

学位の種類	博士	氏名	渡邊 行朗
-------	----	----	-------

学位論文題目

A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its signaling pathway

[Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)遺伝子とそのシグナル伝達経路を構成する遺伝子内における 106 個の一塩基多型 (SNPs) 及び 11 個のその他の多型の同定]

共著者名

木下 晃、山田 崇弘、太田 亨、木住野 達也、松本 直通、吉浦 孝一郎、
新川 詔夫、石川 睦男

Journal of Human Genetics (2002) 47: p.478-483

平成14年

研究目的

ヒトゲノム解析が進み、約30億の塩基配列が完全に決定されつつある。しかし3~4万種類と推測されているヒト遺伝子のうち、多数の遺伝子産物についてはその機能および詳細な発現調節は明らかにされていない。従って、ゲノム解析は今までの構造解析から機能解析へシフトしつつあるといえる。このゲノム機能解析において最も重要なのは、疾患の発症に関連する遺伝子である。疾患研究に結びつくこの「ポストシーケンス」研究のうち、大きなウエイトを占めるのが遺伝子多型を利用した遺伝疫学的アプローチである。

世界的に見ても、このアプローチにより疾患原因遺伝子を見つけだし、それらを医療に結びつける流れができてつつある。日本も年間数百億円を投じて、遺伝子多型のひとつである一塩基多型 (single-nucleotide polymorphisms; SNPs) の開発とそれを応用した疾患遺伝子研究をすすめている。

SNPs は個人間における 1 塩基の違いを意味する。わたしたちの体型や体質が各々違うように、遺伝暗号である塩基配列も一人一人かなり多くの部位で異なっていることが知られている。一般的にはこの塩基配列の違いを多型とよんでいる。遺伝学的な定義としては、多型とはある塩基の変化がその集団の中で 1% 以上の頻度で存在するものとされている。遺伝子多型には、SNPs のほかに 1 から数十塩基ほど挿入や欠失している挿入/欠失多型、RFLP (restriction fragment length polymorphism; 制限酵素切断断片長多型)、VNTR (variable number of tandem repeat; 繰り返し単位が数塩基から数十塩基のもの) 及びマイクロサテライト多型 (繰り返し単位が 2~4 塩基のもの) がある。この中で、SNPs が特に注目されているのは、①ゲノム内に数百万コピー存在している (他の多型は数千~数万程度しかない) ②判定が非常に容易で、さらに結果を (0, 1) 信号化することができ情報処理が簡単である ③高速・大量の SNPs タイピングが実現されつつある などの理由からで、多型マーカーとして利用しやすく臨床応用が比較的容易である。

TGF- β 1 は、多くの細胞の増殖抑制因子として知られている。TGF- β 1 は血小板や胎盤、骨など様々な組織で産生され、細胞の増殖抑制、細胞外マトリックスの産生、免疫能の抑制などの作用をもっている。また発生の過程において特に心臓の形態形成に重要な働きをしていることが確認されている。また、そのシグナル伝達経路にある 2 種類のレセプター、4 種類の細胞内タンパクにより発現調節を受けている。

本研究の目的は、生体内で多岐にわたるはたらきをもつ TGF- β 1 遺伝子及びそのシグナル伝達経路を構成する遺伝子に関して、SNPs を中心とする多型の存在する位置及び頻度の詳細なデータベースをつくることである。このデータベースは、ある疾患がこれらの遺伝子に対し疾患感受性があるかどうかを研究する際に有用であると考えられる。

材 料 方 法

インフォームドコンセントをとった検診受診者 (健常者) 48 名の血液サンプルより DNA を抽出した。まず初めに 16 名の DNA を用い、TGF- β 1 とそのレセプターである I 型 TGF- β レセプター、II 型 TGF- β レセプター、細胞内シグナル伝達物質である SMAD 2、SMAD 3、SMAD 4、SMAD 7 に関して、それらの遺伝子における全てのエクソンとその両側 1.5 kb ずつ、プロモーター領域、及び 5'-、3'-末端の非翻訳領域で GenBank のデータベースに基づきプライマーを作成し polymerase chain reaction (PCR) 法とダイレクトシーケンシング法にて SNPs 等の多型を探索した。多型がみつけれられた塩基配列に対して、今度は残り 32 名の DNA を用いて計 48 名 (96 対立遺伝子) におけるその多型の頻度を求めた。

成績

本研究において、TGF- β 1 とそのシグナル伝達経路を構成するタンパクをコードする計7つの遺伝子において、106 個の SNPs と 11 個の多型を同定した。106 個の SNPs のうち 79 個（全体の 75%）は既存の SNPs データベースになく新規に同定されたものである。今回調べた遺伝子のうち、アミノ酸をコードするエクソン内に 5 個の SNPs を同定したが、そのうち 2 個はアミノ酸置換をおこすものである。よってこれらの SNPs は遺伝子産物の構造や生物学的機能に影響をあたえる可能性が考えられる。

詳細に述べると、TGF- β 1 遺伝子においては 11 個の SNPs が同定された。そのうち 1 個はエクソンに、1 個は 5'末端領域に、残り 9 個はイントロンに存在した。このエクソン内の SNPs は、ロイシンをプロリンにアミノ酸置換する多型である。I 型 TGF- β レセプター遺伝子にはイントロンに 11 個、3'側非翻訳領域に 1 個 SNPs をみつけた。II 型 TGF- β レセプター遺伝子にはエクソンに 1 個、イントロンに 27 個、3'側非翻訳領域に 3 個の SNPs をみつけた。このエクソン内の SNPs もバリンをイソロイシンにアミノ酸置換する多型である。その他に、II 型 TGF- β レセプター遺伝子にはイントロンに 2 個の欠失多型をみとめた。SMAD 2 遺伝子には、全てイントロンに 6 個の SNPs が存在した。SMAD 3 遺伝子には、エクソンに 1 個、イントロンに 18 個、5'末端領域及び 3'側非翻訳領域に 1 個ずつ SNPs が存在した。このエクソン内の SNPs はアミノ酸置換をおこさない。SNPs 以外の多型も 4 個みとめられた。SMAD 4 遺伝子には、5'末端領域に 2 個、イントロンに 4 個、3'側非翻訳領域に 2 個 SNPs が存在した。加えて欠失多型も 1 個みとめられた。SMAD 7 遺伝子には、エクソンに 2 個、イントロンに 10 個、3'側非翻訳領域に 1 個、3'末端領域に 3 個の SNPs があつた。このエクソン内の SNPs もアミノ酸置換をおこさない。他にも欠失多型と挿入多型が各々 2 個ずつみとめられた。

考案

本研究の対象である TGF- β シグナル伝達経路を構成するタンパクは、骨や筋肉の分化、免疫抑制、発ガンなどに関連している。そのため、この多型データはこれらに関連する研究分野に対して有用であると思われる。実際、TGF- β 1 のある多型が骨密度に影響を与え骨粗鬆症への疾患感受性に関連があるとする報告がでている。この報告の他にも、これらタンパクの変異により様々な疾患を引き起こしていることが判明している。例を挙げると、TGF- β 1 の変異で常染色体優性遺伝する骨硬化性病変を引き起こす Camurati-Engelmann 病などがある。また遺伝子的変異による Smad2, Smad4 の不活化が膵臓ガンに関連しているとする報告もある。このほかにも TGF- β 1 とそのシグナル伝達経路の異常は様々な疾患に関与している可能性がある。多型は 1%以上存在するありふれたものなので、その多型 1 つがあるからといってそれがそのまま疾患の直接の原因となる可能性はほとんどないが、疾患感受性などに影響を与えることは十分考えられる。

結 論

TGF- β 1 とそのシグナル伝達経路を構成するタンパクをコードする遺伝子群に関して、SNPs を中心とする詳細な多型データベースを作成した。

引 用 文 献

Kinoshita A, Saito T, Tomita H, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G,

Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N,

Yoshiura K (2000) Domain-specific mutations in TGFB1 result in Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet*

26:19-20

Massagué J (1998) TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791

Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Tanaka M, Mizuno M, Harada A (2001) Association of the C-509-->T polymorphism,




alone of in combination with the T869-->C polymorphism, of the transforming growth factor- β 1 gene with

bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J Mol Med* 79:149-156

参 考 論 文

なし

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏名	渡邊 行 朗
審査委員長 <u>塩野 寛</u> 			
審査委員 <u>片桐 一</u> 			
審査委員 <u>石川 聡男</u> 			
学 位 論 文 題 目			
<p>A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNP_s) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and its signaling pathway [Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) 遺伝子とそのシグナル伝達経路を構成する遺伝子内における106個の一塩基多型 (SNP_s) 及び11個のその他の多型の同定]</p>			
<p>TGF-β1は、多くの細胞の増殖抑制因子として知られている。TGF-β1は血小板や胎盤、骨など様々な組織で産生され、細胞の増殖抑制、細胞外マトリックスの産生、免疫能の抑制などの作用をもっている。また発生過程において特に心臓の形態形成に重要な働きをしていることが確認されている。また、そのシグナル伝達経路にある2種類のレセプター、4種類の細胞内タンパクにより発現調節を受けている。</p> <p>本研究の目的は、生体内において多くの細胞の増殖抑制因子として知られる Transforming growth factor-β (TGF-β1) とそのシグナル伝達経路を構成するタンパクをコードする遺伝子群において、一塩基多型 (SNP_s) を主とした多型を調べ、その位置と頻度を詳細に示したデータベースを作成することである。SNP_s は主に疾患に関連する遺伝子（責任遺伝子）の探索の際に多型マーカーとして利用される。また、SNP_s そのものが遺伝子発現に影響を及ぼしたり、アミノ酸変異を生じさせている場合、疾患のリスク診断等にも利用される。</p> <p>本研究において、TGF-β1遺伝子は11個のSNP_sが同定された。そのうち1個はエクソンに、1個は5'末端領域に、残り9個はイントロンに存在した。このエクソン内のSNP_s は、ロイシンをプロリンにアミノ酸置換する多型である。I型TGF-βレセプター遺伝子にはイントロンに11個、3'側非翻訳領域に1個SNP_sをみつけた。II型TGF-βレセプター遺伝子にはエクソンに1個、イントロンに27個、3'側非翻訳領域に3個のSNP_sをみつけた。このエクソン内のSNP_sもバリンをイソロイシンにアミノ酸置換する多型である。その他に、II型TGF-βレセプター遺伝子にはイントロンに2個の欠失多型をみとめた。SMAD2遺伝子には、全てイントロンに6個のSNP_sが存在した。</p>			

SMAD3遺伝子には、エクソンに1個、イントロンに18個、5'末端領域及び3'側非翻訳領域に1個ずつSNP_sが存在した。このエクソン内のSNP_sはアミノ酸置換をおこさない。SNP_s以外の多型も4個みとめられた。SMAD4遺伝子には、5'末端領域に2個、イントロンに4個、3'側非翻訳領域に2個SNP_sが存在した。加えて欠失多型も1個みとめられた。SMAN7遺伝子には、エクソンに2個、イントロンに10個、3'側非翻訳領域に1個、3'末端領域に3個のSNP_sがみとめられた。このエクソン内のSNP_sもアミノ酸置換をおこさない。他にも欠失多型と挿入多型が各々2個ずつみとめられた。

TGF- β 1は骨や筋肉の分化、免疫抑制、発癌等に関連している。そのため、この詳細な多型データベースはそれらに関連する疾患の感受性遺伝子検索などに大変有用であると思われる。本研究は、TGF- β 1とそのシグナル伝達経路を構成するタンパクをコードする遺伝子群に関して、SNP_sを中心とする多型データベースを明らかにした。

なお、論文提出者は各審査委員による本論文の内容及び関連領域についての試問には適切な応答が得られた。

以上の理由により、本論文は学位論文に値するものと判定した。