

「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

(長崎大学大学院医歯薬学研究科 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

本年度4月にはヒトゲノムの大規模シーケンシングの終了宣言がなされた。しかし、大部分の疾病遺伝子は依然として未知であり、位置的単離（ポジショナルクローニング）による疾患遺伝子同定の重要性は変わらない。単一（メンデル）遺伝子病と染色体転座や微細欠失を合併する患者は、疾病遺伝子の同定や単離の絶好の材料である。本研究では、症例を国内外から組織的に集積し、転座切断点・欠失領域から、位置的単離法あるいは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。平成14年度までに、ソトス症候群、エンゲルマン病、鏡像多指趾症、肢中部短縮型骨格異形成症の各疾患遺伝子を単離し、その発症機構を明らかにした。マルファン症候群2型、ヒト耳垢型（乳がん関連）、無嗅覚症、先天性視力障害症、合指症の位置的遺伝子単離は現在進行中であり、いくつかは本年度中に達成する。ゲノムの微細欠失や重複を網羅的に検出するシステムである全ゲノムマイクロアレイ法は平成16年度までに完成する予定である。

平成14年度研究で以下の成果を得た。

(1) ソトス症候群の分子病理：多数例のソトス症候群において、平成13年度に単離した *MSDI* 遺伝子の遺伝子病理を解析した。塩基配列決定による点変異、及びFISHによる0.7 Mb欠失の同定戦略で、日本人患者総計95例中49例（51.6%）に *MSDI* を含む欠失、11例（11.6%）に点変異を見出した。同様に、白人患者17例における解析で、4例（24%）に点変異を同定し、欠失は1例（6%）のみであった。 *MSDI*-SNPを利用して、欠失をもつ患者の26家系を解析し、18例の患者における欠失は父の精子形成期、2例が母の卵子形成期で生じた異常であった。つまり、日本人患者の半数は父の精子形成期に生じた欠失が原因であるが、白人では点変異が主たる原因であった。この差の原因は明らかでないが、白人患者における診断バイアスが最も可能性が高い。欠失はその範囲の両端に存在する低頻度反復配列 [low copy repeat (LCR)] が介在していることを示唆した。欠失21例と点変異5例の表現型解析から、心奇形・泌尿器系異常・痙攣は欠失群にのみ認められた。5例中2家系の家族例では親子共に点変異を認めた。これらの発症機構に関する成果は、*American Journal of Human Genetics* や *Human Molecular Genetics* など種々の学術誌に公表し、また一部は *in press* である。現在、 *MSDI* の機能解析用の *NsdI*-KOマウスを作成している。

(2) 鏡像多指趾症遺伝子の機能解析：平成13年度に染色体転座を利用して位置的単離した原因候補遺伝子 (*MIPOL1*) の機能は未だ不明であるが、奈良先端大学院大学においてそのマウスホモログ *Mipo11* 欠失をもつマウスES細胞が作成されたので、共同研究を開始した。*Mipo11* 欠失ES細胞を基にしたモデルマウスを構築中である。平成15年度にはモデルマウス解析を開始したい。

(3) 耳垢型 (乳がん関連) 責任遺伝子の位置的単離：耳垢型座は、連鎖不平衡解析によって、16番染色体上のマーカーSNP-B81540(33-34).1領域の約100 kb中に追いつめた。現在その単離を目指している。平成15年度中に責任遺伝子を単離する予定である。

(4) 先天盲と合指症遺伝子の同定：先の研究で両疾患座をマップしたので、候補遺伝子各々12種と30種の変異解析を行った。しかし、未だSNP以外の病的変異は同定されていない。

(5) 染色体再構成をゲノム網羅的に検出するマイクロアレイ法の開発：同マイクロアレイ開発のうち、テロメア領域特異的アレイに関しては既に完成した。これを利用して、共通領域の欠失を示した3例の臨床像から新しい疾患単位 (新規の微細欠失症候群) の確立に至った。

## 2. 研究実施内容

### (1) ソトス症候群の *NSDI* 分子病理

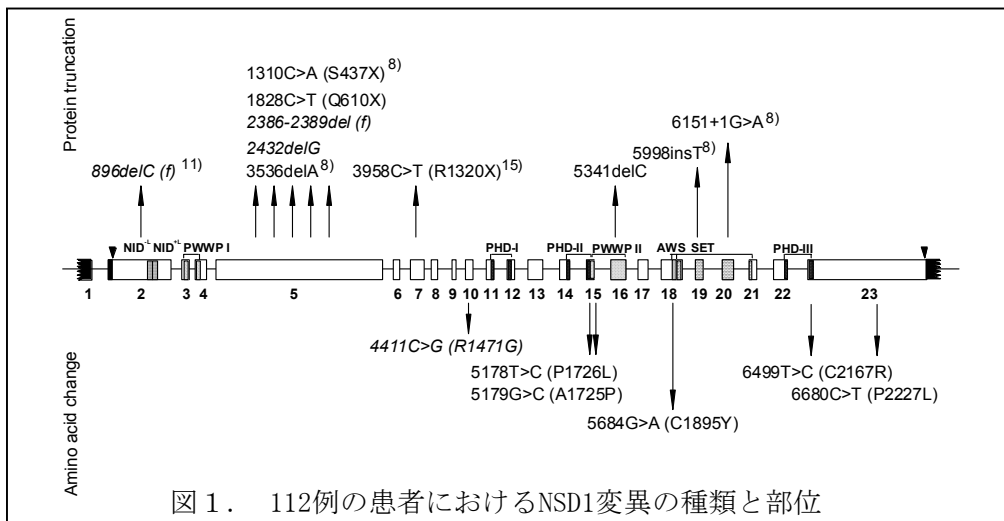
平成13年度に単離した責任遺伝子 *NSDI* 異常のソトス症候群患者における種類・頻度を決定するため、112例 (日本人患者95例と非日本人患者17例) で網羅的に細胞分子遺伝学的を行った。*NSDI* を含む0.7 Mb欠失の解析は、細胞が利用できた例ではFISH解析を、不可能例ではマイクロアレーCGH法で解析し、欠失の認めない例では、*NSDI* エクソン2-23までの蛋白翻訳領域を全てPCRにて増幅しダイレクトシーケンス法で変異の有無を確認した。結果を表1と図1に示す。

表1. 112例の患者における *NSDI* 変異

-----  
日本人患者95例：欠失49例 (51.6%)、点変異11例 (11.6%)

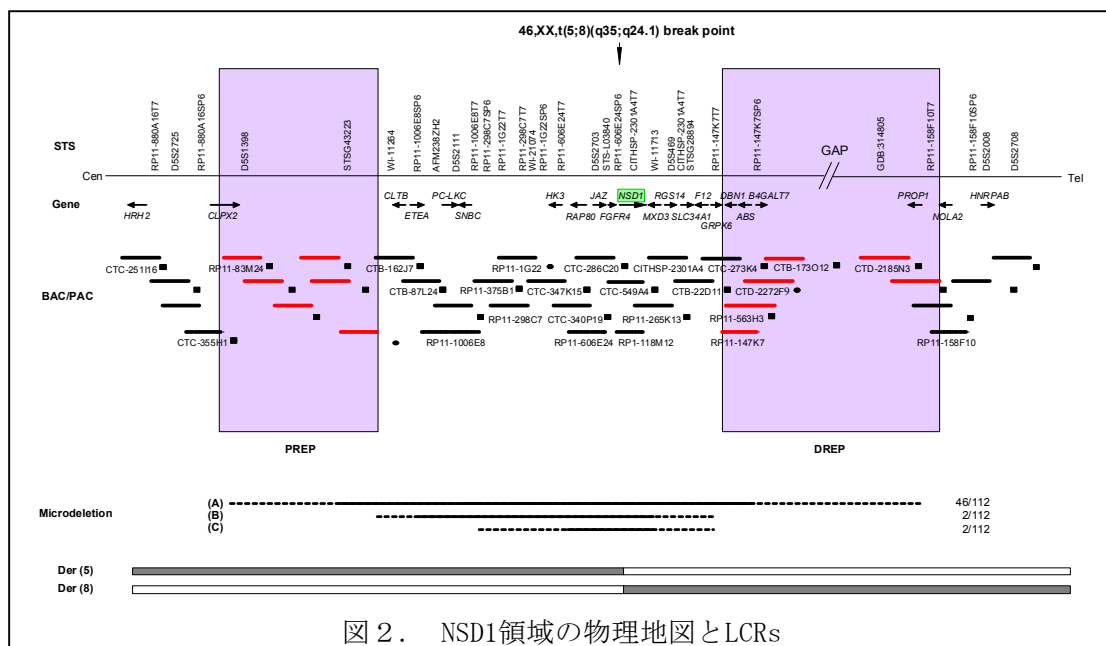
非日本人患者17例：欠失1例 (5.9%)、点変異5例 (29.4%)  
-----

計112例：欠失50例 (44.6%)、点変異16例 (14.3%)  
-----



従来より家族性ソトス症候群の存在が指摘されていたが、本研究において2家系のNSD1変異を伴う家族例を認めた。この結果、常染色体優性遺伝形式を改めて確認し、さらにNSD1変異が生殖機能に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

高頻度の欠失を引き起こす原因を探るため、欠失領域をカバーするBAC/PACベースの物理地図を作製し(図2)、特徴的なゲノム構造の有無を確認した。欠失50例中46例は、0.7Mbの共通欠失であり、残りの4例は小さな欠失であった。共通欠失領域の着糸点側と末端側の切断点付近の各々に約145 Kbにわたる塩基配列相同部位[Low Copy Repeat (LCR), PREPとDREP]が存在し、欠失はLCRを介した減数分裂時の不等組み換えにより生じたことが示唆された。日本人例と非日本人例で欠失頻度に差が観察されたため、正常日本人5例と欠失のない13例のソトス患者でFISH解析を行ったが、DREPおよびPREP由来のプローブは同一染色体上に2組ずつシグナルを現したため、2つのLCRsは異種民族に共通して存在することが判明した。したがって、欠失頻度の差は、診断時の何らかのバイアスが原因であろう。



欠失の発生機構を探るため、欠失の親起源を調べた。20家系中18家系の欠失は父（精子形成過程）起源、2家系は母（卵子形成過程）起源であった。さらに2〜3世代のDNA採取できた8家系について、マイクロサテライトマーカーを用いた欠失周辺の染色体組み換えを調べた結果、6例に染色体内再構成を2例に相同染色体間の再構成を認め、欠失が単一の機構で生じるのではないことが判明した。

#### (2) 耳垢型（乳がん関連）責任遺伝子のポジショナルクローニング

ヒト耳垢型は湿型と乾型に二分され、日本人の80%は乾型であるのに対して、白人・黒人はほとんど例外なく湿型である。乾型は数万年前に蒙古高原の住民に起こった突然変異であり、その後、中国北部・朝鮮半島を経て日本に拡散したと考えられている。湿型は体臭とリンクし、乳がんの発生に関連するデータがある。我々は家系を用いた連鎖解析により *DI6S3093* と *DI6S3080* の間の7.2 cMに耳垢型遺伝子をマッピングした（Lancet, 2002）。両マーカー間のBACクローンのシーケンスより、137個のマイクロサテライトマーカーを同定し、64人の乾型、54人の湿型試料において、多型のアレル頻度を比較した。その結果、 $p < 0.01$ を示す15個のマーカーを確認したので、マーカー周囲にSNPを選定し、乾型64人と湿型54人中のアレル頻度を比較した。これを基に、約2 Mb領域中に密集していた12個のSNPのタイピングを行った。SNP-B81540(33-34).1が全ての乾型サンプルにおいてホモ接合を示し（ $p < 10^{-8}$ ）、乾型132人と湿型67人では $p < 10^{-12}$ を示した。同SNPのテロメア側には $p < 10^{-7}$ を示すもう一つのSNPの存在も確認され、この領域約100 kbが耳垢型遺伝子が存在する領域だと結論した。現在その単離を目指している。

(3) CGHマイクロアレイの開発：(A) 全染色体テロメア特異的マイクロアレイの開発：テロメア領域に高頻度に起こる染色体再構成をスクリーニングするシステムである全染色体のテロメア特異的プローブをスポットしたマイクロアレイを開発した。本アレイが実働するか否かを5例のヴォルフ症候群（4番染色体端部欠失, 4p-）試料の解析で検証した。全例で4p-を検出したので、有効性が確認された。また、別の共通領域の欠失を示した3例の臨床像から新しい疾患単位（新規の微細欠失症候群）の確立を示唆する所見を得た。(B) 性染色体特異的マイクロアレイの開発：XおよびY染色体上に1 Mb毎に分布するDNAをスポットした高解像度マイクロアレイを完成した。このアレイを用いて歌舞伎メーキャップ症候群20例を解析中である。(C) 全ゲノム解析用マイクロアレイの作成：遺伝疾患の解析には、モノソミー・トリソミーを網羅的に解析できる高品質のアレイが必要である。全ゲノム上に1.5 Mb 毎に分布する計2000個のBACクローンを用いたマイクロアレイを作成中である。本アレイに用いるBACクローンは、本来の染色体の位置に単一シグナルを発するもののみを選択すべく、全クローンのFISHを進めている。現在までに1000種のBACクローンのFISHを完了した。

### 3. 研究実施体制

平成14年度の研究チームは、研究代表者（新川）の統括のもと、分子遺伝学研究グループ（新川、松本、吉浦、木住野、太田、添田、高橋、木下、Ghadami、黒滝、茅島、小松、

菅原、原田、山田、渡辺、三輪、三宅、水口、Mapendano、野口、楊井、宮崎) と臨床細胞遺伝学研究グループ (福嶋、成富、大橋、阿部、永井、坂爪) の2グループから成る。

#### 分子遺伝学研究グループ

- ① 研究分担グループ長：新川 詔夫 (長崎大学医学部、教授)
- ② 研究項目：疾患遺伝子の位置的単離、疾患遺伝子の機能解析、ゲノム再構成を網羅的に同定するCGHマイクロアレーの開発

#### 臨床遺伝学研究グループ

- ① 研究分担グループ長：福嶋 義光 (信州大学医学部、教授)
- ② 研究項目：患者集積と切断点および微細欠失の分子遺伝学的同定

#### 4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

##### (1) 論文 (原著論文) 発表

- 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<sup>5</sup>-acetylglucosamine-2-epimerase/N<sup>5</sup>-acetylmannosamine kinase gene (*GNE*). J Hum Genet 47: 77-79, 2002.
- Ida T, Harada N, Abe K, Kondoh T, Yoshinaga M, Maki T, Niikawa N: Identification of *de novo* chromosome rearrangements: Five cases analyzed with differential chromosome painting Am J Med Genet 108: 182-186, 2002.
- Kayashima T, Katahira M, Harada N, Miwa N, Nakamura Y, Kajii T, Niikawa N, Kishino T: Maternal isodisomy for 14q21-q24 in a man with diabetes mellitus. Am J Med Genet 111: 38-42, 2002
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita H-A, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: Haploinsufficiency of the *NSDI* gene causes Sotos syndrome. Nat Genet 30 (April): 365-366, 2002.
- Tomita H-A, Yamada K, Ghadami M, Ogura T, Yanai Y, Nakatomi K, Sadamatsu M, Masui A, Nanko S, Kato N, Niikawa N: The wet/dry earwax locus maps to chromosome 16p11.2-16q12.1. Lancet 359 (9322): 2000-2002, 2002
- Kondo S, Sugawara H, Harada N, Matsumoto N, Ohashi, H, Sato M, Kantaputra PN,

- Komatsu K, Tomita H, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Yoshiura K: A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet* 47: 136-139, 2002
- Sugawara H, Egashira M, Harada N, Jakobs TC, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Breakpoint analysis of a familial balanced translocation t(2;8)(q31;p21) associated with mesomelic dysplasia. *J Med Genet* 39: e34, 2002
- Komatsu K, Nakamura N, Ghadami M, Matsumoto N, Kishino K, Ohta T, Niikawa N, Yoshiura K: Confirmation of genetic homogeneity of non-syndromic low frequency sensorineural hearing loss by linkage analysis and DFNA6/14 mutations in a Japanese family. *J Hum Genet* 47: 395-399, 2002.
- Harada N, Takano J, Kondoh T, Ohashi H, Hasegawa T, Sugawara H, Ida T, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Kajii T, Niikawa N, Matsumoto N: Duplication of 8p23.2: A benign cytogenetic variant? *Am J Med Genet* 111: 285-288, 2002.
- Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K: A catalog of 106 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and its signaling pathway. *J Hum Genet* 47: 478-483, 2002.
- Nonomura K, Kakizaki H, Fukuzawa N, Fujieda K, Harada N, Niikawa N, Koyanagi T: Monozygotic twins with discordant sexual phenotypes due to different ratios of mosaicism of 47,X,idic(Y),idic(Y)/46,X,idic(Y)/45,X. *Endocr J* 49: 497-501, 2002.
- Yamada T, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Fujimoto S, Niikawa N, Kishino T: The novel gene, *TSGA14*, adjacent to the imprinted gene *MEST* escapes genomic imprinting. *Gene* 288 (1-2):57-63, 2002.
- Harada N, Nagai T, Shimokawa O, Niikawa N, Matsumoto N: A 4q21-q22 deletion in a girl with severe growth retardation. *Clin Genet* 61(3):226-228, 2002.
- Engle EC, McIntosh N, Yamada K, Lee BA, Johnson R, O'Keefe M, Letson R, London A, Ballard E, Ruttum M, Matsumoto N, Saito N, Collins MLZ, Morris L, Monte MD, Magli A, de Berardinis T: CFEOM1, the classic familial form of congenital fibrosis of the extraocular muscles, is genetically heterogeneous but does not result from mutations in *ARIX*. *BMC Genetics* 3: 3, 2002.
- Katahira M, Kayashima T, Kishino T, Niikawa N: Maternal uniparental disomy for chromosome 14 with diabetes mellitus. *Intl Med (Tokyo)* 4: 717-721, 2002.
- Miyamoto T, Hasuike S, Jinno Y, Soejima H, Yun K, Miura K, Ishikawa M, Niikawa N: The human *ASCL2* gene escaping genomic imprinting and its expression pattern. *J Assist Reprod Genet* 19: 240-244, 2002.

- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N: Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): Dosage effect of *IGF1R*? Am J Med Genet 113: 173-177, 2002.
- Okamoto N, Toribe Y, Nakajima T, Okinaga T, Kurosawa K, Nonaka I, Shimokawa O, Matsumoto N: 1p36 deletion syndrome with congenital fiber type disproportion myopathy. J Hum Genet 47: 556-559, 2002.
- Harada N, Shimokawa O, Nagai T, Kato R, Kondoh T, Niikawa N, Matsumoto N: A 4-Mb critical region for intrauterine growth retardation at 15q26. Clin Genet 62: 340-342, 2002.
- Kayashima T, Yamasaki K, Yamada T, Sakai H, Miwa N, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Kanetake H, Niikawa N, Kishino T: The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene (*CPA4*) in the 7q32 imprinting domain. Hum Genet 112: 220-226, 2003.
- Nagai T, Matsumoto N, Ogata T, Kurotaki N, Imaizumi K, Kurosawa K, Harada N, Kondoh T, Ohashi H, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Yokoyama T, Uetake K, Sakazume S, Fukushima Y, Niikawa N, Naritomi K: Sotos syndrome and haploinsufficiency of *NSDI*: Phenotypic comparison between intragenic mutations and submicroscopic deletions. J Med Genet 40: 285-289, 2003
- Höglund P, Kurotaki N, Kytölä S, Miyake N, Somer M, Matsumoto M: Familial Sotos syndrome is caused by a novel one base pair deletion of the *NSDI* gene. J Med Genet 40: 51-54, 2003.
- Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N: Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. Pediatr Int 45: 97-99, 2003.
- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Kishino T: Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of *Ube3a*. Hum Mol Genet 12: 837-847, 2003.
- Shotelersuk V, Srichomthong C, Yoshiura K, Niikawa N: A novel mutation, 1234del(C), of the *IRF6* in a Thai family with van der Woude syndrome. Int J Mol Med 11(4): 505-507, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：2件（研究期間累積件数：2件）