

全ゲノム連鎖解析法による疾患感受性遺伝子座の検索

伊藤清子¹、有波忠雄²

¹筑波大学人間総合等教育研究支援室(医学系)、²筑波大学基礎医学系

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

全ゲノム連鎖解析法は、多因子疾患の原因遺伝子座や感受性遺伝子座を全染色体上にくまなく検索する方法である。多因子疾患は、複数の遺伝因子と環境因子の影響により発症する。多因子疾患である小児気管支喘息の感受性遺伝子座の検索を目的として、染色体全域に存在するマイクロサテライト (MS) マーカーを約 10 cM 間隔で選択し、疾患との連鎖の有無を調べた。連鎖の統計解析には、ノンパラメトリック法の一つである罹患同胞対法を用いた。その結果、第 4 染色体 (4q35)、第 5 染色体 (5q31-33)、第 6 染色体 (6p22-21.3)、第 12 染色体 (12q14-24.2) と第 13 染色体 (13q14-14.3) のそれぞれの領域に小児気管支喘息との連鎖が見られ、この領域が感受性遺伝子座である可能性が示唆された^[1]。

1. はじめに

近年、多くの疾患感受性遺伝子が、分子遺伝学的手法の発達とヒトゲノムプロジェクトの進行により明らかになってきている。

疾患感受性遺伝子を同定する主な研究方法には、連鎖解析法と候補遺伝子解析法がある。連鎖解析法は、その疾患を発症している構成員を含む家系を対象として、発症に強い影響を与える遺伝子座を染色体上に見い出すことを目的としている。候補遺伝子解析法は、その遺伝子上に存在する多型と疾患との相関を明らかにすることを目的としている。

今回報告する全ゲノム連鎖解析法は、疾患との連鎖の有無を染色体全域にわたって検討する方法であり、疾患感受性遺伝子を同定するための検索法として広く用いられている。

2. 目的

全ゲノム連鎖解析法を用いて、染色体全域にわたって小児気管支喘息感受性遺伝子座を検索する。

3. 方法

3.1 対象

日本人の小児気管支喘息を有する 2 人以上の子ども (同胞) がいる家系を対象とした。対象数は 47 家系 197 人で、罹患同胞は 65 対である。本研究は、筑波大学倫理委員会で承認された方法で、本人および親よりインフォームドコンセントを得て行った。

3.2 遺伝子解析

3.2.1 DNA の抽出

EDTA 加採血を行った静脈血 10 ml を 2,000 rpm で 10 分遠心後、血漿成分と血球成分に分離し、Kunkel らの方法^[2] に従い、この血球成分から高分子の DNA を抽出した。遠心分離して得られた血球成分を 9 倍量の抽出液 (0.32 M sucrose、5 mM MgCl₂、1% TritonX-100、10mM Tris-HCL、pH7.6) に希釈後、3,000 rpm で 15 分遠心して核分画を得た。この核分画を 3 ml の proteinase K 用緩衝液 (10 mM Tris-HCL、10 mM EDTA、10 mM NaCl、pH 8.0) に浮遊させた後、最終濃度 0.5 % になるように SDS を加えて核膜を破壊した。次に、0.6 mg の proteinase K を加え、37 °C で一晩反応させてタンパク質成分を分解した。さらに Phenol 処理による除タンパク後、透析液 (10 mM Tris-HCL、1 mM EDTA、pH 8.0) に透析し Phenol を完全に除いた。次に、RNase を最終濃度 100 µg/ml になるように加え、37 °C で 1 時間反応させて RNA を分解した。さらに proteinase K 反応、Phenol 処理、透析を繰り返した。

抽出した DNA は分光光度計で測定し、 $1OD_{260}=0.055 \text{ mg/ml}$ として DNA 濃度を計算し、最終濃度 10 ng/ml になるように TE (10mM Tris-HCL、1 mM EDTA、pH 8.0) で調整し、4°C で保存した。

3.2.2 遺伝マーカーの選択

全ゲノム連鎖解析法は、遺伝マーカーとして全染色体上に存在する一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism : SNP)、あるいは単純な繰り返し配列であるマイクロサテライト (MS) を用いて行われる。今回、我々は MS マーカーを用いた。MS マーカーは 1 から 4 塩基程度の配列単位で反復しているもので、反復数が個体間で異なることが多く、しかも反復数がさまざまに対立遺伝子が多いため遺伝子マーカーとしては有用なものである (図 1)。

染色体全域に存在する MS マーカーを全染色体上でほぼ均等 (約 10cM) になるように選択し、それら MS マーカーすべてについてサイズが 100 ~ 400 bp になるように PCR プライマーを作成した。さらに PCR プライマーの上流側の 5' 末端に蛍光色素の FAM (青)、HEX (緑) または TET (黄) を標識し、

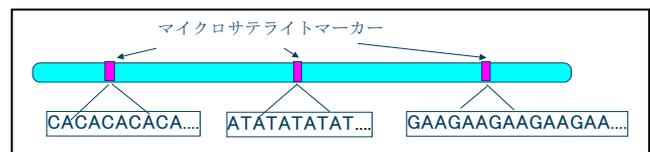


図 1 染色体上に点在する MS マーカー

それぞれの MS マーカーを区別できるようにした。本研究では、リサーチジェネテイクス社のヒューマンリンケージマッピングスクリーニングセット ver.8 を用い、全染色体で 386 ヶ所の MS マーカーを検討した。内訳は、第 1 染色体 30 ヶ所、第 2 染色体 28 ヶ所、第 3 染色体 25 ヶ所、第 4 染色体 21 ヶ所、第 5 染色体 23 ヶ所、第 6 染色体 19 ヶ所、第 7 染色体 20 ヶ所、第 8 染色体 19 ヶ所、第 9 染色体 16 ヶ所、第 10 染色体 20 ヶ所、第 11 染色体 15 ヶ所、第 12 染色体 18 ヶ所、第 13 染色体 11 ヶ所、第 14 染色体 14 ヶ所、第 15 染色体 12 ヶ所、第 16 染色体 14 ヶ所、第 17 染色体 15 ヶ所、第 18 染色体 14 ヶ所、第 19 染色体 10 ヶ所、第 20 染色体 10 ヶ所、第 21 染色体 6 ヶ所、第 22 染色体 6 ヶ所、性 (X,Y) 染色体 21 ヶ所である。

3.2.3 PCR 反応 (Polymerase Chain Reaction)

上記の PCR プライマーを患者の DNA 増幅に用いた。DNA と PCR プライマーを含む反応液 10 μ l を下記のように 96 穴 PCR プレート上に調整し、DNA 増幅器 (Gene Amp PCR System 9600、Applied Biosystems [ABI]) にて増幅させた。

反応組成液	
10xBuffer (ABI)	1.0 μ l
10mM dNTP mix	0.8 μ l
25 mM MgCl ₂	0.8 μ l
Forward Primer	0.3 μ l
Reverse Primer	0.3 μ l
Taq polymerase (ABI)	0.04 μ l
Template DNA	0.8 μ l
滅菌蒸留水	5.96 μ l

PCR 反応は、95°C で 5 分間の鋳型 (Template) DNA の変性後、94°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒の変性、アニーリング、伸長を 10 回繰り返す、さらに 91°C で 15 秒、55°C で 15 秒、72°C で 30 秒の変性、アニーリング、伸長を 25 回繰り返す、最後に 72°C 10 分間の DNA 伸長を行った。

3.2.4 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

MS マーカーそれぞれについて増幅させた患者の DNA (PCR 産物) を熱変性後、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、遺伝子型を決定した。電気泳動には DNA シークエンサー (ABI PRISM™ 377) を

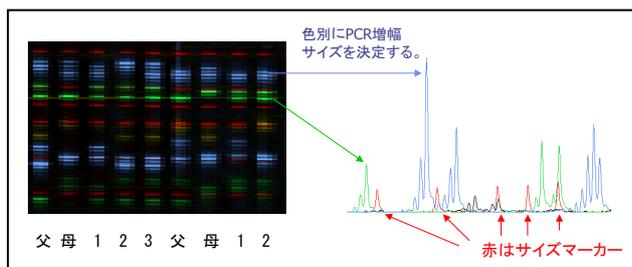


図 2 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による MS マーカー遺伝子型決定の原理

用いた。ゲル板は、36 cm のガラス板に 4% アクリルアミドゲル溶液 30 ml (尿素 10.8 g、5xTBE [0.5M Tris-boric acid、10 mM EDTA] 6 ml、40% アクリルアミド液 [38% acrylamide、2% methylene bis-acrylamide] 3 ml、10% 過硫酸アンモニウム 150 μ l、TEMED 15 μ l) を流し込んで作製した。コームは 36 well コームを使用した。蛍光 (FAM、TET、HEX) とサイズ (bp) が重ならないように遺伝マーカーを選んで、1 つのレーンに 8~9 種の PCR 産物を同時に泳動できるようにした。FAM、TET で標識された PCR 産物は 10 分の 1 に、HEX で標識された PCR 産物は 5 分の 1 になるように希釈混合し、混合液 1 μ l にホルムアミド 1.5 μ l、Blue Dextran (50 mM EDTA、50 mg/ml Blue Dextran) 0.3 μ l、サイズスタンダードの GS-500 TAMURA (ABI) 0.3 μ l を加え、95°C で 5 分間の熱変性を行った後、急冷し 1 本鎖 DNA にした。この 1 本鎖 DNA をサンプルとして 1 レーンあたり 2.5 μ l ずつ泳動した。この 1 本鎖 DNA が、そのサイズ (bp) によりゲル上に分離され、MS マーカーの繰り返し配列の数によって 2~4 bp の倍数の差で検出された (図 2)。

3.2.5 遺伝子型の判定

サンプルの 1 本鎖 DNA と同時に泳動したサイズスタンダード GS-500 TAMURA を基準として、目的の MS マーカーのサイズを相対的に求めた (図 2)。GENESCAN™ software (ABI) と GENOTYPER software (ABI) の両方で波形を見ながら、親子間のサイズを確認し、各 MS マーカーの遺伝子型を決定した (図 3)。

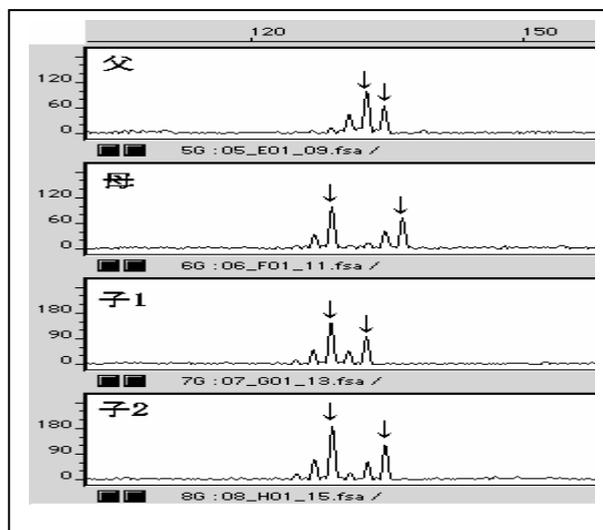


図 3 親子間の MS マーカーの遺伝子型

3.3 統計解析

3.3.1 連鎖解析法

家系を用いた連鎖解析には、パラメトリック法解析とノンパラメトリック法解析がある。ノンパラメトリック法解析は、遺伝形式を規定しないで解析することができるため、多くの遺伝子と環境が複雑にからみあって発症する多因子疾患の感受性遺伝子の同定に広く用いられている。

今回、我々が対象とした小児気管支喘息は多因子疾患であるので、ノンパラメトリック法にて解析した。しかも、ともに患者である同胞とその両親からなる家系を対象としているので、ノンパラメトリック法解析の一種である罹患同胞対解析を行った。

罹患同胞対解析では、患者である子ども達すべてが必ずしも疾患の原因となる感受性遺伝子を持っているとは限らないが、同胞がともに親から感受性遺伝子を受け継いでいる可能性が高く、そのため疾患と連鎖している領域では、対立遺伝子を偶然より高い確率で共有していることが期待される。故に、疾患と MS マーカーの連鎖の有無を解析することによって、疾患感受性遺伝子座を検索できる。実際には、小児気管支喘息と MS マーカーとの連鎖を、同胞間で観察された共有する同祖遺伝子 (alleles identical by descent, IBD) の割合から、多点ノンパラメトリックスコアである MLS (multipoint maximum lod score) を求めた。解析にはコンピュータプログラム MAPMAKER/SIBS ver2^[3] を用いた。

3.3.2 連鎖の可能性を示す基準

本研究では、E.Lander らの提唱した多因子疾患の全ゲノム検索の判定基準^[3]に従い、Lod (logarithm of odds) 値 3.6 以上を有意な連鎖、Lod 値 2.0 以上を有意な連鎖を示唆する基準とした。なお、Lod 値は、2つの遺伝子座が連鎖している可能性としない可能性の比であるオッズ (odds) 比の対数値で表される。Lod 値 3.0 は、連鎖している可能性がしないものより 1000 倍高いことを意味する。

4. 結果と考察

全ゲノム連鎖解析法により、小児気管支喘息の感受性遺伝子座を染色体全域にわたり検索した結果を図 4-1、4-2 に示した。疾患との連鎖の可能性を示す領域は、第 4 染色体 (4q35、lod 2.74)、第 5 染色体 (5q31-33、lod 4.52)、第 6 染色体 (6p22-21.3、Lod 2.13)、第 12 染色体 (12q14-24.2、Lod 2.0) と第 13 染色体

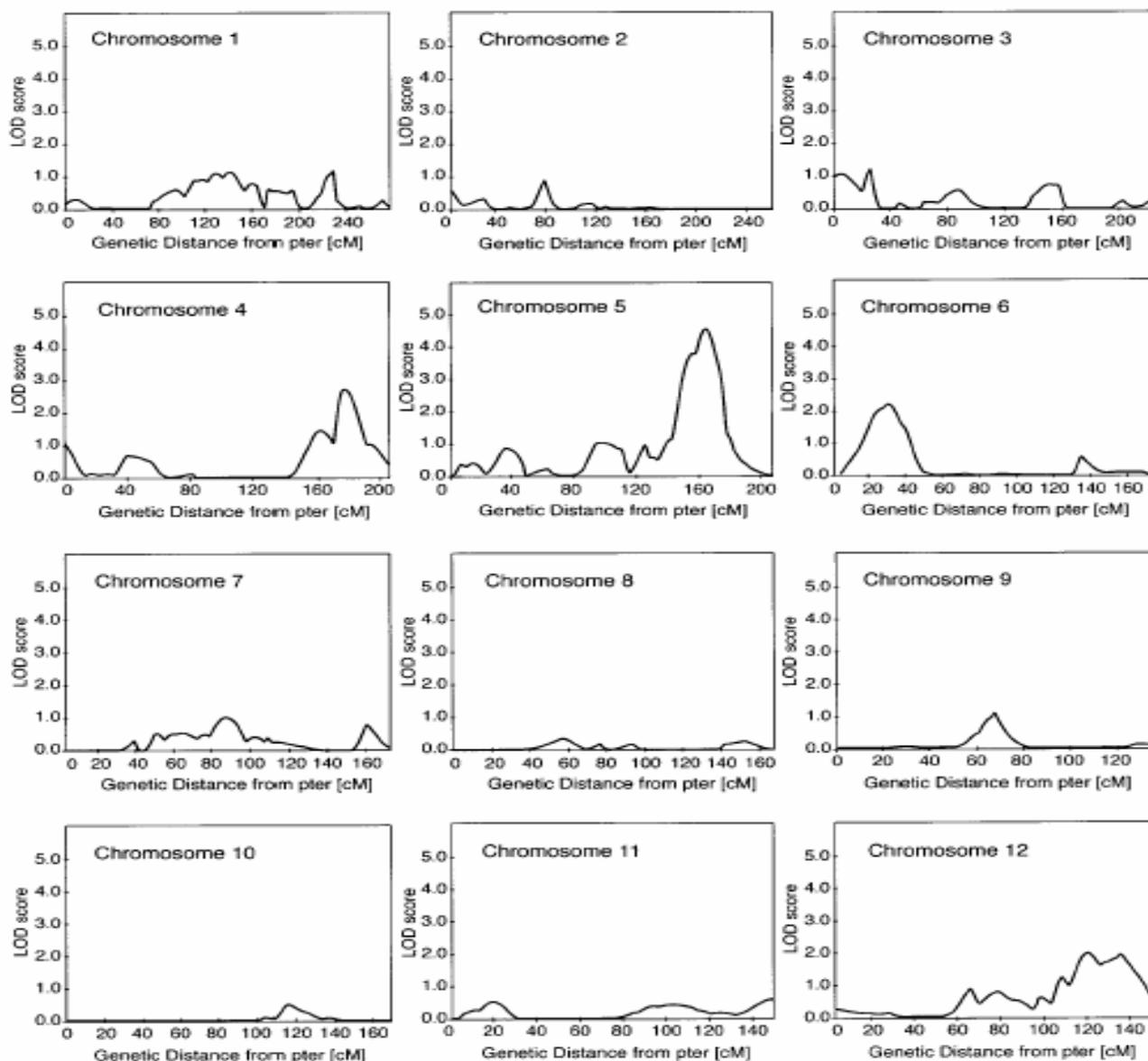


図 4-1 小児気管支喘息患者の全ゲノム解析の結果 各染色体ごとの結果を示した。縦軸は MLS (Lod) 値を示し、横軸はテロメア側からの MS マーカーの距離 (cM) を示した。

(13q14-14.3、Lod 2.82) にそれぞれ見られた。この領域に、疾患発症にかかわる遺伝子が存在している可能性が示唆された。そこで我々は、これら領域をさらに細かく分析し、この領域に存在し疾患との関与が考えられる候補遺伝子を解析した。これまでに第6番染色体上にあるTNF^[4]、PAFAH^[5]などの遺伝子が小児気管支喘息に関連していることを見出し、疾患感受性遺伝子として報告している。

このように全ゲノム連鎖解析法は、疾患感受性遺伝子座の検索に有用である。現在、我々はこの方法により花粉症、精神疾患などの感受性遺伝子の検索を行っている。

参考文献

- [1] Y. Yokouchi, E. Noguch, S. Ito, T. Arinami, et al., Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12B locus by a genome-wide search in Japanese families, *Genomics* 66 (2000) 152-160.
- [2] L. M. Kunkel, K. D. Smith, S. H. Boyer, D. S. Bargaonkar, et al., Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants, *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 1245-1249.
- [3] E. Lander, L. Kruglyak, Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results [see comments], *Nat Genet* 11 (1995) 241-247.
- [4] E. Noguchi, Y. Yokouchi, M. Shibasaki, T. Arinami, et al., Association between TNFA polymorphism and the development of asthma in the Japanese population, *Am J Respir Crit Care Med* 166 (2002) 43-46.
- [5] S. Ito, E. Noguchi, T. Arinami, et al., Evidence for an association between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency and increased risk of childhood atopic asthma, *J Hum Genet* 47 (2002) 99-101.

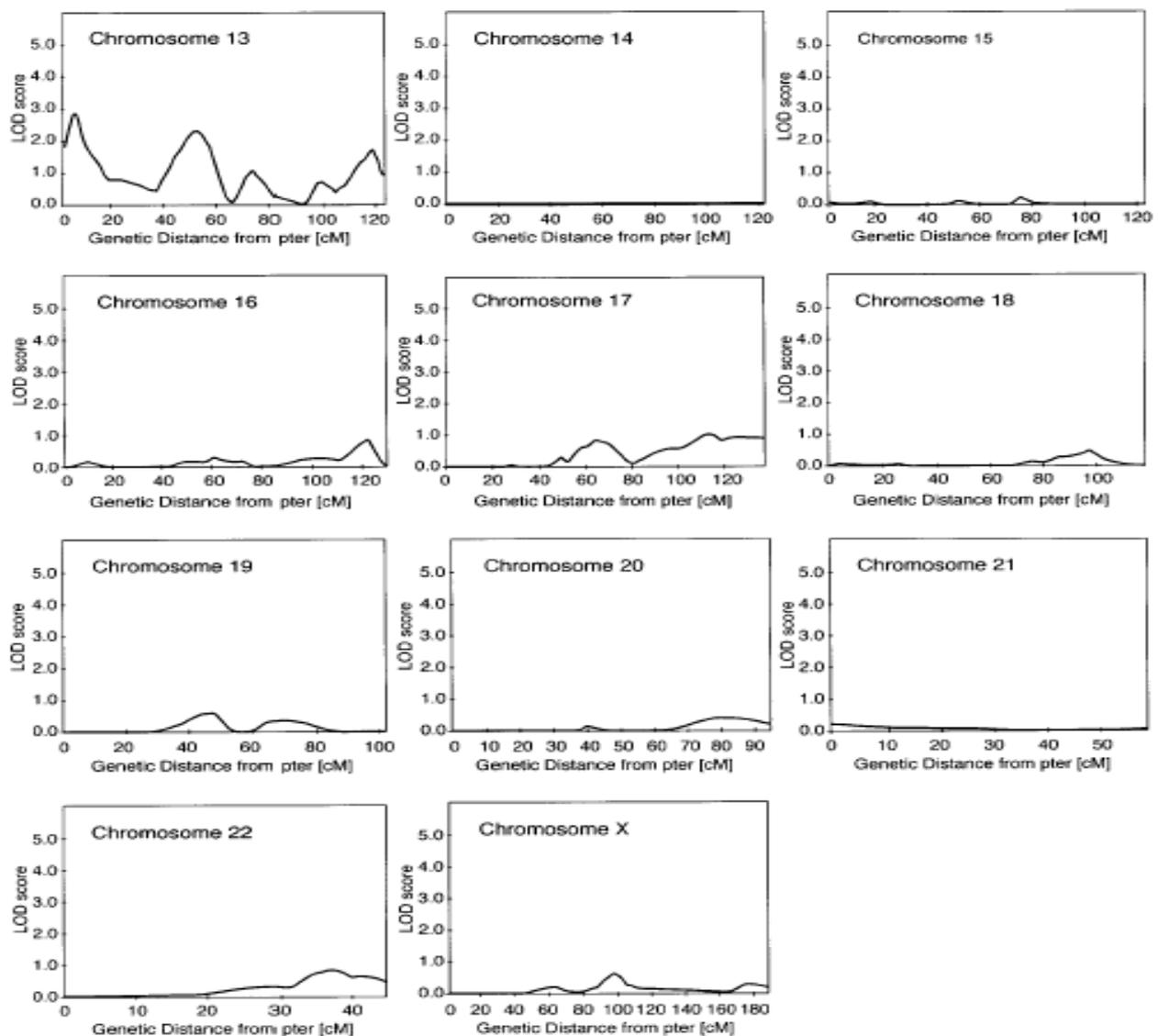


図 4-2 図 4-1 の続き