

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2002 - 238571**

( P 2 0 0 2 - 2 3 8 5 7 1 A )

(43)公開日 平成14年 8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/68	A 4B024
C12Q 1/68		C12N 15/00	ZNA A 4B063

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全11頁)

(21)出願番号	特願2001 - 38621 ( P 2001 - 38621 )	(71)出願人	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)	(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
		(74)代理人	100077517 弁理士 石田 敬 (外 4 名)
		F ターム (参考)	4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 HA12 4B063 QA01 QA17 QA19 QQ03 QQ42 QR08 QR14 QR42 QR62 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02

(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) 【要約】

【課題】 1型糖尿病の発症に関与する遺伝子の同定方法。

【解決手段】 T - b e t 遺伝子中の G T リピート多型 (多型 1 )、C A リピート多型 (多型 2 ) 又はアミノ酸 3 3 位のヒスチジンのコドン中の塩基置換多型 (多型 3 ) により、1型糖尿病に関与する遺伝子が同定される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 に示す第 6 0 0 位の塩基から第 6 7 1 位の塩基までに存在する「g t」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 1 0 ~ 5 0 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 1 0 ~ 5 0 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。

【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 6 3 5 位の塩基から第 6 6 6 位の塩基までに存在する「c a」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 1 0 ~ 5 0 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 1 0 ~ 5 0 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。

【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)

リバーズプライマー：5'-GAGAGGTTTTGCTTGCTT (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 3 3 位のヒスチジンのコドン C A C (塩基番号 1 9 0 0 ~ 1 9 0 2) より上流に存在するヌクレオチド配列中連続する 1 0 ~ 5 0 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 1 0 ~ 5 0 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。

【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)

リバーズプライマー：5'-AACTTGACCACAACAGGTG (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。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【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。

【0 0 0 2】

10 【従来技術】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 I D D M 1 - 1 5 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 I D D M 1 ( H L A 遺伝子) と I D D M 2 のインスリン遺伝子を除きまだ証明されていない。

20 【0 0 0 3】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。I N F - 、インターフェロン 1 受容体、C T L A - 4、C D 2 8、T N F 、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 T h 1 と T h 2 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 T h 1、アレルギーや全身性ループスエリテマトーデスなどは T h 2 優位の疾患であると考えられている。

30 【0 0 0 4】T - b e t 遺伝子は、最近同定された転写因子で T h 1 系の細胞に特異的に発現し、かつ T h 2 系細胞に強制的に T - b e t 遺伝子を発現させると T h 1 の性質を持つようになることから、T h 1 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, Klm ST, Cosn GL, et al. ; Cell. 100 : 655-669)。

【0 0 0 5】

40 【発明が解決しようとする課題】しかしながら、T - b e t 遺伝子と 1 型糖尿病感受性との関係は知られていない。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。

【0 0 0 6】

50 【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 G T リピート (多型 1 と称する) が存在し、3 ' - 非翻訳領域に C A 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 3 3 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。

【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'-AAGTTTCCTTCCGGTCTTA（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。

【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'-AGGTGGGTTAGACAGAAATAG（配列番号：5）

リバーズプライマー：5'-GAGAGGTTTTGCTTGCTT（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。

【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'-CAGTCTATGGATGAGGCAC（配列番号：8）

リバーズプライマー：5'-AACTTGGACCACAACAGGTG（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-bet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-bet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（clonehCIT.211#P7, accession no.AC003665）この中にヒトt-bet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。

【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-bet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された。

【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ズ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ズプライマーとから成るプライマー対が使用される。

【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CAC（His）/CAG（Gln）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ズ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。

【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

10 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】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

20 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。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）のほかに、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。

#### 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

20 ーの長さを同定した。

【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

20 ーの長さを同定した。

(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。

【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'-AAGTTTCCTTCCGGTCTTA(配列番号：2)

30 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)	対立遺伝子数(頻度)	P値	対立遺伝子数(頻度)	P値	
(TG) <sub>n</sub>							
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)	2 (0.7)	0.19	0 (0.0)	---	
対立遺伝子3	21	0 (0.0)	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)	2 (0.7)	0.19	2 (0.9)	0.12	
対立遺伝子6	25	4 (1.0)	2 (0.7)	0.70	2 (0.9)	---	
対立遺伝子7	26	7 (1.7)	6 (2.0)	0.83	2 (0.9)	0.50	
対立遺伝子8	27	4 (1.0)	5 (1.6)	0.51	2 (0.9)	---	
(TG) <sub>1,4</sub> TA(TG) <sub>n</sub>							
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)	22 (7.2)	0.36	17 (7.8)	0.26	
対立遺伝子11	15	2 (0.5)	5 (1.6)	0.25	3 (1.4)	0.35	

【0025】

【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)	対立遺伝子数(頻度)	P値	対立遺伝子数(頻度)	P値	
(TG) <sub>n</sub> TA(TG) <sub>4</sub> CG(TG) <sub>5</sub>							
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)	12 (3.9)	0.59	10 (4.5)	0.93	
対立遺伝子14	22	22 (5.5)	32 (10.5)	0.01	25 (11.5)	0.007	
対立遺伝子15	23	15 (3.8)	19 (6.2)	0.13	14 (6.4)	0.13	
対立遺伝子16	24	34 (8.5)	30 (9.8)	0.55	24 (11.0)	0.31	
対立遺伝子17	25	72 (18.0)	34 (11.0)	0.01	26 (11.9)	0.04	
対立遺伝子18	26	36 (9.0)	25 (8.2)	0.69	17 (7.8)	0.61	
対立遺伝子19	27	41 (10.2)	28 (9.2)	0.63	16 (7.3)	0.23	
対立遺伝子20	28	36 (9.0)	25 (8.2)	0.69	16 (7.3)	0.48	
対立遺伝子21	29	34 (8.5)	18 (5.9)	0.18	13 (6.0)	0.26	
対立遺伝子22	30	33 (8.2)	19 (6.2)	0.3	13 (6.0)	0.30	
対立遺伝子23	31	7 (1.7)	7 (2.3)	0.61	5 (2.3)	0.64	
対立遺伝子24	32	0 (0.0)	3 (1.0)	0.08	2 (0.9)	0.12	
対立遺伝子25	33	6 (1.5)	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。

【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

40 ホワードプライマー: 5'-AGGTGGGTTAGACAGAAATAG(配列番号: 4)

リバーズプライマー: 5'-GAGAGGTTTTGCTTGTCTT(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)	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】(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'-CAGTCTATGGATGAGGCAC(配列番号: 8)

リバースプライマー: 5'-AACTTGACCACAACAGGTG(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 II I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。

【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

制限酵素部位

CAC CGC TAC

↓

CAG CGC TAC

AGC/GCT = Eco47 III

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	Gln33/ 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%)	0.02
病歴10年以下	109	74 (67.9%)	33 (30.3%)	2 (1.8%)	0.009
病歴10年以上	44	34 (77.3%)	10 (22.7%)	0 (0.0%)	0.57

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

11

12

3、His 3 3 / Gln 3 3、及びGln 3 3 / Gln 3 3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。

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Gln 3 3を有する個体は、1型糖尿病にかかる可能性が高いと予想される。

【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、His 3 3 / Gln 3 3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

【0036】

【配列表】

```

<110> Ihara Kenji
<120> Primers for identification or Type 1 diabetes-revsitive genes
<160> 11
<210> 1
<211>
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 1
<400> 1
cgcgccggcc cttggggcct ctgtgccgc gccggaacaa gaacgtctcg tctgttttc 60
tggctcgaca atgcttctga ctccgtgtcc ctactgctt tggcttcagc gtagggagac 120
aggggaatgg ggttgttagg aggacagga aagctccgga ggggcgtctg tgcccaggct 180
gttgacacaa cagccagagg actcacaagg gagacgggtg agtgcgggac agtgagaagt 240
caccttgatt taggggaagg gtgactgtgg cttcacctag aattggtgtg cgccccgcc 300
ccactctcta ctgtagagga gtcgcagcgg gcagtgaag cctgtgctct gggcggacag 360
gacgcctggg cctcctgtgt gggaaactgg aggggaaggg agccccttat ctccgggccc 420
cctgcgcca cctccccgg ctcctttgct gctgggtgtc tcaggtcagc tttagtggtg 480
gtagtgtggt tggtagcgtt ggtggtggtg tgtgtgtacg gggggagatt gggatttgg 540
gacatggaga agcagtcgcc aagtttctt tccggtctta ctttgagatc atatgtctgg 600
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tgtgtgtgtg 660
ggtgtgtgtg tatgggggct agtcagtaa agctttagg gggcacagat cccttccagg 720
cacaaatgcc cacgggctgg gcagatgaag ctacccagg ggtccagcct gtagccagc 780
cccacactgc accctttgag gctgggccag tgaaacctt cccacactc ctgtccagaa 840
attcaccggt tcagcctgga gaagtggga aggggtgtcc catggcttca tggctcaggg 900
ttcctgagcc ccgtgcgtga tggggagagt ttggggctga ggggtgctgct tccggataga 960
gcctcctgcg caaggaaaga aacagaaacc tgtgacttgt gtggtatttg tttagtaagc 1020
aaccgccgga gtgactgtg tctgatgtgg gctgtgcgca cccacccttc ccagtgcggc 1080
ccatgtgagc aggggaccag cgaggaccag tgtggaaggg ctgttgtcat tgggggacct 1140
gggatgctgg gtcccaggtc cgagaggtgt ggatacaaaa cgtggggctt ggggtggagg 1200
ggagagggag aaggccatgt tggacccag aggttggtgta 1239

```

【0037】

```

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer for polymorphism 1
<400> 2
aagtttctt tccggtctta

```

20

【0038】

```

<210> 3
<211> 22
<212> DNA

```

13

14

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Reverse primer for polymorphism 1

&lt;400&gt; 3

ctacaagctt tactgcacta gc

22

【 0 0 3 9 】

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt;

&lt;212&gt;

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Nucleotide sequence comprising polymorphism 2

&lt;400&gt; 4

taatacatgt aaagggttta agaacattgc ctgacaaaca gtaagcactc actgtgtaag 60  
 ctaactgttac caacagtttc tagctgtttc tgcctgtctt tttatacaca ctgaattgtg 120  
 tttgtaaaat aatacatact tttttttttt ttttttgaga cagagttttg ctcttgtgtc 180  
 ccaggctgga atgcaatggt gcgatctcag ctcaactgaa ccttcgcctc ccagggtcaa 240  
 gtgattctcc tgcctcacc cctctgagtag ctgggattac agatgtgcac caccatgcct 300  
 ggctaatttt tgtattttta gtagagacgg tgtttcgcca tattggccag gctgggtctcg 360  
 aactcctgac gtcagggtgat ctaccacct tggcttccca aagtgtggg attacaggcg 420  
 tgcgtacca cactcagcct atacatgctt cttttaaata attcaagcaa ggaagaaaag 480  
 tataaagaca acaataaatt atctcaaac ttacccatca agaattatca ttaacattag 540  
 gtgggttaga cagaaatagt tttataaatt ggaaccatac tgaaaaggct ttttcttaat 600  
 gaaaatggtt aaattttagc ttatagaatt tagtcacaca cacacacaca cacacacaca 660  
 cacacatcaa gacaagcaaa acctctcaaa ctctcaagtg aatgaaggg agttgtctaa 720  
 cttaagataa atttttcttc actacaagaa atattttctt ggtttttttt ttttttgaga 780  
 cagagtctcg ctctgttgcc caggctggag tgcagtggca cgatctcagc tcaactgcaac 840  
 ctccacctcc tgggttcaag cagttctcct gcctcagcct cccgagtagc tgagactaca 900  
 ggcgtgtgcc accacgccg gctttttttg tgtttttggt agagacgggg ttttcccat 960  
 attagccagg atggtctcga tctcttgacc tcgtgatctg tctgcctcgg cctcccaaag 1020  
 tgctaggatt ataggcgtga gccaccgtgc ccaggcaaga aatagtt 1067

【 0 0 4 0 】

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Forward primer for polymorphism 2

&lt;400&gt; 5

aggtgggta gacagaaata g

21

【 0 0 4 1 】

40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Reverse primer for polymorphism 2

&lt;400&gt; 6

gagaggtttt gcttgtctt

19

【 0 0 4 2 】

&lt;210&gt; 7



15

16

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Nucleotide sequence comprising polymorphism 3

&lt;400&gt; 7

```

gtcccatag gccctaagg gtgaagccct gtcaggctgg gacagaaatg tagagctggg 60
gccagttccc aggggagaac tggggaggac tggggtgaag gtagagagag gagaagttaa 120
actttaacat gacaaaaata ttaaagtatt ttcaaagta ctcttaaaaa tgtaaatctt 180
tatctatata ctgatatgca aaatatcca tgacaccttg tggagtgaag aaaaagtaca 240
cattataaag cagcatgtgt agtgtttata taaattatat atttgtgcat gtgtgcaaaa 300
gacagagaca gagagtatat aaggagttag gtctcagagg gtgttcactg aaatgttaat 360
cctgtttggc tttaggggtt ggaattggg gtgatttata cagtcttgtt ttacttttc 420
tgtgctgctt aaatttccta tataagtatg ttcatcttt atacacagga aaactcccaa 480
tgatgctatt tcaattggg ggggggaaa cggatagttt tcatcataaa aggagtctaa 540
tacattagtt aacataaaag gaaaatggag aaagaaaagc ctccatcgtc ctatctccga 600
ggcagccctt cagagcatgt ggtgggtttc cttcctgtca gccggctctg aatctgttca 660
aagcagcttt tccatccagg tataataata gattgaaag tgctgcacac gtacaccctc 720
tcatgtaagg cttgcagccc ccctgaaaag tagatctgtt tatttcccc agtctatgga 780
tgaggcacgt gaggtgact ttcaggcaag gaaaatgact tgccctgggtc acatatacct 840
ggcaggcaga gccagacctg ggactctcag cactggcagc ccaatgctac ttccagtgcc 900
catgactgcc atgcagggtg ggggagcttt tggggccct gccaggcca gctcagggcc 960
ctgcaaacc cttgctgctg ctgatgcagt gcgctttaag gaacatttcc tgtgtccat 1020
caggttccag gctgcccc agggctagag ctacaagatg cagccaactc agcacatgtg 1080
gacctctggt ggggagaaag agggcaacc gaaaggtcac ttagcacaga gctcgggcac 1140
acagtaggta tcaataaaga tcgattgaat gttcatggtc aaagtgtctt ctagtgtgcc 1200
cgtgctccga gccctgagt gccaggagaa tgcccagcga gtcccacttg ggccatctcg 1260
gaaggcttcc tgtaggagag ggcctttgag ctgagacttc aaagctgggc tgaatttccc 1320
cgaggtcca gaagagagcc acgggctggt gtgtcaggca gcgagctga cactcccaga 1380
aagcaagatc ttcgaactac agggctcgcg caggctctcg ctctctcca ccatgggggg 1440
ccctgcagta ctcgccaaga gcgtagaatt tgccatgat tagccacgag agggcggggt 1500
ggggcgaggc ggagcaggcc cgaggtggcg gagggtgggg gagccggaga gcttcaataa 1560
gccacagcaa agcgtcgcga ctctagtac agcggcccgc tggagaggaa gcccgagagc 1620
tgccgcgcgc ctgccggacg agggcgtaga agccaggcgt cagagcccgg gctccggtgg 1680
ggtccccac ccggccctcg ggtccccgc cccctgtctc ctgccatcc cagcccacgc 1740
gacctctcg cgcgaggagg ggcgggtcct cgacggctac ggaaggtgc cagcccggcc 1800
cggatgggca tctgtgagcc gggttgcgga gacatgtga cgggaccga gccgatgccg 1860
gggagcgagc agggccgggc gcctggcgcc gaccgcagc accgctactt ctaccggag 1920
ccgggcgcgc aggacgcgga cgagcgtcgc gggggcggca gcctggggtc tccctaccg 1980
gggggcgctt tgggtcccgc cccgcccagc cgcttccttg gagcctacgc ctaccgccc 2040
cgacccagg cggccgctt ccccgccgcg ggcgagctct tcccggcccg cgcggagcc 2100
gagggctacc agccggcgga gggctacgcc gccccggacc cgcgcgcccg gctctaccg 2160
gggccgcgtg aggactacgc gctaccgccc ggactggagg tgtcggggaa actgagggtc 2220
gcgctcaaca accacctgtt gtggtccaag ttaatcagc accagacaga gatgatcatc 2280
accaagcagg gacggtgagt cgggcgccc ggccttggg gcctctgtgc ccgcccggga 2340
acaagaacgt ctcgtctgtt ttcttgctc gacaatgctt ctgactccgt gtccctcact 2400
gctttggctt cagcgtaggg agacagggga atggggttgt taggaggaca gggaaagtc 2460
cggaggggcg tctgtgcca ggctgttgca ccaacagcca gaggactcac aaggagagc 2520
ggtgagtgcg ggacagttag aagtcacctt gatttagggg aagggtgact gtggctcac 2580
ctagaatgg tgtgcgcccc tgcccactc tctactgtag aggagtcgca gcgggcagtg 2640
aaagcctgtg ctctgggccc acaggacgcc tggccctcct gtgtgggaaa ctggagggga 2700

```

17

18

agggagcccc ttatctccgg gccccctgcg cccacctccc ccggctcctt tgctgctggt 2760  
 gtgctcaggt cagcttttagt ggtgtagtg gtggtggta 2799

【 0 0 4 3 】

<210> 8  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Forward primer for polymorphism 3  
 <400> 8  
 cagtctatgg atgaggcac 19

【 0 0 4 4 】

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Reverse primer for polymorphism 3  
 <400> 9  
 aaacttggac cacaacaggt g 21

【 0 0 4 5 】

<210> 10  
 <211>  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <223> Nucleotide sequence comprising polymorphism 3 genotype His33  
 <400> 10  
 cagtctatgg atgaggcacg tgagggtgac tttcaggcaa ggaaaatgac ttgcctgggt 60  
 cacataatcc tggcaggcag agccagacct gggactctca gcactggcag cccaatgcta 120  
 cttccagtgc ccatgactgc catgcagggt aggggagctt ttgtgggccc tgccaggccc 180  
 agctcagggc cctgcaaacc cctggctgct gctgatgac tgcgctttaa ggaacatttc 240  
 ctgtttgcca tcaggttcca ggtctgcccc cagggtaga gctacaagat gcagccaact 300  
 cagcacatgt ggacctctgg tggggagaaa gagggcaacc cgaaaggta ctagcacag 360  
 agtctgggca cacagtagt atcaataag atcgattgaa tgttcatggt caaagtgtct 420  
 tctagtgtgc ccgtgctccg agcctctgag tgccaggaga atgcccagcg agtcccactt 480  
 gggccatctc ggaaggcttc ctgtaggaga gggccttga gctgagactt caaagctggg 540  
 ctgaatttcc ccgagggtcc agaagagagc cacgggctgg tgtgtcaggc agcggagctg 600  
 aactcccag aaagcaagat cttcgaacta cagggtgcgc gcaggctctc gcttctctcc 660  
 accatggggg gccctgcagt actcgccaag agcgtagaat ttgcctagta ttagccacga 720  
 gagggcgggg tggggcgagg cggagcaggg ccgagggtgg ggagtggggg ggagccggag 780  
 agcttcataa agccacagca aagcgtgag actctagtga cagcggcccg ctggagagga 840  
 agcccagagag ctgccgcgcg cctgccggac gagggcgtag aagccaggcg tcagagcccg 900  
 ggctccggtg gggccccca cccggcctc gggcccccg ccccctgctc cctgcccatac 960  
 ccagcccacg cgaccctctc gcgcgcggag gggcgggtcc tcgacggcta cgggaaggtg 1020  
 ccagcccgcc ccggtgggc atcgtggagc cgggttgcgg agacatgctg acgggcaccg 1080  
 agccgatgcc ggggagcgac gagggccggg cgctggcgc cgaccgcag caccgtact 1140  
 tctaccgga gccgggcgcg caggacgcgg acgagcgtcg cgggggcggc agcctggggt 1200  
 ctccctaccg ggggggcgc ttggtgccc cccgcccag ccgcttctt ggagcctacg 1260  
 cctaccgcc gcgaccccag gcggccggct tccccggcgc gggcgagtcc ttcccgccgc 1320  
 ccgcgacgc cgagggtac cagccgggcg agggctacgc cgccccggac ccgcgccgcg 1380

19

20

ggctctacc ggggccggt gaggactacg cgctaccgc gggactggag gtgtcgggga 1440  
 aactgagggt cgcgctcaac aaccacctgt tgtgttcaa gttt 1484

【 0 0 4 6 】

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Nucleotide sequence comprising polymorphism 3 genotype Gln33

&lt;400&gt; 11

cagtctatgg atgaggcacg tgaggttgac tttcaggcaa ggaaaatgac ttgcctgggt 60  
 cacatatacc tggcaggcag agccagacct gggactctca gcaactggcag cccaatgcta 120  
 cttccagtgc ccatgactgc catgcagggt agggagcctt ttgtgggcc tgcaggccc 180  
 agctcagggc cctgcaaacc cctggctgct gctgatgcag tgcgctttaa ggaacatttc 240  
 ctgtttgcca tcaggttcca ggtctgcccc cagggtaga gctacaagat gcagccaact 300  
 cagcacatgt ggacctctgg tggggagaaa gagggcaacc cgaaaggta cttagcacag 360  
 agtctgggca cacagtaggt atcaataaag atcgattgaa tgttcatggt caaagtgtct 420  
 tctagtgtgc ccgtgctccg agcctctgag tgccaggaga atgccagcg agtcccactt 480  
 gggccatctc ggaaggcttc ctgtaggaga gggccttga gctgagactt caaagctggg 540  
 ctgaatttcc ccgagggtcc agaagagagc cacgggctgg tgtgtcaggc agcggagctg 600  
 aactcccag aaagcaagat cttgaaacta cagggtgcgc gcaggctctc gcttctctcc 660  
 accatggggg gccctgcagt actcgccaag agcgtagaat ttgcctagta ttagccacga 720  
 gagggcgggg tggggcgagg cggagcaggg ccgagggtgg ggagtggggg ggagccggag 780  
 agcttataa agccacagca aagcgtgcg actctagtga cagcggcccg ctggagagga 840  
 agcccagag ctgccgctgc cctgcccggc gagggcgtag aagccaggcg tcagagcccg 900  
 ggctccggtg gggccccca cccggcctc gggcccccg cccctgctc cctgccatc 960  
 ccagcccacg cgacctctc gcgcgaggag gggcgggtcc tcgacggta cgggaagggt 1020  
 ccagcccgcc ccgatgggc atcgtggagc cgggttgcgg agacatgctg acgggcaccg 1080  
 agccgatgcc ggggagcagc gagggccggg cgcttgcgc cgaccgcag cagcgtact 1140  
 tctaccgga gccggcgcg caggacgcg acgagcgtc gggggcggc agcctgggt 1200  
 ctccctacc ggggggccc ttggtgccc ccccggcag ccgcttctt ggagcctacg 1260  
 cctaccgcc gcgaccagc gcggccggt tccccgcgc gggcaggtcc ttcccgcgc 1320  
 ccgaggcgc cgagggtac cagccggcg agggctacg cggcccggc ccgctgccc 1380  
 ggctctacc ggggccggt gaggactacg cgctaccgc gggactggag gtgtcgggga 1440  
 aactgagggt cgcgctcaac aaccacctgt tgtgttcaa gttt 1484