

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17018006

研究課題名（和文） 霊長類ゲノムの多様性と反復配列進化

研究課題名（英文） Genome Diversity in Primates and Evolution of Their Reiterated Sequences

研究代表者

植田 信太郎 (UEDA SHINTAROH)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：20143357

研究成果の概要（和文）：

ヒトとヒトに最も近縁なチンパンジーの間の塩基配列での違いは1%余りに過ぎず、ヒトへの進化をもたらした遺伝的背景の謎は深まるばかりである。本研究では上述の1%という値を求めたゲノム中の単一コピー配列ではなく、反復配列に着目して解析をおこなった。その結果、

(1) 脊髄小脳変性症の原因となっているリピート構造はヒトへの進化の過程で獲得された、

(2) 種特異的に存在する単純アミノ酸リピートは表現型に影響を及ぼす、(3) 安定な立体構造をとる単純アミノ酸リピートをもつ遺伝子の進化速度は速い、等を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Human spinocerebellar ataxia type 10 is caused by ATTCT expansion in the ATXN10 gene. We found LINE-1 was inserted into ATXN10 intron; Alu was then inserted in the LINE-1; and endogenous retrovirus K was lastly retrotransposed in the Alu. The ATTCT repeat was located on the 3' -end of the Alu. Using 33 primate species, we revealed that nucleotide substitutions in a poly(A) tail of the Alu element and the following amplification of pentanucleotides occurred in the lineages of catarrhines and that ATTCT repeats originated in the common ancestor of hominoids. Hoxd-13 has taxon-specific polyalanine tracts in amniotes. We replaced the wild-type Hoxd-13 gene with one lacking the 15-residue polyalanine tract. Sesamoid bone formation in knock-in mice was different from that in the wild type. The present study provides the first direct evidence that taxon-specific homopolymeric amino acid repeats are involved in phenotypic diversification at the organismal level. Homopolymeric amino acid repeats are tandem repeats of single amino acids, and are considered to be structurally/intrinsically disordered. We found a number of the repeats predicted to have nondisordered structure and substitution rates showed a higher K_a/K_s ratio for the genes with not disordered repeats than the genes with disordered repeats, showing elevated amino acid substitution rates in genes with nondisordered repeats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,000,000	0	10,000,000
2006年度	8,800,000	0	8,800,000
2007年度	8,800,000	0	8,800,000
2008年度	8,000,000	0	8,000,000
2009年度	8,000,000	0	8,000,000
総計	43,600,000	0	43,600,000

研究分野：分子進化学、分子人類学

科研費の分科・細目：

キーワード：ゲノム、遺伝子、進化、人類学、神経科学、アミノ酸リピート、反復配列

1. 研究開始当初の背景

ヒトの進化をもたらした遺伝的背景を探る研究は1960年代より進められてきたが、ヒトとヒトに最も近縁なチンパンジーの間の塩基配列での違いは1%余りに過ぎず、逆にその謎は深まるばかりであった。

2. 研究の目的

そこで本研究では上述の1%という値を求めた「ゲノム中の単一コピー配列」ではなく、ヒトへの進化の背景となったヒトと他の霊長類の間でのゲノム情報の違いを反復配列（リピート構造）に着目して構造と機能の両面からの比較解析をおこない、ヒトへの進化の過程で生じた遺伝的背景を探った。

3. 研究の方法

(1) 全ゲノム配列を対象としたドットプロット法を用いてゲノム中で直列型の構造をとる反復配列を検出する。これによりゲノム中に存在する「長い配列を単位とする反復配列」と「多くの繰り返しからなる反復配列」のすべてを抽出する。これらの領域についてヒトとチンパンジーの間等での比較により「ヒトに特異的な反復配列領域」を抽出する。

(2) アミノ酸をコードする遺伝子において、ヒトで単一のアミノ酸リピート構造をもつ遺伝子に着目して、原猿から新世界ザル・旧世界ザル・類人猿に至る様々な霊長類におけるそのorthologous遺伝子での様態を明らかにする。同様の分析を単一のアミノ酸リピート構造をもつ様々な遺伝子についておこない、これにより、ヒトへの進化の過程における単一アミノ酸リピート構造の多様性とその進化動態を、最終的には単一のアミノ酸リピート構造をもつ遺伝子全体の動態とヒトへの進化の係わりを探る。(3) ある特定の生物系統群に特異的に存在する単一アミノ酸リピート構造が蛋白ネットワークの中で果たす機能的役割ならびに表現型レベルでの役割を、*in vitro*での再構成系実験および遺伝子ノックイン・モデル動物により明らかにする。

4. 研究成果

霊長類における単一アミノ酸リピート構造の多様性とその進化動態：

ヒトにおいてCAGトリプレットリピートによってコードされるグルタミン(Q)リピートを1ヶ所だけにもつSCA1遺伝子について、4属5種の類人猿、7属13種の旧世界ザル、5属7種の新世界ザル、2属2種の前猿について、それらの遺伝子構造を解

析した。この結果、グルタミンリピートそのものは旧世界ザルから出現しているものの、その基本構造は新世界ザルから、すなわち真猿類において現れたことが明らかとなった。また、ヒトにおいてグルタミンリピートは多くの場合ヒスチジンによってリピート構造の連続性が遮断されているが、このヒスチジンによる遮断は大型類人猿の共通祖先で生じたこと、その後、それぞれの系統でさらに独立にヒスチジンによる遮断が複数回生じてきたことが明らかとなった。また、テナガザルではCAGトリプレットリピートがCAATに置換することによって生じるヒスチジンによる遮断ではなく、コードするアミノ酸自身は同じグルタミンであるがCAGがCAAに置換することによる単純リピート構造の遮断が生じていることも明らかとなった。ヒトにおいてCAGトリプレットリピートによってコードされるグルタミン(Q)リピートを持ち、その異常なリピート回数の拡張によりataxiaを引き起こす遺伝子であるSCA3およびSCA17遺伝子について、4属5種の類人猿、7属13種の旧世界ザル、5属7種の新世界ザル、2属2種の前猿について、それらのリピート構造を解析した。その結果、SCA3遺伝子のグルタミンリピートは霊長類の共通祖先で既に獲得されていたこと、それが原因かどうかは不明だが、リピート構造の連続性の遮断は同義置換、非同義置換を問わず頻繁に生じており、各系統群に特有な遮断が生じてきたことを明らかにした。一方、SCA17遺伝子のグルタミンリピートの出現は霊長類の分岐以前、おそらくは哺乳類の共通祖先で生じていたことが明らかとなった。また、リピート構造の連続性の遮断は同義置換のみが観察され、非同義置換による遮断は観察されなかった。このことは、SCA17遺伝子のグルタミンリピートが単純反復配列（同義配列のみ）であることの生物学的必要性を示唆する。

ゲノムワイドの網羅的解析から各生物分類群における単一アミノ酸反復配列の特徴を抽出するために、ヒトにおいて連続して7残基以上、同一のアミノ酸が並ぶ“単一アミノ酸リピート構造”を網羅的に探索した結果、658遺伝子由来の861“単一アミノ酸リピート構造”が抽出され、それらの構造的特徴として、(1)グルタミン酸、グルタミン、ロイシン、プロリン、アラニン、グリシン、セリン、それぞれのアミノ酸残基からなる単

一アミノ酸リピートが多数を占めていること、(2) その多くは転写ならびに翻訳に係わっている遺伝子であること、(3) 進化的視点から見ると、約85%は哺乳類の系統で単一アミノ酸リピートの長さが保存され、霊長類の系統だけで保存されていたのは約10%であること、が示された。これら“単一アミノ酸リピート構造”における“霊長類進化の過程でヒトへ向かって複雑化していった変異”の特徴を抽出するために、データベースから霊長類を含む哺乳動物におけるオルソログ遺伝子の塩基配列をダウンロードした。しかしこれだけでは原猿から新世界ザル・旧世界ザル・類人猿に至る段階的な霊長類ゲノム情報が著しく不足するため、実験的にオルソログ遺伝子の塩基配列を決定した。これにより上記“単一アミノ酸リピート構造”を、(a) 哺乳動物全般において保存されている“単一アミノ酸リピート構造”、(b) 霊長類の中では保存されている“単一アミノ酸リピート構造”、(c) 霊長類の中で変異が見られる“単一アミノ酸リピート構造”に分類し、各生物分類段階を追った比較をおこない、“哺乳類から霊長類そしてヒトへの進化の過程で変異していった単一アミノ酸リピート”の構造的特徴の抽出を試みた。その結果、上記(a)～(c)のいずれにおいても、ヒトで見られた“単一アミノ酸リピート構造”の特徴である、(1) グルタミン酸、グルタミン、ロイシン、プロリン、アラニン、グリシン、セリン、それぞれのアミノ酸残基からなる単一アミノ酸リピートが多数を占めていること、(2) その多くは転写ならびに翻訳に係わっている遺伝子であること、は共通した特徴であることが示された。しかし、それぞれのアミノ酸残基が占める割合は各群で大きな差異が存在していた。

従来、タンパク質は立体構造を形成し、その立体構造の特徴により他の分子と相互作用することによって機能を発揮すると考えられてきた。しかし最近の研究により、ある特定の立体構造を形成しない領域 (disorder 領域: natively unfolded と呼ばれる) が存在することが知られるようになった。また、これら disorder 領域の中には、機能発現に関与する領域があることが実験的に明らかになると共に、このような領域が高等生物で特に多く見られること、それらは転写調節に関与するタンパク質やDNA結合タンパク質中に多く存在することが示されている。そこで、disorder 領域を取りやすい“単一アミノ酸リピート構造”の有無を検索した結果、おおきく3つのアミノ酸残基グループに分

けられることが明らかとなった。そこで、上記(a)～(c)群についてタンパク質中の disorder 領域の割合分布を調べたところ、各群間に違いが、とくに、「霊長類の中で変異が見られる“単一アミノ酸リピート構造”」である(c)群において disorder 領域の割合分布が他の2群と大きく異なっていることが明らかとなった。

“単一アミノ酸リピート構造”は特定の立体構造を形成しない領域 (disorder 領域) を取りやすく、disorder 領域を取る“単一アミノ酸リピート構造”は大きく3つのアミノ酸残基グループに分けられること、タンパク質中の disorder 領域の割合分布は「霊長類の中で変異が見られる“単一アミノ酸リピート構造”」群において他の2群 (“哺乳動物全般において保存されている単一アミノ酸リピート構造”群、ならびに、“霊長類の中では保存されている単一アミノ酸リピート構造”群) と大きく異なっていることから、単一アミノ酸リピート構造の変化がそれを包含するタンパク質全体へ及ぼす影響を明らかにするべく、disorder 領域の割合が塩基置換へ及ぼす影響を探った。その結果、ある特定の割合となる disorder 領域からなる単一アミノ酸リピート構造をもつ遺伝子では非同義塩基置換速度が統計学的に極めて高い確率で有意に高くなっているとの結果を得た。これは、単一アミノ酸リピート構造の変化がそれを包含するタンパク質へ影響を及ぼしていることを意味している。

ある特定の生物系統群に特異的に存在する単一アミノ酸リピート構造の機能的理解:

ヒトにおいてCAGトリプレットリピートによってコードされるグルタミンリピートを持ち、その異常なリピート回数の拡張により脊髄小脳変性症1型を引き起こすSCA1遺伝子の産物であるAtaxin-1タンパク質の進化機能的多様性を、ヒトAtaxin-1タンパク質のグルタミンリピートを特異的に認識し結合する因子として知られているPQB P-1タンパク質との相互作用の比較から解析した。大腸菌内にて強制発現させた組換えタンパク質を精製し、表面プラズモン共鳴法によって、両者間の相互作用を *in vitro* で解析した。その結果、ヒト型PQB P-1タンパク質はヒト型Ataxin-1タンパク質のグルタミンリピートと類似した構造をもつ旧世界ザル型のAtaxin-1タンパク質は認識して結合できるものの、新世界ザル型のAtaxin-1タンパク質 (モザイク型リピート構造からなる)

とは結合できないことが判明した。霊長類進化とくに新世界ザル分岐後のヒト上科とオナガザル上科（旧世界ザル）の共通祖先すなわち狭鼻類が分岐する前において、A t a x i n-1 タンパク質の機能変異が起こったと考えられる。

アラニン単一アミノ酸リピート構造をもつH o x D 1 3 転写因子に着目して、単一アミノ酸リピート構造の機能的な進化上の意義を探った。ヒトのH o x D 1 3 転写因子の転写活性化ドメイン上に存在するアラニン単一アミノ酸リピート構造について、上記霊長類を含めた多種多様な哺乳類を用いてそのゲノム解析をおこなった。その結果、ほぼすべての哺乳類においてH o x D 1 3 転写因子にはアラニン単一アミノ酸リピート構造が非常によく保存されていた。しかし、哺乳類以外の脊椎動物との間では保存性は低かった。そこで、哺乳動物群に特異的に存在するH o x D 1 3 転写因子のアラニン単一アミノ酸リピート構造の機能的意味を探るために、このアラニン単一アミノ酸リピート構造を人為的に完全欠失させたノックインマウスの作成し、特に四肢の形態に着目して解析をおこなった。小動物用の特殊C T等を用いた詳細な解析をおこなった結果、前肢の形態小変異に関与していることが明らかとなった。また、その形態小変異に関する変異型対立遺伝子の効果は量的であることを示唆する結果も得た。

次に、「H o x d-1 3 転写因子における単一アミノ酸リピート構造の人為的欠失が表現型に及ぼす影響」の研究成果を踏まえ、単一アミノ酸リピート構造の欠失が表現型に影響を及ぼすことが他の転写因子においても観察できるのかどうかを検証するために、ヒトにおいて蛋白コード内に単一アミノ酸反復配列を有し、かつ、脳に特異的に発現しているB r a i n-2 転写因子の単一アミノ酸反復配列のうちで哺乳動物に特徴的な複数の単一アミノ酸反復配列のみを人為的に完全欠失させたノックインマウスの作出をおこない、不致死であるノックイン・ホモ個体においてどのような表現型レベルにおける変異が現れるかを探った。ヒトのB r a i n-2 転写因子の転写活性化ドメイン上に存在する単一アミノ酸リピート構造のうち、アラニン・グルタミン・プロリンそれぞれ1つずつ、計3つの単一アミノ酸リピート構造はマウスを含む哺乳類全般において非常によく保存されている。一方、これらの単一アミノ酸リピート構造は哺乳類以外の脊椎動物

ではほぼ完全に欠けている。そこで、哺乳動物群に特異的に存在するB r a i n-2 転写因子の単一アミノ酸リピート構造の機能的意味を探るために、哺乳動物群に特異的な上記3つの単一アミノ酸リピート構造すべてを人為的に欠失させたノックインマウス”を作出した。基本的行動指標としての自発活動量を測定したところ、単一アミノ酸リピート欠失の雌ホモ個体で明期の活動量が統計学的に有意に低くかった。そこで、エタノール誘発性睡眠時間の測定をおこなった結果、脳内のドーパミン量が低くなっていることが示唆された。以上の結果を受け、今年度は自発活動量以外の行動に生じている変異を探った。一つは、組織化学的手法における脳組織における生体アミン系物質の分布比較である。上記行動解析からドーパミン代謝経路の関与が強く示唆されたため、同代謝経路の律速段階酵素の免疫組織学的分布ならびに発現量に関する定量的解析をおこなった。その結果、ノックイン・ホモ個体の雌において統計学的に有意な発現量変化が明らかとなった。さらに、これに呼応するように、同物質に対するレセプターの発現量に同調的变化が同じく統計学的有意差をもって観察された。加えて、哺乳動物に固有とされている重要な行動様式のへの影響が雌特異的行動として観察された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計7件)

Huang Y-T., Iwamoto K., Kurosaki T., Nasu M., and Ueda S.: The neuronal POU transcription factor Brn-2 interacts with Jab1, a gene involved in the onset of neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters* 382(1/2), 175-178 (2005) 査読有
Kurosaki T., Ninokata A., Wang L., and Ueda S.: Evolutionary scenario for acquisition of CAG repeats in human *SCA1* gene. *Gene* 373, 23-27 (2006) 査読有

Anan K., Yoshida N., Kataoka Y., Sato M., Ichise H., Nasu M., and Ueda S.: Morphological change caused by loss of the taxon-specific polyalanine tract in Hoxd-13. *Mol. Biol. Evol.* 24, 281-287 (2007) 査読有

Kurosaki T., Matsuura T., Ohno K., and Ueda S.: Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurogenetics* 9(2), 151-152 (2008) 査読有

Kurosaki T., Matsuura T., Ohno K., and S. Ueda: *Alu*-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human *ATXN10* gene. *Mol. Biol. Evol.* 26(11), 2573-2579 (2009) 査読有

Gojobori J. and S. Ueda: Elevated evolutionary rate in genes with homopolymeric amino acid repeats constituting non-disordered structure. *Mol. Biol. Evol.* 28(1), 543-550 (2011) 査読有

Kurosaki T., Gojobori J., and S. Ueda: Comparative genetics of poly-Q tract of ataxin-1 and its binding protein PQBP-1. *Biochemical Genetics* (2011) in press 査読有

[学会発表] (計 17 件)

T. Kurosaki, A. Ninokata, and S. Ueda: Molecular evolution of Ataxin-1 CAG repeat in primates. The 55th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA, October 25-29, 2005
K. Onishi, and S. Ueda: Evolution of DSCAM and its related genes. The 55th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA, October 25-29, 2005

M. Nasu, Y. Kataoka, M. Sato, H. Ichise, N. Yoshida, and S. Ueda: Analysis on evolution of nurturing behavior by using knock-in model mouse. Genetic Analysis: Model Organisms to Human Biology (A Genetics Society of America Meeting), San Diego, California, USA, January 5-7, 2006

L. Wang, T. Kurosaki, S. Ji, X. Hu, and S. Ueda: Evolution of Spinocerebellar Ataxia (*SCA*) Genes in Primates. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006) Kyoto, Japan
K. Anan, Y. Kataoka, M. Sato, H. Ichise, N. Yoshida, G. Suwa, and S. Ueda: Phenotypic variation affected by gain and loss of polyalanine tracts in *Hoxd-13*. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006) Kyoto, Japan

M. Nasu, Y. Kataoka, M. Sato, H. Ichise, N. Yoshida, and S. Ueda: Evolutionary Study on Nurturing Behavior of Knock-in Model Mouse. The 20th IUBMB International

Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006) Kyoto, Japan

T. Kurosaki and S. Ueda: Evolutionary alteration of interaction between poly-glutamine tract in ATAXIN-1 and PQBP1. The 11th International Congress of Human Genetics (August 6 - 10, 2006) Brisbane, Australia

T. Kurosaki, T. Matsuura, K. Ohno and S. Ueda: Comparative analysis of the SCA10 ATTCT pentanucleotide repeat indicates the repeat sequence originates from retrotransposons. The 56th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (October 9 - 13, 2006) New Orleans, USA
那須信、阿部由紀子、阿南圭一、片岡由起、佐藤充治、市瀬広武、吉田進昭、植田信太郎: “BRN-2 における哺乳類特異的なドメインは母性行動に関与する” 第 30 回日本分子生物学会年会 (第 80 回日本生化学会大会合同大会)、横浜 (2007/12/11-15)

五條堀淳、植田信太郎: “単一アミノ酸反復配列の霊長類における進化” 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本分子生物学会大会合同大会、横浜 (2007/12/11-16)

T. Kurosaki, T. Matsuura, K. Ohno and S. Ueda: Comparative analysis of the ATTCT pentanucleotide repeat in *ATXN10* gene reveals that the pathogenic repeat derived from *Alu*. Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2007 Annual Meeting, Halifax, Nova Scotia, Canada (2007/7/24-28)

M. Nasu, Y. Kataoka, M. Sato, H. Ichise, N. Yoshida, and S. Ueda: Mammal-specific domain in BRN-2 associated with maternal behavior. The 57th annual meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, California, USA (2007/10/23-27)

那須信、阿南圭一、片岡由起、佐藤充治、市瀬広武、吉田進昭、植田信太郎: “神経系遺伝子 Brn-2 の哺乳類特異的なドメインの in vivo 研究から明らかになったその状況特異的機能” 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007、東京 (2007/9/15)

植田信太郎: “ヒトへの進化と遺伝子・ゲノム研究” 日本人類学会シンポジウム、新潟 (2007/10/6-8)

五條堀淳、植田信太郎: “霊長類における単一アミノ酸反復配列の進化” 第 61 回日本人類学会大会、新潟 (2007/10/6-8)

那須 信、阿部 由紀子、阿南 圭一、片岡 由起、佐藤 充治、市瀬 広武、吉田 進昭、植田信太郎：“B r n - 2 の哺乳類特異的な単一アミノ酸リピートとマウスの養育行動”
第10回日本進化学会年会、東京
(2008/8/22-24)

L. Wang, X. Hu, S. Ji, H. Liu, C. Huan, N. Kozuki, T. Kurosaki, and S. Ueda: Evolution of spinocerebellar ataxia (SCA) genes in primates. The 58th annual meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA, November 11-15, 2008

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/shinka/lab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 信太郎 (UEDA SHINTAROH)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：20143357