



かずさDNA研究所ニュースレター

第44号

2011年8月9日



開所記念講演会

2011年10月22日(土)にかずさアカデミアホールで開催します。多くの方々のご参加をお待ちしています。



最近の研究成果

遺伝子変異のモザイク化と病気の発症

ヒトゲノム研究部：小原收ら
(京都大学大学院医学研究科・その他との共同研究)

モザイクはローマの遺跡やヨーロッパ各地の教会、あるいは中東のモスクなどで見られる幾何学的な模様としてよく知られています。そのモザイクと病気が一体どんな関係にあるのか、上のタイトルからおわかりいただくのは困難でしょうが、実は最近、ヒトの血球細胞の集団の中に、ある特定の突然変異をもった細胞が正常な細胞と混じってモザイクのようにになっている場合があり、それが病気の発症と関連しているのではないかということが推測されるようになったのです。本論文は、新しい解析方法を適用することにより、これまでわからなかったことが見えるようになったという報告です。

これまでにもニュースレターで、最近のDNAやタンパク質の構造や機能を解析する機器や解析方法の進歩などを中心に、いろいろな形で進んでいる分子生物学分野の

技術的な変遷を紹介して参りました。実際にこの分野の技術的な進歩には目を見張るほど著しいものがあります。例えば、1990年代から10年以上の歳月をかけて国際協力によって行なわれ、2000年代のはじめに公表されたヒトのゲノム解析では、世界中の何百という研究機関の研究者が協力することによってはじめて一人のヒトのゲノムの解析を終了することができました。しかし、現在では千人規模のヒトを対象に解析が進められ、それによって個人個人の塩基配列の差を詳しく調べ、さらにそれらの人々を長期間追跡調査し、塩基配列の差と病気の発症との関連の時間経過を探ることなどが計画されています。また、例えばヒトの腸内細菌などのように、特定の環境中に生息する多種類の生物を丸ごとゲノム解析するという「メタゲノム解析」なども行なわれるようになってきています。

このような技術的な進歩を踏まえて、個人に生じたゲノムDNAの塩基配列の変化の解析方法も進歩しています。ヒトのDNAを解析するための従来の方法では、肝臓や大腸などの臓器に含まれる細胞の集団（臓器によって異なりますが、わずか1立方ミリメートルの臓器片に含まれる細胞の数はおよそ100万個もあります）からDNAを採取し、それらをまとめて解析することしかできな



財団法人 かずさDNA研究所 <http://www.kazusa.or.jp/>

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 TEL : 0438-52-3956 FAX : 0438-52-3901

かったのですが、最近はもっと細かい単位で調べることが可能になっています。

この論文で研究の対象とした病気は、新生児期に発症し、中枢神経や関節の病変を引き起こすことで知られる自己炎症性症候群（CINCAと略称します）と呼ばれる病気です。この病気は多種類の炎症を引き起こす病気であり、優性遺伝によって子孫に伝達されることと、病気を引き起こす原因としてNLRP3と名付けられた遺伝子に起った突然変異が関与していることがわかっていました。しかし、小児患者の細胞から採取したDNAを従来の方法で解析した結果では、CINCAを発症していると認められる患者のおよそ40%ではNLRP3遺伝子の変異が見つかりませんでした。

この研究では、従来の方法でNLRP3遺伝子の突然変異の見つからなかった小児患者を対象に、NLRP3遺伝子の突然変異のモザイク化の有無を検査しました。研究試料としては、国際協力によってフランス、オランダ、スペインおよび米合衆国から提供された、小児患者の末梢血単核球と呼ばれる細胞あるいは全血（白血球、赤血球、血小板などを含む血液全体）の合わせて20人の試料からDNAを抽出し、PCR法によってNLRP3遺伝子を含むDNA断片を増幅しました。そして、増幅して得られた個々のDNA断片をまずプラスミドにクローン化し、その結果得られたクローンからランダムに96個を選んで塩基配列の解析を行ないました。

もし試料の中に、例えば突然変異をもつ細胞が約5%混じっていたとしますと、そのまま塩基配列解析を行なった場合には、得られた塩基配列データの特定の位置の塩基に約5%の別の塩基が混入していることとなりますが、その発見は非常に困難です（図1をご覧ください）。これに対して、個々のDNA断片をまずクローン化して分けた上で塩基配列解析しますと、得られた塩基配列データの約5%では、特定の位置の塩基が異なっているので判別できるのです。

この研究方法の正しいことを確認するために、小児患者の両親や近親者等うちの19人の健常者の試料、および、すでに解析されて、問題とするモザイク化が報告されている6人の日本人と1人のスペイン人の試料も解析しました。これらの解析を行なった結果、26人のうちの18人（69.2%）の試料には、NLRP3遺伝子の突然変異が見いだされました。そして、そのうちの7種の突然変異はこれまで報告されていないものでした。これらのことから、NLRP3遺伝子の突然変異

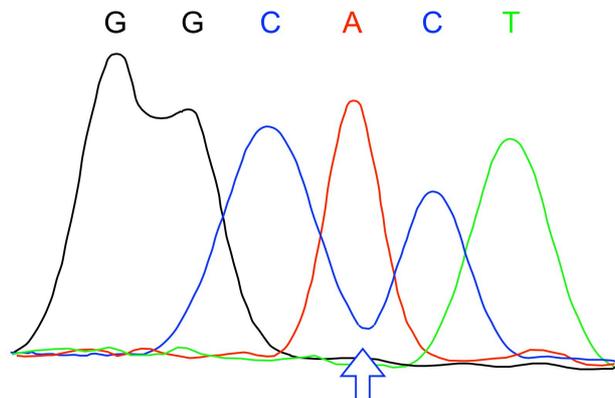


図1：突然変異のモザイク化の検出

図はDNAシーケンサーで検出される塩基のピークを模式的に表したものです。もし、青い矢印のAのピークの位置にCのピークが5%混じっていても、それを検出するのは不可能ですが、解析対象とするDNA断片が予めクローン化されて分けられていれば、全体の5%のクローンでは、この位置にはAのピークはなく、3個のCのピークが連続して出現しますので、突然変異が容易に検出されることになります。

がモザイク状に存在していることでCINCAの発症が引き起こされると結論されたのです。

【ここに紹介したのは、現在印刷中の学術雑誌Arthritis & Rheumatism誌で発表される「慢性の新生児神経性自己炎症性症候群における高頻度のNLRP3の体細胞モザイク化：国際研究センター間の協力研究の成果」という論文（原文は英語）の概要です。】

今月のキーワード

～「最近の研究成果」にでてきた言葉の解説～



体細胞突然変異：通常の遺伝学的な突然変異の定義としては「その変異が生殖細胞を通じて子孫に伝達されること」が前提となっており、したがって突然変異は世代を超えて持続します。一方、生殖細胞以外の細胞（体細胞と総称します）のDNAにもいろいろな突然変異が起こることが知られています。例えば、がん細胞も体細胞突然変異の例ですし、本文で述べましたように、CINCAという病気も体細胞突然変異の例であることとなります。生殖細胞に起こった突然変異が次世代に遺伝するのに対して、体細胞に起こった突然変異はその個体とともに消滅します。

突然変異とその表現型：遺伝子は染色体に含まれるDNA上の一定の区画であり、多くの真核生物ではエクソンという単位に分断されて存在しています。したがって、遺伝子を構成するエクソンのDNAの塩基配列上に生じた変化が突然変異です。さて、多くの場合、突然変異が起こると、正常な個体のもつ「機能が失われる」（loss of function）場合が多いのですが、突然変異によって正常な個体にはない「新たな機能が加わる」（gain of function）場合もあります。例えば、突然変異によって、その変異した遺伝子から作られるタンパク質が他のタンパク質などより強固に結合する場合などは、正常な個体では見られない新たな機能が加わるという現象が生じます。本文中のNPR3遺伝子に生じた突然変異も新たな機能が加わる表現型を示す突然変異の例です。

◆ どんなゲノム こんなゲノム ◆

* 多数の昆虫のゲノムを解析するプロジェクト (2011年6月17日号のBBC: Science & Environment)

ハエや蚊等の昆虫は節足動物と呼ばれ、この地球上でもっとも栄えている分類群であり、およそあらゆる場所に生息しています。また、昆虫の中にはいろいろな病気を媒介するものがあることは今更言うまでもありません。そのような昆虫のうち、DNA物語でも紹介しましたハエの仲間であるキイロショウジョウバエは、古くから遺伝学や分子生物学の幅広い分野で重要な実験生物として研究の対象とされてきたこともあり、真核の多細胞生物の中では線虫に次いでもっとも早くゲノム解析が行なわれ、2000年に解析結果が発表されました。以来、これまでに数種類の昆虫のゲノム解析が進められ、結果が公表されています。今回、昆虫などによって媒介される病気の撲滅を目指す「5000種の昆虫ならびに他の節足動物のゲノム解析の推進」と名付けられたプロジェクトが発足し、世界中で5年間に毎年500億ドルの資金を費やしてゲノム解析を推進していこうということになったそうです。このプロジェクトは、DNAシーケンサーの進歩によってゲノム解析がより低価格になったことを踏まえて、なぜある種の昆虫は病気を媒介するのにその近縁種は媒介しないのかということゲノム比較によって明らかにし、さらに、例えばマラリアを媒介する蚊に寄生するカビと宿主である蚊の免疫機構との関連をゲノムデータに基づいて研究することでよりよい「生物殺虫薬」を製造する方法を確立すること、一般に害虫と近縁の益虫との差異を明らかにすることによってより有効な殺虫薬を作ることなどを目指すということです。

* ジャガイモのゲノム解析 (2011年7月14日号のNature誌に掲載)

ニューズレター第42号 (2011年6月) の「最近の研究成果」の項で、ナス科のモデル植物としてのトマトについてゲノム解析を含めて最新の研究状況について述べ、その中でジャガイモについても簡単に触れました。ジャガイモはトマト、トウガラシ、タバコと並んで南米原産のナス科を代表する世界的に重要な作物であり、中世の大航海時代以降のヨーロッパの食糧事情を大幅に変えた作物だと言われています。2009年のFAOの統計によれば、全世界で3.3億トンのジャガイモが生産されて消費されているということです (日本の生産量はわずか275万トンで世界の0.85%)。今回、中国、オランダ、アメリカ合衆国など13カ国の約30の研究機関の研究者らにより、8億4,400万塩基 (イネの倍の大きさ) と推定されるジャガイモのゲノムの85%強のゲノムデータが解析され、公表されました。その結果によれば、3万9,000個あまりのタンパク質を作る遺伝子が同定され、またジャガイモのゲノムは過去少なくとも二回の倍化 (ゲノム全体が二倍になること) が起こったことが推測されるということです。さらに、ジャガイモではこれまでに行われてきた近親交配による機能低下が予想されるということで、今後の品種改良にゲノム解析結果をどのように活用できるかが問われることになりそうです。



DNA物語 (17)

前回のDNA物語で、大腸菌のファージと宿主の関連を解析する過程で発見された「制限」という現象の解析から、異なる生物に由来するDNA分子を人工的に切断して再結合させるという「組換えDNA技術」が誕生したことを述べました。今回は、こうして確立された組換えDNA技術の応用から生れた「遺伝子クローニング」について述べ、さらにそれに密接に関連するDNAの塩基配列を決定する方法について述べます。

前回代表的な制限酵素としてEcoRIとBamHIの二つの例をあげ、これらの二つの酵素がDNAの塩基配列中にある6塩基の「回文配列」 (塩基の回文配列は、塩基配列がまったくランダムだとしますと4,096塩基に一回起こります) を認識して左右対照的に切断することを説明しました。その折に簡単に触れましたように、これらの酵

素によって切断された断片の末端の塩基配列はすべて同じであり、突出した4塩基の一本鎖の配列 (EcoRIではAATT、BamHIではGATC) をもっています。この切断片の突出した部分は互いに相補的で親和性をもっていますので、同じ酵素で切断した断片を混合することで断片同士を「繋ぎ合せること」が可能になります。したがって、もし大腸菌の細胞内で自律増殖する (大腸菌のDNAとは独立に増える) 能力をもつファージやプラスミドなどのDNAを同じ酵素で切断して加えますと、ファージやプラスミドなどに目的とするDNA断片が結合されたものができることになります (図1をご覧ください)。

ところで、一般に有性生殖を経ないで生じた細胞集団はクローンと呼ばれます。例えば、植物の接ぎ木や挿し木によって得られる個体はすべて同じクローンです。クローンの特徴は、もとの個体のDNAと同じ塩基配列のDNAをもっていることです。その後このクローンの意味が拡張されて、「塩基配列の変更を起こすことなく自律

増殖させたDNA集団」もクローンと呼ばれるようになり、それにしたがって、ファージやプラスミドなどに目的とするDNA断片を結合させて増殖させ、均一なDNA集団を得ることを「クローン化する」（クローニング）と呼ばれるようになったのです。そして、クローニングの技術を用いることにより、いろいろな生物の遺伝子を含むDNA断片を大腸菌や酵母などの微生物で増やすことが可能になり、それによって、研究対象とする遺伝子から作られるタンパク質を大量に得ることも可能になったのです（ただし、そこにはいくつかの付随する問題があるのですが、専門的になり過ぎますので割愛させていただきます）。

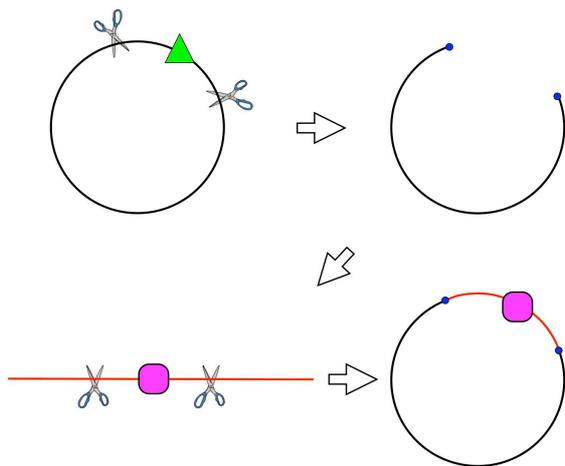


図1：制限酵素を用いたDNAクローンの作成

DNAを切断する制限酵素はしばしばハサミにたとえられます。前回説明しましたように、このハサミで切断したDNAは切り口が同じ形のギザギザをしています。そのことを利用して、ある生物の遺伝子を含む断片を環状のプラスミドに埋め込む様子を模式的に示しました。もとのプラスミドには目印となる遺伝子（▲）があります。まずこのプラスミドを制限酵素で切断し、次に、目的とする遺伝子（■）をもった生物のDNAを同じ制限酵素で切断して混合し、リガーゼという「のり」役割をする酵素で結合し、もとのプラスミドにあった目印の▲はもたず、代わりに■をもつものを選択するのです。

こうして、制限酵素をハサミのように用いてDNAを切断し、リガーゼと呼ばれる結合酵素をノリのように用いて再結合させて用いることにより、自然界では起こることのない人為的なDNAの組換えを起こすことができるようになりました。これが遺伝子クローニングの方法です。それまでは遺伝子の機能を知るための方法としては突然変異株を遺伝学的に解析するしかなかったのですが、この方法によって対象とする遺伝子をクローン化すれば、その遺伝子の作るタンパク質の生化学的な性質や働きを直接調べることができるようになりました。その後遺伝子クローニングの方法はいろいろな方面での研究に応用され、やがてこれまでは非常に困難であった病気の治療にも用いられるようになりました。たとえば、成長ホルモンの不足によって引き起こされる病気の患者さんを治療するために、成長ホルモンの遺伝子をクローン

化すれば、成長ホルモンを大量に作らせることができますので、得られたホルモンを抽出して純化した後に患者に投与するのです。成長ホルモン以外にも、遺伝子を微生物にクローン化することで安価でかつ大量に得られるようになったタンパク質製剤はたくさんあります。

一方、このようにして遺伝子のクローニングの方法が確立したのとほぼ同じ時期に、DNAの塩基配列（G, A, T, Cの4種の塩基の並び）を解読する二つの方法が編み出されました。一つは化学的な分解による方法で、他は酵素を用いた合成による方法です。どちらの方法も、部分的な分解反応または合成反応の過程を工夫することで得られる、末端に既知の塩基（G, A, T, Cのどれか）をもつ断片を、電気泳動という方法で長さの順に並べることによって塩基配列を解読するのです（図2をご覧ください）。後者の方法（発明者の名を冠して「サンガー法」と呼ばれます）では、用いる酵素の改良や塩基の検出方法などの改良が重ねられ、1990年代になって、DNAシーケンサーという機器として自動化され、上述したDNA断片のクローニングの方法と相まって、生物のゲノムDNAのすべての塩基配列を解析するという「ゲノム解析」の実現に至りました。こうして生物学は、生物の生命活動を支える根幹の情報であるゲノムDNAの塩基配列を基盤とした新しい時代に入り、ゲノム情報学という、コンピューターを駆使してゲノムDNAの塩基配列のもつ意味を解析する分野も登場してきました。

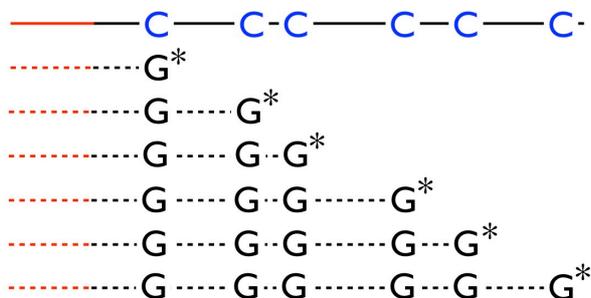


図2：サンガー法によりDNAの塩基の並びを決める方法

DNAは4種類の塩基のならんだ長い二本のらせん状の分子が、互いにG-CおよびA-Tの相補的な対合で支えられています。DNAの複製（コピー）に当たってDNA合成酵素は、一方のらせん（鋳型と呼ばれ、図の最上段に示します）の塩基配列を、G-CおよびA-Tの相補性にしたがって、プライマーと呼ばれる部分（図の左端の赤い部分）からコピーして伸長していきます。そこで、このコピー反応の際に、通常のGに加えて、Gと構造的に類似したG*を少量混ぜるのです。G*が一旦取り込まれますとコピー反応はそこでストップするようになっています。したがって、G*を混ぜたコピー反応の生成物は、図に示しますように、末端にG*をもち長さの異なるDNAの混合物になります。同じような反応を、A*, C*, T*で行ないます。全体の反応生成物のそれぞれは、他に比べて必ず1塩基だけ長さが異なっていますから、それらを電気泳動によって長さの順にふるい分けするのです。G*, A*, C*, T*にはそれぞれ異なる蛍光を発する色素が付けてありますので、DNAシーケンサー内を通過していくDNA断片の蛍光を検出することにより、G, A, C, Tの並びが判別できるようになります。



トピックス

眼は再生する

昔は田舎なら田んぼや池などでしばしば出会うことのできたイモリ（アカハライモリ）も、最近では見つけることがかなり困難になっており、イモリを知らない子供が増えているようです。イモリは、2006年の環境省の区分で準絶滅危惧種に分類されており、埼玉県などでは県の条例で捕獲を禁じているということです。同じ両生類でもカエルは数も種類もかなり多く見かけますが、繁殖力が強いと言われるイモリのが数が減っているのはどうしてなのでしょう？

イモリは昔から再生力の高い脊椎動物として有名で、尾や指の再生に際しては骨まで再生することが知られています（トカゲは「しっぽ切り」で有名ですが、尾の骨は再生しません）。また、イモリは尾や指だけでなく、眼のレンズを再生する能力を持っていることも古くから知られていました。そして、眼のレンズの再生の過程を詳細に観察した結果、発生過程での眼のでき方と、成体になってからの眼の再生は異なるものであり、眼のレンズの再生では、虹彩（眼の中心部にあるいわゆる「黒目」の部分）の細胞が変化して生ずることが報告されました。さらにイモリで眼の再生の実験をくり返して行った結果、16年間に18回眼を失っても再生したという驚くべき結果も報告されています。

イモリの眼の再生の研究が進む過程で、研究者の中には、鳥類やほ乳類でも同じように眼の再生ができないかと考え、ニワトリやマウスの眼の再生にチャレンジする人も現れました。その結果、鳥類やほ乳類でも黒目の細胞を培養し、そこに特定の成体因子を加えることでレンズの形成を誘導できることがわかったのです。さらに、この過程を詳細に解析した結果、黒目の細胞の中には、眼の働きに関与するいろいろな細胞を作り出す能力をもつ「幹細胞」が含まれているのではないかと考えられるようになりました。もしこの考えが正しいとすれば、将来は自分の黒目の一部を使って再生させたレンズを用いることで、機能しなくなった眼のレンズの治療ができるようになるかも知れません。

決まった形をもたないタンパク質

これまでの教科書では、酵素（タンパク質）とその酵素が作用する相手の化合物（基質と呼ばれます）は、基質の形と酵素の作用部位の形がちょうど鍵と鍵穴のような関係になっていると説明されてきました。この考えは、19世紀末のドイツの化学者であったエミール・フィッシャーによって提唱されたものです。この対応関係は酵素の「基質特異性」と呼ばれ、免疫を司る抗体とその作用する相手である抗原との間の特異性ととともに、高度な構造的対応関係の例としてよく知られています。

ところが、1990年代になると、タンパク質の中にはこのようなルールに従わないものがあるということが報告されるようになりました。その最初の例が、カルシウムによって活性が調節されるカルシニューリンという酵素です。この酵素タンパク質の結晶の構造解析が行なわれた結果、もっとも重要な基質に結合する部位の構造がはつきりしないというのです。一般にタンパク質の構造解析は、そのタンパク質のよい結晶を作り、その結晶をX線回折（レントゲン診断に用いられるX線がタンパク質の結晶内を通過する際に回折される（曲げられる）のを測定する）と呼ばれる方法で解析します。もしタンパク質の結晶の一部が規則的な構造をもたない場合には、その部分からはきれいなX線回折像が得られず、したがって構造はわからないこととなります。

そこで、どれだけ多くのタンパク質に構造の定まっていない部分があるのかということを生物情報学分野の研究者がいろいろなコンピューター・プログラムを書いて調べてみたところ、大体40%のタンパク質に構造の不定な部分があるという結果がわかりました。最近では、X線回折に代わってNMR（核磁気共鳴：病気の診断にも用いられています）がタンパク質の構造解析に威力を発揮していますが、NMRでタンパク質の構造解析をしている研究者の間では、部分的に構造の定まっていないタンパク質のあることはほぼ常識になっており、そのことがタンパク質の柔軟性をもたらしてきたのではないかという意見もあるということです。こうした現状から、今後、タンパク質を含む生物の構造にどれだけ柔軟性があるかについての研究の進展が期待されます。

<今月の花>

ミゾホオズキ (ゴマノハグサ科)

Mimulus nepalensis

(2010年8月7日撮影)

北アルプスなどの山に登ると、途中でこの花に近縁のオオバミゾホオズキによく出会う。数年前知人に教えていただいて、房総にもミゾホオズキのあることを知ったが、その折りに見つけたミゾホオズキは全体として小型で派手さがなく、山の沢のほとりの河原にひっそりと咲いていた。以来、毎年この季節になると尋ねて無事を確認している。

