

学 位 論 文 題 名

ヒトミトコンドリア DNA の高変異領域における
遺伝子多型に関する研究

学位論文内容の要旨

研 究 目 的

ミトコンドリア DNA には時間に比例して一定の確率で変異が蓄積し、現代人は多くの系統に分化すると考えられている。特に変異の発生頻度が高い高変異領域は集団に特異的な多型構造を持つと考えられ、塩基配列の類似性をもとにグループ化したハプログループは、人類遺伝学的な集団の移動パターンの解明に利用されている。ミトコンドリア DNA は 1 細胞中に多くのコピーが含まれ、一部の塩基配列が異なるコピーを含んだヘテロプラスミーが知られている。中でも塩基番号 303-315 の配列長多型に観察されるヘテロプラスミーは同一個体でも必ずしも同一のパターンとはならないが、母子間において複数の組織を用いた変化については報告されていない。さらに、高変異領域は転写開始点である LSP や複製起点を含んでおり、LSP から複製起点の上流まで合成される転写産物をプライマーとして DNA 鎖が伸長する DNA 複製のメカニズムが知られている。複製初期の転写産物形成過程において、鋳型 DNA に依存して転写終結が生じることが報告されているが、個人差の大きい高変異領域の遺伝子多型がこの転写終結に関与することが推察される。本研究では、日本人集団における高変異領域の遺伝子多型に基づく個人差とヘテロプラスミーの構造変化を検討した。さらに、複製初期の転写終結における塩基番号 303-315 配列長の影響について考察した。

材 料 ・ 方 法

- 1) 材料 北海道在住の日本人 217 名から採取した血液より DNA を抽出した。また、塩基番号 303-315 にヘテロプラスミーをもつ 2 組の母子より血液、口腔粘膜、爪、毛髪 (4 本) の 7 試料をそれぞれ採取し、DNA を抽出した。
- 2) 高変異領域多型解析 217 名の DNA を用いて、高変異領域のうち HVR1 (塩基番号 15998-16400)、HVR2 (塩基番号 30-407) を PCR 増幅し、PCR 産物をダイレクトシーケンシング解析した。得られた塩基配列は標準配列 rCRS と比較した。
- 3) ハプログループ解析 36 座位のコード領域の SNPs 解析に基づいて判定した。
- 4) クローニング解析 2 組の母子の 7 試料を用いて塩基番号 1-393 を PCR にて増幅し、PCR 産物から pGEM-T Easy Vector を用いてサブクローニングを行い、各試料で 40 クローンを得た。

5) *in vitro* 転写反応と転写終結部位の決定 塩基番号 303-315 に代表的な配列長 (C_5TC_6 、 C_7TC_6 、 C_9TC_6 、 $C_{12}TC_6$ 、 $C_{15}TC_6$ 、 C_9 、 C_{11} 、 C_{13}) を含むプラスミド DNA を鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* 転写反応を行った。終結部位は転写産物より cDNA を合成し、3'末端をサブクローニングにより決定した。

結 果

1. 日本人集団における高変異領域の遺伝子多型に基づく個人差

日本人 217 名の DNA を鋳型とした HVR1、HVR2 の多型解析により HVR1 では塩基置換が 108 箇所、塩基の挿入が 2 箇所観察され、136 通りの塩基配列に分類された。一方、HVR2 は塩基置換が 40 箇所、塩基の挿入が 5 箇所、塩基の欠失が 3 箇所観察され、96 通りの塩基配列に分類された。最も高頻度で観察される HVR1 と HVR2 多型の組み合わせの出現頻度は 0.032 と極めて低い値を示した。さらに東アジア集団に共通である 27 のハプログループに分類され、ハプログループに特徴的な多型が特に HVR1 に観察された。

2. 母子間の塩基番号 303-315 の配列長多型におけるヘテロプラスミー解析

2 組の母子のそれぞれ 7 試料を用いたクローニング解析によりヘテロプラスミー構造を解析した。1 組目では母子の血液、口腔粘膜細胞、爪では類似したパターンを示したが、毛髪間で顕著な違いが観察されていた。2 組目では母子間で血液を除いてヘテロプラスミーが消失する傾向が見られたが、血液では逆の傾向が観察された。

3. 複製初期の転写産物形成過程への塩基番号 303-315 配列長多型の影響

コントロールを C_7TC_6 として、塩基番号 303-315 の配列長がより長くなることで転写終結が促進された。さらに、コントロールで 303-315 の下流に観察された転写終結部位は塩基番号 303-315 の配列長がより長くなることで塩基番号 303-315 内へとシフトしていた。

考 案

日本人集団において高変異領域のうち HVR1、HVR2 の多型に基づく個人差は極めて大きく、個人識別に有効であると考えられた。ハプログループと HVR1、HVR2 多型には緊密な関係があり、ハプログループに関連する遺伝子多型は特に HVR1 に凝縮されていることが示唆された。

ヘテロプラスミー構造の組織間変化は遺伝的ボトルネックにより説明されうるが、特に毛髪は限定された幹細胞に由来する DNA 分子から構成されるために毛髪間でも違いが生じやすいと考えられている。その結果、近縁の母系内では毛髪間で他の組織より多様なパターンが観察される可能性が示唆された。さらに、ヘテロプラスミー変化は母子間で一様ではないことが示された。

塩基番号 303-315 とその下流で生じた転写終結には塩基番号 303-315 の配列長が関与し、転写産物量と終結部位の変化は鋳型 DNA の C 連続数に対応して転写産物が G-rich となることで安定した高次構造を取りにくくなることに起因することが示唆された。

結 論

1. 日本人集団において高変異領域の遺伝子多型に基づく個人差は極めて大きく、特に HVR1 で高い多型性を示した。
2. ハプログループと高変異領域の遺伝子多型との間には緊密な関係があった。

- 3.塩基番号 303-315 の配列長多型を構成するヘテロプラスミーは同一個体の組織間あるいは母子間で多様なパターンを示し、母子間では組織ごとに一様ではない変化が生じていた。
- 4.塩基番号 303-315 の配列長は、複製初期の転写反応における転写終結に関与することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 関 健

副 査 准教授 菅 原 満

副 査 講 師 平 野 剛

副 査 教 授 清 水 恵 子

学 位 論 文 題 名

ヒトミトコンドリア DNA の高変異領域における

遺伝子多型に関する研究

ミトコンドリア DNA の中でも、変異の発生頻度が高い高変異領域にはヘテロプラスミーを含めた集団特異的な多型構造が見られ、法医鑑定に活用されている。また、全塩基配列の変異をもとに作成されたハプログループに基づく系統樹は、集団の移動パターンの解明に利用されるなどミトコンドリア DNA の遺伝子多型は広範囲に応用されるものとなっている。しかしながら、ハプログループとの比較による高変異領域の遺伝子多型の特性やヘテロプラスミーの構造変化についての報告は少ないのが現状である。さらに高変異領域の遺伝子多型が与える DNA 複製機構への影響については知られていない。

そこで本研究では、日本人集団における高変異領域の遺伝子多型に基づく個人差と母系内での異なる組織を用いたヘテロプラスミーの構造変化を検討した。また、DNA 複製初期の転写産物形成過程への塩基番号 303-315 配列長多型の影響について明らかにした。

(1) 日本人集団における高変異領域の遺伝子多型に基づく個人差

北海道在住の日本人 217 名から得た DNA を鋳型として、高変異領域のうち HVR1 および HVR2 の多型部位を検出し、合わせてハプログループを検出した。HVR1 では 110 箇所の変異部位により 136 通りに分類され、HVR2 では 48 箇所の変異部位により 86 通りに分類されており、HVR1 がより多型性に富んでいることが確認された。最も高頻度で観察される HVR1 と HVR2 の組み合わせの出現頻度は 0.032 と極めて低く、日本人集団における個人差は極めて大きいことが示された。また、東アジア集団に共通である 27 のハプログループに分類され、HVR 多型にハプログループ分類を追加することである程度の個人差が増大することが明らかとなった。さらに、ハプログループと高変

異領域の遺伝子多型との間には緊密な関係があり、ハプログループに関する遺伝子多型は HVR1 にほぼ集約して存在するものと思われた。ハプログループから高変異領域多型をある程度推定可能であることから、高変異領域多型解析において問題とされている様々な人為的エラー防止にハプログループ判定が有用な手段であることが示された。

(2) 塩基番号 303-315 の配列長多型におけるヘテロプラスミー解析

塩基番号 303-315 の配列長多型とヘテロプラスミー状態との関連性、2 組の母子間でのヘテロプラスミー構造の変化について検討を行った。塩基番号 303-315 の配列長多型において、より長い塩基配列で明確なヘテロプラスミー状態となりやすいことが示された。また、ヘテロプラスミーは同一個体でも組織間で異なるパターンを示しており、結果として母子間であっても多様なパターンが観察されることが示された。さらに、母子間でのヘテロプラスミー構造の変化は組織間で異なっており、一様ではない複雑な変化が生じていることが明らかとなった。

(3) 複製初期の転写産物形成過程への塩基番号 303-315 配列長多型の影響

塩基番号 303-315 の配列長多型を鋳型とした *in vitro* 転写反応により転写産物量と終結部位を明らかにした。塩基番号 303-315 における異なる C 連続数からなる配列長多型はミトコンドリア DNA の複製初期の転写産物形成過程において、配列長に依存して転写終結を促進させた。さらに転写終結部位も配列長に依存して上流側へとシフトしていた。転写終結は鋳型 DNA の C 連続数に対応した転写産物の G-rich 構造によって調節されている可能性が示唆され、塩基番号 303-315 の配列長は転写終結において極めて重要な働きを担っていることが明らかとなった。

以上より、ヒトミトコンドリア DNA の高変異領域における多型性と多型により調節されるメカニズムについて明らかにした。本研究により高変異領域多型に基づく個人差の程度、高変異領域とハプログループとの関連性、さらには母子間の一様ではないヘテロプラスミーの構造変化が示されたことから、本知見は法医鑑定におけるミトコンドリア DNA の利用において有益なものとなりうる。また、遺伝子多型として観察された C 連続数に依存的な転写終結が示されたことから、新たな転写反応の終結メカニズムとして重要な知見となることが期待される。以上の点で本論文「ヒトミトコンドリア DNA の高変異領域における遺伝子多型に関する研究」に含まれる研究成果は優れており、博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認めた。