

論文内容の要旨

論文題目: **Molecular evolution of microsatellite repeats in the *ATXN1* and *ATXN10* genes**

(*ATXN1*、*ATXN10* 遺伝子におけるマイクロサテライトリピートの分子進化)

氏名 黒崎 辰昭

マイクロサテライトリピート (1–6bp の直列反復配列) の伸長は、神経疾患、筋疾患、発生障害などこれまでに 40 種以上のヒトの病気に関与することが知られている。リピートの伸長はその他の突然変異と異なり、組織間、世代間でダイナミックに変化し、突然変異率が高い。またより繰り返しの多い配列の方が、少ないものよりも伸長しやすく、リピートがある一定の閾値を超えると病気を発症する。しかし一方でマイクロサテライトリピートはゲノム中に豊富に存在し、その突然変異率の高さからゲノム進化の一要因として指摘されてきた。進化的な観点からヒトとげっ歯類のリピート配列 (poly-Q) の長さを比較すると、病気の原因となるリピートは正常アレルにおいても、ヒトで顕著 (>2 倍) に長い傾向にある。すなわちリピート病原因遺伝子内のリピート配列はヒトに至る進化の過程で急速に伸長したことが想定される。これまでヒトと霊長類数種との比較解析は例があるが、これらリピート配列獲得の進化様式を包括的に示したデータはない。本研究では霊長類進化におけるリピート配列の起源と分子進化を明らかにするため、ヒトとげっ歯類での塩基配列の差異が大きい脊髄小脳変性症 1 型 (spinocerebellar ataxia type 1, SCA1) と脊髄小脳変性症 10 型 (spinocerebellar ataxia type 10, SCA10) の各原因遺伝子 *ATXN1*、*ATXN10* において、霊長類内におけるリピート配列の比較解析を行い、リピートの機能進化的側面を考察した。

1. *ATXN1* CAG リピートの分子進化

SCA1 は、主に脊髄、小脳、脳幹部の神経細胞が変性し、特異的に細胞死に至る進行性の運動失調症である。SCA1 は原因遺伝子 *ATXN1* のエキソン 7 に存在する CAG リピート (poly-Q

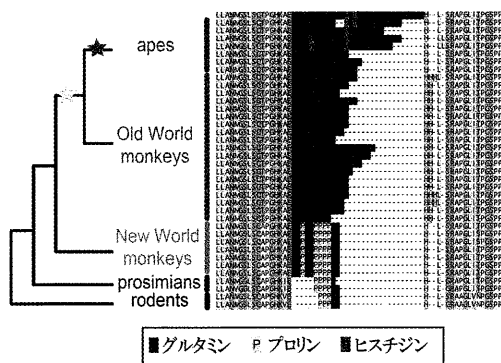


図1: Ataxin-1 poly-Q配列の種間比較

● ★はそれぞれ、霊長類進化において推定されるリピートが多様性を増した時期、リピート中からプロリン残基が消失した時期、リピート中にヒスチジン残基が出現した時期を示す。

可能性がある。本研究では *ATXN1* CAG リピート獲得の進化的起源を明らかにするため、霊長類内の各種において、リピート配列を決定した。その結果、原猿、新世界ザルの *Ataxin-1* オルソログでは明確なリピート構造を形成せず、グルタミンとプロリンの入り混じったモザイク状構造を形成すること、また CAG の繰り返し構造 (poly-Q をコード) は旧世界ザル、類人猿、ヒト共通の遺伝的形質であることを明らかにした (図 1)。さらにこれらリピートの生物種間比較から、リピート構造の長さに多様性があり、比較的リピートの長い類人猿において “Repeat Interruption (RI)” 構造が配列内に出現することを明らかにした。

CAG リピートは、分子内で独特な二次構造 (ヘアピン構造) を形成しやすく、DNA 複製、DNA 修復、組み換えの際に生じるヘアピン構造がリピートの不安定性に深く関与することが指摘されている。従って CAG リピートや RI 構造獲得の分子的背景に関する知見を得るため、DNA の二次構造予測プログラムにより、これら霊長類 CAG リピートの DNA の二次構造比較を行った。その結果、類人猿、旧世界ザル、新世界ザルにおいて独特のヘアピン構造が形成され、リピートの長さ依存的にその構造が安定化することが判明した (図 2)。また RI がヘアピン構造の安定化を軽減することがわかった。RI は、98% の健常なヒトアレルで保持されており、リピートが過伸長した *SCA1* 患者においては通常存在しないことから、リピート配列の伸長を防止する役割があるとされている。従ってこれらの結果は、*ATXN1* CAG リピート (poly-Q) が、霊長類進化の過程、特に広鼻猿類分岐後の共通祖先という段階で獲得され、配列の長さの多様性が増し、リピートが比較的長く伸びた数種 (類人猿、ヒト) において過伸長を防ぐ機構として RI 構造を獲得するに至った進化的シナリオを提示している。

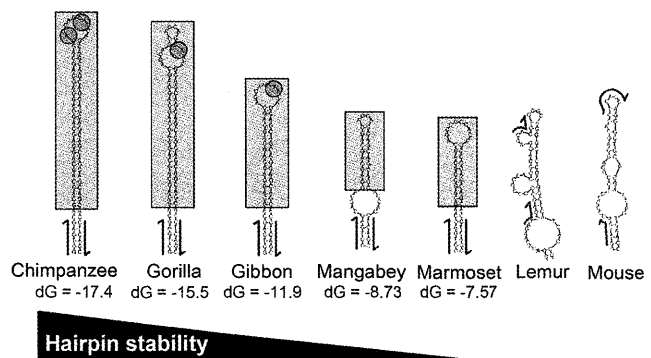


図2: *ATXN1* の CAGヘアピン構造

●はRepeat Interruption, |はCAGリピート前後に位置する相補的な配列、■はCAGヘアピンを示す。

をコード) が 39 リピート以上に過伸長することが原因となる。この CAG リピートはげっ歯類において存在しないが、正常なヒト集団においては、6-44 の範囲に分布を見せる。*ATXN1* によりコードされる *Ataxin-1* タンパク質は分子内に核酸 binding domain を有し、遺伝子発現の調節因子として機能する。また生理学的には *Ataxin-1* は学習と記憶などの形質と関連が指摘されている。特に *Ataxin-1* の poly-Q の長さはヒトの計算能力と正の相関があることから、霊長類進化における CAG リピートの獲得が、ヒトに特徴的な形質 (知能) の進化に寄与した

SCA1の分子病理学的メカニズムとして、poly-Qの過伸長がAtaxin-1の分子構造を変化させ、この変異タンパク質が異常な機能を獲得し、神経細胞特異的に毒性を示すとされている。poly-QがAtaxin-1タンパク質の立体構造形成に重要であることは疑いないが、正常なAtaxin-1のpoly-Qの分子機能に関しては、不明な部分が多い。これまでAtaxin-1のpoly-Qを特異的に認識し結合する因子として、Poly-Q Binding Protein 1 (PQBP-1)が知られている。PQBP-1は発生段階の中枢神経系で発現が強くみられる因子で、特に変異型Ataxin-1 (82Q)と結合し、細胞死を促進させる。従って、霊長類Ataxin-1の機能進化に対するPQBP-1の関与が想定される。Ataxin-1とPQBP-1との結合に関して、これまで変異型Ataxin-1 (82Q)との結合は明らかにされてはいるものの、正常型のAtaxin-1との結合、もしくはグルタミンリピートそのものとの結合は十分に解析されてはいない。従って組み換えタンパク質を発現・精製し、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) によって、これら相互作用の変化を *in vitro* で解析した。その結果正常型Ataxin-1とPQBP-1との間に相互作用が検出された。さらにPQBP-1は旧世界ザル型のpoly-Q (Q11)を認識して結合できるものの、新世界ザル型のモザイク配列 (Q2PQ2P4Q2)とは結合できないことが判明した (図3)。これは霊長類進化、新世界ザル分岐後の共通祖先段階において、Ataxin-1の分子機能変異が起こった一つの証拠と考えられる。

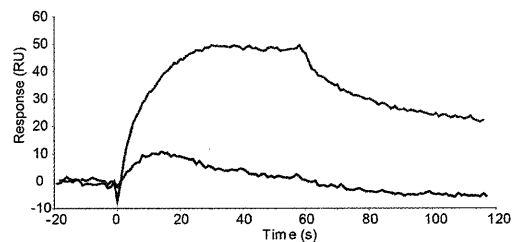


図3: SPR法によるPQBP-1と化学合成ペプチドとの相互作用解析

旧世界ザル型ペプチド(11Q; 赤線)、新世界ザル型ペプチド(2QP2Q4P2Q; 青線)をセンサーチップに固定化し(398, 439RU)、その上からPQBP-1(6.45 μM)を注入した。

2. ATXN10 ATTCT リピートの分子進化

SCA1などコード領域内のマイクロサテライトリピートに対して、非コード領域内に存在するリピート長の変異は組織間、世代間を通じてダイナミックに変化することが知られている。SCA10は、原因遺伝子ATXN10のイントロン9に存在するATTCTリピートの伸長が原因となる。健常者における繰り返し多型の範囲は10-29であるが、患者における範囲は280-4500と非常に大きく、既知のリピート病の原因としては最も大きな変異の一つである。ATXN10遺伝子と相同性のある配列はショウジョウバエや酵母においても確認されており、神経細胞の生死を制御する役割があるとされている。しかしながら、ATTCTリピートの機能的側面は全く不明である。さらにATTCTリピートの起源やその周辺のゲノム構造に関して、ヒト以外の

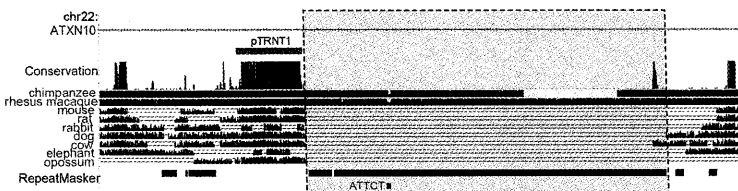


図4: 哺乳類リピート周辺領域のゲノム構造の比較
破線四角で囲まれた領域が霊長類特異的な7.4-kb領域。この内96.2%がトランスポゾン由来。ヒトゲノム中には、この領域のすぐ上流にTRNT1遺伝子の偽遺伝子(pTRNT1)の挿入が見られる。

生物種において全く分かっていない。本研究ではこの5塩基繰り返し配列の進化的な起源を明らかにするため、哺乳類における比較解析を行った。その結果、このリピートは霊長類特異的(図4)であり、また霊長類内では、

原猿、新世界ザルにおいても全く存在しないことが明らかになった。一方、ヒト、旧世界ザル、類人猿の配列比較において、リピート周辺配列は高度に保存されているにもかかわらず、リピート自体の繰り返し単位や長さに多様性があることが判明した(図 5)。ヒト、類人猿のリピートの方が旧世界ザルのものよりも比較的長く、旧世界ザルにおいて CTTGT、類人猿において ATTCT という、それぞれの系統特異的に T-rich なリピートが観察された。さらにこのリピートがトランスポゾン配列中に存在することから(図 4)、周辺のゲノム構造を決定した。その結果、リピートがちょうど LINE1 と *Alu* の境界に位置し(図 5)、また *Alu* の poly (A) tail の 3' 末端側よりすぐ後に続くことから、この 5 塩基繰り返し配列自体、*Alu* の poly (A) tail が変化したものであることが明らかになった。データベース検索により、この *Alu* のサブファミリーは *AluS* (30–50 Mya) と同定され、またこの *Alu* が LTR 型レトロトランスポゾン ERVK (30–40 Mya) の挿入により二つに分断されていることから、その起源は広鼻猿類と狭鼻猿類の分岐年代 (40–50 Mya) に起きたであろう *Alu* のレトロトランスポジションであることが判明した(図 6)。

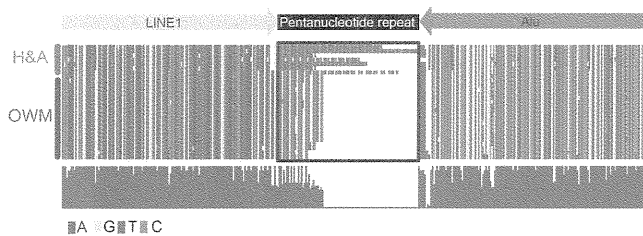


図5:ヒト、類人猿、旧世界ザルにおけるリピート周辺領域の配列比較

四角で囲まれた領域が5塩基繰り返しリピート。ヒト、類人猿(H&A)では繰り返し単位がATTCT、旧世界ザル(OWM)ではCTTGTとなっている。

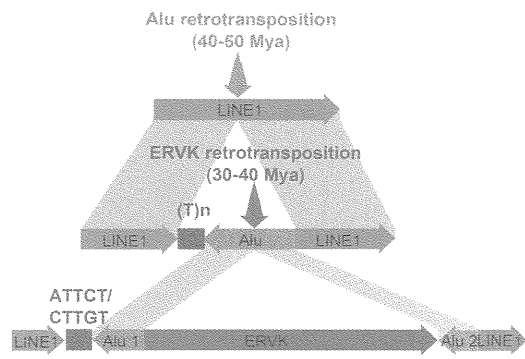


図6:5塩基繰り返し配列の起源

本研究では *ATXN1*、*ATXN10* 遺伝子におけるマイクロサテライトリピートの比較解析を行い、これらリピート配列が霊長類内各種において系統特異的な差があることを明らかにした。特にそれぞれのリピートに関して、その起源は広鼻猿類と狭鼻猿類の分岐年代前後にあることが判明し、霊長類進化におけるこれらリピートの起源が明らかになった。またどちらの遺伝子においても類人猿、ヒトにおいてより長いリピートが保持される傾向があることが判明した。すなわちこれらの遺伝子に関して、神経疾患の危険性を増大させる方向にヒトや類人猿は進化したことを意味する。これらリピート獲得に伴う機能的有意性の有無や、他のリピート病原因遺伝子における分子進化は今後さらに解明されるべき課題である。しかし少なくともこれら遺伝子において、霊長類のゲノム進化と多様性形成の一要因として、マイクロサテライトリピートが大きく貢献したことは間違いない。