

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570224

研究課題名 (和文) 新規ユビキチン受容体遺伝子のエキソン混成進化

研究課題名 (英文) Origin and Evolution of a Novel Chimeric Gene, PIPSL

研究代表者

大島 一彦 (OHSHIMA KAZUHIKO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：60282852

研究成果の概要：エキソンシャッフリングと遺伝子重複の連動から生じた興味深い遺伝子PIPSLを見出した。PIPSL 配列の保存性には種特異性が見られ、特徴的な進化様式を経て現在に至ることが判明した。ヒトPIPSL の分子進化様式を探るために、世界11 地域の人類集団 (125 人) のゲノムDNAを用いて多型解析を行った結果、人類の出アフリカ後に広まったと推測されるハプロタイプが明らかになった。これらは、キナーゼドメインの基質結合部位付近の非常に近接した2つの座位に非同義置換SNPを有する。派生型PIPSLの基質との結合能に影響を与えている可能性が考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：PIPSL、逆転写、加速進化、LINE 1、霊長類、人類集団、多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子重複とエキソンシャッフリング

遺伝子の多くは、既存のゲノム構造の使いまわしにより生じている。まず遺伝子全体かあるいは遺伝子の一部が重複し、やがて機能

分化が生じる。遺伝子全体のコピーに対しては淘汰圧が緩和するため、一般にコピーは急速に変異を蓄積して不活性化されてしまい、新規の機能を獲得するコピーは極めて稀である。一方、エキソンシャッフリングにより

遺伝子内部に新規の機能ドメインを獲得すれば、その遺伝子は速やかに適応進化する可能性がある。しかし些細な変更でも通常は、遺伝子本来の機能や適応度を低下させる場合が多いため、そのような変異が固定することは稀である。申請者等は、両者の長所を兼ね備えたように見える遺伝子新生の新たな例をヒトゲノム中に見出した。その機構には RNA の逆転写反応が関わっている。

(2) 逆転写反応による遺伝子重複

遺伝子重複は、ゲノムの広範な重複の内部に生じるか、あるいは不等交叉の結果として生じることが知られている。しかし、それとは全く異なる遺伝子重複の機構が、特に哺乳類ゲノムで活発であることは、意外に知られていない。細胞の mRNA がレトロトランスポゾン(哺乳類の場合は L1)の逆転写反応により cDNA 化し、ゲノムに挿入され、イントロンを欠いた構造の重複遺伝子を生じるのである。この型の重複配列は“プロセッシング済み偽遺伝子”(processed pseudogene)と呼ばれている。例えば霊長類の場合、申請者等の結果から、およそ 4000–5000 万年前の祖先霊長類のゲノム内で、このような重複配列が爆発的に増大した可能性が示唆されている。名前こそ“偽遺伝子”ではあるが、これらの配列の一部のものはタンパク質や機能性の RNA を産生する“真の”遺伝子 (retrogene) として実際に細胞機能を担っていることが報告されている。ゲノムの統計解析からも、“機能性”偽遺伝子が意外に多いかもしれないことが報告されている。

(3) 逆転写により誕生したエキソン混成遺伝子 PIPSL の発見

このようなヒトゲノムのプロセッシング済み偽遺伝子を精査したところ、エキソンシャッフリングと遺伝子重複の連動から生じた興味深い配列を見出した。この重複配列は、

異なる 2 種類の遺伝子 (リン脂質キナーゼとプロテアソームサブユニット) の RNA がスプライシング過程で連結し、L1 の転移機構により転座した構造を持つ。両者は翻訳フレームを維持したまま融合し、誕生後およそ 2000 万年後の現在もその ORF を保持している。新遺伝子は起源遺伝子と異なり精巣特異的発現を示し、細胞内局在性やキナーゼ活性が親遺伝子とは大きく変化している。またユビキチン化タンパク質との結合活性を示すことから、新たなユビキチン受容体タンパク質であると考えられる。

PIPSL は強い正の淘汰により親遺伝子から急速に分岐したと推定される。その結果、リン脂質キナーゼ活性はほぼ排除され、ユビキチン化タンパク質に対する適度の親和性を保持している。興味深いのは、チンパンジーの PIPSL mRNA は効率的に翻訳されるのに対して、ヒトの PIPSL mRNA は 5' 端近くの 1 ヌクレオチドの欠失の影響により、翻訳効率に大幅に低下している点である。エキソンシャッフリングと逆転写による遺伝子重複から形成されたこの新規の精巣ユビキチン受容体は、急速な雄性生殖遺伝子の進化の新たな事例でもあるといえる。

2. 研究の目的

本研究は、このような経緯で見出された霊長類雄性生殖遺伝子 PIPSL の機能や進化を探り、PIPSL の理解を深めると同時に、このエキソンシャッフリングの明瞭な事例を通じて、シャッフリング後の機能ドメインがたどる進化的変化や、エキソンシャッフリングにおけるレトロトランスポゾンの役割について探ることを目的とした。具体的には、次の二項目を中心に研究を進めた。

(1) 混成遺伝子の系統解析・集団解析

PIPSL の起源を探る。霊長類 (サル、類人猿) のゲノム DNA より、オーソログな遺伝

子座をクローニングし、塩基配列解析により遺伝子の有無や進化的変化の特徴を調べる。また、各類人猿における発現様式を比較する。さらに人類集団における PIPSL 遺伝子配列の多型サイト・多型頻度を調べ、種分化後の進化様式を探る。

(2) 混成遺伝子の機能解析

PIPSL のタンパク質発現系を構築し、精製タンパク質を用いて、結合タンパク質の探索等、生化学的機能解析をおこなう。多様な UIM (ユビキチン相互作用モチーフ) は、ユビキチンやユビキチン様ドメインが関与する様々な細胞過程の基盤として重要であり、PIPSL の UIM 構造の進化的変化がその機能にどのような影響を及ぼしているのか興味深い。また、PIPSL の構造変化は、キナーゼドメイン本来の機能・構造を理解する上でも重要な情報を提供すると期待されるため、PIPSL タンパク質の構造決定に向けた準備を進める。

3. 研究の方法

(1) 混成遺伝子の系統解析・集団解析

① PIPSL の起源を探る

霊長類(サル、類人猿)のゲノム DNA より、オーソログな遺伝子座をクローニングし、塩基配列解析により遺伝子の有無や進化的変化の特徴を調べる。霊長類 DNA (培養細胞由来) は Cell バンク (ECACC: 英国) より入手した。

② 人類集団における PIPSL 遺伝子配列の多型サイト・多型頻度解析

ヒト種分化後の PIPSL 遺伝子の進化様式を探るために、まず日本人の一般集団に由来する DNA を入手し、PIPSL 遺伝子配列の多型を調べる。公的な研究資源バンク (ヒューマンサイエンス振興財団・ヒューマンサイエンス研究資源バンク) より連結不可能匿名化された DNA サンプルの提供を受けた。なお本研究

は、学内の倫理審査会の審査を通過している。③日本人集団の多型データを基礎にして、欧州、アジア、南アメリカ、アフリカ、中国、インド・パキスタン、太平洋等、多様な人種のゲノム DNA (Ethnic panel) を入手し、PIPSL の多型頻度を調べる。サンプルは、米国の Cell バンクより入手した。

(2) 混成遺伝子の機能解析

PIPSL のタンパク質の大腸菌内発現系を構築し、発現量、可溶性等を検討した。また、プルダウン・アッセイにより、PIPSL 結合タンパク質の探索、結合様式の解析をおこなった。PIPSL は UIM (ユビキチン相互作用モチーフ) をもち、ユビキチン関連タンパク質と結合することが予想される。親遺伝子との結合が報告されている Ubl (ユビキチン様) ドメインタンパク質を中心に、PIPSL に対する結合の強度を推定した。

また、類人猿における PIPSL 発現制御の比較をおこなうために、類人猿の組織サンプルの入手を試みた。この目的で、国内の大型類人猿情報ネットワーク (GAIN) にユーザー登録している。利用可能なサンプルの発生 (個体死亡や健康診断時の非侵襲的サンプリング) を待った。

4. 研究成果

エキソンシャッフリングと遺伝子重複の連動から生じた興味深い遺伝子 PIPSL を見出した。この重複配列は、異なる 2 種類の遺伝子 (リン脂質キナーゼとプロテアソームサブユニット) の RNA がスプライシング過程で連結し、L1 の転移機構により転座した構造を持つ。両者は翻訳フレームを維持したまま融合し、誕生後およそ 2000 万年後の現在もその ORF を保持している。PIPSL は起源遺伝子と異なり精巣特異的に発現している。ユビキチン化タンパク質との結合活性を示し、塩基置

換様式の特徴から、過去に強い正淘汰を経て親遺伝子から急速に分岐したと推定されている。

今回解析の対象とした霊長類は、ヒトと類人猿、*Homo sapiens* (ヒト)、*Pan sp.* (チンパンジー)、*Gorilla sp.* (ゴリラ)、*Pongo sp.* (オランウータン)、*Family Hylobatitae* (ギボン)、旧世界ザルの *Macaca fascicularis* (マカク)、*Chlorocebus sp.* (ミドリザル)、新世界ザルの *Aotus sp.* (ヨザル)、*Saguinus oedipus* (マーモセット) の計 9 種である。PCR により PIPSL 領域を増幅させ、塩基配列を決定した。その結果、ヒトと類人猿のゲノム中のみに PIPSL 配列が存在することを確認した。また、PIPSL 配列の保存性には種特異性が見られ、PIPSL は誕生後、特徴的な進化様式を経ていることが判明した。種分化後のヒト PIPSL の分子進化様式を調査するために、日本人のゲノム 50 サンプルを用いて多型解析を行った。約 3500bp の PIPSL 遺伝子領域内に 1 箇所の STRP と 9 箇所の SNP を確認した。タンパク質コード領域の SNP は非同義置換が多く、またヘテロ接合度が高かった。さらに、多型解析の対象を世界 11 地域の人類集団 (125 人) に拡大し、詳細な解析を行った。その結果、人類の出アフリカ後に広まったと推測される 2 つのハプロタイプの存在が明らかになった。これらはいずれも、PIP5K1A 由来キナーゼドメインの基質結合部位付近の非常に近接した 2 つの座位に非同義置換 SNP を有する。これらの変異は派生型の PIPSL における基質との結合能に影響を与えている可能性が考えられる。今後の機能解析により明らかになるものと思われる。

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 Ohshima, K. and Igarashi, K. Tracing the evolutionary fates of the PIPSL retrogene in hominoids. Submitted (2009) 【査読有り】
- ② Babushok, D.V., Ohshima, K., Ostertag, E.M., Chen, X., Wang, Y., Mandel, P.K., Okada, N., Abrams, C.S. and Kazazian, H.H., Jr. A Novel testis ubiquitin-binding protein gene arose by exon shuffling in hominoids. *Genome Res.* 17, 1129-1138 (2007) 【査読有り】

[学会発表] (計 7 件)

- ① 五十嵐久美子、橋本真美、大島一彦 (ポスター)。エキソン混成遺伝子 PIPSL の発現解析。日本分子生物学会、2008 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- ② 五十嵐久美子、大島一彦 (口頭)。エキソン混成遺伝子 PIPSL のヒト集団多型の特徴。日本遺伝学会、2008 年 9 月 5 日、名古屋大学
- ③ Kazuhiko Ohshima & Kumiko Igarashi. Origin and Evolution of a Novel Chimeric Gene, PIPSL. XX International Congress of Genetics. 2008 年 7 月 16 日-17 日、ベルリン (ドイツ)
- ④ Kumiko Igarashi & Kazuhiko Ohshima. Possible selective pressure for an exon-shuffled gene, PIPSL, in human population. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE08). 2008 年 6 月 6 日-8 日、バルセロナ (スペイン)
- ⑤ 五十嵐久美子、竹内智子、胡雪、Daria Babushok、Haig Kazazian、大島一彦 (口頭、及びポスター)。新規エキソン混成遺伝子 PIPSL の翻訳抑制の可能性。日本分子生物学会、2007 年 12 月 14 日、横浜

⑥ **大島一彦**、五十嵐久美子、バブシヨク ダ
リア、カザジアン ハイグ (口頭)。新規
エキソン混成遺伝子の人類集団多型。日
本遺伝学会、2007年9月19日、岡山大
学

⑦ **大島一彦**、宮崎菜穂、五十嵐久美子、Daria
Babushok、Haig Kazazian (口頭)。新規
エキソン混成遺伝子の種特異的進化。日
本進化学会。2007年8月31日、京都大
学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 一彦 (OHSHIMA KAZUHIKO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授

研究者番号：60282852