



平成 23 年 8 月 1 6 日

報道関係者各位

国立障害者リハビリテーションセンター  
独立行政法人理化学研究所

## ヒト網膜細胞由来の完全な遺伝子 16 万クローンを公開 -世界最大級のヒト網膜完全長 cDNA リソース-

### <概要>

国立障害者リハビリテーションセンター研究所（国リハ研、加藤誠志所長）は、視覚障害に関わる遺伝子を探索する研究の一環として、ヒト網膜細胞で発現している全遺伝子の解析を進め、独自技術を用いて約 16 万個のヒト網膜細胞由来完全長 cDNA クローンを作製しました。この中の 39,643 クローンは、末端の塩基配列情報を解析済みであり、7,067 種類の遺伝子から構成されています。このクローンセットは、ヒト網膜細胞由来の完全長遺伝子セットとしては世界最大級であり、これまで取得困難であった希少な遺伝子や長いサイズの遺伝子の完全長 cDNA を多数含んでいます。理化学研究所バイオリソースセンター（理研 BRC、小幡裕一センター長）は、これらのクローンを公開し、世界中の研究者による利用を可能にしました。今後、網膜細胞の変性や再生メカニズムを解明するための材料としてのみならず、ヒト遺伝子の多様性に関する研究を行うための完全長 cDNA リソースとしての活用が期待されます。

### 1. 背景

国立障害者リハビリテーションセンターを訪れる視覚障害者が最も多く罹患している疾患は、網膜色素変性症（色変）です。色変は、夜盲に始まり、視野狭窄を経て最終的には失明に至る進行性の遺伝子疾患です。人種や地域に依存せず 3,500～4,000 人に一人の罹患率であり、日本で 3 万人以上、世界で 170 万人以上の患者がいると言われています。これまでに世界で 40 種類以上の原因遺伝子が報告されていますが、日本人の色変患者の原因遺伝子も多様であることが示唆されています。そこで、国リハ研では新規の原因遺伝子候補を探索する目的で、網膜細胞（視細胞と網膜色素上皮細胞、図 1）で発現している遺伝子の網羅的解析を実施してきました。

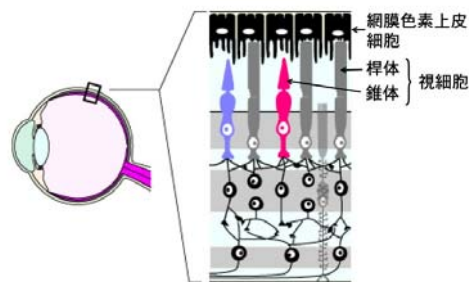


図1 網膜の構造

国リハ研の加藤が開発したベクターキャッピング法と呼ばれる独自技術を用いて、網膜細胞から完全長 cDNA ライブラリーを作製し (図 2) [1,2]、このライブラリーに含まれる cDNA クローンの塩基配列解析を行いました。その結果、網膜細胞で発現している多くの新しい遺伝子を見出すことが出来ました[3,4]。収集したクローンセットは、ヒト網膜細胞由来の完全長遺伝子セットとしては世界最大級であり、これまで取得困難であった希少な遺伝子や長いサイズの遺伝子の完全長 cDNA を多数含んでいます。したがって、このクローンセットは網膜の研究者にとってのみならず、ヒトの遺伝子に関わっているすべての研究者にとってもヒト完全長 cDNA リソースとして有用です。

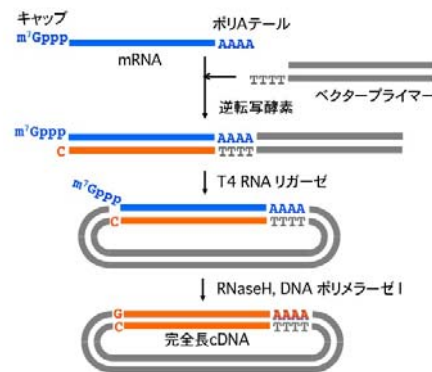


図2 ベクターキャッピング法

理研 BRC では、遺伝子リソースについて、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 「遺伝子材料」(ヒト、動物および微生物)の中核機関として、国内外の大学・研究機関で作製された各種生物の遺伝子を収集、保存、品質管理し、提供しています。ヒト遺伝子については、昨年 3 月から、文部科学省ゲノムネットワークプロジェクト (GNP)<sup>iii</sup>によって作製ならびに収集されたヒト完全長 cDNA コレクションを提供しています。GNP のコレクションは約 14, 000 種類のヒト遺伝子をカバーしていますが、ヒト遺伝子の数は約 23, 000 種類とされています。今回の国リハ研から寄託されたヒト網膜完全長 cDNA クローンを加えることにより、理研 BRC のヒト完全長 cDNA コレクションを充実し、ユーザーの利便性の向上を図りました。

## 2. 本クローンセットの内容

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 とヒトレチノblastoma 細胞株 Y79 (錐体前駆細胞由来) という 2 種類の網膜由来の細胞を用いて、それぞれの細胞の mRNA からベクターキャッピング法で完全長 cDNA ライブラリーを作製しました。ARPE-19 ライブラリーから約 10 万クローン、Y79 ライブラリーから約 9 万クローン、総計 19 万クローンを単離し、各クローンを 96 ウェルあるいは 384 ウェルのプレートにグリセロールストックとして保存しました。これらのクローンの中から選んだそれぞれ約 24,000 クローンの末端部分塩基配列解析を行い、それぞれ約 20,000 クローン、合計 39,643 個の完全長 cDNA クローンを同定しました[3,4]。これらのクローンは、塩基配列解析の結果、7,067 種類の遺伝子からなることが分かりました。配列解析を行った全クローンの内訳と末端の部分塩基配列のリストは、理研 BRC のホームページ[<http://dna.brc.riken.jp/ja/NRCDhumja.html>]からダウンロードできます。理研 BRC では、クローン単位での分譲に対応いたしております。また、ご希望により、各々のライブラリーを丸ごと複製したプレート単位での分譲にも対応いたします。このライブラリーに含まれる完全長 cDNA クローンの割合は 83%ですので、19 万クローンの中には、約 16 万個の完全長クローンが含まれていると見積もられます。

### 3. 本クローンセットの特徴

ベクターキャッピング法を用いて合成した完全長 cDNA は、従来法で合成した cDNA に比べて次のような利点を有しています。

(1) キャップ付加部位からポリ A テールまでを含む完全長 cDNA である。

完全長 cDNA の末端に塩基 G が一個挿入されるので、G の有無によって完全長かどうか判定できます (図 2)。本クローンセットに含まれている完全長 cDNA クローンはこの要件を満たしており、公開したクローンリストに記載した配列情報により、判定ができます。

(2) 人工的な変異や欠失を含む可能性が極めて低い。

ベクターキャッピング法には、従来法に含まれていた人工的な変異や欠失を生成する可能性のある工程がありません。従って、cDNA 合成過程で人工的な変化が起こる可能性が極めて低く、完全な mRNA の情報を持つ正真正銘の完全長 cDNA が得られます。

(3) 希少な遺伝子や長い遺伝子を含む。

ベクターキャッピング法を用いると、mRNA の発現量や長さによるバイアスがかからず、希少な遺伝子や長い遺伝子の完全長 cDNA が合成されます。実際、7,000 塩基対以上の cDNA を有するクローンを多数含んでおり [1,3,4]、これまでに同定された最長のクローンは 13,000 塩基対でした [4]。

(4) 新規のバリエーションを含む。

遺伝子名が同じでも、転写開始点・スプライシング・ポリ A 付加部位が異なる多くのバリエーションを含んでいます (図 3) [3,4]。特に、希少な遺伝子や長い遺伝子のバリエーションには、データベースにも記載のない新規のものも多く含まれています。

(5) アンチセンス遺伝子を同定できる。

ベクタープライマーを使用しているため cDNA インサートの向きが一義的に決まり、アンチセンス遺伝子 (図 3) 由来の cDNA の同定が容易にできます [3,4]。本クローンセットは、これまで確認されていなかった新規のアンチセンス遺伝子 cDNA を含んでいます。

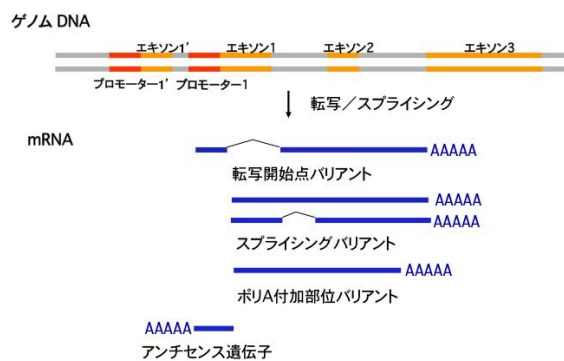


図3 mRNAバリエーションの構造

### 4. 関連する発表論文

1) Kato S, Ohtoko K, Ohtake H, Kimura T. Vector-capping: a simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library. DNA Res. 2005 Feb 28;12(1):53-62.

<http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/12/1/53.long>

2) Kato S, Oshikawa M, Ohtoko K. Full-length transcriptome analysis using a bias-free cDNA library prepared with the vector-capping method. Methods Mol Biol. 2011;729:53-70.

<http://www.springerlink.com/content/v167171110r03558/#section=864398&page=1>

3) Oshikawa M, Sugai Y, Usami R, Ohtoko K, Toyama S, Kato S. Fine expression profiling of

full-length transcripts using a size-unbiased cDNA library prepared with the vector-capping method. DNA Res. 2008 Jun 30;15(3):123-36.

<http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/15/3/123.long>

4) Oshikawa M, Tsutsui C, Ikegami T, Fuchida Y, Matsubara M, Toyama S, Usami R, Ohtoko K, Kato S. Full-length transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jun 22. [Epub ahead of print] <http://www.iovs.org/content/early/2011/06/22/iovs.11-7479.abstract>

## 5. クローンセット作製に関わったグループ

- ・ 国立障害者リハビリテーションセンター研究所障害工学研究部
- ・ 東洋大学大学院工学研究科
- ・ (株) 日立ハイテクノロジーズ

## 6. 本発表資料の内容に関する問い合わせ先

国立障害者リハビリテーションセンター

取材申込： 管理部企画課企画係長 壘 準 (もたい じゅん)

TEL： 04-2995-3100 (内線 2147) FAX： 04-2995-3661

内容照会： 研究所長 加藤誠志 (かとう せいし)

TEL： 04-2995-3100 (内線 2500) FAX： 04-2995-3132

独立行政法人理化学研究所

バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室

室長 小幡 裕一 (おばた ゆういち)

専任研究員 村田 武英 (むらた たけひで)

TEL: 029-836-3612 FAX: 029-836-9120

E-mail: dnabank@brc.riken.jp

- 
- 完全長 cDNA クローン** cDNA とは、ゲノム DNA から転写された RNA の塩基配列に相補的になるように合成された DNA のこと。完全長 cDNA とは、広義には転写された RNA 全長とまったく同じ長さを有する cDNA のことであり、狭義には、タンパク質翻訳領域のみの全長を持つ cDNA のことを指す。クローンは、遺伝的に同一の集まりのこと。cDNA クローンは、元となる cDNA から作られた、配列がまったく同じようにコピーされた cDNA のこと。この完全長 cDNA を効率的に合成するためには、非常に高い技術が必要とされ、わが国が世界に先んじている。
  - 文部科学省ゲノムネットワークプロジェクト** 2004 年度から文部科学省（笹月健彦推進委員会主査、榊佳之実施会議議長、林崎良英中核機関研究課題代表者、五條堀孝中核機関研究課題代表者）によって開始された。今後のポストゲノムシーケンシング研究の発展を目指して、国際レベルにある研究ポテンシャルを活用しつつ、遺伝子の発現調節機能やタンパク質等の生体分子間の相互作用の網羅的な解析に基づき、生命活動を成立させているネットワークを明らかにすることを目的とした。

---

(参考) cDNA クローンの利用手続き

① 利用を希望する cDNA クローンの ID 検索

クローンの利用希望者は、理研 BRC のホームページ (<http://dna.brc.riken.jp/ja/NRCDhumja.html>) から全クローンの内訳と末端の部分塩基配列のリスト (Excel ファイル) をダウンロードし、目的とする遺伝子を検索して下さい。検索結果に示されるクローン ID をもとに、理研 BRC へ cDNA クローンを請求して下さい。

② 理研 BRC への提供依頼

理研 BRC へクローンを請求するために、以下の 2 種類の必要書類を理研 BRC へ送付して下さい。

- ・「遺伝子材料提供依頼書」1 部
- ・「生物遺伝資源提供同意書 (以下 MTA)」2 部

「遺伝子材料提供依頼書」および「MTA」は理研 BRC のホームページよりダウンロードして下さい。なお、学術機関による学術研究以外の利用の場合は、クローンの作製者の使用承諾を得る必要があります。事前に理研 BRC にご相談下さい。

③ cDNA クローンの受領

必要書類を確認後、理研 BRC から cDNA クローンを発送します。提供する cDNA クローンは、提供容器 (プラスチックバイアル) に DNA をおよそ 1  $\mu$ g 封入して封筒に入れて郵送します。封筒には、理研 BRC の署名入りの「MTA」、受領確認用の「受領書」、cDNA クローンが予定通り増殖するかをご報告いただくための「追跡調査用紙」の様式が同封されています。利用者は cDNA クローンの到着後、「受領書」を返送して下さい。「追跡調査用紙」は、クローンの増殖確認後に送付して下さい。

④ 提供手数料の支払い

通常、理研 BRC は cDNA クローンの受領書を受取り後、1 週間以内に請求書を発送します。利用者は請求書の記載金額をお支払い下さい。提供に当たっては、送料、容器や封筒、cDNA クローンの増殖・検査費用などに係る必要実費を提供手数料として利用者にご負担いただいております。サンプル 1 本あたり、国内の学術研究機関の場合で、8,400 円 (消費税込み) を理研 BRC から請求します。なお、提供手数料の徴収により、理研 BRC 及びクローン作製者が経済的利益を得ることはありません。