

メダカゲノム情報によるステロール生合成遺伝子の解析 ～メダカ *DHCR7* の遺伝子構造～

Analysis of sterol biosynthesis genes
from the genome information of Medaka *Oryzias latipes*
The estimation of gene structure of Medaka *DHCR7*

西山 智子 清水 誠之 西野 秀昭

Satoko NISHIYAMA Nobuyuki SHIMIZU Hideaki NISHINO

福岡教育大学・理科教育講座 (生物)

(平成23年9月30日受理)

Abstract

The gene structure of Medaka *Oryzias latipes* *DHCR7* was investigated through BLAST search by comparison of Medaka genome database with the cDNA and exon base sequences of *Homo sapiens* and *Danio rerio* in order to elucidate the mechanism of biological evolution at the viewpoint of generation of sterol biosynthesis genes. As the results, the exons 2 and 3 of *DHCR7* of Medaka *Oryzias latipes* were extracted as the strong candidates. One of the estimated exons, exon 2 of Medaka *DHCR7* was amplified by using wild type Medaka genome DNA as the template, but not the intron between exons 2 and 3. These results indicate the intra-species mutation in the intron base sequence of Medaka *Oryzias latipes*.

要 約

ステロール生合成遺伝子が、生物進化の過程で如何にして創生されてきたかを探究するため、単細胞の真核生物には見出されないが、より高等な多細胞真核生物には見出される *DHCR7* 遺伝子の構造を複数の生物で比較する目的で、まずメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* の遺伝子構造の解明に取り組んだ。ヒト *Homo sapiens* やゼブラフィッシュ *Danio rerio* の *DHCR7* の cDNA 構造で NBRP メダカゲノムデータベースを対象に BLAST 検索を行った。その結果、メダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* の第2と第3 exon の候補を見出した。メダカ *DHCR7* と考えられる塩基配列からプライマーを設計し、野生メダカのゲノムを鋳型として PCR を行ったところ、推定第2 exon と似た長さの産物が増幅し、メダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* 第2 exon の存在を確認することができた。しかし、intron と考えられる塩基配列から設計したプライマーでは産物の増幅が見出されなかった。メダカゲノムデータベースに採用されたメダカ近交系 Hd-rR 系と同じ種である野生メダカとで比較すると、exon の塩基配列は保存されている一方、intron に種内変異が蓄積している可能性が考えられた。

1. はじめに

ステロール生合成遺伝子は、真核生物にのみ見出されることから、生物が前核細胞から真核細胞へと進化する際に、何らかの過程によって新しい遺伝子として誕生してきたものと考えられる¹⁾。ステロール構造が存在することによって、細胞膜の構造は柔軟性を増す²⁾。細胞膜が柔軟になることによって、細胞の大型化や貧食能の獲得へつながったことが推定される²⁾。

ステロール生合成遺伝子の一つ、*DHCR7*は、コレステロール生合成過程の最終段階を触媒する酵素をコードしている(図1)。動物ではコレステロールを、植物では*DHCR7*に相当する遺伝子*DWARF5*がシトステロール等を生合成する上でステロール構造を安定化させる大切な働きがある¹⁾。もし、酵母などのエルゴステロールのように、B環に不飽和結合が5位と7位に二箇所存在すると、紫外線照射によってB環が開裂してビタミンDのような構造となってしまう³⁾。*DHCR7*に突然変異が生じると、中枢神経系の発達異常や脊椎動物においては単眼症の原因遺伝子と成る事もある⁴⁻¹⁰⁾。脊椎動物のモデル生物の一種であるメダカでも単眼となる変異が知られている¹¹⁾が、この変異が*DHCR7*の異常によって発症するか否かは未だ明らかではない。ヒトなどでは形態形成調節遺伝子である*Sonic hedgehog*の異常⁶⁾⁸⁾⁹⁾や、そのコードするタンパク質の翻訳後のコレステロールによる修飾が不十分なため、単眼症や完全全脳症に至る例も知られている⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾。野草の一種、バイケイソウに含まれるアルカロイドによる仔ヒツジの単眼症は翻訳後修飾の異常に起因していると考えられている⁴⁾。

メダカ(*Oryzias latipes*)は、我が国で独自に開発された脊椎動物のモデル生物として、生物学、医学、環境科学、水産学などで広く利用され、英語名もMedakaと表記されている¹¹⁾。さらに、比較ゲノム生物学の進展によって、メダカとヒト(*Homo sapiens*)のゲノム遺伝子構造には多くの共通性が期待されている¹¹⁾。したがって、例えば、メダカの遺伝的な変異体を解析することによって、ヒト遺伝病の原因遺伝子にたどりつくことも可能となることが考えられる。メダカは胚発生に関わる300余の突然変異体が知られており¹¹⁾、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)など他の硬骨魚類の突然変異体では見られないものが多く、研究対象としての貴重なコレクションとなっている。またメダカは、日本国の自生種であることから、

野生集団の遺伝子解析を行うことによって、我が国の自然環境の成り立ちや、その保全に新たな視点を提供する可能性も考えられる。

本研究の目的は、メダカの*DHCR7*遺伝子構造を明らかにすることである。それは、ステロール生合成遺伝子が生物の進化の過程でどのようにして誕生してきたのかを考察する上で意義ある研究になるものと考えられるからである。アメリカの国立衛生研究所 National Institute of Health (NIH)により運営されているwebサイト、National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹²⁾(図2)のGenBankという世界的なDNAデータベース〔日本のDNA Data Bank of Japan (DDBJ)、欧州のEBI/EMBLも相互にデータを共有している〕にはメダカ*DHCR7*の情報は未だ見られないが、我が国のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)(図2)によるメダカゲノムプロジェクトではニホンメダカ*Oryzias latipes*のゲノム解析によって、約100万リード、726 Mbpの情報が既に塩基配列の決定がなされ、データベース化されている。メダカゲノムサイズは約800 Mbpと推定されているので、全ゲノムの0.9×分に相当する¹¹⁾。しかし、少なくとも*DHCR7*の遺伝子構造は、cDNAの塩基配列とともに未だ特定されていない。

一方で、ゼブラフィッシュは、脊椎動物の小型魚類モデル生物として多くのゲノムデータやmRNA配列データがNCBIに登録されている。ヒト*DHCR7*のゲノムデータもNCBIに登録されているので、ここからゼブラフィッシュとヒトの*DHCR7*遺伝子構造の比較を行い、類似性が高い構造は、メダカゲノムの*DHCR7*でも同様に類似していると考えられることができる。

本研究では、NCBIからヒト*DHCR7*を含むゲノム及び、ゼブラフィッシュ*DHCR7*を含むゲノムの各情報を利用して、NBRPメダカゲノムプロジェクトのデータとの間での類似性の検索、すなわちBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって検索し、メダカ*DHCR7*遺伝子構造を見出し、必要に応じて塩基配列のクローニングへ結びつけることをも視野に入れ、コレステロール生合成遺伝子の創生メカニズムの解析へ供することを目的とする。

2. 研究方法

NCBI法：既に全塩基配列が決定されデータベースに登録されている*DHCR7*の塩基配列のうち、

ヒトと硬骨魚類、ここではゼブラフィッシュで同じ塩基配列、すなわち同じアミノ酸配列を探し出す。ヒトと硬骨魚類であるゼブラフィッシュで共通な塩基配列は、硬骨魚類であるメダカでも共通である事が期待されるからである。そこでまず、ヒト及びゼブラフィッシュの *DHCR7* の各 cDNA (mRNA) 塩基配列を、遺伝情報データベース GenBank から探し出す。米国国立衛生研究所 (NIH) が運営している Web サイト、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の HP¹²⁾ を開く (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。そのサイトにおいて、「Nucleotide」を選択し、*Homo sapiens DHCR7* をキーワードとして検索を実行する。例えば、*Homo sapiens DHCR7* の cDNA 情報は、accession number が AF110060 というデータに登録されている。次に cDNA (mRNA) とゲノム DNA の塩基配列を比較して、exon 構造を塩基配列レベルで見出す。真核生物のゲノムには、最終の RNA 産物に残る exon 構造と、最初の転写産物より除かれる intron 構造が交互に配置された、分断された遺伝子構造である¹³⁾。exon 構造は、完成した成熟 mRNA に残される塩基配列である。このように遺伝子は、mRNA の 5' 末端にあたる exon にはじまり、3' 末端にあたる exon で終わる。intron は介在配列であり、一次転写産物がプロセッシングを受けて完成した mRNA になる際に切り除かれる (RNA スプライシング¹³⁾)。異なる生物間で相同遺伝子を比較した場合、通常 intron の位置は保存されているが、それぞれの intron の長さはかなり変化している。しかし、exon 配列はよく似たままで保存されている。exon の配列が保存されていることを利用して、異なった種からよく似た遺伝子や塩基配列を見出すことができる。RNA スプライシングは、intron のスプライス部位で行われる。スプライス部位は、exon-intron 境界の intron 側にある配列で、intron の 5' 末端に位置する 5' スプライス部位のコンセンサス配列は GU から始まり、intron の 3' 末端に位置するスプライス部位のコンセンサス配列は AG で終わる¹¹⁾¹²⁾。このように、intron 構造は原則として、GU で始まり、AG で終わるので、これを GU-AG 則と呼ぶ事とする¹⁾。従って exon 構造を見つけるには、intron 構造が GU と AG で挟まれていることを目印としてスプライシングされることから、cDNA (mRNA) の塩基配列とゲノムにおける遺伝子の塩基配列を比較することで exon-intron 構造を推定できる。ゼブラフィッシュに

についても同様に *DHCR7* における exon-intron 構造を見つけ出すことができる¹⁾。そして、ヒトの *DHCR7* と、ゼブラフィッシュの *DHCR7* を比較し、類似性が見出されれば、ゼブラフィッシュと同じ硬骨魚類であるメダカの *DHCR7* もヒト *DHCR7* やゼブラフィッシュ *DHCR7* のアミノ酸配列に類似していることが期待できる。その類似した配列を基に、メダカ *DHCR7* の遺伝子構造を見出す事が可能と考えられる。その方法が検索ツール BLAST による方法である¹²⁾。

BLAST 法：メダカ *Oryzias latipes* は我が国で独自に開発された脊椎動物のモデル生物として、生物学、医学、環境科学、水産学などで広く利用されている。さらに比較ゲノム生物学の進展によって、メダカとヒトのゲノムには多くの共通性があることが明らかになり、メダカは遺伝子機能解析の重要なリソース (生物資源) となっている。「ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP)」は、ライフサイエンスの研究に広く用いられる実験材料としてのバイオリソース (実験動植物、細胞、DNA などの遺伝子材料で、ここでは「生物遺伝資源」と同義語として扱う) のうち、国が特に重要と認めたものについて、体系的な収集、保存、提供体制を整備することを目的とした国家プロジェクトである¹¹⁾。またリソースに関する情報も同様に収集し、使いやすいデータベースとして利用者に提供することによって、リソースの有効利用を図ることも目的としている。まず、NBRP のサイト (<http://www.nbrp.jp/index.jsp>) を開く。左に多数の生物資源名があるので、その「メダカ」をクリックする。「NBRP メダカ Genome」をクリックする。「BLAST」をクリックする。「BLAST」とは、先にも述べたように、Basic Local Alignment Search Tool の略で、類似した塩基配列やアミノ酸配列をデータベース等から見つけることができる web 上の検索ツールである。GenBank に登録されている遺伝子情報は、「DNA sequence」から検索することができる。NBRP で公開されているメダカゲノムデータは、平成14年度文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト「ゲノム解析等」によって実施されたニホンメダカ *Oryzias latipes* のゲノム解析によって得られたもので、解析にはメダカ近交系 Hd-rR が用いられている。この系統は、放射線医学総合研究所の石川裕二博士から提供されたものである。また、その DNA は東京大学の武田洋幸博士から提供され、ゲノム解析は国立遺伝学研究所および理化学研究所によって、ホールゲノ

ムショットガン法によって行われた。約100万リード、726 Mbp の情報が含まれている。メダカのゲノムサイズは約 800 Mb と推定されているので、全ゲノムの 0.9×分に相当する。

BLAST のプログラムは、以下の 3 つがある。

- ①blastn : DNA query (検索したい塩基配列) を DNA database に対して行う
- ②blastb : タンパク質に翻訳された DNA query を、同様にタンパク質に翻訳された DNA database に対して行う
- ③blastp : protein query を タンパク質に翻訳された DNA database に対して行う

このうち、使用したプログラムは、①blastn と ③blastp である。blastn と blastp の使い分けは、cDNA の Open Reading Frame (ORF, 翻訳可能な読み枠) の塩基配列や mRNA 配列を BLAST する場合は blastn を、アミノ酸配列を BLAST するときは blastp を用いた。blastn では、ある塩基配列とよく似た塩基配列を、似ている順に複数見つけることができるもので、blastp は、あるアミノ酸配列とよく似たアミノ酸配列を、似ている順に見つける事ができる。②blastb は、ある塩基配列をタンパク質に翻訳して、よく似たアミノ酸配列を検索することができるが、paste した最初の塩基から翻訳を開始し、順番に翻訳してしまうので、求めるアミノ酸配列と異なるものを検索してしまう恐れがあるため、ここでは使用しなかった。

まず、①blastn では、「COPY&PASTE」の枠に、ヒト *Homo sapiens DHCR7* mRNA の塩基配列を DNA に置き換えたもの、すなわち cDNA の ORF を paste して、Search をクリックする。タンパク質に翻訳される領域では、コドンの塩基が一つ異なってもアミノ酸残基が同じであれば、タンパク質として同じ働きをすることから、塩基配列よりもホモロジーを見つけやすいアミノ酸配列で検索、すなわち③blastp も行った。ヒト *Homo sapiens DHCR7* mRNA をアミノ酸に翻訳したもので検索を行った。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* についても、同様に *DHCR7* mRNA をアミノ酸に翻訳したもので BLAST 検索する。ヒトとゼブラフィッシュの検索結果で、同じデータがヒットしていれば、それはメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* である可能性が高いと考えられる。

次に、ヒットしたデータが、ヒト *Homo sapiens DHCR7* の何番目の exon になるのか、ゼブラフィッシュ *Danio rerio DHCR7* の何番目の exon にな

るのか明らかにするために、exon ごとに検索を行う。ヒト *Homo sapiens DHCR7* 各 exon, ゼブラフィッシュ *Danio rerio DHCR7* 各 exon をメダカゲノム情報で BLAST 検索する。その際、ヒト *Homo sapiens DHCR7* 各 exon の塩基配列で検索すると共に、各 exon の塩基配列をアミノ酸に変換したもので検索を行う。得られたデータから、メダカ *Oryzias latipes DHCR7* の exon である可能性が高いものを見出してゆく。intron は GU-AG 則によると、GU と AG で挟まれている。これを目印にして未成熟の mRNA はスプライシングされ成熟した mRNA となる。よってデータでヒットしているアミノ酸配列に相当する塩基配列の前後で GU-AG 則に一致する配列を見つける。

メダカ *Oryzias latipes* の exon の確認 : NBRP メダカゲノム情報データベースから推定したメダカ *Oryzias latipes DHCR7* の exon が実際に存在しているのか、メダカからゲノム DNA を抽出し、推定した exon の最初と最後、また、前後の intron と推定される部分からプライマーをデザイン及び合成して、PCR (Polymerase Chain Reaction) によって増幅できるかどうか確認した。ここでは野生メダカ (いわゆるクロメダカ) を用いてゲノム DNA を抽出して鋳型とした。

メダカ *Oryzias latipes* ゲノム DNA の抽出法 :

1. 野生のニホンメダカを -20°C で凍結させる。
2. 乳鉢で粉碎する。
3. 蒸留水 2 ml を使って 2 本のマイクロフュージチューブに均等に分ける。
4. 24°C で 3,000 rpm 2 分間遠心し、上澄みを除く。沈殿を 0.5 ml の蒸留水に懸濁し、5 秒遠心する。
5. 上澄みを除き、沈殿を残った液に懸濁する。
6. 0.2 ml の 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na_2EDTA を加え良く懸濁する。次に、0.2 ml の phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) を加え、良く混合する。
7. 30 秒おきに 3 ~ 4 分間、ボルテックスする。0.2 ml の TE (pH 8) を加える。
8. 遠心を 4°C で 3,000 rpm, 5 分間行う。水の層を新しいマイクロフュージチューブに移す。1.2 ml の 100% ethanol を加え、2 本のマイクロフュージチューブに分けて上下逆さまにしながら良く混合する。
9. -20°C で一晩置く。
10. 遠心を 4°C で 12,000 rpm, 20 分間行う。上

澄みを捨て、沈殿を 0.4 ml の TE (pH 8) に 3 μ l の 10 mg/ml の RNase A を加える。5 分間 37 °C で保温する。10 μ l の 4 M ammonium acetate に 1 ml の 100% ethanol を加え上下逆さまにして混ぜる。

11. 遠心を、4 °C で 12,000 rpm, 20 分間行う。上澄みを捨てる。風乾し、50 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 8) に溶かす。

PCR の反応条件は以下の通りである。

	94 °C	2 分	× 1 サイクル
熱変性	94 °C	30 秒	} × 30 サイクル
アニーリング	65 °C	30 秒	
相補鎖の合成	72 °C	1 分	
	72 °C	7 分	× 1 サイクル
	4 °C	∞ (回収まで)	

PCR 産物の電気泳動による確認：アガロースゲル電気泳動は、1 %ゲル濃度にて行った¹⁴⁾。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、6 %ゲル濃度¹⁵⁾、ポリアクリルアミドゲル組成は、10%アクリルアミド水溶液 10.0 ml, 蒸留水 7.8 ml, 10×TBE 0.2 ml, 10%過硫酸アンモニウム 0.2 ml を良く混合し、TEMED10 μ l を加えて直ぐ混合後、ガラス板間に流し込んだ。10%アクリルアミド水溶液は、95 g のアクリルアミド (Bio-Rad, 電気泳動グレード, ウルトラピュア), 5 g のビスアクリルアミド (Bio-Rad, 電気泳動グレード, ウルトラピュア) を混合、溶解させ、蒸留水で 1 ℓ とした。

3. 結果

BLAST によるメダカ *DHCR7* 候補遺伝子の検索：ヒト *Homo sapiens* の *DHCR7* と、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の *DHCR7* を比較すると、exon の数は共に 7 個である (図 8 でメダカの推定遺伝子構造とともに比較している)。各 exon 構造のアミノ酸残基数は、第 1 exon がヒト *Homo sapiens* では 33、一方ゼブラフィッシュ *Danio rerio* では 36 と、3 つのアミノ酸残基の違いがあったが、第 2 exon ~ 第 6 exon のアミノ酸残基数は全く同じ、第 7 exon は 1 個の違いであった (図 3)。また、アミノ酸配列も同様に比較すると、ヒト *Homo sapiens* とゼブラフィッシュ *Danio rerio* で高度に類似していた (図 3)。従ってゼブラフィッシュ *Danio rerio* と同じ硬骨魚類であるメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* もヒト *Homo sapiens* *DHCR7* やゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7*

のアミノ酸配列に類似していることが期待できる。よって、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* 及びヒト *Homo sapiens* の各 *DHCR7* の塩基配列やアミノ酸配列がよく似た構造をメダカゲノムから見出すことによって、メダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* の遺伝子構造を見出す事ができると考えられる。その方法が検索ツール BLAST による方法である。

まず、①blastn を行う。「COPY&PASTE」の枠に、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* mRNA の塩基配列を DNA に置き換えたもの、すなわち cDNA の ORF を paste して、Search をクリックする。その結果、10 件がヒットした。一致すると思われる部分がヒットすると考えられたが、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* ORF の DNA 塩基配列を用いてヒットしたものはメダカ *Oryzias latipes* ゲノム *DHCR7* に相当するものではないと思われた (データ示さず)。タンパク質に翻訳される領域では、コドンの塩基が一つ異なってもアミノ酸残基が同じであれば、タンパク質として同じ働きをすることから、塩基配列よりもホモロジー (類似性) を見つけやすいアミノ酸配列で検索、すなわち③blastp を行うことにした。ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* mRNA をアミノ酸配列に翻訳したもので検索を行った。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* についても、同様に *DHCR7* mRNA をアミノ酸配列に翻訳したもので BLAST 検索した。ヒト *Homo sapiens* とゼブラフィッシュ *Danio rerio* の検索結果で、同じデータがヒットしていれば、それはメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* である可能性が高いと考えられる。同じであったリードは、次の七つであった。

GOLWno3264
 GOLWno3439
 GOLWno3804 (I)
 GOLWno3804 (II)
 GOLWno3801
 GOLWno4192
 GOLWno4337

この中で、リードがセンス鎖にコードされているものは、次の三つであった。

GOLWno3439
 GOLWno3804 (I)
 GOLWno4192

アンチセンス鎖にコードされているものは次の四つであった。

GOLWno3264
 GOLWno3804 (II)
 GOLWno3801

GOLWno4337

ただしここでのセンス鎖とは、メダカデータベースに記載されている塩基配列そのものとする。

次に、ヒットしたデータが、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* の何番目の exon になるのか、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* の何番目の exon になるのか明らかにするために、exon ごとに検索を行った。ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* 各 exon、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* 各 exon をメダカゲノム情報で BLAST 検索した。その際、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* 各 exon の塩基配列でまず検索し、その後、各 exon の塩基配列をアミノ酸に変換したもので検索を行った。その結果、検索は塩基配列で行うよりもアミノ酸配列で行う方がホモロジー（類似性）を見つけやすかったため、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* の各 exon ごとの検索ではアミノ酸配列でのみ BLAST 検索することとした。

これらのデータから、メダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* の exon である可能性が高いものを見出していった。intron は GU-AG 則によると、GU と AG で挟まれている。これを目印にして未成熟の mRNA はスプライシングされ成熟した mRNA となる。よってデータでヒットしているアミノ酸配列に相当する塩基配列の前後で GU-AG 則に一致する配列を見つければよい。また、第 1 exon では、ゼブラフィッシュ *Danio rerio*、ヒト *Homo sapiens* とともにヒットするリードはなかった。第 2～第 6 exon では、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* とヒト *Homo sapiens* の間ではアミノ酸残基数は同じであったが、第 1 exon ではアミノ酸残基数が 3 残基違い、アミノ酸配列も他の exon に比較して類似性が低かったため、メダカ *Oryzias latipes* でもヒト *Homo sapiens* やゼブラフィッシュ *Danio rerio* と比較して類似性が低く、BLAST 検索でヒットしなかったと考えることもできる。メダカ *Oryzias latipes* の第 1 exon も他の第 1 exon に比べてあまり似ていない可能性が高いだろう。

ヒト *Homo sapiens* の *DHCR7* の第 2 exon アミノ酸配列、EVDWFSLASVIFLLLFAPFIVYYFIMACDQYSCALTGPVVDIVTGHARLSDIWAKTPPITRKAQAQLYTLWVTFQ, をメダカ *Oryzias latipes* ゲノムデータベースで検索すると「GOLWno3264」がヒットした。同様にゼブラフィッシュ *Danio rerio* の *DHCR7* の第 2 exon アミノ酸配列、EVDWFSLSGVILLLCFAPFLVFFFIMACDQYQCSISHPLLDLYNGDATLFTI

WNRAPSFTWAAKIYAIWVTFQ, を、同様に検索すると、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* 第 2 exon でヒットした GOLWno3264 の同じ場所がヒットした。ヒットしたアミノ酸残基数はそれぞれの第 2 exon のアミノ酸残基数と同じであった（図 3）。GU-AG 則を考えると、もしヒットした部分がメダカ *Oryzias latipes* ゲノムの exon にあたるとしたら、ヒット部分の前の ag と、ヒット部分の後の gt でスプライシングされているはずである。終止コドンからヒットの始まりまでにある ag は 5 つ。ヒットの終わりから終止コドンまでにある gt は 4 つ。これらの組み合わせは 20 通りあるが、どの組み合わせでスプライシングされているか分からないので、メダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* 第 2 exon を次のようにして推定した。すなわち、ヒト *Homo sapiens* とゼブラフィッシュ *Danio rerio* の各 *DHCR7* 第 2 exon を比較すると、アミノ酸残基数が同じであり、塩基配列の一致は 63.67%，アミノ酸配列では 58.10% が一致していた（データ示さず）。このように、ヒト *Homo sapiens* *DHCR7* 第 2 exon、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* 第 2 exon が比較的似ていることから、GOLWno3264 の塩基配列をヒト *Homo sapiens* の *DHCR7* 第 2 exon 及び、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* の第 2 exon の塩基配列と比較し、GU-AG 則を用いるとメダカ *DHCR7* の第 2 exon の intron との切れ目を推定することができる。その結果、図 4 に示すように、GOLWno3264 の特定の塩基配列部分がメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* の第 2 exon であると推定できる。前後の ag 及び gt でスプライシングされているものと考えられる。

メダカ *Oryzias latipes* 第 2 exon の確認：NBRP メダカ *Oryzias latipes* ゲノム情報データベースから推定したメダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* 第 2 exon が実際に存在しているのか、メダカからゲノム DNA を抽出し、推定した第 2 exon の最初と最後、また、前後の intron と推定される部分からプライマーをデザイン及び合成して、PCR (Polymerase Chain Reaction) によって増幅できるかどうか確認した。

PCR では、DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる伸長反応を繰り返し行うことにより in vitro で一定の長さの DNA を増幅できる。この方法を用いると、DNA を数時間で少なくとも 10^5 倍以上に増幅できる。ここでは野生メダカ（いわゆるクロメダカ）を用いてゲノム DNA を抽出した。

設計し合成したプライマーは次の4つである。
 I, IVは intron 部分のプライマー, II, IIIは exon 部分のプライマーである。

I : agctgcatttagatgtttggctttatcac (0l int1 PR 01, センス鎖)

II : ggaggtggactggttctctctcatcag (0l exo2 PR 01, センス鎖)

III : ctggaagcccacccaaacggcgtatatac (0l exo2 PR02, アンチセンス鎖)

IV : atcaattcgagctcggtaccctttttc (0l int2 PR 02, アンチセンス鎖)

これら4つのプライマーから, I×III, I×IV, II×III, II×IVの4通りの組み合わせによるPCRを行う事が可能である。

GOLWno3264の塩基配列の中に, メダカ *Oryzias latipes DHCR7* の第2 exonに加え, 第3 exonがあると推定できた。さらに, 第2 exonも第3 exonと共に, GOLWno3264の塩基配列の中に存在したことから, 図4がメダカ *Oryzias latipes* のゲノムにおける遺伝子 *DHCR7* の推定部分構造, すなわち第2 exonと第3 exonで, 前後にある ag～gtの間でスプライシングされているものと考えられた。

表1 *DHCR7*第2 exonの塩基配列及びアミノ酸配列の類似性

<i>Oryzias latipes</i> と	塩基配列	アミノ酸配列
<i>Homo sapiens</i> を比較	61.9 %	52.8 %
<i>Danio rerio</i> を比較	73.9 %	71.6 %

表2 *DHCR7*第3 exonの塩基配列及びアミノ酸配列の類似性

<i>Oryzias latipes</i> と	塩基配列	アミノ酸配列
<i>Homo sapiens</i> を比較	67.0 %	70.0 %
<i>Danio rerio</i> を比較	71.4 %	80.0 %

この推定第2 exonと第3 exonのうち, 第2 exonが実際にメダカに存在しているか確かめるため, 方法に示したプライマーI～IVを組み合わせ用い, メダカ抽出ゲノムDNAを鋳型としてPCRし(図5), アガロースゲル電気泳動(図6)やアクリルアミドゲル電気泳動によって期待される長さのPCR産物が増幅しているか確認した(図7)。抽出したゲノムDNAは, $A_{260/280}$ が1.91に近いほど純度が高いものとみなすことができる¹⁶⁾。PCRでは, 純度と密度が高いゲノムDNA

を使用して行うことが望ましいので, 抽出した野生メダカゲノムDNAの中で, 純度 ($A_{260/280} = 1.80$), 濃度 (256 ng/ml)とも高いゲノムDNAを用いてPCRを行った。その結果, ①I×II, ②I×IV, ④II×IVのプライマーの組み合わせではPCR産物は確認できなかったが, ③II×IIIの組み合わせだけ, PCR産物を確認することができた(図6, 図7)。PCRをアニーリング温度55℃で行うと, PCR産物は得られなかった。Tm値がプライマーIIは71.8, プライマーIIIは77.5であったため, アニーリング温度を65℃にするとPCR産物が得られた。PCR産物を確認できなかったのは, intron部分のプライマーを用いた場合であった。③II×IIIの期待されるPCR産物の長さは223 bpである。1 kbpのマーカーでは, ③II×IIIの大きさがどのくらいか分からないのでpUC Mixマーカーを用いた結果, ③II×IIIのプライマーの組み合わせのPCRでは, 産物は331 bp以下であり, 期待する部分が増幅し223 bpの大きさであることが期待できた(データ示さず)。

PCR産物の, より詳細な分子量を知るために, ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った(図7)。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は, アクリルアミドの重合体であるポリアクリルアミドのゲルを使用した, アガロースよりもさらに分子ふるい効果が大きく, 蛋白質や比較的分子量の核酸を分離するのに適している。ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果, ③II×IIIの組み合わせプライマーでのPCR産物の大きさは, pUC Mixマーカーの242 bpと190 bpの間であったことから, 223 bpであることが更に期待できた。メダカ *Oryzias latipes DHCR7* の推定される遺伝子構造を図8に示す。

4. 考察

BLASTでは, exonごとのアミノ酸配列BLAST検索で, ヒト *Homo sapiens*, ゼブラフィッシュ *Danio rerio DHCR7* に共通してヒットしたのから類似性の高い配列を見つけることでメダカ *Oryzias latipes DHCR7* の遺伝子情報を見つけることができる可能性を探った。共通してヒットしたリードに *Oryzias latipes* のゲノム情報と思われるものがなかった場合や, 共通してヒットしなかったexonについては, *Oryzias latipes* と近縁な他の生物のゲノム情報を用いて検索するなどのBLAST方法を考える必要があると考えられる。

intronは, mRNAには含まれないので, そこ

に起こった変異は直接タンパク質の構造には影響を与えない。タンパク質に翻訳される領域では exon はアミノ酸をコードしなければならないので、変化が起こるとしてもある程度の制限がある。このため、塩基の置換の多くは、コドンの内容に影響を与えない場合がある3文字目か、あるいは非翻訳領域に起こると考えられている。変異は exon にも intron にも同じ頻度で起こっているが、exon に変化が起こったときには、生物にとって好ましくない場合が多いため、進化の過程で除かれる場合が多いと考えられる。しかし、タンパク質をコードしない intron では、点変異による置換やさまざまな変異が蓄積しやすいと考えることができる。これは、intron が塩基配列に依存した機能をもっていないことを意味している。

PCR 反応で、① I × III, ② I × IV, ④ II × IV の intron 部分のプライマーでは、増幅せず、③ II × III の exon 部分のプライマーでは増幅し PCR 産物が確認できたのは、使用したメダカが野生型であり、データベース解析に用いられたものと異なっていたためであると考えられる。メダカは地域による変異が多い¹¹⁾ ため、intron 部分は、変異によって塩基配列が異なっていたためであると考えることができる。しかし、exon だけの PCR 反応ではバンドを確認することができたのは、遺伝子情報の中で重要である exon 部分に起こった有害な変異は保存されていないからと考えられる。

ゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7* とヒト *Homo sapiens* *DHCR7* を比較し、比較的塩基配列やアミノ酸配列が似ており、そこからメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* の第2 exon を推定し、PCR によって増幅したことから、予想した配列が実際に第2 exon に相当するものと考えることができる。これより、ヒト *Homo sapiens* の *DHCR7* とゼブラフィッシュ *Danio rerio* *DHCR7*、メダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* も似ていると考えることができる。PCR で使用したメダカが Hd-rd 系であったなら、すべてのプライマーで増幅が起こり、電気泳動によって PCR 産物が確認できたと考えられる。

BLAST 検索により、メダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* の第1 exon, 第7 exon を見つけることができれば、メダカゲノム DNA から第1 exon と第7 exon の塩基配列を用いてメダカ *DHCR7* 塩基配列を PCR によって増幅し、DNA シーケンサーによってメダカ *Oryzias latipes* の *DHCR7* のほとんどの DNA 配列を明らかにすることができると考えられる。

5. 参考文献

- 1) 西野秀昭・牧尾友美：生物界ステロール生合成遺伝子の分子進化に関する考察，福岡教育大学紀要，第58号第3分冊，75-88，平成21(2009)年2月
- 2) 田川邦夫：からだの生化学，初版第1刷，108-110，1993年4月30日，(株)宝酒造
- 3) 田川邦夫：からだの生化学，初版第1刷，113-114，1993年4月30日，(株)宝酒造
- 4) Strauss, E. : One-eyed animals implicate cholesterol in development, *Science*, 280 (5369), 1528-1529, 1998
- 5) Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., & Roelink, H. : The teratogenic *Verattum* alkaloid cycloamine inhibits *Sonic hedgehog* signal transduction, *Development*, 125, 3553-3562, 1998
- 6) Maity, T., Fuse, N., & Beachy, P. A. : Molecular mechanisms of *Sonic hedgehog* mutant effects in holoprosencephaly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (47), 17026-17031, 2005
- 7) Xu, F., Rychnovsky, S. D., Belan, J. D., Hobbs, H. H., Cohen, J. C., & Rawson, R. B. : Dual roles for cholesterol in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (41), 14551-14556, 2005
- 8) Dubourg, C., Bendavid, C., Pasquier, L., Henry, C., Odent, S., & David, V. : Review Holoprosencephaly, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2 : 8 doi : 10. 1186/1750-1172-2-8
- 9) Farzan, S. F., Singh, S., Schilling, N. S., & Robbins, D. J. : Hedgehog Processing and Biological Activity, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 294 (4), G844-G849. doi : 10. 1152/ajpgi. 00564. 2007, 2008
- 10) Weaver, D. D., Solomon, B. D., Akin-Samson, K., Kelly, R. I., & Muenke, M. : Cyclopia (Synophthalmia) in Smith-Lemli-Opitz Syndrome-First Reported Case and Consideration of Mechanism, *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 154C (1) : 142. doi : 10. 1002/ajmg. c. 30241, 2010
- 11) ナショナルバイオリソースプロジェクト

(NBRP) 情報公開サイト (<http://www.nbrp.jp/index.jsp>),
メダカデータベース
(<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>)
Medaka Genome Database,
http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/medaka_top.html

- 12) National Center for Biotechnology Information (NCBI) HP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 13) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. : MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, Chapter 6, HOW CELLS READ THE GENOME: FROM DNA TO PROTEIN, 299-374, 2002
- 14) Sambrook, J., & Russel, D.W. : *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL 3rd. ed.*, 5.4-5.17, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 15) Sambrook, J., & Russel, D.W. : *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL 3rd. ed.*, 5.40-5.48, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 16) Sambrook, J., & Russel, D.W. : *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL 3rd. ed.*, A9.3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

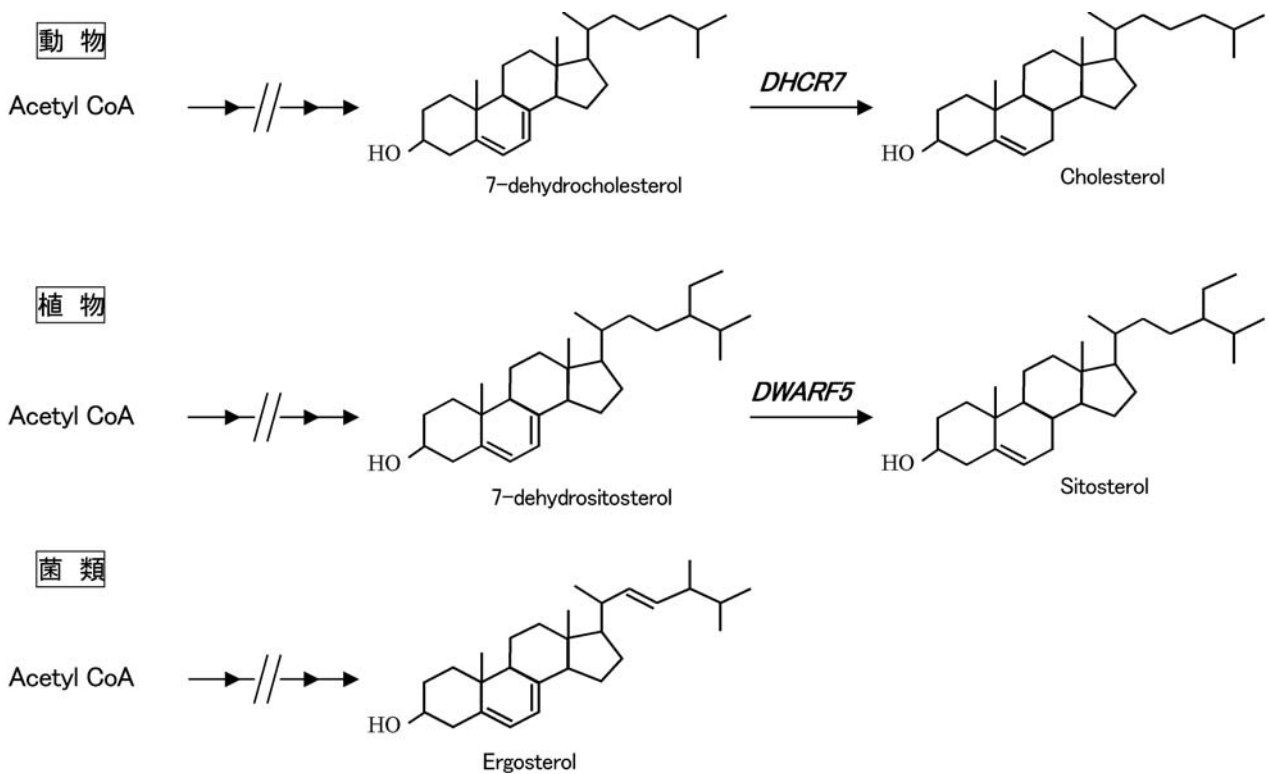


図1 動物・植物・菌類におけるステロール合成経路における最終段階

高等動物、植物にはそれぞれステロール7位還元酵素（B環の不飽和結合が還元される）である *DHCR7* と *DWARF5* をコードする遺伝子が存在するが、下等真核生物である酵母などには例外を除いて見出されていない

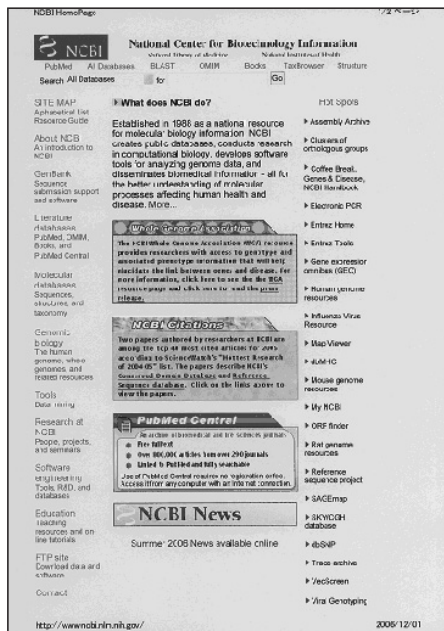


図2 National Center for Biotechnology Information (NCBI) (左) 及び National BioResource Project (NBRP) (右) のホームページ

exon1
 H.s: MAAKSQPNIPKAKSLDGVNTDRTASQGWRAW [33]
 D.r: MMASDRVRKRHKGSANGAQTVEKEPSKEPAQWRAW [36]

exon2
 H.s: EVDWFSLASVIFLLLFAPFIVYYFIMACDQYSCALTGPVVDIVTGHARLSDIWAKTPPITRCAAQLYTLWVTFQ [74]
 D.r: EVDWFSLSGVILLLLCFAPFLVFFFIMACDQYQCSISHPLLDLYNGDATLFTIWNRAPSF TWAAAKIYAIWVTFQ [74]

exon3
 H.s: VLLYTSLPDFCHKFLPGYVGGIQEGAVTPA [30]
 D.r: VVLYMCPDFLHKILPGYVGGVQDGARTPA [30]

exon4
 H.s: GVVNKYQINGLQAWLLTHLLWFANAHLWSFPTIIFDNWIPLLWCANILGYAVSTFAMVKGYFFPTSARDC [72]
 D.r: GLINKYEVNGLQCWLITHVLWVLAQHFWFSPTI IIDNWIPLLWCTNILGYAVSTFAFIKAYLFPTNPEDC [72]

exon5
 H.s: KFTGNFFYNYMMGIEFNPRIGKWFDFKLFNRPVAVWTLINLSFAAQRELHSHVTNAMVLVNLQ [68]
 D.r: KFTGNMFYNYMMGIEFNPRIGKWFDFKLFNRPVAVWTLINLSYAAKQELYGYVTNSMILVNLQ [68]

exon6
 H.s: AIYVIDFFWNETWYLTIDICHDFGWYLGWDCVWLPYLYTLQ [44]
 D.r: AVYVVDFFWNEAWYLTIDICHDFGWYLGWDCVWLPFLYTLQ [44]

exon7
 H.s: LYLVIYHPVQLSTPHAVGVLLGLVGYIIFRVANHQKDLFRRTDGRCLIWGRKPKVIECSYTSADGQRHHSKLLVSGFWGVAR
 HFNYVGDLMGSLAYCLACGGHLLPYFYIIMAILLTHRCLRDEHRCASKYGRDWERYTAAVPYRLLPGIF* [153]
 D.r: GLYLVIYHPVQLSTPHAVGVLLGLVGYIIFRVANHQKDLFRRTDGRCLIWGRKPKVIECSYRSADGAIHKSMLTSGFWGVA
 RHMNYTGDLMGSLAYCLACGGHLLPYFYIVYMTILLVHRCIRDEHRCNSKYGKDWERYTAAVSYRLLPNIF* [154]

図3 ヒト及びゼブラフィッシュ *DHCR7* 各 exon のアミノ酸配列の比較
 H.s: ヒト *Homo sapiens*, D.r: ゼブラフィッシュ *Danio rerio*。*: 終止コドン。[] 内はアミノ酸残基数。

```

cagctgcattagatgtttggctttatcacagctcctggtcgtcttttgcgaatgctgtttatacagttgataggccgatatgataaa
tatgcagtatatgtgctggcctgtttcacattgagagctgcataagcgttcccagtgtttctttcaattatgattctgccgattt
tagccaaaatcccaaaaatctgtgctgttttctgggacatagttctgcagagcgacagaatttcatggaaatttgccttaata
atgtggtatcttgaacctttaacattttacagagagatgttattaaatgaatcctttacatgatttctatgtgatgttttag
ttatttaccgtgtaattctcgtggaggtagtcacgtgttttcagtagctgttactcctcactgtacccccacgtgtgactcc
tccagggaggtggactggttctctctcatcagcgtggtggctctcctcatcttctgctcccttcacgtcttttacttcgtgatgg
cctgtgaccagttccagtgctccgtcagcgagcctttgctgcagctttattacggggacgtgacgcttctctccatctgggcccg
ggccccctccttctcctggtcggcggcctaagatatacggcgtttgggtggcttccagtgaggcgtgagggacggatgggcgct
gttgcaggttgcatatcttaggggtttaccgctgtttgctcgtccaggtcttctctacctgtgtgtccctgatgtcaccaca
caagtttatccagggtatgttggggggtgcaggatggagcagcaactcctgcagtaaacatctgtaaatgcccgtttgttatt
atgttattgctacgacaattcaaggtatcttttcccagattatccatagaaaaaggggtaccgagctcgaattgat
    
```

図4 リード GOLWno3264 の塩基配列及び第2と第3の exon の推定

5'側の太字部分が推定した第2 exon, 3'側の太字部分が推定した第3 exon の塩基配列を示す。一重下線部分はそのまま、プライマー I (01 int1 PR01; agctgcattagatgtttggctttatcac; センス鎖), 二重下線部分のをそのままプライマー II (01 exo2 PR01; ggaggtggactggttctctctcatcag; センス鎖), 波下線部分のアンチセンス鎖を基にプライマー III (01 exo2 PR02; ctggaagcccccaaacggcgtatatac; アンチセンス鎖), 点下線部分のアンチセンス鎖を基に IV (01 int2 PR02; atcaattcgagctcggtagccctttttc; アンチセンス鎖) を合成した。黒に白抜き文字 ag が intron の終わり、同じく黒に白抜き文字 gt が intron の始まりと推定。

Water	31.4 μ l	Water	31.4 μ l
10 \times PCR Buffer (Mg ⁺⁺)	4.0 μ l	10 \times PCR Buffer (Mg ⁺⁺)	4.0 μ l
dNTP mixture	3.2 μ l	dNTP mixture	3.2 μ l
Takara Taq	0.2 μ l	Takara Taq	0.2 μ l
<i>Oryzias latipes</i> genome DNA	0.4 μ l	<i>Oryzias latipes</i> genome DNA	0.4 μ l
I 01 int1 PR01	0.4 μ l	II 01 exo2 PR01	0.4 μ l
<hr/>		<hr/>	
	39.6 μ l		39.6 μ l
↓		↓	
19.8 μ l	19.8 μ l	19.8 μ l	19.8 μ l
III 01 exo2 PR02	IV 01 int2 PR02	III 01 exo2 PR02	IV 01 int2 PR02
0.2 μ l	0.2 μ l	0.2 μ l	0.2 μ l
<hr/>		<hr/>	
20.0 μ l	20.0 μ l	20.0 μ l	20.0 μ l
(① I \times III)	(② I \times IV)	(③ II \times III)	(④ II \times IV)

図5 PCRの反応液の組成

I～IVは各々プライマーを示す。PR01はセンス鎖の、PR02はアンチセンス鎖の塩基配列を基にしたプライマーである。exoはexonの推定5'または3'末端の塩基配列を、intは、推定exonに直に隣接したintronの塩基配列を示す。

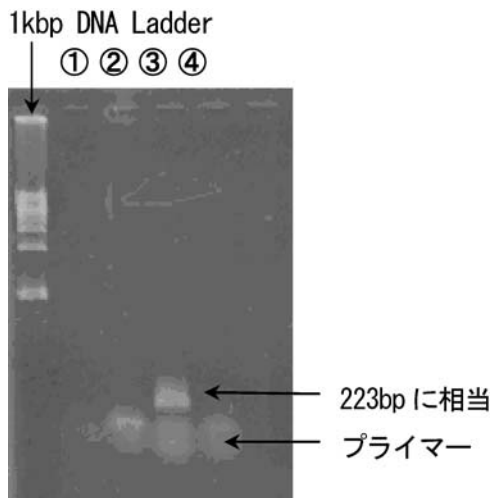


図6 PCR産物の1%アガロースゲル電気泳動

PCRにおけるプライマーの組み合わせ：① I \times III ② I \times IV ③ II \times III ④ II \times IV

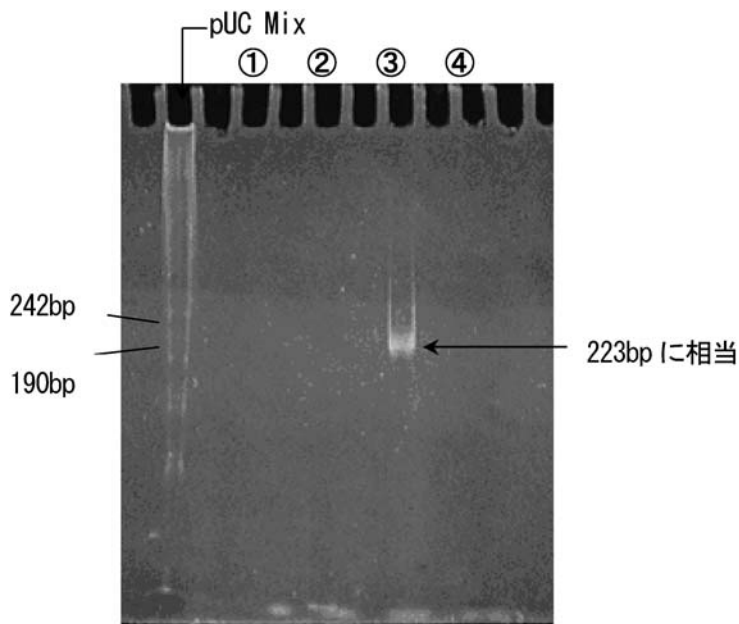


図7 PCR産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCRにおけるプライマーの組み合わせ：① I × III ② I × IV ③ II × III ④ II × IV

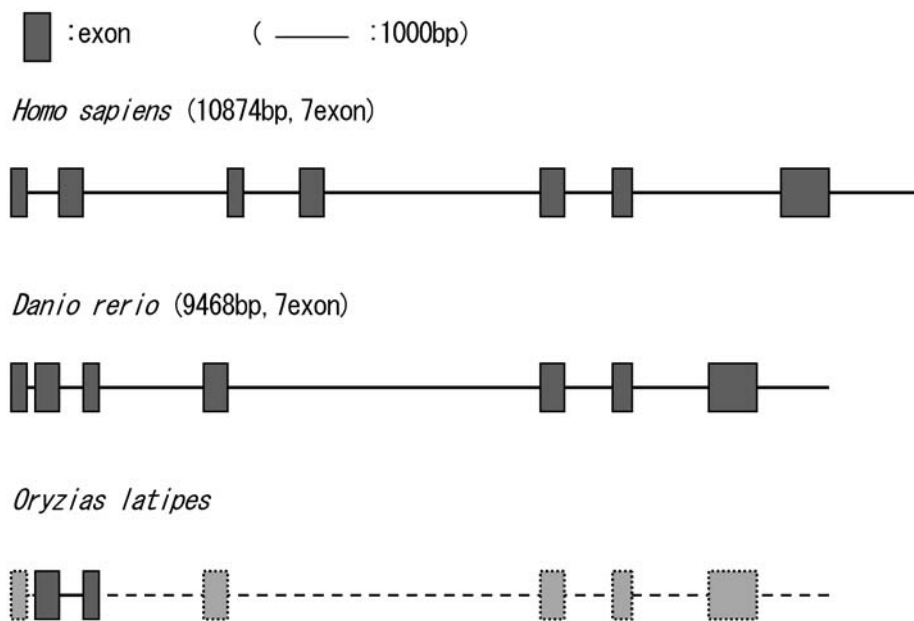


図8 推定されるメダカ *Oryzias latipes* *DHCR7* の遺伝子構造

比較のため、ヒト *Homo sapiens* 及びゼブラフィッシュ *Danio rerio* の既知の遺伝子構造も示している。exon どのような間の線は intron を示す。点線四角は推定 exon を示す。

