

ヒト及び霊長類の細胞・ゲノムレポジトリの確立

●石田貴文

東京大学大学院理学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

本研究計画では、まず細胞株化法の改良と実際の株化によるアジアにおけるヒト遺伝子研究資材の確立を目指し、さらに、ヒト進化を視座に置き霊長類ゲノムリソースの確立を目標とする。そこで、一般に汎用されているEBウイルスを用いた細胞株化と同時に、汎用型細胞株化法の開発をおこなう。細胞とDNAをバンク化し、生命科学諸分野で活用できる人類共通の財産を目指す。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 種を越えた汎用性、低コスト化を含めた細胞株化技術の改良
- (2) アジア・オセアニアの集団に焦点を当てた細胞の保存・株化・性状解析
- (3) 類人猿から原猿にいたる各種霊長類の細胞株の樹立と性状解析
- (4) 樹立された細胞株よりDNAを抽出し「バンク化」を図るとともに、DNAプレートの試作
- (5) 保存された株化細胞・DNAの保存・供給体制の確立

〈研究期間の成果〉

遺伝子試料の収集と細胞株の樹立については、本年度は倫理指針の関係からヒトに関しては新たな試料収集はおこなわず、現在1,900株ある樹立細胞の整備をおこなった。霊長類に関しては、樹立細胞株は、類人猿から原猿に至る30種、200株になった。

汎用株化法の確立については、EBウイルス法のマニュアルを作成し、使い勝手のモニタリングと、汎用細胞株化法の研修をおこなった。現在、ウェブサイトで3カ国語（和・英・華）で公開すべく準備を進めている。

低コスト化の視点から細胞株化技術の改良については、1検体あたり200ドルかかっていたところを75ドル近くまでコストダウンできた。

使用可能となった試料を用いた研究で、エイズ発症・進行に関連すると言われるSDF1-3'A対立遺伝子のアジア・メラネシアにおける分布の人類学的・分子生物学的背景(5, 15, 21), メラニン合成関連AIM遺伝子多型と3大人種の関係(22), mc1rの多型分布と皮膚色・淘汰説の関係(3, 4)、耳垢遺伝子の分布(1)、を明らかにした。また、霊長類の試料を用い、いくつかのヒトの遺伝的多型の起源を明らかにするとともに(24, 26)、ダイナミックなゲノムの変化を見いだした(2)。9研究機関に試料を提供し共同研究が進められた(7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 20, 23, 27)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

2001年から、中国・台湾・韓国・シンガポールでヒトゲノム研究に巨額の投資がおこなわれている。各国の計画の中にもセルバンク構想があり、中国・シンガポールでは幅広く進められている。シンガポールでは我々の株化法を踏襲しよい成績を上げているように、我々の技術は他を圧倒している。これまでに樹立されたものも合わせ

現在、1,900細胞株を得、今後のヒトゲノム多様性研究資材として有用となった。また、霊長類のセルバンクに関しては、限られた種の細胞を保有している研究機関は内外に多いが、29種から200を超えるものは例を見ず、その需要は増している。これら霊長類のリソースを用い、霊長類ゲノム進化におけるAlu配列の重要性を指摘し、Genome Research誌において高く評価された(2)。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- (1) アジアの政情不安により、当初計画していた調査を見送ったものがあった。
- (2) 新たな倫理指針に沿うべく試料収集を控えることになった。国際共同研究に対応した倫理指針の制定がのぞまれる。
- (3) B及びTリンパ球同時株化法については、ドナー細胞を作製したが、酵素欠損クローニングの選択がうまくいかず、実用まで至らなかった。

〈今後の課題〉

- (1) 倫理指針に対応した集団調査・国際共同研究体制の再建
- (2) ヒトに焦点を当てた進化研究のための霊長類ゲノムレポジトリの整備
- (3) 眠っている試料を活用してもらうための情報発信
- (4) 国内外の研究者への技術移転の面からのサポート

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）
1. Yoshiura, K., Kinoshita, A., Ishida, T., Ninokata, A., Ishikawa, T., Kaname, T., Bannai, M., Tokunaga, K., Sonoda, S., Komaki, R., Ihara, M., Saenko, V., Kaimovich, A.G., Sekine, I., Komatsu, K., Takahashi, H., Nakashima, M., Sosonkina, N., Mapendano, C.K., Ghadami, M., Nomura, M., Linag, D.-S., Kim, D.-K., Garidkhuu, A., Natsume, N., Ohta, T., Tomita, H., Hirayama, K., Ishibashi, M., Takahashi, A., Saitou, N., Saito, S., Nakamura, Y. and Niikawa, N. A single nucleotide polymorphism in the ABCC11 gene is the determinant of the human earwax type: Can we trace the road of ancient Mongoloid migration by this marker? Nature Genetics (in press).
2. Nakayama, K. and Ishida, T. Alu mediated 100kb deletion in the primate genome: the loss of the agouti signaling protein gene in the lesser apes. Genome Research, (in press).
3. Nakayama, K., Soemantri, A., Jin, F., Dashnyam, B., Ohtsuka, R., Duanchang, P., Isa, M.N., Settheetham-Ishida, W., Harihara, S. and Ishida, T. Identification of novel functional variants of the melanocortin 1 receptor gene originated from Asians. Human Genetics, (in press).
4. Soejima, M., Tachida, H., Ishida, T., Sano, A. and Koda, K. Evidence for recent positive selection at the human

- AIM-1 locus in a European population. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23: 179-188.
5. Kimura, R., Nishioka, T., Soemantri, A., Ishida, T. Allele-specific transcript quantification detects haplotypic variation in the levels of the SDF-1 transcripts. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14: 1579-1585.
 6. Oota, H., Pakendorf, B., Weiss, G., von Haeseler, A., Settheetham-I., W., Tiwawech, D., Ishida, T., Rischel, J., Stoneking, M. Recent origin and cultural reversion of a hunter-gatherer group. *Proc. Biol.*, 2005, 3: 536-542.
 7. Tanabe, H., Kupper, K., Ishida, T., Neusser, M., Mizusawa, H. Inter- and intra-specific gene-density correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenetics and Genome Research*, 2005, 108: 255-261.
 8. Kimura, R., Nishioka, T., Soemantri, A., Ishida, T. Cis-acting effect of the IL1B C-31T polymorphism on IL-1b mRNA expression. *Genes and Immunity*, 2004, 5: 572-575.
 9. Nakajima, T., Wooding, S., Sakagami, T., Emi, M., Tokunaga, K., Tamiya, G., Ishigami, T., Umemura, S., Munkhbat, B., Jin, F., Guan-jun, J., Hayasaka, I., Ishida, T., Saito, N., Pavelka, K., Lalouel, J.-M., Jorde, L.B., Inoue, I. Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 complete AGT sequences in worldwide chromosomes. *American Journal of Human Genetics*, 2004, 74: 898-916.
 10. Suto, Y., Ishida, T., Hirai, M. Multicolor karyotyping of six Old World monkey species. *Cytologia*, 2003, 68: 431-436.
 11. Tachikui, H., Nakajima, T., Saitou, N., Hayasaka, I., Ishida, T., Inoue, I. Lineage specific homogenization of the polyubiquitin gene among human and great apes. *Molecular Biology and Evolution*. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57: 737-744.
 12. Suto, Y., Ishikawa, Y., Hyodo, H., Ishida, T., Kasai, F., Tanoue, T., Hayasaka, I., Uchikawa, M., Juji, T. and Hirai, M. Gene arrangement at the Rhesus blood group locus of chimpanzees detected by fiber-FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, 101: 161-165.
 13. Koda, Y., Ishida, T., Tachida, H., Wang, BJ., Pang, H., Soejima, M., Soemantri, A. and Kimura, H. DNA sequence variation of the human ABO-secretor locus (FUT2) in new guinean populations: possible early human migration from Africa. *Human Genetics*, 2003, 113: 1013-1016.
 14. Sugawara, H., Harada, N., Ida, T., Ishida, T., Ledbetter, D.H., Yoshiura, K., Ohta, T., Kishino, T., Niikawa, N. and Matsumoto, N. Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics*, 2003, 82: 238-244.
 15. Kimura, R., Nishioka, T. and Ishida, T. The SDF1-G801A polymorphism is not associated with SDF1 gene expression in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Genes and Immunity*, 2003, 4: 356-361.
 16. Hohjoh, H., Ohashi, J., Takasu, M., Nishioka, T., Ishida, T. and Tokunaga, K. Recent divergence of the HLA-DRB1*04 allelic lineage from the DRB1*0701 lineage after the separation of the human and chimpanzee species. *Immunogenetics*, 2003, 54: 856-861.
 17. Shimizu, Y., Suzuki, J., Terao, K. and Ishida, T. In vitro aging of macaque adherent cells: similar pattern of cellular aging between human and macaque. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2003, 124: 243-250.
 18. Shimizu, Y. and Ishida, T. Spontaneous establishment of a novel Japanese macaque cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-animal*, 2002, 38: 311-313.
 19. Shimizu, Y. and Ishida, T. Somatic mutations in the p53 gene account for the extention of replicative life-span of macaque cells. *Boichem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 295: 644-650.
 20. Dan, I., Watanabe, N.M., Kajikawa, E., Ishida, T., Pandey, A. and Kusumi, A. Overlapping of MINK and CHRNE gene loci in the course of mammalian evolution. *Nucleic Acid Research*, 2002, 30: 2906-2910.
 21. Kimura, R., Soemantri, Ag., Settheetham-I., W., Ohtsuka, R., Inaoka, T., Pookajorn, S., Tiwawech, D., Duangchan, P. and Ishida, T. Anthropological implication of the SDF1-3'A allele distribution in Southeast Asia and Melanesia. *Journal of Human Genetics*, 2002, 47: 117-121.
 22. Nakayama, K., Fukamachi, S., Kimura, H., Koda, Y., Soemantri, Ag. and Ishida, T. Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *Journal of Human Genetics*, 2002, 47: 92-94.
 23. Noda, R., Kim, C.G., Takenaka, O., Ferrell, R.E., Tanoue, I., Hayasaka, I., Ueda, S., Ishida, T. and Saitou, N. Mitochondrial 16S rRNA sequence diversity of hominoids. *Journal of Heredity*, 2001, 92: 490-496.
 24. Kimura, M. and Ishida, T. Chimpanzee Band 3 protein polymorphism and the origin of the band 3 Memphis in humans. *Folia Primatologica*, 2001, 72: 298-300.
 25. Oota, H., Settheetham-I., W., Tiwawech, D., Ishida, T. and Stoneking, M. Residence patterns influence human MtDNA and Y-chromosome variation. *Nature Genetics*, 2001, 29: 20-21.
 26. Kimura, R. and Ishida, T. The human SDF-1 gene polymorphism is located on a mutational hotspot that was identified by the hominoid genome study. *Human Biology*, 2001, 73: 891-895.
 27. Pranomo ZAD, Takeshima, Y., Surono, A., Ishida, T. and Matsuo, M. A novel cryptic exon in intron 2 of the dystrophin gene evolved from intron by creating consensus sequences for splicing in different stages of the anthropoid evolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 267: 321-328.