

氏 名	イ 李 ジュ 珠 ミ 美
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	論 理 博 第 1455 号
学位授与の日付	平 成 16 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Molecular Genetic Analysis of Human Endogenous Retroviruses (HERVs) in Primates: Expression, Evolution and Phylogeny (霊長類におけるヒト内在性レトロウイルス (HERVs) の分子遺伝学的解析: 発現, 進化, 系統)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 中 修 教 授 三 上 章 允 教 授 林 基 治

論 文 内 容 の 要 旨

レトロエレメントはゲノムの中で置換し動くエレメントである。その複製過程には RNA 中間体を經由する。レトロエレメントはレトロポゾン, レトロトランスポゾン, 内在性レトロウイルスに分類される。この分類は増幅の様式とそれらの一般的な性質, 長末端反復配列, 逆転写酵素, 外殻タンパク質遺伝子の有無である。

ヒト内在性レトロウイルス (HERVs) は1000万年から4000万年前に霊長類のゲノムに取り込まれたと考えられており, それらは200種類以上のグループ, サブグループに分類されている。霊長類の進化過程において, それらはゲノムの中で継続的に増幅し, HERVs とその部分構造である長末端反復配列 (LTR) を含めるとヒトのゲノムの8%を占める。最近ヒトゲノム中に少なくとも26種類の HERV ファミリーの存在が分子系統解析により明らかにされている。今回の研究において興味ある HERV ファミリー (HERV-H, HERV-W, HERV-E, HERV-T) の系統関係解析, 遺伝子の発現について霊長類ゲノム, サルの組織を用いて調べた。

最初の章では, HERV-H, HERV-E についてヒト単染色体 DNA で新しいエレメントを発見し, ヒト上科霊長類 DNA で調べ, それらのヒト染色体, ホミノイドでの進化過程について考察した。ヒト単染色体 DNA の PCR 分析により HERV-H *env* 遺伝子は8, 13, 21, 22番染色体を除くほとんど全ての染色体で検出された。HERV-E *env* 遺伝子もヒト5, 9, 18, 20, 21, 22番染色体を除く多くの染色体に存在している。この遺伝子は類人猿, 旧, 新世界ザルにおいても存在するがキツネザル, ギャラゴ等の原猿類では見いだされない。ヒト単染色体よりの75および類人猿の25クローンの塩基配列を決定, 系統樹を描いた。グループ I と II が識別され, グループ II は4000万年, グループ I は1000万年前に霊長類のゲノムに入り込み増幅を始めたと推測した。

第II章においては, 旧世界ザルに属するニホンザルについて HERV-W と HERV-E ファミリーについて調べ, ニホンザルの臓器について HERV-W の構造遺伝子, HERV-E *env* 遺伝子の発現について RT-PCR 法により調べた。HERV-W *env* 遺伝子は, 精巣, 前立腺, 腎, 小脳, 甲状腺, 脾, 小腸, 胃, 卵巢等調べた全ての臓器で発現していた。HERV-E *env* 遺伝子は発現が少なく, 上記の臓器の中で, 小脳, 卵巢では発現していなかった。これらの RT-PCR で得られたクローンの塩基配列の系統樹から二つのグループがあることが明らかとなり, それらのゲノムへの進入あるいは増幅は4000万年と1400万年前と計算された。

第III章では新世界ザルのリスザル臓器について HERV-T ファミリーの発現を RT-PCR 法で調べ, それらの系統関係について調べた。HERV-T *pol* 遺伝子は, 小脳, 肝, 肺, 脾で発現がみられ, 他方精囊, 大脳皮質, 精巣, 前立腺, 腎では発現していなかった。RT-PCR より得た7クローンの塩基配列を決定しデータベースからの配列とともに系統樹を作製した。リスザルの配列は得られている配列とランダムに関係していることを明らかにした。

今回の研究において, ヒト, 類人猿, サルのゲノム, 臓器において新しい HERV エレメントを明らかにした。それらに加え HERV ファミリーの系統的な解析により, HERV 類が霊長類の進化過程においての侵入, 継続的な自己増幅によりマルチコピーとなったことを推定した。さらに, RT-PCR 法によるサルの臓器における遺伝子発現パターンの解析により,

それらの転写活性が霊長類において維持されていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

レトロエレメントはゲノムの中で置換し動くエレメントである。その複製過程には RNA 中間体を經由する。レトロエレメントはレトロポゾン、レトロトランスポゾン、内在性レトロウイルス (HERV) に分類される。この分類は増幅の様式とそれらの一般的な性質、末端反復相同配列 (LTR)、逆転写酵素 (*pol*)、外殻タンパク質遺伝子 (*env*) の有無である。またこれらのエレメントは複製の過程で RNA 分子を必要とする。その際宿主細胞の tRNA を利用している。それらの tRNA が規定しているアミノ酸によって分類されている。HERV の後に付く H, E 等は tRNA の規定するアミノ酸の一文字表記である。

第 I 章ではヒト単染色体 DNA を用い HERV-H, HERV-E の *env* 遺伝子の存在を PCR 法により調べた。HERV-H *env* 遺伝子は 8, 13, 21, 22 番の 4 本の染色体を除く全ての染色体に、また HERV-E *env* 遺伝子は 5, 9, 18, 20, 21, 22 番を除く染色体に存在していることを明らかにした。ヒト単染色体を用いた遺伝子解析は初めての結果であり、さらに HERV-H *env* の 15, 17 番での存在はデータベースにも記載されていない新しい結果である。さらに霊長類各種のゲノムで調べ、類人猿、新、旧世界ザルには見いだされるが、原猿類、齧歯類には存在しないことを明らかにした。さらにそれらの配列から系統樹を作製したところ、大きく二つのグループに分類され一つは約 4000 万年前、他は約 1400 万年前と計算された。これらは原猿類と真猿類分岐、大型類人猿の分岐の時期と矛盾しない。

第 II 章ではニホンザルの臓器から抽出した RNA を用い HERV-W を構成する *gag*, *pol*, *env* 遺伝子の発現を RT-PCR で検討した。*env* 遺伝子は調べた全ての臓器 (精巣, 前立腺, 腎, 小脳, 甲状腺, 脾, 小腸, 胃, 卵巣) で発現していること、*pol* 遺伝子は腎, 小脳で発現が無く、*gag* 遺伝子は精巣と脾でのみ発現が見られることを明らかにした。また HEV-E *env* 遺伝子は小脳と脾で発現していなかった。この RT-PCR で得られた DNA の塩基配列から系統樹を描いたところ二つのグループがあることが明らかになり、これらのレトロエレメントは 4000 万年前と 1400 万年前に霊長類のゲノムに挿入されたかあるいはゲノム中で増幅が始まったことを明らかになった。そもそもサル類の臓器別の RNA は入手が極めて困難であり、これらの結果は初めてのものである。構成遺伝子の臓器特異的な発現特性も興味深い結果といえる。

第 III 章では新世界ザルの一種であるリスザルの臓器から得られた RNA を用い RT-PCR 法により HERV-T *pol* 遺伝子の発現を調べている。調べた臓器の内、小脳, 肝, 肺, 脾での発現、他方精囊, 大脳皮質, 精巣, 前立腺, 腎では発現していなかった。RT-PCR で得られた DNA からクローンの塩基配列を決定、データベースから得た配列と共に系統樹を作製したところ、リスザルの配列はそれらの配列とランダムに関係することを見いだした。臓器特異的な別の発現配列パターンも新しい知見である。

以上、本申請論文はヒト内在性レトロウイルス (HERV) および関連の遺伝子について、ヒト単染色体 DNA を用いヒト各染色体における存在の有無、各種霊長類 DNA を用いた同じ遺伝子の塩基配列決定とそれらの系統関係、霊長類ゲノムへの挿入あるいは増幅の時期を推定した。またニホンザル、リスザルの臓器からの RNA の RT-PCR 法による遺伝子解析、得られた DNA の塩基配列決定と系統樹の作製を行った。これらはいずれも初めての結果であり、今後の HERV 研究に大きく寄与することが考えられ、博士 (理学) の学位を授与するに値するものと認定した。なお李珠美氏学位論文調査委員会は審査委員会を開き、本人に対して論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格に値すると判断した。