

平成 23 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790988

研究課題名 (和文) ジストロフィン遺伝子に挿入された動く遺伝子に関する研究

研究課題名 (英文) A study of mobile element inserted into dystrophin gene

研究代表者 栗野 宏之 (AWANO HIROYUKI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：30437470

研究成果の概要 (和文) : 我々は、ジストロフィン遺伝子内に挿入された約 330 塩基の挿入配列を同定した。この挿入配列は約 110 塩基のポリ T 配列を有し、ポリ T 配列を除いた残りの 212 塩基の配列はヒト 11 番染色体と完全に一致していた。これらの特徴から 11 番染色体の一部が逆転写を介し、ジストロフィン遺伝子に挿入されたと考えられた。さらに転写産物の解析から計 452 塩基の配列が 11 番染色体から転写されていることが明らかになった。452 塩基が存在する 11 番染色体の領域には既知の遺伝子が存在せず、またこの配列は既知の蛋白をコードしないため、新規の非翻訳遺伝子と考えられた。

研究成果の概要 (英文) : We identified an approximately 330-bp sequence inserted into dystrophin gene. This inserted sequence had an approximately 110-bp stretch of T, and complementary sequence of the remaining 212-bp perfectly matched with genomic sequence on the human chromosome 11. Our finding suggested that the source region on chromosome 11 was inserted into dystrophin gene after reverse transcription. Further analysis of the transcript revealed that entire 452-bp region on chromosome 11 was actively transcribed. This 452-bp sequence was transcript from a region where no gene had been mapped and had no appreciable protein coding ability. Thus this transcript is currently considered a novel non-coding gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ジストロフィン遺伝子、レトロトランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトが完了し、その塩基配列の特徴からヒトが持つ遺伝子の数は

ほぼ決定されたと考えられている。しかし、我々はジストロフィン遺伝子のエクソン配列に挿入された変異配列の解析からレトロポジション能を有する新しい遺伝子の存在を示唆する結果を世界で初めて得た。本研究の端緒は申請者がジストロフィン遺伝子のエクソン配列内の挿入変異配列を発見したことにある。挿入された配列はポリ T 配列を有するなどの特徴から、転写された mRNA が逆転写をうけてジストロフィン遺伝子に挿入されたレトロトランスポジションによるものと考えられた。レトロトランスポジションをうける配列は別名動く遺伝子とも呼ばれ、レトロトランスポゾンとして分類されてきた。今回発見した挿入配列もレトロトランスポゾンと考えられ、その転写元はヒト 11 番染色体にあると考えられた。ところが、転写元の 11 番染色体の領域には既知の遺伝子が存在してなかった。また挿入配列は L1 や Alu といった既知のレトロトランスポゾン配列と一致せず、これらの特徴から挿入配列は新しい動く遺伝子であることが強く示唆された。よって、この挿入配列は、新しい範疇を形成するレトロトランスポゾンと考えられた。本研究の成果は、ゲノム構造の多様性をもたらす新たな因子の解明をすることであり、この新しい動く遺伝子を世界に先駆けてクローニングするものである。さらに新しく解明された転写調節配列が支配する他の遺伝子の存在を明らかにするもので、人遺伝子数の想定に根本的改革をもたらすのみならず、新しい病因遺伝子の解明を促進するものと期待される。また新しいレトロトランスポゾンの発見は逆転写機序あるいは染色体への挿入機序に関する新しい機構を明らかにするもので、新しい遺伝子治療の手法の開発に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

- (1) レトロトランスポジション能を有する新しい遺伝子のクローニング
- (2) 新しい遺伝子の転写調節機構の解析

3. 研究の方法

- (1) 挿入配列の特徴を直接シーケンス法で解明

研究の発端となった症例は 4 歳の日本人男性である。3 歳時に高 CK 血症を指摘され、4 歳時に行われた筋生検にてジストロフィン染色が陰性であったことから、**Duchenne** 型筋ジストロフィーと診断された。この児の持つジストロフィン遺伝子に挿入された挿入配列や、配列が挿入され

た部位のジストロフィン遺伝子の配列を明らかにして配列のもつ特徴を明らかにする。

- (2) RT-PCR法を用いた新しい遺伝子の高発現臓器の決定

現在明らかにしている配列を解析のスタート点として、RT-PCR 増幅により同産物が得られるように当該配列の転写産物検出法を確立する。その後、成人の各臓器から得られた全 RNA を用いて RT-PCR を実施して高発現している臓器を特定する。

- (3) 高発現臓器における、発現時期特異性の解明

先に同定した臓器の発生段階別に採取された全 RNA を用いて先と同様に RT-PCR 法を行い遺伝子発現が盛んな時期を同定する。

- (4) 5' RACE法を用いた新しい遺伝子の上流の配列の同定

最も発現が強い発生段階の臓器を選び、5' RACE 法を用いて上流の配列を決定する。

- (5) 新しい遺伝子の塩基配列のオープンリーディングフレームの検索と、コードする蛋白の同定

BLAST を用いた Gene Bank などのデータベースやオープンリーディングフレーム予測ソフトを用いて蛋白質の相同性の検討を行う。

- (6) 新しい遺伝子の転写元における転写調節領域の検索

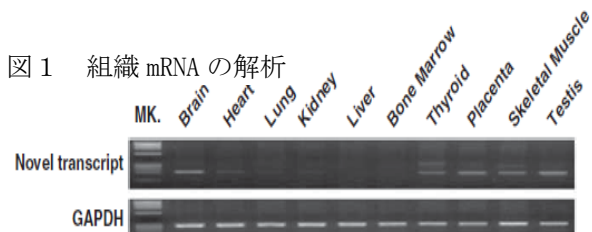
コンピュータを用いて、転写調節配列の検索をおこなう。

4. 研究成果

- (1) 症例で、gDNA を用いて遺伝子変異の検索を行ったところ、ジストロフィン遺伝子エクソン 6 7 内に約 330 塩基の挿入配列を同定した。この挿入配列はポリアデニル化シグナルの相補配列と約 110 塩基のポリ T 配列を認めた。また挿入配列の前後には 3 塩基の Target site duplication を認め、これらの特徴から、挿入配列は逆転写を介した転移により挿入された配列、すなわちレトロトランスポゾンと考えられた。この約 330 塩基の配列が挿入されたジストロフィン遺伝子の配列は既知のレトロトランスポゾンである L1 の

エンドヌクレアーゼが標的とする配列と 1 塩基が異なるのみであった。これらの特徴より、この挿入配列が L1 の逆転写酵素やエンドヌクレアーゼを利用してレトロトランスポジションを起こしたと考えられた。L1 の転移機構が関与されたと考えられる mRNA の転移がこれまでに報告されており、これはレトロトランスポジションのために L1 がコードする蛋白が L1 自身の mRNA のみならず、他の mRNA にも結合するためだと推測されている。L1 の mRNA に比べて他の mRNA が多量に存在するため L1 のコードする蛋白を使用しやすいと考えられ、当該挿入配列も細胞内に多量に存在する mRNA であることが推測された。さらにポリ T 配列を除いた 212 塩基の相補配列はヒト 11 番染色体のゲノム配列の一部と 100% の同一性を認めた。この領域にはポリ A 配列を認めなかったため、11 番染色体の一部が転写され、さらに逆転写を介しジストロフィン遺伝子に転移したと考えられた。なお、この挿入配列は両親に認めず患者の世代で起こった新規の変異である。これは現在も挿入配列が非自律的なレトロトランスポジション能を有していることを示唆している。よって当該配列は、既知のレトロトランスポゾンと同一性がなく、現在も活動性のある、世界ではじめて同定した新しいレトロトランスポゾンであった。

- (2) (1) で同定した配列は既知の転写産物のデータベースにこの配列を認めないため、組織特異度が高いかあるいは発生のある段階にしか発現がない特殊な配列と考えられた。そこで、ヒト臓器の total RNA を用いた挿入配列の発現の解析をおこなったところ、脳、甲状腺、胎盤、骨格筋、精巣に発現を認めた。(図 1)



この中では、脳に最も強く発現を認めたため、次に胎児期の脳を用いて発現を調べたところ、胎児期の脳においても発現を認めた。挿入配列を同定した患者は臨床的に軽度の精神

発達遅滞を認めており、挿入配列の転写産物が脳の高次機能に関与している可能性が考えられた。今後、マイクロアレイ解析などの手法を用いて他の遺伝子に及ぼす影響を調べることで、機能解析につながると考えられた。

- (3) 挿入配列の全長の配列を得るために、最も強く発現を認めた脳の mRNA を用いて 5' RACE を行ったところ、挿入配列の 5' 側に新たに 240 塩基の配列を得た。ゲノム上で、この配列は挿入配列と連続しており、合計 452 塩基の領域が脳で発現していることが明らかになった。またコンピュータと解析ソフト (Genetyx) を用いて、ゲノム上の 452 塩基の上流の配列で、プロモーターの検索を行ったところ TATA ボックスを 4 か所に認め、イントロンを有さない構造もつ遺伝子であると考えた。イントロンを持たない遺伝子として、mRNA が逆転写されてつくられた DNA 配列がゲノム内に挿入されたものをプロセス型偽遺伝子という。この遺伝子は配列の両端に同じ配列を有するという、当該配列と同じ特徴を有する。しかし、当該配列の転写元となる 11 番染色体の位置には既知の遺伝子がなく、これまでの偽遺伝子とは特徴を異にする新しいタイプの配列と考えられた。
- (4) 得られた 452 塩基の配列で蛋白をコードする配列の有無を調べたところ、一番長いオープンリーディングフレームは 29 のアミノ酸をコードするが、このペプチドは既知の蛋白と同一性を認めなかった。よって、この 452 塩基の配列は、ゲノム上の転写活性の明らかでない領域からの新規の非翻訳遺伝子からの転写産物であると考えた。最近、通常は活動をしていない 'ジャンピング遺伝子' が神経前駆細胞において活性化されたという報告がある。この新しい転写産物は、TATA box により発現をコントロールされているが、活動休止中の遺伝子の一つである可能性がある生理学的な役割の解明に、さらなる研究が必要と考える。

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1件）

① Awano H, Malueka RG, Yagi M, Okizuka Y, Takeshima Y, Matsuo M. Contemporary retrotransposition of a novel non-coding gene induces exon-skipping in dystrophin mRNA. Journal of Human Genetics 査読有, 55 巻, P785-90.

〔学会発表〕（計2件）

① 栗野宏之、
Genotype-phenotype correlation of the dystrophinopathy cases with small mutations in the dystrophin gene.
アメリカ小児科学会
2010年5月2日
バンクーバーコンベンションセンター

② 八木麻理子、
High incidence of outlier from the reading-frame rule in dystrophinopathy patients with duplication mutations in the dystrophin
アメリカ小児科学会
2009年5月3日
ヒルトンボルチモア

〔図書〕（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗野 宏之 (AWANO HIROYUKI)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号：30437470

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者