

10. 霊長類の種内変異を解析するための

PCR プライマーデータベース Prim-Prim の開発とその応用

国立遺伝学研究所・総合研究大学院大学遺伝学専攻

齋藤 成也 鈴木留美子

立命館大学総合理工学院生命科学部

河合 洋介

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

石田 貴文

ヒトを除くすべての種が「絶滅危惧種」に指定されている霊長類は保全生物学的な観点からみて重要な研究対象である。絶滅が危惧されている生物種の保全のためには、系統情報が基礎データとして重要であり、また各種内の遺伝的多様性の把握も重要である。霊長類の遺伝的多様性の解析にはミトコンドリア DNA が分子マーカーとして用いられることが多いが、母系遺伝という遺伝様式のために遺伝子の系図のある側面しか知ることができない。そのため霊長類の系統関係や遺伝的多様性を包括的に理解するためには核 DNA の多数の遺伝子座を分子マーカーとして用いる必要がある。そこで霊長類の保全生物学と種内の多様性研究というふたつの目的のために、“Prim - Prim”というデータベースの設立を計画した。このデータベースは既知の霊長類ゲノム配列の比較から、未解読の霊長類の DNA 断片を分子マーカーとして増幅させることのできる「霊長類ユニバーサルプライマー」を収める事を目標としている。データベースの名称は、Primers for Primates の略称であり、プライマーと霊長類のどちらの単語も同一のラテン語語根であることに留意している。

すでにゲノム配列の解読が終了しているヒト (*Homo sapiens*) とアカゲザル (*Macaca mulatta*) のゲノム配列¹⁾を比較し、変異性の高いイントロン領域をはさんだエクソンが両種で完全に一致している領域を抽出した。この中から PCR プライマーとしてのよい化学的性質を持つ部分配列を同定し、これらを「狭鼻猿類ユニバーサルプライマー」の候補配列として予測した。

ヒトとアカゲザルに共通して保存されているエクソン部位の配列から PCR プライマーを設計するための概念図を図 1 に示した。最初に、アカゲザルゲノムと順系相同なヒトゲノム転写領域の塩基配列 16,265 配列を Ensembl (www.ensembl.org) から取得した。次に両端のエクソンが 37 塩基以上の長さ、イントロンが 500~1000 塩基の長さで GC 含量が 60%未満という条件でエクソン~イントロン~エクソン構造を抽出し、さらにソフトウェア Primer3 (primer3.sourceforge.net) で PCR プライマー候補を予測し、4,252 組を抽出した。最後に、In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) でアカゲザルゲノムを検索し、非相同な部位を除去して、最終的に 2,303 組のプ

Development and application of PCR primer database Prim-Prim for analysing intraspecific variation of primates

Saitou Naruya*¹, Suzuki Rumiko*¹, Kawai Yosuke*², and Ishida Takafumi*³. *¹National Institute of Genetics and SOKENDAI, *²Ritsumeikan University, *³University of Tokyo.

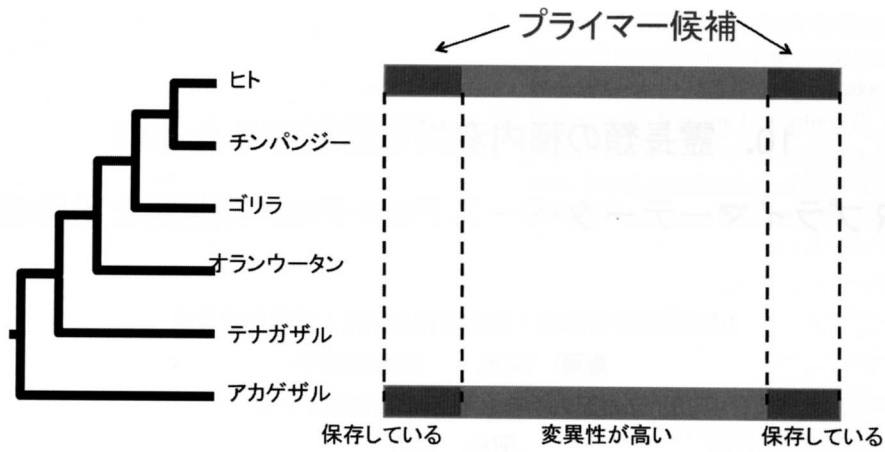


図1 ヒトとアカゲザルゲノムの整列配列からプライマーを設計する概念図

プライマー候補が残った。これらの情報は Prim-Prim Database (<http://sayer.lab.nig.ac.jp/primprim/>) から一括してダウンロードすること

ができる (図2)。

プライマー予測の妥当性を検証するためにこれらのうち10組を用いてヒト, チンパンジー (*Pan*

primers from literature

Primer_id	forward primer	reverse primer	position in human genome	literature
SN-MIS	CACACCGCCGTCACYCYCTCAA	ACCGGCTCTGCCATCTTAACSN	Mt:1505-3228	Noda et al. 2001

experimentally confirmed primers
(short sequences conserved between human and rhesus macaque)

Primer_id	forward primer	reverse primer	position in human genome
ENST00000337907:17-18	AATGAAGACATCCGCTCCAG	GTCAGCCTCCTCCGTAICAG	1:8344524-8345320
ENST00000264331:23-24	GAAGCTGCTGGACTGCAATA	TCCCACAGCCACTCCTTAC	3:25635345-25636356
ENST00000230859:8-9	ATGCAGGTGAAGCAGGTCTT	GATCCACCTCCGGIAGTCAA	5:6801704-6802669
ENST00000285068:12-13	ATCACCAGAAAGGAGCAAGA	GAGGAGTCCAGAAATCACCA	7:134928481-134929834
ENST00000297785:6-7	GTTGTCAAACAGCAGAGCA	TGTAGGCCCATAACAGGAA	9:74728860-74730219
ENST00000209606:3-4	GCAAGCAGTAACACTTGCAGA	CGCAGAACCACTTCCAACT	11:9450893-9452063
ENST0000040584:1-2	GTCTCCAGCCTCATGTTTC	CAAGGTCTGATACCAGCTGT	12:52689772-52691139
ENST00000315596:6-7	AACATTGCTTGGGTCAAGTC	CCAAAGCTCCTGAGACACTG	13:32130669-32131290
ENST00000306829:27-28	GCCCATGCCATGTTAGATTC	AAGCAGCTTCTTCTGGACT	15:60816578-60817704
ENST00000377353:17-18	AACCACAGCCTGGATGTCCTC	CACATAGAGGGGCTGGTCA	17:38097536-38098042

Download
Excel Format
CSV Format

図2 Prim-Prim Databaseの初期画面

troglydotes), シロテナガザル (*Hylobates lar*), フクロテナガザル (*Symphalangus syndactylus*) のゲノム DNA の増幅を試みた。テナガザルは、我々が決定したミトコンドリア DNA 配列²⁾でもそれらの系統関係がはっきりしないグループであり、また種間交雑の可能性がある。

その結果いずれのサンプルにおいても期待される塩基配列をもつ DNA 断片が得られたことが確かめられた。図 3 に、増幅し塩基配列を決定した DNA 領域の系統樹の例をしめした。Macaque_ref, human_ref, chimp_ref, orangutan はデータベー

スから取得した配列である。

文 献

- 1) Rhesus macaque Sequencing and Analysis Consortium: Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science*, 316(5822): 222-234, 2007.
- 2) Noda R., Kim C.-G., Takenaka O., Ferrell R. E., Tanoue T., Hayasaka I., Ueda S., Ishida T., and Saitou N. Mitochondrial 16S rRNA sequence diversity of hominoids. *Journal of Heredity*, 92: 490-496, 2001.

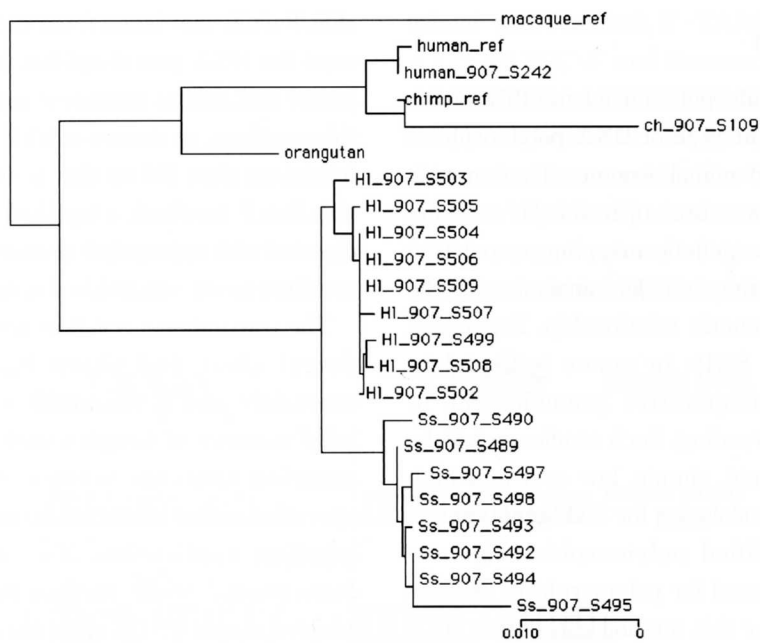


図 3 例として増幅し塩基配列を決定した DNA 領域の系統樹