

多型マイクロサテライトを用いた東アジア人の遺伝的特性に関する研究

●田宮 元

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

＜研究の目的と進め方＞

現在のヒトゲノム上には多くの多型マーカーが同定され、これを利用した連鎖不平衡マッピングにより、多遺伝子性疾患関連遺伝子の同定が試みられている。一方で、そのような解析に必須となる人類集団の遺伝的特性に関する知見は少なく、特に日本人など東アジア人集団における情報は非常に少ない。疾患によっては、民族集団をうまく用いたエスニックマッピングを行うことが必須と考えられ始めている。また連鎖不平衡マッピングでは、遺伝的隔離集団を用いることが有利であると考えられている。隔離の無かった集団に比べて染色体上に連鎖不平衡が強く維持されていると予想されることから、数少ない遺伝マーカーを使って、多因子性疾患の原因遺伝子を効率的に連鎖不平衡マッピングできることが期待されるからである。例えば、フィンランド人集団やスカンジナビア・サーミ民族、イタリア・サルディニア人などがこのような隔離集団として考えられている。一方で、日本人や幾つかの東アジア人集団も、比較的均質な遺伝的背景を持つとされているが、これまで行われた研究のほとんどはヨーロッパ人集団に限定されており、アジア人集団ではほとんど研究例がない。申請者はこれまで、多型マイクロサテライトをゲノム全体にわたり約100kbに1個という高密度で配置するという研究を行ってきた。そこで、本研究は、これら約30,000個にもおよぶ多型マイクロサテライトを利用して、東アジア人の遺伝的特性やその進化的類縁関係を研究することを目的とする。

研究の進め方としては、1) 約30,000個の多型マイクロサテライトのうち、ランダムに選択した50箇所程度のゲノム領域中に存在するマイクロサテライトならびにその近傍のSNPマーカーを用いて日本人、韓国人、中国人やモンゴル人など東アジア人集団における多型性と連鎖不平衡強度を調査し、2) 各集団の遺伝的特性やその進化的類縁関係を明らかにし、3) これら、多遺伝子性疾患のゲノムワイド連鎖不平衡マッピングに必須の情報をデータベース化する、という流れとなる。

＜研究開始時の研究計画＞

1) マイクロサテライトの多型解析

各民族集団のDNA検体を個々人で整理したパネルを用い、多型マイクロサテライトマーカーに関してPCR増幅を行い、遺伝子型判定を行う。

2) マイクロサテライト近傍のSNPマーカーの多型解析

マイクロサテライトマーカーと同様、各民族集団のDNAパネルについて、TaqMan法およびPCR-RFLP法を用いたSNPタイピングを行う。

3) 多型解析と連鎖不平衡強度の計算

最尤推定法による遺伝子頻度の計算を行い、ハーディ・ワインベルグ平衡検定を行う。また、隣り合う2遺伝子座間のハプロタイプ頻度と連鎖不平衡強度を推定する。また、距離行列法に基づく系統解析を行い、集団内および集団間のハプロタイプの類縁関係を推定する。

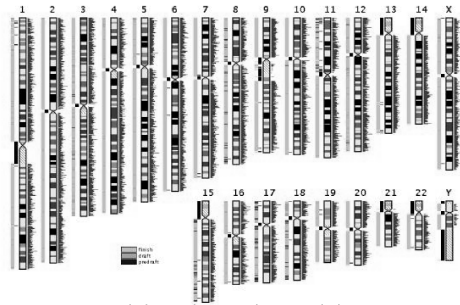
4) データベース化

得られた情報（多型情報、ハプロタイプ情報、統計指標ほか）をデータベース化するとともに、グラフィカルな結果表示機能を持たせる

＜研究期間の成果＞

1) マイクロサテライトマーカー

この研究を行うにあたって約3万個のマイクロサテライトマーカーがヒトゲノム中に設定された。この作成の過程で行った多型解析は、本研究にも利用されている。このマイクロサテライトマーカーは成果リスト11で論文発表を行っている。

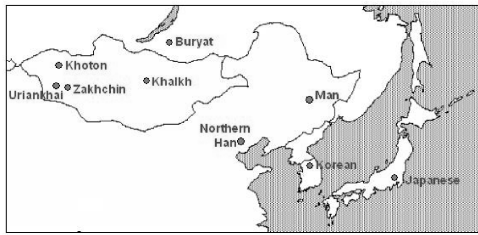


ゲノムワイドマイクロサテライトマーカー

2) マイクロサテライトマーカーによる遺伝的隔離集団の調査

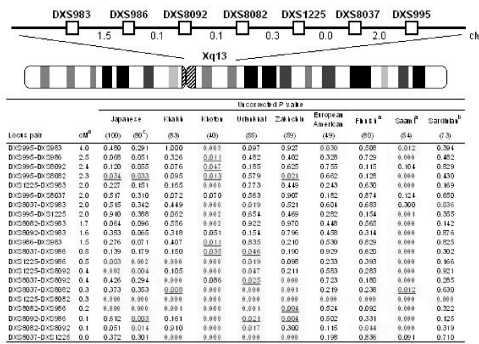
まず、本研究では、東アジアの隔離集団におけるバックグラウンド連鎖不平衡を調査することを目的に、日本およびモンゴルの5集団に焦点を当てた。日本人集団は現在、約1億2000万人の人口からなるが、2000年前には約60万人と推定されており、フィンランド人と同様、典型的な人口増加集団と見なされている。また、歴史的な考察などから、日本人集団はこれまで比較的均質な集団であると考えられてきた。一方、モンゴル国は20を超える民族集団で構成されているが、そのうち、ハルハと呼ばれる民族集団はモンゴル全土に分布し、約180万人からなる大きな集団である。対照的に、ホトン、ウリアンハイ、およびザフチンと呼ばれる集団は、いずれもハルハとは起源を異にし、少数からなる隔離集団である。特に、ホトンと呼ばれる集団は人口が約6,000人と、極めて少ない。そこで、これらの東アジア人集団について、これまでフィンランド人やサーミ民族で行われてきたミトコンドリアやX染色体などを用いた解析と同様のデザインを用いることで両者の比較を行った。

まず、これら5集団における集団の歴史を遺伝学的に検証するため、ミトコンドリアDNAの塩基配列を決定し、TajimaのD検定により人口増加の有無を調査した(表1)。その結果、日本人とハルハについてはDの値が有意に負に傾き、過去に人口増加があったことが示唆された。一方、ホトン、ウリアンハイ、およびザフチンにおいてはDの値が有意とならず、現在まで人口が比較的一定だったことが示唆された。



使用した集団

これら5集団について、X染色体上の7つの多型マイクロサテライトマーカーを用いてタイピングを行い、Fisher検定により、マーカー間の連鎖不平衡を検定した。こうして得られた結果を、フィンランド人およびサーミを含むヨーロッパ人集団の既報データと比較した。その結果、これらのうち、日本人とハルハにおける連鎖不平衡は、フィンランド人やサルディニアと同程度、あるいはそれらよりもやや広範囲に渡ることが示された。一方、少数一定集団である残り3集団（ホトン、ウリアンハイ、ザフチン）における連鎖不平衡は、日本人とハルハよりもさらに広範囲におよぶことが示された。特に、ホトンにおいては、サーミと同様、大多数のマーカー間で連鎖不平衡が認められた。

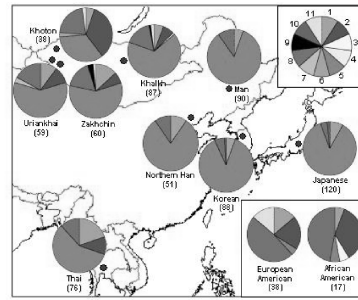


観察された連鎖不平衡

ここで行った解析は、東アジアの隔離集団に関して行われたものとしては初めての報告である。そして、得られた結果はX染色体に限られたものではあるが、これら東アジアの隔離集団が、ヨーロッパの隔離集団と同様、連鎖不平衡マッピングに適した集団であることを示唆する。特に、ホトン、ウリアンハイ、ザフチンにおいては、染色体の広範囲に渡り連鎖不平衡が維持されており、これは、このような集団が複合疾患の初期マッピングを行う際に重要な役割を果たす可能性を示唆する。一方、日本人とハルハでは、それほど広範囲ではないがフィンランド人と同程度の連鎖不平衡が保持されており、このことから、このような集団が単一遺伝子疾患および複合疾患のfine mappingに適用できる可能性が示唆された。この成果は成果リスト1として論文発表を行った。

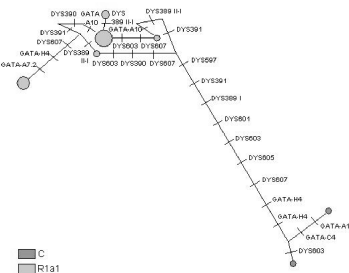
3) SNPマーカーによる遺伝的特性の調査

次に、同じくX染色体上の6個のSNPマーカーを使ってこれらの集団のハプロタイプを検査したところ、11個のハプロタイプが検出された。その地理的な分布からは、ホトン集団のハプロタイプ構成が他の集団と大きく異なっていることが明らかとなり、周辺集団とのある程度のadmixtureが過去に起こっていると予想された。また、日本人は韓国人集団や中国人集団ときわめて類似したハプロタイプ構成を持つことが分かった。この成果は、成果リスト10ならびに12として論文発表を行った。



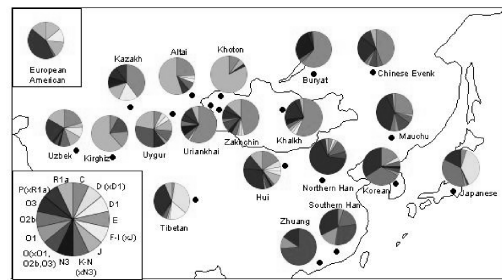
X染色体SNPハプロタイプ構成

同じくY染色体上のSNPマーカーを用いたハプロタイプ構成の調査の結果からは、ホトン集団においてボトルネックあるいは創始者効果の存在が示唆されており、ホトン集団においてどの程度のadmixtureが起こったのかは結論が出ていない



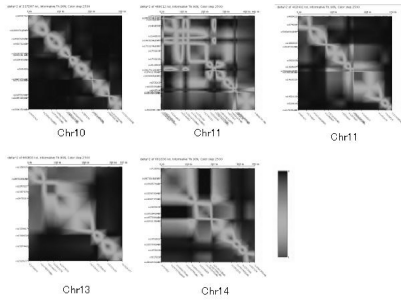
4) Y染色体マーカーを用いた遺伝的特性の調査

X染色体と同様にY染色体上のマイクロサテライトマーカーを用いたアジア人集団の遺伝的特定の調査を行った。この結果からは、日本人集団が周囲の集団とは異なった特徴的なY染色体ハプロタイプ構成を持つことが分かり、従来から知られていたAlu繰り返し配列挿入多型 (YAPマーカー) の有無と関連していることが分かった。またモンゴル人諸集団が東アジア人集団とはかなり異なるハプロタイプ構成を持つことも明らかになった。



5) 常染色体マーカーを用いた連鎖不平衡高強度の計測

次に10番染色体、11番染色体2箇所、13番染色体、14番常染色体上のマイクロサテライトマーカーならびにSNPマーカーを用いて日本人集団で多型解析を行い、連鎖不平衡高強度を計測した。その結果、日本人集団ではこれらの領域で、明確なハプロタイプブロックが複数観察された。また、そのうちのいくつかではマイクロサテライトマーカーの特定の対立遺伝子との強い連鎖不平衡が観察された。



6) データベース化等

これらの解析の過程で、マイクロサテライトマーカーの多型判定を効率よく行うためのアルゴリズムの開発も行った(成果リスト7)。また、マイクロサテライトマーカーやSNPマーカーによるハプロタイプ推定に関するアルゴリズムの開発も行った(成果リスト6)。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、常染色体に存在する多数の多型マイクロサテライトマーカーならびにSNPマーカーを利用して、東アジア人集団の遺伝的特性をさまざまな角度から調査しており、このような研究は他に類を見ない。本研究で用いられた民族集団のうちモンゴル人に関しては、他にも遺伝学的研究に共同研究として利用された(成果リスト5)。また成果リストに含まれる全論文の引用回数は過去4年間で計72回を数えている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初予定の半分の領域しか連鎖不平衡強度の計測を達成できなかった。また、期待したよりも少ない数のSNPでしか連鎖不平衡を観察することが出来なかった。タイピングしたSNPのうち、予想よりも多くの数のSNPで多型を示さなかったことがその主な理由であった。また、データベース化については、着手はしたものの時間切れで完成することが出来なかった。

<今後の課題>

東アジアのいくつかの集団で遺伝的特性ならびに進化的類縁関係を調査を行ったが、実際に疾患の解析にどこまで適しているのかという直接的な評価にまでは至らなかった。今後は、このような集団を実際にモデル疾患の解析に用い、その過程でさらに各集団の評価を実践的にすることが課題である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0208300043

Katoh T, Mano S, Ikuta T, Munkhbat B, Tounai K, Ando H, Munkhtuvshin N, Imanishi T, Inoko H, Tamiya G. Genetic isolates in East Asia: a study of linkage disequilibrium in the X chromosome. *Am J Hum Genet.* 2002 Aug; 71(2): 395-400.

2. 0303192240

Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H. Identification of IkappaBL as the Second Major Histocompatibility Complex-Linked Susceptibility Locus for Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet.* 2003 Feb; 72(2): 303-12.

3. 0404121303

Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H. Toward identification of susceptibility

genes for sporadic Parkinson's disease. *J Neurol.* 2003 Oct;250 Suppl 3:III40-3.

4. Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Hui L, Kulski JK, Beilby J, Tamiya G, Inoko H. Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the Major Histocompatibility Complex by association analysis using microsatellite markers. *Tissue Antigens.* 2003 Mar; 61(3): 203-10.

5. Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saito N, Pavelka K, Lalouel JM, Jorde LB, Inoue I. Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 complete AGT sequences in worldwide chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2004 May; 74(5): 898-916.

6. Mano S, Yasuda N, Katoh T, Tounai K, Inoko H, Imanishi T, Tamiya G, Gojobori T. Notes on the maximum likelihood estimation of haplotype frequencies. *Ann Hum Genet.* 2004 May; 68(Pt 3): 257-64.

7. Matsumoto T, Yukawa W, Nozaki N, Nakashige R, Shinya M, Makino S, Yagura M, Ikuta T, Imanishi T, Inoko H, Tamiya G, Gojobori T. Novel Algorithm for Automated Genotyping of Microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 2004 Nov 19; 32(20): 6069-6077.

8. Hui J, Oka A, Tomizawa M, Tay GK, Kulski JK, Penhale WJ, Iaschi SP, Makino S, Tamiya G, Inoko H. Identification of two new C4 alleles by DNA sequencing and evidence for a historical recombination of serologically defined C4A and C4B alleles. *Tissue Antigens.* 2004 Mar; 63(3): 263-9.

9. Goto S, Lee LV, Dantes MB, Tooyama I, Tamiya G, Makino S, Ando S, Munoz EL, Yamada K, Matsumoto S, Shimazu H, Kuratsu J, Hirano A, Kaji R. Functional Anatomy of the Basal Ganglia in X-Linked Recessive Dystonia-Parkinsonism. *Ann Neurol.* 2005 Jul; 58(1): 7-17.

10. Katoh T, Munkhbat B, Tounai K, Mano S, Ando H, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H. Genetic features of Mongolian ethnic groups revealed by Y-chromosomal analysis. *Gene.* 2005 Feb 14; 346: 63-70.

11. Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen S.E.V, Giphart M.J, Kulski J.K, Fukazawa T, Hashimoto H, Kimura K, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H. Whole Genome Association Study of Rheumatoid Arthritis Using 27,039 Microsatellites. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 15; 14(16): 2305-21.

12. Katoh T, Mano S, Munkhbat B, Tounai K, Oyungerel G, Chae GT, Han H, Jia GJ, Tokunaga K, Munkhtuvshin N, Tamiya G, Inoko H. Genetic features of Khoton Mongolians revealed by SNP analysis of the X chromosome. *Gene.* 2005 Aug 23.

2) データベース/ソフトウェア

なし

3) 特許

13. 「マイクロサテライト遺伝多型マーカーを用いる遺伝子のマッピング方法」 特許出願2002-383869: 特許公開2005-160302 (公開日: 2005年6月23日)