「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総合研究科　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

ポストゲノムシーケンシング期の現在でも大部分の疾病遺伝子は未知であり、位置的単離法による疾患遺伝子同定の重要性は変わらない。本研究では、単一遺伝子病と染色体転座や微細欠失を合併する患者症例を組織的に集積し、転座切断点・欠失領域からの疾病遺伝子の単離・同定を目指す。本戦略によって、過去４年間にSotos症候群、Engelmann病、鏡像多指趾症、肢中部短縮型骨格異形成症、Marfan症候群２型、肥満・糖尿病などの原因・候補遺伝子を単離・同定・解析し、いくつかの疾患においてはその発症機構を明らかにした。

平成16年度には、遺伝的連鎖解析法で明らかにした遺伝形質の局在から位置的単離法によって、ヒト耳垢型（乳がん関連・薬剤耐性関連）遺伝子Ｘを単離した（未発表につき遺伝子名は割愛）。また、無鼻症、Opitz-C症候群、裂手裂足症の位置的遺伝子単離、および全ゲノムCGHマイクロアレイ法の確立は現在進行中である。

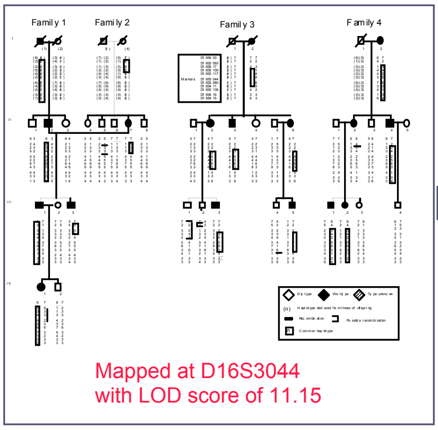
2.研究実施内容

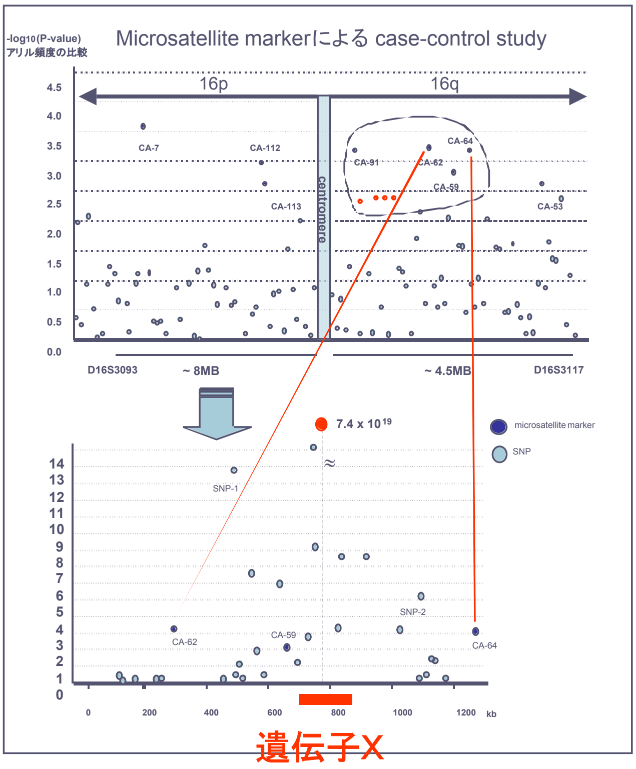
本研究は臨床細胞遺伝学研究グループと分子遺伝学研究グループで各々仕事を分担して行った。臨床細胞遺伝学研究グループでは研究参加者が細胞遺伝学的に診断し、かつインフォームドコンセントを得た患者試料を採取後、一部は細胞遺伝学的に解析し、残りはEBVで不死化し後者グループの研究に備えた。分子遺伝学研究グループでは、前者が集積した試料と細胞遺伝学所見から、転座切断点をクローニングし、単離した遺伝子を解析し、疾患原因遺伝子または遺伝形質遺伝子を同定・単離した。また、全ゲノムCGHマイクロアレイの開発を行い、臨床細胞遺伝学研究グループの協力を得て、その臨床応用を図る。

(A)分子遺伝学研究グループ

<u>(1) 耳垢型決定遺伝子の同定</u>：「耳垢型」は湿型と乾型のあることが知られている。乾型は日本を含めた東アジア人特有（80%以上）であり、その他の多くの民族は湿型である。過去の研究において「耳垢型」遺伝子座を16番染色体動原体付近の5.9 cM領域にマップした結果を受けてゲノム解析を行い、耳垢型決定遺伝子Ｘを単離した（未発表のため遺伝子名は割愛）。マップされた領域の物理地図の作成、多数のSNPおよびマイクロサテライト

多型を検索、次いで118名のボランティアにおけるタイピング・関連解析を行った。有意なP値（$10^{-6\sim-9}$）を示す２種のSNP間600 Kb中に存在する４種の遺伝子に絞って126名の新たなボランティアにおけるタイピング、さらに遺伝子Ｘの機能解析を行った結果、遺伝子Ｘ中のcSNP（G/A)が耳垢型を決定していることが判明した（図１）。次いで世界中の30の民族におけるAアリル（乾型）の遺伝子頻度を調べた結果、東北アジアにピークをもつ南北および東西地理的勾配が明らかとなった。遺伝子Ｘは乳癌や薬剤耐性に関連する遺伝子であり、本研究で得た耳垢型決定多型は、耳垢型のみならず古代モンゴロイドの移動・拡散を示し、さらにアジア人に少ない乳癌や、アジア人の薬剤耐性(副作用)を決定している可能性が高い。





長崎大学事務職員での耳垢型とアリル頻度

	GG	GA	AA	合計
湿性	4	34	0	38
乾型	0	1	87	88
合計	4	35	87	126

遺伝子頻度（ G: 0.171 ； A: 0.829 ）

図１　耳垢型決定遺伝子Ｘの同定

(2) Opitz-C症候群における転座切断点解析：特異顔貌、脳梁欠損、唇裂・口蓋裂、三角頭蓋、多合指、関節拘縮、心奇形、外性器異常などを示すOpitz-C症候群患者に合併した染色体転座［t(3;18)(q13.2q12.1)]の切断点から遺伝子Ｙを同定した（未発表のため遺伝子名は割愛）。切断点をカバーするBACコンティグのFISH解析で切断点を含むBAC（RP11-15911)を単離し（図２）、コスミド・プラスミドサブクローンのFISH解析、Southern blot解析、inverse PCR解析、シーケンシング解析により切断点を同定した。現在、切断点に存在する遺伝子Ｙを解析中である。

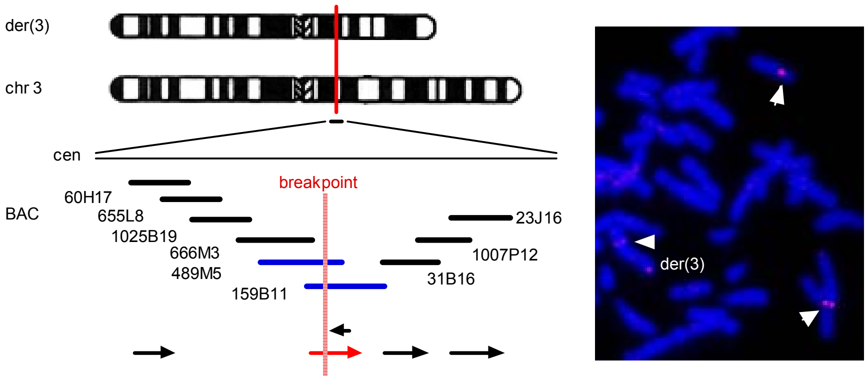


図２　3q13.2切断点をカバーするBACコンティグと遺伝子Ｙ

(3) 裂手裂足症における転座切断点解析：核型46,XY,der(3)der(7),inv ins(3;7)(q21;q32q21.1)をもつ裂手裂足患者から7q21.1側の切断点同定を行った。切断点をカバーするBACコンティグのFISH解析で、切断点を含むBACを単離し、cosmid/plasmidサブクローンの構造・FISH解析、Southern blot解析、inverse PCR解析、シーケンシング解析により切断点を決定した（図３）。切断点上にはゲノムデータベース登録遺伝子はなかったが近傍にマップされていた３つのESTからRACE法により新規遺伝子Ｚを単離した（未発表につき遺伝子名は割愛）。

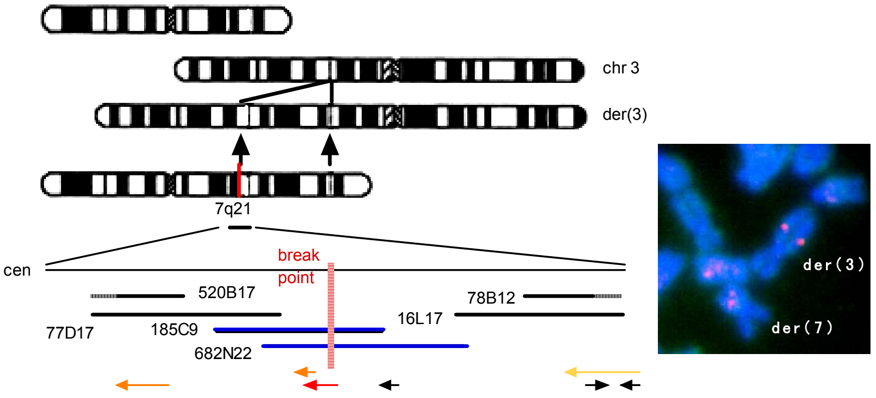


図３　7q21.1切断点をカバーするBACコンティグと新規遺伝子Ｚ

(4) 無鼻症における転座切断点解析：無鼻症を伴う新生転座[t(3;12)(q11.2;p11.22)]の台湾人症例において、3q11.2にマップされる7種のBACクローンによるFISH解析を行った結果、3q11.2転座切断点領域に約19 Mbの欠失を確認した（図４）。ゲノムデータベース上で3q11.2と12p11.22それぞれの切断点領域の候補遺伝子を探索したが、有用な遺伝子情報はなかった。核型正常の２例において、台湾症例の転座切断点および欠失領域をFISH解析したが、欠失は認めなかった。また、この２例では、全ゲノムアレイ2200を使用しCGHも行ったが、欠失などの変異は検出しなかった。現在、他の２例を解析中である。

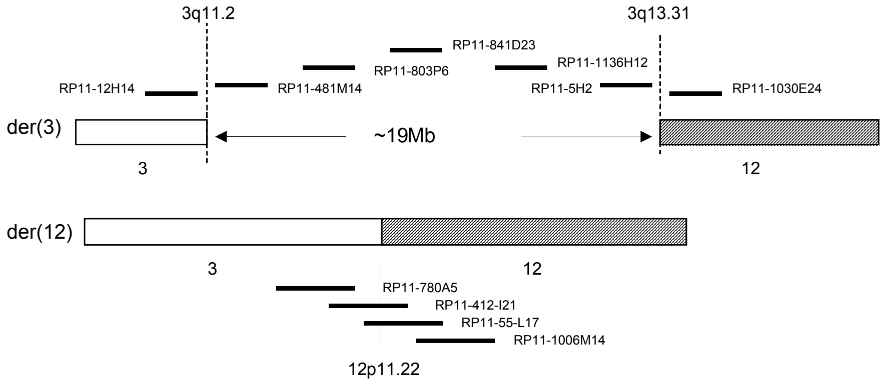


図４　13q11.2と12p11.22切断点領域の物理地図

(5) マイクロアレイ2200の構築と疾患解析への応用：全ゲノムを2200個のBACクローンで網羅的にカバーするマイクロアレイ2200を開発した。種々の検討から、CGH（Cy5/Cy3比）の平均値の±3SD以内のCGH値を正常範囲とした。マイクロアレイ2200を用いて、非特異的精神遅滞症例30例と歌舞伎メーキャップ症候群40例を解析し、５例の非特異的精神遅滞症例において病的な構造異常を同定した（表１）。このうち1例の欠失部位に、ある種の精神神経疾患で断裂の報告のある遺伝子がマップされており、その精神神経疾患の責任遺伝子である可能性が高いと考えられる（公表前のため明記を避ける）。さらに歌舞伎メーキャップ症候群の解析では現在までに145個のクローン部位でゲノムコピー数の異常を認めており現在詳細な解析が進行中である。

表１　マイクロアレイ2200によって同定された
　　　５例の非特異的精神遅滞患者の異常

Case	Karyotype
MR88	46,XY,del(15)(q11.2q12)mat
MR96	46,XX,del(1)(1q43qter)
MR117	46,XY,del(13)(q13.2q13.2)
MR118	46,XY,der(22)t(19;22)(p13.3;q13.31)pat
MR126	46,XY,del(3)(p21p21)de novo

(6) マイクロアレイ4600の開発：さらに密度を２倍にしたマイクロアレイ4600の開発に向けBACクローンを新たに2400個選択し全てFISH解析を行った。このうち予想された位置にユニークなシグナルを呈するクローンは約2000個で最終で合計4150個の至適クローンの選択が終了した。全てのクローンのDNA抽出も完了した。

(B) 臨床細胞遺伝学研究グループ

(1) 染色体転座をもつ単因子遺伝病およびその患者試料の収集：De novo均衡型構造異常２例（4q腕内逆位、13q/20qの相互転座）を収集し、Ｂリンパ芽球様細胞株として保存した。過去に収集されていた均衡型構造異常症例のうち、 2q腕間逆位、1p/7q相互転座、

9q/11q相互転座、Xp/10p全腕転座、7p/13q相互転座、1q/4q相互転座の各１例のＢリンパ芽球様細胞株を分子遺伝学研究グループに分与した。また、過去に樹立凍結保存されていた思春期早発症１家系３名、発作性運動誘発性コレオアテトーシス症１名のＢリンパ芽球様細胞株を分子遺伝学研究グループに分与、新規でOpitz-C症候群１名の血液送付とともにＢリンパ芽球様細胞株樹立・保存した。

(2) 染色体転座をもつ症例の切断点解析と変異解析：7qと10pの均衡型構造異常を有する特発性思春期早発症患者の解析において、単離した転座点BACクローンおよびコスミドクローンの位置情報から、切断点近傍に存在する候補遺伝子について染色体異常のない同症患者における変異解析を行ったが、変異は特定できなかった（投稿準備中）。12q腕内逆位を伴った患者の解析で、２ヶ所の転座点BACクローンを同定し、現在さらに切断点を狭めるべく継続解析中である。一方の転座点に近接した領域に、この患者の症状に一部共通点のあるrestless leg syndromeの遺伝子座が一大家系の連鎖解析でマップされた報告があるので、本症例の病態との関連性を含めて解析を進めている。4qと17qの均衡型構造異常を有する多発奇形患者の解析で，17qの転座点BACクローンを同定した。切断点に既知の遺伝子は存在していない。4qの切断点同定を進行中である。

3.研究実施体制

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（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、教授）

② 研究項目：

(A) 染色体構造異常の切断点からの疾患（形質）遺伝子の単離

(B) 疾患（形質）遺伝子の機能解析

(C) 微細欠失同定のためのマイクロアレイシステムの構築

臨床細胞遺伝学研究グループ

① 研究分担グループ長：福嶋　義光（信州大学大学院医学研究科、教授）

② 研究項目：

(A) 臨床試料の収集と細胞の不死化

(B) 症例収集と臨床情報収集

(C) 核型診断と欠失同定

4.主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○ Miura K, Niikawa N: Do monochorionic dizygotic twins increase after pregnancy by assisted reproductive technology? *J Hum Genet* 50 (1): 1-6, 2005.

○ Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto

N: Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* 76 (1): 52-67, 2005.

○ Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Yoshimura S, Miura S, Nakayama D, Mapendano CK, Niikawa N, Ishimaru T: Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of the placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem* 50 (9): 1709-1711, 2004.

○ Matsumoto T, Niikawa N: Eight novel microsatellite markers in the 3' region of the dystrophin gene useful for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Prenat Diagn* 24 (12):1014-1015, 2004.

○ Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: A 1-Mb critical region in six patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet* 49 (8): 440-444, 2004.

○ Matsuzawa N, Nakamura T, Niimi T, Furukawa H, Toyoda T, Yoshiura K, Niikawa N, Natsume N, Shimozato K: A T25G mutation in the *IRF6* gene in a Japanese family with Van der Woude syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 414-417, 2004.

○ Kurosawa K, Harada N, Saitoh S, Sosonkina N, Niikawa N, Matsumoto N: Unmasking of 15q microdeletion using microarray-based comparative genomic hybridization in a mentally retarded boy with r(Y). *Am J Med Genet* 130A: 322-324, 2004.

○ Masuzaki H, Miura1 K, Miura S, Yoshiura K, Mapendano CJ, Nakayama D, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T: Labor increases maternal DNA contamination in cord blood. *Clin Chem* 50 (9): 1709-1711, 2004.

○ Niikawa N: Molecular basis of Sotos syndrome. Horm Res 62 (Suppl, Proceedings of the 15th Novo Nordisk Symposium on Growth Hormone and Endocrinology: Advances in Dysmorphology, *Malta, April* 2-3, 2004): 60-65, 2004.

○ Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Abifadel M, Akiyama T, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Fukukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N: Heterozygous *TGFBR2* mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 36 (8): 855-860, 2004.

○ Kamimura J, Wakui K, Watanabe Y, Miyake K, Harada N, Kinoshita A, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Kasuga M, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: The *IHPK1* gene is disrupted at the 3p21.31 breakpoint of

t(3;9) in a family with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Genet* 49: 360-365, 2004.

○ Okubo A, Miyoshi O, Baba K, Takagi M, Tsukamoto K, Kinoshita A, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: A novel *GATA4* mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japnese family. *J Med Genet* 41 (7): E97, 2004.

○ Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, Harada N, Kondoh T, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of inv dup del(8p): Analysis of five cases. *Am J Med Genet* 128 (A): 133-137, 2004.

○ Miyake N, Harada N, Shimokawa O, Ohashi H, Kurosawa K, Matsumoto T, Fukushima Y, Nagai T, Shotelersuk Y, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: On the reported 8p22-p23.1 duplication in Kabuki make-up syndrome (KMS) and its absence in Japanese patients with typical KMS. *Am J Med Genet* 128 (A): 170-172, 2004

○ Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T: Detection of cell-free placental DNA in maternal plasma: Direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet* 41 (4): 289-292, 2004.

○ Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, Niikawa N, Matsumoto N: 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet* 126A (3): 278-283, 2004.

○ Ghadami M, Majidzadeh-A K, Morovvati S, Damavandi E, Nishimura G, Kinoshita A, Najafi M-T,Niikawa N,Yoshiura K:Familial isolated congenital anosmia with morphologically normal olfactory bulb in two unrelated Iranian families: A new clinical entity? *Am J Med Genet* 127A (3): 307-309, 2004.

○ Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N.Subtelomere-specific microarray-based comparative genomic hybridization: A rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41 (2): 130-136, 2004.

○ Miyake N, Tonoki H, Gallego M, Harada N, Shimokawa O, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Phenotype-genotype correlation in two patients with 12 proximal deletion. *J Hum Genet* 49: 282-284, 2004.

○ Kato R, Kawamura J, Sugawara H, Niikawa N, Matsumoto N: A rapid diagnostic method for a retrotransposal insertional mutation into the *FCMD* gene in Japanese patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med*

Genet 127A: 54-57, 2004.

○Kinoshita A, Shirahama A, Miyahara A, Nishimura G, Haga N, Namba A, Ueda H, Hayashi H, Seidel J, Fukumaki Y, Ikegawa S, Niikawa N, Yoshiura K: *TGFB1* mutations in four new families with Camurati-Engelmann disease: Confirmation of independently arising LAP-domain-specific mutations. *Am J Med Genet* 127A: 104-107, 2004.

○ Ghadami M, Majidzadeh-A K, Morovvati S, Damavandi E, Nishimura G, Kinoshita A, Pasalar P, Komatsu K, Najafi MT, Niikawa N, Yoshiura K: An isolated congenital anosmia locus maps to 18p11.23-q12.2. *J Med Genet* 41: 299-303, 2004.

○ Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, Tsukamoto K, Tomita H, Tsujihata M, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Minakami H, Niikawa N, Yoshiura K: LRP5, low density lipoprotein receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density (BMD). *J Hum Genet* 49 (2): 80-86, 2004.

○ Yamada T, Mitsuya K, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Yamada H, Minakami H, Oshimura M, Niikawa N, Kishino T: Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST-flanking region at human chromosome 7q32 *Genomics* 83 (3): 402-412, 2004.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：１件（CREST研究期間累積件数：３件）