

# 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 関根章博  
SEKINE, Akihiro

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およびミレニアムゲノムプロジェクト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。さらに、2003 年 10 月より日米英を中心とした国際ハプロタイプ地図作成プロジェクトが発足し、白人、アジア人、アフリカ人について全 60 万 SNPs から成るハプロタイプ地図の作成を開始した。日本、すなわち、理研 SRC の分担分としては全体の約 25%（国別で 2 位、一施設では 1 位）に相当する第 5, 11, 14~17, 19 番染色体における 3 人種のハプロタイプ地図の作成を目的とすることから、ミレニアムゲノムプロジェクトとの併進による対応ができるよう、よりスピードアップしたタイピングシステムを構築するとともに、当プロジェクトを円滑かつ正確に遂行するためのプログラム開発を目指す。なお、ゲノム全域にわたるハプロタイプ地図の構築は、疾患関連遺伝子探索の効率化を計るばかりでなく、疾患成因や薬剤応答性の民族間・個人間の違いを理解するために有用な基盤情報となる。

### 1. 大量高速 SNP タイピングシステムの確立と研究支援（全員）

平成 12 年度は東京大学医科学研究所が独自に開発した 384-well カードを用いた、multiplex PCR 法とインバーダー（Invader）法を併用した大量・高速 SNP タイピングシステムを構築した。本法は、multiplex PCR 法によって 96 カ所の SNP を含むゲノム領域を同じ溶液内で増幅し、増幅された DNA をカードに分注、インバーダー試薬のスポットティング、反応槽の超音波溶着による完全密閉、インキュベーション、ジェノタイプの決定、の手順で行う SNP タイピング法である。そして、大量・高速化・コスト削減に寄与したのが、独自開発したカードの使用と multiplex PCR 法の開発である。本カードは各反応槽が約 1  $\mu$ l と微量であり、超音波溶着によって反応層を完全密閉できるため、高価なインバーダー反応容量を従来の約 1/5 に削減できる。また、反応も定温のインキュベーターで行え、コスト削減・大量・高速化（48 カード/時間/台の処理能力）を実現化している。また、96 カ所の SNP を含むゲノム領域を同時に増幅する multiplex PCR 法は、高価な試薬の削減と高速化を実現している。この手法の確立により年間 1.6 億の SNP タイピングが可能となり、ゲノムワイドな疾患関連遺伝子研究が実現可能となった。平成 12 年度末から平成 14 年度上半期にかけて、1 SNP あたり 768 人（8 疾患）について約 10.5 万 SNPs のタイピング（約 8,100 万タイピング）を実施し、8.6 万 SNPs の情報（成功率 82%）を取得した。この際、大量のデータを取り扱うためのプログラムや大量・高速化に伴う人的ミスを回避・チェックする計 62 種類のプログラムを完成させた。さらに、最も人的エラーが多く、プログラムによってもミスタイピングを回避できない Invader Probe 分注ステップの自動化を本年度に完成させ、タイピング精度

99.9%以上の信頼性の高いデータ獲得が可能になった。得られた結果は同センター内の疾患遺伝子解析チームに提供し、疾患関連候補遺伝子の同定に貢献している。平成 14 年度下半期からは新たに 4 疾患に関してのタイピングを開始し、1 SNP あたり 384 人（4 疾患）について約 8.1 万 SNPs についてのタイピング（約 3,100 万タイピング）を実施し、7.2 万 SNPs の情報（成功率 90%）を取得している。これらに加え、ミレニアムゲノムプロジェクトに対する支援として、高血圧・糖尿病・喘息関連遺伝子研究のため、各々 192 検体を用い、約 10 万 SNPs についてのタイピング（約 5,800 万タイピング）を実施し、8.3 万 SNPs の情報（成功率 83%）を取得した。さらに、本年度は、喘息の 2 次スクリーニングとして、検体数 1,536 を用いて、1 次スクリーニングで絞られた約 2,700 SNPs のタイピングを行い、結果を厚生労働省ミレニアムに送付した。これで、支援としての約束手数は満了した。これらは日本人における連鎖不平衡地図やハプロタイプ地図を作成するための基盤情報となり、現在行われているミレニアム研究による生活習慣病関連遺伝子研究や、あらゆる疾患関連遺伝子研究の基盤情報としても有用となる。これら基盤情報の整備やタイピング支援体制の確立は、諸外国における SNP タイピングを利用した疾患遺伝子研究に比して、非常に優位な状況を生みだしており、SRC が疾患関連遺伝子研究に関して、世界的に主導的立場を確立していくことに寄与するものである。

### 2. 薬剤代謝関連遺伝子の SNP スクリーニングとデータベース化（関根、北本、村松、藤司、佐藤（知）、玄；飯田（SRC 薬理遺伝学研究チーム）；斎藤（SRC 遺伝子多型解析チーム））

SNP の大規模収集とその情報に基づくゲノム解析は、疾

患遺伝子の同定のみならず、薬剤反応性、疾患リスク診断や薬剤使い分けなどの21世紀型オーダーメイド医療の鍵となる重要な情報を提供し、将来的には医療や創薬のパラダイムを根底から変革させる可能性を持つと考えられている。このような薬理ゲノム学的研究の基盤整備のために、薬物代謝酵素および関連遺伝子群のSNPデータベースの構築を行っている。これまでにSNP検索を行った対象遺伝子は、チトクロームP450・アセチル転移酵素遺伝子群・メチル基転移酵素群・硫酸転移酵素遺伝子群・グルタチオン転移酵素遺伝子群・UDP-グルクロン酸転移酵素群・アルコール脱水素酵素遺伝子群・エステラーゼ遺伝子群などの薬剤代謝に関連する酵素遺伝子群、ABCトランスポーター・有機アニオントランスポーターなど薬物運搬や薬物動態に関与する遺伝子群など、197種類の遺伝子領域に及ぶ。現在までに全遺伝子領域について解析が終了し、新たに5,796遺伝子多型を発見し、各遺伝子領域の高密度SNP地図を作成した。このような大規模かつ体系的・網羅的な薬物代謝関連遺伝子多型データベースは他に類をみないものであり、欧米の公的データベースに登録されているSNPとの比較においても（遺伝子によって異なるが）、我々の単離したSNPの密度は平均3~4倍である。本研究で解析した遺伝子については、既にインターネットを通じて公開し、研究者に提供している（<http://SNP.ims.u-tokyo.ac.jp/>）。また、国内の製薬企業によって設立されたファルマコ・スニップ・コンソーシアムと共同で、「日本人一般集団における薬物代謝関連遺伝子SNPのアレル頻度データベース作成」のプロジェクトを遂行し、約4,200遺伝子多型についてのタイピング結果を求め、連鎖不平衡地図を作成し報告した。本データを基に、東京女子医科大学大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野の鎌谷直之教授（現SRC統計解析研究チームチームリーダー兼任）の共同研究によりハプロタイプ地図を作成、マーカー（タグ）SNPを選出し、効率的な薬剤感受性多型の検出法を確立し、そのシステムを特許出願した。このような日本人集団のハプロタイプ・連鎖不平衡地図の完成は、易罹患性、薬剤に対する反応性・副作用の正確な遺伝子診断への応用に寄与するものと考えている。さらに、最近では、多くの既存薬物のターゲットとなっているレセプター遺伝子やチャンネル遺伝子群についても解析を開始し、日本人一般集団48人を対象に53遺伝子領域で1,270SNPsを単離し、各遺伝子領域の高密度SNP地図を作成し、タイピング実施するための準備を完了した。

### 3. 高精度染色体ハプロタイプ地図の構築（全員）

日米英を中心に国際協力の下、2003年10月よりヨーロッパ系白人、アジア人、アフリカ人についてのハプロタイプ地図を構築するプロジェクトが発足した。本プロジェクトは全染色体を約60万カ所のSNPでカバーする高密度ハプロタイプ地図を作成することを目標としており、このデータベースの構築は、疾患関連遺伝子群や疾患原因遺伝子あるいは薬剤応答関連遺伝子群等を、ゲノム全域にわたって網羅的かつ体系的に、しかも効率良く同定するための不可欠な基盤情報となる。また、民族間における違いや個人ごとによる違いといったオーダーメイド医療システム構築を飛躍的に促進させる。当研究チームは国際ハプロタイプ地図作成計画の一翼を担うこととなり、ヒト全染色体の25%、第5、

11、14~17、19番染色体の高密度ハプロタイプ地図作成を目標とし、日本から世界に向けて情報発信を行い、疾患遺伝子や薬剤応答関連遺伝子等の探索の効率化を行うための遺伝子多型情報の高度化に取り組む。昨年度は担当した染色体におけるハプロタイプ地図作成のためのSNPタイピングも必要であることから、システムを年間1.6億のタイピングデータが取得できるよう拡大し、かつ、円滑に遂行できるようプログラムを作成した。なお、現時点で先行するヨーロッパ系白人約25.6万SNPsについてタイピング結果を取得し、DNA配列の問題からデザインできなかった約10.6万SNPsの情報と併せて、とりまとめ機関である米国DCCに報告した。同様に、アジア人およびアフリカ人ではそれぞれ約23万SNPsずつのタイピング結果をDCCに報告した。これはプロジェクトに参加している各国研究機関の中で最多の報告である。世界全体では、ヨーロッパ系白人で約107万SNPs、アジア人で約104万SNPs、アフリカ人で約103万SNPsとなり、今後SNP研究を遂行する上で重要な基盤情報となる。なお、全ての情報は国際HapMap計画のホームページ（<http://hapmap.jst.go.jp/index.html.ja>）で公開され、誰もが利用できるようになっている。タイピング精度を確認するQA/QCチェックも行った。以上をもって、本プロジェクトは予定期間内に完全に終了した。これらの情報は今後SNP研究を加速的に向上させる重要な基盤になると確信される。

Among several types of genetic variations, SNPs (single nucleotide polymorphisms) are the simplest and most common form, and are thought to be useful markers to identify genes susceptible to human common diseases. A part of genetic polymorphisms including SNPs must influence the quality and/or quantity of gene products. Systematic analysis to search an association between SNP genotype and common-disease phenotypes as well as responsiveness to drugs are expected to disclose a gene(s) related to or causing a disease and also those related to effectiveness and adverse drug reactions of drugs. The aims of Laboratory for Genotyping are (1) development of rapid and high-throughput SNP-typing system and (2) large-scale genotyping support for groups studying on disease-associated genes. At present, we have established a novel technology by a combination of multiplex PCR and the Invader SNP analysis method, and the system we set up on the basis of these technologies can achieve approximately 160 millions SNPs per year, making the genome-wide SNP association study realistic. In addition to these association studies, we are participating in the International HapMap Project which aims to construct haplotype maps (by a genotyped common SNP every 5 kb) through the whole-genome in Caucasian, Asian, and African populations. As a core member of the Project, we began to construct haplotype maps for seven chromosomes, namely 5, 11, 14-17, and 19, in the three ethnic populations. Up to date (in March of 2005), we had researched about approximately 256,000 SNPs in Caucasian samples, approximately 230,000 SNPs in Asian samples and approximately 230,000 SNPs in Yoruba samples respectively. These results have already reported to the DCC (The Hapmap Data Coordination Center) which is located in USA. Also, International HapMap Project have established over 1 million SNPs data in three ethnic populations, and protocol,

individual genotype, genotyping frequency, LD map, haplotype etc. have exhibited in the website of International HapMap Project (<http://hapmap.jst.go.jp/index.html.ja>). These information is useful to estimate the number of marker SNPs required for identifying susceptible genes, and will lead to a more efficient approach of whole genome association studies and disclose the influence of genetic diversity between different ethnic groups on human health and drug sensitivities.

### Research Subjects

1. High-throughput SNPtyping
2. SNP typing support for the millennium project in Ministry of Health, Labour and Welfare
3. Construction of SNP database for drug metabolizing enzymes, transporters, and receptors
4. Construction of haplotype maps database (International HapMap Project)

### Staff

#### Laboratory Head

Dr. Akihiro SEKINE

#### Technical Staff

Ms. Kazu ANDO  
 Ms. Ayumi ENDO  
 Ms. Konyoku GEN  
 Ms. Noriko IWAMOTO  
 Ms. Sueko KANAZAWA  
 Ms. Yukie KATAOKA  
 Ms. Nami KAWAHARADA  
 Mr. Takuya KITAMOTO  
 Ms. Tomoko SATO  
 Ms. Bailing LIANG  
 Ms. Syoko MIYASHITA  
 Ms. Yuri MURAMATSU  
 Ms. Hitomi NAKAGAWA  
 Ms. Hiroko SATO  
 Ms. Noriko SHIINO  
 Ms. Nao SUGIYAMA  
 Ms. Sanae SUGURI  
 Mr. Wataru TABEI  
 Ms. Yuka TOJI  
 Ms. Yumiko TSUCHIYA

#### Assistant

Ms. Masayo MIYAZAKI  
 Ms. Eri TATSU  
 Ms. Tomoko WAKO

#### in collaboration with

Dr. Aritoshi IIDA (Lab. Pharmacogenet., SRC)

### Visiting Members

Mr. Kyota ASHIKAWA (Science Service Inc.)  
 Mr. Kan FUKUDA (JavaSystem Co., Ltd.)  
 Mr. Yasunori GONOI (Tempstaff Co., Ltd.)  
 Mr. Takahiro KAWASHIMA (Science Service Inc.)  
 Ms. Mikako KITAMURA (WDB Co., Ltd.)  
 Mr. Seiho MIZUSAWA (INTEC Web Genome Inf. Corp.)  
 Mr. Atsushi NAGASHIMA (Science Service Inc.)  
 Ms. Chizuru NODA (Tempstaff Co., Ltd.)  
 Ms. Emiko NOZAKI (Science Service Inc.)  
 Mr. Takashi OKUBO (Science Service Inc.)  
 Ms. Noriko SAIKI (WDB Co., Ltd.)  
 Mr. Takashi SASAKI (Tempstaff Co., Ltd.)  
 Ms. Masae TAKEZAKI (Science Service Inc.)  
 Ms. Masako TANAKA (WDB Co., Ltd.)  
 Mr. Kazunari YAMAGISHI (JavaSystem Co., Ltd.)  
 Ms. Kumiko MIYAKE (Nittetsu Hitachi Syst. Eng., Inc.)

### Trainees

Ms. Ayumi HARA (Gen. Div., Natl. Cancer Cen.)  
 Mr. Takayuki KINEBUCHI (Gen. Div., Natl. Cancer Cen.)  
 Ms. Yoko YAMAMOTO (Gen. Div., Natl. Cancer Cen.)

### 誌 上 発 表 Publications

#### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

- Tanaka N., Babazono T., Saito S., Sekine A., Tsunoda T., Haneda M., Tanaka Y., Fujioka T., Kaku K., Kawamori R., Kikkawa R., Iwamoto Y., Nakamura Y., and Maeda S.: "Association of solute carrier family 12 (sodium/chloride) member 3 with diabetic nephropathy, identified by genome-wide analyses of single nucleotide polymorphisms", *Diabetes* **52**, 2848–2853 (2003). \*
- International H., Tsunoda T., Sekine A., Tanaka T., and Nakamura Y.: "The International HapMap Project", *Nature* **426**, 789–796 (2003). \*
- Kamatani N., Sekine A., Kitamoto T., Iida A., Saito S., Kogame A., Inoue E., Kawamoto M., Harigai M., and Nakamura Y.: "Large-scale single-nucleotide polymorphism (SNP) and haplotype analyses, using dense SNP maps, of 199 drug-related genes in 752 subjects: the analysis of the association between uncommon SNPs within haplotype blocks and the haplotypes constructed with haplotype-tagging SNPs", *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 190–203 (2004). \*
- Kanazawa A., Tsukada S., Sekine A., Tsunoda T., Takahashi A., Kashiwagi A., Tanaka Y., Babazono T., Matsuda M., Kaku K., Iwamoto Y., Kawamori R., Kikkawa R., Nakamura Y., and Maeda S.: "Association of gene encoding wingless-type mammary tumor virus

- integration-site family member 5B (*WNT5B*) with type 2 diabetes”, *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 832–843 (2004). \*
- Tsunoda T., Lathrop G. M., Sekine A., Yamada R., Takahashi A., Ohnishi Y., Tanaka T., and Nakamura Y.: “Variation of gene-based SNPs and linkage disequilibrium patterns in the human genome”, *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1623–1632 (2004). \*
- Iida A., Saito S., Sekine A., Kataoka Y., Tabei W., and Nakamura Y.: “Catalog of 300 SNPs in 23 genes encoding G-protein coupled receptors”, *J. Hum. Genet.* **49**, 194–208 (2004). \*
- Iida A., Saito S., Sekine A., Tabei W., Kataoka Y., and Nakamura Y.: “Identification of 20 novel SNPs in the guanine nucleotide binding protein alpha 12 gene locus”, *J. Hum. Genet.* **49**, 445–448 (2004). \*
- Ozaki K., Inoue K., Sato H., Iida A., Ohnishi Y., Sekine A., Sato H., Odashiro K., Nobuyoshi M., Hori M., Nakamura Y., and Tanaka T.: “Functional variation in *LGALS2* confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin- $\alpha$  secretion *in vitro*”, *Nature* **429**, 72–75 (2004). \*
- (総説)
- The International HapMap Consortium, Nakamura Y., Sekine A., Sorimachi K., Tanaka T., Tanaka Y., Tsunoda T., and Yoshino E.: “Integrating ethics and science in the International HapMap Project”, *Nature Rev. Genet.* **5**, 467–475 (2004).

#### □ 頭 発 表 Oral Presentations

- (国際会議等)
- Kobayashi K., Yamada R., Suzuki A., Chang X., Kochi Y., Sekine A., Tsunoda T., Nakamura Y., and Yamamoto K.: “Case-control association study of multiple genes that have been previously reported to be associated with rheumatoid arthritis using multiple single nucleotide polymorphisms in Japanese population”, American College of Rheumatology 68th Ann. Scientific Meet./Assoc. of Rheumatology Health Professionals 39th Ann. Scientific Meet., Texas, USA, Oct. (2004).
- Kawaguchi T., Kawakami H., Yamada R., Sekine A., Nakamura Y., Yamamoto K., and Tsunoda T.: “Large scale SNP-based haplotype analysis of the human chromosome 1p where rheumatoid arthritis-susceptible variants in *PADI4* were identified”, American Soc. of Human Genetics 54th Ann. Meet. (ASHG 2004), Toronto, Canada, Oct. (2004).
- Tsunoda T., Lathrop G. M., Sekine A., Yamada R., Takahashi A., Ohnishi Y., Tanaka T., and Nakamura Y.: “Genome-wide map of gene-based and block-based haplotypes and tag SNPs and comparison of power for association study”, 13th Takeda Science Foundation Symp. on Bioscience on Genome Analysis and Medicine, Tokyo, Dec. (2004).
- Hotta K., Tanabe A., Yanagiya T., Iida A., Tsunoda T., Saito S., Sekine A., and Nakamura Y.: “Systematic search of obesity related gene using SNPs”, 13th Takeda Science Foundation Symp. on Bioscience on Genome Analysis and Medicine, Tokyo, Dec. (2004).