

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2010

課題番号：22890041

研究課題名（和文）

次世代シーケンサーを用いたパーキンソン病の遺伝子に関する研究

研究課題名（英文）

Identifying susceptible genes for Parkinson disease employing next-generation sequencer

研究代表者

三井 純 (MITSUI JUN)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70579862

研究成果の概要（和文）：

パーキンソン病患者サンプル64例を8×8のマトリックスに配置し、各8行各8列についてサンプルをプーリングした。候補となるライソゾーム遺伝子6遺伝子について、それぞれのプールDNAをPCRにて増幅し（合計24kb相当の領域）、ライブラリーを作成し、IlluminaGAIIxシングルエンド100塩基の解析にて各ライブラリーあたり1レーン相当の解析を行った。アレルあたり1,000~2,000のdepthに相当する塩基配列が得られた。dbSNPに多型として登録のない変異に着目して、マトリックスによる整数計画法を用いて変異とそのサンプルを同定した。検索した範囲で3個の変異が同定され、いずれも64例中1例にヘテロ接合性に認められた。うち1個の変異はライソゾーム病の病原性変異として報告のある変異であり、うち2個の変異は多型・病原性変異データベースに登録のない変異だった。これらの変異が真の変異かどうかを直接塩基配列決定にて解析したところ、いずれの変異・サンプルとも正しいことを確認できた。本解析により、(1). 十分なdepthがあれば、8サンプルのプーリングは変異同定において現実的な手法である。(2). 整数計画法によるエラーの補正は有用である。(3). マトリックスによるプーリングによってバーコードを用いずにサンプルと変異の対応が可能であることが示唆された。

今後は、変異を認めた遺伝子について、さらに大規模なサンプルで塩基配列解析を行い、パーキンソン病の遺伝子検索を進める。

研究成果の概要（英文）：

To identify susceptible genes for Parkinson disease, comprehensive resequencing analysis of candidate genes (responsible genes for lysosomal storage disease) employing a next-generation sequencer was conducted. We arranged 64 DNA samples of patients with Parkinson disease in an 8x8 rectangular array, and formed the pooled DNA sample sets by each row and column (8 rows and 8 columns). Each pooled DNA sample set was subjected to PCR amplifications of candidate genes (approximately 24 kb in total) and every amplicons for each set were mixed. The mixed amplicons for each set was subjected to an analysis of single lane of Illumina GAIIx, single-end, 100bp, according to manufactures' instructions.

Reads were aligned to the reference sequences (hg19) of candidate genes by BWA with default parameters, and approximately 1,000-2,000 coverage per allele was obtained. Only 50 bp of reads with more than 20 of QV were used to screen variants. We specifically focused on rare variants not registered in dbSNP, and searching for such variants employing an integer programming algorithm. The results were that 3 variants not registered in dbSNP were obtained; each variant was identified in three different samples in the heterozygous state. All of them were nonsynonymous single nucleotide substitutions. One was reported to be pathogenic for a lysosomal storage disease, and two were unknown variants. All variants were confirmed by an additional direct nucleotide sequence analysis (Sanger method).

Based on these results, it was suggested that the matrix pooling approach is an accurate and cost effective testing algorithm for detection of rare variants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：ゲノム，神経内科学

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病（以下，PD）は頻度の高い（60歳以上の高齢者の1%以上）神経変性疾患である。単一遺伝子が原因の家族性PDの原因遺伝子はいくつか同定されているが，PDの90%以上が孤発性でありその病態・病因は長らく不明である。近年，頻度の高い多型を用いたゲノムワイド関連解析（GWAS）が広く行われ，PDについてもいくつかの疾患感受性遺伝子の候補が同定されている（Nat Genet. 2009;41:1303-7, Nat Genet. 2009;41:1308-12）。しかしそのオッズ比は1.2-1.5倍程度で，PDの遺伝因子は十分に解明されていない。

それに対して申請者らが報告したGBA遺伝子は，変異キャリアーのオッズ比が28倍と非常に強く，孤発性PDの約10%がキャリアーという，これまでの疾患感受性遺伝子とはけた違いの影響度を持つ遺伝因子であることが示された（Arch Neurol. 2009;66:571-6）。さらに申請者らも参加した国際多施設共同研究において，人種に関わらず孤発性PDの最も強い遺伝因子であることが確認された（N Engl J Med. 2009;361(17):1651-61）。

GBA遺伝子の日本人一般集団における変異の頻度は非常に低く（キャリアー頻度 1/300-400），変異が多様であるため，GWASでは検出が困難であり，稀な変異の同定には配列解析（リシーケンス）に基づく関連解析が必要である。このような疾患と関連する多様で稀な変異には，未解明の遺伝因子が多く存在すると予想され，リシーケンスに基づく解析が必要であるという点が本研究を提案する理論的背景となっている。この研究パラダイムを実現するために，次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンシングを実施する。

2. 研究の目的

現時点では，疾患と関連する多様で稀な変異を同定する，大規模シーケンシングの方法論の方向性は2つあると考えている。

- (1) ゲノムの全エクソン領域をキャプチャーして，小から中規模サンプルで関連解析を行う
- (2) 特定の候補遺伝子群について大規模サンプルで関連解析を行う。

将来的にシーケンスコストが著しく低下すれば，1のようなdata-drivenなアプローチが現実化するだろうが，現時点ではコストの面で容易ではない。2はhypothesis-drivenであり何らかの手がかりを要するが，申請者らは既に，PDと関連するGBA遺伝子変異が全てグルコセレブロシダーゼ酵素（ライソゾームで働く糖脂質を分解する酵素）の活性を障害する変異であることを示しており（Arch Neurol. 2009;66:571-6），その酵素活性低下がPDの病態と関連することを示している。さらにライソゾーム関連の別の2-3遺伝子を対象にした小規模サンプルによる予備検討にて，PDと関連する可能性のある遺伝子の知見を得ている。このような独自の知見から，ライソゾーム関連遺伝子がPDと関連するという仮説は蓋然性が高いと考えており，それを踏まえてこれまでの研究をライソゾーム関連遺伝子に拡大して解析を行うことを提案する。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用いた大規模サンプルの解析手段として，

- (1) サンプルのpooling,
- (2) バーコードによるサンプルの

indexing,

(3). 物理的な segmentationなどが考えられる。

申請者らはすでに次世代シーケンサー SOLiD2 システムを用いて検討を行い、平均エラー率は非常に低いものの（ミスコールするリードの比率が平均 0.2%程度）、サイクル数の後半でエラーの頻度が高くなること、特定の塩基でミスコールする比率が例外的に高くなる（ミスコールするリードの比率が 5~10%）ことを見出し、エラーを軽減するためのフィルターを検討している。サイクル数に依存するエラーについてはサイクル数を選択することで、塩基のコンテキストに依存するエラーについては、リードのストランド・バイアスを考慮してフィルターをかけることで大幅に軽減することができた。その結果、サンプルの pooling については、5-10 程度が可能と結論でき、スループットが大幅に改善した。また、バーコードによるサンプルの indexing については、リードのロスも少なく、バーコード間のリードのばらつきも比較的小さいため有用であると結論できた。このような知見は、実験デザイン、エラーの頻度の予想・フィルターの設計を決定する上で必要不可欠である。

4. 研究成果

パーキンソン病患者サンプル 64 例を 8×8 のマトリックスに配置し、各 8 行各 8 列についてサンプルをプーリングした。候補となるライソゾーム遺伝子 6 遺伝子について、それぞれのプール DNA を PCR にて増幅し（合計 24kb 相当の領域）、ライブラリーを作成し、IlluminaGAIIx シングルエンド 100 塩基の解析にて各ライブラリーあたり 1 レーン相当の解析を行った。アレルあたり 1,000~2,000 の depth に相当する塩基配列が得られた。dbSNP に多型として登録のない変異に着目して、マトリックスによる整数計画法を用いて変異とそのサンプルを同定した。

検索した範囲で 3 個の変異が同定され、いずれも 64 例中 1 例にヘテロ接合性に認められた。うち 1 個の変異はライソゾーム病の病原性変異として報告のある変異であり、うち 2 個の変異は多型・病原性変異データベースに登録のない変異だった。これらの変異が真の変異かどうかを直接塩基配列決定にて解析したところ、いずれの変異・サンプルとも正しいことを確認できた。本解析により、(1). 十分な depth があれば、8 サンプルのプーリングは変異同定において現実的な手法である。(2). 整数計画法によるエラーの補正は有用である。(3). マトリックスによるプーリングによってバーコードを用いずにサンプルと変異の対応が可能であることが示唆

された。

今後は、変異を認めた遺伝子について、さらに大規模なサンプルで塩基配列解析を行い、パーキンソン病の遺伝因子検索を進める。

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] (全て査読あり 計 4 件)

- ① Matsukawa T, Wang X, Liu R, Wortham NC, Onuki Y, Kubota A, Hida A, Kowa H, Fukuda Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Aoki S, Takizawa S, Shimizu J, Goto J, Proud CG, Tsuji S. Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in EIF2B2, EIF2B3, and EIF2B5. *Neurogenetics*. 2011 (PMID:21484434)
- ② Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics*. 2011;12(2):117-21.
- ③ Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice A, Hattori N, Tsuji S. Mechanisms of genomic instabilities underlying two common fragile-site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines. *Am J Hum Genet*. 2010 ;87(1):75-89.
- ④ Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing using next-generation sequencer. *J Hum Genet*. 2010;55(7):448-55.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 三井 純, 土井 晃一郎, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 森下 真一, 辻省次. 疾患と関連する稀で多様な変異の検出を目的とした pooled DNA 解析. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月 20 日.

- ② 三井 純. 孤発性疾患の研究 ～パーキンソン病～. 第52回日本神経学会学術大会, シンポジウム. 名古屋, 2011年5月19日.
- ③ Mitsui J, et al. Case-control association study of PARK2 exon rearrangements in Parkinson disease using an array comparative genomic hybridization analysis. American Society of Human Genetics. Washington D. C., U. S. A. 2010. 11. 4
- ④ 三井 純. 孤発性パーキンソン病の遺伝子: common disease-multiple rare variants. 第51回日本神経学会総会, シンポジウム. 東京, 2010年5月20-22日.
- ⑤ 三井 純, 高橋 祐二, 後藤 順, 齊藤 祐子, 村山 繁雄, 辻 省次. アレイCGHを用いたPARK2欠失・重複変異検出によるパーキンソン病の関連解析. 第51回神経学会総会, 東京, 2010年5月20-22日.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 純 (MITSUI JUN)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 70579862

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: