

Y染色体の多様性に関連した肥満・糖尿病の遺伝的要因の研究

●中堀 豊 ◆新家 利一

徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野

〈研究の目的と進め方〉

我々はY染色体の構造の多様性と男性の表現型の関連に興味を抱いてきた。これまで一連の研究において、日本人集団において異なったハプロタイプを持つY染色体のタイプが精子数と関連すること、また男性不妊症の重要な原因の一つである無精子症と関連することを見出した。この研究の過程で、Y染色体上に肥満・糖尿病に関連する遺伝子が存在することを示唆する予備的な結果を得た。本研究では日本人集団でY染色体上のSNPsや他のDNAマーカーを収集し、その解析により、肥満・糖尿病関連遺伝子または遺伝子群を同定することを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

Y染色体上の遺伝子発現制御領域及びエクソンを中心にプライマーを設定し、SSCP (single strand conformation polymorphism) やDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 法を中心にSNPsを収集する。遺伝子発現制御領域で見出された多型については、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子活性を利用した手法によって、その意義の検索を行う。また翻訳領域に見出された塩基置換に関してはこの遺伝子変異をもつcDNAを合成し、発現ベクターにクローニング後培養細胞へ導入する。その後、細胞よりmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイまたはdifferential display法などを用いて、正常cDNAを導入した場合との遺伝子発現プロファイリングの比較を行う。

また近年、小児の生活習慣病が社会問題化しており、我々は現在この問題に取り組むべく、関連機関との連携を進めている。遺伝学的背景と生活習慣の双方から小児肥満・糖尿病の発症のメカニズムを検討するための基本となる、小児の体格・生活習慣の疫学的な調査も併せて行っていく。

〈研究期間の成果〉

合計100種類上のプライマーセットを用いて、Y染色体上の遺伝子発現制御領域及びエクソンより新規のSNP素を行い、日本人集団において新規に4種類のSNPを見出した。このうちTB4Y遺伝子のプロモーター領域に見出したT-910C多型については、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて転写活性の違いを検索したが、多型による明らかな転写活性の違いは認められなかった。他の3つの新規SNPはTBL1Y遺伝子において見出された。一つはアミノ酸置換を伴うSNPであり [G268C (Asp90His)]、他の2つはイントロンに存在していた [IVS7+1G>C、IVS7+9G>A]。これらの多型はいずれもY染色体ハプログループO3(xO3e)で見出され、これらのうちの2種類が同時に存在するY染色体は見出されなかった(3)。これらは今後Y染色体の遺伝的多様性と男性表現型の関連解析を行う上で、有用なSNPであると推察された。またY染色体上のSNPのスクリーニングと並行して、マイクロチップ電気泳動法などを用いた迅速な多型タイピングの方法を開発した (1, 2, 5, 7, 10)

Y染色体構造の多様性の解析のために新たなる多型マーカーの探索を行った (6, 8, 11)。この過程で福井医科大学の松木教授らとの研究によってY染色体長腕の無精子症候補領域の一つAZFcより、新たにマイクロサテライトマーカーYfm1を見出し、これを用いて日本人集団におけるY染色体の遺伝的多様性の検討を行った。Yfm1は解析の結果、AZFc領域に複数コピーが存在することが明らかとなった (6, 8)。日本人集団のY染色体を解析した結果、YAP (Y chromosome insertion polymorphism)を持つY染色体でYfm1のコピー数が少ないことが明らかとなった。さらに、Yfm1がDAZ1遺伝子の近傍に存在することから、YAPを持つY染色体ではDAZ遺伝子のコピー数が減少していると予想した(6, 8)。またこのタイプのY染色体は以前に我々が遺伝疫学的研究によって精子数が他のグループより少ないことを明らかにしたY染色体であり (Kuroki et al, 1999)、AZFc領域の構造の違いが精子数に関連している可能性を提案した(6, 8)。これについては2003年にReppingら (Repping et al, Nature Genet.2003)によってFISHや大規模な塩基配列の決定などのゲノム解析を用いた解析がなされた。その結果、実際に日本人Y染色体でYAPをもつタイプのものはAZFc領域に部分欠失を持ち、確かにDAZ遺伝子などAZFc領域に複数コピーをなして存在する遺伝子のコピー数が少ないことが明らかになった。

徳島県医師会の学校医部会の中に小児生活習慣病対策委員会が設立された。これによって徳島県下7万人の小中学生の体格調査が毎年可能となり、全国との比較や肥満判定方の検討など、肥満に関する様々な解析が可能となった (12)。この実績を踏まえて、ごく最近、徳島県において、研究代表者を会長として「みんなでつろう!健康とくしま県民会議」が発足した。徳島県はここ数年連続で糖尿病死亡率が日本一であり、生活習慣病対策がまさに県民全体の課題となっている。これまでの地道な活動によって、将来的な生活習慣病発症要因の総合的解析のための基礎となる関連機関との関係構築が出来た。

〈国内外での成果の位置づけ〉

Y染色体の遺伝的多様性と男性表現型に関する論文は、Nature Genetics等の国際的に高い評価を受けている雑誌の原著論文や総説に引用されている (8, 9)。特に、Y染色体のタイプによってY構造の違いがあり、これが精子数などの男性の表現型に重要であるとの我々の指摘は高く評価されており、この分野の研究に大きく貢献できたと思われる。

我々の日本人Y染色体の遺伝的多様性に関する研究は韓国でも高い評価を受け、その後韓国とのグループの共同研究により韓国人集団の遺伝的多様性の解析にも貢献している (4)

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Y染色体は反復配列が多く存在すること、またX-Y相同領域については、Y染色体特異的プライマーの設計が困

難な場合も多かった。単一コピー遺伝子の遺伝子解析に関しては、結果的には予想より多型性が少なかった。これらの要因により、Y染色体上のSNP探索が当初の予想より難しかった。

本研究期間中に国際的な組織であるY染色体コンソーシアム (YCC) が様々な人種や民族の標準的なY染色体ハプログループを公開し、以降Y染色体多型に関する成果の公表についてはこのYハプログループとの整合が求められるようになった。我々が既に分類していたY染色体のタイプをこの標準的Y染色体ハプログループに位置づけるために、さらに多型解析を追加して行わなければならなかった。

独自のフィールドをもって遺伝疫学的な研究を行うためには、医師会、行政各機関との信頼関係の構築が極めて重要である。この信頼関係構築のためには大変な時間と労力を要するが、実際に我々も多大の時間と労力を要した。

〈今後の課題〉

Y染色体が詳細に分類できるようになり、これに基づいて、Y染色体の遺伝的多様性と様々な男性表現型との関連解析が出来る基盤がようやく整った。今後、規模の大きな研究によってY染色体の遺伝的多様性と男性表現型の関連を解析していく必要がある。

小児生活習慣病対策委員会も軌道に乗り、小児肥満・糖尿病に関する疫学的研究の基礎が出来あがった。このシステムを有意義に活用することで、将来的には遺伝と生活習慣 (環境要因) の双方から小児肥満・糖尿病の原因を総合的に解析していく必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. Jabasini M, Ewis AA, Xu F, Ping G, Fouad M, Shinka T, Nakahori Y, Ishikawa M, Baba Y. Ultrafast diagnosis of the genetic-related disorders using the combined technologies of multiplex PCR and multichannel microchip electrophoresis. *Anal Sci.*, 21(12): 1537-9 (2005).
2. Jabasini M, Ewis AA, Xu F, Mohamadi MR, Ping G, Shinka T, Nakahori Y, Baba Y. Multiplex PCR with multichannel microchip electrophoresis: an ultrafast analysis for genetic diseases. *J Chromatogr Sci.*, 43(5):221-5 (2005).
3. Yan HT, Shinka T, Kinoshita K, Sato Y, Umeno M, Chen G, Tsuji K, Unemi Y, Yang XJ, Iwamoto T, Nakahori Y. Molecular analysis of TBL1Y, a Y-linked homologue of TBL1X related with X-linked late-onset sensorineural deafness. *J Hum Genet.*, 50(4):175-81 (2005)
4. Jin HJ, Kwak KD, Hammer MF, Nakahori Y, Shinka T, Lee JW, Jin F, Jia X, Tyler-Smith C, Kim W. Y-chromosomal DNA haplogroups and their implications for the dual origins of the Koreans. *Hum Genet.*, 114(1):27-35 (2003).
5. Jabasini M, Xu F, Dang F, Shinka T, Nakahori Y, Baba Y. Range of separation of potential tool for bioseparation, microchip electrophoresis system, for DNA polymorphisms on the human Y-chromosome. *Anal Sci.*, 19(1):175-6 (2003).
6. Ewis AA, Lee JW, Kuroki Y, Shinka T, Nakahori Y. Yfml, a multicopy marker specific for the Y chromosome and beneficial for forensic, population, genetic, and spermatogenesis-related studies. *J Hum Genet.*, 47(10):523-8 (2002).

7. Jabasini M, Zhang L, Dang F, Xu F, Almoftli MR, Ewis AA, Lee J, Nakahori Y, Baba Y. Analysis of DNA polymorphisms on the human Y-chromosome by microchip electrophoresis. *Electrophoresis.*, 23(10):1537-42 (2002)
8. Ewis AA, Lee J, Shinka T, Nakahori Y. Microdeletions of a Y-specific marker, Yfml, and implications for a role in spermatogenesis. *J Hum Genet.*, 47(5):257-61 (2002).
9. Ewis AA, Lee J, Naroda T, Sasahara K, Sano T, Kagawa S, Iwamoto T, Nakahori Y. Linkage between prostate cancer incidence and different alleles of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *J Med Invest.*, 49(1-2):56-60 (2002).
10. Shinka T, Naroda T, Tamura T, Sasahara K, Nakahori Y. A rapid and simple method for sex identification by heteroduplex analysis, using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *J Hum Genet.*, 46(5):263-6 (2001).
11. Lee J, Kotliarova SE, Ewis AA, Hida A, Shinka T, Kuroki Y, Tokunaga K, Nakahori Y. Y chromosome compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266, and DXYS241. *J Hum Genet.*, 46(2):80-4 (2001).
12. 田中久子、笹原賢司、勢井雅子、新家利一、石本寛子、津田芳見、中堀豊、徳島県における小中学校の児童生徒体格の集計 (平成12年度データ)、日本公衆衛生学会誌、50 (3): 234-245, 2003

2) その他

中堀 豊：Y染色体からみた日本人、岩波科学ライブラリー、2005年9月、岩波書店