

平成 21年 4月26日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592052
 研究課題名（和文） 鎖肛ブタモデルにおける多因子遺伝研究－GLI2の網羅的遺伝子座相互作用分析
 研究課題名（英文） Genetic Analysis of Anal Atresia (AA) in Pigs

研究代表者
 工藤 寿美（KUDOU SUMI）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
 研究者番号：50375507

研究成果の概要：我々はこれまでに鎖肛ブタ家系を構築し責任遺伝子の主座が15番染色体上にありGLI2遺伝子を候補遺伝子として同定した。本研究の目的はSNPをマーカーとしてGLI2遺伝子における連鎖解析を行い鎖肛発症に関連する領域を特定することである。DNAサンプル調整を行い遺伝子相同性を利用してGLI2遺伝子領域のSNPを同定した。ブタゲノム計画の進行により高速かつ大量のSNPタイピングを行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学

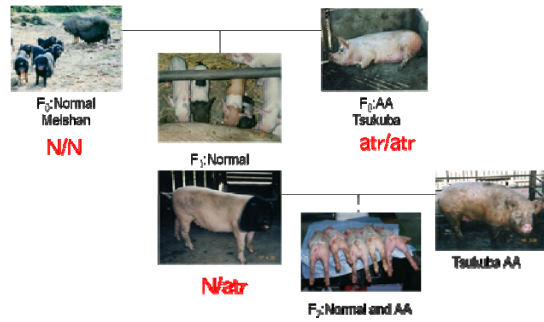
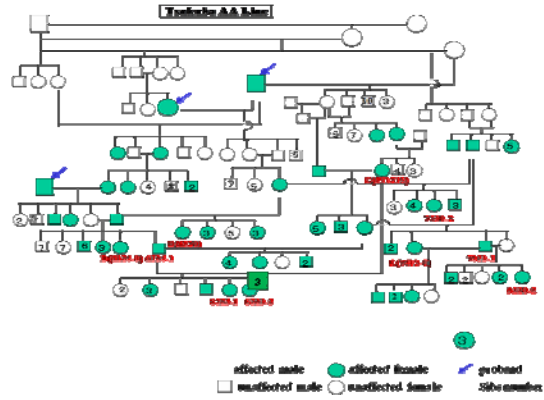
1. 研究開始当初の背景

(1) 鎖肛は小児外科で施行する新生児手術の中で最も頻度が高い。手術によって生命予後は良好であるが、特に高位鎖肛の機能予後は依然として改善の余地が大きい。排便、排尿、生殖などの機能に関する患者の不安や悩みは、結婚、生殖に際して自分の子供に遺伝しないかという疑問につながる。また、患者の両親には次子をもうけることへの不安がある。鎖肛の遺伝様式の解明は、疾患の予防、根絶につながる重要な基礎研究である。

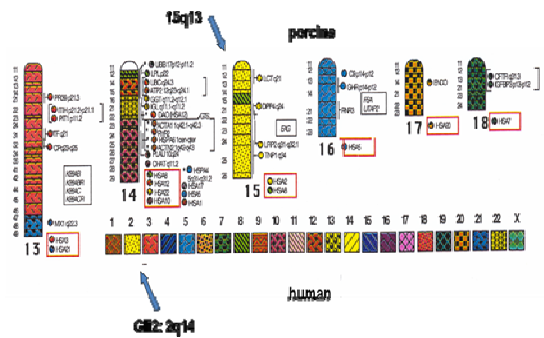
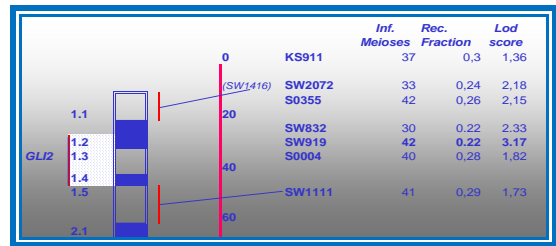




(2) 我々はこれまでに鎖肛ブタモデルによってこの複雑な多因子遺伝の解明に取り組んできた。多因子遺伝の研究には患者対照研究にしても連鎖解析にしても、何千という多数のサンプルが必要になりヒトでは事実上不可能である。我々は自然発症の鎖肛ブタにヒトと同様に手術を施行して救命し、育てた後に交配を繰り返すことによって、通常では0.18%の発症率を61.9%にまで増加させた筑波鎖肛ブタ家系を構築した。筑波鎖肛ブタと全く別の家系であるメイシャンブタを交配しF1を得、F1を筑波鎖肛ブタに戻し交配をしてF2を得た。このバッククロス家系のDNAサンプル (N=545) を遺伝解析に使用した。



(3) 1944年以来、スウェーデン王国ウプサラ大學動物遺伝学教室Leif Andersson教授との国際共同を続けている。これまでの研究により責任遺伝子の主座は15番染色体上にあることが判明した。さらに、ブタ15q13がヒト2q14に相当すること、ヒト2q14はGLI2遺伝子に相当することにより、鎖肛ブタ遺伝子のうちの主たる遺伝子座はGLI2であることがわかった。他の研究グループによる報告でもGLI2遺伝子をノックアウトしたマウスは鎖肛を発症することが証明された。



2. 研究の目的

本研究の目的は、鎖肛の遺伝様式のなかでさらにGLI2遺伝子のどこにどのような変異がおくと鎖肛発症につながるのかについて明らかにすることである。SNPをマーカーとしてGLI2遺伝子における連鎖解析を行い、鎖肛発症に関連する領域を特定していきたい。

3. 研究の方法

(1) 筑波鎖肛ブタ家系のDNAサンプル調整
バッククロス家系 (N=545) の全検体について筑波大学の実験室に-80°Cで保存してある組織検体からFUJIFILMのQuickGene-800を用いてDNAを抽出した。

(2) GLI2遺伝子の塩基配列解析
ヒトGLI2遺伝子の塩基配列をもとにブタやイヌのBLAST (相同塩基配列の探索) からプライマーをデザインしPCRを施行した。塩基配列決定はMegaBACE4000を用いた。

(3) SNPの探索
得られた塩基配列を用いて、ソフトウェアSequencherにより複数のサンプルでContigを作成し、波形を比較、分析しながらSNPを見つけ出した。

(4) Pyrosequencingを用いたSNPタイピングのスクリーニング
同定したSNPの部位で新たにPyrosequence用のプライマーを作成し、約100サンプルについてSNPタイピングを行った。

(5) 高速かつ大量のSNPタイピングと連鎖解析
1サンプルあたり約500のSNPタイピングを全545サンプルに行うためには、高速かつ大量に処理できる方法が必要である。illumina BeadArrayによってこれが可能になった。さらにブタゲノム計画の進行による塩基配列情報とSNP情報をもとに、マーカーに用いる約500のSNP部位を決定しカスタムオーダーにて約250000のSNPタイピング情報を得る。これをもとに連鎖解析を行う。

4. 研究成果

(1) GLI2遺伝子のSNP解析
遺伝子相同性を利用してExon1, 2, 11からそれぞれ766, 846, 900bpの塩基配列を得た。各塩基配列には各々13, 8, 6個のSNPが含まれていた。この結果から本家系におけるGLI2遺伝子領域のSNP頻度は約1%であることがわかった。

exon 1 (789bp)

```
GCACAGGCGCATGATAAATGACTTGAATAAAAAGGGGAAAGAAAGAAATCTAGTCTCCATCTCCAGAGACAAAACTAGTCGT  
GTGGCTCCAGATGGACCGCGCGACACAGGGGGAGGCTCGGCTCCGCCAAGCTTCCGCCAGGATGCTGGGGCGGACAGT  
GGAAACAGAGAGTGTCTCTTTGGGGGAGTAAATGAGAGGCTCGGGCTGTGGAGTCCCTCTGTTATAATAGTGGGCGAGAA  
ATCACCTAAGGACTAAATTCATACCTGAGCCCTCTCATACAGCCAGAGGATCAGAGGAAATCTTCCAAATGTCTTTG  
GGAGCGGGAGGACATCCCGGCTCCCTGGCAGAGCTCAATGTGCGCAGAGACACCCCGAGGCGACCGAGCGAGCCGCGC  
CCTCTTGGCTTTCCTCGGCTGTGTTCGGGCTCTCTGTGTGAGCCGAGATGCCCAATCCACACAGCCCTCCAAITGGGG  
TGGTCAACACCTTAGGTTCCCTTCGGGATCCATACCCCGCTGGAGCCCGAGGATCCAGAACCCAGCAGAGCTGCTTGGAT  
ACAGAGGGCCACAGGCTAATTCATCTGCAAGGGCTATGAGAAAGAACCCCACTCAACCCCGCCAGCCGCGAGGCGAG  
TAAAGTACTCTTGGGAGCTACTCCGGGGCCAGCCGCGAGGCGAGAGGCTTCTCCGCCGCTCAG
```

exon 2 (846bp)

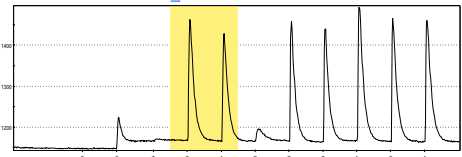
```
ACGGGTTGATGGGGTGGGGAGGTTGAGGCCCGGCTGCAGAGAGAGACACAGCTCATGGATGGGGTGGGGAGGGCTC  
GTGAGGCTAACAGTTTGGGGGACAGAGGACTCCGAGGATCAGATGGGATGCTTCCACTCAGCTCAGCTCAGCTATGCTTTC  
CTCACTCAAGCAGCAGCTGGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
CTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
CATTTGAGCCCTTTTGTCCCTTTTGTGGGGGAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
CTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
CAGGTTTGGAGCCCTCATCTGATGGATACAGCTGGGCTTTCAGCCGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
CTCCAGATCAGAAATCATTTGGGCTAAATAGAGAGCCCATGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
TTTGAATTCACATAAACAGTGGCTAGGCTGACTCCAAATGCAACAGTGGCTTCTCTCTGGGGTGGGCTGGGCTGGGCTGG  
CCACTTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
```

exon 11 (900bp)

```
CTCCCTCCCTCCCGGAGTAACTGGCTGTGTGGGAGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
AGCAGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
AGCAGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
TCCAGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG  
TGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGG
```

また、pyrosequencingを用いて上記SNPについてタイピングを試行した。下記の如く各サンプルの反応は良好であり、DNA検体の調整に問題がないことが確認された。

060721_exon 11 - Well H2
Entry: GLI2exon 11
Position 1: A/A (Passed)



(2) ブタゲノムデータベースを利用したSNPタイピングと連鎖解析
ブタゲノム計画の進行により illumina BeadArray を用いて高速に大量のSNPタイピングが可能になった。現在タイピングの対象となるSNPを探索中である。SNPgenotypeが得られたら、これを用いて鎖肛に関する連鎖解析を行い鎖肛に関連する変異部位を特定していく予定である。

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)

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 寿美 (KUDOU SUMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50375507

(2) 研究分担者

堀 哲夫 (HORI TETSUO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：80173615

(3) 連携研究者

なし

