脳神経外科における的確な遺伝子診断のための手法

宮田 敏行

Genetic Diagnosis

by

Toshiyuki Miyata, Ph.D.

from

Department of Etiology and Pathogenesis, National Cardio-vascular Center Research Institute

Recently, attention has been focused on single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are useful not only as markers for human genetic studies because of their high density, but also because they make it easy to perform large-scale genotyping using high-throughput methods. Monitoring SNPs may help gene hunters to trace sequences associated with susceptibility to common diseases. A large number of SNPs are deposited in the public database, dbSNP at the U. S. National Center for Biotechnology Information. We validated 525 candidate SNPs by DNA sequencing of samples from Japanese individuals, and a total of 143 SNPs (27%) were identified. In Japan, the JSNP project is underway and many SNPs have been identified. In the near future, the genotyping of SNPs will identify the susceptible genes of common diseases.

(Received July 29, 2002; accepted September 24, 2002)

Key words : single nucleotide polymorphism, microsatellite DNA, JSNP, SNP

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 12 : 156-160, 2003

はじめに

ヒトゲノムの全解読を目指す“ヒトゲノム計画”は、2000年3月の「ヒトゲノム配列は人類共通の財産である」というクリントン・ブレア声明、2000年6月のクリントン大統領が主催した国際チームとセセラ・ジェノミクス社の共同記者会見と続き、ついに2001年2月には、Nature誌とScience誌にヒトゲノム概要配列が発表された。このように、ヒトゲノム構造は、当初の予想より早く明らかになった。そして現在では、ゲノム研究はポストゲノムの時代、すなわちゲノム情報を基盤とした研究へとシフトしつつあるように見える。

本稿の主題である遺伝子診断の手法を用いて、ヒト疾

患を診断し治療することは、ポストゲノム研究に位置するが、その前にまず国際チームとセセラ社が発表したヒトゲノム概要配列を簡単に紹介したい¹⁾⁴⁾。

ヒトゲノムの概要配列

Table 1は国際チームとセセラ社が発表したヒトゲノム概要配列の比較である。国際チームが決定した塩基数は、セセラ社のものとほぼ同じであるものの、位置不確定な断片が全体の0.6%と少なく、重複しつつ連続したクローン化DNAの集合体であるコンティグ数もセセラ社より少ない。すなわち国際チームの概要配列の方が、つながりが大きいことを示している。また国際チームは、

国立循環器病センター研究所 病因部 〒565-8565 吹田市藤白台5-7-1〔連絡先：宮田敏行〕

Address reprint requests to: Toshiyuki Miyata, Ph.D., Department of Etiology and Pathogenesis, National Cardio-vascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita-shi, Osaka 565-8565, Japan

Table 1 Human genome draft sequence¹⁾⁴⁾

	International Consortium	Celera Genomics
Number of base pairs	2.72 billion bp	2.65 billion bp
Covered region	85%	83%
Strategy	hierarchical shotgun sequencing	whole genome shotgun sequencing
Number of genes	31,000	26,383~39,114
SNPs identified	140 million	210 million
Sequence accuracy	99.99%	99.96%
Number of unpositioned fragments	0.6%	8.7%
Number of contigs	6,094	54,061

この後も既存クローンの完全配列化と残存ギャップ領域を埋め、連続クローン化への努力を行っている。

さて、この概要配列の発表で最もインパクトが大きかったことは、両グループともにヒト遺伝子の数を3万個程度と見積った点であろう。これは、予想されていた数よりかなり少なく、大きな驚きをもって迎えられた。しかしこの数は、理研グループが、21 番染色体の配列を決定した際に提案した数に一致していた²⁾。両グループの遺伝子を比べると、約 1.5 万個は共通であったものの、それ以外の遺伝子は、研究グループにより独自に遺伝子であると予想されたものであることが判明した。このことは、未知の遺伝子を予測する方法のむずかしさを示している。

このように、概要配列といえどもヒトゲノム配列が明らかとなり、それを基にして遺伝子が明らかになると、遺伝子であると予想されるものの、その機能が見当たらないもののがかなり多くある（セレラ社のデータでは約 40%にのぼる）ことが判明した。このことは、疾患を対象として、その原因遺伝子を探る研究に大きな問題を提示した。すなわち、疾患の原因遺伝子を究明するには、これまでは遺伝子産物である蛋白質の機能を考慮して、疾患の原因遺伝子に迫るアプローチ（候補遺伝子アプローチ）が主流であった。しかしこの手法では、機能未知遺伝子は対象となりえない。そこでゲノム情報を利用して、網羅的に原因遺伝子に迫るアプローチ（ホールゲノム・アプローチ）の有用性が指摘されるようになった。

マイクロサテライト多型と 1 塩基多型

ホールゲノム・アプローチは、ゲノム上に存在するゲノムの多様性を利用する。このゲノムの多様性は、マイクロサテライト多型と 1 塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)に分けられる。ゲノムには、2~4 塩基を 1 単位とする配列が繰り返す多型が存在する。この多

型はマイクロサテライト多型とよばれる。CA 反復配列から成るマイクロサテライト多型は、ヒトゲノム上に約 22 万カ所存在し、反復回数の違いにより、対立遺伝子が 10 種以上に及ぶこともある。

一方、SNP は 1 塩基の配列が異なるため、対立遺伝子は 2 つであるが、ヒト全ゲノム上にきわめて多数（300 万~1,000 万カ所）存在するといわれている。マイクロサテライト多型は、遺伝子マーカーとして利用されるのに対し、SNP は疾患の責任変異である可能性が高い。

SNP はヒト集団内に一定以上の頻度（通常 1%以上）で存在するものを指す。SNP は 1 塩基が異なるだけなので、情報量はマイクロサテライト多型に比べ少ないが、その数はきわめて多く、100~300 塩基に 1 カ所存在するといわれる。また、タイピングの自動化が可能であるので、疾患感受性遺伝子などを遺伝学的に調べる際の、染色体上の位置マーカーとしても利用される。このように SNP は多因子疾患の原因遺伝子の同定に使用され、医学の分野での使用が期待されている。

SNP の公開データベース

SNP はインターネットでアクセス可能な公開データベースに保管されている。最も大規模なデータベースは、米国の National Center for Biotechnology Information が管理している dbSNP データベース（最近 Entrez SNP に名称を変更した）である。現在 267 万 SNP が登録されている。ここに集められた SNP は、ゲノム配列を決定する際のオーバーラップクローンの配列から見出されたものが多く含まれているので、その信頼性を疑問視する声もある。そこでわれわれは、高血圧に関連する遺伝子（179 遺伝子）の 525 個の SNP を dbSNP データベースから抽出し、日本人 32 人にその多型が存在するかどうかを調べた（Table 2）。その結果、143 SNP は日本人に存在し、5%以上の頻度を示す 116 SNP を同定した⁵⁾。すなわち、

Table 2 Allele frequency of 159 SNPs in 93 hypertension candidate genes in Japanese⁵⁾

Minor allele frequency	Number of SNPs	Number of new SNPs	Number of total SNPs
1.0~5.0%	27 (5%)	13	40
5.1~25.0%	53 (10%)	3	56
25.1~50.0%	63 (12%)	0	63
Total	143 (27%)	16	159

SNP: single nucleotide polymorphism

(): % of the total SNPs ($n=525$)

dbSNP データベースに格納されている SNP のうち、27% しか日本人に同定できなかった。このことは、dbSNP データベース中の SNP の多くは日本人には存在しないか、もしくはその頻度はきわめて低いと考えられた。

日本で行われている Japanese SNP (JSNP) は、遺伝子のエクソンとプロモーター領域にしぼってシーケンスを行い、これまでに 16 万以上の SNP を同定し、48,000 以上の SNP の頻度情報を公開している (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>)³⁾。これは遺伝子の機能に関与すると考えられる領域をシーケンスし、SNP を同定しているため、その精度はきわめて高く、かつ重要な SNP が含まれている可能性も高い。また、日本人集団を用いて各 SNP の頻度も求めている。SNP の頻度を求めるためのタイピング方法は、後述するインベーター法を改良して用いている。それは、マルチプレックス polymerase chain reaction (PCR) で一度に 96 SNP 部位を増幅し、独自に開発した分注機で分注後、インベーター法を用いてタイピングするというものである。この方法では 1 つの SNP のタイピングに、わずか 0.4 ng の DNA を使用するだけであり、20 万 SNP 部位のタイピングでも、100 μ g の DNA で可能である⁶⁾。理化学研究所では、この高速タイピング法を用いて、疾患を対象に SNP タイピングが進行中であり、その成果が待たれるところである。

ハプロタイプブロック

SNP が接近している場合、SNP 間で連鎖不平衡を示すことがある。連鎖する複数の座位のアレルのうち、1 つの配偶子に存在するものの組み合わせをハプロタイプという。ハプロタイプは、減数分裂の段階で組換えがないかぎり保存される。疾患関連遺伝子の解析においては、遺伝子マーカーのアレル頻度とハプロタイプの作成ならびに頻度が重要である。全ゲノムにわたってタイピング

Table 3 SNP blocks in chromosome 21⁷⁾

Common SNPs/ block	No. of blocks	Avg. size/ block (kb)	Avg. no common haplotypes/ block
>10	589	23.90	3.75
3 to 10	1,408	8.52	2.92
<3	2,138	2.96	2.30
Total	4135	7.83	2.72

A total of 24,047 SNPs are classified into the SNP blocks.

No.: number Avg.: average

を行い、疾患遺伝子を同定する際、200 万カ所あるといわれる SNP のすべてをタイピングすることは、予算と時間を考えると得策ではない。そこで連鎖不平衡を考えてハプロタイプを明らかにして、ハプロタイプを区別するために SNP タイピングを行うべきであるといわれている。

このハプロタイプが保存されている領域は、数 kb のものから数百 kb 以上のものまでであることが判明している。つまりこのような領域内では、連鎖不平衡が成り立っているため、ハプロタイプを調べることが重要である。第 21 番染色体全域の 24,047 SNP を 20 染色体でタイピングした結果によると、21 番染色体は 4,135 のブロックから構成されており、そのなかの 589 ブロック（全配列の 43.5% を占める）は、頻度が高い SNP を 10 個以上含んでおり、それらは 3~4 個のハプロタイプで構成されている⁷⁾ (Table 3)。

大規模 SNP タイピング法

SNP は 2 種のアレルを示すのでタイピングを自動化しやすい。いずれのタイピング法も長所、短所があり、どの方法が今後の主流になるかは定かではないが、大規模なタイピング法として用いられている方法の原理を紹介する。

Ⅰ タックマン PCR 法

SNP 部位を中央にした 2 種の鋳型特異的配列のタックマンプローブが、多型を識別する。このプローブの 5' 端と 3' 端は、蛍光基と消光基が結合しており、プローブ自体では蛍光を発しない。また 2 種のプローブは、異なる波長の蛍光を出す蛍光基が結合している。SNP 部位に結合したプローブは、PCR 反応の過程の Taq DNA ポリメラーゼの作用により、蛍光基が遊離する。この蛍光により多型のタイピングを行う。このように本法は 2

種の PCR 用プライマーと、配列に特異的な蛍光基・消光基が結合した 2 種のタックマンプローブが必要である。

② インベーター法

インベーター法は、特殊な DNA の構造を認識して切断するエンドヌクレアーゼ (cleavase) を利用したものである。5'側に鋳型配列とは無関係な配列 (フラップ) をもち、3'側は SNP 部位から鋳型特異的相補配列をもつアリルプローブと、SNP 部位から 3'側に相補的であり SNP 部位は任意の塩基のインベータープローブを用いる。これら 2 種のプローブは、SNP 部位にインベータープローブが 1 塩基入り込んだ状態となり、cleavase がこれを認識して切断すると、フラップが遊離する。フラップに相補的な配列をもつ FLET プローブ (蛍光基と消光基が結合している) に、このフラップが結合すると、再度 cleavase が作用して蛍光が発生する。これらの反応が 65°C 程度で行えるように設計すると、PCR なしで反応が繰り返し行われ、タイピングが可能となる。

③ 高密度オリゴヌクレオチドチップ

1~2 cm 四方の基盤上に、多種類の 20 塩基程度のオリゴヌクレオチドを、高密度に整列化し固定した DNA チップを用いる。検体は蛍光標識後、チップ上のオリゴヌクレオチドとアレル特異的なハイブリダイゼーションさせ、洗浄後、残存蛍光強度を測定することにより、タイピングを行う。この方法は、個人ごとに 1 枚のチップを用いることとなり、テーラーメイド医療に、その威力を発揮するものと期待される。

おわりに

SNP を中心とするヒトゲノム情報は、医学の領域で幅広く使われつつあり、今後の医学を一新するとまでいわれている。その基になる発想は、一人一人の異なる遺伝子情報に基づいた最適な薬物治療に代表されるような、個人に合った医療を行うことにより、医療の質を画期的

に向上させるものである。今後、このような考えの基に研究が進行し、医療の現場でも使用される日が近いと考える。

文 献

- 1) Celera Genomics: The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351, 2001.
- 2) Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**: 311-319, 2000.
- 3) Hirakawa M, Tanaka T, Hashimoto Y, Kuroda M, Takagi T, Nakamura Y: JSNP: A database of common gene variations in the Japanese population. *Nucleic Acids Res* **30**: 158-162, 2002.
- 4) International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921, 2001.
- 5) Okuda T, Fujioka Y, Kamide K, Kawano Y, Goto Y, Yoshimasa Y, Tomoike H, Iwai N, Hanai S, Miyata T: Verification of 525 coding SNPs in 179 hypertension candidate genes in the Japanese population: Identification of 159 SNPs in 93 genes. *J Hum Genet* **8**: 387-394, 2002.
- 6) Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y: A high throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* **46**: 471-477, 2001.
- 7) Patil N, Berno AJ, Hinds DA, Barrett WA, Doshi JM, Hacker CR, Kautzer CR, Lee DH, Marjoribanks C, McDonough DP, Nguyen BT, Norris MC, Sheehan JB, Shen N, Stern D, Stokowski RP, Thomas DJ, Trulson MO, Vyas KR, Frazer KA, Fodor SP, Cox DR: Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science* **294**: 1719-1723, 2001.

要 旨

脳神経外科における的確な遺伝子診断のための手法

宮田 敏行

ヒトゲノム上の遺伝子多型, 特に 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) が医学の分野で注目を集めている. SNP は数がきわめて多いので, 疾患の責任変異である可能性が高い. SNP は公開データベースに格納されている. 日本人 DNA を用いて公開データベース内の 525 個の SNPs を調べたところ, 27%にあたる 143 個しか確認されなかった. 日本では遺伝子領域を再シーケンスし, SNP を同定するプロジェクトが行われ, 多数の SNPs が見出されている. 今後, SNP をタイピングすることにより, 種々の疾患に関わる遺伝子が同定されるものと考えられる.

脳外誌 12 : 156-160, 2003