

[0021]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2006年

<https://doi.org/10.15017/15429>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 21, 2007-05. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



ゲノム構造学分野

Division of Genome Analysis

当部門は、ヒトゲノムの多様性解析をテーマとしてゲノムプロジェクト発足以来参画してきた。この多様性解析は「ポストシーケンス」時代のゲノム科学研究の主要なテーマのひとつであり、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、デザインブルな DNA ナノ構造体を作製する研究も行っている。

平成 18 年度の当分野の異動は以下の通りであった。4 月より官 彦雷が医学系大学院に入学した。平成 19 年 3 月に教授の林 健志が定年退官した。

A．ヒトゲノム多型マーカーの大規模解析

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。近年の技術革新により糖尿病・癌など多因子疾患の原因遺伝子をゲノムワイド関連解析により網羅的に探索することは現実的なものとなりつつある。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り、また利用できるマーカーも限定されるので詳細なマッピングのためにはこれを補う方法が必要である。我々が開発してきたキャピラリー電気泳動装置を利用した PLACE-SSCP 法はこの目的にかなうものである。本法は 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、プール解析による SNP アレル頻度の正確な算出に利用できる。これまでにこの方法をマルチキャピラリー電気泳動装置に応用するなどいくつかの改良を重ね、高精度化、ハイスループット化を実現してきた。

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 PLACE-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。このシステムは UNIX 上で稼動するリレーショナルデータベースを内装し、実験によるデータ収集工程の管理を行う dbQSNP conductor、得られた結果を web 上で公開する dbQSNP public (<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp>)、及び dbQSNP conductor から dbQSNP public へデータを移行するためのツールである Transfer Tool の 3 部が

らなる．さらにこのシステムは，米国 NCBI の公共データベースである GenBank 及び dbSNP のデータを自動的に取得し，それらに対し高速に Blast 検索を行うことで，公開データベース更新時に配列と最新の外部情報との関連を表示するような機能を実装している．この方法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た(<http://qsnip.gen.kyushu-u.ac.jp/>)．

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 上で独立に作動する SNP 同定，アレル頻度定量解析ソフトウェア「QSNPlite」を開発した．これは，「dbQSNP」と同様に SSCP 解析による SNP タイピング及びアレル頻度決定とシーケンシングによる SNP 配列の同定，確認を統合して行うものである．このソフトウェアを用いたアレル頻度が実測値と非常によく関連することを報告した．

b. 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は解析対象とする SNP の選択も重要である．そのためには日本人ゲノムの連鎖不平衡地図の情報が不可欠である．我々はゲノム創薬・治療薬分野の和氣教授らとの協力体制のもとに単一精子由来の胞状奇胎 74 試料の DNA を用いて約 28 万個の SNP をタイピングした．これにより得られた 74 セットの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た．また，関連解析を効率よく行うために tagSNP の選定を行った．これらの結果をデータベース「D-Haplo-DB」(<http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp>) に集約し，公開した．本年度は，さらに胞状奇胎 100 個を Affymetrix 500K SNP chip でタイピングし，既に公開しているハプロタイプ情報 (D1 phase) をより高精細にした (D2 phase)．D2 phase の tagSNP を用いることにより，未知 SNP (連鎖不平衡に用いてない SNP) の 80%を $r^2 > 0.8$ としてキャプチャーできる．HapMap 計画による推定ハプロタイプに誤りがないと仮定した場合，両者 (D-Haplo と HapMap) から選定された tagSNP セットの関連解析における検出力は，ほぼ同等であると推定された

B. 遺伝子の変異および多型と各種疾患との関連の解析

九州大学医学部病態修復内科との共同研究で自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子同定のために，PLACE-SSCP 法を利用して SNP のアレル頻度を患者群と対照群とで比較することによる関連解析を行った．候補遺伝子として，免疫系細胞のシグナル伝達系遺伝子群及びアポトーシス関連遺伝子群を選定し，それぞれの遺伝子領域から SNP を検出した．得られた SNP について患者，健常者それぞれ 100 名以上から作製したプール DNA におけるアレル頻度を PLACE-SSCP 法により算出した．これまでに，複数の遺伝子上の SNP が疾患と有意に関連することが見出された．最も強い関連を示したのは，タイプ I インターフェロン応答に関与する IRF5 遺伝子の SNP であった．この遺伝子周辺の SNP について日本・韓国・台湾の検体 (患者 809 人，健常

人 990 人) を用いてシーケンシングによる関連解析を行った結果, イントロン 1 にある rs2002420 が最も強い関連 ($p=1.4 \times 10^{-7}$) を示し, リスクアレル(T)によるオッズ比(OR)は 1.46 で西欧人集団での研究で最近報告された値とほぼ一致した。従って IRF5 は人類共通に SLE 易罹患性に関与していると考えられる。

医学部脳神経外科との共同研究では脳腫瘍抑制遺伝子を探索する目的で PLACE-SSCP 法を利用した。PLACE-SSCP 解析では SNP アレルの量比を正確に決定できる。そこでこの解析法を脳腫瘍組織での loss of heterozygosity (LOH) 解析に応用した。その結果, 正常組織が 70% を占めるような腫瘍組織でも LOH を的確に検出可能であることを明らかにし, グリオーマにおける高頻度 LOH 領域を決定した。

また, 福岡大学眼科との共同研究で眼科領域遺伝性疾患の発症機構を解明し, 治療・遺伝子診断に役立てるためにいくつかの疾患に対して遺伝子解析を行っている。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。Wnt シグナルは複数の経路を介して核内の標的遺伝子の発現を制御するが, これまで FEVR における変異により β カテニンと転写因子 LEF/TCF を介する古典的経路が阻害されることが報告されている。我々は変異の違いにより疾患重症度の相違が見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, 発症要因が複雑であることが示唆された。

C. 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。全長 cDNA にコードされる MIBP1 は 2437 アミノ酸からなる巨大な分子で, zinc フィンガーと呼ばれる DNA 結合ドメインを N 末側と C 末側の離れた 2 箇所に持つ。したがってこの蛋白質はゲノム上の 2 ヲ所に結合し, 結合した配列を引き寄せるという機能をもつのではないかと考えられる。MIBP1 と同じファミリーに属する他の因子は免疫応答などに関わる様々な遺伝子の調節領域に結合することが知られている, しかし MIBP1 による標的遺伝子発現の詳細な分子メカニズム, 及び, 脳で高い発現を示す生理学的意味は不明である。

in situ hybridization の解析で, MIBP1 は成体ラット脳の嗅球・大脳皮質・海馬・小脳で強く発現し, ニューロンで強く, グリアではほとんど見られなかったこと, ラット胎児では胎生 16 日目から 18 日目の細胞分裂が完了したニューロンからなる大脳の cortical plate で顕著に強く発現していたことから, MIBP1 は神経細胞の分化や維持に関与している可能性が示唆されている。また, 我々はマウス胚性腫細胞 P19 細胞においてレチノイン酸(RA)処理(神経細胞様に分化させるための処理)の 3 時間以内に MIBP1 mRNA 発現が誘導され, さらに分化後期まで発現が維持されることを見出している。これらの結果をふまえて, 神経分化における MIBP1 の役割を明らかにするために, MIBP1 の発現誘導が可能な P19 細胞株を樹立した。さらに, MIBP1 と相互作用するたんぱく質を免疫沈降法により同定した。

D. 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．我々は先ず，構造体を構成するオリゴヌクレオチド配列を，二段階のアルゴリズムで決定をするソフトウェアを開発した．第一段階は望ましい箇所でのみハイブリダイズする配列とその相補配列対の集合を選択するもので，全ての対合は一定の融解温度 (T_m) の範囲に収まるように選ぶ．第二段階で，相補配列対をデザインされた形に添うように割り当て，期待する二重鎖の T_m が十分高く，それ以外の全ての望ましくない対合の T_m が十分低くなるようにオリゴヌクレオチド配列を決定する．これに従ってオリゴヌクレオチドを設計・合成し，適切な緩衝液中で混合後，加熱・徐冷によりハイブリダイズさせ所定の構造を形成させアガロース電気泳動によって確認した．構造体の可視化，評価は原子間力顕微鏡により行った（生体分子計測研究所との共同研究）．昨年度から正三角形を基盤としたデザインシステムに特化したプログラムを開発してきたが，本年度はこれを改変した MAAMOT (Monoglyphic Almost Anything Made Of Triangles) という構想に基づき，効率的な構造体形成の条件を検討した．

業績目録

原著論文

1. Higasa K, Hayashi K. 2006.Periodicity of SNP distribution around transcription start sites. BMC Genomics, 7, 66
2. Qin M, Kondo H, Uno H, Fujiwara E, Uchino E, Tahira T, Hayashi K. 2006. Novel OPA1 mutations identified in Japanese pedigrees with optic atrophy. Molecular Vision, 12, 485-491.
3. Asakawa T, Nishi K, Mizuno R, Yoneda K, Okada T, Hayashi K. 2006. Build-to-order nanostructures using DNA self-assembly. Thin Solid Films. 509, 85 - 93.
4. Jespersgaard C, Larsen LA, Baba S, Kukita Y, Tahira T, Christiansen M, Vuust J, Hayashi K, Andersen PS. 2006. Optimization of capillary array electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for routine molecular diagnostics. Electrophoresis, 27, 3816-3822.
5. Tahira T, Okazaki Y, Miura K, Yoshinaga A, Masumoto K, Higasa K, Kukita Y, Hayashi K. 2006. QSNPlite, a software system for quantitative analysis of SNPs based on capillary array SSCP analysis.

- Electrophoresis, 27, 3869-3878.
6. Hata N, Shono T, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Kawamura T, Nagata S, Matsumoto K, Hayashi K, Iwaki T, Sasaki T. 2006.
An astroblastoma case associated with loss of heterozygosity on chromosome 9p.
J Neurooncol. 80, 69-73.
 7. Higasa K, Miyatake K, Kukita Y, Tahira T, Hayashi K. 2007.
D-HaploDB: a database of definitive haplotypes determined by genotyping complete hydatidiform mole samples.
Nucleic Acids Res. 35, D685-689.
 8. Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Kukita Y, Nakamura S, Yao T, Hayashi K, Iida M. 2007.
Impact of Phospholipase A2 Group IIa Gene Polymorphism on Phenotypic Features of Patients with Familial Adenomatous Polyposis.
Dis Colon Rectum. 50, 223-231.
 9. Kondo H, Qin M, Kusaka S, Tahira T, Hasebe H, Hayashi H, Uchio E, Hayashi K. 2007.
Novel mutations in Norrie disease gene in Japanese patients with Norrie disease and familial exudative vitreoretinopathy.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 48, 1276-1282.
 10. 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. in press

総説

1. 林 健志, 2006.
メンデルから DNA を経てゲノムへ
バイオ研究マスターシリーズ「遺伝子工学集中マスター」, 羊土社, 14-30.

学会発表

1. 田平知子, 坂口大志, 塚本 浩, 堀内孝彦, 林 健志 (2006, 4/23-26)
全身性エリテマトーデス(SLE)疾患感受性遺伝子の解析
第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 長崎
2. 水野里香, 春田洋孝, 杉山幸宏, 森居隆史, 岡田孝夫, 浅川剛, 林 健志 (2006, 8/31)
DNA ナノチューブ構造体の温度変化 AFM 観察による熱安定性評価
第 67 回応用物理学会学術講演会秋季大会, 滋賀
3. 堤 孝信, 浅川 剛, 水野里香, 春田洋孝, 岡田孝夫 (2006, 12/6-12/8)
DNA/RNAを用いた革新的ナノ構造体の作製
日本分子学会2006フォーラム, 名古屋
4. Hayashi K. (2006, 9/14)
D-haplo: a genome-wide definitive haplotype determined using complete hydatidiform moles.

The 8th international meeting on human genome variation and complex genome analysis, Hong Kong, SAR, China (Invited)

5. Higasa K, Hayashi K. (2006, 9/14-16)

Periodicity of SNP distribution around transcription start sites.

The 8th international meeting on human genome variation and complex genome analysis, Hong Kong, SAR, China

6. Miyatake K, Kukita Y, Higasa K, Wake N, Hirakawa T, Kato H, Matsuda T, Tahira T, Hayashi K. (2006, 9/14-16)

The power of definitive haplotypes in association studies.

The 8th international meeting on human genome variation and complex genome analysis, Hong Kong, SAR, China

7. Tahira T, Masumoto K, Okazaki Y, Yoshinaga A, Higasa K, Kukita Y, Hayashi K. (2006, 9/14-16)

Precise estimation of allele frequencies in pooled DNA based on capillary array SSCP analysis.

The 8th international meeting on human genome variation and complex genome analysis, Hong Kong, SAR, China

8. Hayashi K, Masumoto K, Okazaki Y, Yoshinaga A, Higasa K, Kukita Y, Tahira T. (2006, 10/9-13)

Capillary array SSCP analysis of pooled DNA for association testings.

56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, USA

9. Tahira T, Horiuchi T, Sakaguchi D, Yamai M, Miyagawa H, Tsukamoto H, Hayashi K. (2006, 10/9-13)

Analysis of genes affecting susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE)

56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, New Orleans, USA

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。

2006 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 年として長崎大学出身の渡邊 和典、九州大学理学部 4 年生の蔭山 瑠衣、金子 沙世、および技術補助員の新道 真由美であった。10 月には助手であった柴田 弘紀が助教授に昇任した。

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、機能ゲノム学的および発生工学的アプローチをとっている。

a. 罹患同胞対解析

先に JSSLG (Japanese Schizophrenia Sip-pair Linkage Group) による第一回目の罹患同胞対解析において 1q23.3, 2q36.3, 3q23, 4q23, 5q33.1, 8p12, 9q21.1-21.2, 9q21.31, 14q23.1, 17q12, 20q11.2 に $p < 0.05$ と連鎖傾向を示す領域を見いだした。この中で諸外国からの報告と一致する 5q33.1 を選択し、この 5.7 Mb 領域に存在する 43 個の遺伝子につき、連鎖不平衡を考慮して選択した SNP についてタイピングを行った。有意差が見られた SNP についてサンプル数を追加しさらに解析を行ったところ、遺伝子型・アレル頻度で 1 遺伝子、ハプロタイプ頻度において 1 遺伝子、それぞれ疾患との有意な関連が認められた。しかしタイ人集団を用いた解析では有意差は認められず、日本人集団特異的な疾患感受性遺伝子の可能性が考えられた。

b. 関連解析

(1) 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群の体系的な関連解析を行っている。本年度はカイニン酸受容体遺伝子 *GRIK3*, *GRIK4* および *GRIK5* と統合失調症との関連解析を報告した。我々は上記遺伝子につきそれぞれの遺伝子のサイズ (240 kb, 430 kb, 90kb) に応じ 16, 24 そしての 5 個の MAF 0.1 以上 SNP を選択した。ケース、コントロール群のタイピングを行いゲノタイプ、アレル頻度における両群間での有意差を検定したが、*GRIK3* の 1 個の SNP 以外では有意差は認められなかった。しかしこの SNP の示す有意差も、Bonferroni 補正により消失した。またペアワイズハプロタイプの関連解析では *GRIK3* で 7 つの、*GRIK4* で 4 つのペアワイズハプロタイプで両群間での有意差が見られた。しかしこれらも Bonferroni 補正により消失した。また別サンプルセットを用いた解析でも、補正前の有意差は再現されなかった。以上から *GRIK3*, *GRIK4* および *GRIK5* は日本人の統合失調症への主要な

関与はないものと結論した。

以上に加え、*EAT3*、*EAT1* および *EAT4* をそれぞれコードする 3 つのグルタミン酸トランスポーター遺伝子 *SLC1A1*、*SLC1A3* そして *SLC1A6* の関連解析を行った。まず 3 遺伝子領域につき 25 個の SNP を設定し 100 ペアのケース・コントロール群の検体を用いてタイピングを行った。False Discovery Rate による多重検定の補正後において *SLC1A1*、*SLC1A3* については関連が認められなかったが、*SLC1A6* の SNP4 の遺伝子型について、またハプロタイプ SNP2-SNP5、SNP3-SNP5 の分布について有意差が認められた。これらの SNP について検体数を増やし罹患群 400、健常群 420 について関連解析を行ったところ、SNP2-SNP5 について有意差が見られた。以上から *SLC1A6* については日本人において統合失調症の発症に関わっているが、*SLC1A1*、*SLC1A3* については主要な関与はないものと結論した。

(2) ゲノムワイド関連解析: 先の罹患同胞対解析から効果の弱い遺伝子の関与が示唆された。このような遺伝子の検出には関連解析が有力であることから (Risch, 2000)、九州大学生体防御医学研究所 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、ゲノムワイドな関連解析を行っている。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につき、プールした 1 次サンプル (罹患群、健常群の 157 検体ペア) を用いた関連解析を行った。その結果、合計 28,095 個のマーカーについてデータが得られ、その中で有意差 ($P < 0.05$) が認められるマーカー数は 2,966 個 (10.6%) であった。これらのマーカーにつきプールした 2 次サンプル (罹患群、健常群の 150 検体ペア) で同様の解析を行い、1,019 個のマーカーについて有意差を認めた。これらのマーカーにつきプールした 3 次サンプル (罹患群、健常群の 150 検体ペア) を用いた解析を行い、1,014 個のマーカー中 352 個 (34.7%) につき有意差を認めた。現在陽性マイクロサテライトマーカー周辺の TagSNP を選択し、1 次、2 次、3 次サンプルを集積した症例、健常群 450 ペアのタイピングを行い、疾患感受性遺伝子の同定を進めるべく、準備中である。

c. 精神作用薬応答遺伝子群の探索

NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである PCP は統合失調症様症状を引き起こすことが知られている。PCP 投与 (5 mg/kg) 1 時間および 4 時間後のラットの大脳の 5 部位 (内側前頭皮質、側坐核、線条体、海馬、後帯状皮質) から、マイクロアレイ (Agilent Technologies, G4105A) を用いて生食投与群に比べ 1.5 倍以上の変化を来す 90 種類の遺伝子を見出した。その中で 2.0 倍以上の変化を来す 12 種類の遺伝子を定量的 RT-PCR 法により確認した。現在それらについてのローカスワイド関連解析を行いほぼ 5 個の遺伝子について終了し、そのうち 2 個について関連を見出している。

d. 変異マウスの作製

先に関連を報告した *GRIA4* についてノックアウトマウスを作出し、海馬スライスを用いて PPF、LTP を解析した。Adult ではいずれも野生型と有意な差は認められなかった。*GRIA4* の発現が高いことが知られている出生 3 日目 (P3) において PPF は見られなかったが、野生型に比べ同一刺激強度による応答が増強していた。行動解析のために戻し交配を 6 世代まで完了し、現在行動解析のために繁殖中である。

B. 遺伝性脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) の分子機構の解明

遺伝性脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) は九州大学神経内科によって見出された常染色体優性遺伝形式をとる緩徐進行性の中樞神経の変性症である。4 世代にわたる家系を対象に 776 個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに連鎖解析を行ったところ、3p26.2-pter の 3.3 Mb の領域に連鎖が認められた (MLS 5.18)。ついでこの領域に存在する 7 個の遺伝子のエクソン、およびエクソン-イントロン領域について変異検索を行った。その結果、コンタクチン 4 遺伝子 (*CNTN4*) に家系内の罹患者全員が有し、健常者 520 名には存在しない 1 変異を見出した。この変異の遺伝子発現への関わりと、コンタクチン 4 の機能を明らかにするために、現在、変異の機能解析とコンタクチン 4 の変異マウスの作出を行っている。

C. Pelizaeus-Merzbacher 病の病因解析

中樞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。今年度はエピジェネティックな発現制御の観点から新たな病因を探る目的で *PLP1* の 5' 上流域のメチル化状態を調べ、不活性化 X 染色体の指標となりうる CpG サイトを見出した。

D. 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すすめている。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 種について該当配列を決定することで、41 個のアミノ酸置換はヒト-チンパンジー分岐後にヒト側で起きていたことを明らかにした。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 50 検体チンパンジー 50 検体を用いて各グルタミン酸受容体遺伝子の全変異検出と分子進化的解析を進めている。

業績目録

原著論文

1. Shibata, H., Aramaki, T., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, O., and Fukumaki, Y. 2006.
Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (*GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*) with schizophrenia.
Psychiatry Res. 141, 39-51.
2. Miura, S., Shibata, H., Furuya, H., Ohyagi, Y., Osoegawa, M., Miyoshi, Y., Matsunaga, H., Shibata, A., Matsumoto, N., Iwaki, A., Taniwaki, T., Kikuchi, H., Kira, J. and Fukumaki, Y. 2006.

The contactin 4 gene locus at 3p26 is a candidate gene of SCA16.

Neurology. 67, 1236-1241.

3. Furuya, H., Yamada, T., Ikezoe, K., Ohyagi, Y., Fukumaki, Y. and Fujii, N. 2006.

An improved method for Southern DNA and Northern RNA blotting using a Mupid-2 Mini-Gel electrophoresis unit.

J. Biochem. Biophys. Methods. 68, 139-143.

4. 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 *SLC1A1*, *SLC1A3* and *SLC1A6* with schizophrenia.

Am. J. Med. Genet. 144B, 271-278.

5. 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.

6. Shibata, A., Iwaki, A. and Fukumaki, Y. 2007.

A novel expression system for artificial miRNA containing no endogenous miRNA precursor sequences. Journal of RNAi and Gene Silencing in press.

総説

1. 服巻 保幸. 2006.

グルタミン酸受容体遺伝子のポリモルフィズム

CLINICAL NEUROSCIENCE 24: 210-214.

2. 服巻 保幸. 2006.

統合失調症関連遺伝子

ゲノム医科学 NOW (ゲノム4領域編) pp.195-211.

クバプロ

3. 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. 三浦 史郎, 柴田 弘紀, 大八木 保政, 古谷 博和, 谷脇 考恭, 吉良 潤一, 服巻 保幸 (5/11-13, 2006)

脊髄小脳変性症 16 型(SCA16)の責任遺伝子は 3p26.2-pter に連鎖する.

第 47 回日本神経学会総会, 東京.

2. Deng, X., Takeuchi, N., Shibata, H., Rachi, S., Sakai, M., Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, N. and Fukumaki, Y. (2006, 6/18-23)

Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes, *SLC1A1*, *SLC1A3*, *SLC1A6* and the neutral amino acid transporter genes *SLC1A4*, *SLC1A5* with schizophrenia.

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan.

3. Shibata, H., Goto, H., Takaji, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Jarusuraisin, N. and Fukumaki, Y. (2006, 8/5-10)
Locus-wide association study of schizophrenia with 43 genes located in the 5q33.1 region.
11th International Congress of Human Genetics, Brisbane, Australia.
4. Furuya, H., Shigeto, H., Ohyagi, Y., Kira, J., Iwaki, A. and Fukumaki, Y. (2006, 9/12-14)
Unverricht-Lundborg disease with shorter repeats expansion diagnosed by real time-PCR(qRT-PCR)
The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Chiba.
5. Shibata, H., Goto, H., Takaji, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Jarusuraisin, N. and Fukumaki, Y. (2006, 9/14-16)
Locus-wide association study of 43 genes in the 5q33.1 region with schizophrenia.
The 8th International Meeting on Human Genome Variation and Complex Genome Analysis, Hong Kong, China.
6. 竹内 尚子, トウ 湘東, 柴田 弘紀, 良知 姿子, 境 真由美, 二宮 英彰, 田代 信維, 岩田 伸生, 尾崎 紀夫, 服巻 保幸(2006, 10/17-20)
グルタミン酸および中性アミノ酸トランスポーター遺伝子群と統合失調症との関連解析.
第51回日本人類遺伝学会大会, 米子.
7. Fukumaki, Y., Goto, H., Shibata, H., Takaji, M., Ninomiya, N., Tashiro, N. and Jarusuraisin, N. (2006, 10/28-11/1)
Locus-wide association study of genes in the 5q33.1 region with schizophrenia.
The XIVth World Congress of Psychiatric Genetics, Cagliari, Italy.
8. 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, 柴田 弘紀 (2006, 12/6-8)
グルタミン酸受容体遺伝子群におけるヒト特異的アミノ酸置換の同定と上流領域の分子進化的解析.
分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋.
9. 新井 伸作, 柴田 弘紀, 境 真由美, 高司 雅史, 小島 理恵子, 菊田 るみこ, 二宮 英彰, 服巻 保幸 (2006, 12/6-8)
AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR1, GluR2 遺伝子 (GRIA1, GRIA2) の多型と統合失調症との関連解析.
分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋.
10. 古谷 博和, 池添 浩二, 服巻 保幸, 藤井 直樹 (2006, 12/6-8)
Mupid を用いた Southern DNA, Northern RNA プロテイング法の改良.
分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋.
11. 松本直樹, 服巻保幸, 岩城明子 (2006, 12/6-8)
Pelizaeus-Merzbacher病におけるエピジェネティクスに関連した病因の検討.
分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋.
12. Fukumaki, Y., Makino, C., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Shibata, H. (2007, 3/24-25)
Identification of single nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, *GRIN2D*, and association study with schizophrenia.
第2回統合失調症学会, 富山.