

[0022]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2007年

<https://doi.org/10.15017/10326>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 22, 2008-05. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

遺 伝 情 報 実 験 セ ン タ ー

Research Center for Genetic Information

ゲノム構造学分野

Division of Genome Analysis

当部門は発足以来ヒトゲノムの多様性解析を主要なテーマとしている。ヒトゲノム配列解読の完了という生命科学上の転換点以降に、その成果を利用して生命の理解をより深め医学等に応用していくために新たに広範な研究分野が展開してきた。多様性解析は特にゲノム情報を有効に利用できる分野であることから、我々はさらなる方法論および情報抽出技術を開発することにより遺伝子多型および変異が人間の疾病とどのように関わっているかを解明し、病気の予防、診断、治療に役立てることを目指している。さらに遺伝子機能解析の方法論確立のために、DNA 結合能に基づいて単離された転写因子 MIBP1 の標的遺伝子の検索および他の細胞内蛋白質との相互作用の解析を行っている。また、DNA の自己組織化能力を利用して次世代の素材・素子を開発するために、デザインナブルな DNA ナノ構造体を作製する研究も行っている。

平成19年度は当分野で博士課程の研究をおこなっていた医学系大学院生の秦暢宏が研究課題“Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis”により、また同大学院生であった宮川弘が研究課題“Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus”により医学博士号を取得した。

A. ヒトゲノム多様性の解析

a. PCR-SSCP 法に基づいた SNP 検出・定量システムの開発

個人間の遺伝的素因（いわゆる体質）の違いはヒトゲノムの配列のわずかな違いに起因する。このような違い（多型）のなかで最も多いのが一塩基多型（single nucleotide polymorphisms : SNP）である。これを効率よく解析するための PCR-SSCP 法を開発してきた。これは PCR 産物を末端蛍光標識し非変性条件で電気泳動を行うことにより、塩基配列の異なるフラグメントを分離するもので、SNP のスクリーニングやタイピングのみならず DNA プールの解析による SNP アレル頻度の正確な算出に利用できる。この解析では、非常に多数の試料 DNA をそれぞれタイピングするのではなく試料 DNA を等モルになるように混合したプールを解析するので、解析の労力およびコストを大幅に削減することが可能である。医学研究への本法の応用として、患者群および対照群のそれぞれについて DNA プールを作製し、そのアレル頻度を比較することにより関連解析を効率よく行う方法を開発した。

大規模な SNP の検出およびアレル頻度算出を効率よく行うためには実験管理及び産出されたデータの処理を行うシステムの開発も重要である。我々は、試料管理、PCR プライマーの設計からシーケンシング、プール DNA の PCR-SSCP 解析による多数の SNP のアレル頻度の決定、結果のデータベース化までを一括して行う大規模な実験情報管理システム (laboratory information management system: LIMS) ” dbQSNP” を構築した。このシステムを利用して遺伝子転写開始点領域の SNP 約 10,000 個を網羅的に解析し、日本人集団と西欧人集団におけるアレル頻度を実験的に推定して dbQSNP データベースとして公開してきた (<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/>)。新たに、主として候補遺伝子を対象として自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の関連解析を行った結果も同データベースに公開した。

さらに、疾患関連解析を効率よく行うためのツールとしてこのシステムの中核部分を利用するために、Windows 上で稼動する解析ソフトウェア「QSNPlite」を開発し公開した (<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/placeSSCP/qsnplite/>)。これは、シーケンシング及び DNA プールの PCR-SSCP 法を行い、それらの結果を統合して SNP を同定し、アレル頻度を決定するためのものである。

b. DNA プールの定量的 SNP 解析システムの開発

近年の DNA マイクロアレイ技術の進歩により、糖尿病・癌など多因子疾患の原因遺伝子を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析は現実的なものとなってきた。しかし、既成のシステムを利用して非常に多数の検体を解析するのはコスト面での限界がある。大規模ゲノムワイド関連解析を低コストで行う方法論を確立するための先行研究として、SLE 患者群および対照群の DNA プールを被検材料とし、SLE の関連解析研究を行った。まず、DNA マイクロアレイによる定量的 SNP 解析で 1 次スクリーニングを行った。ここでは患者群プールと対照群プール各 2 種類を各 6 回解析した。両群の比較は相対的蛍光強度により行った。この中央値に基づく値を比較する z-スコアを算出し、平行してシルエットスコアによる比較も行った。マイクロアレイを用いた解析ではノイズによる擬陽性が大きな問題となる。これを除外するためにいずれの統計量についてもスライディングウインドウ解析を行った。これにより、患者群と健常者群のプールでアレル頻度が異なると予想される複数の領域が検出された。この中からさらに擬陽性のシグナルを除外するために、より精度の高い定量が可能である PCR-SSCP 法を 2 次スクリーニングとして用いて DNA プールでの SNP アレル頻度を測定し比較した。これらの解析により染色体 7p の IKZF1 (Ikaros) 遺伝子の約 36 kb 上流にある SNP が SLE と強く関連していることを見いだした。この DNA プールの解析結果を、個別試料のタイピングにより確認したところ、SNP のアレルのオッズ比は 1.56 (95% CI 1.35-1.81)、P 値は 2.8×10^{-9} であり、これまで我々が調べた中で最も強く疾患と関連していた。

以上の結果より、DNA プールをゲノムワイドアレイと PCR-SSCP 法の 2 段階で解析する方法は疾患関連 SNP の同定に有用であることが示された。

c. 遺伝子の変異および多型と各種疾患との関連の解析

DNA プールを PCR-SSCP 法で定量的に解析することにより自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) の感受性遺伝子同定のための関連解析を行い、転写因子 IRF5、補体 C3 の遺伝子内の SNP が SLE と関連していることを見いだした (医学研究院・病態修復内科学分野との共同研究)。

がん組織ではがん抑制遺伝子の欠失が高頻度に観察される。この欠失は SNP をマーカーとして loss of heterozygosity (LOH) 解析により検出できる。SSCP 解析では SNP アレルの量比を正確に決定できるので、がん組織に正常組織が混入していても欠失を感度よく検出することができる。そこでこの解析法を脳腫瘍組織・髄膜腫組織での LOH 解析に応用し、これらの腫瘍での高頻度 LOH 領域を決定した (医学研究院・脳神経外科学分野との共同研究)。

眼科領域では単一遺伝子の変異によると考えられる遺伝性疾患が数多く報告されている。これらの発症機構を解明し、治療・遺伝子診断に役立てるために解析を行っている (福岡大医学部眼科との共同研究)。家族性滲出性硝子体網膜症 (FEVR) の患者の遺伝子解析を行い、これまでに frizzled 4 (Wnt シグナルの細胞表面受容体) をコードする FDZ4, 共受容体をコードする LRP5, リガンドをコードする NDP にそれぞれ複数の突然変異を同定した。変異の違いにより疾患重症度の相違が認められる機構を解明するため、遺伝子変異が Wnt シグナル標的遺伝子の発現へ与える影響を定量した。その結果、Wnt シグナル古典的経路の阻害と表現型が相関しない場合もあり、発症要因が複合的であることを明らかにした。

d. 胞状奇胎を用いた全ゲノムハプロタイプの直接決定

多因子疾患の原因遺伝子をゲノムワイドな関連解析により同定するために必要な全ゲノムのハプロタイプを決定する目的で国際ハップマッププロジェクトが遂行された。しかし、このプロジェクトでは 2 倍体細胞に由来する DNA を用いて決定した SNP ジェノタイプから間接的にハプロタイプを推定している。特に、東アジア人 (日本人及び中国人) の試料に関しては、不特定個人 45 人由来のジェノタイプデータを基にハプロタイプを遺伝統計学的モデルのみに基づいて推定しているため、その結果は誤りを多く含む可能性がある。そこで我々は、単一精子由来のハプロイドゲノムを持つ全胞状奇胎を解析することにより、日本人ゲノムのハプロタイプを直接決定し、より精細な疾患の関連解析に耐えるゲノム情報基盤を確立することを目指している。

昨年度までに胞状奇胎 74 試料の DNA を用いて約 28 万個の SNP (D1 phase), 約 50

万個の SNP (D1 phase の結果とあわせて D2 phase と呼称) を DNA マイクロアレイによりタイピングした (生体防御医学研究所・ゲノム創薬・治療学分野および医学研究院・生殖病態生理学分野との共同研究)。これにより得られたゲノムワイドな確定ハプロタイプをもとに情報学的解析を行い, 日本人ゲノムのハプロタイプブロック構造・SNP 間連鎖不平衡ピンを決定し, 関連解析を効率よく行うための tagSNP の選定を行った。これらの結果をデータベース「D-HaploDB」 (<http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp>) に集約し, 公開している。さらに情報学的解析により複数の試料で共有されるハプロタイプの構造を調べ, 日本人ゲノムに自然選択の痕跡を見いだせるかどうか検討を行っている。また, 近年疾患との関連が注目されているコピー数多型を DNA マイクロアレイデータの情報学的解析により検出しハプロタイプ上にマップするための研究を行っている。

B. 転写因子 MIBP1 の機能解析

転写因子 MIBP1 (*c-myc* Intron 1 Binding Protein 1) は癌遺伝子 *c-myc* のイントロン 1 領域にある発現調節領域に結合する蛋白質として同定された。MIBP1 は全長 2437 アミノ酸からなり, C2H2 type の Zinc finger を持ち, 転写因子と考えられている。これまで報告されたノックアウトマウスの表現型は, T 細胞, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 破骨細胞など, 多種類の細胞における分化異常であることから, それらの分化を制御する機能を担っているものと考えられるが, 具体的な転写調節の分子メカニズムは未だ不明である。我々は生体防御医学研究所プロテオミクスセンターの協力を得て免疫沈降-マススペクトル解析で, MIBP1 の新規結合タンパク質を探索し, OGT を同定した。OGT はタンパク質のセリン・スレオニン残基に N-アセチルグルコサミン単糖を付加する翻訳後修飾 (O-GlcNAc 化) 酵素である。実際に, 全長 MIBP1 が O-GlcNAc 化されていること, そのためには OGT 結合領域が必要であることも確認した。OGT は転写, 細胞内輸送, 細胞周期など, さまざま場面での蛋白質機能制御に関わっていることが知られている。MIBP1 と OGT との結合, あるいは MIBP1 の O-GlcNAc 化が, MIBP1 の転写因子としての機能にどのように影響しているかを調べている。さらに, MIBP1 の転写調節の標的遺伝子を同定するために DNA マイクロアレイを用いて, MIBP1 発現に伴い発現が変動する遺伝子を探索している。

C. DNA を利用したナノ構造体の設計

DNA の塩基配列は生命現象を空間的, 時間的に規定する情報を担っている。即ち膨大な情報を記述しうる物質である。さらに DNA はこれらの情報を読み出すための物理化学的性質を同時に保有している。我々はこの DNA の情報記述能力とその読み出し機構, 即ち ACGT の適切な並びと, A:T 及び G:C の塩基対形成能を利用して, 生命を描く

のではなく、1次元から3次元までのあらゆる指定されたナノ構造体を積み木細工として作製する方法を研究し、将来ナノマシンの設計に役立てようと考えている。その基本的コンセプトとして、まず三角形の持つ幾何学的な安定性に着目した。即ち構造体を構成する基本ユニットとして一辺数十塩基対の正三角形を採用し、それを組み合わせて三次元構造体を設計しポリゴンとして作製することとした。また設計の更なる進化形として、一筆書きで長い一本鎖が全ての三角形のほぼ全ての辺を通るような骨格を想定した。これによって離れた位置にある配列の組み合わせを一意的に指定できるので、複数の構造の集合体としての複雑な構造体の設計・構築が可能となる。我々はポリゴン構造の全ての辺が独立な配列を持つように設計し、その一筆書き鎖を数本のオリゴヌクレオチドのPCRによる連結産物として得ることを試みた。実際にはPCRによって得られた長い一筆書き鎖をクローニングし、シーケンシングにより配列を確認した後、これを鋳型とするPCRを行い、産物の酵素処理による単鎖化を行った。この長い一本鎖を適切な配列を持つオリゴヌクレオチドと混合して適切な温度でアニーリングすることにより、デザインされた構造体を効率よく構築することに成功した。そして構築された三次元構造体を、ゲル電気泳動、原子間力顕微鏡 (AFM) により確認した。

業績目録

原著論文

1. Hata N, Shono T, Mizoguchi M, Matsumoto K, Guan Y, Nagata S, Hayashi K, Iwaki T, Sasaki T. 2007.
Loss of heterozygosity analysis in an anaplastic oligodendroglioma arising after radiation therapy.
Neurol Res. 29: 723-6.
2. Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP Jr, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, Kanba S. 2007.
Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (DRD4) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients.
J Psychiatr Res. 41: 763-775.
3. Kondo H, Qin M, Tahira T, Hayashi K. 2007
Severe Form of Familial Exudative Vitreoretinopathy Caused by Homozygous R417Q Mutation in Frizzled-4 Gene.
Ophthalmic Genetics 28:220-223.

4. Qin M, Kondo H, Tahira T, Hayashi K. 2008
Moderate reduction of Norrin signaling activity associated with the causative missense mutations identified in patients with familial exudative vitreoretinopathy.
Human Genetics 122:615-623.

5. Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y, Nakamura T, Lee J-H, Tsai C-Y, Chiang B-L, Nagasawa K, Harada M, Tahira T, Hayashi K, Horiuchi T. 2008
Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus.
Rheumatology 47:158-164

6. Guan Y, Hata N, Kuga D, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Shono T, Suzuki S, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Yokoyama N, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K. 2008
Narrowing of the regions of allelic losses of chromosome 1p36 in meningioma tissues by an improved SSCP analysis.
Int. J. Cancer 122:1820-1826.

学会発表

1. 田平知子, 堀内孝彦, 木本泰孝, 塚本 浩, 林 健志 (2007, 4/26)
IRF5 遺伝子多型の全身性エリテマトーデス感受性への関与: アジア人集団を用いた解析
第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜

2. 岩下雄二, 田平知子, 林 健志 (2007, 12/12)
MIBP1 新規結合タンパク質 OGT の同定
第 30 回日本分子学会年会, 横浜

3. 田平知子, 増本和海, 久木田洋児, 岡崎優子, 吉永亜紀, 堀内孝彦, 林 健志 (2007, 12/13)
DNAプールのDNA-chip解析による全身性エリテマトーデス(SLE)疾患感受性遺伝子の大規模探索
第 30 回日本分子学会年会, 横浜

4. 堤 孝信, 水野里香, 久木田洋児, 岡田孝夫, 林 健志 (2007, 12/14)
デザインナブルな自己組織化DNA/RNAナノ構造体作製法の確立
第 30 回日本分子学会年会, 横浜

5. Kukita Y, Higasa K, Ishikawa S, Tahira T, Hayashi K. (2007, 10/24)
Detection of human copy number variations using a collection of Japanese complete hydatidiform moles.
57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

6. Higasa K, Kukita Y, Miyatake K, Tahira T, Hayashi K. (2007, 10/24)
Enhanced D-HaploDB: definitive haplotypes and extended haplotype information determined by genotyping complete hydatidiform mole samples.
57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

7. Tahira T, Masumoto K, Kukita Y, Horiuchi T, Hayashi K. (2007, 10/26)
Pooling-based Genomewide Association Study Identifies Loci for Systemic Lupus Erythematosus.
57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

8. Kukita Y, Higasa K, Ishikawa S, Tahira T, Hayashi K. (2007, 11/27-28)
Detection of human copy number variations using a collection of Japanese complete hydatidiform moles.
The 7th international workshop on advanced genomics, Tokyo, Japan

9. Higasa K, Kukita Y, Miyatake K, Tahira T, Hayashi K. (2007, 11/27-28)
Enhanced D-HaploDB: definitive haplotypes and extended haplotype information determined by genotyping complete hydatidiform mole samples.
The 7th international workshop on advanced genomics, Tokyo, Japan

ゲノム機能学分野

Division of Human Molecular Genetics

当研究室では、一個の遺伝子の異常により起きる単一遺伝子病や、複数の遺伝子と環境因子の相互作用により発症する多因子病の解析と共に、ストレスや薬物への応答遺伝子の解析を行うことにより、遺伝情報制御機構の観点から生命現象を理解することを目指しており、さらに疾病の診断および治療法の確立にも寄与したいと考えている。

2007 年の研究室への新たな参加者は、システム生命科学府博士課程 1 年として九州大学理学部出身の金子 沙世および中国の大連医科大学出身の王 麗香であり、さらに理学部生物学科学生 4 年生の佐々木 達哉および森田 彩が卒業研究のために配属となった。

A. 統合失調症の分子基盤の解明

統合失調症は主に思春期に発病し、幻覚、妄想、思考障害などの陽性症状や、感情の平板化、寡動、意欲・自発性の欠如などの陰性症状を特徴として、多くは慢性に経過する頻度の高い精神疾患である。複雑な遺伝様式から多因子病と考えられており、同胞発症相対リスク λ_s は 10 程度であり遺伝子の関与が比較的高いことが知られている。この疾患の感受性遺伝子を同定し、分子機構を解明するために、遺伝統計学的、機能ゲノム学のおよび発生工学的アプローチをとっている。

a. 候補遺伝子関連解析

統合失調症のグルタミン酸伝達異常モデルに基づき、グルタミン酸受容体遺伝子、グルタミン酸トランスポータ遺伝子、グルタミン酸代謝系遺伝子の体系的な関連解析を行っている。今回はグルタミン酸受容体遺伝子についての解析結果を報告する。III 型メタボトロピックグルタミン酸受容体遺伝子の *GRM4* について 8 個、*GRM7* について 43 個の SNP を選択し、スクリーニングの目的で 100 ペアのケース・コントロールサンプルを用いて単点およびハプロタイプ関連解析を行った。*GRM4* の SNP については関連が認められなかったが、*GRM7* の 2 つの SNP (rs12491620 と rs1450099) についてハプロタイプで関連が認められた。またこの有意差は False Discovery Rate による多重検定の補正を行っても消失しなかった。そこでこの 2 つの SNP につきサンプルを追加して (計 404 のケースと 420 のコントロールサンプル) 解析を行ったところ、有意差が認められた ($P=0.002$)。以上の結果から、*GRM4* の統合失調症発症への主要な関与はないが、*GRM7* やその近傍領域の本疾患感受性への関わりが考えられた。

b. ゲノムワイド関連解析

ゲノム集団遺伝学分野の山本 健 博士および東海大学医学部 猪子 英俊 博士の協力を得て、ゲノムワイドに分布した約 3 万のマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析を行った。プールした 1 次サンプルを用いたスクリーニングにより有意差の見られるマーカーを選択し、次にこれらのマーカーにつき 2 次サンプルで関連解析を行い、さらに 3 次サンプルによる同様なスクリーニングを行った。その結果 28,095 個のマーカーから有意差がみられる 352 個のマーカーが得られた。これらのマーカーにつき各スクリーニング間で有意差を示すアレルの再現性の確認等を行い、計 59 マーカーを選択した。次に得られたマーカー周辺の 200 kb の領域に位置する $MAF > 0.1$, $r^2 > 0.8$ の Tag SNP を合計 1,564 個選び、1 次、2 次、3 次サンプルをまとめタイピングを行った。その結果 167 個の SNP に有意差が認められた。この中で種々の検定で有意差が見られる 31 個の SNP を選定し、JIRAS (Japanese Genetics Initiative for Replicating Association of Schizophrenia) のサンプル (約 2,400 ペア) を用いて関連解析を行っている。

c. 精神作用薬応答遺伝子群の関連解析

精神作用薬である PCP (phencyclidine) はヒトおよび動物モデルで統合失調症様の陽性症状と陰性症状を引き起こすため、現在のところ統合失調症の最も有効な薬理学的モデルと考えられている。そこで PCP の急性投与に反応して発現が有意に変化する遺伝子をマイクロアレイにより探索し、それらの統合失調症発症への関与を患者検体を用いた関連解析により検討した。PCP 急性投与ラットの脳の 5 部位から単離したトータル RNA のマイクロアレイ解析を行い、90 個の遺伝子と 21 個の EST において発現量の変化を観察した。定量的 RT-PCR により発現変化を検討し、さらに同一処理を行った別サンプルから単離したトータル RNA を用いた定量的 RT-PCR により再現性の確認を行い、最終的に発現量の変化を来す 12 個の遺伝子を同定した。2 倍以上の発現量変化が確認された 10 個の遺伝子うち、*DUSP1*, *BTG2*, *PLAT* について日本人集団罹患群、健常群各 304 検体を用いた関連解析を行った。各遺伝子全領域を連鎖不平衡でカバーするように合計 12 個の SNP を設定し、タイピングした。その結果、各 SNP 単独では、遺伝子型およびアレル頻度のいずれも疾患との有意な関連を示さなかったが、*BTG2* および *PLAT* のハプロタイプ頻度においては、False Discovery Rate 補正後にも疾患との有意な関連を示した ($P = 1.4 \times 10^{-6}$, $P = 1 \times 10^{-3}$)。したがって日本人集団において、*DUSP1* は統合失調症の発症に大きな関与はないが、*BTG2* および *PLAT* 遺伝子もしくはその近傍領域の本疾患発症への関与が考えられた。

d. 変異マウスの解析

先に関連を報告し作出した *GRIA4* ノックアウトマウスについて、電気生理学的解析に引き続き、C57BL/6 系マウスへの戻し交配を 6 世代まで終了し行動解析を実施中である。統合失調症のエンドフェノタイプとして指摘されている Prepulse inhibition の障害が本変異マウスでも見られている。

B. 遺伝性脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) の分子機構の解明

脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) は九州大学神経内科にて見いだされた常染色体優性遺伝形式をとる緩徐進行性の経過をとる変性疾患である。昨年度ゲノムワイドな連鎖解析を行い、3p26.2-pter に連鎖領域があることを報告した。この領域には臨床症状が類似する脊髄小脳失調症 15 型 (SCA15) がマップされており、最近になって SCA15 ではこの領域に向き合って存在しているイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体遺伝子 (*ITRP1*) とスルファターゼ修飾因子遺伝子 (*SUMF1*) が部分欠失していることが報告された。そこで SCA16 家系の罹患者および非罹患者のゲノム DNA を用いて real-time PCR により両遺伝子のコピー数の比較定量を行った。その結果罹患者では *ITRP1* のエクソン 58 個のうちエクソン 1 からエクソン 48 が欠失していることを見いだした。続く切断点の解析の結果、*ITRP1* と *SUMF1* の遺伝子間領域 (26 kb) のうち *ITRP1* の上流 13 kb まで欠失しており、*SUMF1* には異常が見られなかった。従って SCA16/SCA15 の発症には *SUMF1* の寄与は低く、*ITRP1* のハプロ不全が原因であると結論した。

C. 進行性骨化性線維異形成症の分子機構の解明

進行性骨化性線維異形成症 (FOP: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva) は異所性骨化が起こる常染色体優性遺伝病である。その原因としてこれまでアクチビン A 受容体 I 型 (*ACVRI*) に R206H 変異が見いだされている。興味深いこと日本を問わず患者にはこの変異のみが見いだされ、しかもその 95% が *de novo* mutation で発症すると考えられている。今回 62 歳の FOP の症例の末梢血から得られた total RNA とゲノム DNA を用いた解析により、G356D のアミノ酸変異を来す G>A 置換を見いだした。これは *ACVRI* の 7 番目のエクソンに位置しており、150 名の健常日本人には認められず、同胞の *ACVRI* を含めた約 0.5 Mb の領域内の SNP によるハプロタイプ解析からは *de novo* mutation である可能性が考えられた。また real time PCR を用いた末梢血リンパ球での *ACVRI* 発現解析では、本症例、健常者、健常同胞との間に差は認められなかった。現在この変異による発症機構について解析を進めている。

D. Pelizaeus-Merzbacher 病の病因解析

中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする Pelizaeus-Merzbacher 病は PLP 遺伝子 (*PLP1*)

の点変異・完全重複・完全欠失などによって引き起こされる X-連鎖遺伝病である。PLP1 は量的効果のある遺伝子であり発現量の厳密な制御が重要である。今年度は PLP1 のプロモーター領域における変異を見だし、細胞培養系を使ってその機能解析を行った。

E. 人工 miRNA 前駆体発現系を用いたジーンサイレンシング

特定の遺伝子の発現を組織特異的・時期特異的に抑制する目的で、microRNA (miRNA) の前駆体を RNA polymerase II 系プロモーターの制御下で発現させる新たな系を開発し、artificial miRNA precursor motif (AMPM) と命名した。AMPM は miRNA 前駆体として認識され、標的遺伝子の発現を強力に抑制した。また、AMPM を選別マーカー遺伝子のイントロン内に配置することにより、選別マーカー遺伝子の発現と標的遺伝子の発現抑制を一致させることができた。その配列特異性は shRNA と同程度であった。従って、AMPM は shRNA と同様に、遺伝子機能解析や遺伝子治療のツールとして有用であり、しかも pol II で転写されるため時空間的制御が可能であることから、shRNA よりも優れたシステムであると考えられる。さらに複数の AMPM を 24 塩基程度の長さの配列を介してクラスター状に連結することにより、1 つの転写産物から同時に複数の人工 miRNA を効率よく発現させることができることを明らかにした。また、同一標的内の異なる部位を標的とした複数の AMPM を連結して同時に発現させることにより、標的が変異を起こして mismatches が生じて抑制効果を維持できることを示した。従って、連結型の AMPM は HIV-1 のような変異率の高い標的に対しても有効なツールになると期待される。現在この系を個体レベルに応用するため解析を進めている。

F. グルタミン酸受容体遺伝子の比較ゲノミクス

ヒトにおける高次脳機能の進化機構の解明を目的として、グルタミン酸受容体遺伝子の比較ゲノム研究を進めている。これまでにグルタミン酸受容体遺伝子群全 26 遺伝子のチンパンジーにおける全翻訳領域とその上流約 1 kb のチンパンジーにおける塩基配列の決定を行った（国立情報研の藤山 秋佐夫博士，理研の榊 佳之博士，豊田 敦博士，黒木 陽子博士，東大の服部 正平教授らとの共同研究）。その結果、いずれのグルタミン酸受容体遺伝子についても Ka/Ks はヒト-チンパンジーともに平均よりも小さく、翻訳領域への強い進化的制約が示唆された。またヒト-チンパンジー間で同定した 74 箇所のアミノ酸置換について、他の類人猿 4 種及びその他の霊長類 5 種および全世界の 9 つのヒト集団（80 検体）について該当配列を決定することで、ヒト-チンパンジー分岐後にヒト側で起きかつヒト集団で固定している塩基置換を 34 個同定した。さらに、グルタミン酸受容体遺伝子群にどのような自然選択圧がかかってきたのかを解明するために、ヒト 72 検体チンパンジー 50 検体を用いた各グルタミン酸受容体遺伝子上流領域

のリシーケンシングによる全変異検出と Tajima' s test などの集団遺伝学的解析を進めている。これまでのイオンチャンネル型グルタミン産受容体 14 種の解析から、チンパンジー特異的な純化選択 (*GRIN2B*, *GRIA4*, *GRIK3*) や、ヒト特異的な平衡選択を示す領域 (*GRIN2B*) を同定した。

業績目録

原著論文

1. Shibata, A., Iwaki, A. and Fukumaki, Y. 2007.
A novel expression system for artificial miRNA containing no endogenous miRNA precursor sequences.
J. RNAi Gene Silencing, 3, 237-247.
2. Deng, X., Shibata, H., Takeuchi, N., Rachi, N., Sakai, M., Hideaki Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, O., and Fukumaki, Y. 2007.
Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes *SLCIA1*, *SLCIA3* and *SLCIA6* with schizophrenia.
Am. J. Med. Genet. 144B, 271-278.
3. Suzuki, A., Hamano, S., Shirakawa, T., Watanabe, K., Endo, T., Sharma, S., Jha, B., Acharya, GP., Nishiyama, K., Fukumaki, Y. and Kobayashi S. 2007.
The distribution of hereditary erythrocytic disorders associated with malaria, in a lowland area of Nepal: a micro-epidemiological study.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 101, 113-122.
4. Furuya, H., Ikezoe, K., Wang, L., Ohyagi, Y., Motomura, K., Fujii, N., Kira, J., Fukumaki, Y. 2008.
A unique case of fibrodysplasia ossificans progressiva with an ACVR1 mutation, G356D, other than the common mutation (R206H).
Am J Med Genet A. 146: 459-463.
5. Iwaki, A., Kawano, Y., Miura, S., Shibata, H., Matsuse, D., Li, W., Furuya, H., Ohyagi, Y., Taniwaki, T., Kira, J. and Fukumaki, Y. 2008.
Heterozygous deletion of *ITPR1*, but not *SUMF1* in spinocerebellar ataxia type 16.
J. Med. Genet. 45, 32-35.
6. Shibata, H., Tani, A., Chikuhara, T., Kikuta, R., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N., Fukumaki, Y. Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, *GRM4* and *GRM7*, with schizophrenia. *Psychiatric Res.* 2008. In press.

総説

1. 鄧 湘東, 服巻 保幸. 2007.

グルタミン酸受容体遺伝子と統合失調症

分子精神医学 7: 324-334.

2. 服巻 保幸. 2007.

こころの病気に関わる遺伝子を求めて

ゲノムは何をどのように決めているのだろうか?-生命システムの理解に向けて (小原 雄治編) pp. 126-138.

クバプロ

学会発表

1. 新井 伸作, 柴田 弘紀, 境 真由美, 二宮 秀彰, 岩田 仲生, 尾崎 紀夫, 服巻 保幸 (2007, 9/12-15)

グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子 *GAD2* とグルタミン合成酵素遺伝子 *GLUL* の多型と統合失調症との関連解析.

第 52 回日本人類遺伝学会, 東京.

2. 柴田 弘紀, 田中 邦佳, 渡邊 和典, 蔭山 瑠衣, 後藤 大輝, 蘭 直純, 黒木 陽子, 豊田 敦, 服部 正平, 榊 佳之, 藤山 秋佐夫, 服巻 保幸 (2007, 9/12-15)

統合失調症感受性遺伝子としてのグルタミン酸受容体遺伝子群の分子進化学的解析,

第 52 回日本人類遺伝学会, 東京.

3. 柴田 弘紀, 田中 邦佳, 渡邊 和典, 後藤 大輝, 竹中 修, 服巻 保幸 (2007, 9/19-21)

統合失調症関連遺伝子としてのグルタミン酸受容体遺伝子群の分子進化学的解析.

日本遺伝学会第 79 回大会, 岡山.

4. 古谷 博和, 池添 浩二, 永田 倫之, 藤井 直樹, 服巻 保幸 (2007, 5/15-17)

activin A 受容体 1 (ACVR1) に新規アミノ酸置換を認めた進行性化骨性筋炎 (FOP) 症例.

第 49 回日本神経学会総会, 横浜.

5. 柴田弘紀 (2007, 10/3)

統合失調症関連遺伝子としてのグルタミン酸受容体遺伝子群の分子進化学的解析.

国立遺伝学研究所研究会シンポジウム「ヒトゲノム多様性に基づく進化医学の発展」, 国立遺伝学研究所, 三島.

6. 服巻 保幸, 小林 茂. 柴田 弘紀 (2007, 12/11-15)

進化医学序説: なぜ病気は存在するのか?

- 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
7. 梅根健一, 大橋佐登子, 吉田正己, 服巻 保幸 (2007, 12/11-15)
単純ヘルペスウイルス 1 型 a 配列上の順向き反復配列の多様性.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
8. 新井 伸作, 柴田 弘紀, 境 真由美, 二宮 秀彰, 岩田 仲生, 尾崎 紀夫, 服巻 保幸 (2007, 12/11-15)
統合失調症とグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子およびグルタミン合成酵素遺伝子 (*GAD2*, *GLUL*) の多型との関連解析.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
9. 鄧 湘東, 柴田 弘紀, 黒木 俊秀, 中原 辰雄, 橋本 喜二郎, 二宮英彰, 岩田 仲生, 尾崎 紀夫, 服巻 保幸 (2007, 12/11-15)
フェンシクリジン (PCP) 応答性遺伝子群を対象とした統合失調症感受性遺伝子の探索.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
10. 古谷博和, 王 麗香, 池添浩二, 吉良 潤一, 藤井 直樹, 服巻 保幸 (2007, 12/11-15)
activinA 受容体 1 遺伝子 (*ACVRI*) に新規ミスセンス変異を認めた進行性化骨性筋炎 (FOP) 症例.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
11. 渡邊 和典, 田中 邦佳, 後藤 大輝, 竹中 修, 服巻 保幸, 柴田 弘紀 (2007, 12/11-15)
イオンチャンネル型グルタミン酸受容体遺伝子群 14 種の上流調節領域の分子進化的解析.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
12. 金子 沙世, 柴田 篤志, 岩城 明子, 服巻 保幸 (2007, 12/11-15)
人工 miRNA を用いた遺伝子発現制御系の開発.
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜.
13. Deng, X., Sagata, N., Takeuchi, N., Tanaka, M., Shibata, H., Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, N., Fukumaki, Y. (2007, 10/7-11)
Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes *SLC1A4*, *SLC1A5* and the glycine transporter genes *SLC6A9*, *SLC6A5* with schizophrenia
The XVth World Congress of Psychiatric Genetics. New York, NY.
14. Shibata, H., Tanaka, K., Watanabe, K., Goto, H., Takenaka, O., Fukumaki, Y. (2007, 10/23-27)
Molecular evolutionary study of the ionotropic glutamate-receptor gene family as schizophrenia susceptibility genes: human-specific non-neutral pattern observed in *GRIN2B* upstream region.
57th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Diego, CA.