

平成22年 4月23日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590634
 研究課題名（和文） 補体 C1s/C1r/C1r-LP の発現調節機構と遺伝子多様性の分子基盤の解明
 研究課題名（英文） Study on molecular basis of expression and structure of complement component C1s/C1r/C1r-LP
 研究代表者
 中川 真由美（NAKAGAWA MAYUMI）
 鳥取大学・医学部・助教
 研究者番号：00243410

研究成果の概要（和文）：補体成分であるヒト C1s、C1r および C1r-LP は、それぞれの遺伝子が12番染色体上に隣接して位置し、遺伝子構造がよく類似している。C1S 遺伝子と C1R 遺伝子は同一の祖先遺伝子の重複により生じ、C1r-LP 遺伝子はさらに C1R 遺伝子が重複して生じたと考えられている。本研究では、非ヒト霊長類の C1S/C1R 遺伝子コーディングエクソン領域の構造を明らかにした。その結果から、C1S/C1R 遺伝子は、重複により発生した後も霊長類において同様の速さで進化していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The human genes for complement components C1s, C1r and C1r-LP are closely located on chromosome 12 and are structurally similar to each other. C1S/C1R genes were generated from a common ancestral gene and C1r-LP gene was generated by C1R gene duplication. In this study, we clarified the coding exon organization of non-human primate C1S and C1R genes, and it was shown that each gene has gone through a similar evolutionary rate in primate after gene duplication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：補体、遺伝子多型、遺伝子多様性

1. 研究開始当初の背景

補体成分であるヒト C1s、C1r および C1r-like protein (C1r-LP) は、それぞれの遺伝子が12番染色体上に隣接して位置し、遺伝子構造がよく類似している。C1S 遺伝子と C1R 遺伝子は同一の祖先遺伝子の重複により

生じ、C1r-LP 遺伝子はさらに C1R 遺伝子が重複して生じたと考えられている。特に、C1s と C1r はその2量体ずつが集まり4量体を形成して C1q とともに C1複合体として働き、機能面でも関連が深い。

欠損症においては、C1s あるいは C1r が単

独で欠損していることはごくまれであり、通常は C1s と C1r がともに欠損するなど動向を同じくすることから、両遺伝子の発現調節機構にも何らかの関連があるのではないかと考えられた。

研究開始当初のヒトの各遺伝子についての研究では、C1S 遺伝子が3者の中では比較的研究が進んでおり、DDBJ、EMBL、GenBankなどのデータベース上で5'側領域も含めた全塩基配列 (AB065437) が公表され、発現調節領域の同定もなされていた。C1R 遺伝子は、1986年に cDNA が報告されて以来数多くの研究がなされながらも詳しい遺伝子構造は明らかにされず、データベース上でコンテックがつながっていなかった。2003年われわれが遺伝子構造を発表してからも¹⁾あまり研究が進んでいなかった。C1r-LP は2002年に初めて報告され、2005年には構造や機能に関する論文も発表されたがそれ以外の報告は少ない。つまり、関連が深いと思われるこれら3つの遺伝子の中で、C1R/C1r-LP 遺伝子についてはまだあまり研究が進んでいないのが現状であった。

1) M. Nakagawa, I. Yuasa, Y. Irizawa, K. Umetsu. The human complement component *C1R* gene: the exon-intron structure and the molecular basis of allelic diversity. *Ann Hum Genet* 67:207-215 (2003)

2. 研究の目的

同じ補体系因子であり、機能、発生面で関連が深いとされる C1S、C1R および C1r-LP 遺伝子について、単独には研究が進められているが、相互関連などを明らかにするための総合的な解析は国内・国外いずれにおいても行われていなかった。われわれは3つの遺伝子の総合的な解析を、日本人、ドイツ人という違う民族間で、さらに非ヒト霊長類について行うことで新しい知見を得ていきたいと考えた。これ以前にはヒト C1R 遺伝子の分子基盤、多様性について解析を行い報告しており、本研究はその結果にひき続き、以下の三つの目的を達成するよう研究を進めた。

①従来行ってきたヒト C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子の多様性の解析を引き続き行い、3つの遺伝子を合わせたハプロタイプ解析によりそれらの遺伝子進化と、法医学分野にお

けるより精度の高い有用な個人識別マーカーの確立を目指す。

②非ヒト霊長類の C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子の構造を明らかにし、解析を行ってこれら補体成分の分子進化について知見を得る。

③C1R 遺伝子のプロモーター領域はまだ同定されていない。遺伝子構造や機能など種々の面で相同性が高い C1S 遺伝子のプロモーター部位と相互比較しながら C1R 遺伝子のプロモーター領域を同定し、機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子多様性の解析

①日本人とドイツ人集団の C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子の多様性について解析し、ハプロタイプを決定する。

②非ヒト霊長類のサンプルを入手し、DNA を抽出する。

③非ヒト霊長類の C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子を PCR 増幅するためのプライマーは、ヒトや他の霊長類で、ゲノムや mRNA が既に報告されているものを参考に遺伝子解析ソフトを用いて作成する。具体的には、まず、推定されるエクソン内にイントロン増幅用のプライマーを作成し、イントロンの配列を決定する。その配列をもとに、イントロンにエクソン増幅用プライマーを作成し、エクソンの増幅と塩基配列の決定を行う。

④イントロンの増幅が困難な場合、ヒトエクソン増幅用プライマーを用いて非ヒト霊長類サンプルを PCR 増幅してみる。増幅が可能な場合は、まずエクソンの塩基配列を決定し、その後イントロンの増幅と塩基配列の解析を行う。

⑤以上の結果をもとに、ヒトおよび非ヒト霊長類の C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子について遺伝子ごとに系統解析を行う。

⑥ヒトおよび非ヒト霊長類の C1S/C1R/C1r-LP 遺伝子について塩基・アミノ酸置換速度を求め比較することで、分子進化の度合い、自然選択の作用などについて調べる。

⑦ハプロタイプ解析と発現調節機構の解析の結果をあわせ、C1s/C1r/C1r-LPの分子進化について総合的に考察し、知見を得る。

(2) C1R 遺伝子の発現調節領域の同定

①既に報告されている C1S 遺伝子のプロモーター領域を参考にしながら、われわれの解析結果およびデータベースから得た C1R 遺伝子配列について、遺伝子解析ソフトを用いてプロモーター領域を推定する。

②発現実験に用いるベクターや、細胞、試薬の準備と、実験設備などの環境を整え、実験条件を検討する。

③検討した条件に従い、DNA 断片を含むベクターを導入した細胞を培養し、その細胞抽出液をルシフェラーゼアッセイ法により分析し、挿入配列のプロモーター活性を測定する。

④プロモーター活性が認められた場合、その領域の様々な欠失 DNA 断片を作製して③と同様に実験を行い、プロモーターとしての最小領域を同定する。

⑤C1R 遺伝子と C1S 遺伝子の発現調節機構の関連を調べる。

4. 研究成果

補体成分である C1s、C1r および C1r-like protein(C1r-LP)の遺伝子は、ヒトでは12番染色体上に隣接して位置し、機能面、発生面で関連が深いとされている。本研究に先立ち、われわれはヒト C1S 遺伝子および C1R 遺伝子の多様性の分子基盤を解明し、日本人およびドイツ人集団についてのハプロタイプ解析を進めてきた。

非ヒト霊長類についてデータベースを検索すると、C1R 遺伝子ではチンパンジー、オランウータン、カニクイザルの mRNA が、C1S 遺伝子はチンパンジーやアカゲザルに関する報告がある程度で、いずれもまだ研究が進んでいないのが現状である。本研究では、非ヒト霊長類としてチンパンジー、ゴリラ、ニホンザルの DNA を用いて C1S/C1R 遺伝子について解析を行った。19年度・20年度には、ヒトエクソン増幅用プライマーを主に用いて C1S 遺伝子と C1R 遺伝子のコーディングエクソン領域を増幅し、塩基配

列を決定して、両遺伝子の分子進化について知見を得た。しかし、それぞれの遺伝子の分子進化に関してさらに深い知見を得るためには、イントロン部分も含めた比較・解析を行うことが望ましい。そこで21年度は同サンプルの C1R 遺伝子のイントロン領域の塩基配列をほぼ決定した。しかし、ヒト C1R 遺伝子でもその長さや配列の複雑性から解析が困難であったイントロン10については、今回のサンプルでも決定しにくく、いまだ不完全な状態である。C1S 遺伝子についても同様にイントロン解析を進めているところである。本研究で、C1S/C1R 遺伝子の霊長類における分子進化を総合的にみることができた。今後はイントロン解析を進め、遺伝子全体の構造を明らかにするとともに分子進化にさらに深い知見を得たい。また、C1r-LPについても同様に解析を進めたい。

以下に、主要な成果をあげる。

(1) 非ヒト霊長類 C1R 遺伝子のコーディングエクソン領域の塩基配列を決定した。

①コーディングエクソンの構造

・すべてのサンプルにおいて、エクソン増幅用プライマーを用いた PCR で増幅産物が得られ、塩基配列が決定できた。得られた塩基配列は C1R 遺伝子のコーディングエクソン (2-12) 領域に相当すると考えられ、データベースのヒト、チンパンジー、オランウータン、カニクイザルの配列と同様に、全長は2115bp で、シグナルペプチド17残基と成熟タンパク688残基の計705残基のアミノ酸をコードしていた。

②塩基配列の比較

・ヒト C1R 遺伝子の中で祖先遺伝子と考えられる C1R*2Ser 型遺伝子の塩基配列と比較すると、チンパンジーは5部位、ゴリラは13部位、ニホンザルは75部位が塩基置換を示した。非同義置換速度は 0.40×10^{-9} /座位/年、同義置換速度は 2.17×10^{-9} /座位/年であった。

ヒト C1R の多様性にかかわる5つの塩基置換部位を比較すると、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、マウスはヒト C1R*2Ser と同じ塩基を示したが、ニホンザルとカニクイザルは C1R*1Ser と同じ塩基を有していた。

③アミノ酸配列の比較

・塩基配列から推定されたアミノ酸配列から、ヒト C1r が属するキモトリプシン型セリンプロテアーゼ群の特徴である His⁴⁸⁵、Asp⁵⁴⁰、Ser⁶³⁷が、オランウータン、カニクイ

ザルと同様に今回のサンプルでも同じ位置に確認された。アミノ酸配列をヒト C1R2Ser型と比較すると、チンパンジーは2部位、ゴリラは4部位、ニホンザルは28部位で置換が認められた。C1R のアミノ酸置換速度は 0.84×10^{-9} /座位/年と計算された。

④系統解析

・塩基配列に基づく系統樹（図1）では、「ヒトとチンパンジーとゴリラ」、「オランウータン」、「ニホンザルとカニクイザル」の大きく3つのクラスターに分類された。また、ゴリラの祖先がヒト・チンパンジーの共通祖先からさきに分岐していた。アミノ酸配列に基づく系統樹も同様の結果を示した。

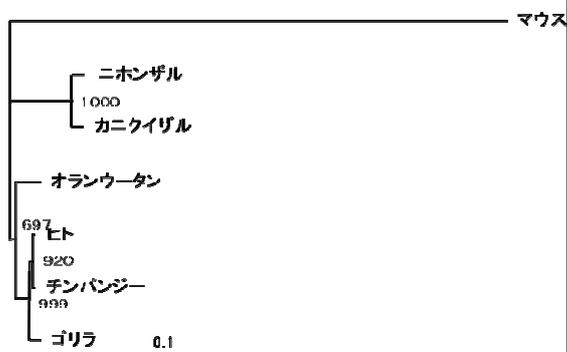


図1 霊長類 C1R の塩基配列を用いた系統樹

(2) 非ヒト霊長類 ((1) のサンプルからニホンザルを除く) の C1S 遺伝子のコーディングエクソン領域の塩基配列を決定した。

①コーディングエクソンの構造

・すべてのサンプルにおいて、ヒトエクソン増幅用プライマーを用いた PCR で増幅産物が得られ、塩基配列が決定できた。得られた塩基配列は C1S 遺伝子のコーディングエクソン (2-12) 領域に相当すると考えられ、全長は2064bp でシグナルペプチド15残基と成熟タンパク673残基の計688残基のアミノ酸をコードしていた。

②塩基配列の比較

・われわれは以前、ドイツ人と日本人それぞれ8名ずつについて、コーディングエクソンとその隣接するイントロン部分の塩基配列を解析した。その結果、エクソン部位に8か所、イントロン部位に2か所変異部位が検出され、日本人集団とドイツ人集団につい

て解析を行い、9つのハプロタイプを観察した。その中の主要な HP1と比較すると、チンパンジーは17部位、ゴリラは13部位に相違が認められた。コーディング領域全体の非同義置換速度は 0.57×10^{-9} /座位/年、同義置換速度は 2.03×10^{-9} /座位/年であった。

③アミノ酸配列の比較

・塩基配列から推定されたアミノ酸配列において、C1r 同様 C1s も属するキモトリプシン型セリンプロテアーゼ群の特徴である His⁴⁶⁰, Asp⁵¹⁴, Ser⁶¹⁷が、今回のサンプルすべてにおいてヒトと同じ位置に確認された。アミノ酸配列を、ヒト C1s の中で祖先型と考えられる C1S1型と比較すると、チンパンジーは7部位、ゴリラは5部位で置換が認められた。C1S のアミノ酸置換速度は 1.15×10^{-9} /座位/年と計算された。

④系統解析

・塩基配列に基づく系統樹（図2）では、ヒトとチンパンジーとゴリラが1つのクラスターを形成した。C1R ではチンパンジーがゴリラよりヒトに近かったが、C1S ではゴリラがヒトに近縁の結果を示した。アミノ酸配列に基づく系統樹も同様の結果を示した。

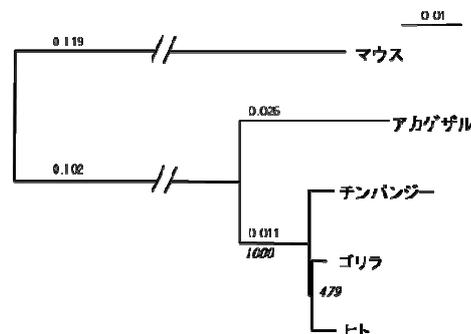


図2 霊長類 C1S の塩基配列を用いた系統樹 (数値は遺伝距離とブートストラップ値)

(3) 非ヒト霊長類 C1S 遺伝子と C1R 遺伝子の分子進化

祖先遺伝子の重複により生じた C1S/C1R 遺伝子の分岐後の進化速度を比較した。例えば、好酸球カチオンタンパク (ECP) は、好酸球由来神経毒 (EDN) 遺伝子の重複により生じた。両遺伝子の塩基の置換率について解析すると ECP 遺伝子の非同義置換率は同義置換率をはるかに上回り、ECP 遺伝子に正の選択が作用したことがうかがえる。(1) (2) より、C1S 遺伝子と C1R 遺伝子のコー

ディング領域全体の同義置換速度と非同義置換速度を求めると、両遺伝子は同様の値を示し、同義置換速度は非同義置換速度の約4～5倍であった。これらは、Insulin-like growth factor IIなど多くのタンパクと類似していた。アミノ酸置換速度も両遺伝子とも同様の値であった。

C1s と C1r はモジュール構造も同じで6つのドメインからなる。ドメインごとの同義・非同義置換速度を求めたが、両遺伝子とも同一遺伝子内のドメイン間に有意な差はみられず、領域による自然選択の違いは認められなかった。

祖先遺伝子の重複により生じたと考えられる C1S/C1R 遺伝子は、霊長類においては同様の速さで進化していた。

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00093633

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①中川真由美、湯浅勲、霊長類の C1S 遺伝子について、DNA 多型、18巻、印刷中、2010、査読なし

②中川真由美、湯浅勲、梅津和夫、斎藤成也、霊長類の C1R 遺伝子について、DNA 多型、17 巻、p165-168、2009、査読無

[学会発表] (計2件)

①中川真由美、霊長類の C1S 遺伝子について、日本 DNA 多型学会第18回学術集会、2009年11月19日、福岡県久留米市久留米大学

②中川真由美、霊長類の C1R 遺伝子について、日本 DNA 多型学会第17回学術集会、2008年11月21日、東京都千代田区日本大学会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 真由美 (NAKAGAWA MAYUMI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00243410

(2) 研究分担者

湯浅 勲 (YUASA ISAO)