

「ゲノムの構造と機能」  
平成12年度採択研究代表者

新川 詔夫

(長崎大学附属原爆後障害医療研究施設 教授)

## 「染色体転座・微細欠失からの疾病遺伝子の単離と解析」

### 1. 研究実施の概要

ヒトの疾病遺伝子の単離・解析を染色体構造異常からアプローチする。単一遺伝子病と染色体転座を合併する患者では、転座による遺伝子断裂が起き発症すると考えられ、一方、隣接遺伝子症候群を伴う微細染色体欠失中には数種の遺伝子が包含されていると考えられる。両者ともに、疾病遺伝子の同定や単離の絶好の材料である。本研究は、このような症例を全国規模でかつ組織的に集積し、転座切断点および微細欠失領域から、位置的単離法および位置的候補遺伝子探索法により多くの疾病遺伝子の単離・同定を目指すものである。平成12年度は、以下の結果を得た。

- (1) 鏡像多指趾症患者がもつ転座( $t(2; 14)(p23.3; q13)$ )の14q13切断点から、新規遺伝子MIT1を単離した。今後は別の患者で変異を同定し、原因遺伝子の確認に入る。
- (2) Sotos症候群(脳性巨人症)患者の( $t(5; 8)(q35; q24.1)$ )切断点をカバーする4種のコスミドクローンを単離し、平成13年度の研究に備えた。
- (3) 高度の肥満を伴う糖尿病患者の( $t(3; 9)(p14.1; q31)$ )の切断点クローニングを開始した。
- (4) 肢中部短縮型骨格異形成症患者の( $t(2; 8)(q31; p21)$ )切断点領域2q31を含むコスミドを同定した。平成13年度はこれらのコスミドクローンの解析に入る。
- (5) 微細欠失内の遺伝子同定に用いるゲノムCGHアレイは、それを構築するための材料の収集と調整をほぼ終えた。

### 2. 研究実施内容

平成12年度は、分子遺伝学研究グループと臨床細胞遺伝学研究グループの2グループで各々仕事を分担して、以下の5つの研究を開始した。(1)染色体転座( $t(2; 14)(p23.3; q13)$ )を伴った鏡像多指趾症、(2) ( $t(5; 8)(q35; q24.1)$ )を伴ったSotos症候群、(3) ( $t(3; 9)(p14.1; q31)$ )をもつ肥満・糖尿病、(4) ( $t(2; 8)(q31; p21)$ )を伴う肢中部短縮型骨格異形成症について、転座切断点の同定と切断点クローニングを行った。さらに、(5)ゲノムCGHアレイにより微細欠失中の欠失遺伝子を同定する手法を確立するため、新規の患者・胎児組織を集積し、さらにアレイ構築のための材料調

整を行った。

(1) 臨床細胞遺伝学研究グループ

- (A) 患者材料の収集：「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(厚生科学審議会)に従い、インフォームド・コンセントを得て、染色体構造異常と表現型異常の双方をもつ15例の新規患者の材料を収集した。一部はEBウイルスで不死化し、細胞を液体窒素中で保存した。一方、分子遺伝学研究グループで単離・同定するSotos症候群候補遺伝子の変異解析のため、32例の新規患者を集積し、試料を調整した。
- (B) 高度の肥満を伴う糖尿病患者の転座切断点解析：1家族3名の罹患者(母、兄、妹)がもつ転座の切断点クローニングの第一段階として、分子遺伝学研究グループから提供されたBACライブラリーからデータベースを利用し、さらに染色体FISH法によるクローン同定を行った。その結果、3p14.1切断点は2つのSTSの間に、9q31切断点も2種のSTS間に狭めることができた。平成13年度は切断点をクローニングする予定である。
- (C) 上記以外の疾患のFISH法による転座切断点解析：鏡像多指趾症患者、Sotos症候群患者、および肢中部短縮型骨格異形成症患者における転座切断点を同定した。

(2) 分子遺伝学研究グループ

- (A) 鏡像多指趾症：患者がもつ転座14q13転座切断点付近に1.2 MbのBAC/PACコンティグを構築し(図1)、臨床細胞遺伝学研究グループによる切断点解析データを利用した結果、BAC B368に切断点が存在することが明らかになった。次いで、exon trapping、ランダムシーケンス法、CpGアイランドシーケンス法により転座点付近の遺伝子の同定を行った。同時に、新規に作成したSTSマップを手がかりとしてデータベース内のシーケンスを整列させることによって、コンティグ全体のシーケンスも判明したのでこれらのシーケンスデータも使用した。転座点付近に既知のHNF3 $\alpha$ 遺伝子と新規遺伝子MIP1遺伝子を単離した。現在のところ、この1.2 Mbのコンティグ領域には他に遺伝子は存在しない。HNF3 $\alpha$ は糖尿病の原因遺伝子の1つであり、後軸性鏡像多指趾の原因遺伝子の候補としては考え難い。一方、MIP1は全長350 kbで、15個のエクソンから成り、443アミノ酸の蛋白をコードしている。患者の転座によって、イントロン10で断裂していた。ノザン解析では成人の心、肝、骨格筋、腎、膵、および胎児腎で発現していた(図2)。今後は、MIP1を最大の候補として、別の患者における変異解析を行う予定である。

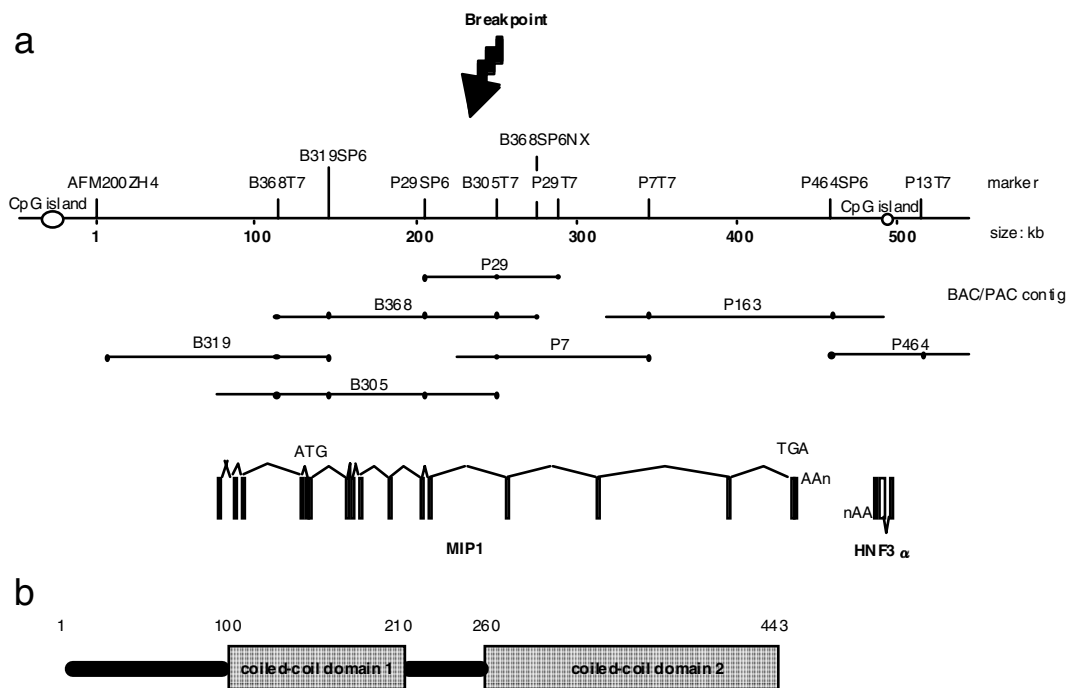


図1．新規遺伝子MIP1のゲノム構造(a)と推定蛋白(b)

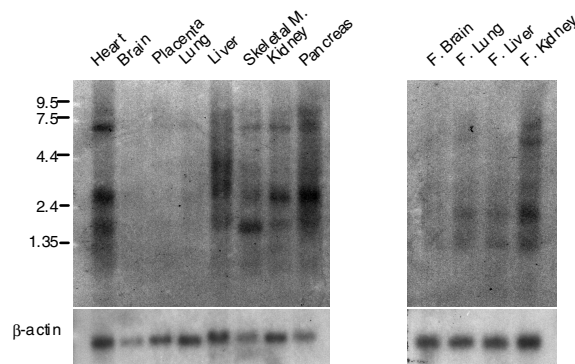


図2．MIP1の発現

(B) Sotos症候群：臨床細胞遺伝学研究グループによる切断点解析データから患者の5q35転座切断点近傍に存在する2つの候補遺伝子*FGFR4*と*JAZ*の変異解析を行ったが変異は同定されなかった。次にRPCI-1, 3 PACライブラリースクリーニングを行い、2つのPACクローンを同定し(図3)、FISH法にて転座切断点をカバーすることを確認した。このうちの1つのPACクローンのコスミドサブクローニングを行い切断点をカバーする4種のコスミドクローン(c2B, c4D, c6A, c6B)を単離した。今後は候補遺伝子がこれらのクローン中にあることを想定し、解析する。

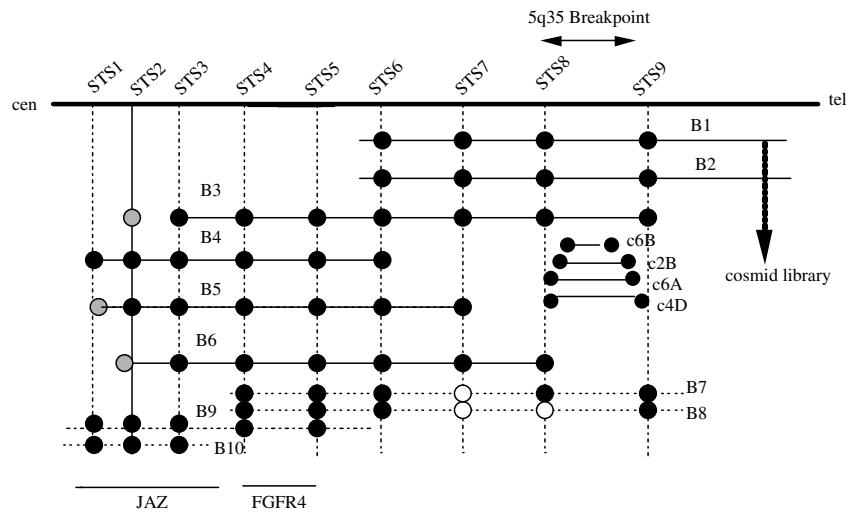


図3 . 5q35切断点付近のSTS/EST地図

(C) 肢中部短縮型骨格異形成症：患者の切断点領域2q31にはHoxD遺伝子がマップされているが、RPCI-1, 3ライブラリーから同遺伝子を含む9種のクローンを単離した。これを用いて臨床細胞遺伝学研究グループが行ったFISH解析結果を利用し、2q31切断点を含む約150kbのPACクローンを単離した。さらに領域を狭めるため、そのコスミドサブクローン260個を作成しコンティグを構築し、切断点領域を含むコスミドc181とc188を同定した(図4)。平成13年度はこれらのコスミドクローンの解析に入る。

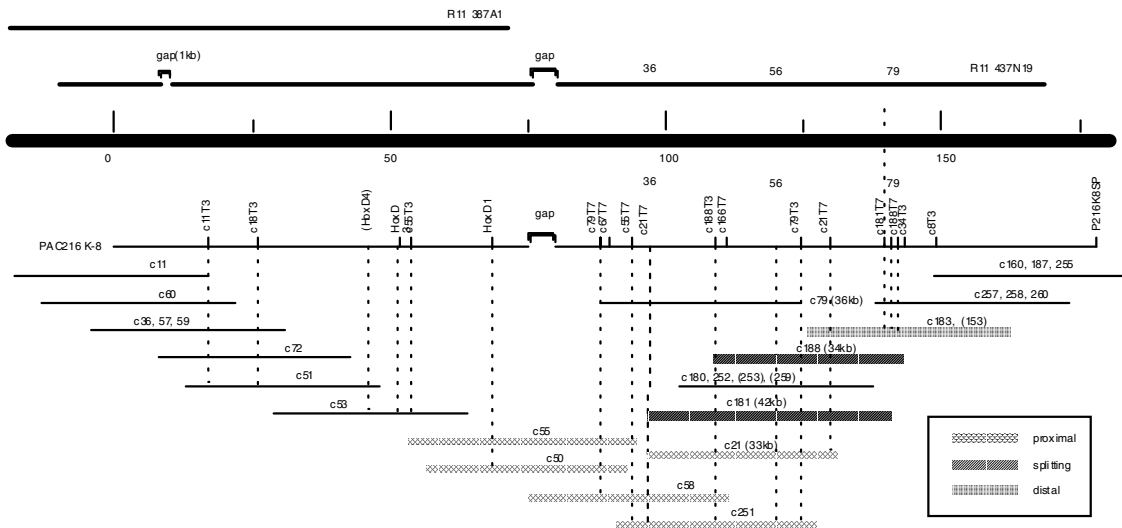


図4 . 2q31切断点付近のコスミドコンティグ

④ ゲノム CGHアレイの構築：ヒトゲノムプロジェクトの共通プラットフォームであるRPCI-11 BACライブラリーを購入した。本ライブラリーは、draft sequenceの鋳型であり、ヒト全ゲノムを1 Mb毎にカバーするBAC クローンは全て入手済みとなった。これに加えヒト染色体の全テロメアを網羅する計57 BAC/PACクローンを現在収集中である(29クローンは既得)。テロメアクローンは、通常の染色体検査で同定されない微細なテロメア領域の欠失・重複を同定するために必須である。これらのクローンから高純度DNAを抽出しBAC DNA arrayの基礎実験に入る予定である。

### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ghadami M, Makita Y, Yoshida K, Fukushima Y, Wakui K, Ikegawa S, Yamada K, Kondo S, Niikawa N, Tomita H : Genetic mapping of the Camurati-Engelmann disease locus to chromosome 19q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* 66: 143-147, 2000.

Yamada K, Tomita H, Amemiya T, Niikawa N : Genetically distinct autosomal dominant posterior polar cataract in a five-generation Japanese family. *Am J Ophthalmol* 129 : 159-165, 2000.

Kondo-Saitoh A, Matsumoto N, Sasaki T, Egashira M, Saitoh A, Yamada K, Niikawa N, Amemiya T : Two nonsense mutations of PAX6 in two Japanese aniridia families : Case report and review of the literature. *Eur J Ophthalmol* 10: 167-172, 2000.

Kinoshita A, Saito T, Tomita H-A, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G, Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N, Yoshiura K: Domain specific mutations in the human transforming growth factor beta 1 gene ( *TGFB1* ) result in Camurati-Engelmann disease. *Nature Genet* 26(1) : 19-20, 2000.

Yamada K, Tomita H, Yoshiura K, Wakui K, Fukushima Y, Ikegawa S, Ishida T, Matsuo M, Matsumoto T, Sonta S, Nakamura Y, Amemiya T, Niikawa N : An autosomal dominant posterior polar cataract locus maps to human chromosome 20. *Eur J Hum Genet* 8 : 535-539, 2000.

Yoshiura K, Noda Y, Kinoshita A, Niikawa N : Association of doublecortin with the microtubules : An ex vivo co-localization study of mutant doublecortin. *J Neurobiol* 43 : 132-139, 2000.

Uotani S, Yamasaki H, Takino H, Kawasaki E, Matsuo H, Yamasaki S, Jinno Y, Niikawa N, Ito M, Sugie H, Yamaguchi Y, Eguchi K : Identification of a 5' splice junction mutation in the debranching enzyme gene in a Japanese patient with

glycogen storage disease type IIIa. *J Inherit Metab Dis* 23 : 527-528, 2000.

Hayashida S, Yamasaki K, Asada Y, Soeda E, Niikawa N, Kishino T : Construction of a physical and transcript map flanking the imprinted *MEST/PEG1* region at 7q32. *Genomics* 66 : 221-225, 2000.

Tsuda M, Egashira M, Niikawa N, Wada Y, Honke K : Cancer-associated alternative usage of multiple promoters of human GalCer sulfotransferase gene. *Eur J Biochem* 267 : 2672-2679, 2000.

Ghadami M, Tomita H-A, Najafi M-T, Yamada K, Majidzadeh-A K, Niikawa N: Bardet-Biedl syndrome type 3 in an Iranian family : Clinical study and confirmation of disease localization. *Am J Med Genet* 94 : 433-437, 2000.

Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kue JA, Ramocki MB, Newborn SK, Dudlicek LL, May LF, Mills PL, Das S, Dobyns WB, Ledbetter DH : The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the *LIS1* gene. *Hum Mol Genet* 9 : 3019-3028, 2000.

Miyoshi O, Kishino T, Niikawa N : Silver-Russell syndrome and ring chromosome 7. *J Med Genet* 37 : 380, 2000.

Yamasaki K, Hayashida S, Miura K, Masuzaki H, Ishimaru T, Niikawa N, Kishino T : The novel gene,  $\gamma$ 2-COP, in the 7q32 imprinted domain escapes genomic imprinting. *Genomics* 68: 330-335, 2000.

Iida A, Emi M, Matsuoka R, Hiratsuka E, Okui K, Ohashi H, Inazawa J, Fukushima Y, Imai T, Nakamura Y : Identification of a gene disrupted by inv(11) (q13.5q25) in a patient with left-right axis malformation. *Hum Genet* 106 : 277-287, 2000

De Baere E, Fukushima Y, Small K, Udar N, Van Camp G, Verhoeven K, Palotie A, De Paepe A, Messiaen L : Identification of BPESC1, a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation, t(3;4)(q23;p15.2) in a patient with BPES. *Genomics* 68 : 296-304, 2000

Takai Yasushi, Tsutsumi O, Harada I, Morita Y, Momoeda M, Fukushima Y, Taketani Y : A case of XY pure gonadal dysgenesis with 46,XYp-/47,XXYp-karyotype whose gonadoblastoma was removed laparoscopically. *Gynecol Obstet invest* 50 : 166-169, 2000

Ishikawa S, Ishikawa M, Tokuda T, Yoshida K, Wakui K, Matsuura S, Ohara S, Sekijima Y, Hidaka E, Fukushima Y, Shigeta H, Komatsu K, Ikeda S : Japanese family with an autosomal dominant chromosome instability syndrome : A new



neurodegenerative disease? *Am J Med Genet* 94:265-270, 2000

Fukushima Y : Pitfalls of chromosome analysis. *Congenital Anomalies* 40 : 131-132, 2000

Muroya K, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, Kameyama J, Sato H, Suzuki Y, Terasaki H, Gomyo H, Wakui K, Fukushima Y, Ogata T : Sex-determining gene (S) on distal 9p : Clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol & Metabol* 85 : 3094-3100, 2000

Wada T, Kubota T, Fukushima Y, Saitoh S : Molecular genetic study of Japanese patients with X-linked  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X) *Am J Med Genet* 94 : 242-248, 2000

Ogata T, Kosho T, Wakui K, Fukushima Y, Yoshimoto M, Miharuru N : Short stature homeobox-containing gene duplication on the der(X) chromosome in a female with 45,X/46,X,der(X), gonadal dysgenesis, and tall stature. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 2927-2930, 2000

Nakane T, Kubota T, Fukushima Y, Hata Y, Ishii J, Komiyama A : Opitz trigonocephaly (C)-like syndrome, or Bohring-Opitz syndrome : Another example. *Am J Med Genet* 92 : 361-362, 2000

Ogata T, Wakui K, Kosho T, Muroya K, Yamanouchi Y, Takano T, Fukushima Y, Rappold G, Suzuki Y : Structural analysis of a rare rearranged Y chromosome and its bearing on genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 92 : 256-259, 2000

Ogiso Y, Ueno I, Fujimori M, Fukushima Y, Katsuyama T : A novel non-pathogenic polymorphism of the APC gene in a patient with familial adenomatous polyposis coli. *Jpn J Clin Oncol* 30 : 204-206, 2000

Ludecke H.-J. , Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Gross S, von Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C, Christen H-J, Claussen U, Devriendt K, Fastnacht E, Forderer A, Friedrich U, Goodship THJ, Greiwe M, Hamm H, Hennekam RCM, Hinkel GK, Hoeltzenbein M, Kayserili H, Majewski F, Mathieu M, McLeod R, Midro AT, Moog U, Nagai T, Niikawa N, Orstavik KH, Plochl E, Seitz C, Schmidtke J, Tranebjorg L, Tsukahara M, Wittwer B, Zabel B, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B : Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhinophalangeal syndrome types I and III . *Am J Hum Genet* 68 : 81-91, 2001.

Seki H, Kubota T, Ikegawa S, Haga N, Fujioka F, Ohzeki S, Wakui K, Yoshikawa H, Takaoka K, Fukushima Y : Mutation frequencies of EXT1 and EXT2 in 43 Japanese families with hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet* 99 : 59-

62, 2001