

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3551312号

(P3551312)

(45) 発行日 平成16年8月4日(2004.8.4)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 9 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2001-38621 (P2001-38621)	(73) 特許権者	391012501 九州大学長 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号
(22) 出願日	平成13年2月15日(2001.2.15)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(65) 公開番号	特開2002-238571 (P2002-238571A)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(43) 公開日	平成14年8月27日(2002.8.27)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
審査請求日	平成13年2月15日(2001.2.15)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
前置審査		(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1に示す第600位の塩基から第671位の塩基までに存在する「gt」リピート領域より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する15～30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチド又はその相補体、と前記リピート領域より下流に存在するヌクレオチド配列中連続する15～30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドとからなる、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対。

【請求項2】

次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5'-AAGTTTCCTTTCCGGTCTTA(配列番号：2)

リバーズプライマー：5'-CTACAAGCTTTACTGCACTAGC(配列番号：3)

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項1に記載のプライマー対。

【請求項3】

1型糖尿病にかかりやすい個体を同定するための請求項1又は2に記載のプライマー対。

【請求項4】

配列番号：4に示す第635位の塩基から第666位の塩基までに存在する「ca」リピート領域より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する15～30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチド又はその相補体、と前記リピート領域より下流に存在するヌクレオチド配列中連続する15～30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドとからなる、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対。

10

20

【請求項 5】

次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5'-AGGTGGGTTAGACAGAAATAG（配列番号：5）

リバースプライマー：5'-GAGAGGTTTTGCTTGTCTT（配列番号：6）

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項3に記載のプライマー対。

【請求項 6】

1型糖尿病にかかりやすい個体を同定するための請求項4又は5に記載のプライマー対。

【請求項 7】

配列番号：7に示す33位のヒスチジンのコドンCAC（塩基番号1900～1902）より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する15～30個の連続するヌクレオチドのオリゴヌクレオチド又はその相補体と、前記ヒスチジンのコドンより下流に存在するヌクレオチド配列中15～30個の連続するヌクレオチドのオリゴヌクレオチド又はその相補体とから成る、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対。

10

【請求項 8】

次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5'-CAGTCTATGGATGAGGCAC（配列番号：8）

リバースプライマー：5'-AAACTTGGACCACAACAGGTG（配列番号：9）

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項5に記載のプライマー対。

【請求項 9】

1型糖尿病にかかりやすい個体の同定のための請求項7又は8に記載のプライマー対。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、1型糖尿病感受性遺伝子又は1型糖尿病にかかりやすい個体の同定のためのプライマーに関する。

【0002】

【従来の技術】

1型糖尿病の発症に関与する遺伝的背景因子の同定に関しては、その発生頻度の高いコーカサス人集団を中心に研究が進められており、これまでに証明された遺伝子座位はIDDM1-15のほかいくつかの染色体上の位置が報告されている。しかしながらそれぞれの座位における疾患感受性遺伝子についてはIDDM1（HLA遺伝子）とIDDM2のインスリン遺伝子を除きまだ証明されていない。

30

【0003】

一方、1型糖尿病発症に関連する候補遺伝子疾患関連研究に関しては、これまで多くの遺伝子について報告がある。INF-、インターフェロン1受容体、CTLA-4、CD28、TNF、ケモカイン受容体などの関連性の報告があるが、民族集団により結果の相違を見るケースもある。

Tリンパ球には、そのサブセットとしてTh1とTh2という異なった2つのタイプが存在することが証明されており、1型糖尿病や多発性硬化症などの疾患はTh1、アレルギーや全身性ループスエリテマトーデスなどはTh2優位の疾患であると考えられている。

40

【0004】

T-bet遺伝子は、最近同定された転写因子でTh1系の細胞に特異的に発現し、かつTh2系細胞に強制的にT-bet遺伝子を発現させるとTh1の性質を持つようになることから、Th1系への分化に重要な働きを有することが示唆されている（O'Garra A., Nature. 404 : 719-720 ; Szabo SJ, Klim ST, Cosn GL, et al. ; Cell. 100 : 655-669）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、T-bet遺伝子と1型糖尿病感受性との関係は知られていない。

50

従って、本発明は、T - b e t 遺伝子の領域と1型糖尿病感受性との関連を解明し、1型糖尿病感受性に関連する遺伝子又は1型糖尿病にかかりやすい個体を同定するためのプライマーを提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決すべくゲノムT - b e t 遺伝子をクローニングし、その配列を決定した結果、ヒトT - b e t 遺伝子は6個のエキソンと5個のイントロンを有し、エキソン1にGTリピート(多型1と称する)が存在し、3' - 非翻訳領域にCAリピート(多型2と称する)、そしてエキソン1のアミノ酸番号33のコドン中に1塩基遺伝子多型が存在し、これらの多型が日本人集団における1型糖尿病と関連することを見出し、本発明を完成した。

10

【0007】

従って本発明は、配列番号：1に示す第600位の塩基から第671位の塩基までに存在する「gt」リピート領域より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する10～50個のヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチド又はその相補体、と前記リピート領域より下流に存在するヌクレオチド配列中連続する10～50個のヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチドとからなる、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対を提供する。

【0008】

上記のプライマー対の具体例として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5' - A A G T T T C C T T T C C G G T C T T A (配列番号：2)

20

リバースプライマー：5' - C T A C A A G C T T T A C T G C A C T A G C (配列番号：3)

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項5に記載のプライマー対が挙げられる。

【0009】

本発明はまた、配列番号：4に示す第635位の塩基から第666位の塩基までに存在する「ca」リピート領域より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する10～50個のヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチド又はその相補体、と前記リピート領域より下流に存在するヌクレオチド配列中連続する10～50個のヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチドとからなる、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対が挙げられる。

30

【0010】

上記プライマー対の具体例として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5' - A G G T G G G T T A G A C A G A A A T A G (配列番号：5)

リバースプライマー：5' - G A G A G G T T T T G C T T G T C T T (配列番号：6)

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項3に記載のプライマー対が挙げられる。

【0011】

本発明はさらに、配列番号：7に示す33位のヒスチジンのコドンCAC(塩基番号1900～1902)より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する10～50個の連続するヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチド又はその相補体と、前記ヒスチジンのコドンより下流に存在するヌクレオチド配列中10～50個の連続するヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチド又はその相補体とから成る、1型糖尿病感受性遺伝子同定用プライマー対を提供する。

40

【0012】

上記プライマー対の具体例として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー：5' - C A G T C T A T G G A T G A G G C A C (配列番号：8)

リバースプライマー：5' - A A A C T T G G A C C A C A A C A G G T G (配列番号：9)

50

9)

を有する2個のオリゴヌクレオチドから成る、請求項5に記載のプライマー対が挙げられる。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明においては、まず、ヒトT - b e t 遺伝子はそのcDNA情報しか登録されておらずゲノム情報は未発表のため、GenBankに登録されているクローンをT - b e t 遺伝子cDNA情報を用いてスクリーニングした結果、ゲノムクローンを同定し(c l o n e h C I T . 2 1 1 # P # 7 , a c c e s s i o n n o . A C 0 0 3 6 6 5)この中にヒトt - b e t 遺伝子が存在することを確認した。その結果、遺伝子の構造としては、6個のエキソンと5つのイントロンからなると推定された。イントロン領域にはいくつかのマイクロサテライトの可能性のあるリピート配列が存在し、我々はそれらの解析の結果、エキソン1にGTリピート(多型1)と3'UTR領域にCAリピート(多型2)マイクロサテライト多型が存在することを同定した。

10

【0014】

またエキソン1内のアミノ酸番号33のヒスチジンはグルタミンに置換した1塩基遺伝子多型(多型3)があることが同定された。これらt - b e t 遺伝子内の3カ所を遺伝子多型を日本人集団における1型糖尿病への関与を疾患関連研究法で解析し、その結果、3カ所の遺伝子多型のそれぞれ特定の遺伝子多型が1型糖尿病患者において統計学的に有意に多く、疾患感受性遺伝子であることが強く示唆された。すなわち疾患感受性遺伝子と同定

20

【0015】

従って、本発明における多型1のGTリピート数を決定するための増幅用プライマーとしては、GTリピートの上流の任意の位置にあるヌクレオチド配列に対応するホワードプライマーとGTリピートの下流の任意の位置にあるヌクレオチド配列に対応するリバースプライマーとから成るプライマー対が使用される。

同様に、多型2のCAリピート数を決定するための増幅用プライマーとしては、CAリピートの上流の任意の位置にあるヌクレオチド配列に対応するホワードプライマーと、ACリピートの下流の任意の位置にあるヌクレオチド配列に対応するリバースプライマーとから成るプライマー対が使用される。

30

【0016】

さらに、多型3の検出用プライマーとしては、塩基置換多型部位であるC A C (H i s) / C A G (G l n) 部位より上流の任意の位置のヌクレオチド配列に対応するホワードプライマーと、前記多型部位より下流にあるヌクレオチド配列に対応するリバースプライマーとから成るプライマー対が使用される。

【0017】

多型1及び多型2のリピート数を決定するためのホワードプライマーが対応するゲノム配列の位置としては、リピートの上流末端からおよそ600塩基の位置にある塩基と、リピートの上流末端からすぐ上流の塩基との間にある任意の配列であることができる。また、多型1及び多型2のリピート数を決定するためのリバースプライマーが対応するゲノム配列の位置としては、リピートの下流末端からおよそ600塩基の位置にある塩基と、リピートの下流末端のすぐ下流の塩基との間にある任意の配列であることができる。

40

【0018】

しかしながら、ホワードプライマーに対応するゲノム上の位置としては、リピートの上流末端から上流方向に300塩基以内にあることが好ましく、150塩基以内にあることがさらに好ましく、例えば50塩基以内にあることが好ましい。また、リバースプライマーに対応するゲノム上の位置としては、リピートの下流末端から下流方向に300塩基以内にあることが好ましく、150塩基以内にあることがさらに好ましく、例えば50塩基以内にあることが好ましい。

【0019】

50

多型3検出用のホワードプライマーに対応するゲノム上の位置としては、多型部位から上流1500ヌクレオチドの範囲内が好ましく、1000ヌクレオチドの塩基がさらに好ましく、例えば500ヌクレオチド以内にあるのが好ましい。多型3検出用のリバースプライマーに対応するゲノム上の位置としては、多型部位から下流1500ヌクレオチドの範囲内が好ましく、1000ヌクレオチドの範囲内がさらに好ましく、例えば500ヌクレオチドの範囲内が好ましい。

【0020】

プライマーの長さは、常用のPCR技術に関する知見に基いて定められ、通常10～50ヌクレオチドの長さ、より一般的には15～40ヌクレオチドの長さ、例えば15～30ヌクレオチドの長さである。

10

プライマーの塩基配列としては、対応するゲノム上の配列と完全に同一であるか、又は正確な相補体であることが好ましいが、完全に一致しなくても特定の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得ることは明らかである。従って、ゲノム配列のある領域に「対応する」プライマーの配列としては、ゲノム配列の対応領域と完全に同一の配列及び正確な相補体である配列（これらを含めて、完全に一致する配列と称する）のほか、これらの完全に一致する配列に対して10ヌクレオチド当たり、1～3ヌクレオチド異なる程度の相同性ヌクレオチド配列も含まれる。

【0021】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

20

実施例

(1)多型1を同定するために、ゲノムクローンの塩基配列をもとにして、PCRプライマーセットの塩基配列を決定し、PCRでこの多型を含む領域を増幅後にアプライドバイオシステム社の310 PRISM装置並びに解析ソフトGeneScanを用いて、各個人のマイクロサテライトマーカの長さを同定した。

【0022】

(2)多型2を同定するために、多型1と同様にゲノムクローンの塩基配列をもとにして、PCRプライマーセットの塩基配列を決定し、PCRでこの多型を含む領域を増幅後各個人のマイクロサテライトマーカの長さを同定した。

(3)多型3を同定するため、この多型を含む領域を増幅するPCRプライマーセット塩基配列を決定し、PCRで増幅後に制限酵素Eco47 IIIで処理することで多型を同定した。

30

【0023】

まず、各試料から鋳型DNAを次のようにして調製した。末梢血約0.5mlより、DNA抽出キット(QIAamp blood kit、キアゲン社)を用いてDNAを抽出した。得られたDNA量は、吸光度を測定(Spectrophotometer、島津社製)することで定量した。

(1)多型1を解析するためのPCRプライマーセットの塩基配列

ホワードプライマー：5' - AAGTTTCCTTTCCGGTCTTA (配列番号：2)

40

リバースプライマー：5' - CTACAAGCTTTACTGCACTAGC (配列番号：3)

上記のプライマーにより増幅されたPCR産物は、GTリピートの繰り返し数により、日本人集団では配列番号：1に示す多型を含めて26種類の多型性を有していた。

【0024】

結果を次の表1及び表2に示す。

【表1】

表 1

対立遺伝子 NO.	反復数 (n)	正常者		1型糖尿病(全数)		1型糖尿病(発病が10歳以下)	
		対立遺伝子数 (頻度)	P値	対立遺伝子数 (頻度)	P値	対立遺伝子数 (頻度)	P値
(TG) _n							
対立遺伝子1	15	1 (0.3)	---	1 (0.3)	---	1 (0.5)	---
対立遺伝子2	20	0 (0.0)	0.19	2 (0.7)	0.19	0 (0.0)	---
対立遺伝子3	21	0 (0.0)	0.43	1 (0.3)	0.43	1 (0.5)	0.35
対立遺伝子4	23	2 (0.5)	---	1 (0.3)	---	1 (0.5)	---
対立遺伝子5	24	0 (0.0)	0.19	2 (0.7)	0.19	2 (0.9)	0.12
対立遺伝子6	25	4 (1.0)	0.70	2 (0.7)	0.70	2 (0.9)	---
対立遺伝子7	26	7 (1.7)	0.83	6 (2.0)	0.83	2 (0.9)	0.50
対立遺伝子8	27	4 (1.0)	0.51	5 (1.6)	0.51	2 (0.9)	---
(TG) ₁₄ TA(TG) _n							
対立遺伝子9	13	1 (0.3)	---	1 (0.3)	---	1 (0.5)	---
対立遺伝子10	14	22 (5.5)	0.36	22 (7.2)	0.36	17 (7.8)	0.26
対立遺伝子11	15	2 (0.5)	0.25	5 (1.6)	0.25	3 (1.4)	0.35

【 0 0 2 5 】

【 表 2 】

表 2

対立遺伝子 No.	反復数 (n)	正常者		1型糖尿病(全数)		1型糖尿病(発病が10歳以下)	
		対立遺伝子数 (頻度)	P値	対立遺伝子数 (頻度)	P値	対立遺伝子数 (頻度)	P値
(TG)nTA(TG) ₄ CC(TG) ₅							
対立遺伝子12	20	1 (0.3)	---	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
対立遺伝子13	21	19 (4.7)	0.59	12 (3.9)	0.59	10 (4.5)	0.93
対立遺伝子14	22	22 (5.5)	0.01	32 (10.5)	0.01	25 (11.5)	0.007
対立遺伝子15	23	15 (3.8)	0.13	19 (6.2)	0.13	14 (6.4)	0.13
対立遺伝子16	24	34 (8.5)	0.55	30 (9.8)	0.55	24 (11.0)	0.31
対立遺伝子17	25	72 (18.0)	0.01	34 (11.0)	0.01	26 (11.9)	0.04
対立遺伝子18	26	36 (9.0)	0.69	25 (8.2)	0.69	17 (7.8)	0.61
対立遺伝子19	27	41 (10.2)	0.63	28 (9.2)	0.63	16 (7.3)	0.23
対立遺伝子20	28	36 (9.0)	0.69	25 (8.2)	0.69	16 (7.3)	0.48
対立遺伝子21	29	34 (8.5)	0.18	18 (5.9)	0.18	13 (6.0)	0.26
対立遺伝子22	30	33 (8.2)	0.3	19 (6.2)	0.3	13 (6.0)	0.30
対立遺伝子23	31	7 (1.7)	0.61	7 (2.3)	0.61	5 (2.3)	0.64
対立遺伝子24	32	0 (0.0)	0.08	3 (1.0)	0.08	2 (0.9)	0.12
対立遺伝子25	33	6 (1.5)	0.89	5 (1.6)	0.89	5 (2.3)	0.48
対立遺伝子26	34	1 (0.3)	---	1 (0.3)	---	0 (0.0)	---

【0026】

表1及び表2は、正常者からの試料200個(対立遺伝子数400個)、1型糖尿病患者からの全試料153個(対立遺伝子数306個)、及び発病が10歳以下の1型糖尿病患者からの試料109個(対立遺伝子数218個)について、多型1の各対立遺伝子型(GT反復数)に属する対立遺伝子の個数及び頻度分布(%)、並びにこれらを正常者からの試料と1型糖尿病患者からの試料について比較したP値を示す。なお、検定は、カイ自乗検定にて行い、P値が0.05以下を有意と判定した。

【0027】

以上の結果から、対立遺伝子14における対立遺伝子頻度において、正常者と1型糖尿病

10

20

30

40

50

者間、また正常者と10歳以下の発症の1型糖尿病患者間で統計学的に有意な差異を認めた。

【0028】

(2) 多型2を解析するためのPCRプライマーセットの塩基配列

ホワードプライマー：5' - A G G T G G G T T A G A C A G A A A T A G (配列番号：4)

リバースプライマー：5' - G A G A G G T T T T G C T T G T C T T (配列番号：5)

上記のプライマーにより増幅されたPCR産物は、CAリピートの繰り返し数により、日本人集団では配列番号：3に示す多型を含めて6種類の多型性を有する。

結果を次の表3に示す。

【0029】

【表3】

表 3

対立遺伝子 NO.	反復数 (n)	正常者		1型糖尿病(全数)		1型糖尿病(発病が10歳以下)	
		対立遺伝子数(頻度)	P値	対立遺伝子数(頻度)	P値	対立遺伝子数(頻度)	P値
対立遺伝子1	13	0 (0.0)		1 (0.3)	0.43	1 (0.5)	0.35
対立遺伝子2	14	27 (6.7)		38 (12.4)	0.0098	30 (13.7)	0.0040
対立遺伝子3	15	4 (1.0)		5 (1.6)	0.51	1 (0.5)	0.66
対立遺伝子4	16	240 (60.0)		177 (57.9)	0.56	124 (56.9)	0.45
対立遺伝子5	17	122 (30.5)		82 (26.8)	0.28	61 (27.9)	0.51
対立遺伝子6	18	7 (1.7)		3 (1.0)	0.53	1 (0.5)	0.27

【0030】

表3は、正常者からの試料200個(対立遺伝子数400個)、1型糖尿病患者からの全試料153個(対立遺伝子数306個)、及び発病が10歳以下の1型糖尿病患者からの試料109個(対立遺伝子数218個)について、多型2の各対立遺伝子型(AC反復数)に属する対立遺伝子の個数及び頻度分布(%)、並びにそれらを正常者からの試料と1型糖尿病患者からの試料について比較したP位を示す。

以上の結果から、対立遺伝子2における対立遺伝子頻度において、正常者と1型糖尿病患者間、また正常者と10歳以下の発症の1型糖尿病患者間で統計学的に有意な差異を認めた。

【0031】

10

20

30

40

50

(3) 多型3を同定のPCRプライマーセットの塩基配列

ホワードプライマー：5' - C A G T C T A T G G A T G A G G C A C (配列番号：8)

リバースプライマー：5' - A A A C T T G G A C C A C A A C A G G T G (配列番号：9)

上記のプライマーにより増幅されたPCR産物は、ヒスチジン対立遺伝子型はEco47 IIIで消化されないがグルタミン対立遺伝子型は2本に消化される。このことを利用して、アミノ酸番号33のヒスチジン・グルタミン遺伝子多型の区別が可能である。

【0032】

PCR法にて上記の下線の塩基配列で増幅される1484塩基対のフラグメントは、制限酵素Eco47 III処理にて、His対立遺伝子は680塩基対と804塩基対に消化されたが、Gln対立遺伝子は新たなEco47 III消化部位の出現により330塩基対、350塩基対と804塩基対に消化された。

10

【0033】

【表4】

表4

塩基置換によるアミノ酸の変化

His Arg Tyr

CAC CGC TAC

↓

Gln

CAG

20

制限酵素部位

CAC CGC TAC

↓

CAG CGC TAC

30

AGC/GCT = Eco47 III

40

His(33)型対立遺伝子及びGln(33)型対立遺伝子のヌクレオチド配列の例を配列番号：10及び配列番号：11に示す。

結果を、表5に示す。

【0034】

【表5】

表 5

遺伝子型	試料数	アミノ酸33位における遺伝子型		P
		His33/ His33	His33/ Gln33	
正常者	200	162 (81.0%)	34 (17.0%)	4 (2.0%)
1型糖尿病				
全体	153	108 (70.6%)	43 (28.1%)	2 (1.3%)
病歴10年以下	109	74 (67.9%)	33 (30.3%)	2 (1.8%)
病歴10年以上	44	34 (77.3%)	10 (22.7%)	0 (0.0%)

表5は、正常者からの試料200個（対立遺伝子数400個）、1型糖尿病患者からの全試料153個（対立遺伝子数306個）、発病が10歳以下の1型糖尿病患者からの試料109個（対立遺伝子数218個）及び発病が10歳以上の糖尿病患者からの試料44個（対立遺伝子数88個）について、遺伝子型His33/His33、His33/Gln33、及びGln33/Gln33に属する遺伝子型の数及び頻度（%）、並びにそれらの比較により得られるP値を示す。検定は、カイ自乗検定にて行い、P値が0.05以下を有意と判定した。

【0035】

上記の表より、正常患者に比べて1型糖尿病患者において、His33/Gln33の比率が高いことがわかる。

以上の結果から、多型1においてGT反復数が49の個体、多型2においてAC反復数が12の個体、及び多型3において遺伝子型Gln33を有する個体は、1型糖尿病にかか

10

20

30

40

50

る可能性が高いと予想される。

【 0 0 3 6 】

【 配 列 表 】

<110> Ihara Kenji

<120> Primers for identification or Type 1 diabetes-revsitive genes

<160> 11

<210> 1

<211>

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 1

<400> 1

```

cgcgccggcc ctggggccct ctgtccccgc gccggaacaa gaacgtctcg tctgttttc 60
tggctcgaca atgcttctga ctccgtgtcc ctactgctt tggcttcagc gtagggagac 120
aggggaatgg ggttgttagg aggacagggg aagctccgga gggcgctctg tgcccaggct 180
gttgcaccaa cagccagagg actcacaagg gagacgggtg agtgcgggac agtgagaagt 240
caccttgatt taggggaagg gtgactgtgg ctacacctag aattgggtgt cgtccctgcc 300
ccactctcta ctgtagagga gtgcgacggg gcagtgaag cctgtgctct gggcggacag 360
gacgcctggg cctcctgtgt gggaaactgg aggggaaggg agcccttat ctccgggccc 420
cctgcgcca cctccccgg ctcctttgct gctgggtgic tcaggtcagc tttagtgggt 480
gtagtgggtg tggtagcggg ggtgggtggg tgtgtgtacg gggggagatt gggatttggg 540
gacatggaga agcagtcgcc aagtctctt tccggtctta cttgagatc atatgtctgg 600
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 660
ggtgtgtgtg tatgggggct agtgcagtaa agcttgtagg gggcacagat ccttccagg 720
cacaaatgcc cacgggctgg gcagatgaag ctacccagg ggtccagcct ggtagccagc 780
cccacacigc acctttgag gctgggtccag tgaaaaccti cccacactc ctgtccagaa 840
attcaccggt tcagcctgga gaagtgggga aggggtgtcc catggcttca tggctcaggg 900
ttctgagcc cgtgctgta tggggagagt ttggggctga ggggtctgct tccggataga 960
gcctcctgcg caaggaaaga aacagaaacc tgtgacttgt gtggtatttg tttagtaagc 1020
aaccctcgga gggactgtg tctgatgtgg gctgtgcgca cccaccctc ccagtgcggc 1080
ccatgtgagc aggggaccag cgaggaccag tgtggaaggg ctgttgtcat tggtagacct 1140
gggatgcagg gicccaggic cgagaggigt ggataccaaa cgtggggctt ggggtggagg 1200

```

20

30

40

ggagagggag aaggccatgt tggaccccag aggttgga 1239
【0037】
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> 10
 <223> Forward primer for polymorphism 1
 <400> 2
aagtttcctt tccggtctta 20
【0038】
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA 20
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Reverse primer for polymorphism 1
 <400> 3
ctacaagctt tactgcacta gc 22
【0039】
 <210> 4 30
 <211>
 <212>
 <213> Homo sapiens
 <223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 2
 <400> 4
taatacatgt aaagggttta agaacattgc ctgacaaaca gtaagcactc actgtgtaag 60
ctactgtttac caacagtttc tagctgtttc tgtctgtctt ttatacaca ctgaattgtg 120 40
tttgtaaaat aatacatact ttttttttt ttttttgaga cagagttttg ctcttgttgc 180

ccaggctgga atgcaatggt gcgatcicag ctcactgaaa ccttcgcctc ccaggttcaa	240	
gtgattctcc tgcctcacc ccttgagtag ctgggattac agatgtgcac caccatgcct	300	
ggctaatttt tgtattttta gtagagacgg tgitcgcga tattggccag gctggctcgc	360	
aactcctgac gtcaggatgat ctaccacct tggcttccca aagtgcctggg attacaggcg	420	
tgcgtcacca caticagcct atacatgctt ctittaaata attcaagcaa ggaagaaaag	480	
tataaagaca acaataaatt atctcaaate ttaccatca agaattatca ttaacattag	540	
gtgggttaga cagaaatagt ttataaatt ggaaccatac tgaaaaggct tttcttaat	600	10
gaaaatgggt aaattttagc ttatagaatt tagtcacaca cacacacaca cacacacaca	660	
cacacatcaa gacaagcaaa acctctcaaa ctctcaagtg aaatgaaggg agttgctaaa	720	
cttaagataa atttttcttc actacaagaa atattttctt ggtttttttt ttttttgaga	780	
cagagctcgc ctctgttgc caggctggag tgcagtgga cgatcicagc tcactgcaac	840	
ctccacctcc tgggttcaag cagtctctct gcctcagcct cccgagtgc tgagactaca	900	
ggcgtgtgcc accacgccg gcittttttg tgtttttgtt agagacgggg tttcaccat	960	
attagccagg atggctctga tctcttgacc tctgtatctg tctgcctcgg cctcccaaag	1020	20
tgctaggatt ataggcgtga gccaccgtgc ccaggcaaga aatagtt	1067	

【0 0 4 0】

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for polymorphism 2

<400> 5

aggtgggta gacagaaata g	21	
------------------------	----	--

【0 0 4 1】

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Reverse primer for polymorphism 2

<400> 6

gagaggtttt gcttgtctt 19

【 0 0 4 2 】

<210> 7

<211>

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 3

<400> 7

gtccccatag gccccctaagg gtgaagccct gtcaggctgg gacagaaatg tagagctggg 60
 gccagttccc aggggagaac tggggaggac tggggtgaag gtagagagag gagaagttaa 120
 actttaacat gacaaaaata ttaaagtatt tticaaagta ctcttaaaaa tgtaaatctt 180
 tatctatata ctgatatgca aatatattcca tgacaccttg tggagtgaaa aaaaagtaca 240
 cattataaag cagcatgtgt agtgtttata taaattatat atttggcat gtgtgcaaaa 300
 gacagagaca gagagtatat aaggagtgag gtctcagagg gtgttcactg aaatgttaat 360
 cctgtttggc tttaggggtt ggaatttggg gtgatttata cagtcctgtt ttacttttc 420
 tgtgctgctt aaatttccta tataagtatg ttcatcttt atacacagga aaactcccaa 480
 tgatgctatt ttcaattggg gggggggaaa cggatagtt tcatcataaa aggagcttaa 540
 tacattagtt aacataaaag gaaaatggag aaagaaaagc ctccatcgtc ctatctccga 600
 ggcagccctt cagagcatgt ggtgggttcc ctccctgtca gccggctctg aatcgtttca 660
 aagcagcttt tccatccagg tataataata gattggaaag tgctgcacac gtacaccctc 720
 tcatgtaagg ctgacagccc cctgaaaag tagatctgtt tatttccccc agtctatgga 780
 tgaggcacgt gaggttgact ttcaggcaag gaaaatgact tgcctgggtc acatatacct 840
 ggcaggcaga gccagacctg ggactctcag cactggcagc ccaatgctac ttccagtgcc 900
 catgactgcc atgcagggtt ggggagcttt tgtgggacct gccaggccca gctcagggcc 960
 ctgcaaacc cttggctgctg ctgatgcagt gcgccttaag gaacatttcc tgttgtccat 1020
 caggttccag gtcigcccc agggctagag ctacaagatg cagccaactc agcacatgtg 1080

20

30

40

gacctctggt	ggggagaaag	agggcaaccc	gaaaggcac	ttagcacaga	gictgggcac	1140	
acagtaggta	tcaataaaga	tcgattgaat	gttcattggc	aaagtigtct	ctagtgtgcc	1200	
ctgtctccga	gcccttgagt	gccaggagaa	tgcccagcga	gtcccacttg	ggccatctcg	1260	
gaaggttcc	tgtaggagag	ggcctttgag	ctgagacttc	aaagctgggc	tgaatttccc	1320	
cgaggttcca	gaagagagcc	acgggciggt	gtgtcaggca	gctggagctga	cactcccaga	1380	
aagcaagatc	ttcgaactac	aggggtgcgc	caggctctcg	ctctctcca	ccatgggggg	1440	
ccctgcagta	ctcgccaaga	gcgtagaatt	tgccctagat	tagccacgag	agggcggggt	1500	10
ggggcgaggc	ggagcagggc	cgaggtggcg	gagtgggggg	gagccggaga	gcttcataaa	1560	
gccacagcaa	agcgcctcga	ctctagtgac	agcggcccgc	tggagaggaa	gcccgagagc	1620	
tgcgcgcgc	ctgcccggac	agggcgtaga	agccaggcgt	cagagcccgg	gctccgggtg	1680	
ggtccccac	ccggcccctg	ggtccccgc	ccccgtctc	ctgcccctcc	cagcccacgc	1740	
gacctctctg	cgcgcggagg	ggcgggtcct	cgacggctac	gggaagggtc	cagcccgcc	1800	
cggatgggca	tcgtggagcc	gggttgcgga	gacatgtcga	cgggcaccga	gccgatgccg	1860	
gggagcgacg	agggccgggc	gcttggcgcc	gaccgcgacg	accgctactt	ctaccgggag	1920	20
ccgggcgcgc	aggacgcgga	cgagcgtcgc	ggggcgggca	gcttggggtc	tccttaccgg	1980	
gggggcgect	tggigcccgc	cccgccgagc	cgttctcttg	gagcctacgc	ctaccgccc	2040	
cgaccccagg	cggccggctt	ccccggcgcg	ggcgagtcct	tcccgccgcc	cgcggacgcc	2100	
gagggctacc	agccgggcga	gggtctacgcc	gccccggacc	cgcgcgccgg	gctctaccgg	2160	
ggcccgctg	aggactacgc	gctaccgcgc	ggactggagg	tgtcggggaa	actgagggtc	2220	
gcgtcaaca	accacctgtt	gtggctcaag	tttaatcagc	accagacaga	gatgatcctc	2280	
accaagcagg	gacggtgagt	gcggcgcgcc	ggcccttggg	gctctgtgtc	ccgcgccgga	2340	30
acaagaacgt	ctcgtctgtt	ttcttggctc	gacaatgctt	ctgactccgt	gtccctcact	2400	
gctttggctt	cagcgtaggg	agacagggga	atggggttgt	taggaggaca	gggaaagctc	2460	
cggagggggc	ctgtgtccca	ggctgttgca	ccaacagcca	gaggactcac	aaggagagac	2520	
ggtgagtgcg	ggacagtgcg	aagtcacctt	gatttagggg	aagggtgact	gtggcttcac	2580	
ctagaatigg	tgtgcgcccc	tgcccactc	ctactgttag	aggagtgcga	gcgggcagtg	2640	
aaagcctgtg	ctctgggcgg	acaggacgcc	tgggcctcct	gtgtgggaaa	ctggagggga	2700	
agggagcccc	ttatctccgg	gccccctgcg	cccacctccc	ccggctcctt	tgtctctggt	2760	40
gtgctcaggt	cagctttagt	ggtggtagtg	gtgggtgta			2799	

【0043】

〈210〉 8

〈211〉 19

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Forward primer for polymorphism 3

10

〈400〉 8

cagtctatgg atgaggcac

19

【0044】

〈210〉 9

〈211〉 21

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

20

〈220〉

〈223〉 Reverse primer for polymorphism 3

〈400〉 9

aaacttggac cacaacaggt g

21

【0045】

〈210〉 10

〈211〉

30

〈212〉 DNA

〈213〉 Homo sapiens

〈223〉 Nucleotide sequence comprising polymorphism 3 genotype His33

〈400〉 10

cagtctatgg atgaggcacg tgaggttgac tticaggcaa ggaaaatgac tggcctgggt 60

cacatatacc tggcaggcag agccagacct gggactctca gcactggcag cccaatgcta 120

cttccagtgc ccatgactgc catgcagggt aggggagctt ttgtgggccc tgccaggccc 180

40

agctcagggc cctgcaaacc cctggctgct gctgatgcag tgcgctttaa ggaacatttc 240

ctgttgcca tcaggttcca ggtcigcccc cagggctaga gctacaagat gcagccaact 300
 cagcacaigt ggacctctgg tggggagaaa gagggcaacc cgaaaggtea ctagcacag 360
 agtctgggca cacagtaggt atcaataaag atcgattgaa tgttcattgt caaagtigt 420
 tctagtgtgc ccgigtctcg agcctctgag tgccaggaga atgcccagcg agtcccactt 480
 gggccatctc ggaaggcttc ctgtaggaga gggccittga gctgagactt caaagctggg 540
 ctgaatttcc ccgagggctc agaagagagc cacgggctgg tgtgtcaggc agcggagctg 600
 acactcccag aaagcaagat ctctgaacta cagggctgcg gcaggtcttc gcttctctcc 660 10
 accatggggg gccctgcagt actcgccaag agcgtagaat ttgcctagta ttagccacga 720
 gagggcgggg tggggcgagg cggagcaggg ccgaggtggc ggagtggggg ggagccggag 780
 agcttcaata agccacagca aagcgtcgcg actctagiga cagcggcccg ctggagagga 840
 agcccagagag ctgccgcgcg cctgccggac gagggcgtag aagccaggcg tcagagcccg 900
 ggctccggtg gggccccca cccggccctc gggcccccg cccccgtc cctgcccate 960
 ccagcccacg cgacctctc gcgcgcggag gggcgggtcc tcgacggcta cgggaaggig 1020
 ccagcccgcc ccggaatggg atcgtggagc cgggttgcgg agacatgtct acgggcaccg 1080 20
 agccgatgcc ggggagcgac gagggccggg cgcctggcgc cgacctcgag caccgctact 1140
 tctaccggga gccgggctcg caggacgcgg acgagcgtcg cgggggctgg agcctggggt 1200
 ctccctacc ggggggctcc ttgggtccc cccgcccag ccgcttctt ggagcctacg 1260
 cctaccgcc gcgaccccag gcggccggct tccccggcgc gggcgagtcc tccccgcc 1320
 ccgcgagcgc cgagggctac cagccgggcg agggctacgc cccccggac ccgcgcgccg 1380
 ggctctacc ggggcccgtt gaggactacg cgtaccgcc gggactggag gtgtcgggga 1440
 aactgagggt cgcgtcaac aaccacctgt tgtggtccaa gttt 1484 30

【0 0 4 6】

<210> 11

<211>

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 3 genotype Gln33

<400> 11

cagtctatgg atgaggcacg tgaggtgac tticaggcaa ggaaaatgac ttgcctgggt 60

40

cacatatacc	tggcaggcag	agccagacct	gggactctca	gcactggcag	cccaatgcta	120	
cttccagtgc	ccaigactgc	catgcagggt	aggggagctt	ttgtgggccc	tgccaggccc	180	
agctcagggc	cttgcaaacc	ctggcigtct	gcigtatgcag	tgcgctttaa	ggaacatttc	240	
ctgttgteca	tcaggttcca	ggtctgcccc	cagggctaga	gttacaagat	gcagccaact	300	
cagcacaigt	ggacctctgg	tggggagaaa	gagggcaacc	cgaaaggcca	cttagcacag	360	
agtctgggca	cacagtaggt	atcaataaag	atcgattgaa	tgttcatggt	caaagtigtct	420	
tctagtgigc	ccgigtctcg	agccctigag	tgccaggaga	atgcccagcg	agtcccacit	480	10
gggccaatctc	ggaaggcttc	ctgtaggaga	gggccttiga	gctgagactt	caaagctggg	540	
ctgaatticc	ccgagggctc	agaagagagc	cacgggcctg	tggttcaggc	agcggagctg	600	
acactcccag	aaagcaagat	cttcgaacta	cagggctgcg	gcaggctctc	gcttctctcc	660	
accatggggg	gcccctgcagt	actcgccaag	agcgtagaat	tggcctagta	ttagccacga	720	
gagggcgggg	tggggcgagg	cggagcaggg	ccgaggtggc	ggagtggggg	ggagccggag	780	
agcttcataa	agccacagca	aagcgcctcg	actctagtga	cagcggcccc	ctggagagga	840	
agcccgagag	ctgccgcgcg	cttgccggac	gagggcgtag	aagccaggcg	tcagagcccc	900	20
ggctccggtg	gggtccccc	cccggccctc	gggtcccccg	ccccctgctc	ctgcccctc	960	
ccagcccacg	cgacctctc	gcgcgcggag	gggcgggtcc	tcgacggcta	cgggaagggtg	1020	
ccagcccgcc	ccggatgggc	atcgtggagc	cgggttgcgg	agacatgctg	acgggcaccg	1080	
agccgatgcc	ggggagcgc	gagggccggg	cgccctggcg	cgacctgcag	cagcgtact	1140	
tctaccggga	gccgggcgcg	caggacgcgg	acgagcgtcg	cggggcggc	agccctgggt	1200	
ctccctacc	ggggggcgcc	tgggtgcccg	ccccgcccag	ccgttctctt	ggagcctacg	1260	
cttaccgcc	gcgaccccag	gcggccggct	tccccggcgc	gggcgagctc	tccccgccgc	1320	30
ccgcggacgc	cgagggctac	cagccgggcg	agggctacgc	cgccccggac	ccgcgcgccg	1380	
ggctctacc	ggggccgcgt	gaggactacg	cgctaccgcg	gggactggag	gtgtcgggga	1440	
aactgagggt	cgcgctcaac	aaccacctgt	tgigtgctcaa	gttt		1484	

フロントページの続き

(72)発明者 井原 健二

福岡県福岡市東区貝塚団地アーベインルネス貝塚9棟906号

(72)発明者 原 寿郎

福岡県福岡市中央区荒戸3-3-15-403

審査官 七條 里美

(56)参考文献 国際公開第00/073453(WO, A1)

Cell, 2000, Vol.100, No.6, pp.655-669

Genomics, 2000, Vol.70, No.1, pp.41-48

医学のあゆみ, 1999, Vol.188, No.5, pp.376-379

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/09

C12N 15/12

C12Q 1/68

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

JSTPlus(JOIS)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq