gene Mutation Data Base に登録されている約1,500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。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8遺伝子(9アミノ酸置換)、チンパンジーで27遺伝子(29アミノ酸置換)見つかった。これらのアミノ酸置換の64%はカニクイザル、チンパンジーともに疾病型をもっており、チンパンジーからヒトに進化する過程でヒト正常型に変化し、ヒトへの進化に寄与したことが予想される。さらに、ヒトで肥満に関わるといわれるアドレナリン受容体 $\beta 3$ 遺伝子の Arg64Trp 変異に関して、変化型は他の哺乳類にはみられないので、その exon 1 をチンパンジー 20 個体のゲノム DNA について調べたところ、この変異に関してヘテロ接合が3個体がみいだされた。したがって、アルギニンのトリプトファンへの置換はヒトではじめて生じたのではなくヒト・チンパンジー系統で生じたものと推定された。

全長決定クローンからヒト RefSeq 対応クローン約6,000を選別し、cDNA インサートの PCR 増幅を行った。また、3' 末端配列を軸に各クローンにユニークな配列を選択し、当初として約1,600クローンのオリゴマーを設計した。それをもとに、オリゴチップを作製し、その性能をみるために、カニクイザル各種組織での発現を比較して、有意な結果が得られることを確認した。

分担研究者

楠田 潤 独立行政法人医薬基盤研究所
生物資源部 研究リーダー

平井 百樹 東京女子医科大学

国際統合医科学インスティテュート教授

菅野 純夫 東京大学大学院

新領域創成科学研究科 教授

A. 研究目的

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約 22,000 が国際データベースに記載されている。また、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、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

情報を研究の材料とすることは依然として必要である。

本研究ではヒトに近いモデル動物としてのカニクイザル完全長cDNAのカタログに基づくヒトゲノム遺伝子領域解析をめざして、1) カニクイザル脳 7領域、精巣および肝臓から、オリゴキャップ法により作製したライブラリー由来cDNAクローンをもとに、ヒト参照遺伝子(RefSeq)配列に相当するものを検索し、その全長塩基配列を決定し、ヒトとの配列比較解析を行う。チンパンジーは配列一致率が高すぎて意味のある差異の解析ができない例が多いので、カニクイザルを主とするが遺伝子によって適宜チンパンジーcDNAも比較に加えて、種特異的に出現(欠失)している遺伝子や種特異的進化を示す遺伝子の探索など、遺伝子進化の異同を解析し、ヒトの進化的成り立ちを遺伝子レベルで追究する。特に、ヒトの遺伝疾患として記載のあるもの約1,600については、サルcDNAとの配列比較により進化的差異を解析し、種による遺伝子機能変化と病因との関係を探る。それらをもとに遺伝子機能探索のために疾病解析用完全長cDNAバンクの確立をはかり、疾病遺伝子cDNAの全長配列に疾病との関連データを付加したデータベース作りを行うとともに、cDNAクローンのバンクでの運用を可能にする。2) 上記で分離したカニクイザルcDNAの配列情報に基づき、2万種の遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製を試み、脳部位での特定遺伝子発現の差異や肝臓での薬剤応答遺伝子発現変動を解析することなどへの利用のためバンクからcDNAアレイで供給できるようにする。これによってこれまで不明だったヒトの疾病に関連する遺伝子の同定から機能解明に向けた研究、また、既に関係の知れたものも含めて遺伝子の機能変化とその疾病の成因との関係を解析する研究、さらに、診断、治療に結び付く研究の発展に資することを

目的とする。

B. 研究方法

1) サル脳 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、)及び精巣、肝臓から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から分離し、部分塩基配列を決定したクローンについて、相同性検索によりヒト参照遺伝子(cDNA)配列に相当するものについて、約1万個の全長塩基配列を決定(一部、台湾アカデミアシニカ分子生物学研究所との共同研究)し、カニクイザル参照遺伝子セットを作製する。蛋白コード領域を中心としてヒトとの配列比較を行い、遺伝子進化の異同を解析し、種の独自性との関連を追究する。特に、ヒト疾患遺伝子に対応する配列を検索し、対応するサルcDNA全長配列決定を行い、ヒトで病気を引き起こす遺伝子の変化と進化過程での変化の比較解析を進め、配列の差と病因との関係を探る。また、疾病遺伝子に関してcDNAクローンを用いた機能解析ができるようにヒト疾患関連遺伝子cDNAも新たにそろえ、カニクイザルcDNAとセットで疾病解析用遺伝子バンクの確立に努める。

2) チンパンジー組織が入手できたので、新たに精巣cDNAライブラリーを作製してcDNA数(約1万)を増やして、5'端配列を決定する。そのデータをふまえて、上記の配列比較に適当なチンパンジーcDNAを加えることにより、スプライシング変異や挿入・欠失などの構造変異、塩基(アミノ酸)置換率、非同義置換数と同義置換数の比などを調べ、種間での配列保存度を比較することにより、種特異的に出現(欠失)している遺伝子や種特異的進化を示す遺伝子の探索を行う。また、チンパンジー大脳、心筋、腎臓、肝臓などの組織よりtotal RNAを抽出し、ヒトならびにカニクイザルのマイクロアレイを用いた解析のための試料と

する。

3) カニクイザルcDNAクローン9万個について、その配列情報をもとに、オリゴヌクレオチドを設計し、特異性が高く、感度のよいオリゴヌクレオチドマイクロアレイを試作する。最終的に、約2万種の遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製を試み、脳部位での特定遺伝子発現の差異や肝臓での薬剤に応答した遺伝子発現変動の解析など、その利用法を探りバンクから供給できるようにする。

(倫理面への配慮)

ヒトcDNAライブラリー原材料は医療機関に属する医師により、本人または遺族の書面による許諾を得て、採取されたもので、コード化され個人識別情報は研究者に示されない。さらに、作製に当たって複数の材料を使用するなどの手段で保護を行う形を取った。

カニクイザルは国立感染症研究所サル需給調整委員会及び動物実験委員会で審議されたもので、殺処分を行わざるをえなくなったものを霊長類センター研究員との共同研究という形で分与を受けた。チンパンジー組織は三和科学所有で自然死したものから、同所倫理委での議を経て分与を受けた。

C. 研究結果

サル脳 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、)及び精巣、肝臓から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DNAから分離し、部分塩基配列を決定したクローンについて、相同性検索によりヒト参照遺伝子(cDNA)配列に相当するものについて、その全長配列を決定し、カニクイザル参照遺伝子セットを作製することを目標とした。これまでに9,000クローン以上について決定(一部、台湾アカデミアシニカ分子生物学研究所との共同研究)し、公共デ

ータベースに登録した。

合計で、63,570の5' ESTおよび9,407の全長cDNAの配列を得た。9,407の全長配列のうち、7,569cDNAsには5,280のヒト標準遺伝子と相同関係があった。その結果、3,067ペアのヒトマカクorthologous遺伝子の整列配列が得られた。そうしたヒトカニクイ配列比較で、2,672(87%)ペアで2つの系列の間にアミノ酸置換がみられた。同義のサイトで平均的置換率は5.7%であった。さらに、ヒト配列との比較の結果、

1) ヒトゲノム配列で意味のある遺伝子領域として注釈されていない、タンパク質をコードする400以上のカニクイザルのcDNAを見いだした。これらの隠れた遺伝子の大部分は低発現レベルのためにヒトの現在のゲノムアノテーションでは特定されていないものと思われる。これらをもとにヒトでの発現の有無を調べ、種特異的転写物を探索した。1例として、TMEM30C遺伝子についてヒトチンパンジー分岐後に転写のサプライス部位の塩基置換で引き起こされた転写の中途終了により、ヒトでは正常遺伝子産物が見られないことを見出した。

2) ヌクレオチド置換と構造上の変化の両方で、トランスクリプトの制御領域(5' UTR)にヒトとカニクイザルで相違が見られ、そのレベルは組織に依存していた。また、5'制御領域がタンパク質コーディング領域のように選択圧の対象であることが示された。

3) カニクイザルのトランスクリプトームで600以上Nc(non-coding)RNAを見いだした。これらのある程度は実験的レベルで生じたかもしれないが、ある程度のもは重要な機能を持つものと思われる。そのことは近縁種での系列比較で推論することができる。上記2)のように、ヒト相同遺伝子をもつカニクイザルcDNAについて、ORFがほぼ一致する精巣由来、脳由来ペアについて、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い。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が精巢cDNAで27%の割合で存在するが、脳由来cDNAでは14%でそれほど高くなかった。今年度は チンパンジーの精巢転写物にもそのような高率で変化型が見られるかどうか、チンパンジー精巢cDNAの全長配列解析を行った。

チンパンジー精巢よりオリゴキャップ法でcDNAライブラリーを作製し、約8,000クローンを分離した。その5'末端配列を決定し、約6,000の引き続き解析する価値のある配列を得た。韓国KRIBBとの共同研究で、そのcDNAクローンのインサートの全長配列決定を行い、2,178配列を得た。それらをヒトゲノム配列データベース、ヒトcDNAデータベースを用いて比較解析した結果、ヒトRefSeq遺伝子に相同性のある配列1,802個が得られた。ヒトゲノム配列、登録cDNAに当たらないcDNAは58個で、蛋白をコードしない、ヒトゲノムにエキソン様に配列する、ncRNAと見られるcDNAクローンが27個見られた。

蛋白コード領域のほぼ一致する1,077配列について、UCSCヒトゲノム配列上にBlat方式でマップし、5' UTR領域エキソンに注目すると、148個(13.7%)でスタートエキソン(ex1)がヒトのトランスクリプトと異なり、31個(2.9%)でex1は一致するが、Alternative splicingの結果と思われるエキソン配列の変化が見られた。他2個にヒトゲノム配列にない配列をex1にもつものがあり、全体で、16.8%(181/1077)に5' UTRの変化が見られた。これはカニクイザルに比べて低い率であるが、精巢以外のcDNAクローンでは4.5%(6/134)であることからして、カニクイザルと同様、精巢において、同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特

異的に変化しているものと思われる。

昨年度報告したカニクイザルcDNAの5' UTRの変化したクローン169個のうち、55個がチンパンジーにもヒトオルソログとしてみられたが、うち、31個が同様に5' UTRの変化が見られたことからチンパンジー、カニクイザル共通にヒトとは違った変化をしていることが窺える。

チンパンジー脳・皮膚由来完全長cDNAライブラリーを作製し、約1.5万クローンの5'端配列解析から、3,771種のヒト既知mRNAに対応する配列を得ている。それらからヒトRefSeq遺伝子に対応する完全長cDNA 87個を選び、その全長配列と対応するヒトmRNA配列(RefSeq)とをヒトゲノム配列上にそれぞれをマッピングした。そして、従来行っていた置換率算定に加え、exon-intron構造、転写開始点・終了点の位置の比較など、大規模な遺伝子構造における種差の有無について比較解析を行った。置換率は全体、5' -UTR, CDS, 3' -UTR、アミノ酸でそれぞれ0.73, 0.87, 0.59, 0.93, 0.58%であった。これにindelを考慮に入れると、この種差は増加し、塩基挿入・欠失(indel)を加算すると全体で1.36%になり、従来の置換のみの種間差よりも大きな値となっている。

疾患遺伝子の機能と霊長類の進化との関係を知るため、Human Gene Mutation Data Baseに登録されている約1,500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。カニクイザル全長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300個及び1025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8遺伝子(9アミノ酸置換)、チンパンジーで27遺伝子(29アミノ酸置換)みつかった。こ

これらのアミノ酸置換の64%はカニクイザル、チンパンジーともに疾病型をもっており、チンパンジーからヒトに進化する過程でヒト正常型に変化し、ヒトへの進化に寄与したことが予想される。

さらに、心血管疾患に関連する6遺伝子の多型について、チンパンジー20個体についてダイレクトシーケンシングにより比較解析を行った。特にアドレナリン受容体 β 3遺伝子(ADRB3)のArg64Trp変異に関して、変化型は他の哺乳類にはみられない。そのexon1をチンパンジー20個体のゲノムDNAについて調べたところ、この変異に関してヘテロ接合が3個体がみいだされた。したがって、アルギニンのトリプトファンへの置換はヒトではじめて生じたのではなくヒト・チンパンジー系統で生じたものと推定された。

2) 上記のようにヒト標準遺伝子に相当する約8,000個の遺伝子cDNAクローンを得ている。このcDNAの塩基配列データベースにより、外部委託して1,600クローンに対応するオリゴマー搭載DNAチップを試作した。カニクイザル脳に対して、精巣または脾臓のトータルRNA、さらに、処理と未処理肝臓RNAを用いて、遺伝子発現解析した結果、精巣で高く発現している遺伝子群、肝臓処理で発現の上がる遺伝子群など、有意なデータが得られる結果を得た。シグナルの実測値が低いなどの問題点もあり、遺伝子発現の網羅的解析においては、発現定量性の正確さが重要な問題であるので、さらに、完全長cDNAをプローブとして用いることによりシグナルの強度化を計り、発現量の定量性を改善するため、

6,000クローンについてPCR増幅して、チップに張り付ける方式でcDNAマイクロアレイを作製した。

D. 考察

カニクイザルはニホンザルと同属で、性

格がより穏やかで扱いやすい為、対人薬の開発などに実験動物として用いられているが、網羅的遺伝子解析は行われていなかった。ゲノムからヒト化の過程を明らかにするには近縁の霊長類での比較解析が不可欠であり、特に、霊長類としての特徴が明確になる旧世界ザルでの解析が重要である。カニクイザルはマウスなどよりもはるかにヒトに近縁であり、各遺伝子構造はヒトとほぼ同じであると考えられている。脳は、体の中で最もバリエーションに富んだ遺伝子が発現しており、精巣では臓器特異的に発現して新規に分離されるcDNA種が多いと期待された。さらに、カニクイザルcDNAライブラリーを用いることにより、ヒトよりも新鮮なサンプルが入手でき、ヒトのcDNAライブラリーでは作製の過程で失われる可能性のある希少な発現の遺伝子を発見することが期待できる。

ヒト遺伝子配列と相同性のあるカニクイザルおよびチンパンジーcDNAクローンについて、ORFがほぼ一致する精巣由来クローンの5'UTRの変化率が高いことは精巣において、同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特異的に変化しているものと思われる。また、カニクイザルcDNAの5'UTRの変化したクローン169個のうち、55個がチンパンジーにもヒトオルソログとしてみられたが、うち、31個が同様に5'UTRの変化が見られたことからチンパンジー、カニクイザル共通にヒトとは違った変化をしている遺伝子の存在が窺える。さらに、ヒトRefSeq遺伝子に対応するヒトcDNA半数以上(52%)が異なったプロモーターに制御されて転写されている事が報告されている(GenomeRes. 16:55-65, 2005)。逆に7,000ほどは1つのプロモーターしか記載されていないことになる。上記のカニクイザルおよびチンパンジーのスタートエキソンがヒトのRefSeq遺伝子のものと異なる例を示したが、カニクイザル124個のうち、

29 個, チンパンジー148 個のうち, 33 個がそれらに該当した。ヒトではサルで使われているプロモーター配列もしくは活性がなくなったか, あるいはそのプロモーターに由来する転写物がまだ未発見であると推測される。いずれにしても, サルの cDNA 全長配列を利用して, ヒトの遺伝子で一層の数のものが2つ以上のプロモーターを使って, 転写を行っている可能性が示された。

疾病の原因となるアミノ酸置換の祖先型をみよめる64%が疾病型、8%が正常型であり、のこりは判別不能であった。すなわち64%の疾病の原因となるアミノ酸配列は非ヒト霊長類型(祖先型)でヒトでは病気になるが、チンパンジーやカニクイザルは病的ではない。これらの遺伝子の多くは節約遺伝子で飢餓に備えてエネルギーを蓄える遺伝子型をもつチンパンジーやカニクイザルは低カロリーの食餌と充分な運動で適合するが、現在のヒトの食生活には不適當で症状が顕在化するものと予想される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2) K. Nagao, N. Takenaka, M. Hirai and S. Kawamura: Coupling and decoupling of evolutionary mode between X- and Y-chromosomal red-green opsin genes in owl monkeys. *Gene* (2005) 352-:82-91

これらの置換を詳しく解析すれば疾患の発症機構の解明や治療薬の開発に役立つものと思われる。

E. 結論

カニクイザル完全長 cDNA ライブラリー由来クローン計9万個の部分塩基配列を決定し、cDNA クローン約1万個の全長塩基配列を決定した。カニクイザルまたはチンパンジーcDNA の全長配列のヒト相同配列との比較により、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の成立要因を探ることの有用性を示した。ヒト、マカク、チンパンジーの配列比較により、塩基置換率の程度、5' UTR の構造変化、ヒト疾病遺伝子変位部位の祖先型で新知見を得た。種特異的遺伝子候補7クローンを得ている。

発現解析についてはカニクイザル cDNA チップ作製の基盤を作り基礎実験を行ったが、実例を示すまでには至らなかった。

3) Yamashita R, Suzuki Y, Wakaguri H, Tsuritani K, Nakai K, Sugano S. DBTSS: DataBase of Human Transcription Start Sites, progress report 2006. *Nucleic Acids Res.* 34: D86-D89, 2006.

4) Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S. Diversification of transcriptional modulation: Large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes.

and characterization of putative alternative promoters of human genes. Genome Res. 16: 55-65, 2006. Epub 2005 Dec 12.

2. 学会発表

1) 楠田 潤、田沼玲子、平田 誠、高橋一朗、亀岡洋祐、橋本雄之 長田直樹

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

第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

2) 長田直樹、田沼玲子、平田 誠、高橋一朗、亀岡洋祐、橋本雄之、楠田 潤

カニクイザルcDNAの解析とデータベース構築

第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

3) Naoki Osada, Makoto Hirata, Reiko Tanuma, Jun Kusuda, Katsuyuki

Hashimoto:

Cynomolgus monkey cDNA libraires: Rate and pattern of 5'UTR evolution in primates.

Human Genome Meeting 2005, May, Kyoto

4) R. Sakate, Y. Suto, T. Imanishi, I. Hayasaka, T. Gojobori, K. Hashimoto and M. Hirai:

Comparative analysis of chimpanzee full-length cDNAs mapped onto human genome unveils potentially large inter-species divergence in gene loci.

55th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Oct. 2005, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分 担 研 究 報 告 書

カニクイザルおよびチンパンジー cDNA と ヒト オルソログ と の 比較 解析

およびカニクイザル cDNA マイクロアレイ作製

橋 本 雄 之

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

カニクイザル cDNA 全長配列のヒトとの比較の結果、1) ヒトゲノム配列で遺伝子領域として注釈されていない、タンパク質をコードする 400 以上のカニクイザル cDNA を見いだした。2) ヌクレオチド置換と構造上の変化の両方で、トランスクリプトの制御領域(5'UTR)にヒトとカニクイザルで相違が見られ、そのレベルは組織に依存していた。3) カニクイザルのトランスクリプトームで 600 以上 Nc(non-coding) RNA を見いだした。チンパンジー精巣ライブラリーから分離した cDNA の全長配列決定を行い、ヒトと蛋白コード領域のほぼ一致する 1,077 配列について比較した結果、16.8% (181/1077) の 5'UTR に変化が見られた。これはカニクイザルに比べて低い率であるが、カニクイザルと同様、精巣において同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特異的に変化しているものと思われる。全長決定クローンからヒト RefSeq 対応クローン約 6,000 を選別し、cDNA インサートの PCR 増幅を行った。また、3' 末端配列を軸に各クローンにユニークな配列を選択し、当初として約 1,600 クローンのオリゴマーを設計した。それをもとに、オリゴチップを作製し、その性能をみるために、カニクイザル各種組織での発現を比較して、有意な結果が得られることを確認した。

A. 研究目的

ヒトゲノム全体の DNA 配列決定プロジェクトとその一環として発現遺伝子部分のクローン化が大規模に進められているが、遺伝子部分の確定とその機能解明は、全体としては残された課題となっている。

1) カニクイザル脳 7 領域、精巣および肝臓から、オリゴキャップ法により作製したライブラリー由来 cDNA クローン約 9 万個をもとに、その 3 万個のクラスターのうち、ヒト参照遺伝子 (RefSeq) 配列に相当するものを検索し、約 1 万個の全長塩基配列を決定し、ヒトとの配列比較解析を行う。チンパンジーは配列一致率が高すぎて意味のある差異の解析ができない例が多いので、カニクイザルを主とするが遺伝子によって適宜チンパンジー cDNA も比較に加えて、種特異的に出

現 (欠失) している遺伝子や種特異的進化を示す遺伝子の探索など、遺伝子進化の異同を解析し、ヒトの進化的成り立ちを遺伝子レベルで追究する。

2) 上記で分離したカニクイザル cDNA の配列情報に基づき、2 万種の遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドマイクロアレイ作製を試み、脳部位での特定遺伝子発現の差異や肝臓での薬剤応答遺伝子発現変動を解析することなどへの利用のためバンクから cDNA アレイで供給できるようにする。

B. 研究方法

1)) 自動 DNA シークエンサーを用いて、クローン DNA の部分塩基配列を決定し、インサートされた DNA の 5' 端から部分塩基配列決定を行った。多数の cDNA クローンについてコンピュータープログラムに

よりDNAデータベース上の配列と相同性検索を行い、既知のものに合致するものについて、その5'領域を完全に含んでいるかどうか判定した。

2) ヒト既知配列と相同性のあるクローンのインサートについて、全長配列をプライマーウオーキング法を主として決定した。それらの全長配列について、米国 UCSC ヒトゲノム配列データベースの Blat program による相同性検索を行った。配列比較は ClustalW プログラムを用いて並列配列を作り、Li の方法で塩基置換率 K_a , K_s 値を求めた。 K_5' UTR は Kimura's 2-parameter 法によって求めた。

3) チンパンジー精巣よりオリゴキャップ法で cDNA ライブラリーを作製し、約 8,000 クロウンを分離した。その5'末端配列を決定し、約 6,000 の引き続き解析する価値のある配列を得た。韓国 KRIBB との共同研究で、その cDNA クローンのインサートの全長配列決定を行い、2,178 配列を得た。

4) 全長決定クロー約 9,000 からヒト RefSeq 対応クロー約 6,000 を選別し、cDNA インサートの PCR 増幅を行った。また、3'末端配列を軸に各クローンにユニークな配列を選択し、当初として約 1,600 クローンのオリゴマー(30mer)を設計した。それをもとに、オリゴチップを作製し、その性能をみるために、カニクイザル各種組織での発現を比較した。

C. 研究結果

サル脳 7 組織(頭頂葉、側頭葉、前頭葉、後頭葉、脳幹、小脳皮質、延髄、)及び精巣、肝臓から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から分離し、部分塩基配列を決定したクローンについて、相同性検索によりヒト参照遺伝子(cDNA)配列に相当するものにつ

いて、その全長配列を決定し、カニクイザル参照遺伝子セットを作製することを目標とした。これまでに9,000クローンについて決定(一部、台湾アカデミアシニカ分子生物学研究所との共同研究)し、公共データベースに登録した。

合計で、63,570 の5'EST および 9,407 の全長 cDNA の配列が得られた。9,407 の全長配列のうち、7,569cDNAs には 5,280 のヒト標準遺伝子と相同関係があった。その結果、3,067 ペアのヒトマカク orthologous 遺伝子の整列配列が得られた。そうした ヒトカニクイ配列比較で、2,672(87%)ペアで 2 つの系列の間にアミノ酸置換がみられた。同義のサイトで平均的置換率は 5.7%であった。

こうした結果をデータベース化し、QFbase と名付けて、インターネットに公開した。

<http://genebank.nibio.go.jp/gbank/qfbase/index.html>

ヒトとの比較解析の結果、1) ヒトゲノム配列で意味のある遺伝子領域として注釈されていない、400 以上のカニクイザルのタンパク質をコードする cDNAs を見いだした。これらの隠れた遺伝子の大部分は低発現レベルのためにヒトの現在のゲノムアノテーションでは特定されていないものと思われる。2)ヌクレオチド置換と構造上の変化の両方で、トランスクリプトの制御領域(5'UTR)にヒトとカニクイザルで相違が見られ、そのレベルは組織に依存していた。また、5'制御領域がタンパク質コーディング領域と同様に選択圧の対象であることが示された。3)カニクイザルのトランスクリプトームで 600 以上 Nc(non-coding) RNA を見いだした。

これらのある程度は実験的レベルで生じたかもしれないが、ある程度のものは重要な機能を持つものと思われる。そのことは近縁種での系列比較で推論することができ

る。4) カニクイザルトランスクリプトームから種特異的転写物を探索した。1例として、*TMEM30(CDC50) C* 遺伝子についてヒトーチンパンジー分岐後に転写のスパライス部位の塩基置換で引き起こされた転写の中途終了により、ヒトでは正常遺伝子産物が見られないことを見出した。

上記2)のように、ヒト相同遺伝子をもつカニクイザルcDNAについて、ORFがほぼ一致する精巣由来、脳由来ペアについて、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い。そうしたエクソン領域をスタートエクソンとするなどの変化型5' UTRが精巣cDNAで27%の割合で存在するが、脳由来cDNAでは14%でそれほど高くなかった。今年度はチンパンジーの精巣転写物にもそのような高率で変化型が見られるかどうか、チンパンジー精巣cDNAの全長配列解析を行った。

チンパンジー精巣 cDNA ライブラリーからの cDNA クローンの全長配列決定を行い、2,178 配列を得た。それらをヒトゲノム配列データベース、ヒト cDNA データベースを用いて比較解析した結果、ヒト RefSeq 遺伝子に相同性のある配列 1,802 個が得られた。ヒトゲノム配列、登録 cDNA に当たらない cDNA は 58 個で、蛋白をコードしない、ヒトゲノムにエクソン様に配列する、NcRNA と見られる cDNA クローンが 27 個見られた。

蛋白コード領域のほぼ一致する 1,077 配列について、UCSC ヒトゲノム配列上に Blat 方式でマップし、5'UTR 領域エクソンに注目すると、表 2 のように、148 個 (13.7%) でスタートエクソン(ex1) がヒトのトランスクリプトと異なり、31 個 (2.9%) で ex1 は一致するが、Alternative splicing の結果と思われるエクソン配列の変化が見られ

た。他 2 個にヒトゲノム配列にない配列を ex1 にもつものがあり、全体で、16.8% (181/1077) に 5'UTR の変化が見られた。これはカニクイザルに比べて低い率であるが、精巣以外の cDNA クローンでは 4.5% (6/134) であることからして、カニクイザルと同様、精巣において、同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特異的に変化しているものと思われる。

昨年度報告したカニクイザル cDNA の 5'UTR の変化したクローン 169 個のうち、55 個がチンパンジーにもヒトオルソログとしてみられたが、うち、31 個が同様に 5'UTR の変化が見られたことからチンパンジー、カニクイザル共通にヒトとは違った変化をしている遺伝子の存在が窺える。

5) 上記のようにヒト標準遺伝子に相当する約 6000 個の遺伝子 cDNA クローンを得ている。この cDNA の塩基配列データベースにより、外部委託して1,600クローンに対応するオリゴマー搭載 DNA チップを試作した。カニクイザル脳に対して、精巣または脾臓のトータルRNA、さらに、化合物処理と未処理肝臓RNAを用いて、遺伝子発現解析した結果、精巣で高く発現している遺伝子群、肝臓処理で発現の上がる遺伝子群など、有意なデータが得られる結果を得た。シグナルの実測値が低いなどの問題点もあり、遺伝子発現の網羅的解析においては、発現定量性の正確さが重要な問題であるので、さらに、完全長 cDNA をプローブとして用いることによりシグナルの強度化を計り、発現量の定量性を改善するため、6,000クローンについてPCR増幅して、チップに張り付ける方式でcDNAマイクロアレイを作製した。

D. 考察

ヒトcDNAの178万以上の5'配列を解析した結果、14,628のヒトRefSeq遺伝子に対

応し、その半数以上（52%）が異なったプロモーターに制御されて転写されている事が報告されている (GenomeRes. 16:55-65, 2005)。逆に7,000ほどは1つのプロモーターしか記載されていないことになる。上記のカニクイザルおよびチンパンジーのスタートエクソンがヒトのrefSeq遺伝子のものと異なる例を示したが、カニクイザル124個のうち、29個、チンパンジー148個のうち、33個がそれらに該当した。ヒトではサルで使われているプロモーター配列がなくなったか、活性がなくなったか、もしくはそのプロモーターに由来する転写物がまだ未発見であると推測される。いずれにしても、サルのcDNA全長配列を利用して、ヒトの遺伝子で一層の数のものが2つ以上のプロモーターを使って、転写を行っている可能性が示された。

E. 結論

1) ヒトゲノム配列で遺伝子領域として注釈されていない、タンパク質をコードする400以上のカニクイザル cDNA を見いだした。2) ヌクレオチド置換と構造上の変化の両方で、トランスクリプトの制御領域(5'UTR)にヒトとカニクイザルで相違が見られ、そのレベルは組織に依存していた。3) カニクイザルのトランスクリプトームで600以上 Nc(non-coding) RNA を見いだした。チンパンジー精巣ライブラリーから分離した cDNA の全長配列決定を行い、2,178 配列を得た。ヒトと蛋白コード領域のほぼ一致する 1,077 配列について、16.8% (181/1077) に 5'UTR の変化が見られた。これはカニクイザルに比べて低い率であるが、カニクイザルと同様、精巣において、同じ遺伝子産物を持つ遺伝子の発現が種特異的に変化しているものと思われる。全長決定クローンからヒト RefSeq 対応クローン約 6,000 を選別し、cDNA インサートの PCR 増幅を行った。また、3

末端配列を軸に各クローンにユニークな配列を選択し、当初として約 1,600 クローンのオリゴマーを設計した。それをもとに、オリゴチップを作製し、その性能をみるために、カニクイザル各種組織での発現を比較して、有意な結果が得られることを確認した。

1. 論文発表

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):1-7 (2005)

2. 学会発表

1) Naoki Osada, Makoto Hirata, Reiko Tanuma, Jun Kusuda, Katsuyuki Hashimoto: Cynomolgus monkey cDNA libraries: Rate and pattern of 5'UTR evolution in primates. Human Genome Meeting 2005, May, Kyoto
2) R. Sakate, Y. Suto, T. Imanishi, I. Hayasaka, T. Gojobori, K. Hashimoto and M. Hirai: Comparative analysis of chimpanzee full-length cDNAs mapped onto human genome unveils potentially large inter-species divergence in gene loci. 55th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Oct. 2005, USA

3) 楠田 潤、田沼玲子、平田 誠、高橋一朗、亀岡洋祐、橋本雄之、長田直樹
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

第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月

4) 長田直樹、田沼玲子、平田 誠、高橋一朗、亀岡洋祐、橋本雄之、楠田 潤
カニクイザル cDNA の解析とデータベース構築

なし

表 1.

カニクイザルおよびチンパンジー cDNA の収集と配列解読

	<u>カニクイザル</u>	<u>チンパンジー</u>
EST クローン	85,894	20,471
全長決定クローン	9,407	2,349
ヒト RefSeq(22,000)		
相補クローン	7,569 (34%)	1,975 (9%)

表 2. チンパンジー cDNA のヒトオルソログと比較しての 5'UTR 変化

<u>1st ex altered</u>	<u>AS in 5' UTR</u>	<u>ex1 not in Hs</u>	<u>total analyzed pair.</u>
148 (13.7%)	31 (2.9%)	2 (0.2%)	1078
256 * (21.1%)	56 * (4.6%)	2 (0.16%)	1211

* added clones with exons including cds in 5' UTR

カニクイザルとヒト疾病関連遺伝子比較解析

楠田 潤 （独）医薬基盤研究所 遺伝子資源室 研究リーダー

疾患遺伝子について、疾病に関連したアミノ酸置換の進化的起源と哺乳類ホモログ間での分布を知るため、昨年度、アミノ酸置換と発症との関係が明白な1,300個のヒト疾患関連遺伝子に相補性をもつ約300個のカニクイザル遺伝子を当研究室の完全長cDNA配列コレクションから選別した。ヒトでは発症を促進もしくは抑制するアミノ酸置換がカニクイザル遺伝子の正常配列と一致する例を8遺伝子中に9カ所同定した。本年度はゲノム解析の終了したチンパンジーおよびアカゲザルの遺伝子配列（仮想的なものも含む）を利用して同様の解析を行い、病的アミノ酸置換が両非霊長類野生型配列と一致する例をあらたに27遺伝子で29カ所同定した。疾病の原因となるアミノ酸置換の祖先型をみよめる64%が病気型、8%が正常型であり、のこりは判別不能であった。すなわち64%の疾病の原因となるアミノ酸配列は非ヒト霊長類型（祖先型）でヒトでは病気になるが、チンパンジーやカニクイザルは病的ではない。これらの遺伝子の多くは節約遺伝子で飢餓に備えてエネルギーを蓄える遺伝子型をもつチンパンジーやカニクイザルは低カロリーの食餌と十分な運動で適合するが、現在のヒトの食生活には不相当で症状が顕在化するものと予想される。これらの置換を詳しく解析すれば疾患の発症機構の解明や治療薬の開発に役立つものと思われる。

A. 研究目的

ヒトゲノムには約25,000個の遺伝子が同定されているが、その変異が疾患の発症につながるような遺伝子を疾患遺伝子と呼んでいる。現在、Human Gene Mutation Database (HGMD)には1,516個の疾患遺伝子が収録されており、その中にはアミノ酸置換が発症にむすびつくものは1,351遺伝子知られている。疾病を引き起こすアミノ酸置換の中には他の霊長類疾患遺伝子ホモログの正常配列と一致するものがあり、このような配列はヒトでは疾患を引き起こすのに、非ヒト霊長類では生理的になんの影響を与えないことを意味している。ヒトにとって病気を起こす変異が非ヒト霊長類正常遺伝子配列にどの程度存在し、分布するのか、また進化的にどのように出現し、消失していったかを明らかにするため、これまで約8,000個のカニクイザル完全長cDNA配列の網羅的解読により得られた配列情報から、病的置換と一致する配列をコンピューターで検索したところ、8個のカニクイザル疾患遺伝子に9個のアミノ酸置換が見つかった（表1）。さらに近縁な哺乳動物ホモログを検索、収集して、配列をアラインメントすることで、病的配列の種間に置ける分布と進化的消長が分かり、祖先系を推

定できる。これらの結果はヒトにとって正常配列と変異配列のいずれが祖先から受け継がれたか（祖先系）を明らかにするもので、疾病の成因を類推するのに役立つ。

本年度、このような一致例をより多数同定し祖先系の確定をすることで疾病の種類との関係を解明するため、ゲノムの概要配列が公開されたチンパンジーおよびアカゲザルの配列情報についても疾患遺伝子の領域に発症を決定づけるアミノ酸配列があるかどうかを検索した。

B. 研究方法

Human Gene Mutation Database (HGMD)に収録されている1,516個の疾患遺伝子からnonsense変異によるアミノ酸置換が病因として記載されている1,351遺伝子について遺伝子のCDS配列と疾患に関係するアミノ酸置換情報をManualでdownloadした。チンパンジーの疾患遺伝子の配列はNielsenら(Nielsen et al., Nature 437:1153-1157, 2005)がGenBankに登録した11,000個の遺伝子配列からヒト疾患遺伝子1,351個に相当するものをソートした。Nielsenらのチンパンジー遺伝子配列は欠失が多くquery配列の50%前後しか相補的な配列が得られなかった。また他の哺乳

類疾患遺伝子配列については GenBank を検索することで収集した。

C. 研究結果

これまで約 8,000 個のカニクイザル完全長 cDNA クローンについて挿入配列の全長を解読し、収録してきたが、その中から 1,351 個のヒト疾患遺伝子に対応する、300 個のカニクイザルオルソログ遺伝子を選別した。次にヒトに較べてカニクイザルで異なるアミノ酸配列がヒトで疾患に関連して置換したアミノ酸と一致するものを探したところ、8 個の遺伝子で 9 カ所が一致した (表 1)。その一例をあげるとヒトでは Trypsinogen (PRSS1) の 29N (Asn) が T (Thr) に置換すると遺伝性膵炎 (Pancreatitis) を引き起こす (図 1)。29N は Trypsinogen から Trypsin への活性化につながるペプチドの切断点に近傍にあり、29T への変異で活性化が加速され、通常 Zymogen として蓄えられている膵臓で活性化が起き易くなり膵臓細胞を自己消化するために膵炎を起こすと考えられている。チンパンジーやカニクイザルは 29T 型で、活性化され易い Trypsinogen をもつが (図 2) 生のタンパク質を主食とする非ヒト霊長類にとって都合がよい。しかし加熱変性したタンパク質を主食とするようになったヒトでは多量の Trypsin を必要とせず、活性化し難い 29N に変異したと考えられる、食生活への適応が起きたと解釈することができる。

次にヒト霊長類疾患遺伝子ホモログでさらに広範囲に病的アミノ酸置換と一致する例を探すため、すでに報告もしくはデータベースに公開されている配列情報を検索した。チンパンジーに関しては、Nielsen らが PCR で増幅して、解読した約 11,000 遺伝子の CDS の配列情報があるので (Nielsen *et al.*, Nature 437:1153-1157, 2005)、これらより 1,351 個のヒト疾患遺伝子配列に相補性をもつものを検索したところ、1,025 遺伝子が得られた。さらにヒトで病気を引き起こすアミノ酸置換との一致を調べたところ、27 遺伝子で 29 カ所みつかった (表 2)。

これらの遺伝子をカニクイザルで見つかった 8 遺伝子を合わせてみると、37 遺伝子となった。その疾患遺伝子と疾患の関係をみてみると、その 37% は直接病因に関係すると予想される遺伝子で、63% は多

因子疾患の一つか間接的に影響する遺伝子の変異であった (表 1、2)。

これらの 37 遺伝子については変異箇所を進化的変遷をみるため、ゲノムの解析が終了しているアカゲザル、マウス等、哺乳動物でホモログ遺伝子をさがしたところ、チンパンジーおよびマウスではすべてに遺伝子の配列が揃い、アカゲザルとカニクイザルからなるマククでは 32 遺伝子の配列が得られた。その他、公的データベースの BLAST 検索で得られる哺乳類遺伝子ホモログの配列をも集めアラインメントを行った。すなわち変異箇所のアミノ酸配列を他の哺乳類と比較することで病気型配列と正常型配列のどちらが祖先から受け継がれたかが明らかになる (表 3、4)。この祖先型をみてみると 64% が病気型、8% が正常型であり、のこりの 28% は判定不明であった (表 5)。すなわち 64% の疾病の原因となるアミノ酸配列が非ヒト霊長類型であったが、チンパンジーやカニクイザルは病的ではない。これらの遺伝子の多くは節約遺伝子で、飢餓に備えてエネルギーを蓄える遺伝子型をもつチンパンジーやマカクザルは低カロリーの食餌と十分な運動で適合するが現在のヒトの食生活には不適で、症状が顕在化するものと思われる。

D. 考察

昨年まではカニクイザル疾患遺伝子を対象をしぼって解析を進めてきたが、該当するカニクイザル配列が少なく、結果の解釈が難しかったので本年度は他の非ヒト霊長類の疾病関連遺伝子配列にも範囲を広げ、疾病に関係する変異を比較解析して、アミノ酸置換の進化的起源や変異によってもたらされる機能の変化を系統発生的に考察することを目指した。

病的アミノ酸置換の祖先型をみてみると 3 グループに分類された (表 5)。1) 25 サイト (64%) はヒト以外すべての種が病的変異をもつが、非ヒト霊長類では病的症状をあらわさない。ヒトへ進化した後、症状を抑制するようなヒト型 (正常型) の変異が起きたものと思われる。2) 一方、チンパンジーを除いたすべての種が正常型を持つものが 3% 存在した。マカクからチンパンジーに進化する過程で病的アミノ酸

置換が発生し、チンパンジーの種全体にひろまったものと思われる。ヒトでは蔓延することなく一部に止まっており、患者として顕在化したものと予想される。3) 最後に残る確定不能グループ(28%)は病的アミノ酸置換が進化的に遠い種にも不規則に出現するもので、種の生活環境や食性に影響を受けた変異であると予想される。

ヒト疾患遺伝子におけるアミノ酸置換がもたらす遺伝子産物への影響がわかっているものがあるが、*in vitro*の実験で見られる限り、わずかに10%の活性低下をきたすだけという例もあり、ごくわずかな機能低下に反応し、ヒトでは症状があらわれることを示している。それだけヒトの生理調節機構は精密であり、わずかな狂いが疾病に結びつくと思われる。さらに発病に関連するアミノ酸置換のタンパク分子中の位置を調べてみると活性中心付近ではなく、機能にさほど影響しない外縁部分にあるものが多いといわれており、わずかな活性の低下を裏付けるものである。おそらく活性中心に起こったアミノ酸置換は大幅な活性低下をもたらす、機能不全をおこし致死個体を生むため集団中には残る可能性は低い。

E. 結論

アミノ酸置換と発症との関係が明白な1,300個のヒト疾患関連遺伝子に相補性をもつチンパンジー遺伝子1,025個をNielsenらの遺伝子コレクションから選別した。

ヒトでは発症に関係するアミノ酸置換がチンパンジー遺伝子の正常配列と一致する例が27遺伝子中に29カ所認められた。これまでカニクイザル疾患遺伝子で同様の配列を8遺伝子中に9カ所確認しており、これらを合わせて35遺伝子で38アミノ酸置換を収録したことになる。

これらの遺伝子について種間の比較を行うため、すでに公開されているアカゲザル、マウスはじめ他の哺乳動物のホモログ遺伝子配列を検索収集し、遺伝子ごとにアラインメントを行い、アミノ酸置換の祖先型を類推した。祖先型を分類すると1) ヒト以外すべての生物が病的変異をもつもの(64%)、2) チンパンジーだけ病的変異をもつもの(3%)、3) 確定不能なもの(28%)となった。特に大半を占めるヒト以外のすべての生物が病的変異型遺伝子をも

つ疾患には成人病に関連するものが多く、節約遺伝子等で病的変異を野生型としてもツカニクイザルやチンパンジーにとって野生生活では栄養素をできるだけ蓄えることが必要で、病的変異によってもたらされる生理環境に野生の食生活は適合するが、ヒトでは病的変異をもつ個体にとって現在の食生活では栄養過多となり障害をおこすものと思われる。

ここで得た結果は成人病の多くの原因が生活習慣にあり、病的遺伝子型をもつ人はサルやチンパンジーの生活を手本とすれば健康でいられることを示唆するものである。彼らの主食は木の葉で、植物性の低カロリーの食事を心がけ、採食のため1日に数十kmを移動するといわれているので運動を積極的に行えば健康を保つことが可能となる。

このような情報は疾病予防にとって有用で、厚労省医療関係予算の削減に貢献するものと思われる。

F. 研究発表

学会発表

樋田 潤、田沼玲子、平田 誠、高橋一朗、
亀岡洋輔、橋本雄之、長田直樹
非ヒト霊長類におけるヒト疾患関連遺伝子
ホモログの網羅的解析
日本分子生物学会第28回大会 神戸
12月

長田直樹、田沼玲子、高橋一朗、亀岡洋輔、
橋本雄之、樋田 潤
カニクイザルcDNAの解析とデータベース構築
日本分子生物学会第28回大会 神戸
12月

図 1

力ニクイザル疾患遺伝子正常配列中にみられる病的アミノ酸置換

PRSS1Trypsinogen: Hereditary Pancreatitis (遺伝性膵炎)

	Trypsinogen	Trypsin	
ヒト健常	MNPLLILTFVAAALAAPFDDDDKI	IVGGYNCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL	INEQWVVSAGHCYKSR
ヒト疾患	MNPLLILTFVAAALAAPFDDDD	IVGGYCEENSVPYQVSLNSGYHFCGGSL	INEQWVVSAGHCYKSR
力ニクイザル	MNPLLILTFVGAALAAPFDDDDKI	IVGGYCGKNSLPYQVSLNSGYHFCGGSL	INQWVVSAGHCYKSR
		N29T	
ヒト健常	LEGNEQFINAAKIRHPQYDRKTLNNDIML	IKLSSRAVINARVSTISLPTAPPATG	IKGLISGWNTASSGADYPDELQC
ヒト疾患	LENEQFINAAKIRHPQYRKTINNDIML	IKLSSAVINARVSTISLPTAPPATG	IKLLISGWNTASSGADYPDELQC
力ニクイザル	LEGEQFINAAKIRHPNYNRNTLNNDILL	IKLSSPAVINARVSTISLPTAPPAA	IGAKCLISGWNTASSGADYPDELQC
ヒト健常	LDAPVLSQAKCEASYPGKITSNMF	CVGFLEGGKDS	CGDGGPVV
ヒト疾患	LDAPVLSQAKCEASYPGKITSNMF	CVGFLEGGKDS	CGDGGPVV
力ニクイザル	LEAPVLSQAKCEASYPGRITSNMF	CA	GFL
			EGGKDS
			CGDGGPVV
			SNGLQGIV
			SWGDGCAQKPKGVYTKVYVVKWIK
ヒト健常	NTIAANS		247
ヒト疾患	NTIAANS		
力ニクイザル	NTIAANS		

(図2)

病的アミノ酸置換の哺乳類疾患遺伝子における分布

PRSS1
trypsi n 1
Heredit ary Pancreatit is
(遺伝性膵炎)

Human	DDDKIVGGINCENSPY
Human N29T	DDDKIVGGYICENSPY
Chimpanzee	DDDKIVGGYICENSPY
Macaque	DDDKIVGGYCKNSLPY
Bovine	DDDKIVGGYCAENSYPY
Mouse	DDDKIVGGYCFENSYPY

表1. ヒト疾患遺伝子相同カニクイザルcDNA配列にみられる病的アミノ酸置換

Gene	Gene name	Macaque seq.	Accession No.	Mutation	Phenotype
AGT	angiotensinogen	QmoA-10278	CM920010	Met235Thr	Hypertension 高血圧
CETP	cholesteryl ester transfer protein	QtsA-14108	CM994290	Ile405Val	Higher HDL cholesterol level 高HDLコレステロールレベル
DI02	type 2 iodothyronine deiodinase	QtsA-19610	CM021259	Thr92Ala	Insulin resistance インシュリン抵抗性
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	QtsA-16270	CM012769	His264Arg	Increased plasma FFA and glycerol levels 血清遊離脂肪酸、グリセロール上昇
MUT	methylnalonyl-CoA isomerase	AB083319	CM920486	His532Arg	Methylmalonic aciduria メチルマロニル尿症
PRSS1	trypsin 1	UCSC	CM021670	Asn29Thr	Pancreatitis, hereditary 遺伝性膵炎
FCGR2A (GD32A)	Fc fragment of IgG	NM_021642	CM980739	Gln127Lys	Immunoglobulin binding variant IgG結合変異体
FCGR2A (GD32A)	Fc fragment of IgG	NM_021642	CM960640	Arg131His	Lupus nephritis, protection against 腎炎
TTR	transthyretin	QccE-14396	CM992976	Arg104His	Amyloidotic polyneuropathy アミロイド沈着症

機能を亢進し症状を改善する

赤色: 直接病因となる遺伝子、黄色: 多因子疾患の一原因遺伝子が間接的に影響する遺伝子