

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

成長科学協会研究年報 (2002.07) 25号:185~188.

思春期発来の遺伝的制御機構:LH/CG受容体及びGnRH受容体多型の役割

伊藤善也, 蒔田芳男, 藤根美穂, 上田修, 向井徳男, 中江淳, 羽田明, 藤枝憲二

思春期発来の遺伝的制御機構:LH/CG 受容体および GnRH 受容体多型の役割

旭川医科大学小児科

伊藤善也、蒔田芳男、藤根美穂、上田 修、向井徳男、中江 淳、羽田 明、藤枝憲二

はじめに

思春期開始に一致した諸種ホルモンの分泌亢進時期がどのような遺伝的機構で制御されているかは明らかではない。加えて思春期発現時期が親子間で相関が高いことは、思春期発現時期が何らかの遺伝的な制御を受けている可能性を示唆する。そこでわれわれは、生活習慣病において提唱されている **common disease common variant** 仮説の応用を考えた。すなわち思春期の発現軸である視床下部-下垂体-性腺系において、GnRH 受容体(GnRHR)、LH/CG 受容体(LH/CGR)と FSH 受容体(FSHR)を code する遺伝子の多型を解析することによって思春期発現時期を規定している遺伝的条件を明らかにすることを目的として研究を計画した。今回はその前段階として解析に用いるハプロタイプを求めた。

方法

研究の初段階として、思春期発現に関わる遺伝子についてSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) 情報に基づくハプロタイプ構築を行った。視床下部-下垂体-性腺系における受容体GnRHR、LH/CGR、FSHRの 3 遺伝子を対象とした。SNP情報は、日本人標準SNPs(JSNP: <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)より得た。上記 3 遺伝子においてハプロタイプでの連鎖解析研究を行うために、採用するハプロタイプの条件を以下のように設定した。遺伝子間での連鎖不平衡の度合いが r^2 の値で < 0.5 、トップハプロタイプの占有率が、50%以下である。

今回の実験の目的を説明し文書にて同意を得た 16 人(32 アレル)の成人を対象とした。DNAは常法によりを分離した。多型の決定のためのPCRプライマー設計は、日本人標準SNPsに登録されている SNPの前後 200 塩基の増幅が可能ないようにPrimer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)を用いて設計した。PCR産物は、Sap-Exo itを用いて過剰なプライマーおよびdNTPsを分解し、サイクルシーケンス法の鋳型とした。ET-terminator sequence kitを用いてサイクルシーケンス反応を行い。配列決定には、ABI-Prism 3100 を用いた。

連鎖不平衡の度合いをしめす r^2 の算出、および maximum-likelihood 法に基づくハプロタイプ構築には、ダイナコム社製の SNPalyze(β 版)を用いた。

結果

1. LHCGR

LHCGR 例として、今回の解析方法を示す。5 つの SNP を選択し(IMS-JST057270、IMS-JST057271、IMS-JST149632、IMS-JST149633、IMS-JST046340。以後順に S270, S271,

S632, S633, S340 と略す)、そのアレルを解析した。

Sample	SNP				
	S270	S271	S632	S633	S340
1	TT	GG	TT	CC	GG
2	TA	GA	TT	CC	GG
3	TA	GA	TT	CC	GG
4	TT	AA	TT	CC	GG
5	TA	GA	TT	CC	GG
6	TT	GG	TT	CC	GG
7	TT	GG	TC	CC	GG
8	AA	AA	TT	CC	GG
9	TA	GA	TC	CC	GG
10	TA	GA	TT	CC	GG
11	TT	GG	TT	CC	GG
12	TA	TA	?	?	GG
13	TT	GG	TC	CC	GG
14	AA	AA	TT	CC	GG
15	TT	GG	TC	CC	GG
16	TA	GA	TT	CC	GG

なお sample No.12 においては S632 のアッセイにおいてシークエンスエラーがあったので、以後の解析からは除いた。

上記より各 SNP における各接合体頻度は次のようになる。

	S270		S271		S632		S633		S340	
接合体	TT	7	GG	6	TT	11	CC	15	GG	15
	TA	6	GA	6	TC	4				
	AA	2	AA	3	CC	0				

これよりアレル頻度を求めると以下のようにある。

	S270		S271		S632		S633		S340	
塩基	T	20	G	18	T	26	C	30	G	30
	A	10	A	12	C	4				

ここで S633 と S340 は 30 アレルの解析において多型を認めなかったため、以後の解析から除外した。

次に S270、S271 と S632 の SNP 間における相関を求めた。

r2	S270	S271	S632
S270			
S271	0.75		
S632	0.07692	0.10256	

S270 と S271 の間には $r^2=0.75$ の相関を認めるので、ハプロタイプを組むためには相関が強すぎると判定した。したがってこの組み合わせは以後の解析では用いないこととした。

次に S270 と S632、S271 と S632 の組み合わせにおけるハプロタイプ頻度を求めた。

No	S270	S632	Frequency
1	T	T	0.533
2	A	T	0.333
3	T	C	0.133
4	A	C	0.000

No	S271	S632	Frequency
1	G	T	0.467
2	A	T	0.400
3	G	C	0.133
4	A	C	0.000

以上よりトップハプロタイプの頻度が 50%を下回る S271 と S632 の組み合わせを解析に用いるハプロタイプとして採用した。

以下 GNRHR と FSHR についても同様の方法で採用するハプロタイプを求めた。

2. GNRHR

対象 SNP : IMS-JST154682 および IMS-JST154684

No	IMS-JST154683	IMS-JST154684	Frequency
1	G	T	0.325
2	G	G	0.300
3	A	G	0.293
4	A	T	0.082

3. FSHR

対象 SNP : IMS-JST012841、IMS-JST022160、IMS-JST022161 および IMS-JST022364

No	IMS-JST 012841	IMS-JST 022160	IMS-JST 022161	IMS-JST 022364	Frequency
1	G	A	A	A	0.41
2	G	A	G	G	0.19
3	A	A	G	A	0.19
4	G	G	G	G	0.19

まとめ

今回の解析により 3 遺伝子でハプロタイプを構成することができた。今後は思春期情報を持った患者群の解析を行い、思春期発現がそれらのハプロタイプでどこまで説明できるかを検討する。