

学位論文題名

ヒト凝固第11因子遺伝子にみられた

一塩基多型と連鎖不平衡

学位論文内容の要旨

1. 緒言

一塩基多型 (SNPs, single-nucleotide polymorphisms) はヒトゲノム上 300 から 1,000 塩基に 1 つの割合で高頻度に存在する遺伝子多型である。SNPs の同定により多くのメンデル遺伝病 (単一遺伝子の変異により発症する疾患の総称) の原因が解明されたが、同時に生活習慣病などの疾患関連遺伝子を同定するための遺伝マーカーとして SNPs を利用する患者—対照関連解析 (association study) が現在議論されているところである。つまり、ある特定の SNP を持つアレルが患者群で統計学的に有意に増えている場合、その SNP が直接疾患の原因となっている場合は少なく、隣接する疾患関連遺伝子変異と連鎖不平衡 (2 つ以上の変異が連鎖して存在している状態) にあることが多い。したがって、十分な数の SNPs のスクリーニングにより疾患関連遺伝子の存在領域を推定することが可能となる。ところが、スクリーニングに必要な SNPs 数は連鎖不平衡が認められる物理的距離によって異なり、これは SNPs の起こった時期や染色体組み換えが起こりやすい場所か否かに関係し、今だ不明な点が多い。一方われわれは、ヒト凝固第 11 因子遺伝子の翻訳領域に複数の SNPs の存在を確認しており、本研究では、各々の SNPs について連鎖不平衡が認められるのか、複数の民族において解析することを目的とした。

2. 対象と方法

対象は 173 例の健常人 (白人 41 例、西アフリカ人 50 例、東アジア人 42 例、東アフリカ人 40 例)。EDTA 採血により末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。12 対のプライマーを用いて PCR 法により凝固第 11 因子遺伝子の翻訳領域およびその近傍を増幅し、その PCR 産物を 2%アガロースゲル電気泳動にて確認後に精製した。各 PCR 産物について SNPs のスクリーニングを目的に既報 (Blood, 92 : 3309-3317, 1998) のごとく ddF (dideoxy fingerprinting) を行った。この際、³²P で標識した PCR プライマーと dNTP および ddGTP、DNA ポリメラーゼの存在下で変性・アニーリング・伸長反応を 33 サイクル行い、得られた ddF 産物は 0.5% MDE ゲル電気泳動にてラダーパターンを比較した。野生型と異なるラダーパターンを認めたサンプルについては、その後 ³³P を用いたジデオキシ法によって直接シーケンスを行い、SNPs の同定を行った。

3. 結果

第 11 因子遺伝子の翻訳領域において 5 つの SNPs が高頻度に認められた。いずれも変異型の頻度が少なくとも 1 民族で 5% 以上であったが、アミノ酸変異を伴わなかった。そのうち 3 つの SNPs (C472T, A844G, T1234C) は 10kb にわたって存在するのに

もかわらず、お互いに強い連鎖不平衡の状態にあった($P=0.005$ から 0.000001)。一方、C1750T と G1855T の 2 つの SNPs についてはいずれの民族においても C472T, A844G, T1234C との連鎖がなく連鎖不平衡にはなかった。C1750T と G1855T は 2kb 未満の近距離にあるがお互いに連鎖不平衡を認めなかった。さらにこれら 5 つの SNPs は検討したすべての民族にみられ (ただし、472T アレルのみ東アジア人で検出されなかった)、その起源が現代ホモ・サピエンスがアフリカからアジアやヨーロッパに移動する以前であることが示唆された。

次に先天性第 11 因子欠損症タイプ II(Glu117Ter)ホモ接合体の 1 症例の SNPs を検討したところ、472T-844G-1234C ハプロタイプに関してもホモ接合体であった。また、タイプ II 変異のヘテロ接合体の症例と、タイプ II とタイプ III(Phe283Leu)のヘテロ接合体を同時に持つ症例についてそれぞれサブクローニングをして SNPs の検討を行った結果、やはりタイプ II 変異は 472T-844G-1234C ハプロタイプと同じ染色体上に存在し、タイプ III 変異は野生型である C472-A844-T1234 ハプロタイプと同じ染色体上にみられた。

4. 結語

ヒト第 11 因子遺伝子における 3 つの SNPs に強い連鎖不平衡が存在することを示した。10kb という広い範囲に広がって存在すること、また検討したすべての民族に認められるかなり古い SNPs であることから、染色体組み換えが十分に起こりうる状況と考えられた。現在のところ連鎖不平衡の原因は不明であるが、472T-844G-1234C ハプロタイプに強い選択圧がかかっている可能性がある。つまり、mRNA の翻訳や安定性に影響して、第 11 因子の血漿濃度に違いを生じていることが推察され、今後検討を要すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

ヒト凝固第11因子遺伝子にみられた 一塩基多型と連鎖不平衡

現在、生活習慣病などの疾患関連遺伝子を同定するための遺伝マーカーとして一塩基多型 (SNPs, single-nucleotide polymorphisms) を利用する、患者-対照関連解析 (association study) が議論されている。ある特定の SNP を持つアレルが患者群で統計学的に有意に増えている場合、その SNP が直接疾患の原因となっている場合よりも隣接する疾患関連遺伝子変異と連鎖不平衡 (2 つ以上の変異が連鎖している状態) にあることが多い。つまり十分な数の SNPs をスクリーニングに使用すれば、疾患関連遺伝子の存在領域を推定することが可能となる。ところが、これに必要な SNPs 数は連鎖不平衡が認められる物理的距離によって異なり、これは SNPs の起こった時期や染色体組み換えが起こりやすい場所か否かに関係するが、未だ不明な点が多い。一方、ヒト凝固第 11 因子遺伝子の翻訳領域には複数の SNPs が確認されており、本研究では、各々の SNPs について連鎖不平衡が存在するかどうか複数の民族で解析することを目的とした。

対象は 173 例の健常人 (白人 41 例、西アフリカ人 50 例、東アフリカ人 40 例、東アジア人 42 例)。ゲノム DNA を抽出し、PCR 法で第 11 因子遺伝子の翻訳領域およびその近傍を増幅した。各 PCR 産物について SNPs のスクリーニングを目的にジデオキシフィンガープリンティング (ddF) を行った。得られた ddF 産物は 0.5% MDE ゲル電気泳動にてラダーパターンを比較し、野生型と異なる場合はシークエンスにより SNPs を同定した。

第 11 因子遺伝子の翻訳領域にアミノ酸変異を伴わない 5 つの SNPs を高頻度に検出した。検討したほぼ全ての民族に存在することより、かなり起源が古いものと考えられた。そのうち 3 つの SNPs (C472T, A844G, T1234C) は 10kb にわたって存在するのにもかかわらず、お互いに強い連鎖不平衡の状態にあった ($P=0.005$ から 0.000001)。これらの SNPs に十分な組み換えが起こらなかった原因として、何らかの選択圧が働いた可能性や、組み換えを起こす確率が場所により異なる可能性が考えられた。次に先天性第 11 因子欠損症タイプ II およびタイ

ブ III の変異をもつ 3 症例の SNPs 解析の結果、472T-844G-1234C 変異型ハプロタイプはタイプ II 変異と強い連鎖関係にあり、タイプ III は野生型ハプロタイプに連鎖すると推定された。この結果をもとに、同様の症状を呈する疾患群の中に複数の遺伝子変異があり、かつ連鎖しているハプロタイプが異なる場合、患者-対照関連解析による疾患関連遺伝子の同定は困難になることが示された。

質疑応答においては、畠山教授から、連鎖不平衡の状態にある SNPs 部位で組み換えが起こりにくくなる要因、さらに他の遺伝子とリンクして何らかのアドヴァンテージを得ている可能性の有無についての質問があった。長嶋教授からは、今回検討した 4 民族を選んだ理由、患者-対照関連解析をより有効に行う方法論についての質問があった。小池教授からは、連鎖不平衡は他の遺伝子の SNPs にもよくみられるものなのか否か、通常連鎖不平衡が起こる原因は何らかの選択圧によるものかあるいは偶然なのかという点についての質問があった。今村教授からは、さらに効率良く未知の疾患原因遺伝子を発見する方法についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文は、SNPs を患者-対照関連解析に利用する際に必要な連鎖不平衡についての貴重な情報を提示したことで高く評価され、今後疾患関連遺伝子を同定するさらに効率的な方法の検討に期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。