

# ゲノム塩基配列の網羅的解析法による疾患遺伝子探索と新規分子生命現象の発掘

● 藪島 伸生<sup>1)</sup> ◆ 大石 健太郎<sup>1)</sup> ◆ 大坪 正史<sup>1)</sup> ◆ 堀田 喜裕<sup>2)</sup> ◆ 森脇 真一<sup>3)</sup>

1) 浜松医科大学量子医学研究センター 2) 浜松医科大学眼科 3) 大阪医科大学皮膚科

## ＜研究の目的と進め方＞

1. 未同定疾患遺伝子の候補ゲノム領域の詳細な解析による正確な転写物マップの作成：緑内障等の原因遺伝子候補領域を、我々が開発した「ゲノム悉皆解析法」で解析し、より完全なトランスクリプトマップの作成と転写物の遺漏無き同定と単離を行って、疾患原因遺伝子探索に活用する。
2. 疾患原因/関連遺伝子の探究：眼、皮膚など、主に光に関連する器官や組織で起こる遺伝子疾患等の原因遺伝子の探索と機能解析を行う。特に失明に到る眼疾患を採り上げ、独自に考案した拡張候補遺伝子アプローチと、前記「ゲノム悉皆解析法」を組み合わせて原因遺伝子に迫る。
3. 眼の発生と視覚実現に寄与する遺伝子群の同定と相互作用の解析：メダカ、ラット等の動物モデルを利用し、前記2項目で対象とする疾患に関連する遺伝子について追究する。
4. 遺伝子変異・表現型データベース構築：これらの研究から得られる情報を含め、広く一般に疾患原因または関連遺伝子とその変異、タンパク相互作用の変化、疾患の症状等に関するビジュアルなデータベースを構築し、インターネットで公開する。

## ＜2007年度の研究の当初計画＞

1. 失明に到る眼疾患のうち日本で症例数最多の緑内障を引き続き対象として、発症の背景の現象を解析し原因遺伝子を探査する。同疾患の既知原因遺伝子の産物タンパク質を基点とする「拡張候補遺伝子アプローチ」を次のように押し進める。
  - 1) 昨年度オプチニューリン (OPTN) との相互作用解析で得た候補遺伝子 OPTNA7-1 (OPTN Associated protein on chr7-1) と OPTNA7-2 の変異解析を行う。また、他の OPTN 相互作用タンパクの性状解析も行う。
  - 2) その後同定したミオシリン (MYOC) の相互作用タンパク遺伝子候補群に関して、相互作用の確認、発現プロファイルと細胞内局在の解析を行い、緑内障の新規原因遺伝子候補としての評価を行う。
  - 3) 日本人緑内障家系の収集を継続するとともに、それらの症例の既知原因遺伝子 (OPTN, MYOC, WDR36) の変異をプレスクリーニングする。
2. 緑内障のリンケージ解析による候補領域を対象とした「ゲノム悉皆解析法」を継続する。「拡張候補遺伝子アプローチ」により既知原因遺伝子との相互作用が示唆された遺伝子が候補領域内に見つかったものについては、重点的、優先的に解析を行い、全スプライシングバリエーションの単離を目指す。
3. モデル動物としてメダカを用いて、時期特異的及び組織器官特異的 cDNA ライブラリーの作製を進める。ヒトの猫目症候群原因遺伝子領域に存在する未知の目形態形成遺伝子群等のメダカやマウスにおける相同遺伝子の存在を追究する。また、関連既知遺伝子のオルソログ、パラログ遺伝子同定、それらとの相互作用遺伝子の酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法による探索も行う。
4. ヒト単一遺伝子疾患の変異データベース構築を継続する。また、症状-疾患名-原因/関連遺伝子を結びつけるオントロジーデータベース SYMPHONIE (SYMPtomics Hamamatsu Ontology for New Investigative Etiology) の構築も継続し、今年度は耳鼻咽喉科領域についてのオントロジー構築も行う。

## ＜2007年度の成果＞

1. 既知原因遺伝子タンパクと相互作用するタンパクの解析  
MYOC をベイトとして用いた Y2H 法により、多数の相互作用

タンパクを同定した。それらの中から、以下のカテゴリーの遺伝子を探り上げ、当面の研究対象とした。

- ① 遺伝子座が緑内障候補領域内に存在する遺伝子 (9種) (図1)
- ② 他の眼疾患の原因遺伝子あるいは関連遺伝子 (9種) (図2)
- ③ 細胞外 (ECMおよびECR) で機能すると考えられている遺伝子 (11種) (図3)。

このうち、①については、次々項に記述する。②に関しては、黄斑変性症、網膜色素変性症等の他の重要な失明疾患の発症機構が緑内障と関連する可能性を想起させ、今後、別途本格的な解析を行う必要を示唆する。③に含まれる遺伝子は、MYOC の機能の場として報告されてきた線維柱帯の細胞外マトリクスとは異なる組織で発現するもの、さらに緑内障以外の疾患の原因・関連遺伝子 (カテゴリー②) も含まれている。①～③の14種の遺伝子の cDNA 単離を進めており、一部については培養細胞での発現と MYOC との共免疫沈殿による相互作用の証明も行った。

## 2. NRLタンパクとOPTNの相互作用の性状解析

昨年度同定した OPTN とタンパク相互作用する遺伝子のうち、NRL (Neural Retina Leucine-zipper) は網膜色素変性症の原因遺伝子であり、前項で述べた MYOC 相互作用遺伝子のカテゴリー②と同様、異なる眼疾患の関連を示唆する。NRL と OPTN のラット生体眼組織での発現を抗体染色法で解析したところ、NRL は既報告どおり視細胞の核に存在したが、OPTN は既報告の神経節細胞、内網状層の細胞以外に、NRL と同じく視細胞にも検出された。このことは、両タンパクの生体での相互作用、および網膜色素変性症と緑内障に何らかの関連が存在する可能性を示唆する。

## 3. 拡張候補遺伝子アプローチ

既知原因遺伝子タンパクと相互作用し、緑内障候補領域に座位のある遺伝子を原因候補遺伝子として変異探索する「拡張候補遺伝子アプローチ」を次のように進めた。

- 1) OPTN と相互作用し、GLC1F 領域 (7q35-q36) 内にマップする二つの候補遺伝子 OIP-F01 と OIP-F02 の変異解析を行った (図1)。患者検体は、GLC1F 領域を報告した米国キャセイ眼研究所の M.K.Wirtz 博士との共同研究で入手した。その結果、患者の OIP-F02 で5種類の塩基配列変化を同定した。そのうち、77G/A はアミノ酸置換 (G26E) を伴う。また、630A/T は silent であるが、A の場合 ESE (Exonic Splicing Enhancer) コンセンサス配列を構成する一方、T ではコンセンサスからはずれるため、スプライシング変異となる可能性がある。これらに関して、正常対照と、独自に収集中の緑内障家系での存否を検討したが、いずれの塩基変化も患者群と正常群で出現率に有意な差を認めなかった。
- 2) MYOC と相互作用し、候補遺伝子領域内に遺伝子座位の存在する以下の遺伝子の変異解析を開始した (図1)。
  - ① GLC1L (3p21-p22) : MIP-L01, MIP-L02, MIP-L03
  - ② GLC1F (7q35-q36) : MIP-F01, MIP-F02
 GLC1L の患者検体は、候補領域を報告したメルボルン大学の P.N.Baird 博士との共同研究で入手した。GLC1F については前記の検体を用いている。

## 4. ゲノム悉皆解析法

GLC1F 領域 4Mb (D7S2442-D7S483) 内に存在する遺伝子で ENSEMBL 等のゲノムブラウザーに記載されていない転写物の存在を検討した。データベースでは転写物が存在しない領域に対してエキソン予測ソフトウェア解析を行い、予測されたエキソンがコードするアミノ酸配列のタンパクドメイン解析を行った。得られたタンパクドメインと CpG アイランドの存在を参考に新た

な遺伝子または隣接する遺伝子の新規エキソンの存在可能性を実験によって検討した。実際には、予測したエキソン上でPCRプライマーを設計し、眼由来cDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、新たな転写物を3種類 (GLC1FN1~3) 同定した。これらの遺伝子が緑内障原因遺伝子である可能性も上記家系を用いて検討している。

#### 5. 遺伝子疾患症状オントロジーデータベースの構築と公開

遺伝的要素を伴う疾患を対象として、それらの疾患で見られる自覚症状、診断所見、検査データ等を体系的に収集、整理、分類、階層化し、それらのデータを疾患名、原因・関連遺伝子に結びつけるデータベース SYMPHONIE の構築を継続した。本年度、耳鼻咽喉科疾患を加えて、昨年度までの眼科、皮膚科疾患と合わせて、浜松医科大学よりインターネットで公開した (URLは下記参照)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

- ◆ 拡張候補遺伝子アプローチを用いる緑内障原因遺伝子探索の計画は、GLC1FとGLC1Lの家系を保有し、マッピングを報告したM. K. WirtzおよびP. N. Baird両博士との共同研究が容易に成立した。現在のところ遺伝子同定にまで到達していないが、計画自体のレベルは高いと考える。
- ◆ 緑内障に関して、タンパク相互作用を拠り所に既知原因遺伝子の機能解析を行う試みはまだ報告が少ない。特に、新規原因遺伝子の同定は皆無である。報告された候補遺伝子領域にマップされなくとも、相互作用するタンパクは緑内障の背景現象を解明するために重要な知見を与えられ、高いレベルの成果に結びつくと思われる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

OPTNと相互作用するOIP-F01とOIP-F02の2遺伝子のエキソン内およびその近傍には、患者に特異的な遺伝子変異は同定できなかった。他の遺伝子でも容易に遺伝子変異が見つからない可能性もある。理由としては、リンケージ解析の間違いの可能性よりは、典型的な遺伝子変異ではない可能性を考慮すべきと考えている。

#### <今後の課題>

1. 拡張候補遺伝子アプローチ自体はさらに継続するが、変異探索範囲をエキソンとその周辺だけでなく、より広い範囲に拡大する必要がある。rare variantsの関与の可能性も十分に検討する。
2. ゲノム悉皆解析による新規に同定した転写物の変異解析は世界でも未検討であると考えられるので実行する。
3. MYOCと結合する細胞外機能タンパクの機能的意味を追究する実験を行い、緑内障への関与の可能性を検討する必要がある。
4. 日本人緑内障家系の収集を継続し、日本人特有の原因遺伝子同定を目指してリンケージ解析を実行する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

1. 0702141159

Shimizu, N., Ohtsubo, M., Minoshima, S.: MutationView/KMcanerDB: a database for cancer gene mutations. *Cancer Science* 98(3), 259-267 (2007)

2. 0702141729

Kato, M., Haku, T., Hibino, T., Fukada, H., Mishima, Y., Yamashita, I., Minoshima, S., Nagayama, K., Shimizu, N.: Stable minihairpin structures forming at minisatellite DNA isolated from yellow fin sea bream *Acanthopagrus latus*. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 146(3), 427-37 (2007)

3. 0705081539

Kawano, T., Wang, C., Hotta, Y., Sato, M., Iwata-Amano, E., Hikoya, A., Fujita, N., Koyama, N., Shirai, S., Azuma, N., Ohtsubo, M., Shimizu, N., Minoshima, S.: Three novel mutations of PAX6 gene in Japanese aniridia patients. *J. Hum. Genet.* 52(7), 571-574 (2007)

4. 0801291423

Wang, C., Nakanishi, N., Hikoya, A., Koide, K., Ohishi, K., Sato, M., Nakamura, M., Hotta, Y., and Minoshima, S.: Novel RDH5 Mutation in Family with Mother having Fundus Albipunctatus

and Three Children with Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmic Genet.* (in press)

5. 0801291429

Ohishi, K., Zhang, X. M., Moriwaki, S., Hiramitsu, T., Matsugo, S.: In the presence of ferritin, visible light induces lipid peroxidation of the porcine photoreceptor outer segment. *Free Radic. Res.* 40(8), 799-807 (2006)

6. 0801291502

Ohira, A., Ueda, T., Ohishi, K., Hiramitsu, T., Akeo, K., and Obara, Y.: Oxidative Stress on Ocular Disease. *J. Jpn. Ophthalmol. Soc.* 112(1), 22-29 (2008)

2) データベース/ソフトウェア

1. 0801291353

SYMPHONIE (疾患症状オントロジーデータベース)

遺伝的要因が関与する疾患を対象とし、それらの疾患の患者が示す症状をオントロジーとして記述してオブジェクトデータベースに収納した上で、症状からあるいは疾患や遺伝子からオンラインでビジュアルに検索を可能にしたシステム。

<http://symphonie.mpb.hama-med.ac.jp/>

図1 緑内障候補領域にマップされたOPTNおよびMYOCの相互作用タンパク遺伝子

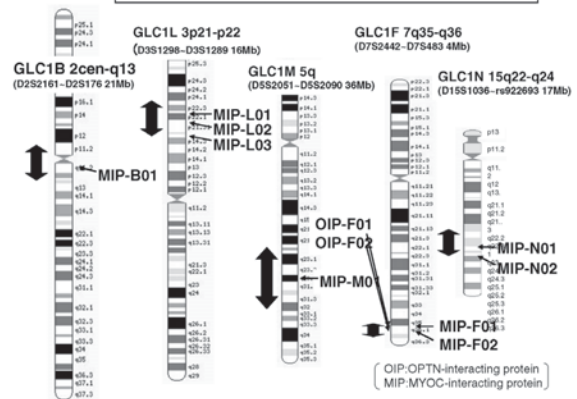


図2 MYOC相互作用タンパクと他の疾患との関連

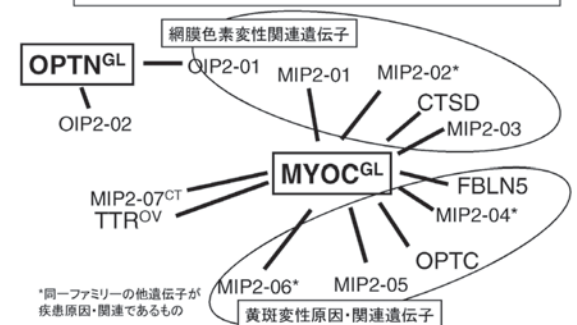
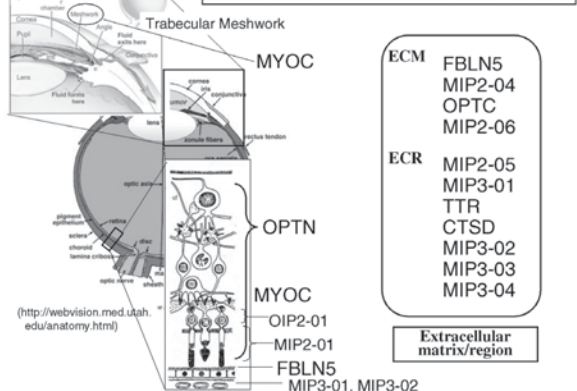


図3 細胞外で機能するMYOC相互作用タンパク



応用ゲノム