

疾患原因の探求のための偽遺伝子のゲノム資源としての活用

● 広常真治

大阪市立大学・大学院医学研究科

＜研究の目的と進め方＞

偽遺伝子とは、他の遺伝子座の既知の機能性遺伝子と配列構造がよく似ているが、機能を失ってしまった遺伝子の中で、がらくた (junk) 遺伝子と言われ、DNAの進化のスピードを測る指標として利用される存在にすぎなかった。しかし、偽遺伝子の数は生物の進化と共に増加しており、ヒトのゲノムには20,000もの偽遺伝子が含まれていると言われているが、その生態的意義は未解明のままである。今回、我々は腎臓および骨に異常をきたしたトランスジェニックマウスを用いて (腎臓に多数の嚢胞を有する嚢胞腎疾患型マウス、骨変形マウス)、偽遺伝子が機能性遺伝子の発現調節を行っていることを見出した。本研究課題では今まで省みられることのできた偽遺伝子を網羅的に明らかにし、疾患との関連を解明する。

偽遺伝子 (Makorin1) → 偽遺伝子の種間の網羅的解析



Makorin1の発生における役割の解明

＜研究開始時の研究計画＞

まず、ESTデータをゲノムと比較し、エクソン-イントロン構造をもとにESTが本来の遺伝子に由来するものか偽遺伝子に由来するものかを明らかにする。選り出された候補遺伝子の中から種間を越えて保存されているものに関して、特に細胞レベルで機能が解析できることが期待される遺伝子に関して細胞で過剰発現させもとの遺伝子の半減期や細胞の表現型の変化を解析し機能的な偽遺伝子の例を確認する。

Makorin1の機能解析についてはMakorin1の細胞内の局在、発生・分化における局在の変化、結合タンパク質の同定を試みる。また、Makorin1はGSK3, CK1, PKCなどのリン酸化部位を持っている。これらの領域にリン酸化特異的なモノクロナル抗体を作成し、シグナル伝達におけるリン酸化や局在の変化を解析し、発生期におけるMakorin1の役割を解明する。また、アフリカツメガエルを用いてMO-RNAによるノックダウンや過剰発現によって発生・分化における役割を明らかにする。

＜研究期間の成果＞

まず我々はヒト、マウスのESTを用いて発現している偽遺伝子をサーチした。今回は技術的な問題からprocessed型の偽遺伝子にしぼって行った。その結果、マウスに比較してヒトでは偽遺伝子が多いだけでなく発現している種類も5倍程多いことが推定された (文献4)。

Makorin1の発生・分化における役割を解明するため、我々はMakorin1の細胞内の局在を解析した。Makorin1は細胞膜と核内に存在し、刺激によって核内に移動することが分かった。このことから、細胞外からのシグナルを核内に伝達し、遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。次に我々はMakorin1の核内における標的遺伝子を同定した。Makorin1は核内においてKruppel-like factorと結合し、遺伝子発現のサイレンシングを抑制することにより、遺伝子発現を維持する機能があることが分かった。

Makorin1 → Kruppel-like factor (遺伝子発現の維持)

＜国内外での成果の位置づけ＞

我々は腎臓および骨に異常をきたしたトランスジェニックマウスを用いて (腎臓に多数の嚢胞を有する嚢胞腎疾患型マウス、骨変形マウス)、偽遺伝子が機能性遺伝子の発現調節を行っていることを見出した (Nature 2003)。さらにこのマウスにおいて変異を起こしている遺伝子は形態形成、なかでも細胞極性・細胞間接着を制御している可能性が示唆されている。また、ヒト多発性嚢胞腎の原因遺伝子であるポリシスチンの下流に位置する可能性も示されており、偽遺伝子の役割の解明、新たな遺伝子の制御機構の発見にとどまらず、ヒトにおける難治性疾患の原因解明・新たな治療法の開発に発展することが期待される。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

機能を持った偽遺伝子の同定は発現を正確に評価しなければならず、本来の遺伝子との違いがわずかであるため、データベースのサーチだけでは必ずしも結論的なことが言えないことが分かった。特に、オリゴヌクレオチドを用いたin situハイブリダイゼーションはシグナルが弱く、困難を極めた。

Makorin1の核内標的分子としてZFPファミリーが同定され今後の発展が期待されるが、ZFPファミリーの遺伝子はマウスで300、ヒトでは700以上あると見積もられており、ほ乳類のなかでも最も進化のスピードが速い遺伝子群である。また、ZFPファミリーの中での相同性が高すぎるため、ホモログの正確な対応が難しく、また遺伝子の発現の解析も困難であることが予想される。

＜今後の課題＞

Makorin1は核内において遺伝子発現を維持することにより発生・分化を制御することが分かった。中でもMakorin1はZFPファミリーの遺伝子群と拮抗することが分かってきた。ZFPファミリーの遺伝子はマウスで300、ヒトでは700以上あると見積もられており、ほ乳類のなかでも最も進化のスピードが速い遺伝子群である。またZFPファミリーの遺伝子は高次脳機能を制御する報告が出始めており、ヒトの高度に発達した脳の発生に寄与する可能性が示唆されている。今後は、特にMakorin1の発生・分化における役割の解明に取り組んでいきたい。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. Kazuhito Toyo-oka, Shinji Sasaki, Yoshihisa Yano, Daisuke Mori, Takuya Kobayashi, Yoko Y. Toyoshima, Suzumi M. Tokuoka, Satoshi Ishii, Takao Shimizu, Masami Muramatsu, Noriko Hiraiwa, Atsushi Yoshiki, Anthony Wynshaw-Boris and Shinji Hirotsune. (2005) Recruitment of Katanin P60 by Phosphorylated NDEL1, a LIS1 interacting protein, is Essential for Mitotic Cell Division and Neuronal Migration. Human Molecular Genetics 14:3113-3128
2. Sasaki S, Mori D, Toyo-oka K, Chen A, Garrett-Beal L, Muramatsu M, Miyagawa S, Hiraiwa N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. (2005) Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. Mol Cell Biol. 25: 7812-7827.
3. Kazuhito Toyo-oka1, Shinji Hirotsune, Michael J. Gambello, Zi-Qiang Zhou, Lorin Olson4, Michael G. Rosenfeld, Robert Eisenman, Peter Hurlin and Anthony Wynshaw-Boris. (2004) Loss of the Max-interacting protein Mnt in mice results in decreased viability, defective embryonic growth and craniofacial defects: relevance to Miller-Dieker syndrome. Human Molecular Genetics 13: 1057-1067.

4. Yoshihisa Yano, Rintaro Saito, Noriyuki Yoshida, Atsushi Yoshiki, Anthony Wynshaw-Boris, Masaru Tomita and Shinji Hirotsune (2004) A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J. Molecular Medicine* 82: 414-422.