

「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 13 年度は、以下の結果を得た。

- (1) Sotos 症候群(脳性巨人症)では、平成 12 年度研究で得た患者の染色体転座 $t(5;8)(q35;q24.1)$ 切断点をカバーするコスミドクローンを利用し、転座で断裂している遺伝子 *NSDI* を単離した。次いで、研究分担グループから集積した染色体異常を伴わない計 42 例の Sotos 症候群患者における遺伝子変異解析を行った結果、4例(9.5%)に塩基置換を同定し、さらに染色体が利用できた 30 名の患者のうち、20 名(67%)に *NSDI* 全長を含む大きな DNA 欠失を同定した。つまり、Sotos 患者の 77%は点変異か欠失のいずれかをもつことが明らかとなった。この結果は、従来原因が不明であった Sotos 症候群の原因遺伝子を単離・同定したのみならず、その確定診断を容易にした。さらに、精神遅滞や過成長の機構解明に寄与するものである。本研究の結果は Nature Genetics 4月号(2002)に掲載される。
- (2) 同様の手法で、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 *MIPOL1* 遺伝子を単離した。*MIPOL1* は2つの coil-coiled domains をもつ機能不明な新規の遺伝子である。本研究結果は、Journal of Human Genetics (2002)に掲載される。
- (3) 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 と 8p21 を含むコスミドを同定し、転座切断点をクローニングした。8p21 切断点には 2 塩基の欠失をみたが、両切断点には共に遺伝子は存在しなかった。しかし、2q31 切断付近に存在する *HOXD* 遺伝子クラスターの発現を調節する位置効果が示唆される。
- (4) 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、切断点をカバーする BAC クローンを既に得た。

(5) 微細欠失内の遺伝子同定に用いるゲノム CGH アレイについては、種々の微細欠失に相当するクローン化 DNA および X/Y プローブを用いた予備実験を行い、1コピーDNA の検出に成功した。

2. 研究実施内容

平成 13 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) Sotos 症候群原因遺伝子の単離と変異解析、(2) 鏡像多指趾症原因遺伝子の単離、(3) t(5;8)(q35;q24.1)を伴った Sotos 症候群、(3) 肢中部短縮型骨格異形成症患者の t(2;8)(q31;p21)切断点クローニング、(4) 糖尿病患者の t(3;9)(p14.1;q31) の切断点解析、(5) ゲノム CGH アレイ技術の確立。

(1) 臨床細胞遺伝学研究グループ

(A) 患者材料の収集: 3省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」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、42 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: FISH 解析により1家族3名の罹患者(母、兄、妹)がもつ転座の切断点をカバーする BAC クローンを得た。これを受けて分子遺伝学研究グループでは、さらに切断点カバーコスミドクローンを単離した。

(2) 分子遺伝学研究グループ

(A) Sotos 症候群(脳性巨人症)のポジショナルクローニング

Sotos 症候群は、出生前から始まる成長過多、精神遅滞、特異な顔貌、脳内奇形、および時に痙攣をみる神経疾患である。1例の染色体転座 t(5;8)(q35;q24.1)をもつ Sotos 症候群の 5q35 切断点付近のゲノム解析で、マウス *Nsd1* 遺伝子とホモロジーを示すヒトの部分配列(AC027314)を同定した(図1)。

切断点付近の BAC コンティグを構築し、切断点をクローニングし、cDNA ライブラリーをスク

リーニングした結果、ヒト *NSD1* 遺伝子を単離した。*NSD1* は 8,088 塩基の open reading frame をもつ新規遺伝子であり、最小 23 個のエクソンから成り、ヒト胎児脳、骨格筋、腎臓などで発現する。患者の 5q35 切断点は *NSD1* 内に位置していた(図1)。*NSD1* の位置は FISH 解析で、コスミ

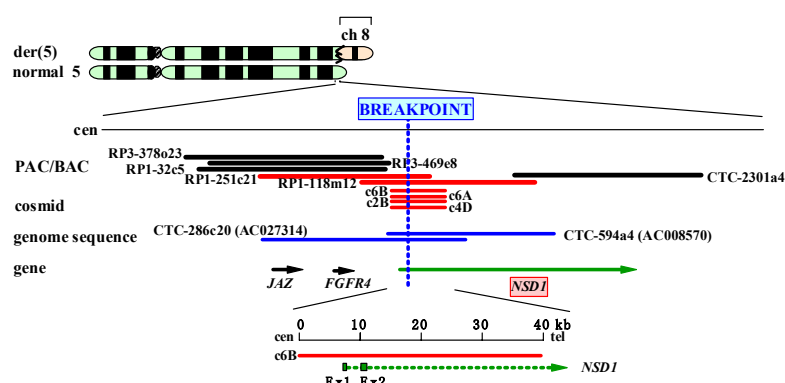


図1 5q35 切断点をカバーする BAC/PAC/cosmid コンティグと新規遺伝子 *NSD1*

ドc6Bのシグナルが派生5番と派生8番染色体双方にみられたことから確認した(図2)。

次いで、臨床細胞遺伝学研究グループが集積した42名の患者のうち、DNAが利用できた38名においてNSD1の変異解析を行った結果、4例(10.5%)に点変異を同定した。このうち、1名はエクソン5のナンセンス変異(1310C->G, S437X)、1名はエクソン5

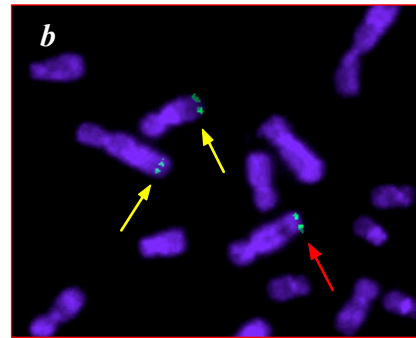


図2 コスミド c6B による FISH。シグナルが派生5番染色体と派生8番染色体双方に出現

の1塩基挿入(5998insT)、1名はイントロン20のスプライドナー部位の塩基置換であった(6151+1G->A)(図3)。

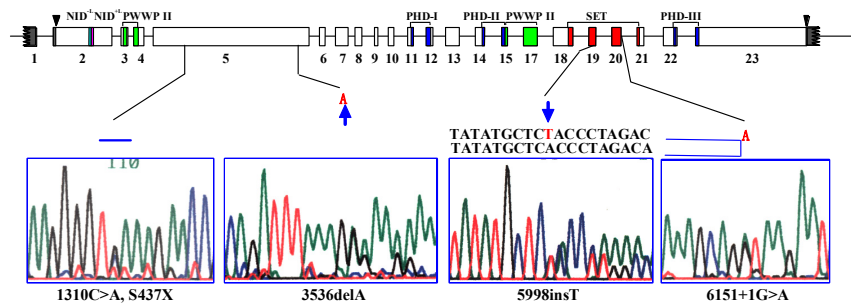


図3 4種の NSD1 遺伝子変異

1310C->G 変異

は NSD1 蛋白の truncation(S437X)、3536delA 変異と 5998insT 変異は各々 nt 3651-3653 および nt 6022-6024 での早期停止コドンの出現、6151+1G->A スプライス部位変異はエクソン20のスキッピングをもたらす(図4)。さらに、FISH解析の結果、染色体が利用できた30名の患者中19名に、NSD1を含む2.2 Mbにおよぶ欠失、1名にやや小さい欠失を認めた(図5)。つまり30名中20名(67%)の患者は大きな欠失をもつことが判明した。

欠失の頻度(67%)に点変異(10%)を合わせると、今回の日本人 Sotos 症候群患者シリーズの77%は NSD1 を含む欠失か NSD1 の変異をもつことが分かった。さらに、これらの変異はヘミ接

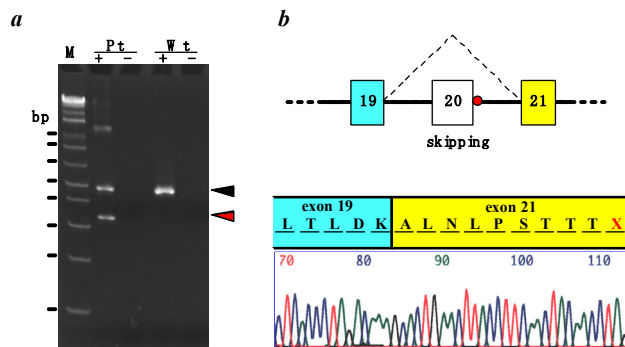


図4 エクソン20のスキッピングを起こす6151+1G->A スプライス部位変異

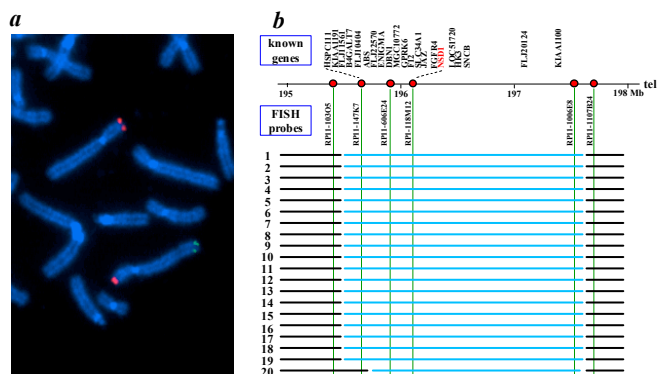


図5 20名の Sotos 症候群患者にみられた欠失とその範囲

合性欠失、あるいは蛋白翻訳の途中停止をもたらすヘテロ接合性の点変異であったので、*NSD1* のハプロ不全が Sotos 症候群の原因であると結論した。これらの結果は Nature Genetics 4 月号に掲載される。

NSD1 のアンチセンスプローブを用い発現抑制によって誘導される下流の各種遺伝子の発現の変化を、cDNA マイクロアレーを用いて観察した(東大医科研・中村祐輔氏との共同研究)。ヒト正常胎児腎上皮細胞株 Hek293 と 2 万 3 千個の cDNA のスポットされたマイクロアレーを用い、数百の遺伝子で発現が変化していることを確認しそれぞれについて確認を続けている。

(B) 鏡像多指趾症: 鏡像多指趾症は、軸前性の指趾が軸後性の指趾と鏡像となるような非常に稀な多指趾症である。平成 12 年度の研究で構築した、鏡像多指趾症患者がもつ転座 14q13 転座切断点付近の 1.2 Mb の BAC/PAC コンテグ中、7 個の BAC/PAC クローンから成る 500 Kb 領域を解析し、新規の遺伝子を単離した (*MIPOL1* と命名、図 6)。*MIPOL1* は約 350 Kb の長さで 15 個のエクソンから成り、442 アミノ酸をコードしていた。患者の 14q13 転座はエクソン 11 と 12 の間に存在し、*MIPOL1* を断裂していた。ノザン解析では成人心・肝・骨格筋・腎・膵組織と胎児腎で発現していた(図 7)。マウス胎児全組織の in situ ハイブリダイゼーションでは、E10.5-E13.5 胎児全体で発現していた。2 例の核型正常患者における変異解析では変異は同定できなかった。もう一方の切断点 2p23.3 の解析では、切断点から

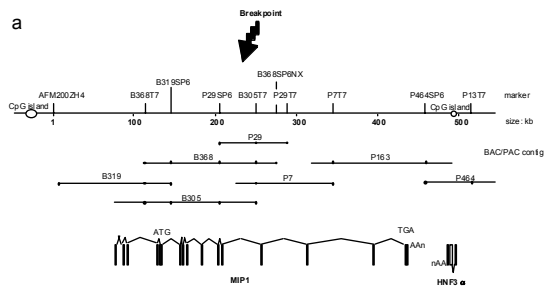


図 6 新規遺伝子 *MIPOL1* の構造

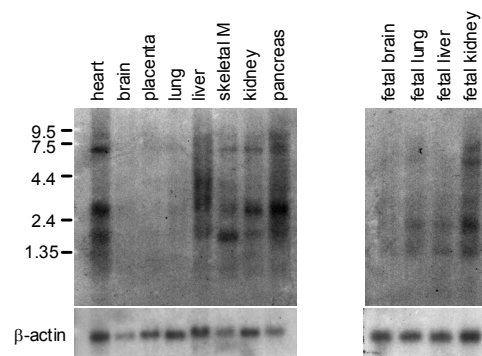


図 7 各組織における *MIPOL1* の発現

50 Kb 離れた *NAG* 遺伝子のみを同定し、切断点には遺伝子はなかった。したがって、*MIPOL1* が鏡像多指趾症の強力な候補遺伝子である。この結果は J Hum Genet (2002) に掲載される。

(C) 肢中部短縮型骨格異形成症: 肢中部短縮型骨格異形成症は、四肢中部の短縮を伴う小人症の総称であり、臨床的には数種のサブタイプから成る。イタリアから報

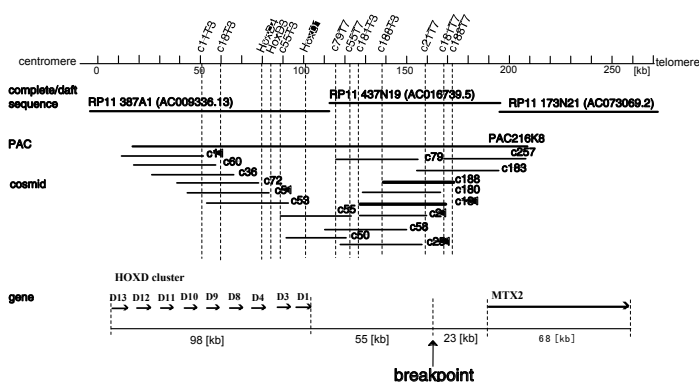


図 8 肢中部短縮型骨格異形成症患者における 2q31 切断点付近のゲノム構造

告された染色体転座(t(2;8)(q31;p21)をもつ肢中部短縮型骨格異形成症患者の切断点領域2q31を解析したが、両切断点には遺伝子あるいは遺伝子様の配列は同定できなかった(図8)。しかし、2q31切断点の55 Kb着糸点側にHOXD遺伝子クラスターが存在することが判明した。患者の転座は偶然合併は否定できないが、転座の位置効果により、HOXD発現を変化させた可能性がある。

- (D) ゲノム CGH アレイの構築:全ゲノム CGH アレイの構築に際し、ゲノム欠失(2コピーが1コピーになる)を確実に同定可能なシステムを開発した。2.2Mbの欠失を伴うSotos症候群患者DNAと正常コントロール DNA 用い、欠失内にマップされる3つのBACクローンと欠失外の2つのBACクローンをスライドグラス上に固着させたアレイスライドを用いた。それぞれのDNAをCy3とCy5でラベル(組み合わせA:ソトス患者Cy3、正常Cy5)あるいはその逆の組み合わせ(B)でラベルし、スライド上にハイブリさせ洗浄後、マイクロアレーsscannerでシグナル比を、各5つのスポット毎に比較した。欠失外の2クローンはCy3/Cy5比がほぼ1であったが、欠失内の3クローンのCy3/Cy5比はほぼ0.5(組み合わせA)ないし2(組み合わせB)であった。組み合わせA/Bにおいて矛盾のない良好なデータを得ることができた。

4. 研究実施体制

(1) 臨床細胞遺伝学研究グループ

福島 義光 (信州大学医学部、教授)

症例収集、細胞不死化

(2) 分子遺伝学研究グループ

新川 詔夫 (長崎大学医学部、教授)

遺伝子単離、変異解析、切断点解析など

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Uehara S, Hanew K, Harada N, Yamamori S, Nata M, Niikawa N, Okamura K: Isochromosome consisting of terminal short arm and proximal long arm X in a girl with short stature. *Am J Med Genet* 99: 196-199, 2001.
- Soejima H, Kawamoto S, Akai J, Miyoshi O, Arai Y, Morohka T, Matsuo S, Niikawa N, Kimura A, Okubo K, Mukai T: Isolation of novel heart-specific genes using the bodymap database. *Genomics* 74: 115-120, 2001.
- Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* 279: 197-204, 2001.
- Miyoshi O, Yabe R, Wakui K, Koizumi S, Uchikawa M, Kajii T, Fukushima Y, Numakura C, Takahashi S, Hayasaka K, Norio Niikawa: Two cases of mosaic RhD blood-group phenotypes and paternal isodisomy for chromosome 1. *Am J Med Genet* 104: 250-256, 2001.

- Simonic I, Nyholt DR, Gericke GS, Gordon D, Matsumoto N, Ledbetter DH, Ott J, Weber JL: Further evidence for linkage of Gilles de la Tourette syndrome (GTS) susceptibility loci on chromosomes 2p11, 8q22 and 11q23-24 in South African Afrikaners. *Am J Med Genet* 105 (2):163-167, 2001
- Giglio S, Broman SW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire V, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O: Olfactory receptor (OR) gene clusters, genomic inversion polymorphisms and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 68 (4):874-883, 2001.
- Demelas L, Serra G, Conti M, Achene A, Mastropaolo C, Matsumoto N, Dudlicek LL, Mills PL, Dobyns WB, Ledbetter DH, Das S: Incomplete penetrance with normal MRI in a woman with germline mutation of the DCX gene. *Neurology* 57: 327-330, 2001.
- Kondoh T, Yamamoto T, Kono Y, Matsumoto T, Sugawara H, Matsumoto N, Moriuchi H: Condition of microcephaly, growth retardation, joint contractures, atopic dermatitis, and mental retardation in two Japanese sisters: A new autosomal recessive MCR/MR syndrome? *Am J Med Genet* 102: 1-5, 2001.
- Kato R, Kishibayashi J, Shimokawa O, Harada N, Niikawa N, Matsumoto N. Congenital glaucoma and Silver-Russell phenotype associated with partial trisomy 7q and monosomy 15q. *Am J Med Genet* 104: 319-322, 2001
- Muroya K, Hasegawa T, Ito Y, Nagai T, Isotani H, Iwata Y, Yamamoto K, Fujimoto S, Seishu S, Fukushima Y, Hasegawa Y, Ogata T: GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. *J Med Genet* 38:374-380, 2001
- Akahoshi K, Moriwaki S, Kimiya S, Takahashi I, Fukushima Y: Woman with UV hypersensitivity and a de novo unbalanced chromosome translocation. *Am J Med Genet* 101:153-157, 2001
- Inoue K, Kanai M, Tanabe Y, Kubota T, Kashork CD, Wakui K, Fukushima Y, Lupski JR, Shaffer LG: Prenatal interphase FISH diagnosis of *PLP* duplication associated with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Prenatal Diagnosis* 21:1133-1136, 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
- Yokoyama A, Maruiwa F, Hayakawa M, Kannai A, Vervoort R, Wright AF, Yamada K, Niikawa N, Naoi N: Three novel mutations of the RPGR gene exon ORF15 in three Japanese families with X-linked retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet* 104: 232-238, 2001.
- Saito N, Ebara S, Fukushima Y, Wakui K, Takaoka K: Progressive scoliosis in cri-du-chat syndrome over a 20-year follow-up period. *Spine* 26:835-837, 2001
- Takahashi N, Omine H, Kaneko J, Miura A, Satoh C: Identification of base substitutions in

ten types of rare variants of phosphoglucomutase-1 (PGM1) encountered in Japanese. *Hum Biol* 2001 Oct;73(5):755-62.

- Morimoto J, Kaneoka H, Murata T, Sato Y, Ogahara S, Hirose S, Naito S, Naritomi K: Proximal symphalangism with coarse facial appearance, mixed hearing loss, and chronic renal failure: New malformation syndrome? *Am J Med Genet* 98:269-272, 2001
- Kosaki R, Ohashi H, Yoshiharu H, Suzuki T, Kosaki K: A de novo mutation (R279C) in the P63 gene in a patient with EEC syndrome. *Clin Genet* 60:314-5, 2001.
- Mabuchi A, Haga N, Ikeda T, Manabe N, Ohashi H, Takatori Y, Nakamura K, Ikegawa S : Novel mutation in exon 18 of the cartilage oligomeric matrix protein gene causes a severe pseudoachondroplasia. *Am J Med Genet* 104:135-9, 2001
- Ogata T, Muroya K, Ohashi H, Mochizuki H, Hasegawa T, Masayuki Kajii: Female gonadal development in XX patients with distal monosomy. *Eur J Endocrinol.* 145(5):613-7, 2001.
- Gedeon AK, Tiller GE, Le Merrer M, Heuertz S, Tranebjaerg L, Chitayat D, Robertson S, Glass IA, Savarirayan R, Cole WG, Rimoin DL, Kousseff BG, Ohashi H, Zabel B, Munnich A, Gecz J, Mulley JC: The molecular basis of X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Am J Hum Genet*: 68:1386-97, 2001.
- Murata T, Kurokawa R, Krones A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y: Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet*:10:1071-6,2001.
- Matsune K, Shimizu T, Tohma T, Asada Y, Ohashi H, Maeda T: Craniofacial and dental characteristics of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 98:185-90, 2001.
- Akiyama M, Kawame H, Ohashi H, Tohma T, Ohta H, Shishikura A, Miyata I, Usui N, Eto Y: Functional disomy for Xq26.3-qter in a boy with an unbalanced t(X;21)(q26.3;p11.2) translocation. *Am J Med Genet* 99:111-4, 2001.
- Kobayashi S, Uemura H, Kohda T, Nagai T, Chinen Y, Naritomi K, Kinoshita EI, Ohashi H, Imaizumi K, Tsukahara M, Sugio Y, Tonoki H, Kishino T, Tanaka T, Yamada M, Tsutsumi O, Niikawa N, Kaneko-Ishino T, Ishino F: No evidence of PEG1/MEST gene mutations in Silver-Russell syndrome patients. *Am J Med Genet* 104:225-31, 2001
- Chen, Y.Z., Hayashi Y, Wu, J.G., Takaoka, E., Maekawa, K., Watanabe, N., Inazawa, J., Hosoda, F., Arai, Y., Ohki, M., Mizushima, H., Morohashi, A., Ohira, M., Nakagawara, A., Liu, S.Y., Hoshi, M., Horii, A., Soeda, E. : A BAC-based STS-content map spanning a 35-mb region of human chromosome 1p35-36. *Genomics*74 : 55-70, 2001
- Chen, Y.Z., Soeda, E., Yang, H.W., Takita, J., Chai, L., Horii, A., Inazawa, J., Ohki, M., Hayashi, Y. : Homozygous deletion in a neuroblastoma cell line defined by a high-density STS map spanning human chromosome band 1p36 : *Genes, Chromosomes & Cancer* 31:

326-332, 2001

- Yang, H. W., Chen, Y.Z., Takita, J., Soeda, E., Piao, H.Y., Hayashi, Y. : Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2. *Oncogene* 20 : 5075-5083, 2001
- Yang, W. Y., Chen, Y.Z., Piao, H. Y., Takita, J., Soeda, E., Hayashi, Y. : DNA fragmentation factor 45 (DFF45) gene at 1p36.2 is homozygously deleted and encodes variant transcripts in neuroblastoma cell line. *Neoplasia* 3 : 165-169, 2001
- Nishimura G, Manabe N, Kosaki K, Haga N, Ohashi H, Nakamura K, Ikegawa S: Spondylar dysplasia in type X collagenopathy. *Pediatr Radiol* 31:76-80, 2001.
- Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y: Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). *Am J Med Genet* 107: 58-60, 2002.
- Nishimura G, Nishimura H, Tanaka Y, Makita Y, Ikegawa S, Ghadami M, Kinoshita A, Niikawa N: Camurati-Engelmann disease Type II: Progressive diaphyseal dysplasia with striations of the bones. *Am J Med Genet* 107: 5-11, 2002.
- Kayashima T, Matsuo H, Satoh A, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Niikawa N, Kishino T: Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase gene (*GNE*). *J Hum Genet* 47: 77-79, 2002.

(2) 特許出願

国内特許 1 件