

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 9 日現在

機関番号：32409  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659437  
 研究課題名（和文）血管形成異常における全エクソンリシークエンシングによる疾患責任遺伝子の同定  
 研究課題名（英文）The analysis of the TGF-β family and angiodyplasia by whole exome sequencing.  
 研究代表者  
 田中 知明（TANAKA TOMOAKI）  
 埼玉医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号：60433653

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、全エクソンリシークエンシングによる、血管形成異常患者における特定遺伝子配列の包括的検索を行う事で、疾患責任遺伝子の絞り込み及び同定を行う事である。次世代シーケンサーの膨大な情報を基に、候補遺伝子として TGF-β 関連遺伝子群について配列比較の検討を行った。本研究において得られたデータより、TGF-β 関連遺伝子群のうち、2 つの遺伝子にアミノ酸置換を伴う遺伝子配列異常が存在する事が明らかになった。同 2 つの遺伝子に関して、疾患責任遺伝子としての候補遺伝子としての可能性が高いと考えられる為、現在詳細な検討を行っている。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to reveal the gene for arteriovenous malformation of unknown cause. Cause of arteriovenous malformation such as Osler-Weber-Rendu disease or heritable pulmonary arterial hypertension is caused by single gene defects such as the TGF-beta family gene. We hypothesized that malformation is associated with TGF-beta gene family. Using patient samples as arteriovenous malformation, we analyzed by whole exome sequencing and investigated that mutations are present in the TGF-beta family genes.

In the gene family of about 70 genes, we found two candidate genes where the mutation in exon on.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) TGF-β 関連遺伝子群について、現在までおよそ 60 種以上の遺伝子が報告されており、血管形成の促進因子と抑制因子として働く重要な因子であることが知られている。TGF-β 関連遺伝子の異常を有する疾患群は、骨格系、間葉系および血管系異常を示すことが多い。

(2) これら血管形成異常を有する患者を検索することで、TGF-β 関連遺伝子の異常が見つかる可能性が高いと考えられる。

(3) 一方、疾患原因を同定するためには、原因関連遺伝子が同定されていない場合、ゲノムワイドで網羅的に解析する必要がある。

(4) 現在、次世代シーケンサー等の技術的な進歩により、直接的にゲノムワイドで原因遺伝子を同定することが可能となった。しかし、原因遺伝子の絞り込みには全遺伝子比較になるため、多数の変異が見つかることによる候補遺伝子の絞り込みが非常に困難である問題点を回避する必要がある。

## 2. 研究の目的

(1) 血管形成異常の症状を有する患者由来検体を用い、網羅的に全エクソンリシーケンシングを行う。

(2) TGF- $\beta$ 関連遺伝子群の約 70 種以上を候補遺伝子群として絞り込みの対象とし、直接的に疾患原因遺伝子の同定を試みる。

(3) 全エクソンリシーケンシングにより多数見付かる可能性がある遺伝子変異を、候補遺伝子群による絞り込みを行う事で、絞り込みの問題点を回避する。

## 3. 研究の方法

(1) 疾患患者由来検体の末梢血検体より得られたゲノムDNAを用いて、全エクソンシーケンシングを行う。

(2) ターゲット候補遺伝子群としてTGF- $\beta$ 関連遺伝子群の約70種を絞り込み対象とする。

(3) 得られたゲノム情報を利用し、TGF- $\beta$ 関連遺伝子群上の全てのシーケンシングデータをGenbankのヒトゲノムシーケンシング情報と比較し、異常がみられる遺伝子を探索する。

## 4. 研究成果

(1) 本研究で得られた全エクソンリシーケンシング解析データを元に、特定遺伝子群との比較検討を行った。Annotationの結果から、3万5千カ所以上の塩基置換が存在する結果が得られた (InDelを含む)。

(2) 候補遺伝子群として、最終的に 70 遺伝子を絞り込み対象とした。これらは全てTGF- $\beta$ 関連遺伝子である。(図1)

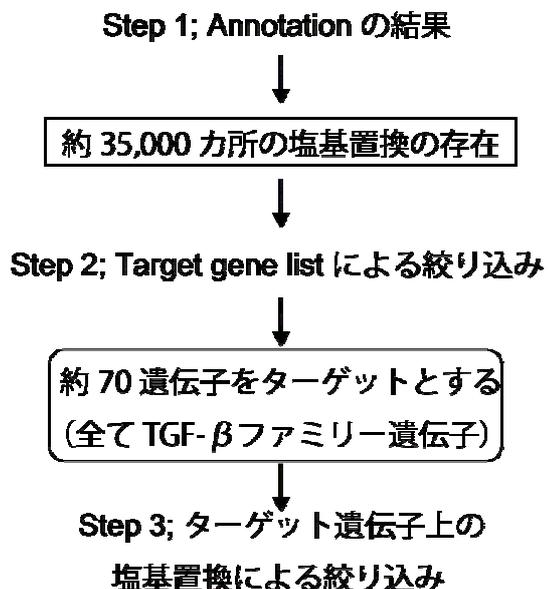


図1 エクソーム解析の絞り込みの流れ

(3) 続いて、リファレンスゲノムとの比較情報に基づき、さらに候補遺伝子群上の以下の3つの条件に合う遺伝子に絞り込んだ。

Exon 上もしくは splicing signal 上に塩基置換等が存在する事

Nonsynonymousのアミノ酸置換を伴う事

SNPの場合は、db SNP 情報に登録されていない事(図2)

Step 4: 塩基置換が Exon 上に存在する事



Step 5: 塩基置換がアミノ酸置換を伴う事



Step 6: dbSNP 等のデータベース上に SNP として登録されていない事

図2 ターゲット遺伝子群上の候補遺伝子の絞り込み

(4) 絞り込み検索の結果、3つの候補遺伝子に絞り込めた。ただし、そのうち1つの遺伝子に関しては、再現性が得られなかったため、残り2つの候補遺伝子について、疾患関連遺伝子である可能性が考えられた。これらは共に1塩基置換によるアミノ酸置換を伴う。

(5) 候補遺伝子2つのうち、一方の候補遺伝子Aに関して、アミノ酸のホモロジーを調べてみた。9種(ヒト、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ)の候補遺伝子Aについて、マルチプルアライメントを行った。

(6) その結果、リシークエンシングによって得られたアミノ酸置換の場所は、9種すべての間で保存されているアミノ酸の場所であった(図3)。

```

ヒト *****A*****
アカゲザル *****A*****
イヌ *****A*****
ウシ *****A*****
マウス *****A*****
ラット *****A*****
ニワトリ *****A*****
ゼブラフィッシュ *****A*****
ショウジョウバエ *****A*****

```

図3 候補遺伝子Aのターゲットアミノ酸を含むアミノ酸相同性検索領域のアライメントの結果

赤文字K: リシークエンシングの結果アミノ酸置換が生じる場所(ターゲット)

\*: 種間で保存されているアミノ酸

x: 種間で保存されていないアミノ酸

(7) またこの領域は、候補遺伝子Aの主となる機能ドメイン領域に存在する事も解った為、リシークエンシングによって得られた変異が、候補遺伝子Aのタンパク機能に影響を与える可能性が十分示唆された。

(8) もう一方の候補遺伝子Bについても同様にアミノ酸のホモロジーを調べてみた。8種の候補遺伝子Bについて、マルチプルアライメントを行った。

(9) その結果、ターゲットのアミノ酸は、全てに保存されている場所ではない事が解ったが、6種の間で保存されているアミノ酸である。(図4)

```

ヒト *****A*****
チンパンジー *****A*****
アカゲザル *****A*****
ウシ *****A*****
マウス *****A*****
ラット *****A*****
ニワトリ *****A*****
ゼブラフィッシュ *****A*****

```

図4 候補遺伝子Bのターゲットアミノ酸を含むアミノ酸相同性検索領域のアライメントの結果

赤文字A,X: ターゲットの場所

\*: 種間で保存されているアミノ酸

x: 種間で保存されていないアミノ酸

(10) この領域は、候補遺伝子Bの主となる機能ドメイン領域には存在しない事も解ったが、アミノ酸置換を伴うため、タンパクの機能に

も影響がある可能性は弱いながらも考えられる。

(11) 上記までの本研究に継続して、同2つの候補遺伝子に関して、詳細な解析を継続して行う。同遺伝子変異に伴うシグナル伝達系への異常を、培養細胞株を用いた in vitro 系において詳細な検討を行っている。2 遺伝子の双方は、TGF- $\beta$ 関連のシグナル伝達に対して、重要な役割を担っているため、疾患との関連性が強いと考えられる。

#### 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)

[学会発表](計1件)

田中知明, 椎原淳, 井上慶明, 加賀亜希子, 石川里奈子, 岡野哲也, 宮沢仁志, 金澤實, 小林国彦, 萩原弘一. 肺癌患者由来臨床検体を用いた、多種癌関連遺伝子の同時検索方法の開発. 第35回分子生物学会. 2012.12.11.岡国際会議場.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)  
埼玉医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：60433653

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし