

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4521184号
(P4521184)

(45) 発行日 平成22年8月11日(2010.8.11)

(24) 登録日 平成22年5月28日(2010.5.28)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
請求項の数 26 (全 48 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2003-519472 (P2003-519472)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月9日(2002.8.9)
 (65) 公表番号 特表2005-502336 (P2005-502336A)
 (43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/008963
 (87) 国際公開番号 W02003/014342
 (87) 国際公開日 平成15年2月20日(2003.2.20)
 審査請求日 平成17年8月4日(2005.8.4)
 (31) 優先権主張番号 01119377.8
 (32) 優先日 平成13年8月10日(2001.8.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 01119528.6
 (32) 優先日 平成13年8月14日(2001.8.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504051445
 ナショナル パブリック ヘルス インスティテュート
 フィンランド エフイーエン-00300
 ヘルシンキ マンネルヘイミンティエ
 166
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 ペルトーネン レーナ
 フィンランド 00251 ヘルシンキ
 ハールトマニンカテュ 8 ナショナル
 パブリック ヘルス インスティテュート
 バイオメディカム デパートメント オ
 ブ モレキュラー メディシン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 成人型ラクターゼ欠乏症と関連するDNA変異体の同定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、または成人型ラクターゼ欠乏症を示す、腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)遺伝子の5'部分を含む核酸分子であって、
 (a) 配列番号1の核酸配列を有する、または含む核酸分子；及び
 (b) 配列番号2の核酸配列を有する、または含む核酸分子；からなる群から選択され、かつ、それぞれ配列番号1又は2の核酸分子の5'および3'末端にわたり、最大で3000ヌクレオチドに及ぶ、核酸分子。

【請求項2】

腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)遺伝子の5'部分を含む核酸分子であって、

10

(a) 配列番号3の核酸配列を有する、または含む核酸分子；及び

(b) 配列番号4の核酸配列を有する、または含む核酸分子；からなる群から選択される、核酸分子。

【請求項3】

ゲノムDNAである、請求項1または2に記載の核酸分子。

【請求項4】

前記ゲノムDNAが遺伝子の一部である、請求項3に記載の核酸分子。

【請求項5】

少なくとも21ヌクレオチドを有する、請求項1から4のいずれか一項に記載の核酸分子

20

の断片であって、LPH遺伝子のヌクレオチド位 - 13910 またはヌクレオチド位 - 22018 を含む、断片。

【請求項6】

請求項1および3から5のいずれか一項に記載の核酸分子に相補的である、核酸分子。

【請求項7】

請求項2から5のいずれか一項に記載の核酸分子に相補的である、核酸分子。

【請求項8】

請求項1および3から5のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項9】

請求項2から4のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

10

【請求項10】

LPH遺伝子のヌクレオチド位 - 13910 またはヌクレオチド位 - 22018 を含む、請求項1および3から5のいずれか一項に記載の核酸分子と、またはその相補鎖と、相補的である、プライマー。

【請求項11】

LPH遺伝子のヌクレオチド位 - 13910 またはヌクレオチド位 - 22018 を含む、請求項2から5のいずれか一項に記載の核酸分子と、またはその相補鎖と、相補的である、プライマー。

【請求項12】

請求項6に記載のベクターで形質転換された、非ヒト宿主細胞。

20

【請求項13】

請求項7に記載のベクターで形質転換された、非ヒト宿主細胞。

【請求項14】

細菌、酵母細胞、昆虫細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞、または植物細胞である、請求項12または13に記載の非ヒト宿主細胞。

【請求項15】

成人型ラクターゼ欠乏症もしくはそれに関連する形質の存在または素因について試験する方法であって、かかる素因を保有する将来の患者またはかかる素因を保有する疑いのあるヒトから採取された試料を試験すること；及び、ホモ接合またはヘテロ接合の状態にある、請求項1および3から6のいずれか一項に記載の核酸分子の存在を確認することを含む方法。

30

【請求項16】

成人型ラクターゼ欠乏症もしくはそれに関連する形質の存在または素因について試験する方法であって、かかる素因を保有する将来の患者またはかかる素因を保有する疑いのあるヒトから採取された試料を試験すること；及び、ホモ接合またはヘテロ接合の状態にある、請求項2から5および7のいずれか一項に記載の核酸分子の存在を確認することを含む方法。

【請求項17】

前記試験が、成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、または成人型ラクターゼ欠乏症を示す核酸分子に相補的な請求項6に記載の相補的核酸分子、またはプローブとしての野生型配列に相補的な請求項7に記載の核酸分子を、厳密な条件下にて前記試料に含まれる核酸分子とハイブリダイズさせる段階と、前記ハイブリダイゼーションを検出する段階とを含む、請求項15または16に記載の方法。

40

【請求項18】

前記ハイブリダイゼーションの産物を制限エンドヌクレアーゼで消化するか、または前記ハイブリダイゼーションの産物を制限エンドヌクレアーゼを用いた消化にける段階と、前記消化の産物を分析する段階とをさらに含む、請求項15または17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記プローブが検出可能に標識される、請求項17に記載の方法。

50

【請求項 20】

前記試験が、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の少なくとも一部の核酸配列を決定する段階を含み、前記部分が、LPH 遺伝子のヌクレオチド位 - 13910 および / またはヌクレオチド位 - 22018 を含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 21】

核酸配列の前記決定が、固相ミニシーケンシング (minisequencing) によって行われる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記核酸配列を決定する前に、前記核酸分子の少なくとも前記一部を増幅する段階をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記試験が、増幅反応を行う段階であって、前記増幅反応に用いられるプライマーの少なくとも 1 つが、請求項 10 に記載のプライマーである段階と、増幅産物をアッセイする段階とを含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記試験が、増幅反応を行う段階であって、前記増幅反応に用いられるプライマーの少なくとも 1 つが、請求項 11 に記載のプライマーである段階と、増幅産物をアッセイする段階とを含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 25】

前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって行われるか、または前記増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 26】

成人型ラクターゼ欠乏症の存在または素因を解析するための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、成人型ラクターゼ欠乏症 (adult-type hypolactasia) の一因となる、またはそれを示す、腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素 (LPH) 遺伝子の 5' 部分を含む核酸分子に関し、前記核酸分子は、(a) 配列番号 1 の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号 1 のその配列が、図 4 にも図示され、図 8 に図示される配列中にも含まれる核酸分子；(b) 配列番号 2 の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号 2 のその配列が、図 5 にも図示され、図 9 に図示される配列中にも含まれる核酸分子；(c) その相補鎖が (a) または (b) の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする、少なくとも 20 ヌクレオチドの核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド / 核酸分子が、LPH 遺伝子から - 13910 5' 位に相当する位置にシトシン残基を有する核酸分子；(d) その相補鎖が (a) または (b) の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする、少なくとも 20 ヌクレオチドの核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド / 核酸分子が、LPH 遺伝子から - 22018 5' 位に相当する位置にグアニン残基を有する核酸分子；からなる群から選択される。本発明はさらに、成人型ラクターゼ欠乏症の存在、またはその素因について試験する方法であって、上記の核酸分子に含まれる SNP の解析に基づく方法に関する。さらに、本発明は、成人型ラクターゼ欠乏症の存在、またはその素因の検出に有用な診断組成物および診断キットに関する。

30

40

【0002】

様々な試料が本明細書を通じて記載されている。製造元のマニュアルおよびカタログを含む、これらの試料の開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

腸内上皮細胞によって主に発現される、ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素 (LPH) は、ラクトース、乳糖をグルコースおよびガラクトース¹に加水分解する。ラクトース

50

がもはや食事の必須成分ではない場合、LPH酵素の発現は、哺乳動物において離乳期間に非常に低いレベルに劇的に低下する。ヒトにおいては、成人型ラクターゼ欠乏症またはラクターゼ非存続 (lactase non-persistence) として知られる状態は、ほとんどの人種に発生し、乳糖不耐症のために、成人間での新鮮な乳の使用を厳しく制限するものである。ラクターゼ非存続状態の発症年齢は、タイ人における1~2歳から、フィンランド人中の10~20歳までの範囲にわたり、人種間で異なる^{2~3}。しかしながら、北欧人種および他の数種の人種群においては、LPH活性は、成人の大部分で一生涯を通してラクターゼ存続として知られる状態を持続する。その表現型ラクターゼ存続/非存続は、遺伝的に決定されることが示されており、その存続状態は、非存続性状態^{4~6}と比較して優性である。

10

【0004】

成人型ラクターゼ欠乏症の現況技術の診断は、乳糖負荷試験 (LTT) に基づく。一晚 (10時間) 絶食させた後、ラクトース1g/kgを12.5%溶液として投与する。最大投与量は50gである。ラクトース摂取前およびラクトースを摂取して20分および30分後に、毛細血管試料を採取する。そのグルコース濃度は、グルコースオキシターゼ法によって決定される (イェルム (Hjelm) およびデ・ベルディエ (de Verdier) 1963)。LTTの日の腹部症状を記録する。1.1mmol/l以上の血中グルコース濃度の最高上昇が、吸収不良の徴候とされる (ガッドマン (Gudman) -ホイヤー (Hoyer) およびハルマン (Harnum) 1968, ジュッシラ (Jussila) 1970, サヒ (Sahi) 1972)。LLTは、偽陽性および偽陰性診断のリスクを10%有し、つまり、LTTの感受性および特異性は約90%である (イソコスキー (Isokoski) ら、1972, ニューカマー (Newcomer) ら、1975, Sahi 1983)。肝臓におけるガラクトースの代謝を阻害するエタノール0.3g/kgを投与し (Tygstrup およびLundqvist 1962)、12.5%溶液でラクトース1g/kgを15分後に投与することによって、LLTの精度を高めることができる。

20

【0005】

最初の、または繰り返し行われたLTTにおける0.2mg/100ml未満の最高上昇を有する小児は、胃内視鏡によって行われる小腸生検に送られる。これは、専門知識が必要とされる観血の手順であり、通常、胃腸病学の専門家によってのみ大学病院で行われている。生検試料は、解剖顕微鏡を用いて組織学的に検査され、粘膜のマルターゼ、スクラーゼおよびラクターゼ活性が決定される (ラウニアラ (Launiala) ら、1964)。小児におけるラクターゼ欠乏症の診断は、腸内生検の組織構造が正常であり、ラクターゼ活性がタンパク質20U/g未満であり、ラクターゼ/スクラーゼ比0.30未満であれば、あるいは、エタノール投与を用いたLTTにおいては、20mg/100ml未満の血中グルコース濃度の最高上昇および5mg/100ml未満の血中ガラクトース濃度の最高上昇 (サヒ (Sahi) ら、1972) が示されれば、正しいとされる。上述のように、成人型ラクターゼ欠乏症を診断する現在の方法は手間がかかる。LTTは不正確であり、したがって、診断が確定される前に、観血の手順、胃鏡検査が必要である。成人型ラクターゼ欠乏症は一般的であり、非特異的な腹部症状 (患者の3分の1が胃痛を訴える) の主な原因であることから、この一般的な健康上の問題の診断法を改善することが明らかに必要である。

30

【0006】

それにもかかわらず、今までに取り扱い易く、それと同時に、迅速かつ正確な結果が得られる生化学的試験法は開発されていなかった。ゲノムDNA/発現レベルでの疾患原因の解明も同様に成功していない。このように、成人におけるLPH遺伝子のコード領域およびプロモーター領域のシーケンシングによって、ラクターゼ存続性/非存続性と関連するDNA変異は明らかにされておらず、この形質^{7~8}と関連するスプライスバリエーションまたはmRNA編集バリエーションの証拠も現れていない。ラクターゼ存続性/非存続性の形質が、ラクターゼ遺伝子内にある、またはラクターゼ遺伝子に隣接するシス作用要素 (1つまたは複数) によっておそらく制御されることが、以前の研究によって示されており、強い連鎖不平衡 (LD) が、ラクターゼ遺伝子にわたる70kbハプロタイプ全体に認められている^{9,10}。いくつかの研究によって、転写調節レベルでLPH遺伝子発現の主要な制

40

50

御が働くという証明が報告されている^{11~13}。しかしながら、LPH遺伝子の発現の転写および転写後制御の両方に影響を及ぼす変異が、成人型ラクターゼ欠乏症の病因に関係することが示唆されている^{14~15}。

【0007】

上記の事項を考慮すると、本発明の根底にある技術的課題は、成人型ラクターゼ欠乏症、またはこの疾患に対する素因の正確かつ簡便な診断を可能にする、手段および方法を提供することである。

【0008】

前記技術的課題の解決は、特許請求の範囲において特徴付けられる実施形態によって達成される。

【0009】

このように、本発明は、成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示す、腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)遺伝子の5'部分を含む核酸分子に関するものであり、前記核酸分子は、(a)配列番号1の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号1の配列が、図4にも図示され、図8に図示される配列中にも含まれる核酸分子；(b)配列番号2の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号2のその配列が、図5にも図示され、図9に図示される配列中にも含まれる核酸分子；(c)その相補鎖が(a)または(b)の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする、少なくとも20ヌクレオチドの核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド/核酸分子が、LPH遺伝子から-13910 5'位に相当する位置にシトシン残基を有する核酸分子；(d)その相補鎖が(a)または(b)の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする、少なくとも20ヌクレオチドの核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド/核酸分子が、LPH遺伝子から-22018 5'位に相当する位置にグアニン残基を有する核酸分子；からなる群から選択される。

【0010】

本発明に従って、「腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)遺伝子」という用語は、ラクトースを、その成分、グルコースおよびガラクトースに加水分解する活性を有する酵素をコードする遺伝子を意味する。その酵素は、E.C.3.2.1.23.62によって特徴付けられる。

【0011】

「成人型ラクターゼ欠乏症」という用語は、全世界の人種にかなりの割合で、腸内細胞におけるラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)の酵素活性の「生理学的」減少から起こる常染色体劣性症状であり、乳糖不耐症としても知られる症状を意味する。

【0012】

「成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示す」という用語は、SNP、およびこのように見出された対応する核酸分子がその症状を指し示し、したがって、もしかすると原因にもなり得るという事実を意味する。したがって、この用語には、記載の5'位置が症状を指し示すということが必然的に必要とされる。一方、前記用語には、5'位置が症状の原因であるか、または一因であるということは必ずしも必要ではない。しかし、前記用語から、いずれかのSNPまたは両方のSNPの原因となる、または一因となる役割は除外されない。

【0013】

「厳密な条件下でハイブリダイズする」という言葉は、当業者によく知られているが、または従来のプロトコールに従って当業者によって確立することができるハイブリダイゼーション条件を意味する。最も有利なことには、その言葉は、非常に厳密な条件を意味する。各配列に、適した、厳密な条件は、温度、核酸分子の組成、塩の条件等のよく知られているパラメーターに基づいて確立される：例えば、サンプルック(Sambrook)ら、"Molecular Cloning, A Laboratory Manual"; CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989またはヒギンズ(Higgins)およびヘイムズ(Hames)(編集者)、"Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985(参考文献54)、特にブリテン(Bri

10

20

30

40

50

tten) & デビッドソン (Davidson) による "Hybridization Strategy" の 3 ~ 15 章を参照のこと。通常 (非常に厳密な) 条件は、 $0.5 \times S S C$ および $0.1\% S D S$ 中で $65^\circ C$ でのハイブリダイゼーションまたは 50% ホルムアミド、 $4 \times S S C$ および $0.1\% S D S$ 中で $42^\circ C$ でのハイブリダイゼーションを含む。通常、ハイブリダイゼーション後には洗浄して、非特異的シグナルを除去する。洗浄条件としては、 $65^\circ C$ 、 $0.2 \times S S C$ および $0.1\% S D S$ または $2 \times S S C$ および $0.1\% S D S$ または $0.3 \times S S C$ および $0.1\% S D S$ ($25 \sim 65^\circ C$ にて) などの条件が挙げられる。

【0014】

本明細書において上述されるように、本発明は、少なくとも 20ヌクレオチドのハイブリダイズする (hybridizing) 核酸分子に関する；上記の (c) および (d) を参照のこと。さらに、本発明は、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 150、または少なくとも 200ヌクレオチドの核酸分子にも関する。前記ハイブリダイズ (hybridizing) 断片は、少なくとも 25、少なくとも 50、少なくとも 75、または少なくとも 100ヌクレオチド、上記の (c) に定義される -13910位の、または上記の (d) に定義される -22018位の 5' および 3' を含むことが好ましい。

【0015】

「核酸分子」という用語は、天然および非天然核酸分子のどちらも意味する。非天然核酸分子には、cDNAならびにPNAなどの誘導体が含まれる。

【0016】

本明細書全体を通じて、「配列番号__の核酸配列を含む核酸分子・・・」という言葉は、配列番号によって指定される核酸分子よりも少なくとも 1ヌクレオチド長い核酸分子を意味する。それと同時に、これらの分子は、例えば配列番号 2 または 1、3 または 4 によって指定される本発明の核酸分子の 5' および / または 3' 末端にわたり、最大で 3000ヌクレオチドに及ぶ。

【0017】

驚くべきことに、本発明によれば、2つのラクターゼ欠乏症関連変異体が、MCM6 遺伝子の異なるイントロン中に位置付けられる、LPH 遺伝子からかなり離れて位置することが見出された。MCM6 は、遺伝子ファミリー (MCM2 ~ 7) のメンバーであり、確実に細胞周期中に 1 回だけ起こるように DNA 複製の開始に必要とされる³¹。LPH と異なり、MCM6 は、その組織分布において制限されず、MCM6 および LPH 転写物のレベルに相関性はない¹⁸。これらの発見により、これら 2 種類の遺伝子は、組織特異性または発生制御を提供する、機能的に有意なシス作用要素を全く共有しないことが示唆されるだろう¹⁸。最もおそらくは、同定される変異体は、LPH および MCM6 遺伝子の発現に対して異なる機能的な重要性を有する。さらに驚くべきことには、ラクターゼ欠乏症との完全な関連に基づいて、それら (またはそれらのうちの 1 種類) は、腸内上皮における LPH 遺伝子の転写物レベルの年齢依存性ダウンレギュレーションに関連するが、MCM6 の転写にはほとんど、または全く効果を及ぼさない。

【0018】

実験的に、9つの拡大されたフィンランド人家系において行われる、連鎖解析、対立遺伝子関連解析および拡大されたハプロタイプ解析を用いて、成人型ラクターゼ欠乏症の遺伝子座が、2q21上で47kb区間に限定された。その領域の配列解析によって、単一ヌクレオチド多型 (SNP)、すべてのフィンランド人家系において、および異なる4つの集団 (人種) からの236個体の試料セットにおいて、成人型ラクターゼ欠乏症で完全に同時分離される C/T₋₁₃₉₁₀ が明らかとなった。C/T₋₁₃₉₁₀ から 8kb のテロメア長にある他の SNP G/A₋₂₂₀₁₈ が 7 症例以外のすべてにおいて形質と関連した。1047 DNA における C/T₋₁₃₉₁₀ SNP の有病率は、3つの異なる集団における成人型ラクターゼ欠乏症の報告された有病率を反映し、形質のその重要性に更なる証拠を提供した。

【0019】

上記で言及されている、驚くべき発見によって、初めて、LPH 遺伝子の上流にある記載の単一ヌクレオチド多型の分子解析に基づく試験システムを確立することが可能となる

10

20

30

40

50

。どちらのSNPも、成人型ラクターゼ欠乏症の診断、または成人型ラクターゼ欠乏症の素因の診断に堅固な基礎を提供するが、ヌクレオチド位 - 13910 が、単独で、またはヌクレオチド位 - 22018 と組み合わせて解析されることが好ましい。これは、-13910 位のSNPが、解析される症例の100%で疾患と関連したのに対して、-22018 位のSNPは、すべての症例のうち98%のみで成人型ラクターゼ欠乏症と関連したからである。にもかかわらず、ヌクレオチド位 - 22018 の単独での解析もまた通常、成人型ラクターゼ欠乏症に対する素因の診断に堅固な基盤を提供する。

【0020】

SNPの存在をスクリーニングする確立された方法が豊富にあるために、現在は、便利に、短時間で、低コストで、高精度で、調査中のヒトに著しく迷惑をかけることなく、成人型ラクターゼ欠乏症に対する遺伝的素因を診断することが可能である。

10

【0021】

本発明はさらに、腸内ラクターゼ・フロリジン加水分解酵素(LPH)遺伝子の5'部分を含む核酸分子に関し、前記核酸分子は、(a)配列番号3の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号3のその配列が図6に図示される、核酸分子；(b)配列番号4の核酸配列を有する、または含む核酸分子であって、配列番号4のその配列が図7に図示される、核酸分子；(c)その相補鎖が(a)または(b)の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド/核酸分子が、LPH遺伝子の-13910位に相当する位置にチミジン残基を有する核酸分子；(d)その相補鎖が(a)または(b)の核酸分子と、厳密な条件下にてハイブリダイズする核酸分子であって、前記ポリヌクレオチド/核酸分子が、LPH遺伝子から-22018位に相当する位置にアデノシン残基を有する核酸分子；からなる群から選択される。

20

【0022】

本発明のこの実施形態は、ヒトが成人型ラクターゼ欠乏症に罹患していないこと、およびその素因を保持しないことを実証するために便利に用いることができる。さらに、LPH遺伝子の上流にある-13910位または-22018位の「野生型」の状況を反映するこの核酸分子は、成人型ラクターゼ欠乏症の素因を試験する実験において対照手段として使用してもよい。試験のために、本明細書を通じて述べられている方法を用いてもよい。

【0023】

本発明の好ましい実施形態において、核酸分子はゲノムDNAである。本発明のこの好ましい実施形態は、研究中のヒトから単離された体液、細胞または組織由来のゲノムDNAに基づいて解析が行われるだろうという事実を反映するものである。

30

【0024】

本発明の核酸分子のさらに好ましい実施形態において、前記ゲノムDNAは遺伝子の一部である。本発明に従って、LPH遺伝子に対して-13910位または-22018位を有するMCM6遺伝子のイントロンの少なくとも1つが解析されることが好ましい。

【0025】

さらに、本発明は、少なくとも14ヌクレオチドを有する、本明細書において上述の核酸分子の断片に関し、前記断片は、LPH遺伝子の(上流の)ヌクレオチド位-13910またはヌクレオチド位-22018を含む。

40

【0026】

本発明の断片は、天然由来ならびに(半)合成由来であってもよい。このように、断片は例えば、有機化学の従来のプロトコールに従って合成された核酸分子であってもよい。重要なことには、本発明の核酸断片は、LPH遺伝子の上流にあるヌクレオチド位-13910または-22018を含む。これらの位置において、断片は、野生型ヌクレオチド、あるいは成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示すヌクレオチド(「変異」配列とも呼ばれる)のいずれかを有し得る。したがって、本発明の断片は、たとえば野生型と変異配列とを区別するアッセイに使用してもよい。本発明の断片は、少なくとも17ヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも21ヌクレオチド、最も好ましくは少な

50

くとも25ヌクレオチド、例えば30ヌクレオチドからなることがさらに好ましい。

【0027】

さらに、本発明は、本明細書において上述の核酸分子と相補的な核酸分子に関する。少なくとも14ヌクレオチドを含み、かつLPH遺伝子のの上流にある配列の少なくとも-13910位または-22018位を網羅する、本発明のこの実施形態は、ハイブリダイゼーションアッセイにおける記載の位置の遺伝子構成 (genetic setup) の解析に特に有用である。このように、例えば、野生型配列 (つまり、-13910位のTまたは-22018位のA)、または成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、もしくはそれを示す変異 (-13910位のCまたは-22018位のG) に正確に相補的な15merを使用して、多型変異間を区別することができる。これは、適切なハイブリダイゼーションおよび洗

10

【0028】

この点に関しては、本発明の核酸分子、その断片、ならびに相補的な核酸分子が検出可能に標識されることに留意することが重要である。検出可能な標識としては、3Hまたは32Pなどの放射性標識、または蛍光標識が挙げられる。核酸の標識は、当技術分野において十分に理解されているが、例えばサンプルック (Sambrook) ら、上記引用文に記述されている。

【0029】

さらに、本発明は、本明細書で上述される核酸分子を含むベクターに関する。本発明のベクターは、野生型配列 (1つまたは複数) を含む核酸分子を含有してもよいし、または変異配列 (1つまたは複数) を含む核酸分子を含有してもよい。そのベクターは特に、本発明の核酸分子を含む、遺伝子工学に従来から使用されているプラスミド、コスミド、ウイルスまたはバクテリオファージであってもよい。前記ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子導入もしくはターゲティングベクターであることが好ましい。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭腫ウイルスなどのウイルスに由来する発現ベクターを、本発明の核酸分子を標的とされる細胞集団に送達するために使用してもよい。当業者によく知られている方法を用いて、組換えウイルスベクターを構築することができる; 例えば、サンプルック (Sambrook) ら、上記引用文およびアウスベル (Ausubel) ら、Current Protocol in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) に述べられている技術を参照のこと。一方、本発明の核酸分子およびベクターは、標的細胞に送達するために、リポソームに再構成することができる。細胞宿主の種類に応じて異なる公知の方法によって、本発明の核酸分子を含有するベクターを宿主細胞に導入することができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは一般に、原核細胞に用いられているのに対して、例えば、リン酸カルシウムもしくはDEAE-デキストランによるトランスフェクションまたは電気穿孔法は、他の細胞宿主に使用される; 上記のサンプルック (Sambrook) を参照のこと。

20

30

【0030】

かかるベクターはさらに、適切な宿主細胞における、適切な条件下での前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などの遺伝子を含み得る。本発明の核酸分子は、原核細胞または真核細胞における発現が可能となるように、発現制御配列に作動可能に連結されることが好ましい。前記ポリヌクレオチドの発現は、ポリヌクレオチドの翻訳可能なmRNAへの転写を含む。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞における発現を保證する調節因子は、当業者にはよく知られている。それらは通常、転写の開始を実現する調節配列、および任意に、転写の終結および転写物の安定化を保證するポリAシグナル、および/または前記ポリヌクレオチドの発現をさらに高めるイントロンを含む。その他の調節因子は、転写エンハンサーならびに翻訳エンハンサー、および/または天然に関連する、または異種のプロモーター領域を含み得る。原核生物の宿主細胞中での発現を可能にする、可能性

40

50

のある調節因子は、例えば、大腸菌における P L、l a c、t r p または t a c プロモーターを含み、真核生物の宿主細胞中での発現を可能にする調節因子の例としては、酵母における A O X 1 もしくは G A L 1 プロモーター、または C M V -、S V 4 0 -、R S V - プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、C M V - エンハンサー、S V 4 0 - エンハンサーまたは哺乳動物および他の動物細胞におけるグロブリンイントロンが挙げられる。転写開始を担う因子に加えて、かかる調節因子は、ポリヌクレオチドの下流にある S V 4 0 ポリ A 部位または t k ポリ A 部位などの転写終結シグナルも含み得る。任意に、異種配列は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡略化された精製を提供する、C 末端もしくは C 末端同定ペプチドペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。このコンテキストにおいて、適切な発現ベクターは、岡山 (Okayama) -ベルク (Berg) の c D N A 発現ベクター p c D V 1 (Pharmacia 社)、p C D M 8、p R c / C M V、p c D N A 1、p c D N A 3、E c h o (登録商標) クローニングシステム (Invitroge 社)、p S P O R T 1 (GIBCO BRL 社) または p R e v T e t - O n / p R e v T e t - O f f または p C I (Promega 社) などの当技術分野で公知のベクターである。好ましくは、発現制御配列は、真核生物の宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクターにおける真核生物プロモーター系であるが、原核生物宿主の制御配列を使用してもよい。

【 0 0 3 1 】

上述のように、本発明のベクターは、遺伝子導入またはターゲティングベクターであってもよい。e x - v i v o または i n - v i v o 技術による治療遺伝子の導入に基づく遺伝子治療は、遺伝子導入の最も重要な応用のうちの 1 つである。i n - v i t r o または i n - v i v o での遺伝子治療に用いられる適切なベクターおよび方法は、文献に記述されており、当業者には公知である；例えば、ジョルダノ (Giordano), Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; アンダーソン (Anderson), Science 256 (1992), 808-813; Isner, ランセット (Lancet) 348 (1996), 370-374; ミュールハウゼン (Muhlhauser), Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; ワング (Wang), Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO94/29469; WO 97/00957, シャーパー (Schaper), Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, またはケイ (Kay) ら (2001) Nature Medicine, 7, 33-40) およびそれらに記載の参考文献を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、直接的に導入するために、またはリポソームもしくはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）を介して細胞に導入するために設計することができる。前記細胞は、生殖細胞系細胞、胚細胞、または卵細胞またはそれから誘導される細胞であることが好ましく、最も好ましくは、前記細胞は幹細胞である。遺伝子治療は、野生型核酸分子のみで考えられる。

【 0 0 3 2 】

本発明は、プライマーまたはプライマー対にも関し、そのプライマーまたはプライマー対は、L P H のヌクレオチド位 - 1 3 9 1 0 または - 2 2 0 1 8 を含む上述の核酸と、またはその相補鎖と、（非常に）厳密な条件下にてハイブリダイズする。本発明のプライマーは、1 7 または 2 1 ヌクレオチドなど、少なくとも 1 4 ヌクレオチドの長さを有することが好ましい。そのプライマーは、2 4 ヌクレオチドの最大長さを有することがさらに好ましい。伸長反応または増幅反応などの適切な検出方法と組み合わせられる、- 1 3 9 1 0 位または - 2 2 0 1 8 位のいずれかを含むゲノム配列との、適切な条件下でのプライマーのハイブリダイゼーションまたはハイブリダイゼーションの欠失を用いて、多型変異間を区別し、次いで、例えば成人型ラクターゼ欠乏症について研究中のヒトの素因に関して結論を導き出すことができる。本発明では、2 種類のプライマー/プライマー対を取り上げる。一方の種類のプライマーは変異配列を含む配列とハイブリダイズする。言い換えると、そのプライマーは、- 1 3 9 1 0 位に C または - 2 2 0 1 8 位に G を含む配列に、またはその相補鎖に正確に相補的である。もう一方の種類のプライマーは、- 1 3 9 1 0 位に T または - 2 2 0 1 8 位に A を有する配列に、またはその相補鎖に正確に相補的である。ハイブリダイゼーション条件は好ましくは、十分厳密であるように選択されるであ

10

20

30

40

50

るうことから、例えば変異配列に正確に相補的なプライマーを野生型対立遺伝子と接触させても、結果としてミスマッチが形成するため、効率的なハイブリダイゼーションは行われない。洗浄後、プライマーが除去されるため、シグナルは検出されないだろう。

【0033】

さらに、本発明は、本明細書において上述される本発明のベクターで形質転換された非ヒト宿主に関する。その宿主は、変異配列または野生型配列を保持し得る。育種などでは、宿主は、一方または両方のSNPに対してヘテロ接合性またはホモ接合性であることができる。本発明の宿主は、ゲノムに一過的にまたは安定的に組み込まれた本発明のベクターを保持し得る。本発明の非ヒト宿主を作製する方法は当技術分野でよく知られている。例えば、サンプルック(Sambrook)ら、上記引用文に記載の従来のトランスフェクションの10
プロトコルを用いて、形質転換細菌(大腸菌など)または形質転換酵母を作製することができる。本発明の非ヒト宿主は、例えば成人型ラクターゼ欠乏症の発症を解明するために使用することができる。

【0034】

本発明の好ましい実施形態において、非ヒト宿主は、細菌、酵母細胞、昆虫細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、遺伝子導入動物または遺伝子導入植物である。大腸菌が好ましい細菌であるのに対して、好ましい酵母細胞は、*S. cerevisiae*または*Pichia pastoris*細胞である。好ましい真菌細胞は、アスペルギルス属(*Aspergillus*)細胞であり、好ましい昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*細胞が挙げられる。好ましい哺乳動物細胞は、LPH酵素の発現を示す結腸癌細胞系であり、CaCo2細胞が挙げられる。20

【0035】

遺伝子導入非ヒト動物、例えば遺伝子導入マウスの作製方法は、生殖細胞、胚細胞、幹細胞または卵細胞またはそれから誘導される細胞に上述のポリヌクレオチドまたはターゲティングベクターを導入することを含む。非ヒト動物は、本明細書に記載の本発明のスクリーニング法に従って使用することができる。遺伝子導入胚の作製およびそれらのスクリーニングは、例えばA. L. ジョイナー(Joyner) Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach* (1993), Oxford University Pressによって記述されているように行うことができる。胚の胚細胞のDNAは、例えば適切な相補的核酸分子でのサザンブロット法を用いて解析することができる; 上記文献を参照のこと。遺伝子導入非ヒト動物を作製するための一般的な方法は、当技術分野において記述されており、例えばWO94/24274を参照のこと。遺伝子導入非ヒト生物(相同的に標的とされる非ヒト動物を含む)を作製するには、胚幹細胞(ES細胞)が好ましい。本質的に述べられているように(ロバートソン(Robertson), E. J. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112)、有糸分裂上不活性なSNL76/7細胞のフィーダー層上で成長するAB-1細胞系(マクマホン(McMahon)およびブラッドリー(Bradley), *Cell* 62:1073-1085 (1990))などのマウスES細胞が、相同的遺伝子ターゲティングに用いられる。他の適切なES細胞系としては、限定されないが、E14細胞系(フーパー(Hooper)ら, *Nature* 326:292-295 (1987))、D3細胞系(ドッチマン(Doetschman)ら, *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45 (1985))、CC E細胞系(ロバートソン(Robertson)ら, *Nature* 323:445-448 (1986))、AK-7細胞系(チワン(Zhuang)ら, *Cell* 77:875-884 (1994))が挙げられる。特異的標的化変異を有するES細胞からのマウス系作製の成功は、ES細胞の多分化能(つまり、胚形成に30
関与し、得られた動物の胚細胞に寄与する胚盤胞または桑実胚など、胚を発生する宿主に注入された後のそれらの能力)に依存する。注入されたES細胞を含有する胚盤胞は、偽妊娠の非ヒトの雌の子宮内で発達させ、キメラマウスとして生まれる。目的の核酸分子を有する細胞のキメラである、得られた遺伝子導入マウスを戻し交配し、本発明の核酸分子にヘテロ接合性の遺伝子導入マウスを同定するために、子孫の尾(tail)の生検のDNAについてPCRまたはサザンブロット分析することによって、正しく標的化された導入遺伝子(1つまたは複数)の存在をスクリーニングする。

【0036】

10

20

30

40

50

遺伝子導入非ヒト動物は、例えば遺伝子導入マウス、ラット、ハムスター、イヌ、サル（類人猿）、ウサギ、ブタ、または雌ウシである。前記遺伝子導入非ヒト動物はマウスであることが好ましい。本発明の遺伝子導入動物は、特に、本発明の核酸およびベクターの表現型発現／結果を研究するのに有用である。さらに、本発明の遺伝子導入動物は、例えばげっ歯類の腸におけるLPH酵素の発達上の発現を研究するのに有用である。本発明の非ヒト遺伝子導入動物を用いて、成人型ラクターゼ欠乏症を改善するのに有用な治療薬／組成物または可能性のある他の治療法について試験することができることがさらに考えられる。

【0037】

さらに、本発明は、本発明の変異核酸分子に特異的に結合するが、対応する野生型核酸分子には特異的に結合しない、抗体またはアプタマーまたはファージに関する。その抗体を、結合について試験し、当技術分野でよく知られているいずれかの血清学的技術、例えばチューブ、ゲルにおける凝集技術、2次抗体を用いる、または用いない固相および捕捉技術において、あるいは免疫蛍光増強（immunofluorescence enhancement）を用いる、または用いないフローサイトメトリーで使用してもよい（例えば、ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）"Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988（参照番号53）に記載の技術を参照のこと）。

10

【0038】

本発明に従って、その抗体は、-13910位（その位のヌクレオチドがC）または-22018位（その位のヌクレオチドがG）を含むエピトープを特異的に認識する。それは、この位置にTを有する-13910位を含むエピトープとも、この位置にGを有する-22018位を含むエピトープとも交差反応しない、または本質的に交差反応しない。標準プロトコールに従って作製される抗体の特異性は、ELISAアッセイなどにおいて、野生型および変異配列を保持するDNA分子と接触させることによって試験することができる。変異配列を有するバックグラウンドではシグナルを生じるが、野生型配列を有するバックグラウンドではシグナルを生じない抗体のみが選択されるだろう。

20

【0039】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗血清に由来する、またはポリクローナル抗血清に含まれるモノクローナル抗体もしくは抗体であってもよい。本発明によって使用される「抗体」という用語は、Fab、F(ab')₂、FvもしくはscFv断片などの前記抗体の断片をさらに含む；例えば、ハーロー（Harlow）およびレーン（Lane）⁵³、上記引用文を参照のこと。抗体またはその断片は天然由来であってもよいし、または（半）合成的に作製されたものであってもよい。かかる合成産物は、本発明の抗体と同じまたは本質的に同じ結合特異性を有する、半タンパク性（semi-proteinaceous）物質としての非タンパク性物質も含み得る。かかる産物は、例えば、ペプチドミメティックによって得ることができる。

30

【0040】

「アプタマー」という用語は、当技術分野でよく知られており、例えばオズボーン（Osborne）ら、Curr. Opin. Chem. Biol. 1（1997）、5-9（参照番号51）またはストール（Stall）およびショーカ（Szoka）、Pharm. Res. 12（1995）、465-483（参照番号52）に定義されている。

40

【0041】

さらに、本発明は、本明細書において上述の野生型核酸分子に特異的に結合するが、成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示す、対応する変異配列には特異的に結合しない、抗体またはアプタマーまたはファージに関する。変異配列に特異的な抗体に関して述べられた、特異性等に関する記述には、本明細書において必要に応じて変更が加えられる。

【0042】

さらに、本発明は、本明細書において上述される野生型核酸分子を含む医薬組成物に関する。

50

【0043】

本発明の医薬組成物は、遺伝子治療アプローチ、特に体細胞遺伝子治療に用いることができる。上記で示され、かつ本発明の医薬組成物に含有される野生型核酸分子は、薬学的に許容される担体および/または希釈剤と組み合わせてもよい。適切な薬剤担体の例は当技術分野でよく知られており、リン酸緩衝液、水、油/水(O/W)型エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液等が挙げられる。かかる担体を含む組成物は、よく知られている従来の方法によって調製することができる。これらの医薬組成物は、適切な用量で対象に投与することができる。適切な組成物の投与は、様々な方法によって、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所的、皮内、鼻腔内または気管支内投与によって行うことができる。投与計画は、治療を行う医師および臨床因子によって決定されるだろう。医療分野においてよく知られているように、いずれか1人の患者に対する投薬量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与すべき特定の化合物、性別、時間および投与経路、全身の健康状態、および同時に投与される他の薬物などの多くの因子によって異なる。通常の投与量は例えば、発現のために、または発現の抑制のために、核酸0.001~1000 μgの範囲であることができる；しかしながら、この例示的な範囲を下回るまたは超える投与量が、特に上記の因子を考慮して考えられる。投与量はさまざまであるだろうが、DNAの静脈内投与に好ましい投与量は、DNA分子約 $10^6 \sim 10^{12}$ コピーである。定期的な診断によって、経過がモニターされる。本発明の組成物は、局所的に投与してもよいし、または全身的に投与してもよい。投与は一般に、非経口的、例えば静脈内投与であるだろう；例えば内部標的もしくは外部標的へのパーティクルガンによる(bi

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

150

160

170

180

190

200

210

220

230

240

250

260

270

280

290

300

310

320

330

340

350

360

370

380

390

400

410

420

430

440

450

460

470

480

490

500

510

520

530

540

550

560

570

580

590

600

610

620

630

640

650

660

670

680

690

700

710

720

730

740

750

760

770

780

790

800

810

820

830

840

850

860

870

880

890

900

910

920

930

940

950

960

970

980

990

1000

1010

1020

1030

1040

1050

1060

1070

1080

1090

1100

1110

1120

1130

1140

1150

1160

1170

1180

1190

1200

1210

1220

1230

1240

1250

1260

1270

1280

1290

1300

1310

1320

1330

1340

1350

1360

1370

1380

1390

1400

1410

1420

1430

1440

1450

1460

1470

1480

1490

1500

1510

1520

1530

1540

1550

1560

1570

1580

1590

1600

1610

1620

1630

1640

1650

1660

1670

1680

1690

1700

1710

1720

1730

1740

1750

1760

1770

1780

1790

1800

1810

1820

1830

1840

1850

1860

1870

1880

1890

1900

1910

1920

1930

1940

1950

1960

1970

1980

1990

2000

2010

2020

2030

2040

2050

2060

2070

2080

2090

2100

2110

2120

2130

2140

2150

2160

2170

2180

2190

2200

2210

2220

2230

2240

2250

2260

2270

2280

2290

2300

2310

2320

2330

2340

2350

2360

2370

2380

2390

2400

2410

2420

2430

2440

2450

2460

2470

2480

2490

2500

2510

2520

2530

2540

2550

2560

2570

2580

2590

2600

2610

2620

2630

2640

2650

2660

2670

2680

2690

2700

2710

2720

2730

2740

2750

2760

2770

2780

2790

2800

2810

2820

2830

2840

2850

2860

2870

2880

2890

2900

2910

2920

2930

2940

2950

2960

2970

2980

2990

3000

3010

3020

3030

3040

3050

3060

3070

3080

3090

3100

3110

3120

3130

3140

3150

3160

3170

3180

3190

3200

3210

3220

3230

3240

3250

3260

3270

3280

3290

3300

3310

3320

3330

3340

3350

3360

3370

3380

3390

3400

3410

3420

3430

3440

3450

3460

3470

3480

3490

3500

3510

3520

3530

3540

3550

3560

3570

3580

3590

3600

3610

3620

3630

3640

3650

3660

3670

3680

3690

3700

3710

3720

3730

3740

3750

3760

3770

3780

3790

3800

3810

3820

3830

3840

3850

3860

3870

3880

3890

3900

3910

3920

3930

3940

3950

3960

3970

3980

3990

4000

4010

4020

4030

4040

4050

4060

4070

4080

4090

4100

4110

4120

4130

4140

4150

4160

4170

4180

4190

4200

4210

4220

4230

4240

4250

4260

4270

4280

4290

4300

4310

4320

4330

4340

4350

4360

4370

4380

4390

4400

4410

4420

4430

4440

4450

4460

4470

4480

4490

4500

4510

4520

4530

4540

4550

4560

4570

4580

4590

4600

4610

4620

4630

4640

4650

4660

4670

4680

4690

4700

4710

4720

4730

4740

4750

4760

4770

4780

4790

4800

4810

4820

4830

4840

4850

4860

4870

4880

4890

4900

4910

4920

4930

4940

4950

4960

4970

4980

4990

5000

5010

5020

5030

5040

5050

5060

5070

5080

5090

5100

5110

5120

5130

5140

5150

5160

5170

5180

5190

5200

5210

5220

5230

5240

5250

5260

5270

5280

5290

5300

5310

5320

5330

5340

5350

5360

5370

5380

5390

5400

5410

5420

5430

5440

5450

5460

5470

5480

5490

5500

5510

5520

5530

5540

5550

5560

5570

5580

5590

5600

5610

5620

5630

5640

5650

5660

5670

5680

5690

5700

5710

5720

5730

5740

5750

5760

5770

5780

5790

5800

5810

5820

5830

5840

5850

5860

5870

5880

5890

5900

5910

5920

5930

5940

5950

5960

5970

5980

5990

6000

6010

6020

6030

6040

6050

6060

6070

6080

6090

6100

6110

6120

6130

6140

6150

6160

6170

6180

6190

6200

6210

6220

6230

6240

6250

6260

6270

6280

6290

6300

6310

6320

6330

6340

6350

6360

6370

6380

6390

6400

6410

6420

6430

6440

6450

6460

6470

6480

6490

6500

6510

6520

6530

6540

6550

6560

6570

6580

6590

6600

6610

6620

6630

6640

6650

6660

6670

6680

6690

6700

6710

6720

6730

6740

6750

6760

6770

6780

6790

6800

6810

6820

6830

6840

6850

6860

6870

6880

6890

6900

6910

6920

6930

6940

6950

6960

6970

6980

6990

7000

7010

7020

7030

7040

7050

7060

7070

7080

7090

7100

7110

7120

7130

7140

7150

7160

7170

7180

7190

7200

7210

7220

7230

7240

7250

7260

7270

7280

7290

7300

7310

7320

7330

7340

7350

7360

7370

7380

7390

7400

7410

7420

7430

7440

7450

7460

7470

7480

7490

7500

7510

7520

7530

7540

7550

7560

7570

7580

7590

7600

7610

7620

7630

7640

7650

7660

7670

7680

7690

7700

7710

7720

7730

7740

7750

7760

7770

7780

7790

7800

7810

7820

7830

7840

7850

7860

7870

7880

7890

7900

7910

7920

7930

7940

7950

7960

7970

7980

7990

8000

8010

8020

8030

8040

8050

8060

8070

8080

8090

8100

8110

8120

8130

8140

8150

8160

8170

8180

8190

8200

8210

8220

8230

8240

8250

8260

8270

8280

8290

8300

8310

8320

8330

8340

8350

8360

8370

8380

8390

8400

8410

8420

8430

8440

8450

8460

8470

8480

8490

8500

8510

8520

8530

8540

8550

8560

8570

8580

8590

8600

8610

8620

8630

8640

8650

8660

8670

8680

8690

8700

8710

8720

8730

8740

8750

8760

8770

8780

8790

8800

8810

8820

8830

8840

8850

8860

8870

8880

8890

8900

8910

8920

8930

8940

8950

8960

8970

8980

8990

9000

9010

9020

9030

9040

9050

9060

9070

9080

9090

9100

9110

9120

9130

9140

9150

9160

9170

9180

9190

9200

9210

9220

9230

9240

9250

9260

9270

9280

9290

9300

9310

9320

9330

9340

9350

9360

9370

9380

9390

9400

9410

9420

9430

9440

9450

9460

9470

9480

9490

9500

9510

9520

9530

9540

9550

9560

9570

9580

9590

9600

9610

9620

9630

9640

9650

9660

9670

9680

9690

9700

9710

9720

9730

9740

9750

9760

9770

9780

9790

9800

9810

9820

9830

9840

9850

9860

9870

9880

9890

9900

9910

9920

9930

9940

9950

9960

9970

9980

9990

10000

【0044】

さらに、本発明は、本明細書において上述される核酸分子、本明細書において上述されるベクター、本明細書において上述されるプライマーまたはプライマー対、および/または本明細書において上述される抗体/aptamerおよび/またはファージを含有する診断組成物に関する。その診断組成物は、成人型ラクターゼ欠乏症を発症する彼または彼女の素因に関して、またはその急性症状の診断に関して、ヒトの遺伝的体質を評価するのに有用である。診断組成物の可能な種々の成分は、溶媒中で、または凍結乾燥状態などの他の状態で1つまたは複数のバイアル中にパッケージされる。溶媒中に溶解される場合には、診断組成物は、少なくとも+8 ~ +4 に冷却することが好ましい。他の場合には、凍結

40

50

60

70

80

90

100

110

120

130

140

150

160

170

180

190

200

210

220

230

240

250

260

270

280

290

300

310

320

330

340

350

360

370

380

390

400

410

420

430

440

450

460

470

480

490

500

510

520

530

540

550

560

570

580

590

600

610

620

630

640

650

660

670

680

690

700

710

720

730

740

750

760

770

780

790

800

810

820

830

840

850

860

870

880

890

900

910

920

930

940

950

960

970

980

990

1000

1010

1020

1030

1040

1050

1060

1070

1080

1090

1100

1110

1120

1130

1140

1150

1160

1170

1180

1190

1200

1210

1220

1230

1240

1250

1260

1270

1280

1290

1300

1310

1320

1330

1340

1350

1360

1370

1380

1390

1400

1410

1420

1430

1440

1450

1460

1470

1480

1490

1500

1510

1520

1530

1540

1550

1560

1570

1580

1590

1600

1610

1620

1630

1640

1650

1660

1670

1680

1690

1700

1710

1720

1730

1740

1750

1760

1770

1780

1790

1800

1810

1820

1830

1840

1850

1860

1870

1880

1890

1900

1910

1920

1930

1940

1950

1960

1970

1980

1990

2000

2010

2020

2030

2040

2050

2060

2070

2080

2090

2100

2110

2120

2130

2140

2150

2160

2170

2180

2190

2200

2210

2220

2230

2240

2250

2260

2270

2280

2290

2300

2310

2320

2330

2340

2350

2360

2370

2380

2390

2400

2410

2420

2430

2440

2450

2460

2470

2480

2490

2500

2510

2520

2530

2540

2550

2560

2570

2580

2590

2600

2610

2620

2630

2640

2650

2660

2670

2680

2690

2700

2710

2720

2730

2740

2750

2760

2770

2780

2790

2800

2810

2820

2830

2840

2850

2860

2870

2880

2890

2900

2910

2920

2930

2940

2950

2960

2970

2980

2990

3000

3010

3020

3030

3040

3050

3060

3070

3080

3090

31

の有する症状が成人型ラクターゼ欠乏症かどうかの適切な結論を導き出すのに有用である。代替方法として、症状を有していないヒトが、成人型ラクターゼ欠乏症の素因を保有するかどうかを評価することもできる。LPH遺伝子の上流にある-13910位に関しては、シトシンがホモ接合の状態で見出される場合にのみ、その症状は成人型ラクターゼ欠乏症と診断されるか、または対応する素因が明白であるだろう。一方、チミジンがホモ接合の状態で見出された場合、または個体がヘテロ接合性(C/T)である場合、次いで、患者が患っている症状は、成人型ラクターゼ欠乏症に関連せず、さらに、その患者はこの症状を発症する素因を保有しないと結論づけられる。しかしながら、ヘテロ接合性遺伝子型を保有するヒトの子供は、C残基を有する染色体がもう一方の親からの対応する染色体と合致する場合に、その症状を発症する可能性がある」と結論づけられる。

10

【0047】

その状況は同様であり、本質的に同じ結論が、-22018位におけるSNPの解析に当てはまる。ホモ接合的に存在するG残基は、急性成人型ラクターゼ欠乏症の素因またはその発生を表す。ヘテロ接合のG/A状態は、その症状を発症しない高い可能性と関連する。ホモ接合状態でAを保有する個体は、その症状を発症するとは予想されないだろう。同様に、ある症状を有する患者は、成人型ラクターゼ欠乏症を患っていないと診断されるだろう。

【0048】

本発明の方法の好ましい実施形態において、前記試験は、成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示す核酸分子と相補的な、本明細書において上述される相補的核酸分子、あるいはプローブとしての野生型配列に相補的な本明細書に上述される核酸分子を、前記試料に含まれる核酸分子と(非常に)厳密な条件下でハイブリダイズさせることと、前記ハイブリダイゼーションを検出することと、を含む。

20

【0049】

さらにまた、使用する核酸プローブに応じて、野生型または変異配列(つまり、成人型ラクターゼ欠乏症の一因となる、またはそれを示す)のいずれかが検出されるだろう。ハイブリダイゼーション条件は、野生型配列に相補的な核酸分子が変異配列とハイブリダイズしない、または本質的にハイブリダイズしないように選択されるであろうことは理解されよう。同様に、変異配列に相補的な核酸分子は、野生型配列とハイブリダイズしない、または本質的にハイブリダイズしないだろう。本発明のハイブリダイゼーション法において、ホモ接合性およびヘテロ接合性遺伝子型から得られた結果を区別するために、例えば、ハイブリダイゼーション後のそれぞれの検出シグナルの強さ/強度をモニター/検出することができる。本発明のハイブリダイゼーション法において、ホモ接合性、ヘテロ接合性野生型対立遺伝子および/またはホモ接合性変異対立遺伝子の間を区別するために、対応する遺伝子型の内部コントロール試料が分析に含まれるだろう。

30

【0050】

さらに好ましい実施形態において、本発明の方法はさらに、前記ハイブリダイゼーションの産物を制限エンドヌクラーゼで消化するか、または前記ハイブリダイゼーションの産物を、制限エンドヌクラーゼを用いた消化にかけることと、前記消化の産物を分析することを含む。本発明のこの好ましい実施形態によって、簡便な手段を用いて、有効なハイブリダイゼーションと有効でないハイブリダイゼーションを区別することが可能となる。例えば、-13910位または-22018位に隣接するDNA配列がエンドヌクラーゼ制限部位を含有する場合、ハイブリダイズ産物は、有効なハイブリダイゼーションでは、適切な制限酵素によって切断されるのに対して、ハイブリダイゼーションが不十分であると、二本鎖産物は得られないか、または認識可能な制限部位を含まず、したがって、切断されないだろう。特に、DNA変異体C/T₋₁₃₉₁₀の配列に特異的な制限酵素は、CviJIであり、DNA変異体G/A₋₂₂₀₁₈の配列に特異的な制限酵素は、HhaIおよびAciIである。rg/cyを切断する前記酵素は、Webcutterプログラムを使用することによって見出される。消化産物の解析は、例えば臭化エチジウムでの核酸の染色と任意に併用されるゲル電気泳動などの、従来の手段によって行うことができる

40

50

。サザンプロット法などの更なる技術との組み合わせもまた考えられる。

【 0 0 5 1 】

前記ハイブリダイゼーションの検出は、例えば、抗DNA二本鎖抗体によって、または標識されたオリゴヌクレオチドを用いることによって行うことができる。好都合なことに、本発明の方法は、サザンプロット法もしくはノーザンプロット法およびなどのプロット技術および関連する技術と共に用いられる。標識化は、例えば標準プロトコールによって行われ、放射性マーカー、蛍光標識、リン光標識、化学発光標識、酵素標識等での標識化が含まれる（上記もまた参照のこと）。

【 0 0 5 2 】

上記に従って、本発明の方法の他の好ましい実施形態では、前記プローブは、例えば本明細書において上述される方法によって、および上述の標識で検出可能に標識される。

10

【 0 0 5 3 】

本発明の方法のさらに他の好ましい方法において、前記試験は、本明細書において記述される核酸分子の少なくとも一部の核酸配列を決定することを含み、前記部分は、LPH遺伝子のヌクレオチド位 - 1 3 9 1 0 および / またはヌクレオチド位 - 2 2 0 1 8 を含む。核酸分子の決定は、サンガー (Sanger) 法またはマクスム-ギルバート法 (Maxam/Gilbert) のプロトコールなど、従来のプロトコールのうちの1つに従って行うことができる（更なる参考には、サンプルック (Sambrook) ら, 上記引用文を参照のこと）。

【 0 0 5 4 】

本発明のさらに好ましい実施形態において、核酸の決定は、固相ミニシーケンシング (minisequencing) によって行われる。固相ミニシーケンシングは、溶液中の野生型および変異ヌクレオチドの定量分析に基づく。最初に、変異を含有するゲノム領域が、1つのピオチン化および非ピオチン化プライマーを用いてPCRによって増幅される。そのピオチン化プライマーは、ストレプトアビジン (SA) コーティングプレートに結合されている。PCR産物は一本鎖状に変性されて、変異部位のすぐ前にこの鎖にミスーシーケンシングプライマーが結合することが可能となる。非標識化dNTPと共に、トリチウム (H3) または蛍光標識された変異および野生型ヌクレオチドは、ミニシーケンシング反応に添加され、Taqポリメラーゼを用いてシーケンスされる。その結果は、計数器または蛍光光度計によって測定され、かつR比として表される、反応における野生型および変異ヌクレオチドの量に基づく。サイバネン (Syvanen) AC, サジャンティラ (Sajantila) A, ルッカ (Lukka) M. Am J Hum Genet 1993: 52,46-59およびスオマラニエン (Suomalainen) A およびサイバネン (Syvanen) AC. Methods Mol Biol 1996;65:73-79を参照のこと。本発明の方法の好ましい実施形態はさらに、前記核酸配列を決定する前に、前記核酸分子の少なくとも前記一部を増幅することを含む。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって行われることが好ましい。リガーゼ連鎖反応などの他の増幅方法を用いることもできる。

20

30

【 0 0 5 5 】

本発明の方法の好ましい実施形態では、前記試験は、増幅反応を行う段階であって、前記増幅反応で使用されるプライマーの少なくとも1つが、本明細書において上述されるプライマーであるか、本明細書において上述されるプライマー対に属する段階と、増幅産物についてアッセイする段階と、を含む。この実施形態において、かつ研究者 / 医師が得たいと望む情報に応じて、野生型または変異配列のいずれかとハイブリダイズするプライマーが用いられる。

40

【 0 0 5 6 】

本発明の方法によって、前記標的配列が、ハイブリダイゼーションに用いられるプライマーに正確に相補的な配列を有するならば、標的配列のみが増幅されるだろう。これは、どの種類のプライマーが使用されるかに応じて、オリゴヌクレオチドプライマーが、好ましくは (非常に) 厳密なハイブリダイゼーション条件下にて、野生型 / 変異配列とハイブリダイズしないが (結果として、増幅産物は得られない)、正確に合致する配列のみにハイブリダイズするであろうためである。当然のことながら、両方のSNPとハイブリダイ

50

ズするプライマー対の組み合わせを用いることもできる。この場合には、期待される増幅産物の解析（２番目の非識別(non-differentiating)プライマーが各遺伝子座に対して同じである場合、増幅産物はゼロ、１種、２種、３種または４種であり得る）から、- 1 3 9 1 0 位および - 2 2 0 1 8 位の両方の遺伝的状態についての情報が得られるだろう。

【 0 0 5 7 】

本発明の方法の好ましい実施形態において、前記増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行われるか、または前記増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。PCRは当技術分野で十分に確立されている。本発明に従って使用される通常の条件は、例えば、93 で3分間の変性段階；55 で30秒間のアニーリング段階；72 で75秒間の伸長段階；および72 で10分間の最終伸長段階；で例示される、体積合計50 μlでの合計35サイクルを含む。

10

【 0 0 5 8 】

本発明はさらに、成人型ラクターゼ欠乏症の存在または素因について試験する方法であって、本明細書において上述される抗体またはアプタマーまたはファージへの特異的結合に関して、ヒトから採取された試料をアッセイすることを含む方法に関する。このコンテキストにおいて、ホモ接合性の野生型対照試料（２つの存続性対立遺伝子を含む）と比較して、本発明の抗原の存在に対して弱い染色が、ヘテロ接合性野生型（一方は存続性対立遺伝子であり、もう一方はラクターゼ欠乏(hypolactasic)の対立遺伝子)に示されるのに対して、ホモ接合のラクターゼ欠乏(hypolactasic)の個体には、適切な抗体が使用されたとしても、染色は期待されない。本発明の方法は、内部コントロールとして、可能性のある3つすべての対立遺伝子の組み合わせに対応する対照試料の存在下にて行われることが好ましい。試験は、野生型配列に特異的な、または変異配列に特異的な抗体等を用いて行うことができる。さらにまた、結合についての試験は、ELISAなどの標準技術の使用を含み得る；例えば、ハーロー(Harlow)およびレーン(Lane)⁵³、上記引用文を参照のこと。

20

【 0 0 5 9 】

本発明の方法の好ましい実施形態において、前記抗体またはアプタマーまたはファージは検出可能に標識される。そのアプタマーは好ましくは、³Hもしくは³²Pで放射標識されるか、または上述の蛍光マーカで標識されるのに対して、ファージまたは抗体は、それに対応する手法において（好ましい放射性標識として¹²⁵Iで）標識するか、またはHisタグ、FLAGタグ、またはmycタグなどのタグで標識することができる。

30

【 0 0 6 0 】

本発明の方法のさらに好ましい実施形態において、その試験はイムノアッセイである。

【 0 0 6 1 】

本発明の方法の他の好ましい実施形態において、前記試料は、血液、血清、血漿、胎児組織、唾液、尿、粘膜組織、粘液、腔組織、腔から採取された胎児組織、皮膚、毛、毛嚢または他のヒト組織である。

【 0 0 6 2 】

本発明のその他の好ましい実施形態では、前記試料からの前記核酸分子は、固体担体に固定化される。

40

【 0 0 6 3 】

固体担体に核酸分子を固定化することによって、試験アッセイの扱いが容易になり、さらに、チップ、シリカウエハーまたはマイクロタイタープレートなどの少なくとも一部の固体担体によって、大量の試料を同時に分析することができる。理想的には、その固体担体によって、例えばロボット装置を用いた自動化試験が可能となる。

【 0 0 6 4 】

本発明の特に好ましい実施形態において、前記固体担体は、チップ、シリカウエハー、ビーズまたはマイクロタイタープレートである。

【 0 0 6 5 】

さらに、本発明は、成人型ラクターゼ欠乏症の存在または素因の解析のための、本明細

50

書において上述される核酸分子の使用に関する。その核酸分子によって同時に、本明細書において詳細に述べられているように、その症状が存在しないこと、またはその症状の素因を解析することが可能となる。

【0066】

さらに、本発明は、本明細書において上述される核酸分子、本明細書において上述されるプライマーまたはプライマー対、本明細書において上述されるベクター、および/または本明細書において上述される抗体アプタマーおよび/またはファージを1つまたは複数の容器中に含むキットに関する。

【0067】

本発明は、本明細書において上述される核酸分子または本明細書において上述されるベクターの、遺伝子治療における使用にも関する。遺伝子治療アプローチは、本発明のベクターに関して本明細書において上述されており、同様に本明細書に当てはまる。本発明によれば、本明細書において上記に定義される、特に配列番号3ないし4で示される核酸分子の断片もまた、遺伝子治療アプローチに用いてもよいことに留意のこと。前記断片は、(c)本明細書において上記で定義される(配列番号3でも示される)-13910位のヌクレオチドまたは(d)本明細書において上記で定義される(配列番号4でも示される)-22018位のヌクレオチドを含む。前記断片は、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも400および最も好ましくは少なくとも500ヌクレオチドを含むことが好ましい。

【0068】

本発明の使用の好ましい実施形態では、前記遺伝子治療により、成人型ラクターゼ欠乏症が治療または予防される。

【0069】

以下の実施例により、本発明を説明する。

実施例1：連鎖および連鎖不平衡解析

2q21上のLPH遺伝子の両側にあるD2S114とD2S2385の間の7つの多型マイクロサテライトマーカ-を、拡大された9つのフィンランド人ラクターゼ欠乏症家系において解析した(図1)。連鎖に関する有意な証拠が、マーカ-D2S314、D2S442、D2S2196およびD2S1334で見出され、マーカ-D2S2196で得られた $\theta = 0$ にて7.67の最高ロッドスコアを有した(表1)。絶対的な組換え現象は、ラクターゼ存続性/非存続性遺伝子座の動原体の境界を定義する、マーカ-D2S114で検出され(家系B、IV3)、その遺伝子座のテロメアの境界を定義する、マーカ-D2S2385で検出された(家族B、IV17)(図1、表1)。棄却域(critical region)を微細にマッピングするために、さらに9つの多型マーカ-を解析した。対立遺伝子頻度および組換え率を攪乱母数として扱って、その領域に関する連鎖不平衡(LD)を、検出された連鎖について条件的にモニターした¹⁶⁻¹⁷。200kb区間に及ぶ、9つのマーカ-のうち6つのマーカ-(LPH13、LPH2、LPH1、AC3、AC4、およびAC10)は、LDの非常に有意な証拠($p < 10^{-4}$)を示すのに対して、LPH遺伝子からの他の3つのマーカ-は、LDの証拠を示さなかった(表1)。2つのマーカ-、LPHおよびAC3は、対立遺伝子のラクターゼ存続性において最も有意な連鎖不平衡を表した($p < 10^{-7}$)。

【0070】

その家系材料は、本来サヒ(Sahi)⁵によって研究された9つの拡大されたフィンランド人家系からなる。1970年代に、すべての家系材料が成人型ラクターゼ欠乏症について試験された。この研究に用いられる家系材料は、若い世代における家族のDNAを収集することによって拡大された。この研究における家系材料は、合計194個体からなった(図1)。すべての家族の表現型状態が、49個体を除くすべてにおいて、エタノールを用いた乳糖耐性検査(LTTE)⁴⁻⁵によって確認された。グルテン性腸症は、血清IgA抗組織トランスグルタミナーゼの測定によってすべての罹患者において除外されている⁴⁵。インフォームド・コンセントを得た後、標準プロトコール⁴⁶に従って、関与している

10

20

30

40

50

すべての家族から採取した血液試料からDNAを抽出した。症例対照研究として、空腸生検標本から単離された196個のランダムなDNA試料であって、その試料からの2糖類分解酵素活性がヘルシンキ大学病院 (Helsinki University Hospital) で測定されている47試料をシーケンスした。標準プロトコール¹⁴⁶に従って、腸内の生検からDNAを単離した。これらの系列は、137個のラクターゼ持続性試料および59個の非持続性試料を含んだ。さらに、M. ロッシ(Rossi), University of Naplesによって親切にも提供されたイタリア人9名からのDNA、M. レンツェ(Lentze), University of Bonnによって親切にも提供されたドイツ人9名のDNA試料、J.K. セオ(Seo), Seoul National Universityによって親切にも提供された韓国人22名のDNA試料、腸内生検試料を分析した(表中: 韓国人23名、イタリア人9名、ドイツ人7名(ドイツからの症例のうち1つは、韓国が起源である))。その診断は、二糖類分解酵素活性の測定に基づくものであった。最終的に、フィンランド人集団におけるC/T₋₁₃₉₁₀変異の頻度を決定するために、東フィンランドおよび西フィンランドの小さな州からの匿名フィンランド人血液ドナー938名のDNAおよびCEPH家系¹⁹に属する109名の親のDNAを解析した。さらに、標準プロトコール⁴⁸を用いて、肝生検から単離されたヒビ(Papio hemedryas ussinus)由来のDNAを解析した。この研究は、ヘルシンキ大学病院(Helsinki University Hospital)およびフィンランド赤十字輸血サービス(Finnish Red Cross Blood Transfusion Service)の倫理委員会(Ethical Committee)によって承認された。

【0071】

実施例2: 拡大されたハプロタイプ解析

第1段階において、2q21上のLPH遺伝子の両側にある極めて多型の10個のマイクロサテライトマーカーが、他に記載されるように^{40,55}解析された。簡単に言えば、The Genethon Resource Center⁵⁵からのラクターゼ遺伝子付近にある、2q上の極めて多型のマイクロサテライトマーカーを以下のような遺伝距離: cen-D2S114-1cM-D2S1334-0cM-D2S2196-0cM-D2S442-2cM-D2S314-2cM-D2S2385-1cM-D2S2288-1cM-D2S397-1cM-D2S150-1cM-D2S132で解析した。マーカーの順序は大部分、Genethonマップで補われる第2染色体の物理的YACコンティグマップ(チューマコフ(Chumakov)ら, 1995⁵⁶)から得られた。鋳型DNA12ng、プライマー5pmol、各ヌクレオチド0.2mM、20mMトリスHCl(pH8.8)、15mM(NH₄)₂SO₄、1.5mM MgCl₂、0.1% Tween 20、0.01%ゼラチン、0.25U Taqポリメラーゼ(Dynazyme, Finnzymes社)を含有する合計体積15μl中でPCRが行われた。³²P-ATPを用いて、プライマーの1つを5'末端で放射標識した。その反応は、マルチウエル・マイクロタイタープレート中で、94℃で30秒間の変性段階; プライマーに応じて、様々な温度にて30秒間アニーリングする段階; 72℃で30秒間伸長する段階; 3分間に設定された変性段階; および5分での最終伸長段階; を含む35サイクル行われた。増幅された断片を6%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、オートラジオグラフィーを行った。第2段階では、LPH遺伝子にわたり構築されたコンティグ内のその他の9個のマイクロサテライトマーカーを、Repeat Masker program (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>)を用いて、BAC(NH034L23、NH0318L13、NH0218L22、およびRP11-329I1)の公開ゲノム配列から同定した。その反復配列の両側にあるプライマーを合成した。PCR条件は、他に記載の通りである⁴⁰。増幅された断片を6%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、オートラジオグラフィーを行った。

【0072】

LINKAGEプログラムパッケージ³⁹のMLINKオプションを使用することによって、対をなすロッドスコアを計算した。完全浸透度を有し、組換え率の性差なく、疾患対立遺伝子頻度0.4を有する、成人型ラクターゼ欠乏症の常染色体劣性遺伝が推定された。その症状はフィンランド人集団⁵⁻⁶のその年齢に現れたため、20歳の年齢を超える個体のみが、研究に含まれた。LTT Eによって確認されていない個体の疾患状態は、未知

10

20

30

40

50

であると見なされた。対立遺伝子頻度およびそのマーカーのヘテロ接合性が、パラメトリックな連鎖解析⁴⁹の目的のために、Downfreqプログラムを用いて、家系材料から推定された。さらに、常染色体劣性型の遺伝を想定して¹⁶、疑似マーカー (pseudomarker) 連鎖および連鎖不平衡解析を行った。対立遺伝子頻度および組換え率を攪乱母数^{16, 49}として扱って、検出された連鎖についてLDの試験を条件的に行った。これらの解析から得られたP値を表1に示す。ハプロタイプは、この順序：LPH1 - LPH2 - LPH13 - AC7 - AC3 - AC4 - AC5 (図3) でマイクロサテライトマーカーに対して手作業で構築された。本発明者らの家系材料における合計54個の非存続性染色体および合計33個の存続性染色体がハプロタイプ解析に利用可能であった。

【0073】

密に連鎖するマーカーの順序は、棄却域における4つのBACクローン：NH0034L23、NH0218L22、NH0318L13および329I10を1つの連続した配列セグメントに構築することによって確認された。このコンティグは、アスパルチル-tRNAシンテターゼ(DARS)遺伝子のマーカーAC8からエクソン10におよび、合計222.5kbを網羅した(図2)。連鎖領域のこの物理地図に基づいて、150kb区間を網羅する、7つのマーカーを有する拡大されたハプロタイプ(cen-LPH13 - LPH2 - LPH1 - AC7 - AC3 - AC4 - AC5 - tel)(図3)が構築された。1つの主要なハプロタイプが、非存続性対立遺伝子のうち3個(5%)に対して、存続性対立遺伝子20個(60%)中に存在し、ハプロタイプの広範な多様性が非存続性対立遺伝子で認められた。存続性対立遺伝子におけるハプロタイプの残り40%は、歴史的組換え現象による名プロタイプの破壊と一致するように、祖先ハプロタイプと異なった。保存ハプロタイプ解析に基づいて、ラクターゼ存続性の遺伝子座は、マーカーLPH1とAC3との間の47kb区間に限定される可能性がある(図3)。

【0074】

実施例3：成人型ラクターゼ欠乏症遺伝子座の配列解析

マーカーLPH1とAC3との間の47kb領域を、9つのラクターゼ欠乏症家系の家族数人のゲノムDNAからの、オーバーラップPCR断片において増幅し、シーケンシングした。その領域は、47kb棄却域(critical region)の36kbを網羅する、微小染色体維持(MCM6)遺伝子¹⁸を含有する(図2)。合計52個の変異体を除いては、MCM6遺伝子のコード領域では変異は検出されなかった；43個のSNPおよび9個の欠失/挿入多型が、47kb棄却域(critical region)において同定された(表2)。変異体のうち2つだけ(C/T₋₁₃₉₁₀、G/A₋₂₂₀₁₈)が、フィンランド人家系におけるラクターゼ存続性/非存続性形質と関連した(表2および3)。第1の関連する変異体、C/T₋₁₃₉₁₀は、LPH遺伝子の最初のATGコドンから-13910bp位にあるMCM6遺伝子のイントロン13に存在する。第2の関連する変異体、G/A₋₂₂₀₁₈は、LPH遺伝子の最初のATGコドンから-22018位にあるMCM6遺伝子のイントロン9に位置する。互いに8kb離れた、これらの2つの変異体は完全に、拡大された9つのフィンランド人家系における成人型ラクターゼ欠乏症で同時分離した。すべてのラクターゼ欠乏の(非存続性)家族は、C₋₁₃₉₁₀とG₋₂₂₀₁₈の両方にホモ接合であった(表3)。興味深いことに、これらのどちらの変異体も、反復要素中に存在し、L2誘導要素にはC/T₋₁₃₉₁₀、Alu要素にはG/A₋₂₂₀₁₈が存在する。

【0075】

実験的に、本発明者らの家系材料からの、棄却域にわたり同様のハプロタイプを共有する、非存続性個体3名、ホモ接合の存続性個体2名およびヘテロ接合の存続性個体2名を、第1段階におけるシーケンシングに使用した(図1)。成人型ラクターゼ欠乏症の棄却域を網羅する、BAC：NH0034L23、NH0218L22、NH0318L23、およびRP-329I10の公開ドラフトゲノム配列を用いて、Sequencher 4ソフトウェア(Gene Codes社)を使用して1つのコンティグに構築した。LPH1とAC3との間の棄却域に及ぶオリゴヌクレオチドプライマーを設計した(オリゴヌクレオチドプライマーのリストは本明細書において以下に記載される)。ゲノムDNA(100ng)、プラ

10

20

30

40

50

イマー（各 20 ng）、dNTP（200 μM）、Taq ポリメラーゼ 0.5 U（Dynazyme, Finnzymes社）を有する合計体積 50 μl で、標準バッファー中にて PCR 増幅が行われた。PCR 産物のサイズが、本発明者らが Dynazyme extend kit（伸長キット）を用いた（条件は本明細書において以下に記述される）1 kb を超える場合を除いては、大部分の PCR は、以下の PCR サイクル条件：94 で 3 分間変性を行う初回、次いで、94 で 30 秒、55 で 30 秒、および 72 で 1.25 分の 35 サイクル、72 で 10 分間の最終伸長を用いて増幅された。精製された PCR 産物（15 ~ 40 ng）を、BigDye terminator chemistry（PE Biosystems社）を用いてサイクルシーケンスした。ABI Sequencing Analysis 3.3（PE Biosystems社）および Sequencher 4.1（Gene Codes社）を用いて、データを解析した。

10

【0076】

シーケンシによるラクターゼ変異体の検出：

ゲノム DNA（100 ng）、プライマー（各 20 ng）、dNTP（200 μM）、0.5 U Taq ポリメラーゼ（Dynazyme, Finnzymes社）を有する合計体積 50 μl で、標準バッファー中にて、PCR 増幅を行った。どちらの PCR も、以下の PCR サイクル条件：94 で 3 分間変性を行う初回、次いで、94 で 30 秒、55 で 30 秒、および 72 で 1.25 分の 35 サイクル、72 で 10 分間の最終伸長を用いて増幅された。PCR は酵素反応によって精製された。精製された PCR 産物（15 ~ 40 ng）を、BigDye terminator chemistry（PE Biosystems社）を用いてサイクルシーケンスした。ABI Sequencing Analysis 3.3（PE Biosystems社）および Sequencher 4.1（Gene Codes社）を用いて、データを解析した。

20

【0077】

固相ミニシーケンシングによるラクターゼ変異体のスクリーニング：

C/T_{.13910} 変異体にわたる DNA 断片を、1つのビオチン化（5' - Bio - CCTCGTTAATAACCCACTGACCTA - 3'）プライマーおよび非ビオチン化（5' - GTCACCTTTGATATGATGAGAGCA - 3'）プライマーを用いて増幅した。G/A_{.22018} には、ビオチン化（5' - Bio - TGCTCAGGACATGCTGATCAA - 3'）および1つの非ビオチン化（5' - CTACCCCTATCAGTAAAGGCCTA - 3'）プライマーを上述の条件下で使用した。PCR 産物 10 μl をストレプトアビジンコーティングのマイクロタイターウェル（Lab systems社, フィンランド）中に捕捉した。そのウェルを洗浄し、サイバネン（Syvanen）ら（Am J Hum Genet. (1993), 52, 46-59）およびサイバネン（Syvanen）およびランデグレン（Landegren）（Hum Mutat. (1994), 3, 172-9）によって記述されているように、結合した DNA を変性させた。C/T_{.13915} にミニシーケンシングプライマー（5' - GGCAATACAGATAAGATAATGTAG - 3'）10 pmol、G/A_{.22018} にはミニシーケンシングプライマー（5' - AAAAACAAGCATTCCTCAGCTGGGC - 3'）10 pmol、およびラクターゼ非存続性対立遺伝子に対応する H-dCTP、H-dGTP（115 Ci/mmol; Amersham社, 英国）またはラクターゼ存続性対立遺伝子に対応する H-dTTP、H-sATP のいずれか 0.1 μl、および DNA ポリメラーゼ 0.05 U（Dynazyme II, Finnzymes社）をそのバッファー中に含有する、ミニシーケンシング反応混合物 50 μl を各ウェルに添加した。マイクロタイタープレート を 50 で 20 分間インキュベートし、ウェルを洗浄した。検出用プライマーを溶出し、溶出された放射能を液体シンチレーション計数器（Rackbeta 1209, Wallac, フィンランド）で測定した。2つの並行なミニシーケンシング反応が各 PCR 産物に対して行われた。

30

40

【0078】

C/T_{.13910} 変異体に対する PCR プライマーおよび検出プライマー：

フォワード PCR プライマー：GTCACCTTTGATATGATGAGAGCA Tm 58 配列番号 8

検出プライマー：GGCAATACAGATAAGATAATGTAG Tm 58 配列番号 10

50

B i o - リバースプライマー : B i o - C C T C G T T A A T A C C C A C T G A C C T
A T m 6 2 配列番号 9

または B i o - T A G G T C A G T G G G T A T T A A C G A G G T 配列番号 7

G / A₋₂₂₀₁₈ 変異体に対する P C R プライマーおよび検出プライマー :

フォワード P C R プライマー : C T A C C C T A T C A G T A A A G G C C T A T m
5 8 配列番号 1 2

検出プライマー : A A A A C A G C A T T C T C A G C T G G G C T m 6 2 配列番
号 1 4

B i o - リバースプライマー : B i o - T G C T C A G G A C A T G C T G A T C A A
T m 6 2 配列番号 1 3

または B i o - T T G A T C A G C A T G T C C T G A G C A 配列番号 1 1

【 0 0 7 9 】

実施例 4 : 症例対照研究試料における D N A 変異体のモニタリング

ラクターゼ欠乏症の診断試験として二糖類分解酵素活性について解析された、合計 1 9
6 個の腸内生検標本から単離された D N A 試料において、C / T₋₁₃₉₁₀ および G / A<sub>-220
18</sub> 変異体の頻度を解析した。合計 5 9 個の試料が、原発性ラクターゼ欠乏症 (primary la
ctase deficiency) を示した。5 9 症例のうち 6 症例が (表 3)、G / A₋₂₂₀₁₈ 変異体
に対してヘテロ接合性 G A であり、残りの 5 3 症例が G 対立遺伝子にホモ接合性であった。
5 9 試料すべてが、変異体 C / T₋₁₃₉₁₀ の C 対立遺伝子にホモ接合性であった。ラクター
ゼ持続性を示す 1 3 7 症例の中で、7 4 症例は、対立遺伝子 T および A にホモ接合性である
ことが見出され、残り 6 3 症例は、ヘテロ接合性 C T および G A であり、C / T₋₁₃₉₁₀
および G / A₋₂₂₀₁₈ それぞれにおいて、対立遺伝子 C および G にホモ接合性である症例は
なかった (表 3)。

【 0 0 8 0 】

他の集団においてこれらの変異体を分析するために、確立された二糖類分解酵素欠損を
有する非フィンランド人の 4 0 症例 : 韓国人 2 3 症例、イタリア人 9 症例、ドイツ人 8 症
例から採取された腸内生検標本から単離した D N A 試料をシーケンスした。イタリア人 1
症例が G / A₋₂₂₀₁₈ にヘテロ接合性であったのに対して、残りの 3 9 症例はすべて、C /
T₋₁₃₉₁₀ および G / A₋₂₂₀₁₈ それぞれにホモ接合性 C C および G G であった (表 3)。拡
大された研究によって、6 種類の異なる人種の 4 0 0 個体において生化学的に検証された
ラクターゼ欠乏症 (ラクターゼ非持続性) と C / T₋₁₃₉₁₀ 変異体の完全な関連のデータを
表す、表 7 に提供されるデータが得られた。G / A₋₂₂₀₁₈ 変異体は、4 0 1 症例のうち 4
0 0 症例においてラクターゼ非持続性と関連した。

【 0 0 8 1 】

実施例 5 : ラクターゼ持続性変異体 C / T₋₁₃₉₁₀ の分子疫学

フィンランド人集団におけるラクターゼ欠乏症に関連する変異体の有病率に関してモニ
ターするために、固相ミニシーケンシング法^{19,20}を用いて、早くに移住したフィンラン
ド西領域または遅く移住したフィンランド東領域に端を発する匿名フィンランド人血液ド
ナー 9 3 8 名の D N A 試料をスクリーニングした (表 4)。実験的に、C / T₋₁₃₉₁₀ 変異
体にわたる D N A 断片を、1 つのオチン化 (5' - C C T C G T T A A T A C C C C T G
A C C T A - 3') プライマーおよび非ビオチン化 (5' - G T C A C T T T G A T A T
G A T G A G A G C A - 3') プライマーを用いて増幅した。G / A₋₂₂₀₁₈ には、ビオチ
ン化 (5' - A G T C T G T G G C A T G T G T C T T C A T G - 3') および 1 つの非
ビオチン化 (5' - T G C T C A G G A C A T G C T G A T C A A C T - 3') プライマ
ーを上掲の条件下で使用した。P C R 産物 1 0 μ l をストレプトアビジンコーティングの
マイクロタイターウェル (Lab systems社, フィンランド) 中に捕捉した。そのウェルを
洗浄し、結合した D N A を上述に記載のように^{19,20}変性させ、G / A₋₂₂₀₀₅ にはミニシ
ーケンシングプライマー (5' - G A C A A A G G T G T G A G C C A C C G - 3') 1
0 p m o l、G / A₋₁₃₉₁₅ にはミニシーケンシングプライマー (5' - G G C A A T A C
A G A T A A G A T A A T G T A G - 3') 1 0 p m o l、およびラクターゼ非持続性対

10

20

30

40

50

立遺伝子に対応する H - d C T P (1 1 5 C i / m m o l ; Amersham社, 英国) または
 ラクターゼ対立遺伝子に対応する H - d T T P のいずれか 0 . 1 μ l、および D N
 A ポリメラーゼ 0 . 0 5 U (Dynazyme II, Finnzymes社) を、そのバッファー中に含有す
 るミニシークエンシング反応混合物 5 0 μ l を各ウェルに添加した。マイクロタイプレ
 ートを 5 0 で 2 0 分間インキュベートし、ウェルを洗浄した。検出用プライマーを溶出
 し、溶出された放射能を液体シンチレーション計数器 (Rackbeta 1209, Wallac, フィンラ
 ンド) で測定した。2 つの並行なミニシークエンシング反応が各 P C R 産物に対して行われ
 た。推定されるラクターゼ欠乏症遺伝子型 C C -₁₃₉₁₀ の全体的な有病率 (1 7 0 症例) は
 1 8 . 1 % であり、東の試料よりも西の試料のほうが有病率が高かった (1 6 . 8 % 対
 して 1 8 . 9 %) (表 4)。これらの値は、フィンランド語を話すフィンランド人の間で
 1 7 % の有病率を報告する疫学的研究とよく一致しており、西から東へ勾配が高くなる。
 G / A -₂₂₀₁₈ 多型に関して、同じセットの試料の遺伝子型も判定し、これらの 2 つの S N
 P 間の L D を、D ' 統計量²¹を用いてモニターした。それらは、ほぼ完全に連鎖不平衡 (L D)
 にあることが見出された (D ' = 0 . 9 8、p = 7 . 6 2 \times 1 0⁻¹¹、表 5)。

【 0 0 8 2 】

異なる集団におけるラクターゼ欠乏症の有病率は、5 % 未満からほぼ 1 0 0 % と大きく
 異なることが知られている。ラクターゼ欠乏症有病率のこれらの変化が遺伝子型 C C -₁₃₉₁₀
 の分布と相関するのかどうかを決定するために、C E P H 家系²²の D N A を解析した。
 C E P H 家系は主に、フランスおよびユタ州から集められ、フランスからの家系は報告され
 たラクターゼ欠乏症有病率約 3 7 %²³を有し、北ヨーロッパ由来のユタ州の集団は 5 %
 未満²⁴のラクターゼ欠乏症有病率を有した。C E P H 家系において親を遺伝子型判定する
 ことによって、フランス人家系の 4 1 . 2 % (1 7 試料のうち 7) が遺伝子型 C C を有
 するのに対して、ユタ州家系の 7 . 6 % のみ (9 2 試料のうち 7) が遺伝子型 C C を有
 することが明らかとなった (表 4)。さらにまた、解析された試料が少数であるのにもか
 かわらず、これらの数値は、これらの集団^{23, 24}におけるラクターゼ欠乏症の疫学的研究
 で得られた値と一致する。観察された変異体の有病率が、記述されている乳糖不耐の集団
 での頻度とよく一致していることが、表 8 に示されている。

【 0 0 8 3 】

実施例 6 : ラクターゼ対立遺伝子変異体 C / T -₁₃₉₁₀ の系統学

フィンランド人家系におけるハプロタイプ解析から、フィンランドにおけるラクターゼ
 対立遺伝子のすべてではないが大部分が、ある共通の祖先に由来していることが示
 唆された。連鎖不平衡を利用して、対立遺伝子のフィンランド人集団²⁵への導入の
 時間を推定した。世代時間が 2 0 年であると仮定すると、この推定から、創始者の変異が
 フィンランド人集団におよそ 9 0 0 0 ~ 1 1 4 0 0 年前に導入されたことが示されるだろ
 う (表 6)。これは、およそ 8 0 0 0 ~ 9 0 0 0 年前²⁶にフィンランド本土に移住した初
 期の徴候とよく一致し、理にかなって、紀元前 8 0 0 0 ~ 1 0 . 0 0 0 年の酪農業の始ま
 りとかなり一致するだろう。さらに重要なことには、異なる集団における対立遺伝子
 中に同じ D N A 変異体が存在することから、この変異体はよりいっそう偶発的であり、
 かつその変異は、解析した集団の派生前に生じたことが示唆されるだろう。

【 0 0 8 4 】

ラクターゼ対立遺伝子の系統発生的起源を洞察するために、ヒビ (Papio Hamadryas)
 の M C M 6 遺伝子のイントロン 9 およびイントロン 1 3 の一部をシーケンスした。遺伝子
 型 G G および C C が、G / A -₂₂₀₁₈ および C / T -₁₃₉₁₀ の両方でヒビ D N A に存在した。
 このことから、対立遺伝子 G および C はそれぞれ、非対立型を表す、祖先対立遺伝子の出
 現を反映しており、変異によりこの対立遺伝子が形質転換され、対立遺伝子が生じ
 たことが示唆される。この仮定は、非対立型対立遺伝子で見出される対立遺伝子の高い多
 様性に対して、対立型対立遺伝子における L D および共有されるハプロタイプを同定する
 ことによって支持される。

【 0 0 8 5 】

実施例 7 : C / T および G / A 変異体の対をなす L D

C/T₋₁₃₉₁₀とG/A₋₂₂₀₁₈との間の対のLDを、D'統計量²¹を用いて推定した。D'は、最大値(D/D_{max}、D/D_{min})として計算される：不平衡測定法D = h_{pq} - pq (式中、h_{pq}は、各遺伝子座に稀な対立遺伝子を有するハプロタイプの頻度であり、pおよびqは、遺伝子座1および2における稀な対立遺伝子の頻度である)、D_{max} = min p(1-p)、q(1-q) (D > 0の場合)、およびD_{min} = -min pq, (1-p)(1-q) (D < 0の場合)。自由度(1 df)で²として分布する統計量：
【数1】

$$D^2 \sqrt{\frac{N}{p(1-p)q(1-q)}} \quad 10$$

を用いて、0からのD'の偏差fの有意性を決定した²¹。

【0086】

遺伝子受入番号：BACでは、NH0218L22、N0034L34、NH0318L13およびRP11-329I10はそれぞれ、AC012551、AC011893、AC011999およびC016516である。ヒト多型の受入番号はGenBank AF395607~AF395615である。

【0087】

参考文献

1. フラッツ (Flatz), G. & ロツソウエ (Rotthauwe), H. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. Prog. Med. Genet. 2, 205-249 (1977).

2. サヒ (Sahi), T., イソコスキー (Isokoski), M., ジュッシラ (Jussila), J. & ラウニアラ (Launiala), K. Lactose malabsorption in Finnish children of school age. Acta Paediatr Scand.61, 11-16 (1972).

3. ワン (Wang), Y. ら. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. Gastroenterology. 114:1230-1236 (1998).

4. サヒ (Sahi), T., イソコスキー (Isokoski), M., ジュッシラ (Jussila), J. & ラウニアラ (Launiala), K. & ピョーララ (Pyyrala), K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. Lancet.823-826 (1973).

5. サヒ (Sahi), T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. Scand. J. Gastroenterol. suppl. 30, 1-73(1974).

6. サヒ (Sahi), T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. Scand. J. Gastroenterol. Suppl.202, 7-20 (1994).

7. ボール (Boll), W., ワーグナー (Wagner), P. & マンテイ (Mantei), N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in human with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. Am. J. Hum. Genet. 48, 889-902 (1991).

8. マンテイ (Mantei), N. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. EMBO J. 7, 2705-2713 (1988).

9. ワン (Wang), Y. ら. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. Hum. Mol. Genet.4, 657-662 (1995).

10. ハーベイ (Harvey), C.B., Pratt, W.S., Islam, I., Whitehouse, D.B. & Swallow, D.M. DNA polymorphisms in the lactase gene: linkage disequilibrium across the 70 kb region. Eur J. Hum. Genet. 3, 27-41 (1995).

11. エッシャー (Escher), J.C. ら. Molecular basis of lactase levels in adult humans. J. Clin. Invest. 89, 480-483 (1992).

- 12 . ロイド (Lloyd) , M. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. *J. Clin. Invest.* 89, 524-529 (1992).
- 13 . ファハルド (Fajardo) , O., ナイム (Naim) , H.Y. & Lacey, S.W. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 106, 1233-
- 14 . ルイージ (Luigi) , M. Mosaic regulation of lactase in human adult-type *Gastroenterology* 112, 1506-1514 (1997).
- 15 . ロッシ (Rossi) , M. Lactase persistence versus decline in human adults: Multifactorial events are involved in down-regulation after weaning. *Gastroenterology* 112, 1506-1514 (1997). 10
- 16 . ゴーリング (Goring) , H.H.H. & ターウィルガー (Terwilliger) , J.D. Linkage analysis in the presence of errors IV: Joint pseudomarker analysis of linkage and / or linkage disequilibrium on a mixture of pedigrees and singletons when mode of inheritance cannot be accurately specified. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1310-1327 (2000).
- 17 . ターウィルガー (Terwilliger) , J.D. & ゴーリング (Goring) , H.H.H. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: Statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum. Biol.* 72, 63-132 (2000).
- 18 . ハーベイ (Harvey) , C.B. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase, LCT, to chromosome 2q21. *Ann. Hum. Genet.* 57, 179-185 (1993). 20
- 19 . サイバネン (Syvanen) , A-C., サジャンティラ (Sajantila) A., ルッカ (Lukka) , M. Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 46-59 (1993).
- 20 . サイバネン (Syvanen) , A-C. & ランデグレン (Landegren) , U. Detection of point mutations by solid-phase methods. *Hum. Mutat.* 3, 172-179 (1994)
- 21 . トンプソン (Thompson) , E. A., ディーブ (Deeb) , S., ウォーカー (Walker) , D. & モトルスキー (Motulsky) , A. G. The detection of Linkage disequilibrium between closely linked markers: RFLPs at the AI-CIII Apolipoprotein genes. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 113-124 (1998).
- 22 . ドーセ (Dausset) , J. Centre d'étude du polymorphisme humain (CEPH): Collaborative genetic mapping of human genome. *Genomics* 6, 575-577 (1990). 30
- 23 . カッデネク (Cuddebecq) , Y., デルブルック (Delbruck) , H. & フラッツ (Flatz) , G. Distribution of the adult lactase phenotypes- lactose absorber and malabsorber- in a group of 131 army recruit *Gastroenterol.Clin. Biol.* 6, 776-779 (1982)
- 24 . マクレラン (McLellan) , T., ジョーデン (Jorde) , L.B. & スコルニック (Skolnick) , M.H. Genetic distance between the Utah Mormons and related populations. *Am. J. Hum. Genet.* 36, 836-857 (1984).
- 25 . ターウィルガー (Terwilliger) , J.D. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 777-787 (1995). 40
- 26 . ヌニェス (Nunez) , M.G. A model of the early settlement of Finland. *Fennoscandia archaeologica* IV, 3-18 (1997).
- 27 . シムーンズ (Simoons) , F.J. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biological and cultural interrelations. II. A cultural historical hypothesis. *Am. J. Dig. Dis.* 16, 695-710 (1970).
- 28 . バリーロ (Varilo) , T. The age of human mutation: genealogical and linkage disequilibrium analysis of the CLN5 mutation in the Finnish population. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 506-512 (1996).
- 29 . ハストバック (Hastbacka) , J. Linkage disequilibrium mapping in isolate 50

- d founder populations: diastrophic dysplasia in Finland. *Nature Genet.* 2: 204-211 (1992).
- 30 .ハーベイ (Harvey) C.B.ら. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with the lactase persistence/non persistence polymorphism. *Ann Hum Genet* 62, 215-223 (1998).
- 31 .オータニ (Ohtani), K.ら. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18, 2299-2309 (1999).
- 32 .スミス (Smith), A.F.A. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 743-748 (1996). 10
- 33 .カザジアン (Kazazian), H.H. & モーラン (Moran), J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature Genet.* 19, 19-24 (1998).
- 34 .モーラン (Moran), J.V., デベラルディニス (DeBerardinis), R.J. & カザジアン (Kazazian), H.H. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283, 1530-1534 (1999).
- 35 .ウェイ (Wei), W.ら. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1429-1439 (2001).
- 36 .ドネリー (Donnelly), S.R., ホーキンス (Hawkins), T.E. & モス (Moss), S.E. A conserved nuclear element with a role in mammalian gene regulation. *Hum. Mol. Genet.* vol.8, 9, 1723-1728 (1999). 20
- 37 .ボーケ (Boeke), J.D. LINEs and Alus - the polyA connection. *Nature Genet.* 16, 6-7 (1997).
- 38 .ジャーカ (Jurka), J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1872-1877 (1997).
- 39 .サビラティ (Savilahti) E, ラウニアラ (Launiala) K, キートネン (Kuitunen) P. Congenital lactase deficiency. *Arch. Dis. Child.* 58, 246-252 (1983).
- 40 .ジャーベラ (Jarvela), I.ら. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1078-1085 (1998). 30
- 41 .シムーンズ (Simoons), F. J. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. A weighing of the evidence. *Am. J. Dig. Dis.* 23, 963-980 (1978).
- 42 .フラッツ (Flatz), G. & ロツソウエ (Rotthauwe), H. W. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog. Med. Genet.* 2, 205-249 (1977).
- 43 .マクラッケン (McCracken), R.D. Lactase deficiency: an example of dietary evolution. *Curr. Anthropol.* 12, 479-517 (1971).
- 44 .アローラ (Arola), H.ら. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 202, 26-35 (1994).
- 45 .サルカネン (Sulkanen), S.ら. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115 (6), 1322-1328 (1998). 40
- 46 .サンプルック (Sambrook), J., フリツチェ (Fritsch), E.F. & マニアティス (Maniatis), T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- 47 .メッサー (Messer), M. & ダルクヴィスト (Dahlqvist), A. A one - step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 14 (3), 376-92 (1966).
- 48 .コッティングハム (Cottingham), Jr. R.W., イダリー (Idury), R.M. & シェーファー (Schaffer), A.A. Faster sequential genetic linkage computations. *Am. J.* 50

. Hum.. Genet. 53, 252-263 (1993).

49 . ゴーリング (Goring) , H.H.H. & ターウィルガー (Terwilliger) , J.D. Linkage analysis in the presence of errors III: Marker loci and their map as nuisance parameters. Am. J. Hum. Genet. 66,1298-1309 (2000).

50 . ターウィルガー (Terwilliger) , J.D. & オット (Ott) , J. Hand book of human genetic analysis. Johns Hopkins University Press, Baltimore (1994).

51 . オズボーン (Osborne) ら, Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 5-9

52 . ストール (Stall) およびゾッカ (Szoka) , Pharm. Res. 12 (1995), 465-483

53 . ハーロー (Harlow) およびレーン (Lane) "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988

54 . ヒギンス (Higgins) およびヘイムズ (Hames) (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985

55 . ディブ (Dib C, フォール (Faure) S, フィザムズ (Fizames) C, サムソン (Samson) D, ドルオー (Drouot) N, ビニャル (Vignal) A, ミラシュウー (Millasseau) P, マルク (Marc) S, ハザン (Hazan) J, セボーン (Seboun) E, ラスロップ (Lathrop) M, ギャペイ (Gyapay) G, モリセツト (Morissette) J, ワイセンベック (Weissenbach) J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature. 1996 Mar 14;380(6570):152-4.

56 . チューマコフ (Chumakov) IM, リガウルト (Rigault) P, レ・ゴール (Le Gall) I, ベラーネ (Bellanne) -シャンテロット (Chantelot) C, ビラウルト (Billault) A, ギユー (Guillou) S, ソウラリュウ (Soularue) P, グアスコニ (Guasconi) G, ポウリアー (Poullier) E, グロス (Gros) I, ら. A YAC contig map of the human genome. Nature. 1995 Sep 28;377(6547 Suppl):175-297

【 0 0 8 8 】

10

20

【表 1】

表 1. 成人型ラクターゼ欠乏症家系における連鎖および連鎖不平衡解析
(微細マッピングマーカを太字で示す)

マーカー	Θでのロッドスコア (Z)					p値 ^a	
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4		
D2S114	-∞	2.44	1.92	1.13	0.41	0.87195	10
P6112	2.76	2.20	1.45	0.75	0.22	0.66207	
D2S1334	3.15	2.45	1.61	0.84	0.25	0.91039	20
AC8	2.26	1.99	1.36	0.71	0.21	0.53670	
LPH13	3.67	2.94	1.96	1.03	0.31	4x10 ⁻⁶	
LPH2	4.09	3.07	2.00	1.00	0.26	5.7x10 ⁻⁷	
LPH1	5.91	4.52	2.96	1.53	0.46	5x10 ⁻⁶	
AC7	3.63	2.60	1.66	0.83	0.23	0.03471	
AC3	6.63	4.88	3.16	1.61	0.44	3.2x10 ⁻⁸	
AC4	3.07	2.22	1.42	0.71	0.19	4x10 ⁻⁵	
AC5	5.33	4.10	2.72	1.39	0.39	0.02166	
AC10	6.60	4.99	3.25	1.65	0.46	1x10 ⁻⁵	
D2S2196	7.67	5.62	3.62	1.85	0.54	0.00010	30
D2S442	3.81	3.08	2.08	1.03	0.27	0.22805	
D2S314	4.22	3.61	2.50	1.37	0.45	0.27535	
D2S2385	-∞	2.79	1.92	1.01	0.28	0.46457	

a: 連鎖を仮定して連鎖不平衡試験を用いて得られたp値^{16,49}

【 0 0 8 9 】

【表 2】

表2. フィンランド人家系における成人型ラクターゼ欠乏症遺伝子座内で
同定された変異

位置 ^a	変異体	ラクターゼ存続性 (ホモ接合)		ラクターゼ存続性 (ヘテロ接合)		ラクターゼ非存続性			
		BIV4	AIV3	BIV8	CIV3	BIV9	DIV4	EIII2 ^b	
-694	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N ^c	AA	10
-1640/50	T ₁₅ →T ₁₂	T _{13/13}	T _{13/13}	T _{13/13}	T _{13/13}	T _{13/13}	T _{12/12}	T _{12/12}	
-2131	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CT*	TT	
-3058/72	T ₁₅ →T ₁₆	T _{15/15}	T _{15/15}	T _{15/15}	T _{15/15}	T _{15/15}	T _{16/16}	T _{16/16}	
-3075	G→T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	
-4480	T→A	TT	TT	TA	TT	AA	TT	TT	20
-5440	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CC	CC	
-5926	A→T	AA	AA	AA	AA	AA	TA	TT	
-8540	G→A	GG	GG	GA	GA	AA	AG	AA	
-8630	C→G	CC	CC	CG	CG	GG	GC	GG	
-13495	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC	
-13910	T→C	TT	TT	TC	TC	CC	CC	CC	30
-15239	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	AG	AA	
-15862	T→C	CC	CC	CT	CC	TT	TC	TT	
-16568/79	T ₁₁ →T ₁₂	T _{11/11}	T _{11/11}	T _{11/12}	T _{11/11}	T _{12/12}	T _{11/11}	T _{12/12}	
-16888	A→G	AA	AA	GA	AA	GG	GA	GG	
-17300	C→T	CC	CC	CC	CC	CC	CT	TT	40

-19044	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC	
-19519	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	TT	TT	
-20077	C→G	CC	CC	CG	CC	GG	GC	GG	
-20486	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	GG	GG	
-21721/28	A ₇ →A ₆	A _{7/7}	A _{7/7}	A _{7/7}	A _{7/7}	A _{7/7}	A _{7/A6}	A _{7/7}	
-21731	A→C	AA	AA	AA	AA	AA	CC	AA	10
-21736/43	A ₉ →A ₈	A _{9/9}	A _{9/9}	A _{9/A8}	A _{9/9}	A _{8/8}	A _{8/8}	A _{8/8}	
-22018	G→A	AA	AA	AG	AG	GG	GG	GG	
-22741	C→T	CC	CC	CC	CC	CC	N	TT	
-22788	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N	GG	
-23069	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	N	GG	
-23442	A→G	AA	AA	AA	AA	AA	N	GG	20
-23771	T→C	TT	TT	TT	TT	TT	N	CC	
-25093/23	Δ30 bp	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	Δ Δ	N	II	
-27310	A→/G	AA	AA	AG	AA	GG	GA	GG	
-27480	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	AG	AA	
-27807	A→C	AA	AA	AA	AA	AA	AC	CC	
-30183	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	AA	AA	30
-31268	A→G	AA	AA	AG	AA	GG	AA	AA	
-31342	T→C	TT	TT	TT	TT	TT	CT	CC	
-33645	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	CC	CC	
-35176	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC	
-36254	C→T	CC	CC	CT	CC	TT	TC	TT	40

-36296	G→T	TT	TT	TG	TT	GG	TG	N	
-36501	A→T	AA	AA	AT	AA	TT	AT	N	
-36506/14	Δ 9 bp	ΔΔ	ΔΔ	ΔI	ΔΔ	II	ΔI	N	
-36671/77	T7→T6	T ₇₇	T ₇₇	T _{7/6}	T ₇₇	T _{6/6}	T ₇₇	T ₇₇	
-37565	T→G	TT	TT	TG	TT	GG	GG	TG	
-38276	G→C	GG	GG	GC	GG	CC	GG	GG	10
-39036	G→C	GG	N	GC	N	CC	N	N	
-40608	G→C	GG	GG	GG	GG	GG	GC	CC	
-41590	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	CT	CC	
-42081/82	ΔAG	AG	AG	AG/Δ	AG	ΔΔ	AG	AG	
-42618	T→C	TT	TT	TC	TT	CC	TT	TT	20
-42893	G→A	GG	GG	GA	GG	AA	GG	GG	

a : BAC、NH0218L22、N0034L34、NH0318L13およびRP11-329110の対応するゲノム配列を用いた、LPH遺伝子の翻訳開始コドン (ATG)からの数字である。b : 研究され、図1において矢印で示されるフィンランド人家系からシーケンスされた個体。
c : 決定されていない。

【 0 0 9 0 】

表3. ラクターゼ持続性／非持続性対立遺伝子におけるC／T₋₁₃₉₁₀ およびG／A₋₂₂₀₁₈ 遺伝子型の分布

	C/T ₋₁₃₉₁₀			G/A ₋₂₂₀₁₈			合計
	CC	CT	TT	GG	GA	AA	
家族のメンバー							
ラクターゼ非持続性	45	0	0	45	0	0	45
ラクターゼ持続性	0	32	13	0	32	13	45
症例対照試料 フィンランド人							
ラクターゼ非持続性	59	0	0	53	6	0	59
ラクターゼ持続性	0	63	74	0	63	74	137
非フィンランド人 ^a							
ラクターゼ非持続性	40	0	0	39	1	0	40
ラクターゼ持続性	0	5	0	0	5	0	5
合計							
ラクターゼ非持続性						0	144
ラクターゼ持続性							187

a : 非フィンランド人試料は、韓国人23個体、イタリア人9個体、ドイツ人8個体からなる。

【表4】

表4. 集団試料におけるC/T -13910 の有病率

DNA試料	遺伝子型			合計	対立遺伝子 頻度 (%)		(CC) 遺伝子型%	
	CC	CT	TT		C	T		
I. フィンランド人集団 :								
1. 東領域	108	287	176	571	0.440	0.560	18.9%	10
2. 西領域	62	159	146	367	0.385	0.615	16.8%	
合計	170	446	322	938	0.418	0.582	18.1%	
II. CEPHの親 :								
1. ユタ州家系	7	33	52	92	0.255	0.745	7.6%	
2. フランス人家系	7	9	1	17	0.676	0.324	41.2%	20

フィンランド内の東および西領域に由来する匿名フィンランド人血液ドナー合計938名のDNA試料、およびCEPHの親から109個のDNA試料。集団におけるラクターゼ欠乏症の有病率は、CC対立遺伝子の遺伝子型頻度によって反映されている。

【0092】

表 5. ランダムなフィンランド人試料における C/T-13910 および G/A-220018 変異体間の LD

	C/T-13910 での遺伝子型			合計	D'	χ^2 (1 df)	P 値
	CC	CT	TT				
G/A-220018 での遺伝子型							
GG	162	2	1	165			
GA	6	440	3	449			
AA	2	4	318	324			
合計	170	446	322	938	0.984	42.41	7.62×10^{-11}

LDはD'統計量¹⁸を用いて計算された。p値は、方法¹⁸に記載のように0からのD'の有意性である。

【表6】

表6. DISLAMBプログラムを用いた、フィンランド人集団へのC/T-13910の導入の推定。

マーカー	AC3		LPH2			
	対立遺伝子 非存続性	ラクターゼ 存続性	ラクターゼ 非存続性	ラクターゼ 存続性		ラクターゼ 非存続性
1		0	1	0	1	10
2		31	10	0	20	
3		0	1	0	14	
4		2	9	32	15	
5		0	31	0	2	
λ^a		0.838		0.999		
Θ^b		0.00031 (0,000038-0.00099)		0.0000(0.00000-0.00052)		20
n^c		570		450		

a: λ は、その集団の頻度(0.60)に対する、疾患染色体における特定の対立遺伝子(ラクターゼ存続性対立遺伝子)の増加の割合である。b: Θ は、組換え率であり、 $1\text{cM}=1\text{Mb}$ と仮定し、最も近いマーカーからの変異の距離によって示される。c: n は、集団への創始者の変異の導入以来の世代数であり、 $\lambda = \alpha(1-\Theta)^n$ の式が当てはまる。d: Θ として計算に用いられる仮定の対立遺伝子はゼロであり、 α は1である。

30

【0094】

表7 生化学的に検証された試料における乳糖不体耐症の有病率

集団(人種)	数	C/T ₁₃₉₁₀					G/A ₂₂₀₁₈		
		CC	CT	TT	GG	GA	AA		
1. フィンランド人									
ラクターゼ持続性	182	0	95	87	0	95	87		
ラクターゼ非持続性	116	116	0	0	110	6	0		
2. イタリア人									
ラクターゼ持続性	7	0	7	0	0	7	0		
ラクターゼ非持続性	23	23	0	0	22	1	0		
3. ドイツ人									
ラクターゼ持続性	0	0	0	0	0	0	0		
ラクターゼ非持続性	8	8	0	0	8	0	0		
4. ソマリア人									
ラクターゼ持続性	0	0	0	0	0	0	0		
ラクターゼ非持続性	42	42	0	0	42	0	0		
6. 韓国人									
ラクターゼ持続性	0	0	0	0	0	0	0		
ラクターゼ非持続性	23	23	0	0	23	0	0		
合計	401	212	102	87	205	109	87		

【表 8】

表8 様々な集団の試料における乳糖不耐症の有病率

集団	数	遺伝子型						ラクターゼ存続 性対立遺伝子の 有病率%	
		C/T13910			G/A22018				
		CC	CT	TT	GG	GA	AA		
韓国人	23	23	0	0	23	0	0	0	*
フランス人	17	7	9	1	6	10	1	59	*
バスク人	85	7	44	34	13	35	37	92	*
南イタリア人	100	89	11	0	88	12	0	11	*
ソマリア人	79	74	5	0	78	1	0	6	10
ユタ州	92	7	33	52	7	30	55	92	*
アフリカ系アメリカ人	96	76	15	5	78	12	5	21	*
モロッコ人	90	62	25	3	65	22	3	31	*
サラウィー人(アフリカ)	57	29	26	2	28	26	3	49	*
サーミ人	30	20	10	0	21	9	0	33	*
チベット人	23	23	0	0	23	0	0	0	
東フィンランド人	571	108	287	176	107	288	176	81	*
西フィンランド人	367	62	159	146	58	161	148	83	*
フィン-ウゴル語族									
Xan	20	19	1	0	19	1	0	5	
Xm	20	19	1	0	19	1	0	5	
マンシ族	22	20	2	0	20	2	0	9	
コミ人	10	7	3	0	7	3	0	30	20
Erza	30	17	10	3	19	9	2	43	
Moksa	30	13	17	0	14	16	0	57	*
Udmort	30	12	16	2	11	15	4	60	*
パキスタン部族									
カラーシュ族	30	30	0	0	28	2	0	0	
ブルーショール族	30	29	1	0	27	3	0	3	
ハザラ族	14	13	1	0	11	3	0	7	
カシミール人	20	15	5	0	14	6	0	25	
マクラーニーバルーチ族	29	19	10	0	19	8	1	34	
ブラーフイー族	30	17	10	3	16	11	3	43	
マクラーニー族(黒色人種)	29	16	10	3	16	10	3	45	30
パターン族	29	12	16	1	13	14	2	59	*
インド人	29	11	13	5	10	12	5	62	*
合計	2032								

*ラクターゼ存続性対立遺伝子の有病率は、報告されているラクターゼ存続性対立遺伝子の有病率 (シムーンズ (Simoons), F. J. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. A weighing of the evidence. Am. J. Dig. Dis. 23, 963-980 (1978)) と非常によく相関している。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】研究されたフィンランド人成人型ラクターゼ欠乏症家系。黒い印は、ラクターゼ欠乏 (hypolactasic) の個体を示し、アスタリスク (*) は、試料が入手できなかったことを示し、疑問符 (?) は未知の疾患状態を示す。は、SNPを同定するためのシーケンシングに用いられる個体を示す (表2)。

【図2】成人型ラクターゼ欠乏症遺伝子座の物理地図。BACクローンは、水平な線の上に表示されている。3つの遺伝子、LPH、MCM6およびDARSは、ブラックボックスより上にある、遺伝子の3'末端に対して向けられる先端を有する太い黒色の矢印によって示される。遺伝子座の微細なマッピングに使用される10個の多型マイクロサテライトマーカーの位置が示されている。水平な線にあるバックスラッシュは、コンティグ配列の配列におけるギャップを示す。マーカーD2S2169の位置は、上述されているように⁴⁰、PACライブラリーから単離されたPAC106020でギャップを埋めることによ

って確認された。LPHの最初のATGの13.9 kbおよび22 kb 5'に位置するイントロン9および13におけるラクターゼ持続性表現型関連変異体の位置を含む、MCM6遺伝子の構成が示される。

【図3】密に連鎖する7個のマイクロサテライトマーカーを用いた、フィンランド人の成人型ラクターゼ欠乏症家系に由来する持続性染色体の拡大されたハプロタイプ解析。祖先創始者の染色体を表すハプロタイプに陰影がつけられている。持続性染色体にも存在した非持続性染色体のハプロタイプのみが示されている。祖先の組み合わせに基づいて、成人型ラクターゼ欠乏症の遺伝子座は、マーカーLPH1およびAC3の間の47 kb区間に限定することができる。

【図4】ラクターゼ持続性に特異的である、その中のTがCによって置換される、-13910位にSNPを含むMCM6遺伝子のイントロン13の配列に含まれる配列(3220 bp)。前記位置は、小文字で示されている。この配列は配列番号1を指す。

10

【図5】ラクターゼ持続型配列に特異的である、その中のAがGによって置換される、-22018位にSNPを含むMCM6遺伝子のイントロン9の配列に含まれる配列(1295 bp)。前記位置は、小文字で示されている。この配列は配列番号2を指す。

【図6-1】-13910位にTを含む、MCM6遺伝子のラクターゼ持続型イントロン13の配列(3220 bp)。前記位置は、小文字で示されている。この配列は配列番号3を指す。

【図6-2】-13910位にTを含む、MCM6遺伝子のラクターゼ持続型イントロン13の配列(3220 bp)。前記位置は、小文字で示されている。この配列は配列番号3を指す。

20

【図7】-22018位にAを含む、MCM6遺伝子のラクターゼ持続型イントロン9の配列(1295 bp)。前記位置は、小文字で示される。この配列は配列番号4を指す。

【図8-1】ラクターゼ持続型配列に特異的である、その中のTがCによって置換される、-13910位にSNPを含むMCM6遺伝子のイントロン13の配列(3220 bp)。前記位置は、小文字で示される。この配列は配列番号5を指す。

【図8-2】ラクターゼ持続型配列に特異的である、その中のTがCによって置換される、-13910位にSNPを含むMCM6遺伝子のイントロン13の配列(3220 bp)。前記位置は、小文字で示される。この配列は配列番号5を指す。

【図9】ラクターゼ持続型配列に特異的である、その中のAがGによって置換される、-22018位にSNPを含むMCM6遺伝子のイントロン9の配列(1295 bp)。前記位置は、小文字で示される。この配列は配列番号6を指す。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Public Health Institute
 PELTONEN, Leena
 ENATTAH, Nabil
 JÄRVELÄ, Irma
 SAHI, Timo
 SAVILAHTI, Erkki
 TERWILLIGER, Joseph

<120> Identification of a DNA variant associated with adult type hypolactasia

<130> F 2034 PCT

<150> EP 01 11 9377.8
 <151> 2001-08-10 10

<150> EP 01 11 9528.6
 <151> 2001-08-14

<150> US 60/315,955
 <151> 2001-08-31

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens 20

<400> 1
 acctttcatt caggaaaaat gtacttagac cotacaatgt actagtaggc ctctgcgctg 60
 gcaatacaga taagataatg tagccoctgg cctcaaagga actctcctcc ttaggttgca 120
 tttgtataat gtttgathtt tagattgttc ttgagccct gcattccacg aggataggtc 180

<210> 2
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2 30
 taagaacatt ttacactctt cagtataaag aagtcagaat acccctacco tatcagtaaa 60
 ggocataaag ttaccattaa aaagatgtcc ttaaaaaagc cattctcagc tgggcgcggt 120
 ggctcacacc tttgtcccag tactttggga agccgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag 180

<210> 3
 <211> 3213
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3

atcagagtca ctttgatatg atgagagcag agataaacag atttggtgca tgtttttaat 60
 ctttgggatg ggacatacta gaattcaactg caaatacatt tttatgtaac tgttgaatgc 120
 tcatacgacc atggaattct toccctttaa gagcttggtg agcatttgag tgtagtgttt 180
 agacggagac galcacgtca tagtttatag agtgcataaa gacgtaagtt accatttaat 240
 acccttcatt caggaaaaat gtacttagac cctacaatgt actagtaggc ctctgcgctg 300
 gcaatacaga taagataatg tagtccctgg cctcaaagga actctcctcc ttaggttgca 360
 ttgtataat gtttgatttt tagattgttc tttgagccct gcattccacg aggataggtc 420
 agtgggtatt aacgaggtaa aaggggagta gtaogaaagg gcattcaagc gtcccatcct 480
 cgcttcaacc aaagcagccc tgcgttttcc tagttttatt aataggtttg atgtaaggtc 540
 gtctttgaaa aggggggttg gctttttttt acagtgtgac tgaggataaa tttataaaaa 600
 gggaaatgta tggcatggtg agtttttcoa catacatcct tgtgaatacc cagctcaaga 660
 tccaaaacat ttccataatt tcagaaagtt ccaaacccct gcctcttttc agtcttagcc 720
 ctcttccct gaagtaacca ctgttccgac ttcaatcact acttttatcc cacaggttaa 780
 ttttttggct tttttccact aaattttcaa attctttgat atggtaacttt actattgacg 840
 aagtactttc acaactagggtt atttaatat ttttgattca cccaatattt agggaacacc 900
 tgtaggggac aaaaaatgaa tgagagcccc tgccttccat tgcctgtaat ctgggtgggaa 960
 cgagacatgt atttaattaa gcatgtaaaa aatagagtgg gtgatgaaat aatctatata 1020
 ctaaatcccc atgacacaca gtttacctat gtaacaaacc tgcattgtgta ccccgaaacc 1080
 taaaatataa gttggaatt aaaaaaaaaac gagagggaga atagagcacc acaaccagag 1140
 tgcctgagatg aattacttta ttaccaaaga aggaggagga ctacgggagg tgcgacggtt 1200
 taaaccocagt cactgaaggg tgtgcagaat ttggataggc aagataccct gggacaaggt 1260
 cattctaaaa ccatgctaac atttgtactt ttttttcat tgtgatagtt cctgaaatga 1320
 gttgcataaa actggtaoat gtcttagggc agtctcta tgaattttat tttgttctat 1380
 ttttaaaaat tagtctcoa atagcagatt cacatgatat taaaatataat gcacataaat 1440
 tataacaca aatataat tctgaatgaaa tttagtatct gcatatattt aagagctatt 1500
 tctgtctcat atgttcataa tcttcatcca ttaaaaaaac tttgttagg cctttctcac 1560
 tctaagatta taaaaaatc tcccattatt tacctagcta gttttotagt tgttccaaaa 1620
 ccatttattg aacaatcoat ctttttgaca ctggtttggc atgcotlaat tatatattct 1680
 tgtgtgtgtt aggatctcct tttgacttt ccattctggt cattgagtct taccagctcc 1740
 tcttacattg gtaccatgat gttttaatct atggggcttt gtagtttaaa ttaggggcta 1800

10

20

30

gttcagcgc attgttctct atcagotggt aggaacttag aaatcagctt gctctgtttt	1860	
aaagaaaaac ctggatattt tttatcagta taacattcta tttatattaa cttgaagaat	1920	
tgaaaacatc taigattttt cctattcagt aacgtatcac ttagaatagg ttaggttgta	1980	
ctaataaaa atctcagctg cataaaacaa ttttttttg cttgtgctac acatccatta	2040	
ggcatcaag ggactcaoct tgtcaagtta ctacagagatt caggctgata taaaggtttg	2100	
atcttgacat acgctttcat gatgacagaa agcaggggaag agaaggtggt gagccatgtg	2160	
ctttctcccc cttctatcca gaaatgacac atactcacat ttcattcgcc agagaaatta	2220	
acatggcccc tcctaagttc aaatggatag agaaatgcct tcctaccagg tgcccagaat	2280	10
tagaagagca aacattttgtg aacagttctg agtaccacaa atacogttat ctttccactt	2340	
aagtcttctg tttcaactcag tagtgcttta aacttttctt catatgtttt tcagtgtttc	2400	
ttgttgaatt tcttgatatt ttatcatggt tgttctgact gggagtagcc ttttttcca	2460	
tttcattttc tggctgggtt cattgctggt tgttttttg ttttgtttg tttttgagat	2520	
ggagtctcac tctgtcggcc aggctggagt gcagtgtcac aatctgggt cactgcaacc	2580	
tctgcctccc aggttcaagc gattcttctt tctcagcctc ctgagtagct gggattacag	2640	
gcatgtgcca ccattgccag ctaatttttt atatttttag tagagatggg gtttctccat	2700	
gttggtcagg ctggctcaca actcccaatc tcaggtgatc cgcctgcctc tgccctccaa	2760	20
agtgtcggga ttatagacat gagccaccgt gcctggccta gttcttatgg gatgtatatg	2820	
tctttggatt catatgatat gtatatatgt ttatatttct acaagtacat acctaggagt	2880	
ggaattggtt ggtcataggt taatgcatgt tttctgcca aacagttgtg tcaatttctg	2940	
ttttcaocgc tgtgaatgag agttgttcta ccttcttgac aacacttgat attgtcagtc	3000	
attttagcca ttctggtgaa tttatagtgc tatttctgtg tgtgtaagag agagaatgag	3060	
agaggggtgt tgtgagaaaa ccaaagcaac actgtgagag tgtgtgtgtt tgtgagaaaa	3120	
ccaaaaataca tactactgtg atttcattgg gagaaaatct gtttggata tcaaaaaaag	3180	
tagcttaatt acttcatcat tattggttta ggt	3213	30

<210> 4
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 taagaacatt ttacactctt cagtataaag aagtcagaat acccctacc tatcagtaaa 60
 ggccataaag ttaccattaa aaagatgtcc ttaaaaacag cattctcagc tgggcacggt 120

ggctcacacc ttgtcccag tactttggga agccgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag 180
 gagttcgaga ccagcctggc caacatggcg aaaacccatt ttcttacta aaaatacaaa 240
 aattagccgg gcatgggtggc ggggtgctgt ggtcccagct actcaagagg ctgaggtggg 300
 aggatcactg agcccaggag gtggaggctg cattgagcca agattgtgcc actgcactcc 360
 agcctgggtg acagagcgag actctgtctc aaaaaaacca aaacaaaaaa aaccagcat 420
 tctttagtaa ataattcata gttttcttca tctagaattt aaaattgtga tagttgatca 480
 gcatgtcctg agcacgtgtg ttgtctgta ctgagttaga tcggtagatg tgtatataag 540
 ttataggtat aaaatcaatc ctgagttgac acaaggtttt gatgttgagt acaagtacag 600
 taagtgtata tttttagtta tgctcttagt ttttaagtcaa ttgtgtggtt ctttctagct 660
 ttaggatctg ttgaattatc ttccttagaa aagggagtta agaattctca cttacctatc 720
 ttctacttgt ttggagaata gaagagtccc tgtggtagca gactttgtga gtttacttgt 780
 aattttccat ctgaaagact gttctgttlt ttctgtatga agtcttctc tgtcgcaccg 840
 gctggagtgc agtgggtgcaa ccttggctca ctgcaacctc tgcctcccg gttcaagcaa 900
 ttctcctgcc tcagcctccc gagtatctgg gattacaggt gcacaccacc acacctggct 960
 aatttttgta ttttcagtag agacggggtt tcaccatggt ggccaggctg gtctcgaact 1020
 cttgaectca tgatcagccc acctcagcct tccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc 1080
 cccacactcg gccgttgttg ttttttaaga gacaggtct cactctgtca cctaacctgg 1140
 agtacagtgg caatcatggc tcaactgtaac ctcaaagcc cggccttagt gaagcgttct 1200
 tcctgccttg gcctcccaaa gtgtctgggat tacaagtgtg agccatgcat ccagcttgaa 1260
 agacagcttc ttaggcttga ttgtttggt tacagg 1296

10

<210> 5
 <211> 3213
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 5
 atcagagtca ctttgataig atgagagcag agataaacag atttgttgca tgtttttaat 60
 ctttggatg ggacatacta gaattcactg caaatacatt tttatgtaac tgttgaatgc 120
 tcatacgacc atggaattct tccctttaa gagcttggtg agcatttgag tgtagttggt 180
 agacggagac gatcacgtca tagtttatag agtgcataaa gacgtaagtt accatttaat 240
 acctttcatt caggaaaaat gtacttagac cctacaatgt actagtaggc ctctgcgctg 300
 gcaatacaga taagataatg tagcccctgg cctcaaagga actctctccc ttaggttgca 360

30

tttgtataat gtttgatfff tagattgttc tttgagccct gcattccacg aggataggtc 420
 agtgggtatt aacgaggtaa aaggggagta gtacgaaagg gcattcaage gtcccatctt 480
 cgcttcaacc aaagcagccc tgcgttttcc tagttttatt aatagggttg atgtaaggtc 540
 gtctttgaaa aggggggttg gctttttttt acagtgtgac tgaggataaa tttataaaaa 600
 gggaaatgta tggcatggty agttttttca catacatcct tgtgaatacc cagctcaaga 660
 tccaaaacat ttccataatt tcagaaagtt ccaaaccocct gcctcttttc agtcttagcc 720
 ctcttcccct gaaglaacca ctgttccgac ttcaatcact acttttatcc cacagggtta 780
 ttttttggct tttttccact aaattttcaa attctttgat atggtacttt actattgacg 840
 aagtactttc acactaggtt atttaatat ctftgattca cccaatattt agggaacacc 900
 tgtaggggac aaaaaatgaa tgagagcccc tgccttccat tgctgctaatt ctggtgggaa 960
 cgagacatgt atttaattaa gcatgtaaaa aatagagtgg gtgatgaaat aatctatata 1020
 ctaaatcccc atgacacaca gtttacctat gtaacaaacc tgcattgtgta cccccgaacc 1080
 taaaatataa gttggaaatt aaaaaaaaaac gagagggaga atagagcatt acaaccagag 1140
 tgctgagatg aattacttta ttaccaaaga aggaggagga ctcaggaggg tgccgacgtt 1200
 taaaccocgt cactgaaggg tgtgcagaat ttggataggg aagataccct gggacaaggt 1260
 cattctaaaa ccatgctaac atttgaactt ttttttccat tgtgatagtt cctgaaatga 1320
 gttgcataaa actggtaaat gtottagggc agtctctaatt tgatttttat tttgttctat 1380
 ttttaaaaat tagtcttcaa atagcagatt cacatgatat taaaatatat gcacataaat 1440
 tatatacaca aatataattt ctgaatgaaa tttagtatct gcatataatt aagagctatt 1500
 tctgtctcat atgttcataa tcttcatcca ttaaaaaaac ttttgtagg cctttctcac 1560
 tctaagatta taaaaaattc tccattatt tacctagcta gttttctagt tgttccaaaa 1620
 ccatttattg aacaatccat ctftttgaca ctggtttggc atgcctaat tatataattc 1680
 tgtgtgtgtt aggatctcct tttggacttt ccattctggt cattgagtct taccagctcc 1740
 tcttacattg gtaccatgat gttttaatct atggggcttt gtagtttaaa tgtagggtta 1800
 gttccagcgc attgttctct atcagctgct aggaacttag aaatcagctt gctctgtttt 1860
 aaagaaaaac ctggtatttt tttatcagta taacattcta tttatattaa cttgaagaat 1920
 tgaaaaacatc tatgattttt cctattcagt aacgtatcac ttagaatagg ttaggttgta 1980
 ctactataaa atctcagctg cataaaacaa tttttttttg cttgtgctac acatccatta 2040
 ggtcatcaag ggaactcact tgtcaagtta ctcagagatt caggctgata taaagggttg 2100

10

20

30

atcttgacat acgctttcat gatgacagaa agcaggggaag agaaggtggt gagccatgtg 2160
 cttttctccc cttctatcca gaaatgacac atactcacat ttcattcgcc agagaaatta 2220
 acatggcccc tcttaagttc aatggatag agaaatgcct tcttaccagg tgcccagaat 2280
 tagaagagca aacatttgtg aacagttctg agtaccacaa ataccgttat ctttccactt 2340
 aagtcttctg tttcactcag tagtgcctta aacttttctt catatgtttt tcagtgtttc 2400
 ttgttgaatt tcttgatatt ttatcatggt tgttcgtact gggagtagcc tttttttcca 2460
 tttcattttc tggctgggtt cattgctggt tgtttttttg ttttgttttg tttttgagat 2520
 ggagtctcac tctgtcgcgc aggctggagt gcagtgtcac aatctcggct cactgcaacc 2580
 tctgcctccc aggttcaagc gattcttctt tctcagcctc ctgagtagct gggattacag 2640
 gcatgtgcca ccatgcccag ctaatttttt atattttttag tagagatggg gtttctocat 2700
 gttggtcagg ctggctcaca actcccaatc tcaggtgatc cgcctgcctc tgccttccaa 2760
 agtgcctgga ttatagacat gagccaccgt gcctggccta gttcttatgg gatgtatatg 2820
 tctttggatt catatgatat gtatataatg ttatatttct acaagtacat acctaggagt 2880
 ggaattgttg ggtcataggt taatgcatgt tttcttgcca aacagttgtg tcaatttctg 2940
 ttttcaccgc tgtgaatgag agttgttcta ccttcttgac aacaattgat attgtcagtc 3000
 attttagcca ttctggtgaa tttatagtgc tatttctgtg tgtgtaagag agagaatgag 3060
 agaggggtgt tgtgagaaaa ccaaagcaac actgtgagag tgtgtgtgtt tgtgagaaaa 3120
 ccaaaaataca tactactgtg atttcattgg gagaaaatct gtttgggtata tcaaaaaaag 3180
 tagcttaatt acttcatcat tattggttta ggt 3213

10

<210> 6
 <211> 1296 .
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 taagaacatt ttacactctt cagtataaag aagtcagaat acccctacc tatcagtaaa 60
 ggcctataag ttaccattaa aaagatgtcc ttaaaaacag cattctcagc tgggcgcggt 120
 ggctcacacc tttgtcccag tactttggga agccgagggt ggtggatcac ctgaggtcag 180
 gagttcgaga ccagcctggc caacatggcg aaaaccatt ttctctacta aaaatacaaa 240
 aattagccgg gcattggtggc ggggtgcttgt ggtccagct actcaagagg ctgaggtggg 300
 aggatcactg agcccaggag gtggaggctg cattgagcca agattgtgcc actgcactcc 360
 agcctgggtg acagagcgag actctgtctc aaaaaaacca aaacaaaaaa aaccagcat 420

20

30

tctttagtaa ataattcata gttttcttca tctagaattt aaaatttgtga tagttgatca 480
 gcatgtcctg agcacgtgtg tttgctgtta ctagttaga tcggtagatg tgtatataag 540
 ttataggtat aaaatcaatc ctgagttgac acaaggtttt gatgttgagt acaagtacag 600
 taagtgtata tttttagtta tgctcttagt ttttaagtcaa ttgtgtgggt ctttctagct 660
 ttaggatctg tgaattatc ttcttagaa aagggagtta agaatttca cttacctatc 720
 ttctacttgt ttggagaata gaagagtccc tgtggtagca gactttgtga gtttacttgt 780
 aatthttccat ctgaaagact gttcttgttt ttctgtatga agtcttctc tctctccag 840
 gctggagtgc agtgggtcaa ccttggctca ctgcaacctc tgcctcccgg gttcaagcaa 900
 ttctctgccc tcagcctccc gagtatctgg gattacaggt gcacaccacc acacctggct 960
 aatthttgta tttttagtag agacggggtt tcaccatggt ggccaggtg gtctcgaact 1020
 cttgacctca tgatcagccc acctcagcct tccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc 1080
 cccacactcg gccgttgtt ttttttaaga gacagggct cactctgtca cctaacctgg 1140
 agtacagtgg caatcatggc tcaactgtaac ctcaaagtgc eggccttagt gaagcgttct 1200
 tctgccttg gccctccaaa gtgctgggat tacaagtgt agccatgcat ccagcttgaa 1260
 agacagcttc ttaggcttga tttgtttggt tacagg 1296

10

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 taggtcagtg ggtattaacg aggt 24

20

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 8
 gtcactttga tatgatgaga gca 23

30

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 9
 cctcgttaat acccaactgac cta 23

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 10 10
 ggcaatacag ataagataat gtag 24

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 11 20
 ttgatcagca tgtcctgagc a 21

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 12
 ctaccctatc agtaaaggcc ta 22

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence 30

<220>
 <223> Primer

<400> 13
 tgctcaggac atgctgatca a 21

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Primer 40

<400> 14
 aaaaacagca ttctcagctg ggc 23

【 図 1 】

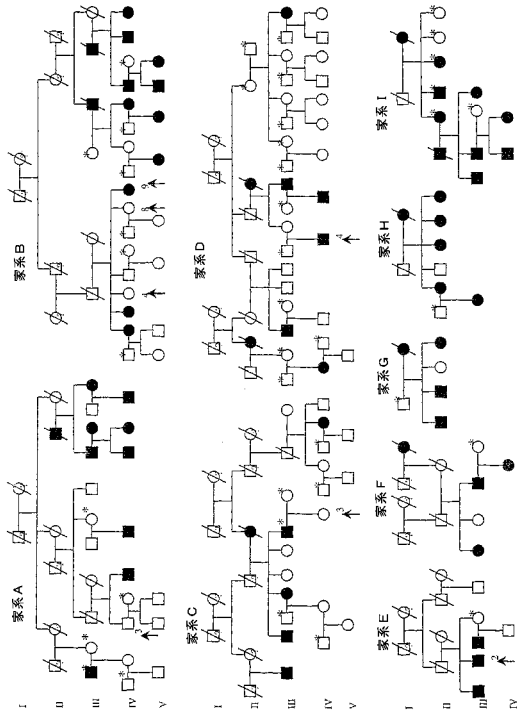


図 1

【 図 2 】

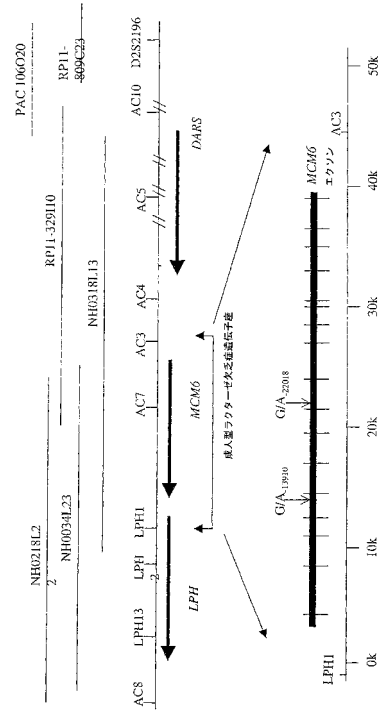


図 2

【 図 3 】

マーカー	ハプロタイプ										合計	
LPH13	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
LPH12	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
LPH11	3	2	2	2	1	1	1	4	4	4	4	4
AC7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AC3	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2
AC4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AC5	6	6	5	6	6	3	6	5	3	3	3	3
マーカー-セクシー対立遺伝子	20	4	1	2	2	1	1	1	1	1	1	33
マーカー-非セクシー対立遺伝子	3	2	0	0	0	0	2	0	2	0	2	54

図 3

【 図 4 】

SEQ ID NO:1

ACCCTTCAITCAGGAAAAATGCTACTTAGACCCCTACAATGCTACTAGTAGGCCCTCTGCCCTG
GCAATACAGATARGATAATGTAGCCCTGGCCCTCAAAGGAACCTCTCCTCCTTAGGTGCA
CTTGTATAATCTTTGATTTTGTAGATCTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATAGGTC

図 4

【 図 5 】

SEQ ID NO:2

TARGAACATTTTACACTCTTCAGTATAAGAAAGTCAGAAATACCCCTACCCCTTCAGTAAA
GGCCCTATAAGTTACCATTAAGAAAGATGCTCTTAAAAACAGCATTCTCAGCTGGGCgCGGT
GGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGGTGGATCACCTGAGGTCAG

図 5

【 図 6 - 1 】

SEQ ID NO:3

ATCAGAGTCACCTTGGATATGATGAGAGCAGAGATAAACAGATTTGTCATGTTTTAAAT
CTTTGGTATGGGACATACAGAAATTCACCTGCAAAATACATTTTATGTAACTGTGAAATGC
TCATACGACCAATGGAAATCTTCCTTTAAAGAGCTTGGTAAGCATTGAGTGTACTGTGTT
AGRCGGAGACGATCAGCTCATAGTTTATAGAGTGCATAAAGACGTAAAGTACCATTAAAT
ACCTTTTCATCAGGAAAATGTACTTAGACCCCTACAATGTACTAGTAGGCCCTTCGGCTG
GCAATACAGATAAAGTAACGTAGCCCTGGCCCTCAAAGGAACCTCCCTCTAGGTPGCA
TTTGTATAATGTTTGAATTTTGTAGATGTTCTTTGAGCCCTGCATTCACAGGATAGGTC
AGTGGTATTAACGAGGTAAGAGGGGAGTAGTACGAAGAGGCCATTCACAGCTGCCAATCT
CGCTCAACCAAGGCTAGGCTTTCCTAGTTTATTAATAGTGTATGTTGTTAGGATGTC
CTCTTTGAAAGGGGGTTCGCTTTTTCACAGCTGTAGCTGAGGTAATAATTTAATAAAA
GGAAATGTATGGCATGGTGTGATTTTTCACATACATCTTGTGAATACCCAGCTCAAGA
TCCAAAACATTTCCATAATTTCCAGAAATTCACAAACCCCTGCCCTTTTTCAGTCTTAGCC
CTCTCCCTCGAAGTAAACCACTGTTCGACTCAATCACTACTTTTATCCCAAGGTTAA
TTTTTGGCTTTTTTCCACTAAAATTTCAAAATCTTTGATATGGTACTTTACTACTGGAGC
AAGTACTTTCACACTAGGTTATTAATATTTCTTTGATTCACCCAAATTTAGGGAACACC
TGTAGGGGACAAAATAATGAACTGAGAGCCCTGCCCTTCCATGCTGCTAATCTGGTGGAA
CGAGCAGCTATTAATTAAGCATGTAAAATAAGAGTGGGTGATGAAATATCTATATA
CTAAATCCCAACGACACAGTTTACCTATGTAACAAACCTGCAATGTATCCCCGCAAC
TAAATATAAGCTGGAAATTAATAAAAACAGAGGAGGAGATGAGCATCACAAACAGAG
TGGTGGATGAATTAATTTTACCAAGAAAGAGGAGGAGGACTCAGGAGGTGCCGAGCTT
TAAACCCAGTCACTGAAGGTTGGCAGAAATTTGGATAGGCAAGTATCCCTGGGCAAGGT
CMTTCAAAACCTGCTAACATTTGTACTTTTTTTTTCATGTGTATGTTTCCGTAATATGA
CTGCTAATAACTGTTAGACTGCTTAGGGCAGTCTCTAATGTATTTTATTTTGTCTAT
TTTTAAAATTAAGCTTCAATAGCAGCTTCAATGATATTAATAATATAGCACATAAT
TATATACACAAAATATTTTTCGAACTGAAATTTAGTATCTGCATATATTTAAGAGCTATTT
TCTGTCTCATATGTTTCATATCTCCATCCATTAATAAAAACCTTTTGTTAGGCCCTTTCTCAC
CTTAAGATTAATAAAAATCTCCCTATTTTACCTAGCTAGTTTTCCTAGTGTTCCTAAA
CCATTTATGAACAACTCCATCTTTTGTACACGGTGTGGCAGTCCCTAATTAATATAATCT
TGTGTGTAGGATACCCCTTTGAGACTTTCGATTCGCTCATGAGTCTTATCAGCTCC
CTTACATTTGGTACAGATGTTTAAATCTATGGGCTTTGTGTTTAAATGTAGGGCTC
TCTCAGCGGATTTCTCTCATACAGCTGTAGGAACTTAGAAATCAGCTTGCCTGTGTTT
AAGAAAACCTGGATTTTTCCTATCCAGTATACATTTCTAATTAATTAACCTGAAGAT
TGAAAACATCTATGATTTTTCCATTCAGTACCTATCTACCTGAAATAGTGTAGTGTGTA
CTCCTAATAAATCTCAGGCTCATAAACAATTTTTTTTTGCTTGTCTACACATCCATTA
GGCTCAGAGGACTCCACTTGTCAAGTTTACAGAGATTCAGGCTGATATAAGGCTTTG
ATCTTGACATACGCTTTCTATGACAGAAAGAGGAGGAGGAGGTTGGAGCCTATGTC
CTTCTCCCTCTCTATCCAGAAATGACACTACTCACATTTTCAATTCGCCAGAGAAATTA
ACATGGCCCTCTTAAGTTCAATAGGATAGAGAAATGCCCTTCTCCACAGGTGCCCAAGAT
TAGAAGAGCAAAATTTTGTGACAGTCTTGTGATACCAACAAATACCTTATCTTTCCACTT
AAGCTCTGCTTTCCACTCAGTACTGCTTTAAACTTTTCTCATATGTTTTCAGTGTTC
TTGTTGAATTTCTGATATTTTATCATGTTTGTTCGACTGGGAGTAGCCTTTTTTTCCA

図 6

【 図 6 - 2 】

TTTCAATTTTCGGCTGGTTTCATTGCTGGTGTTTTTTTTGTGTTTTGTTTTGAGAT
GGAGTCTCACTGTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGTCAACAATCTCGGCTCACTGCAACC
TCTGCCCTCCAGGTTCAAGCGATTTCTTCTTCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGATATACAG
GCATGTGCCACCAATGCCAGCTAATTTTTTATATTTTATAGTACAGTGGGCTTCTCCAT
GTGTGTCAGGCTGCTCAAACTCCAACTCAGGTGATGCTCCCTGCTCCTGCTCCCAA
AGTGTGGGATATAGACATGAGCCACCCCTGCCCTGGCTGCTTCTTATGATATATATG
TCTTTGGATTCATATGATATGATATATGTTTATATTTCTCAAGTACATACCTAGGAGT
GGAATTTGGTGTCAATAGTTAATGCATGTTTTCTGCGCAACAGCTGTGTCAATTTCTG
TTTTCAACCCTGTGAATGAGAGTTGCTTACCTCTTTCACAAACATTTGATATGTCAGTC
ATTTAGCCATTCGTGTGAATTTATAGTGTCTATTTCTGTGTGTGTAAGAGAGAGAAAG
AGAGGTTGTTGAGAAAACCAAGGACACTGTGAGAGTGTGTGTGTTGAGAGAAA
CAAAAATACATACACTACTGTGATTTTCATTGGGAAAAACTCTGTTGGTATATCAAAAAG
TAGCTTAATTTACTCATATATTTGGTTTAGT

図 6

【 図 7 】

SEQ ID NO:4

TAAGAACATTTTACACTCTTCAGTATAAAGAGTCAAGATACCCCTACCTTACAGTAAA
GGCTTAAAGTTACCTTTAAAAGATGTCTTAAAACAGCATTTCTCAGCTGGGCAAGGT
GGCTCACACTTTTGTCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGGTGGATCACCTGAGGTGAG
GAGTGTGAGACCAAGCTGGCCCAACTGGCGAAACCCATTTCTCTACATAAATAATGAAA
AATAGCCGGGCAATGTTGGGGTCTTGTGTGCCAGCTTCAAGGGCTGAGTGGG
AGGATCACTGAGCCAGGAGGTGGAGGCTGCATGTAGCCAGATTTGCCACTGCACCTCC
AGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCTGCTCAAAAACCAAAAACAAAACCAACAGACT
TCTTTAGTAAATAATTCATAGTTTCTTCTCATCTAGAAATTAATAAATTTGATGATGTAICA
GCMTGCTCCGACAGCTGTGTTTGTCTGTACTAGTTTGTATGATGATGATGATGATGATG
TATAGGTTAATAATCAATCTGTAGTGCACAAAGGTTTTGATGTTGATGATGATGATGATG
TAAGTGTATATTTTATGTTATGCTCTTAGTTTAAAGTCAATTTGGTGTGTTCTTCTTACCT
TAGGATCTGTGTAATTTATCTTCTTGAAGAAAGGAGTTAAGAAATCTTCACTTAGCTATC
TCTCATTTGTTGAGAATAAGAAAGTCCCTGTGGTAGCAGCTTTGTGATTTACTTGT
AATTTTCCATCTGAAGACTGTTCTTGTGTTTTTCGCGATGAAGCTTACCTCTGTGCCAG
GCTGGAGTGCAGTGGTGCAGCTTGGCTCACTGCAACCTTGCCTCCGGGTTCAGAGCAA
TCTCTGCTGCCCTCAGCTCCGAGTATCTGGGATACAGGATGACACACCAACACCTGCT
AATTTTTGATTTTTCATGAGACAGGCTTTCACCAATGTTGGCAGGCTGCTCTGCACT
CTTGACCTATGATCAGCCACCTCAGCTTCCAAAAGTGGTGGGATTCAGAGCTGTAGCC
CCCACACTGGCCGTGTTGTTTTTAAAGAGACAGGTTCTACTTGTGCACTTCAAGCTGG
AGTACAGTGGCAATCATGGCTCACTGTAACCTCAAAATGCCGGCTTAGTGAAGCTTCT
TCTTGGCTTGGCTCCCAAGTGTGGGATTAACAAGTGTGAGCCATCAGACTTGA
AGACAGCTTCTTAGGCTGATTTGTTGGTTACAGG

図 7

【 図 8 - 1 】

SEQ ID NO:5

ATCAGAGTCACCTTGGATATGATGAGAGCAGAGATAAACAGATTTGTCATGTTTTAAAT
CTTTGGTATGGGACATACAGAAATTCACCTGCAAAATACATTTTATGTAACTGTGAAATGC
TCATACGACCAATGGAAATCTTCCTTTAAAGAGCTTGGTAAGCATTGAGTGTACTGTGTT
AGRCGGAGACGATCAGCTCATAGTTTATAGAGTGCATAAAGACGTAAAGTACCATTAAAT
ACCTTTTCATCAGGAAAATGTACTTAGACCCCTACAATGTACTAGTAGGCCCTTCGGCTG
GCAATACAGTATAGATAAAGTGGCCCTGACCTCAAAGGAACCTCCCTCCTTAGGTTGCA
TTTGTATAAGTGTGATTTTACATGCTCTTTGAGCCCTGCATTTCCACAGGATAGGTT
AGTGGTATTAACGAGGTAAGAGGGAGTAGTACGAAGGGCAATCAAGGCTCCCATCTT
CGCTTCAACCAAGAGGCTGGTGTGTTTCCCTAGTTTATTAATAGGTTTGTGTAAGGTC
GTCTTTGAAAAGGGGTTTGGCTTTTTCACGTGTGACTGAGGTTAATAATTAATAAAA
GGAAATGTATGGCATGGTGTGATTTTTCACATACATCTTGTGAAATACCCAGCTCAAGA
TCCAAAACATTTCCATAATTTTCAGAAAGTTCMAACCCCTGCCCTTTTCAGTCTTAGCC
CTCTTCCCTGAAAGTAAACCACTGTCCGACTCAATCACTACTTTTATCCCAAGGTTAA
TTTTTGGCTTTTTTCCACTAAAATTTCAAAATCTTGTGATAGTACTTTACTATGGAGC
AAGTACTTTCACACTAGGTTACTTAATTTCTTTGATTCACCAATTTTAGGGAACACCC
TGTAGGGGACAAAATAAGAGAGGAGCCCTGCCCTTCCATGCTGCTAATCTGGTGGGAA
CGAGCATATTTTAAATTAAGCTGTAAAATAAGACTGGCTGATGAAATATCTATATA
CTAAAATCCCAATGACACACATTTTACCTATGTAACAAACCTGCATGTGTACCCCGAAC
TAAAATAATAGTTGAAATTAATAAAAACAGAGGGGAAATAGAGCATCAACACAGAG
TGTGTAGATGAAATTTTATTAACCAAGAGGAGGAGGACTCAGGAGGTTGCCAGCTT
TAAACCCAGTCACTGAAGGCTGTGAGAAATTTGGATAGGCAAGATACCCCTGGGCAAGGT
CATCTTAAACCACTGTACATTTTGTACTTTTTTCTTCAATGTGTAGTCTTCCGAAATGA
GTTGCAATAAACTGGTACATGTCTTAGGGCAGTCTCAATGATTTTTATTTGTCTCTAT
TTTTAAAATATGCTTCAAAATAGCAGATTCACATGATTAATAAATATATGACATAAAT
TATATACACAAAATATTTCTGAAIGAAATTTAGTATCTGCATATATTTAAGAGCTATTT
TCTGCTCATAGTGTTCATATCTTCACTCAATTAATAAATCTTCTTGTAGGCTTTCTCAC
CTAAGATTAATAAATAATCTCCCAATTTTACCTAGCCAGTCTTCTAGTGTCTTCCAAA
CCATTTATGAAACATCCACTTTTTCACACTGTTTGGCAGTGTTCGACTGCTTAAATATATCT
TGTGTGTGTAGGATCTGCTTTGGACTTTCCATCTGTTCTTCAATGAGCTTATCAGCTCC
CTTACATTTGGTACCTAGTCTTAAATCTTAGGGGCTTGTAGTTTAAATGTAGGGCTA
GTTCCAGCCCATGTTCTCTATACGCTGTAGGAACTTAGAAATCAGCTGTCTGTTTTT
AAGAAAACCTGGATTTTTCCTATCCAGTATACACTACTACTTAGAATAGGTTAGGTTGTA
CTACTATAAAATCTCAGCTGCAATAAAGCAATTTCTTTTGTGCTGCTGACATCCATCA
GGCTTCAAGGAGCTCACTGCTCAAGTACTCAGAGATTCAGGCTGATATAAAGGTTTGT
ATCTTGACATCCGCTTTCATGATGACAGAAAGCAGGAAAGAGAAAGTGGTGGAGCCATG
CTCTTCCCTCTTCTATCCGAAATGACACTACTCACATTTTCAATTCGCGCAGGAAATTA
ACATGGCCCTCTTAAGTTCAAAATGAGTAGAGAAATGCCCTTCTCCACAGGTTGCCAGAA
TAGAAGAGCAAAATTTTGTGACAGTCTTGTGATACCAACAAATACCTTATCTTTCCACTT
AAGCTCTGCTTTCCACTCAGTACTGCTTTAAACTTTTCTCATATGTTTTCAGTGTTC
TTGTTGAATTTCTGATATTTTATCATGTTTGTTCGACTGGGAGTAGCCTTTTTTTCCA

図 8

【 図 8 - 2 】

TTTTTTTTTCGGCTGGTTTCATTGCTGGTGTTTTTTTTTTGTGTTTTGTTTTGAGAT
GGAGTCTCACTGTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGTCAACAATCTCGGCTCACTGCAACC
TCTGCCCTCCAGGTTCAAGCGATTTCTTCTTCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTCAG
GCATGTGCCACCATGCCAGTAAATTTTTTATATTTTATAGAGATGGGTTCTCTGCAT
GTGTGTCAGGCTGGTCAAACTCCCAATCTCAGGTACTCCGCTGCTCTGCTTCCAA
ATGTCGGGATTAAGACATGAGCCACCCCTGCCCTGAGCTTCTGATGATGATGATGATG
TCTTTGGATTCATATGATATGATATATGTTTATATTTCTCAAGTACATACCTAGGAGT
GGAAATTTGGGTCATAGGTTAATGCATGTTTTTCTGCGAATGAGCTTGTGTCAGTGTCTG
TTTTTCAACCCTGTAATGACAGTGTCTTACCTCTTTCACAACTATGATATGTCAGTCT
ATTTTAGCCATTTCTGGTGAATTTATAGTGCATTTCTGTGTGTGTAAGASAGAAATGAG
AGAGGGTGTGTTGAGAAAACCAAGGCAACACTGTGAGAGTGTGTGTTTTGTCGAAAA
CCAAAATACATACACTACTGTGATTTCAATTTGGGAAAAAATCTGTTGGTATATCAAAAAG
TAGCTTAATTTACTTATCATATTTTGGTTTAGT

図 8

【 図 9 】

SEQ ID NO:6

TANGAACATTTTACACTCTTCAGTATAAAGAGTCAAGATACCCCTACCTTACAGTAAA
GGCTTAAAGTTACCATTAAGAAGATGTCCTTAAAACAGCATTTCTCAGCTGGGCGCGT
GGCTCACACTTTGTCGCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTTGGGTTGATCACCTGAGGTCAG
GAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACTGGCGAAAACCAATTTCTCTACTAAAATAACAAA
AATAGCCGGGCAATGTTGGCGGTTGTTGTTGGTCCAGCTACCTAGAGGCTGAGGTTGG
AGGATCACTGAGCCAGGAGTGGAGGCTGCATTTGAGCCAAAGATTTGTGCCACTGCCACTC
AGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCTGCTCAAAAACCAAAAACAAAACCAACAGCAGT
TCTTACTAATAATTTCACTAGTCTTCTCATCTGAAATTTAAAATGTGATGATGATGATGATG
GCATCTCTGAGCAGCTGTGTTTGTCTTACTAGTTTATAGTGGTAGATGCTGATATAAG
TTATAGGTATAAAATCAATCTGAGTGTACACAAAGGTTTGTAGTTGAGTACAAAGTACAG
TAAGTGTATATTTTATGTTATGCTTACTAGTTTAAAGTCAATTTGTGTGGTCTTCTTAGCT
TAGGACTGTGTAATTTACTCTTCTTGAAGAAAGGAGTTAAGAAATCTTCACTTACTTATC
TCTCATCTGTTTGGCAATAGAGAGTCCCTGTGGTAGCAGCTTTGTGAGTTTTACTTTGT
AATTTTCCATCTGAAGACTGTTCTTGTTTTTTCTGTAATGAGCTTTCTGCTGCTGCCCGAG
CTGGAGTGCAGTGTGCAACTTTGGCTCACTGCAACTCTGCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCT
TCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AATTTTGTGATTTTCACTGATGAGAGGCTTCCACTGTTGAGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTTGCATCTGATGATGAGCCACTCAGCCTTCCAAAGTGTGGGATTCAGGCTCACACCAAC
CCACACTGCGCCGTTTGTGTTTTTAAAGAGAGGCTTCACTCTGTCACCTAAACCTTGT
AGTACAGTGGCAATCATGGCTCACTGTAACCTCAAAATGCCGGCTTAGTGAAGCTTTCT
TCTGCTTGGCTTCCCAAGGCTGGGATTAACAAGTGTGAGCCATGATCCAGCTTGA
AGACAGCTTCTTAGGCTGATTTGTTGGTTACAGG

図 9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	

(31)優先権主張番号 60/315,955
 (32)優先日 平成13年8月31日(2001.8.31)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 エナッター ネイビル
 フィンランド 0 0 2 5 1 ヘルシンキ ハールトマニンカテュ 8 ナショナル パブリック
 ヘルス インスティテュート バイオメディカム デパートメント オブ モレキュラー メディ
 シン

(72)発明者 イェルヴェレ イルマ
 フィンランド 0 0 2 5 1 ヘルシンキ ハールトマニンカテュ 8 ナショナル パブリック
 ヘルス インスティテュート バイオメディカム デパートメント オブ モレキュラー メディ
 シン

(72)発明者 サーヒ ティモ
 フィンランド 0 0 1 3 1 ヘルシンキ フィーニッシュ ディフェンス フォーシス ペーオー
 ボックス 9 1 9

(72)発明者 サヴィラーティ エルツキ
 フィンランド 0 0 0 2 9 フス ホスピタル フォア チルドレン アンド アドレッセンツ
 ペーオーボックス 2 8 1

(72)発明者 ターウィリガー ジョセフ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 3 2 ニューヨーク セント ニコラス アベニュー
 1 1 5 0 コロンビア ユニヴァーシティー デパー トメント オブ サイカトリー アンド
 コロンビア ゲノム センター

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. AQ515834,<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucgss&id=4748092>>05-May-1999 uploaded, [retrieved on 2008-08-018]Mahairas G.G.et al., RPCI-11 Human Male BAC Library
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. BG189020,<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucst&id=13710707>>21-Apr-2001 uploaded, [retrieved on 2008-08-018]Scott J.et al., Athersys RAGE Library
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. AQ892176,<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucgss&id=6348464>>10-Nov-1999 uploaded, [retrieved on 2008-08-018]Mahairas G.G.et al.,CIT Approved Human Genomic Sperm Library D
 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. AQ781870,<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucgss&id=5684918>>02-Aug-1999 uploaded, [retrieved on 2008-08-018]Mahairas G.G.et al.,CIT Approved Human Genomic Sperm Library D

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N 15/00-15/90
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq

PubMed
JSTPlus(JDreamII)