

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659071

研究課題名（和文）：microUPD 検出による発生初期胚の DNA 修復機構の解析

研究課題名（英文）：Identification of microUPD and analysis of DNA repair in early development

研究代表者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOICHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00304931

研究成果の概要（和文）：

発生時に片親性ダイソミーが発生しているのかを確認すべく DNA マイクロアレイ解析および公的データベースから全ゲノムシーケンスデータをダウンロードし解析した。2トリオの全ゲノムシーケンスデータの解析からは、片親性ダイソミー領域を見つけることは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：

To identify the uniparental disomy region in normal development using microarray and/or whole genome sequencing from trio (father-mother-offspring) DNA. We analyzed two trios' whole genome sequence data downloaded from public database. But we could not identify the UPD locus in normal development offspring.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 2,700,000 | 330,000 | 3,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

常染色体劣性疾患の研究を通し、uniparental disomy (UPD: 片親性ダイソミー) が劣性遺伝病の疾患アレルのホモ接合形成に重要な役割を果たすことが分かってきた。また、Pader-Willi 症候群 (PWS) や Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の発症にも UPD が原因として知られていた。UPD 発生のメカニズムの詳細および UPD 発生の頻度は不明であった。

2. 研究の目的

UPD 発生は、何らかの疾患が発症した場合に、その疾患発症のメカニズムを探索することにより明らかになる。PWS や BWS は 20 年ほど前から UPD が発症原因の一つとして

知られていたが、最近では常染色体劣性遺伝発症の際、homozygous 状態を起こす原因として注目されてきた。しかし、疾患から見た場合に UPD が発見されてくるのですが、正常の妊娠、発生で UPD が発生するのか？あるいは発生するとすれば、その頻度はどれくらいであるかとの疑問がわいた。そこで、本研究では、第一の目的として正常発生の子のゲノムに UPD 部分が存在するのか、存在するとすればその数および合計の大きさを算出することを目的とした。

正常発生過程で UPD の発生が一般的であれば、その周辺の塩基配列に変異は無いのかを探ることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

初年度は、インフォームドコンセントを得て収集した3例のトリオDNAを用いて Human Whole Genome SNP 6.0 を用いて親子間で SNP 伝達が合理的でない部位を選び出した。すなわち、AA x BB → AA or BB, AA x AB → BB となる SNP である。

次に、HapMap project によって収集されているトリオ試料で、全ゲノム塩基配列決定がなされている2トリオの全ゲノム塩基配列決定のデータを用いた。これら2トリオ(6名)のシーケンスデータ(BAM file)をダウンロードし、上記のような親子関係上非合理的である塩基置換部位を全て選び出した。塩基配列は、BAM file をもとに GATK (Genome Analysis Toolkit) によって再度、微細な再配列を行った後、mapping quality > 40 となる信頼度の高い塩基置換部位を解析対象とした。また、選択時には

UPD の候補部位は塩基配列の確認のために capillary シーケンスにより塩基配列を再度決定した。塩基配列が間違っていない UPD 候補部位は、定量 PCR (QPCR) 法によって片アレルの欠失を確認した (hemizygous かどうかの確認)。

4. 研究成果

HapMap 試料から選択したトリオは CEU から家系番号 1463 (父 NA12891, 母 NA12892, 娘 NA12878) と YRI から家系番号 Y117 (父 NA19239, 母 NA19238, 娘 NA19240) である。家系番号 1463 から 100 部位、家系番号 Y117 から 178 部位が UPD 候補領域として選択された。Capillary シーケンサーにより再度塩基決定したところ、家系番号 1463 では 99 部位、家系番号 Y117 から 177 部位は次世代型シーケンサーのエラーであることわかり、UPD 候補領域として、家系番号 1463, 家系番号 Y117 とともに 1 箇所が残った。QPCR の結果、家系番号 1463 では母親から欠失が伝達され、家系番号 Y117 では父親から欠失が伝達されている hemizygous であることが分かった。

次世代シーケンサーによって2トリオから UPD 領域が存在するのかを検証したが、最終的に UPD 領域を確認することは出来なかった。

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 3 4 件)

Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura K-i, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a *CUL7* gene mutation causing 3M syndrome.

Clin Genet 80: 478-483. 2011.

Ono S, Tanaka T, Ishida M, Kinoshita A, Fukuoka J, Takaki M, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kohno S, Hayashi T, Senba M, Yasunami M, Kubo Y, Yoshida LM, Kubo H, Ariyoshi K, Yoshiura K, Morimoto K. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *Eur Respir J* 38(4): 861-869. 2011.

Oikawa M, Yoshiura KI, Kondo H, Miura S, Nagayasu T, Nakashima M. Significance of Genomic Instability in Breast Cancer in Atomic Bomb Survivors: Analysis of Microarray-Comparative Genomic Hybridization. *Radiat Oncol* 6(1):168. 2011

Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *J Obstet Gynaecol Res* 37(11): 1666-1670. 2011.

Mishima H, Sasaki K, Tanaka M, Tatebe O, Yoshiura KI. Agile parallel bioinformatics workflow management using Pwrake. *BMC Res Notes* Sep 8;4(1):331. 2011.

Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Shigeo Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K. An assembly defect due to a *PSMB8* mutation reduces proteasome activity and causes autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome.

Proc Natl Acad Sci 108(36):14914-14919. 2011.

Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 155A(7):1511-1516. 2011.

Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe K, Kinoshita A, Yoshiura KI. Intracystic Papillary Carcinoma of Breast Harbors Significant Genomic Alteration Compared with Intracystic Papilloma: Genome-wide Copy Number and LOH Analysis Using High-Density

- Single-Nucleotide Polymorphism Microarrays. *Breast J* 17(4):427-430. 2011.
- Kurotaki N, Tasaki S, Mishima H, Ono S, Imamura A, Kikuchi T, Nishida N, Tokunaga K, Yoshiura K, Hiroki Ozawa H. Identification of Novel Schizophrenia Loci by Homozygosity Mapping Using DNA Microarray Analysis. *PLoS One* 6(5):e20589. 2011.
- Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *J Hum Genet* 56(4):313-315. 2011.
- Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *J Hum Genet* 56(4):296-299. 2011.
- Ono S, Yoshiura K, Kurotaki N, Kikuchi T, Niikawa N, Kinoshita A. Mutation and Copy Number Analysis in Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Families. *Movement Disorders* 26(4):762-764. 2011.
- Amani D, Ravangard F, Niikawa N, Yoshiura KI, Karimzadeh M, Dehaghani AS, Ghaderi A. Coding region polymorphisms in the indoleamine 2,3-dioxygenase (INDO) gene and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 88(1): 42-47, 2011.
- Okada I, Hamanoue H, Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalk N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K, Tsurusaki Y, Doi H, Noriko Miyake N, Furukawa T, Matsumoto N, and Saitsu H. SMOX1 Is Essential for Ocular and Limb Development in Humans and Mice. *Am J Hum Genet* 88(1): 1-12, 2011.
- Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J Hum Genet* 55(2): 124-126, 2010.
- Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura KI, Kitaoka T. Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome. *J Hum Genet* 55(3): 142-146, 2010.
- Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum Reprod* 25(4): 1076-1080, 2010.
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42(9): 790-793, 2010.
- Matsuzawa N, Kondo S, Shimoizato K, Nagao T, Nakano M, Tsuda M, Hirano A, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations of the IRF6 gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. *Am J Med Genet A*. 152A(9): 2262-2267, 2010.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 30: 849-861, 2010.
- Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K. Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array. *Eur J Med Genet* 53(5): 244-249, 2010.
- Ono S, Imamura A, Tasaki S, Kurotaki N, Ozawa H, Yoshiura K, Okazaki Y. Failure to Confirm CNVs as of Aetiological Significance in Twin Pairs Discordant for Schizophrenia. *Twin Res Hum Genet* 13(5): 455-460, 2010.
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clin Chem* 56(11): 1767-1771, 2010.
- Ota I, Sakurai A, Toyoda Y, Morita S, Sasaki T, Chishima T, Yamakado M, Kawai Y, Ishidao T, Lezhava A, Yoshiura K-i, Togo S, Hayashizaki Y, Ishikawa T, Ishikawa T, Endo I and Shimada H. Association between breast cancer risk and the wild-type allele of human ABC transporter ABCC11. *Anticancer Res* 30(12): 5189-5194, 2010.
- Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J. A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A*. 149A(4): 816-818. 2009.
- Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O,

- Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N. Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. *Am J Med Genet A*. 149A(4): 785-787. 2009.
- Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene. *Gene* 432(1-2): 97-101. 2009.
- Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saito H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Hirahara F, Matsumoto N. A locus for ophthalmic-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet A*. 149A(3): 336-342. 2009.
- Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 54(5): 304-309. 2009.
- Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura KI, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T. Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? *FASEB J* 23(6): 2001-2013. 2009.
- Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genet* 10: 42. 2009.
- Machida J, Félix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M, Shimozato K, Sonta S, Ono T. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofac J* 46(5): 532-540. 2009.
- The Super Science High School Consortium. Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium. *J Hum Genet* 54(9): 499-503. 2009.
- Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, Murray JC. Search for Genomic Alterations in Monozygotic Twins Discordant for Cleft Lip and/or Palate. *Twin Res Hum Genet* 12(5): 462-468. 2009.
- [学会発表] (計 6 6 件)
- 12th International Congress of Human Genetics and The American Society of Human Genetics, 61st Annual Meeting, Montreal, Canada, October 11-15, 2011
口演 2 件
- 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日(火)～16日(金), パシフィコ横浜, 横浜.
口演 1 件
- 第 56 回日本人類遺伝学会 2011 年 11 月 9 日(水)～12 日(土), 幕張メッセ, 千葉
口演 5 件, ポスター 3 件
- 第 18 回出生前診断研究会 2011 年 10 月 1 日(土), 佐賀大学医学部臨床大講堂, 佐賀
口演 1 件
- 第7回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2011年6月4日(土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島
口演 1 件
- 2010/10/10-14 20th ISUOG World Congress: (Prague, Czech Republic)
ポスター 1 件
- The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting. Washington D.C., Baltimore, November 2-6, 2010
口演 2 件
- 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010年12月7日(火)～10日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.
ポスター 4 件
- The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010/12/3-5, Wakayama Prefectural Cultural Hall (和歌山県民文化会館)
口演 1 件, ポスター 1 件
- 第 55 回日本人類遺伝学会 2010 年 10 月 27 日(水)～30 日(土), 大宮ソニックシティ, 大宮
特別講演 1 件, 口演 7 件, ポスター 5 件
- 第 6 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2010年6月5日

(土), 長崎大学医学部ボードインホール,
長崎

口演 1 件

第48回日本婦人科腫瘍学会 (つくば国際会議
場、茨城) 2010年7月8-10日

口演 1 件

第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2010
年5月27日(木)~28日(金), 北とぴあ, 東京

シンポジウム口演 1 件

第 106 回 日本精神神経学会学術総会 2010
年 5 月 20 日 (木) ~22 日 (土) 広島国際会
議場, 広島

ポスター 1 件

第110回日本外科学会総会 2010年4月8日
(木)~10日(土), 名古屋国際会議場, 名
古屋

ポスター 1 件

The American Society of Human Genetics, 59th
Annual Meeting. Honolulu, Hawaii, October
20-27, 2009.

ポスター 6 件

第 16 回日本遺伝子診療学会 2009 年 7 月 30
日 (水) ~8 月 1 日 (土), ホテル札幌ガーデ
ンパレス, 札幌

ワークショップ口演 1 件, 口演 9 件

第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 23 日
(水) ~26 日 (土), グランドプリンスホテ
ル高輪, 東京

口演 3 件, ポスター 7 件

[図書] (計 1 件)

カラー図解基礎から疾患までわかる遺伝学
Eberhard Passarge 著 (監訳: 新川詔夫, 吉浦孝
一郎) メディカル・サイエンス・インターナ
ショナル

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOICHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号: 00304931

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木下 晃 (KINOSHITA AKIRA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師
研究者番号: 60372778

三嶋 博之 (MISHIMA HIROYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
COE 研究員
研究者番号: 10513319

佐々木健作 (SASAKI KENSAKU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
大学院生
研究者番号: なし