

多型マイクロサテライトの収集とヒトゲノム多様性に関する研究

研究代表者：猪子 英俊（東海大学医学部）

I. 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

ヒトゲノムの全塩基配列決定の決定が完了した現在、今後の「ポストゲノムシーケンシング」としての大きな課題の一つは、同定された遺伝子の機能解析であることは間違いない。そのための有力なアプローチである、ある遺伝的多型とヒトでみられる個性的な生物現象との相関を追及することは、遺伝子とヒトがしめす表現型の機能的因果関係、例えば疾患についてはその遺伝要因を解明することを可能とする。このような多様性検索こそが、実験動物で行われる遺伝子のノックアウト操作が許されないヒトについての、ゲノム機能の解析の突破口を開く、と期待される。

世界的に進行しようとしているヒトゲノム多様性プロジェクトの標的である SNP (single nucleotide polymorphism : 単一ヌクレオチド多型 ; 遺伝子内の一塩基置換、欠失、挿入による差異にもとづく多型) は一般的に対立遺伝子の数が 2 個のみであることから、SNP 単独でゲノムワイドなマッピングに用いるには多様度が不十分である。そこで本研究では、多型に富み、したがってより精度の高いマッピングが可能なマイクロサテライトに注目した。ゲノム全体を等間隔でカバーする計 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを設定し、これを多型遺伝マーカーとする相関解析によって、複合遺伝疾患の感受性遺伝子など、ヒト表現型を規定している遺伝要因を同定するための戦略を確立することを目的とする。このような多型マイクロサテライトを用いたゲノム多様性に関する大規模な研究は、疾患に関係する SNP の同定を効率的に推進し、疾患の治療と予防、創薬に役立つのみならず、学習、記憶などの高次行動を始め、ヒトの遺伝子やゲノム機能など、生物種としてのヒト生命現象の分子レベルでの理解へと展開するであろう。

第 I 期において、当該期間の目標であった多型マイクロサテライトマーカー 30,000 個の収集・設定が完了した。またマイクロサテライト繰り返し多型の検出の迅速化を目指した取り組みとして、チップ化した DNA について質量分析を利用したタイピング技術の基礎開発を行い、第 II 期の研究を見据えた基盤整備と、実用化に向けた開発研究に着手可能な体制の構築を終えている。これらの成果をふまえ、第 II 期においては、収集した多型マイクロサテライト

マーカーの情報を整備し、疾患解析を進める上での有益な参考情報を得ること、さらにこれらのマーカーを用いて、複合遺伝疾患の感受性遺伝子候補領域を絞り込み、感受性遺伝子の同定へとつながる最終課程までの解析手法の確立を目標に研究を行う。具体的には、設定した 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを用い、複合遺伝疾患である糖尿病、慢性関節リウマチなどをモデル疾患とした解析を行う。すなわち、多型マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな複合遺伝疾患のマッピングにより、感受性遺伝子候補領域を 100 kb 前後に絞り込み、発現解析やゲノムシーケンシングを行って感受性遺伝子の特定を行って、連鎖解析による方法などによる既存の結果との異同を調べることにより、マイクロサテライトを用いたマッピングによる相関解析法の確立を試みる。さらには、DNA チップの技術開発の進展を受け、マイクロサテライトタイピング方法を切り替えることにより、マッピングの効率化を図る。

2. 研究の概要

a. 多型マイクロサテライトの収集とヒトゲノム多様性に関する研究

(1) 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のための高密度 DNA チップ (MS チップ) 技術の開発に関する研究

マイクロサテライト配列を含むゲノム領域を PCR 増幅後、スライドガラス上にスポッティングし、MALDI-TOF 型質量分析計を用いて分子量を測定することによりマイクロサテライトの繰り返し多型を検索する技術の開発と、多型判定にいたる一連作業のオートメーションシステムの構築が本サブテーマの最終目標である。この目標に向け、第 I 期において MALDI-TOF 型質量分析計の測定条件の検討、新規マトリックスのスクリーニング、ハイスループット化へ向けた予備検討、IR レーザーを搭載した MALDI-TOF/MS の開発を実施し、第 II 期以降の実施計画項目であるスポット数の高密度化とハイスループット化へ向けた開発への基礎検討を終え、本サブテーマ全計画の約 80% を達成した。

第 I 期期間に、長鎖長 DNA の測定に適した新規マトリックス 2,4-DHAP を見出すとともに、7-デアザ体への修飾が DNA フラグメンテーションの抑制と高精度な分析に有効であることが判明したので、第 II 期では 7-デアザ体を用いた PCR 産物に適する測定条件の検討を進め、より精度の高いマイクロサテライト多型解析系の構築を目指す (a. (2))。さらに、マイクロサテ

ライトを含む領域をPCR増幅し、得られたPCR産物をMALDI-TOFMSにて測定するために不可欠な精製などの前処理、および1チップで多検体の分析を実現するために必要な高密度MSチップを作成するシステムを構築する。高密度MSチップ上の微量サンプルスポットから質量測定を行うためには、スポットを認識したのちそのスポットに対してレーザー照射を行うことになる。そこで微量スポットに対してこれらを実行できる方法を検討し、さらに自動化するためのソフトウェアを試作する。具体的には、1) 高密度MSチップ上の微量サンプルスポットを捕らえるための画像認識法、2) 認識した微量サンプルスポット上に精度よくレーザーを照射するためのXYステージ制御方法、の2項目について開発検討を行う。以上により、高密度にサンプルを搭載できるMSチップの開発を進め、ハイスループットな解析系の構築および実現し、最終目標を達成する。

(2) 長鎖長 DNA 質量測定のためのイオン化機構の理論解析

第I期のサブテーマ(1)において、新規マトリックスの探索を網羅的に行い、2,4-DHAPを見いだすことに成功した。第II期では、より高精度な分析と実用化を実現するため、マトリックスの物理科学的な解析すなわち、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間質量分析(MALDI-TOF/MS)において、DNA質量測定に適したマトリックスの探索を理論計算により支援する。具体的には、DHBA及びDHAPらのマトリックスに対して、Gaussian98もしくはGAMERSSを用いて、1) 電子密度、2) IR振動数、3) 励起エネルギー、4) プロトン脱離エネルギー等を計算する。これらの計算された物性値から、MALDI-TOF/MSの解像度に関与する物性を調査する。また、DNA断片化に対しては、最も断片化が顕著であるグアニン塩基について水素イオンとの結合モデルを用いて電子密度を計算することにより解析を行う。以上により、適切な測定条件を理論的に導き出し、より長鎖長での解析を可能とすることによって、マイクロサテライトマーカへの応用範囲を広げ、すべてのマーカについてハイスループットな解析系への適用を実現する。

(3) 絞りこまれた感受性遺伝子候補領域のゲノムシーケンシングによる疾患感受性遺伝子同定の方法論に関する研究

第I期において、ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカ 30,000 個の収集・設定を行った。さらにこれらのマーカは、染色体上の物理的位置情報に基づき、ゲノムワイド遺伝的相関解析に即時使用可能な状態にカタログ化することにより、感受性遺伝子候補領域の絞り込みに関する基盤整備を完了した。また、日本人集団では異なる分集団の混合に由来する階層化を考慮する必要が無いことを明らかにし、複合性疾患の遺伝的相関解析に同集団が適していることを証明した。これらにより、本サブテーマにおいては全計画の90%を達成している。

設定した多型マイクロサテライトマーカを用いることにより、感受性遺伝子候補領域を100 kb前後に絞り込むことができることと期待される。第II期では、複合遺伝疾患であり、またすでに連鎖解析で様々な感受性遺伝子候補領域が報告されている糖尿病、慢性関節リウマチなどをモデル疾患として、候補領域の絞り込みをさらに進め、PACやBACクローニングとショットガンシーケンシングなどの塩基配列決定法で、同領域のゲノム塩基配列を決定する。続いて、候補領域中に、BLAST、GENESCAN等のコンピュータプログラムによってエクソン配列やEST配列の存在を予測する。この情報をもとにして、RT-PCRやRACE、cDNAライブラリーのスクリーニングを行う。同時に、候補領域でのエクソトラッピングを行うことにより、発現遺伝子を同定する。同定された発現遺伝子に関しては、各種ヒト組織由来のRNAを用いたRT-PCRおよびノザン解析により、発現組織を同定し、それぞれ発現量や鎖長などの情報を収集する。また、候補領域内のすべてのgSNPs(genomic SNPs)およびcSNPs(coding SNPs)に関して、患者群・健常者群における解析を行い、疾患との関連を相関解析により調査し、疾患の発症を規定するアミノ酸置換あるいは欠失・挿入を同定する。これらの結果と連鎖解析による方法など既存の結果との異同を調べることにより、マイクロサテライトを用いたマッピングによる一連の相関解析法の確立を試みる。以上により、真の感受性遺伝子を排他的に同定する効率的な方法が可能となり、本研究の最終目標達成を目指す。

(4) マイクロサテライト配列の抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究

本サブテーマでは、ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカ 30,000 個の効率的な設定に資するため、ならびに設定された多型マイクロサテライトマーカの管理と他のゲノム研究者への情報提供に資するための、情報基盤整備を行う。具体的には、マイクロサテライト配列を大量のゲノム塩基配列より取り出すプログラムの作成、多型マイクロサテライトマーカデータベースの構築を研究項目の目標とした。第I期において、ヒトゲノム配列から自動的にプライマーを設計するソフトウェア、PCR産物に由来する蛍光シグナルピークの値を抽出し、多型有無判定を自動化するプログラム、ゲノム上における物理的な位置を考慮した、効率的な多型マイクロサテライトマーカ設定システムを完成させた。さらに、合計約30,000個の多型マイクロサテライトマーカに関する多型情報を収集し、今後の疾患感受性遺伝子の探索を効率よく進めるために、これら多型マイクロサテライトマーカの情報を整理してデータベース化する作業を行った。ここには、基礎となるヒトゲノムの配列情報、マイクロサテライトの位置と種類、多型に関する情報をすべて入力するものとした。これらの情報についてSQL言語を使った関連型データベースとし

て整理し、高速な検索システムも実装した。

そこで、第Ⅱ期においては、第Ⅰ期の研究結果の蓄積を受け、設定の完了した多型マイクロサテライトマーカー情報に関して、WWWを介してインターネット上での公開を行うため、環境基盤の整備を行い、これを実現する。また、多型マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的相関解析によって疾患感受性遺伝子を絞り込む作業において、

実験データが膨大な数になると予想されるため、これを管理するデータベースの開発を行う。さらに、設定した多型マイクロサテライトマーカー、SNPsマーカー、発現遺伝子など、疾患感受性遺伝子の同定に必要となる情報を統合的に整理するデータベースを作製するとともに、実験研究者の負担および時間を軽減するため、インターフェイスの充実を図る。

3. 年次計画

研究項目	15年度	16年度
a. 多型マイクロサテライトの収集とヒトゲノム多様性に関する研究 (1) 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のためのDNAチップ (MSチップ) の開発に関する研究 (2) 多型マイクロサテライトを用いた複合遺伝疾患によるマッピングに関する研究 (3) 感受性遺伝子候補領域のゲノムシーケンシングによる疾患感受性遺伝子同定の方法論に関する研究 (4) マイクロサテライト配列の抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究	第Ⅱ期	
	← 高密度MSチップの開発 →	← 自動化のための検討 →
	← 多型マイクロサテライトを用いた複合遺伝疾患によるマッピングに関する研究 →	← 感受性遺伝子候補領域のゲノムシーケンシングによる疾患感受性遺伝子同定の方法論に関する研究 →
	← データベースの拡充 →	← 相関解析ツール (ソフトウェア) の改善 →
b. 研究進捗管理		
所要経費 (合計)	269百万円	247百万円

II. 平成 16 年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
a. 多型マイクロサテライトの収集とヒトゲノム多様性に関する研究 (1) 質量分析法によるマイクロサテライト多型検索のための高密度DNAチップ (MSチップ) 技術の開発に関する研究 (2) 長鎖長DNA質量測定のためのイオン化機構の理論解析 (3) 感受性遺伝子候補領域のゲノムシーケンシングによる疾患感受性遺伝子同定の方法論に関する研究 (4) マイクロサテライト配列の抽出プログラムの作成とデータベースの構築に関する研究	(株) 島津製作所 (分析計測事業部)	○ 藤分 秀司
	(株) 富士総合研究所 (リサーチ・アンド・サイエンス部門) 東海大学医学部	○ 稲垣 祐一郎 ◎ 猪子 英俊
	文部科学省 国立遺伝学研究所	○ 五條 堀 孝
	科学技術振興機構	
b. 研究進捗管理		

(注：◎は代表者、○はサブテーマ責任者)

III. 研究推進委員会

委員	所属
○ 笹月 健彦 辻 省次 徳永 勝士 木村 彰方 谷口 寿章 田代 弘行	厚生労働省 国立国際医療センター研究所 所長 新潟大学 脳研究所神経内科学教室 教授 東京大学 大学院医学系医学研究科人類遺伝学教室 教授 東京医科歯科大学 難治疾患研究所成人疾患研究部門 教授 徳島大学 酵素科学研究センター 教授 (株) 不二家 バイオサイエンス研究所 所長

(注：○は研究推進委員長)