

遺伝子多型タイピング研究・支援チーム

Laboratory for Genotyping

チームリーダー 中村 祐輔
NAKAMURA, Yusuke

当研究チームは、平成12年度よりスタートしたミレニアムゲノムプロジェクトの疾患関連遺伝子研究のための不可欠なツールである大量、かつ高速で安価の遺伝子多型タイピングシステムの確立を行うと共に、遺伝子多型研究センターの疾患関連遺伝子研究チームに対する研究支援を行うことを目的とする。また、日本人集団における薬剤代謝関連酵素遺伝子のスクリーニングとデータベース構築を通して、薬剤の効果予測・副作用リスク予測を可能とし、「必要な薬剤を、必要な患者に、必要な量だけ」投与するための基盤情報を提供する。

1. 大量高速 SNP タイピングシステムの確立 (中村, 斎藤, 前田)

インバーダー (Invader) 法・TaqMan 法・MALDI-TOF 法などの SNP 解析法の評価を行い、インバーダー法が簡単で精度の高い方法であることを確認した。続いて、インバーダー法の技術改良を行うと共に、これらを利用した大量・高速、かつ、正確な SNP タイピングシステムの確立を行った。まず、1SNP の判定に必要なゲノム DNA を少量に抑えるために、100 カ所のゲノム DNA 断片を一度に (1つのチューブで) PCR 増幅を行う方法を確立した。これによって得た PCR 産物を分注し、インバーダー法を利用して SNP タイピングすることによって 1SNP あたり、0.2 ng で SNP 判定をすることが可能となった。また、東京大学医科学研究所において開発されたカードシステムを利用することによって反応容量を従来の 3 分の 1 程度に減らす方法も検討中であり、これが実用化されるとコストを 1SNP あたり数十円のレベルまで減らすことができるものと期待している。



図 1

また、図1に示したようなロボットの導入によってシステムのオートメーション化が図られており、現在1日約8万 SNP のタイピングを行うことができる。平成13年3月31日現在、約300万 SNP タイピングを実行し、これらのデータを各疾患研究チームに提供した。大量・高速・安価の SNP タイピング体制の構築は、SNP を利用した疾患遺伝子単離競争の成否を握るといえる。したがって、本研究の成果は、センター内の疾患遺伝子解析チームが疾患遺伝子を発見するための基盤情報の提供につながるだけでなく、平成12年度から始まったミレニアム計画によって行われる他省庁での疾患遺伝子解析研究に対して多大なる貢献をするものと期待される。また、一人の患者について一度に複数の SNP を調べる方法が確立されれば、副作用を避けるための SNP スクリーニングを一般の医療機関で行うことを可能とし、「必要な薬剤を、必要な量だけ、必要な患者に」投与するオーダーメイド医療の確立に寄与することは確実である。現在、欧米の製薬企業を含め、多くの研究者が大量・高速 SNP タイピングを目指しているが、本研究は TWT 社と連携して世界で最も高速な SNP タイピングシステムの構築を目指しているものであり、本タイピングシステムの確立はこれまでの疾患遺伝子研究の遅れを一気に挽回する可能性を有している。

2. 薬剤代謝関連酵素遺伝子の SNP スクリーニングとデータベース化 (中村, 飯田, 斎藤)

データベースを利用して薬物代謝関連遺伝子を検索し、各遺伝子配列を抽出した後、遺伝子領域を一単位 (5' 上流領域からエキソン、イントロン領域、3' 下流領域) として一般集団 48 人の DNA を利用して DNA シークエンスを行うことにより SNP の検索を行った。これら遺伝子群には、アセチル転移酵素遺伝子群、アルコール脱水素酵素遺伝子群、アルデヒド脱水素酵素遺伝子群、エステラーゼ遺伝子群、硫酸転移酵素遺伝子群、グルタチオン転移酵素遺伝子群、ミクロソーム酵素遺伝子群、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素遺伝子群などの代謝関連酵素遺伝子群に加えて、薬物輸送タンパク遺伝子群が含まれる。選んだ約180遺伝子の約6割にあたる遺伝子のスクリーニングを終了し、高密度な SNP 地図を完成させた。これまでに、約2800 SNP を同定した (表1) が、公的データベースに登録されていたものは、遺伝子によって異なるが、約10-30%であり、70-90%は新規の SNP であった。以上、本研究で開発された SNP は新規性に加えて、日本人特有の多型という観点からも非常にユニークであり、かつ有用性が高いと考えられた。また、わが国の製薬企業が資金を出して設立したファルマ・スニップ・コンソーシアムから、これら薬剤代謝関連酵素遺伝子の SNP の一般日本人集団におけるアレル頻度データベー

表 1

Gene name	SNPs
Epoxide hydrolase 1, microsomal (EPHX1)	33
Epoxide hydrolase, cytosolic (EPHX2)	37
Catechol-O-methyltransferase (COMT)	34
Guadinioacetate methyltransferase (GAMT)	6
Phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT)	4
Nicotinamide N-methyltransferase (NMNT)	8
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)	91
Histamine N-methyltransferase (HNMT)	42
ATP-binding cassette, sub-family B, member 1(ABCB1)	51
ATP-binding cassette, sub-family B, member 2(ABCB2)	14
ATP-binding cassette, sub-family B, member 3(ABCB3)	25
ATP-binding cassette, sub-family B, member 4(ABCB4)	48
ATP-binding cassette, sub-family B, member 7(ABCB7)	15
ATP-binding cassette, sub-family B, member 8(ABCB8)	24
ATP-binding cassette, sub-family B, member 9(ABCB9)	20
ATP-binding cassette, sub-family B, member 10(ABCB10)	13
ATP-binding cassette, sub-family B, member 11(ABCB11)	14
Cytochrome P450, subfamily I, polypeptide 1(CYP1A1)	3
Cytochrome P450, subfamily I, polypeptide 2(CYP1A2)	7
Cytochrome P450, subfamily I, polypeptide 1C(CYP1B1)	19
Cytochrome P450, subfamily I/B, polypeptide 1(CYP4B1)	41
Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 2(CYP4F2)	20
Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 3(CYP4F3)	1
Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 8(CYP4F8)	19
Cytochrome P450, subfamily XVIIA, polypeptide 1(CYP27A)	3
Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)	38
Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)	12
Aldehyde dehydrogenase 5 (ALDH5)	11
Aldehyde dehydrogenase 7 (ALDH7)	35
Aldehyde dehydrogenase 8 (ALDH8)	18
Aldehyde dehydrogenase 9 (ALDH9)	28
Aldehyde dehydrogenase 10 (ALDH10)	25
ATP-binding cassette, sub-family C, member 6(ABCC6)	13
ATP-binding cassette, sub-family C, member 7(ABCC7)	63
ATP-binding cassette, sub-family C, member 8(ABCC8)	78
ATP-binding cassette, sub-family C, member 9(ABCC9)	7
Gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1)	7
Transglutaminase 1 (TGM1)	14
Cholesterol 7-alpha hydroxylase (CYP7)	12
N-acetyltransferase 1 (NAT1)	3
N-acetyltransferase 2 (NAT2)	33
Arylesterase N-acetyltransferase (ANAT)	4
N-acetyltransferase, homolog 1, S-esterase (ARD1)	9
LI cell adhesion molecule (L1CAM) (saito)	6
Arylsulfatase deacetylase (AADA)	17
Granzyme A (GZMA)	8
Granzyme B (GZMB)	3
Neuropathy target esterase (NTE)	41
Esterase D-formylglutathione hydrolase (ESD)	27
Ubiquitin carboxy-terminal esterase L3 (UCHL3)	56
Ubiquitin carboxy-terminal esterase L1 (UCHL1)	19
Carboxylesterase (CEST)	49
Carboxylester lipase (CEL)	11
Cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase (L-17)	10
Cytochrome P450, subfamily IIA, polypeptide 6(CYP2A6)	10
Cytochrome P450, subfamily IIA, polypeptide 13(CYP2A13)	8
Cytochrome P450, subfamily IIB, polypeptide 6(CYP2B6)	12
Cytochrome P450, subfamily IIB, polypeptide 6(CYP2D6)	13
Cytochrome P450, subfamily IIC, polypeptide 1(CYP2E1)	21
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 1 (ND1)	7
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 2 (ND1)	7
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 3 (ND1)	11
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 5 (ND1)	5
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 6 (ND1)	6
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 7 (ND1)	14
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 8 (ND1)	14
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha subcomplex 9 (ND1)	45
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1, alpha/beta subcomplex	7
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 1 (NDUFS1)	23
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 3 (NDUFS3)	4
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 4 (NDUFS4)	27
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 5 (NDUFS5)	23
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 6 (NDUFS6)	19
NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 8 (NDUFS8)	12
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 3 (NDU2)	2
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 5 (NDU2)	8
NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex 7 (NDU2)	3
NADH-ubiquinone oxidoreductase FV 1 (NDUFV1)	4
NADH-ubiquinone oxidoreductase FV 2 (NDUFV2)	9
NADH-ubiquinone oxidoreductase FV 3 (NDUFV3)	11
Glutathione S transferase Mu 1 (GSTM1)	11
Glutathione S transferase Mu 2 (GSTM2)	21
Glutathione S transferase Mu 3 (GSTM3)	4
Glutathione S transferase Mu 4 (GSTM4)	3
Glutathione S transferase zeta (GSTZ1)	11
Glutathione S transferase pi (GSTP1)	8
Glutathione S transferase theta 2 (GSTT1)	5
Microsomal glutathione S transferase 1 like 1 (MGST1L1)	5
Microsomal glutathione S transferase 1 (MGST1)	34
Microsomal glutathione S transferase 2 (MGST2)	12
Microsomal glutathione S transferase 3 (MGST3)	23
Glutathione S transferase A1 (GSTA1)	6
Glutathione S transferase A4 (GSTA4)	18
Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1/STP1)	27
Sulfotransferase 1A2 (SULT1A2/STP2)	20
Sulfotransferase 1A3 (SULT1A3/STM/HAST)	1
Sulfotransferase 1C1 (SULT1C1)	8
Sulfotransferase 1C2 (SULT1C2)	11
Sulfotransferase 2A1 (SULT2A1/STD)	9
Sulfotransferase 2B1 (SULT2B1)	7
Thyroid hormone sulfotransferase (ST1B2)	15
Tyrosylprotein sulfotransferase 1 (TPST1)	19
Tyrosylprotein sulfotransferase 2 (TPST2)	23
Sulfotransferase-related protein 3 (SULTX3)	40
Estrogen sulfotransferase (STE)	27
Cerebroside sulfotransferase (CST)	13
HNK sulfotransferase (HNK-1st)	37
Carbohydrate sulfotransferase 2 (CHST2)	6
Carbohydrate sulfotransferase 4 (CHST4)	4
Carbohydrate sulfotransferase 5 (CHST5)	18
Quinone oxidoreductase homolog (PQS)	3
NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)	4
NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2)	28
Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	6
Alcohol dehydrogenase 1 (ADH2)	8
Alcohol dehydrogenase 1 (ADH3)	9
Alcohol dehydrogenase 5 (ADH5)	3
Alcohol dehydrogenase 6 (ADH6)	5
Alcohol dehydrogenase 7 (ADH7)	27
Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH2)	2
Short chain alcohol dehydrogenase family gene (HEP27)	6
UGT1A	9
DOOST	15
ATP-binding cassette A1 (ABCA1)	170
ATP-binding cassette A4 (ABCA4)	188
ATP-binding cassette A8 (ABCA8)	61
ATP-binding cassette D1 (ABCD1)	11
ATP-binding cassette D4 (ABCD4)	17
ATP-binding cassette G2 (ABCG2)	29
organic anion transporter polypeptide 1 (OATP1)	50
organic anion transporter 2 (OAT2)	7
Total	2748

ス作成に関して依頼があり、共同研究を行っている。

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) ＊印は査読制度がある論文誌

Ikegawa S., Ohashi H., Ogata T., Honda A., Tsukahara M., Kubo T., Kimizuka M., Shimode M., Hasegawa T., Nishimura G., and Nakamura Y.: “Nobel and recurrent mutations in X-linked dominant chondrodysplasia punctata”, *Am. J. Med. Genet.* **94**, 300–305 (2000). ＊

Ono K., Tanaka T., Tsunoda T., Kitahara O., Kihara C., Okamoto A., Ochiai K., Takagi T., and Nakamura Y.: “Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis”, *Cancer Res.* **60**, 5007–5011 (2000). ＊

Ikegawa S., Sano M., Koshizuka Y., and Nakamura Y.: “Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan4) genes”, *Cytogenet. Cell Genet.* **90**, 291–297 (2000). ＊

Iida A., Sekine A., Saito S., Kitamura Y., Kitamoto T., Osawa S., Mishima C., and Nakamura Y.: “Catalog of 320 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 20 quinone oxidoreductase and sulfotransferase genes”, *J. Hum. Genet.* **46**, 225–240 (2001). ＊

Yamada R., Tanaka T., Unoki M., Nagai T., Sawada T., Ohnishi Y., Tsunoda T., Yukioka M., Maeda A., Suzuki K., Tateishi H., Ochi T., Nakamura Y., and Yamamoto K.: “Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease”, *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 674–685 (2001). ＊

Tsunoda T., Hojo Y., Kihara C., Shiraishi N., Kitahara O., Ono K., Tanaka T., Takagi T., and Nakamura Y.: “Diagnosis system of drug sensitivity of cancer using cDNA microarray and multivariate statistical analysis”, *Currents in Computational Molecular Biology*, edited by S. Miyano, R. Shamir, and T. Takagi, Universal Academy Press, Tokyo, pp. 16–17 (1999).

(総 説)

飯田有俊, 田中敏博, 関根章博, 斎藤督, 中村祐輔: “SNP による pharmacogenomics : 日本人標準多型収集とその基盤整備の重要性”, *実験医学* **19**, 738–742 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Yamada R., Tanaka T., Ohnishi Y., Yamamoto K., and Nakamura Y.: “An efficient SNP discovery procedure used in our association studies of rheumatoid arthritis”, *American Society of Human Genetics 50th Ann. Meet.*, Philadelphia, USA, Oct. (2000).

Tanaka T., Ohnishi Y., Yamada R., and Nakamura Y.: “Large-scale SNP (single nucleotide polymorphism) discovery project in Japan”, *American Society of Human Genetics 50th Ann. Meet.*, Philadelphia, USA, Oct.

(2000).
(国内会議)
山田亮, 山本一彦, 中村祐輔, 角田達彦: “2つの疾患関連
SNPs の関係をモデル化し両者の関係を最尤法にて推定
する試み”, 第10回 Medical Genetics 研究会, 東京, 9月
(2000).
井上耕一, 田中敏博, 永井良三, 堀正二, 中村祐輔: “Male-
specific sudden death in mice with deficiency of a novel
gene related to oxidative stress resistance”, 第65回日本
循環器学会学術集会, 京都, 3月 (2001).

Research Subjects and Members of Laboratory for Genotyping

1. Development of Rapid and High-throughput SNP-
typing System
2. Large-Scale SNP Genotyping for Groups Studying
Disease-Associated Genes

Head

Dr. Yusuke NAKAMURA

Members

Mr. Akihiro SEKINE
Dr. Aritoshi IIDA
Mr. Susumu SAITO
Dr. Shiro MAEDA
Ms. Sakura ONOUE
Ms. Noriko NEMOTO
Ms. Tae MAKINO
Ms. Kuniko MATSUI
Ms. Yuri KITAMURA
Ms. Shoko HIGUCHI
Ms. Satoko HARIGAE
Mr. Takuya KITAMOTO
Ms. Yukari MITSUNOBU
Ms. Yukie MIURA
Ms. Yuka INABA
Ms. Chiemi EGUCHI
Ms. Miwako ANDO
Ms. Tomoe YOROZUYA