

## 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<sup>1)</sup> ◆間野 修平<sup>2)</sup>

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100kb)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。このような多くの感受性遺伝子に関する発症の分子機構解明のためには、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) ゲノムワイドな新しい疾患遺伝子マッピング法の開発：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、環境的要因を見出すことにより、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。

### <研究開始時の研究計画>

#### 1) 疾患感受性遺伝子の同定

関節リウマチを対象とした我々自身の先行研究に倣い、3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による方法を用いて、尋常性乾癬、高血圧、摂食障害、糖尿病など多因子性疾患の遺伝的要因を特定する。また、pooled DNA法の確立、独立な4回の相関解析の実施による解析法の検出力を実際のデータにもとづき評価するとともに、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) ゲノムワイドな新しい疾患遺伝子マッピング法の開発

モンゴルの集団(ホトン集団、ハルハ集団)、及び、日本人集団を対象にして、これらの疾患の表現型を量的形質ととらえ、居住環境、生活習慣、家系などを調査し、それらの情報の統計解析を行うことにより、形質の値が様々な環境要因と遺伝的要因から、どのように説明されるかを明らかにする。さらに、遺伝的分散の分析から多様性を維持する集団遺伝学的な機構を推定し、感受性遺伝子の個数と個々の感受性遺伝子の表現型への寄与の大きさを推定する。さらに、上記の遺伝疫学的解析にもとづいた適切なマッピング法の開発に着手する。

#### 3) ネットワーク解析

同定された感受性遺伝子について、文献学的な考察とコンピュータを用いた解析を駆使して、遺伝的要因から発症にいたるパスウェイをシステム回路として理解することにより、煩雑な機能解析なしに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。Pathway Assist、VLX Design Suite VoyaGene、SPARK、WebGen-Net、さらに、我々自身が作成した統合ソフトウェアによりネットワーク解析を行い、発症カスケードを明らかにして疾患発症の分子機構を予測するとともに、疾患発症カスケードを明らかにすることを通して、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理解し、多因子性疾患の感受性遺伝子の発症機構を明確にする手法を確立する。

### <研究期間の成果>

#### 1) 疾患感受性遺伝子の同定

[マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析法の改良]

マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の方法論を改良するため、pooled DNA法の導入、独立な4回の相関解析の実施から構成される手法を確立した。統計学的な計算によれば、3万個のマイクロサテライト多型マーカーを用いてP<0.05以下を有意とする4回の独立の相関解析により、擬陽性を拾うマーカーの数は1以下である。

マイクロサテライトマーカーの再設定に向けては、実際のデータに基づきマーカー間の遺伝的距離を算出するとともに、アップデートされたSNP情報をもとに、プライマー領域に存在するSNPを検索し、新たなマーカーセット収集した。これらの新たなマーカーセットを用いた実証実験を行い、検出力のゲノムワイドな高い相関解析法を確立した。

#### [疾患感受性遺伝子の同定]

関節リウマチに続き、計8疾患を対象としたマイクロサテライト遺伝相関解析を完了し、各々約100Kbから成る、計108個の疾患感受性領域を同定した(表)。さらに、これらの領域を対象としてSNP相関解析を行い、新たに、29個の疾患感受性遺伝子を同定した。

疾患名	リウマチ	尋常性乾癬	高血圧	強度近視
100kbまで絞りこまれた候補領域数	46	36	19	23
同定された感受性遺伝子数	8	6	5	8
子宮内膜症	摂食障害	ナルコレプシー	糖尿病	心筋梗塞
7	11	3	5	4
1	4	1	2	2

標同定した疾患感受性領域・遺伝子

同定した遺伝子には、新規疾患感受性遺伝子が数多く含まれる一方、リウマチHLA-DR 遺伝子、尋常性乾癬HLA-C 遺伝子、糖尿病感受性タンパクリン酸化酵素遺伝子等、ヒト、あるいは、動物モデルにおいて、既に疾患との関連が確立されている遺伝子も含まれる。さらに、高血圧感受性LPIN1についてはヒトQTL解析を通して、また、リウマチ感受性遺伝子NFKB1L1については、ノックアウトマウス等の独自の動物実験を通して、疾患との関連を見出している。これらの結果は、本研究で見出した疾患感受性遺伝子の妥当性を裏付けるものであると考える。国内外の約70以上の大学、研究所、病院などの研究グループと、マイクロサテライトを用いた相関解析による疾患感受性遺伝子の同定のための共同研究を進めており、今後もこれらを継続する計画である。

#### [マイクロサテライトによる若いSNPレアバリエントの検出]

マイクロサテライト多型の起源(2~3万年前)が、SNP多型(起源は10万年~20万年)に比較して新しいこと、及び、マイクロサテライトのより高度の多型性故に、我々は、マイクロサテライト多型は比較的若いSNPレアバリエントを検出する上で特に有効であると予測してきた。そこで、既知のSNPを用いたハプロタイプ解析では疾患と有意に相関するSNPを見出せなかった尋常性乾癬感受性マイクロサテライトを対象として、その近傍のリシーケンシングを行い、疾患と極めて強い相関を示す新たなSNPを見出した(P値1.30E-10, Odds 2.88)。このSNPは、患者・健常者で、各々、4.5%、11.9%の出現頻度を示し、感受性マイクロサテライト多型との連鎖不平衡故に、400人規模の患者サンプルでマイクロサテライト相関解析により検出が可能であった。この感受性SNPは最高頻度ハプロタイプ(頻度42%)に最近生じたSNP(頻度4.5%)であり、またこのSNPと連鎖不平衡をしめすSNPがないため、SNPを用いたゲノムワイドな相関解析ではこの最高頻度ハプロタイプの患者群での増大を検出しなければならぬため、感受性SNPを検出するには、15,000以上の患者サンプルが必要となる。この結果は、近年広く行われているゲノムワイドSNP解析では検出し得ないようなSNPレアバリエントの検出に、マイクロサテライトが高い有効性を持つことを実証するものである。我々が同定した他の感受性マイクロサテライト多型に対しても、近傍領域のリシーケンシングによって、疾患と強い相関を示す新たなSNP多型が見出される可能性が期待される。

#### 2) ゲノムワイドな新しい疾患遺伝子マッピング法の開発

##### [モンゴル集団の検討]

モンゴルのハルハとホトン集団について、X染色体、Y染色体、常染色体上のSNPやマイクロサテライト多型の頻度分布と連鎖不平衡の強度に関する解析により、特にホトン集団が、遺伝的な隔離集団として有名なノルウェーのサーミ集団に匹敵するほどの遺伝的隔離集団であることを明らかにするとともに、両集団は比較的近年に少数集団に由来し、白人集団との混血を経て、形成されたことがわかった。従って、ホトン集団は、連鎖不平衡の長さが長いことから、相関解析の対象集団として優れている。一方、ハルハ集団はそれほどの遺伝的隔離集団ではなく、日本人よりもやや少し遺伝的に隔離された集団であり、ロシア人などの白人との混血が明らかに認められることから、遺伝率の低い疾患(高血圧や糖尿病)などについては、相関解析の対象集団としてはホトンほどに理想的な集団ではないことが判明した。しかしながら、ホトン集団は全体6千人と少数民族でありサンプリングが容易でないのに対し、ハルハ集団は人口が多いことから、今後の遺伝疫学的解析については、ホトンとハルハの両集団について、血糖値

を量的形質の指標とし、集団遺伝学にもとづく遺伝疫学的解析により遺伝的、環境的要因を明らかにして、糖尿病の発症に関与する遺伝子の数と遺伝的寄与を決定する予定である。

##### [事後同祖性による集団を用いた連鎖解析]

現在広く行われている連鎖不平衡を用いた関連解析は、(i)連鎖不平衡の確率論的性質、(ii)集団の構造化による連鎖を伴わない関連、(iii)対立遺伝子異質性による検出力の低下、等の問題を内包し、連鎖解析によって得られる情報は依然として重要である。欧米では、教会の記録等に基づく大規模な家系の連鎖解析によって、多くの量的形質の連鎖が検出されている。日本ではこのような大規模な家系を用いる連鎖解析は困難であるが、反面、日本人集団は1-3万年前から日本列島に孤立してきた故に、潜在的な同祖性は高いと推察される。従って、本研究では、集団中の個体間の同祖性IBD(identical by descent)の推定による連鎖解析を行うLander-Green algorithm法の拡張として、回帰分析を通常の回帰ではなく、一般化推定方程式で行う方法を開発し、これを日本人集団に適用した。具体的には、尋常性乾癬患者、健常者、各々

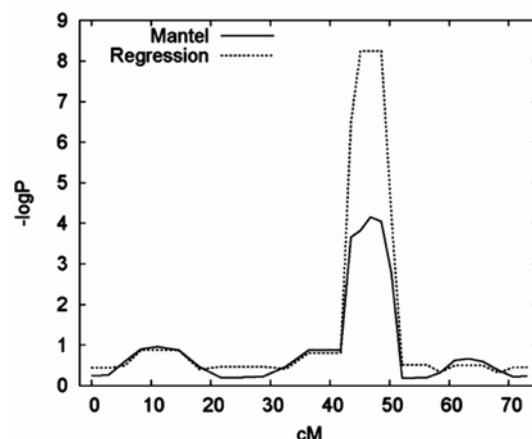


図1 尋常性乾癬連鎖領域の区間マッピング

375個体を対象として、6番染色体上に設定した8個のマイクロサテライトマーカー(平均10.4 cM 間隔)を用いた乾癬連鎖領域の区間マッピングを行い、既知の感受性マイクロサテライトマーカー近傍7 cMのみに、有意な連鎖を検出した(図1)。この結果は、集団における個体間の同祖性をCoalescent過程として表すことで、Hidden Markov Modelを用いてBayes推定することが可能であり、表現型をノンパラメトリックに回帰することで、家系を用いない連鎖解析が可能であることを実証するものである。日本人集団では、極限標本500個体、5 cM 間隔のマーカーで、遺伝率5割程度の遺伝子座を検出すること(検出率0.82)が可能であると考えられる。今後は、この独自の連鎖解析法を、allelic heterogeneityがあることが予想されると統合失調症のゲノムワイド連鎖解析等に適用し、その検出力を評価する計画である。

#### 3) ネットワーク解析

##### [in silicoネットワーク解析]

得られた疾患感受性遺伝子を対象として、文献学的な考察とコンピューターを用いた解析を用いて、糖尿病感受性タンパクリン酸化酵素遺伝子が有望な創薬ターゲットであることを見出した。既に3次元構造が解析されているこのPKXを対象として、in silicoでのドラッグスクリーニングを行い、それらがPKXの活性化に及ぼす効果を培養細胞系で検討した結果、複数の阻害化合物を同定した。今後、動物モデルを用いた解析を通して、これらの化合物の糖尿病治療効果を検討する計画である。

[個別的機能・ネットワーク解析]

・リウマチ感受性遺伝子NFKBIL1

NFKBIL1は、関節リウマチ感受性遺伝子として我々が独自に同定した遺伝子であり、リウマチの抑制因子であると考えられる。NFKBIL1は、元来、構造的類似性に基づいてNFκB inhibitor-like protein 1と命名された。しかし、ハエからヒトまで種を越えて生体防御反応に重要な役割を果たす転写調節因子NFκBとの機能的な関連はまったく明らかではなかった。

リウマチ感受性遺伝子NFKBIL1の機能の解明を目指して、まず、NFKBIL1タンパクと相互作用する因子を、Affinity精製・マススペック法によって解析し、USP9を同定した。USP9は、脱ユビキチン酵素の一つで、ユビキチン化タンパクのユビキチンを除去することを通してタンパクの分解や安定性に寄与すると考えられている。さらに、Superti-FurgaらによるNFκBシグナル伝達系の大規模ネットワーク解析により、USP9はNFκB p100 (NFKB2)と相互作用することが見出されており、従って、NFKBIL1は、USP9との相互作用を通して、NFκBシグナル伝達系と直接的にリンクすると考えられる。

ヒトを含む哺乳類でのNFκBシグナル伝達系は、主に、古典的経路と非古典的経路に分類される。古典的経路は、一般的な炎症反応や自然免疫、或いは、細胞生存に不可欠である。他方、非古典的経路の機能はより特異的で、B細胞の成熟や、リンパ節等二次リンパ器官の形成、樹状細胞や破骨細胞の分化・機能に重要である。そこで、NFKBIL1、及び、これと相互作用するUSP9のNFκBシグナル伝達系における役割を明らかにする目的で、過剰発現実験、及び、RNA干渉を用いたノックダウン実験を行ったところ、NFKBIL1、USP9はともに、非古典的NFκBシグナル伝達系の抑制因子として機能することが見出された。さらに、免疫沈降・イムノプロット法を用いて、NFKBIL1がRelBとNFKB2 (p100/p52)と特異的に相互作用することが観察された。これらは何れも非古典的経路特異的なNFκB因子であり、NFKBIL1による非古典的経路特異的な抑制作用と符合する。また、NFKBIL1とRelB/NFKB2 (p100/p52)の相互作用は非古典的NFκBシグナル伝達系が誘導された条件下でのみ観察される。この結果は、NFKBIL1は、非古典的シグナル伝達系が誘導されて初めて抑制効果を発揮することを示唆しており、NFKBIL1が、既知のNFκB抑制因子(IκBα、IκBβ)とは異なる新しいタイプのNFκB抑制因子であることを示すものである。非古典的NFκBシグナル伝達系の特異的抑制因子であることが明らかになったリウマチ遺伝要因NFKBIL1の生物学的な活性を検討する目的で、NFKBIL1過剰発現トランスジェニックマウス、及び、ノックアウトマウスを作成し、リウマチモデルとして広く用いられているコラーゲン誘導関節炎の発症への影響を観察した。NFKBIL1過剰発現によって発症率と重症度が顕著に減少することが見出された。この結果は、NFKBIL1が、動物個体においても炎症性免疫疾患の決定要因として機能することを示すものである。今後は、非古典的NFκBシグナル伝達系を抑制する分子機構をより詳細に明らかにすることによって、創薬の標的として有望なタンパク因子(もしくは、タンパク因子表面)を同定し、新たな治療薬の開発を目指した研究を展開する計画である。

・高血圧感受性遺伝子SMOC2

後述する独自の酵母ツーハイブリッド(YTH)法を利用して、高血圧感受性遺伝子SMOC2に対するYTH相互作用因子を277個同定した。これら277因子中には、互いに相互作用する因子対が多数含まれており、それらをBioGRID相互作用データベース

より選択したところ、FBNL1、FBNL2、FN1を中心とし、ELN、IGFBP3やCTGFを含む20遺伝子から成る密なネットワークが抽出された(図2)。この結果は、SMOC2がこれらの細胞外基質因子や細胞外因子と相互作用することによって、恐らくは、血管の性状や、内皮細胞の増殖調節を通じて、血圧に作用していることを示唆する。今後は、これらの相互作用の生化学的検証を進めるとともに、個体レベルでのSMOC2の血圧への作用の検討が重要となる。

[酵母ツーハイブリッド法の再検討・再構築]

[酵母ツーハイブリッド法の再検討・再構築]

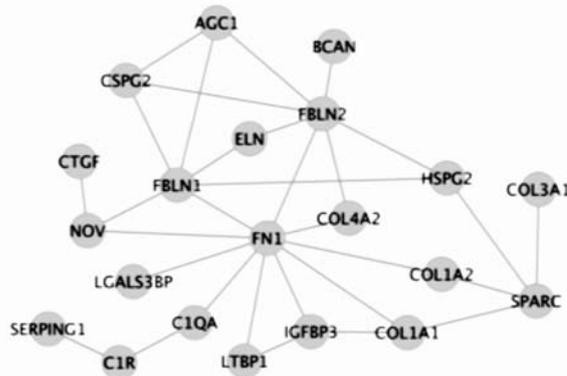


図2 SMOC2のYTHネットワーク解析

酵母ツーハイブリッド(YTH)法は開発されて約20年になるが、相互作用因子同定法として、依然、中心的な役割を果たしている。YTH法は、相互作用する因子対A、Bに依存した転写活性化因子の形成(DNA結合ドメインと転写活性化ドメインの会合)を、形成された転写活性化因子によるリポーター遺伝子の発現促進を指標として検出する、相互作用検出法である。実際のアッセイでは、A、Bの双方に依存しないリポーター遺伝子の発現促進が多数見られ、これら両依存性を示さない偽陽性を如何に確実に排除し得るかがスクリーニングの鍵となる。ここで、我々は、蛍光タンパク標識を利用することによって、A、B両依存性を簡便、且つ、直接的に判定する新たなコンセプトを用いた方法を考案し、これをYTHシステムに導入した。この方法は、従来法の複数リポーターを用いる方法、さらには、個別的なプラスミドシャ

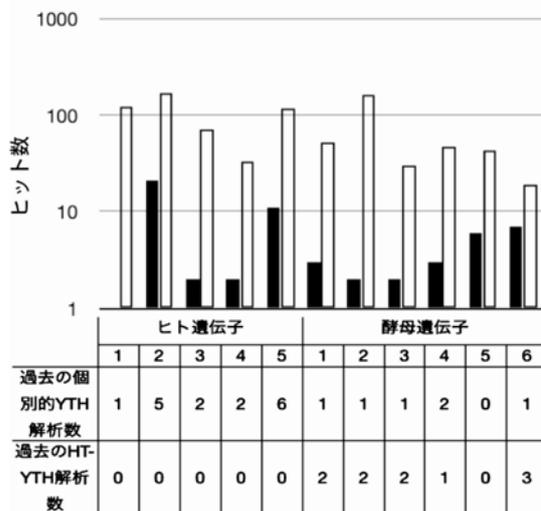


図3 新規YTH法と従来法の比較

フリリングを用いる方法に比較して、はるかに簡便であるとともに、原理的に、A、B 両依存性の判定法としてより直接的であり、高い信頼性が予想される。また、従来法には無いモノマー型 DNA 結合ドメインの使用や、リポータープロモーターの構造の検討等の最適化も加え、従来法の 10 倍以上の検出力を持つ新たなシステムを構築した。この新規システムを用いて行った YTH 解析中、過去に既に個別的 YTH 解析、もしくは、ハイスループット (HT) YTH 解析が行われている遺伝子について、ヒット数を集計した結果を図 3 に示した。全体としては、計 11 遺伝子について、従来法での総ヒット数が 60 であるのに比較して、我々の方法では 865 のヒットが得られており、格段に高い検出力が明らかである。ちなみに、上記蛍光判別法によって、すべてのヒットについて A、B 両依存性が保証されており、偽陽性の混入はほとんどあり得ない。

図 3 で示した酵母遺伝子の YTH 解析は、過去に行われた複数の HT-YTH 解析や、大規模のタンパクアフィニティ/マスペック解析との比較を目的として行ったが、たとえば、図 3 の酵母遺伝子 3 に当たる TPK3 (cAMP-dependent kinase catalytic subunit) の場合、従来法では TPK3 自身と、その制御サブユニットである BCY1 が得られているに過ぎないのに比較して、我々の方法では 30 個の YTH 相互作用因子が得られており、これらの中には、TPK1、TPK2、PKH1、SSN2 等、他の方法によって相互作用が認められている因子も含まれている。また、同定された YTH ヒット因子群を出発点としたネットワーク解析によって、TPK3 と機能的に密接に関連する RAS1、RAS2、CYR1 等を含むネットワークの抽出にも成功している。従って、得られた YTH ヒットに対する既知の相互作用情報が充実している場合には、確度の高い遺伝子機能の推定が可能である。我々の高感度 YTH 法の最大の特徴は、一次コロニーの段階での直接的な陽性検出法 (擬陽性排除法) であるが、この方法はそのままハイスループット化が可能であり、また、圧倒的多数の擬陽性存在下でも問題無く適用する。従って、従来法では不可能であるランダム cDNA 同士の相互作用解析が可能であり、ハイスループットシーケンサーの使用を前提とした大規模相互作用解析へと展開する計画である。

#### [疾患感受性遺伝子の YTH ネットワーク解析]

独自の YTH 法を用いて、我々が同定した 6 個の疾患感受性遺伝子の相互作用因子解析を行い、遺伝子当たり、平均 136 個の YTH 相互作用因子を同定した。1 遺伝子については、従来法による YTH 解析の結果、26 の YTH 相互作用因子が報告されていたが、それ以外の遺伝子については、今回の YTH 解析が初めて

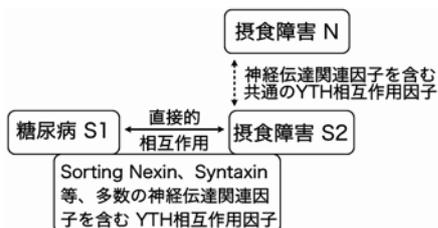


図 4 疾患感受性遺伝子間の機能的関連

の例である。SMOC2 の YTH 解析の結果については上に触れたが、さらに特筆すべき結果として、YTH 相互作用解析を通して浮かび上がった、疾患感受性因子間の密接な機能的関連をあげることができる (図 4)。即ち、エンドサイトーシス関連の糖尿病感受性遺伝子 S1 は、神経伝達物質のリリースに関与する接触障害感受性遺伝子 S2 と直接相互作用し得ることが YTH 解析を通じて明らかになり、さらに、S1 と S2 の YTH 相互作用因子は、シナプス小胞リサイクリングに関与すると考えられている因子を多く含む。また、接触障害感受性遺伝子 N (エンドサイトーシス関連因子) に対して、22 個の YTH 相互作用因子を得たが、これらのうち 17 因子は S2 の YTH 相互作用因子でもあった。従って、我々が遺伝的相関解析によって同定した疾患感受性遺伝子 S1、S2、N は、互いに密接な機能的関連を有し、シナプス小胞リサイクリングを含む情報伝達過程に関与すること、さらに、この過程への何らかの効果が、摂食行動と関連の深い糖尿病・摂食障害の両疾患と関連することが強く示唆される。今後の計画としては、YTH 解析で抽出した相互作用 (候補) の細胞生物学的・生化学的検証を進めるとともに、特に、これらの因子がシナプスにおける情報伝達に及ぼす効果の検討を中心に研究を遂行する計画である。また、個体レベルでの遺伝子機能の解析、疾患との関連の検証を目的として、既に取得している変異マウスを用いた神経科学的・行動学的解析を展開する予定である。

#### <国内外での成果の位置づけ>

・マイクロサテライトを用いたゲノムワイドの遺伝的相関解析は、現在我々のみが行っている独自の、かつ強力な系であり、類似の研究はほとんどみあたらない。国内外の約 70 以上の大学、研究所、病院などの研究グループと共同研究を進行中である。

・本研究での最重要の成果の一つは、尋常性乾癬での SNP レアバリエーションの発見である。広く行われているゲノムワイド SNP 解析で同様の遺伝的要因を見出すことは事実上不可能に近く、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的相関解析の特有の価値を明確に示す結果であると考えられる。

・本研究で開発し、その実効性を検証した「日本人集団を対象とした、同祖性の推定による連鎖解析」は、相関解析が本質的に有する諸問題を補完する手法として、さらには、疾患や量的形質に関与する領域を同定する独立の手法として、その有用性が期待される。

・従来法に比較して、簡便、且つ、高い検出力を持つ新規 YTH 法が、個別的 YTH 法として類を見ないものであることは明らかであり、国内の 5 研究室と共同研究が進行している。しかしながら、この方法が最も有効性を発揮するのは、従来法では不可能である「網羅的・ランダムな相互作用の抽出」においてであると考えられ、それに向けた準備を進行中である。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

・マイクロサテライトを用いた相関解析によって同定した感受性領域内に、疾患と強い相関を示す SNP が同定できない例は、上に述べた尋常性乾癬のケース以外にも複数あり、その場合、結果をどのように理解するかは長年の懸案であった。また、同一の疾患を対象としたゲノムワイドの SNP 解析の結果と、我々の遺伝解析の結果が、HLA 等の強い遺伝的要因以外は一一致率が低い点についての懸念も存在した。しかしながら、当初より我々が予測したように、尋常性乾癬の場合、既存の SNP 解析では検出が難しい、しかも、強い相関を示す感受性 SNP が存在した事実は、他にも同様のケースが存在することを示唆する。マイクロサテライトマーカーを用いて同定した疾患感受性領域の詳細な解析が、より一層

重要になったと考えている。

・当初は、主としてin silicoネットワーク解析を行う計画であったが、実際には、多くの疾患感受性遺伝子について、情報が発現プロファイルに限定されており、遺伝子機能の推定、疾患カスケードの抽出、さらには、創薬ターゲットの同定等に至った例は、糖尿病感受性タンパクリン酸化酵素遺伝子の場合のみであった。従い、リウマチ感受性NFKBIL1については生化学的相互作用因子同定を行ったが、より広範に、より独自性の高い相互作用情報を取得する目的で、新たなコンセプトを導入したYTH法を開発し、疾患感受性遺伝子の相互作用解析に適用した。

#### <今後の課題、展望>

##### 1) 疾患感受性遺伝子の同定

本研究では、マイクロサテライトを用いた遺伝的相関解析で絞り込まれた領域のリシーケンシングによって、強い相関を示す、比較的若い尋常性乾癬感受性 SNP を同定したが、同様のケースは、他の感受性マイクロサテライト領域でも存在すると予想される。本研究の展開としては、特に、「マイクロサテライトは強い相関を示すものの、従来の SNP 解析では高度に有意な SNP が同定できないケース」から優先的に、当該領域のリシーケンシングによる感受性多型の同定を進める計画である。同様のアプローチは、通常のゲノムワイド SNP 解析によって同定された領域についても技術的には可能であるものの、尋常性乾癬で見られたような若いレアバリエーションは、確率的にメジャーなハプロタイプ上に存在する可能性が高いため、マイクロサテライト感受性領域に比べて検出力は遙かに低いものと予想される。

ゲノムワイド SNP 解析の広範な普及は、タイピング技術の工学的な発展に負うところが大きい。マイクロサテライトに関しては、独自に DNA プール法等を確立したものの、タイピング手法そのものは現在までのところ旧来の方法に依存している。しかしながら、近年、技術的進展と普及が目覚ましいハイスループットシーケンサーの利用によって大幅な効率化が期待されるので、新たなマイクロサテライト多型のタイピング法として確立する計画である。

##### 2) ゲノムワイドな新しい疾患遺伝子マッピング法の開発

本研究で我々が開発した同祖性推定による連鎖解析は、相関解析が本質的に内包する弱点を補完しえる点でとりわけ重要である。上で触れたマイクロサテライト多型のタイピング技術の改善も併せて、ゲノムワイドの連鎖解析が実現可能な状況であり、集団を対象とした連鎖解析の有効性の検討を進めるとともに、実際の疾患や量的形質のマッピングに適用していく計画である。

##### 3) ネットワーク解析

創薬を含めた新たな治療戦略の構築という点では、先行して研究を進めている糖尿病タンパクリン酸化酵素の阻害化合物の生化学的検討、及び、疾患動物モデルを用いた生物学的解析を進め、医薬品シーズとして確立したいと考えている。また、独自の相互作用因子解析法として確立した新規 YTH 法については、同定した疾患感受性遺伝子すべての解析を完了するとともに、次世代ハイスループットシーケンサーの使用を前提とした網羅的・ランダム相互作用解析を可能にするスクリーニング系を早期に構築する計画である。当面は、全遺伝子を対象とした網羅的解析を視野に入れつつ、疾患感受性遺伝子群、及び、その相互作用因子群を対象とした網羅的相互作用因子同定に適用する計画である。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

- 0912022043 Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H: Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record.. PLoS ONE 4: e4956, (2009)
- 0912021951 Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H: Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. Curr Pharm Biotechnol. 10: 244-251, (2009)
- 0912021934 Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H: PKC Delta and Epsilon in drug targeting and therapeutics. Recent Patents on DNA & Gene Sequences 3: 96-101, (2009)
- 0912022040 Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Ishihara Y, Noguchi T, Soga Y, Takashiba S, Suzuki G, Kobayashi T, Oka A, Kobayashi T, Yamazaki K, Inoko H, Yoshie H. Assessment of chromosome 19 for genetic association in severe chronic periodontitis. J Periodontol 80: 663-671, (2009)
- 0912022052 Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H: Identification of MICA as a Susceptibility Gene for Pulmonary Mycobacterium avium Complex Infection. J Infect Dis 199: 1707-1715, (2009)
- 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)
- 09011311621 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)
- 09011311654 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)
- 0801111503 Bahram S, Inoko H: Microsatellite markers for genome-wide association studies. Nature Reviews Genetics 8(2), 164 (2007).
- 0801111610 Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H: Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Nature Protocol 2(11):2857-6284 (2007).
- 0608081220 Ohtsuka M, Ishii K, Kikuti YY, Warita T, Suszuki D, Sato D, Kimura M, Inoko H: Construction of mouse 129/Ola BAC library for the targeting experiments using E14 embryonic stem cells. Genes Genet Syst 81: 143-146, (2006)
- 0608081220 Ohtsuka M, Ishii K, Kikuti YY, Warita T, Suszuki D, Sato D, Kimura M, Inoko H: Construction of mouse 129/Ola BAC library for the targeting experiments using E14 embryonic stem cells. Genes Genet Syst 81: 143-146, (2006)

13.0602211229Tamiya G, Shinya M, Imanish T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SEV, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, M Kimura, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites. *Hum Mol Genetics* 14: 2305-2321, (2005)

14.0602211226 Fukami-Kobayashi K, Shiina T, Anzai T, Sano K, Yamazaki M, Inoko H, Tateno Y: Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 9230-923, (2005)

2) 学会発表

1. Inoko H: Identification of NFKBIL1 as a susceptible locus of rheumatoid arthritis by genome-wide association using microsatellites and its functional analysis in osteoclastogenesis. Symposium on inflammation disease in the 10th Congress of International Ocular Inflammation Society, (2009)
2. Inoko H: Genome-wide scan of disease gene by association analysis using 30,000 microsatellites. The 8th International Meeting on Human Genome Variation on Complex Genome Analysis, (2006)

3) 図書

1. Tateno Y, Fukami-Kobayashi K, Inoko H: Evolution of MHC class I complex region with special reference to fragmentary LINE sequences. In: Quantum Bio-Informatics, pp 412 - 426, Eds, L. Accardi, W. Freudenberg and M. Ohya, World Scientific Press, New Jersey, (2006)

4) データベース/ソフトウェア

1. 3万個のマイクロサテライトの位置、PCRプライマー、多型頻度などの情報に関するデータベース <http://www.jbirc.aist.go.jp/gdbs>

5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

1. 発明の名称：尋常性乾癬検査用マーカー遺伝子
  - ① 発明者：猪子英俊、岡晃
  - ② 出願日：2008年1月25日
  - ③ 出願人：東海大学、ジェノダイブファーマ
  - ④ 国内出願番号：2008-000095
2. 発明の名称：NF- $\kappa$ B活性化経路を調節する薬剤
  - ① 発明者：浅井常章、猪子英俊
  - ② 出願日：2006年11月20日
  - ③ 出願人：東海大学
  - ④ 国内出願番号：2006-313109
3. 発明の名称：摂食障害の検査用マーカー遺伝子
  - ① 発明者：猪子英俊、白澤専二
  - ② 出願日：2006年7月25日
  - ③ 出願人：東海大学
  - ④ 国内出願番号：2006-201944