

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590335

研究課題名 (和文) 超高解像度ヒト連鎖地図の構築

研究課題名 (英文) Construction of a super-resolution linkage map for human.

研究代表者

田宮 元 (TAMIYA GEN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・学術研究員

研究者番号：10317745

研究成果の概要：ヒトゲノム中において、マイクロサテライトという 2～5 塩基からなる DNA 配列が数個から数十個繰り返された構造があり、各個人ごとにその長さの違い (多型) を示しやすいという性質をもつ。これらマイクロサテライト多型の情報を集めることによって、生物個体の遺伝的性質や系統の目印となる遺伝マーカーとして利用することができる。染色体上に遺伝マーカーを数多く設定し、連鎖地図を作成することによって、様々な遺伝的形質や疾患の原因遺伝子の位置を調べるための手がかりとすることができる。本研究ではヒト連鎖地図について高解像度化・高精度化を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：人類遺伝学、遺伝子多型、マイクロサテライト、連鎖地図、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロサテライトマーカーを利用したヒトゲノムの連鎖地図は、1996年に CEPH 家系を用いた 200 減数分裂レベルのものがはじめて作成され、その後、多くのヒト疾患の遺伝学的解析において非常に重要なフレームワークとして利用されてきた (Dib C, *et al.* Nature. 1996;380:152-4.). 現在においても、もっとも良く利用される遺伝学的リソースのひとつである。その後、ヒトゲノム連鎖地図の高解像度化が計画され、2002年になって

5,000 個のマイクロサテライトマーカーと 1,000 の減数分裂を含むアイスランド家系を用いて作られた解像度が 0.5cM の連鎖地図 (1,000 減数分裂レベル) がアイスランドの民間企業によって作成された (Kong A, *et al.* Nat Genet. 2002;31:241-7.). この 1,000 減数分裂レベルの連鎖地図では、従来の 200 減数分裂レベルの連鎖地図と比較して大幅な平均解像度の向上がなされ、また推定遺伝距離の 95%信頼区間も同時に改善されている。このようなヒト連鎖地図の解像度と信頼区

間の改善はヒト遺伝形質の連鎖解析において、統計的検出力を飛躍的に向上させ、ヒト疾患の関連遺伝子座同定を成功させるための主要な進歩の一つである。ところがこの1,000 減数分裂レベルの連鎖地図では、祖父母を含まない核家族を中心に遺伝子型判定を行ったためホモ接合体アレルの由来を判定できず、多くの場合で解像度も信頼区間も予想より低くなってしまっている (Weber, *JL. Nat Genet.* 2002 ;31:241-7.)。この深刻な問題の本質的な解決には、1)多くの減数分裂を含む大家系の利用と、2)対象集団中でのヘテロ接合率が高い遺伝マーカーを用いることが必要である。ところが国内外では、マイクロサテライトをはじめとする遺伝マーカーは、連鎖不平衡を利用した遺伝的関連解析のために整備されており、上述したアイスランドの1,000 減数分裂レベルを除いて連鎖解析のための連鎖地図の整備は行われていない。一方、昨今のポストゲノム研究では連鎖不平衡を利用した関連解析が主流となっているが、深刻な対立遺伝子異質性のある場合など関連解析では同定できないタイプの疾患遺伝子の存在も予想されており、この点からも高解像度連鎖地図の整備が緊急の課題となっている。

(2)申請者はこれまでの研究で、モンゴルなど東アジアを中心とした多くの民族集団を用いて人類遺伝学研究を行い、その結果モンゴル西部地域に居住する遺伝的隔離集団を見出し、ヒト遺伝形質の解析に有利な集団として遺伝学的に定義した (Katoh K, *et al. Am J Hum Genet.* 2002;71:395-400.)。この遺伝的隔離集団は約1,000年前にこの地域に移住した3つの家系に由来し、現在では総メンバー数10,000を数える大家系集団となっている。また申請者は日本人集団で多型を示す約30,000個のマイクロサテライトマーカーをヒトゲノム中に設定した (Tamiya G, *et al. Hum Mol Genet.* 2005;14:2305-21.)。これは現在、世界最大のマイクロサテライトマーカーのカタログである。そこで、これらの研究成果を発展させれば、理論的には30,000個のマイクロサテライトマーカーで、各家系100の減数分裂を含む50家系を用いた連鎖地図を作成することが可能であると着想するに至った。この連鎖地図では、理論上平均でおよそ0.1cMという高い解像度が得られ、推定遺伝距離の95%信頼区間も劇的に改善することが可能である。これは、ヒトゲノムの究極の連鎖地図といわれている5,000減数分裂レベルが達成可能であることを意味している。さらには、これまで作成されてきた連鎖地図はすべて欧米人集団を用いたものであったためせつかく準備した遺伝マーカーが日本人では多型性を示さずに研究に利用

できないという深刻な問題点が知られていたが、モンゴル人を用いることで、日本人をはじめ東アジア人集団を用いた遺伝学的解析により適した連鎖地図の作成が可能になる。

2. 研究の目的

(1)研究期間の間に、上述したモンゴル人隔離集団家系を用い、段階的に連鎖地図の高解像度化・高精度化を行い、最低でも2,000減数分裂レベルの連鎖地図を完成させることを具体的な目標とした。またこの研究によって、最終的にはヒトゲノムの究極の連鎖地図である5,000減数分裂レベルの達成に道筋をつけることを目標とした。

(2)これまでヒトの連鎖地図は、利用できる家系やマーカーに制限が多く、1,000減数分裂レベル止まりであったが、申請者の研究計画では、独自に調査した巨大家系とともに申請者自らが作成した約30,000個ものマイクロサテライトマーカーを利用し、理論上5,000減数分裂レベルの連鎖地図を作成することを計画しており、他に類を見ず独創的である。このような高解像度・高精度のヒト連鎖地図は、連鎖解析によるさまざまなヒト形質の遺伝子座同定を可能にし、ヒト形質の遺伝的理解を深めることが期待され、その基礎的ならびに応用的意義は計り知れない。とりわけ、慢性関節リウマチや糖尿病、高血圧や精神疾患などの多遺伝子性疾患の関連遺伝子同定に有効に利用することが可能である。また、作成された連鎖地図のゲノム物理地図との対応により、組み換え現象などヒトゲノムの遺伝的動態に関する理解にも結びつくものであると期待された。

3. 研究の方法

これまで設定の終了している約30,000個の多型マイクロサテライトマーカーのうち、東アジア人集団において十分なヘテロ接合度をもつものを5,000個程度選別した。また、1,000減数分裂レベルの家系を用いて、このマーカーセットを遺伝子型判定し、連鎖分析を行うことで連鎖地図を作成した。

(1)これまでの研究からヘテロ接合度が高く、物理距離が等間隔に並んだマイクロサテライトマーカーを5,000個程度選り出した。次に、100人程度からなる家系集団のDNAサンプルを整理してDNAパネルを用意し、これらのマイクロサテライトマーカーに関して蛍光標識されたプライマーによるPCR増幅を行い、産物を自動シーケンサーで電気泳動し、半自動化されたシステムによって遺

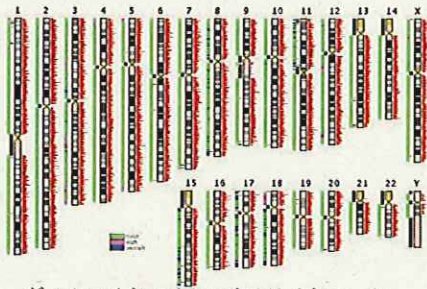
伝子型判定を行った。これらのタイピングにかかるコストが通常の 10 分の 1 程度になるように工夫した。具体的には、PCR 自動分注装置、サーマルサイクラー、遺伝子解析装置 (DNA 解析装置) および関連型データベースを搭載したサーバコンピュータからなるタイピングシステムを構築した。また、もっとも時間のかかる遺伝子型識別作業は全自動コンピュータプログラムの独自開発を行った。

(2) 最尤推定法による遺伝子頻度の計算を行い、得られた遺伝子頻度から理論的なヘテロ接合度の計算を行った。これを実際に観察されたヘテロ接合度と比較し、十分なヘテロ接合度をもち、かつハーディ・ワインベルグ平衡に従うマーカーを選別した。条件が満たされない場合は、再度隣接するマーカーで行うものとした。

(3) 得られた家系での遺伝子型情報をもとに、コンピュータ上で連鎖解析を行い、遺伝距離と 95% 信頼限界を計算した。コンピュータソフトウェアとしては、まず Genehunter ソフトウェアを用い、計算能力に限界が生じた場合に、最近開発された並列処理プログラムを利用した。

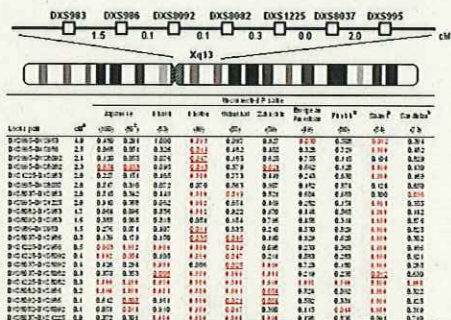
4. 研究成果

(1) この研究を行うにあたって約 30,000 個のマイクロサテライトマーカーがヒトゲノム中に設定された。



(2) 東アジアの隔離集団におけるバックグラウンド連鎖不平衡を調査することを目的に、日本およびモンゴルの 5 集団に焦点を当てた。日本人集団は現在、約 1 億 2000 万人の人口からなるが、2000 年前には約 60 万人と推定されており、フィンランド人と同様、典型的な人口増加集団と見なされている。また、歴史的な考察などから、日本人集団はこれまで比較的均質な集団であると考えられてきた。一方、モンゴル国は 20 を超える民族集団で構成されているが、そのうち、ハルハと呼ばれる民族集団はモンゴル全土に分布し、約 180 万人からなる大きな集団である。対照的に、ホトン、ウリアンハイ、およびザフチンと呼ばれる集団は、いずれもハルハとは起源を異にし、少数からなる隔離集団である。特に、ホトンと呼ばれる集団は人口が約 6,000 人と、極めて少ない。そこで、これらの東アジア人集団について、X 染色体上の多型マイクロサテライトマーカーを用いてタイピングを行い、Fisher 検定により、マーカー間の連鎖不平衡を検定した。その結果、これらのうち、日本人とハルハにおける連鎖不平衡は、フィンランド人やサルディニアと同程度、あるいはそれらよりもやや広範囲に渡ることが示された。一方、少数一定集団である残り 3 集団 (ホトン、ウリアンハイ、ザフチン) における連鎖不平衡は、日本人とハルハよりもさらに広範囲におよぶことが示された。特

に、ホトン、ウリアンハイ、およびザフチンと呼ばれる集団は、いずれもハルハとは起源を異にし、少数からなる隔離集団である。特に、ホトンと呼ばれる集団は人口が約 6,000 人と、極めて少ない。そこで、これらの東アジア人集団について、X 染色体上の多型マイクロサテライトマーカーを用いてタイピングを行い、Fisher 検定により、マーカー間の連鎖不平衡を検定した。その結果、これらのうち、日本人とハルハにおける連鎖不平衡は、フィンランド人やサルディニアと同程度、あるいはそれらよりもやや広範囲に渡ることが示された。一方、少数一定集団である残り 3 集団 (ホトン、ウリアンハイ、ザフチン) における連鎖不平衡は、日本人とハルハよりもさらに広範囲におよぶことが示された。特



観察された連鎖不平衡

に、ホトンにおいては、サーミと同様、大多数のマーカー間で連鎖不平衡が認められた。

得られた結果は、これら東アジアの隔離集団が、ヨーロッパの隔離集団と同様、連鎖不平衡マッピングに適した集団であることを示唆するものとなった。

(3) これらの研究成果を進展させ、理論的には 30,000 個のマイクロサテライトマーカーで、各家系 100 の減数分裂を含む 50 家系を用いた連鎖地図を作成することが可能であると考えられた。そこで上述したモンゴル人隔離集団家系を用い、段階的に連鎖地図の高解像度化を行った。具体的には、2 年間の研究期間中に、2,000 減数レベルの連鎖地図を完成させることを具体的な目標として連鎖地図の作成をすすめた。その結果、約 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーのうち、モンゴル人集団で十分なヘテロ接合度をもつものを選別することができた。また、家系の構成メンバー数と家系数を増やしてタイピングを行い、連鎖地図の密度を上げることに成功した。すべての遺伝距離と 95% 信頼区間に関してデータベース化を行い、これらの研究の過程で最終的に、5,000 減数分裂レベルの連鎖地図完成に向けた体制の構築を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 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*. 2009; 199(11):1707-1715. 査読あり
- ② Tomita K, Oike Y, Teratani T, Taguchi T, Noguchi M, Suzuki T, Mizutani A, Yokoyama H, Irie R, Sumimoto H, Takayanagi A, Miyashita K, Akao M, Tabata M, Tamiya G, Ohkura T, Hibi T. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2008; 48(2):458-73. 査読あり
- ③ Maeda K, Kaji R, Yasuno K, Jambaldorj J, Nodera H, Takashima H, Nakagawa M, Makino S, Tamiya G. Refinement of a locus for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy (HMSN-P) and genetic heterogeneity. *J Hum Genet*. 2007; 52(11):907-14. 査読あり
- ④ Tamiya G. TAF1 as the Most Plausible Disease Gene for XDP/DYT3. *Am J Hum Genet*. 2007; 81:393-406. 査読あり
- ⑤ Kimura T, Shimada A, Sakai N, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. *Genetics*. 2007; 177(4):2379-88. 査読あり
- ⑥ 田宮元、神経疾患における遺伝子転写調節障害 - X連鎖ジストニア・パーキンソンニズム・、最新医学 2007; 62:132-137. 査読なし

[学会発表] (計 5 件)

- ① Makino S, Maeda K, Jamiyansuren J, Yasuno K, Kaji R, Tamiya G. Genomic Sequence Analysis of the HMSN-P region on human chromosome 3q13. The American Society of Human Genetics 2008 Annual Meeting. 2008年11月13日、アメリカ・フィラデルフィア

- ② 田宮元、X連鎖ジストニア・パーキンソンニズムにおけるTAF1遺伝子の神経特異的発現減少、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月12日、パシフィコ横浜

- ③ Jamiyansuren J, Kaji R, Maeda K, Yasuno K, Matsumoto S, Makino S, Tamiya G. Association of tag SNPs in neuronal UCPs with cranial-cervical dystonia. The American Society of Human Genetics 2007 Annual Meeting. 2007年10月24日、アメリカ・サンディエゴ

- ④ Makino S, Tamiya G. Neuron-specific enhanced expression of TAF1 and its isoform. The American Society of Human Genetics 2007 Annual Meeting. 2007年10月26日、アメリカ・サンディエゴ

- ⑤ Maeda K, Kaji R, Jamiyansuren J, Yasuno K, Takashima H, Nakagawa M, Makino S, Tamiya G. A candidate gene for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy (HMSN-P). The American Society of Human Genetics 2007 Annual Meeting. 2007年10月26日、アメリカ・サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田宮 元 (TAMIYA GEN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・学術研究員

研究者番号：10317745

(2) 研究協力者

ジャミヤンスレン・ジャンバルドルジ (JAMIYANSUREN JAMBALDORJ)

徳島大学・大学院医科学教育部・大学院生

ナミビド・ムンフトヴィシン (NAMID MUNKHTUVSHIN)

モンゴル国立衛生研究所・病理学部門・部門長

バトムンフ・ムンフバト (BATMUNK MUNKBAT)

モンゴル国立衛生研究所・病理学部門・研究員