

マイクロサテライトを用いた疾患関連遺伝子探索

●猪子 英俊¹⁾ ◆間野 修平²⁾

1) 東海大学医学部 2) 名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

急速なヒトゲノムの配列、多型情報の蓄積により、生活習慣病などの多因子性疾患の感受性遺伝子のポジショナルクローニングによる同定への期待が高まっている。我々は、リウマチについて3万個のマイクロサテライトを用いた世界初のゲノムワイドな相関解析を進め、47個の感受性遺伝子候補領域(約100 kb)を同定し、さらにそれらの領域より7個の感受性遺伝子を見出した。我々の本解析の検出力は40%であり、他に遺伝的な寄与が小さい遺伝子を含めれば、おそらく100個以上の感受性遺伝子の存在が予想される。したがって、発症の分子機構解明のためには、そのような多くの疾患感受性遺伝子について、それぞれの機能を解析するという、気の遠くなる膨大な作業も遂行しなければならない。

そこで本研究は、1) 疾患感受性遺伝子の同定：生活習慣病などの疾患の感受性遺伝子を数多く同定する。そのため、pooled DNA法の導入、独立な4回の相関解析の実施、実際のデータにもとづく検出力の評価、及び連鎖不平衡(LD: linkage disequilibrium)すなわち遺伝的距離にもとづくマイクロサテライトの評価を行う、2) 遺伝疫学的解析：疾患について集団遺伝学にもとづく遺伝疫学的解析法を駆使して、遺伝的、環境的要因を見いだすことにより、多因子性疾患の感受性遺伝子の数と遺伝的寄与の様式を明らかにし、効率的にマッピングする方法を構築する、3) ネットワーク解析：同定された感受性遺伝子の情報をもとに、遺伝的要因から発症にいたるネットワークをパスウェイ回路として明らかにすることにより、煩雑な機能解析なしに疾患発症の分子機構を解明して、効率的なゲノム創薬に資すること、を目的とする。

＜2008年度の研究の当初計画＞

(1) ゲノムワイドの遺伝的相関解析にもとづいて同定した疾患感受性遺伝子の個体での検証と遺伝子機能の解析

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基づいて同定した多数の疾患感受性遺伝子中、関節リウマチ感受性遺伝子NFKBIL1、及び、高血圧感受性遺伝子LPIN1を主な対象とし、モデル動物(マウス)を用いて、遺伝子と疾患の関係を検証する。さらに、機能未知であるNFKBIL1については、その機能を探索する。

(2) 疾患感受性遺伝子の機能解析基盤技術としての酵母Two Hybrid (YTH)法の再検討・再構築

酵母Two Hybrid (YTH)法は相互作用因子同定による遺伝子機能解析の主要な基盤の一つである。このYTH法に関して、システムの個々の構成因子と、その組み合わせを系統的に比較・検討するとともに、新たなコンセプトによるスクリーニング法を組み入れ、より信頼性・効率にすぐれたシステムを構築する。

＜2008年度の成果＞

(1) ゲノムワイドの遺伝的相関解析にもとづいて同定した疾患感受性遺伝子の個体での検証と遺伝子機能の解析

・LPIN1

我々が高血圧感受性遺伝子として同定したLPIN1は、マウスではlipodystrophy原因遺伝子として知られるが、血圧との関係は不明である。そこで、LPIN1変異マウスを用いて血圧、及び、脈拍を測定したところ、変異マウスで顕著な血圧の上昇が観察され、LPIN1がマウス個体でも血圧の調節に関与することが示さ

れた。また、ヒトを対象としても、QTL解析の結果、Lpin1の血圧への効果を示す結果を得ている。

・NFKBIL1

関節リウマチ感受性遺伝子NFKBIL1のトランスジェニックマウスを作成し、このマウスでは、コラーゲン誘導性関節炎の発症が抑制されることが見出した。また、NFKBIL1が非古典的NF κ Bシグナル伝達系の特異的な抑制因子であり、物理的にも、NFKB2やRelBタンパクと相互作用すること、さらに、この相互作用が、非古典的NF κ Bシグナル伝達系の誘導に依存することを示した。従って、NFKBIL1は、非古典的NF κ Bシグナル伝達系を抑制することによって、リウマチ抑制因子として機能していると考えられる。

・その他

我々のゲノムワイドマイクロサテライト遺伝解析の結果同定された疾患感受性遺伝子中、HLA-DRB1(関節リウマチ)、HLA-C(尋常性乾癬)については、既に、ヒト個体における疾患との関連が確立している。さらに、2型糖尿病感受性遺伝子として同定したタンパクリン酸化酵素については、動物モデルにおいて、発症への関与が示されている。

(2) 疾患感受性遺伝子の機能解析基盤技術としての酵母Two Hybrid (YTH)法の再検討・再構築

YTHスクリーニングの正否の鍵となる「真の陽性と擬陽性の判別」に関して、蛍光タグを利用した新たなコンセプトによる直接的判別システムを構築し、YTH法に組み入れた。この新規YTH法を、相互作用因子が未知の高血圧感受性遺伝子SMOC2に適用し、277のYTH相互作用因子を同定した。これら277因子のネットワーク解析の結果、SMOC2を中心とした23の細胞外/細胞外基質因子、或いは、SMOC2類似因子より成る密な相互作用ネットワークを抽出することができた。

蛍光タグを利用した陽性判別法に加えて、YTH法を構成する構成因子(ベイト、プレイ、及び、リポーター)と、その組み合わせの再検討を系統的に行い、新規システムを新たに再構築した。このシステムでは、必要に応じてダイマー、或いは、モノマーDNA結合ドメインをベイトに使用することが可能で、また、1次コロニーの段階で、ベイト・プレイ依存性を直接的、且つ、明確に判定することができる。

＜国内外での成果の位置づけ＞

世界的にも類をみない「マイクロサテライトマーカーを基盤とするゲノムワイド遺伝解析」の結果同定した疾患感受性遺伝子について、個体での検証を行った。現在までに、我々自身で検証を行ったLPIN1、NFKIL1以外に、HLA-DRB1(関節リウマチ)、HLA-C(尋常性乾癬)、糖尿病感受性タンパクリン酸化酵素遺伝子について、個体での疾患との関連が確立されている。他の感受性遺伝子についても、個体レベルでの検証を行い、広範に行われているSNP GWASに対する、補完性、代替性を検討する計画である。

NFKBIL1については、免疫反応等に広範に機能するNF κ B伝達系の新たな阻害因子であることを、世界に先駆けて示すことができた。阻害効果が非古典的NF κ Bシグナル伝達系に特異的な点、及び、阻害効果がシグナル伝達系誘導時にのみ有効になる点特徴的であり、新しいタイプのNF κ B阻害因子として注目される。

酵母 Two Hybrid 法に関しては、ハイスループット解析が多数報告されているが、擬陽性判定の信頼性など、そのシステムの問題点も指摘されて来た。実際、SMOC2 YTH 相互作用因子中、1/3は既に他研究室でYTHベイトとして使用されたものである。それらの解析でSMOC2が相互作用因子として同定された例は皆無で、一般的なYTH法における深刻な偽陽性“誤”判定の問題が明らかであるが、我々の蛍光タグシステムは、この問題点を解決するものである。さらに、蛍光タグシステム以外にも、各構成因子の再検討に基づくシステム再構築を行うことによって、従来法に比較して、高感度、高効率、且つ、信頼性の高いスクリーニング系を確立する基盤を確立しており、相互作用因子解析における新システムの広範な有用性が見込まれる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

一部の疾患感受性領域については、これまでのところ高度に有意なSNPが近傍に同定されていない。マイクロサテライト多型そのものが効果を及ぼしている可能性や、SNP以外の多型の可能性等を、より網羅的な解析によって明らかにする必要がある。

YTH法については、個々の構成因子とその組み合わせの検討から、場合によっては想定外の組み合わせ効果の可能性が判明し、これら想定外の組み合わせ効果の検証と、その知見を新YTHシステムに反映させるための予定外の作業が加わった。

<今後の課題>

既に個体レベルで検証された疾患感受性遺伝子については、疾患メカニズム解明や、新たな治療戦略の構築に向けた取り組みが求められる。HLA遺伝子や、糖尿病感受性リン酸化酵素等については、既に、In Silicoドラッグデザインを根幹とした創薬アプローチを進行中である。

他の疾患感受性遺伝子については、個体レベルでの検証が当面の課題であり、ENU変異マウススクリーニングを中心に、変異個体の同定を進めている。

我々が独自にNF κ B伝達系の阻害因子であることを見出したNFBKIL1については、阻害分子機構の解明と、個体レベルでのNFBKIL1機能の詳細な解析が課題である。前者については、NFBKIL1とNF κ B因子の直接的相互作用によるDNA結合への阻害効果を解析中である。後者については、KOマウスを作成し、主として免疫系に対する影響を検討している。

YTH法については、ベイト・プレイ・リポーターの各々の構成因子の再検討とシステム再構築をほぼ完了した段階にあり、従来法との定量的な比較、ハイスループット解析に向けた戦略の確立、及び、ネットワーク解析の定式化が課題であり、これを用いた疾患感受性遺伝子の相互作用解析を進める計画である。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0901131601
Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H: A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum Genet* 123: 297-306 (2008)
- 2.0901131614
Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 67: 725-727 (2008)
3. 0901131617
Ohtsuka M, Inoko H, Kulski JK, Yoshimura S: Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics* 9:178-192 (2008)
4. 0901131621
Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I Inoko H: Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet* 123: 655-660 (2008)

5. 0901131637
Ando A, Uenishi H, Kawata H, Tanaka-Matsuda M, Shigenari A, Flori L, Chardon P, Lunney JK, Kulski JK, Inoko H: Microsatellite diversity and crossover regions within homozygous and heterozygous SLA haplotypes of different pig breeds. *Immunogenetics* 60: 399-407 (2008)
6. 0901131643
Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutiérrez E, Blow MJ, Bronner-Fraser M, Brunet F, Butts T, Candiani S, Dishaw LJ, Ferrier DE, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Gissi C, Godzik A, Hallböök F, Hirose D, Hosomichi K, Ikuta T, Inoko H, Kasahara M, Kasamatsu J, Kawashima T, Kimura A, Kobayashi M, Kozmik Z, Kubokawa K, Laudet V, Litman GW, McHardy AC, Meulemans D, Nonaka M, Olinski RP, Pancer Z, Pennacchio LA, Pestarino M, Rast JP, Rigoutsos I, Robinson-Rechavi M, Roch G, Saiga H, Sasakura Y, Satake M, Satou Y, Schubert M, Sherwood N, Shiina T, Takatori N, Tello J, Vopalensky P, Wada S, Xu A, Ye Y, Yoshida K, Yoshizaki F, Yu JK, Zhang Q, Zmasek CM, de Jong PJ, Osoegawa K, Putnam NH, Rokhsar DS, Satoh N, Holland PW: The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res* 18: 1100-1111 (2008)
7. 0901131646
Shibuya E, Meguro A, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4453-4457 (2008)
8. 0901131648
Kulski JK, Shigenari A, Shiina S, Ota M, Hosomichi K, James I, Inoko H: Human endogenous retrovirus (HERVK9) structural polymorphism with haplotypic HLA-A allelic associations. *Genetics* 108: 446-457 (2008)
9. 0901131651
Takemoto Y, Naruse T, Namba K, Kitaichi N, Ota M, Shindo Y, Mizuki N, Gul A, Madanat W, Chams H, Davatchi F, Inoko H, Ohno S, Kimura A: Re-evaluation of heterogeneity in HLA-B*510101 associated with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 72: 347-353 (2008)
10. 0901131654
Sumiyama D, Kitamura S, Terasawa F, Hori Y, Murata K, Kulski JK, Inoko H: Paternity determination of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using microsatellite DNA analysis. *J Vet Med Sci* 70: 711-713 (2008)
11. 0901131658
Hosomichi K, Miller MM, Goto RM, Wang Y, Suzuki S, Kulski JK, Nishibori M, Inoko H, Hanzawa K, Shiina T: Contribution of mutation, recombination, and gene conversion to chicken MHC-B haplotype diversity. *J Immunol* 181:3393-3399 (2008)
12. 0901131700
Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N: Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 92: 1293-1296 (2008)