

論文の内容の要旨

論文題目

cDNA libraries derived from cynomolgus monkey brain: novel gene finding, comparative analysis with human orthologs, and evolutionary considerations.

(カニクイザル脳の cDNA ライブラリー： 新規遺伝子の探索、ヒトオーソログとの比較解析、および進化的考察)

氏名 長田直樹

ヒトの進化を分子レベルで明らかにするためには、ヒト以外の霊長類とのゲノム比較解析が必要であると考えられる。ヒトの生物学的特異性の原因を DNA の塩基置換に遡ることができるとするならば、ヒトと他の霊長類とのゲノム塩基配列比較により多くの知見が得られるであろう。近年、ヒトゲノム解析計画が急速に進められ、2001年2月にヒトゲノムの概要配列が公開された。完全な配列は2003年にも明らかになるといわれている。これに対してヒト以外の霊長類についてのゲノム情報は著しく不足しており（公共塩基配列データベースの Genbank ではヒト以外の霊長類の塩基配列エントリー数はヒトの 0.3%以下である）、十分な比較は難しいのが現状である。本研究ではこれまで、オリゴキャッピング法によって作製されたカニクイザル脳由来ライブラリー（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、小脳、延髄）から約 40,000 のクローンを分離し、その 5'末端配列を決定してきた。カニクイザルはヒトと高度に保存されたゲノムを持っており、グロビン遺伝子クラスター領域の塩基配列比較では、その配列の相違度は約 7%であるとされている。近年になり、カニクイザルが属するマカク属は実験動物としての有用性も大きく取り上げられ、初の遺伝子組み替えサル（アカゲザル）も作られている。次に cDNA ライブラリーを解析に用いることの利点を挙げる。ゲノム DNA の約 95%は遺伝子としての情報を持たない「junk DNA」であると言われており、表現型レベルでの進化を考える場合には、遺伝子間領域についてヒトと他の霊長類との比較を行うよりも、遺伝子として転写、翻訳されている部分を比較する方が効率がよい。cDNA は組織内で発現されている mRNA のコピーであり、ゲノム中で遺伝子と

して発現されている部分だけを効率よく解析することができる。本研究では、1)カニクイザル新規遺伝子の同定ならびにそのヒト相同遺伝子の配列決定、2)ヒトとカニクイザルとの完全長 cDNA 配列の比較、3)ヒトとカニクイザルとの進化において正の淘汰を受けた遺伝子の探索。以上の三点を中心にカニクイザル脳由来 cDNA ライブラリーの解析を行い、その有用性を検討した。

1) 新規遺伝子の探索

ヒトのゲノム配列がほぼ明らかになり、ヒトの遺伝子は 30,000 から 40,000 と推定された。これまでにゲノム配列が解読された他の生物、例えばショウジョウバエやセンチュウなどでは、コンピュータを用いて、ゲノム配列から比較的高精度に遺伝子領域を予測できる。しかしながら、ヒトのような高等哺乳類においては、短いエキソンが長いイントロンに分断されて存在するために、ゲノム配列のみから遺伝子領域を完全に予測することは不可能である。したがってゲノム配列だけでなく、cDNA の全長または部分配列などにより遺伝子を予測することが必要となる。現在多くの大規模プロジェクトがヒト cDNA を用いてヒトの新規遺伝子を収集しようとしている。本研究ではカニクイザルとヒトとの遺伝子の相同性の高さに注目し、カニクイザル脳を用いて新規遺伝子の探索を行った。脳では他の一般的な組織よりも多くの種類の遺伝子が発現していると考えられている。また、cDNA ライブラリーの鋳型となる mRNA は非常に分解速度の速い物質であり、サルと違って新鮮な組織を使うことのできないヒト脳では、ライブラリー作製の過程で多くが失われてしまう。そこで、カニクイザル脳由来ライブラリーから 5'末端配列が遺伝子として公共のデータベースに登録されていないクローン約 1,500 についてその全長配列を決定し、公共のデータベースに登録し、解析を行った。その結果 194 の新規カニクイザル遺伝子が発見された。また、これら 194 の cDNA から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列とその機能についても予測した。更に 29 の遺伝子についてヒトゲノム配列からヒトでの遺伝子配列を予測し、そのうち 21 遺伝子については RT-PCR 法によってヒトの新規遺伝子として発現を確認した。

2) ヒトとカニクイザルとの cDNA 塩基配列比較

新規遺伝子探索の過程で全長配列を決定したカニクイザル cDNA 配列のうち、306 クローンについては既知ヒト遺伝子のコード領域と相同性が見られた。これらは 5'末端配列が未知のものであっても、全長配列を決定すると既知のヒト遺伝子に相当したものである。これら 306 組に Genbank データベースから得られたカニクイザル遺伝子配列とそのヒト相同配列 74 組を加え、それぞれの組について、ヒトとカニクイザルとの cDNA 塩基配列比較を行った。その結果、塩基配列の相違度はどちらの組でも高い順から、同義サイト (Synonymous site)、3'末端非翻訳領域(3'-UTR)、5'末端非翻訳領域(5'-UTR)、翻訳領域平均 (CDS)、非同義サイト (Non-synonymous site)であることがわかった (表 1)。また、得られた値はこれまでの他の研究とほぼ一致する値であった。

表 1

塩基配列のサイトごとの相違度

	5'-UTR	CDS	3'-UTR	Synonymous	Non-synonymous
全長配列決定配列	0.0490	0.0296	0.0498	0.0641	0.0189
Genbank 配列	0.0441	0.0418	0.0520	0.0715	0.0294

3) 正の淘汰を受けた遺伝子の探索

遺伝子進化の中立説によると、遺伝子における有利な変異は数において無視できるほど小さいとされている。ダーウィン進化論による正の淘汰は表現型では多くの例が認められているにも関わらず、その分子レベルでの説明は難しかった。しかし近年の遺伝子情報の増加にともない、MHC、リゾチーム、プロタミンなど霊長類の進化の過程において進化速度が速い、つまり正の淘汰を受けていると考えられる例が多数発見されてきている。そのような遺伝子では翻訳領域の非同義置換率 (Ka) が同義置換率 (Ks) を上回ることが知られている。そこでカニクイザル脳由来 cDNA ライブラリーのうち、前頭、小脳由来の 5'末端配列 21,302、全長配列決定をした cDNA 配列 1,320 についてヒトの遺伝子データベースから相同配列を検索し、ヒト、サル の二配列を整列させたあとに Ka/Ks を算出した。ヒト遺伝子は RefSeq データベースより約 15,000 のヒト遺伝子を対象にした。Ka/Ks が 1 以上のクローンについては全長配列を決定し、再度 Ks/Ks 値を算出した。その結果 12 個の遺伝子について Ka/Ks 値が 1 を上回り、正の淘汰を受けた遺伝子として候補に上がった。12 個の遺伝子のうち 5 つはミトコンドリアの酵素複合体で働く核由来のサブユニットであった。これは、進化速度が速いミトコンドリア由来遺伝子と核由来遺伝子とが共進化を行うという説を支持する結果となった (表 2)。残りの遺伝子は、細胞表面の抗原タンパク (CD59)、アポリポタンパク遺伝子 (Apolipoprotein D)、核内転写因子 (Myeloid cell differentiation antigen)、そして 4 つの機能未知遺伝子 (Hypothetical genes) であった。これまでにヒトとヒヒとの CD59 塩基配列を比較した研究がある以外は、これらの遺伝子については本研究で新たに明らかにされた結果である。これらの候補遺伝子はヒトとカニクイザルの間で進化速度が速いと認められたが、果たしてどちらの系統で進化速度が速くなったのか、などの詳細についてはこれまでの結果からはわからない。そこでシトクローム c 酸化酵素を例に取り、候補遺伝子群の有効性、そして詳細な進化の歴史について調べた。ミトコンドリア遺伝子群のうちシトクローム c 酸化酵素 (Cytochrome oxidase c subunit) は 10 の核由来、3 つのミトコンドリア由来のサブユニットで構成されており、そのうち I, II, IVa, VI, VIIa の 5 つのサブユニットでは霊長類の系統で進化速度の加速が発見されている。このうち今回新たに候補として見つかったサブユニット VIIc, VIII についてはまだ進化に関する報告がされていない。本研究ではこれらの候補遺伝子探索の結果を評価するためにこの二つの遺伝子について更なる解析を行った。ヒトとカニクイザルに加え、コモンチンパンジー、ピグミーチンパンジー、ゴリラ、オランウータン、ヒヒのゲノム DNA から PCR 法により遺伝子領域を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、サブユニット VIIc, VIII の両方でヒト

上科と旧世界ザルの系統において塩基配列の置換速度の加速が見られた。これにより、従来まで発表された 5 つのサブユニット以外にも新たに 2 つのサブユニットが霊長類進化の過程で正の淘汰を受けている可能性を新たに明らかにした。

以上のようにオリゴキャッピング法によるカニクイザル脳由来 cDNA ライブラリーは、ヒト以外の霊長類におけるゲノム解析に非常に重要なリソースであり、今後も精力的に解析されるべきものであるといえる。

表2

Ka/Ks が 1 を超えた遺伝子

遺伝子名	Ka ($\times 10^2$)	Ks ($\times 10^2$)	Ka/Ks	アミノ酸長
Cytochrome c oxidase subunit VIII	11.93	6.37	1.87	69
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit b14.5b	8.75	7.37	1.19	119
CD59 antigen, allele A	8.27	4.90	1.69	128
CD59 antigen, allele B	8.24	7.51	1.10	128
Hypothetical protein MGC2217	7.89	2.79	2.82	85
Cytochrome c oxidase subunit VIIc	7.47	0	∞^*	63
Apolipoprotein D	6.94	5.20	1.34	189
Myeloid cell nuclear differentiation antigen	6.44	6.32	1.02	407
Hypothetical protein FLJ20533	5.05	4.36	1.16	161
Hypothetical protein GW128	4.84	1.62	2.99	63
ATP synthase, subunit F6	4.44	4.12	1.08	108
Ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	4.09	3.60	1.14	91
Similar to testis-specific protein LOC92848	2.45	1.02	2.40	89

*Ks=0 であったため算出できず。