

## 研 究

全エクソーム解析を用いたヒトにおける  
歯の先天欠如に関わる遺伝要因の探索村上暁子<sup>1,2</sup>, 安平進士<sup>2</sup>, 間山寿代<sup>1</sup>, 三浦廣行<sup>3</sup>, 佐藤和朗<sup>1</sup>, 前沢千早<sup>2</sup><sup>1</sup> 岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野<sup>2</sup> 岩手医科大学医歯薬総合研究所 腫瘍生物学研究分野<sup>3</sup> 岩手医科大学歯学部口腔医学講座 歯科医学教育学分野

(受付: 2019年12月20日)

(受理: 2019年12月25日)

## 抄 録

歯の先天欠如は単純なメンデル遺伝を示すことが多いが、複数ある既報遺伝子座の大規模調査においても変異が同定される罹患家系は半数程度に過ぎず、未同定の原因遺伝子が多数あることが示唆される。我々は新規原因遺伝子変異同定を目的として、次世代シーケンサーを用いた罹患家系成員のエクソーム解析を行った。岩手医科大学附属病院歯科医療センター矯正歯科に来院した患者のうち、先天欠如が見られる2家系について、それぞれの家族の非発症者を含め計8名から提供された血液からDNAを抽出し解析に供した。いずれの家系においても、既報遺伝子座に候補となるような変異は同定されなかった。このうち、原因変異の優性遺伝が原因と考えられる家系では、40遺伝子座においてアミノ酸配列に変化を与えるような45の変異が新規候補として抽出された。また *de novo* 優性変異、あるいは劣性変異が原因と考えられるもう一つの家系では、*ATAD3A*, *FBRSL1* (*de novo* 優性変異を仮定した場合), *ZDHHC11B* (劣性変異を仮定した場合) の3遺伝子座の変異が新規候補として抽出された。今回同定された候補から原因変異を特定するためには、アッセイ系の開発や歯発生分子機構の更なる理解、並びに先天欠如家系での候補遺伝子座における変異データの収集が必要である。

## 緒 言

歯の発生は、肥厚した歯胚上皮が蕾状、帽状、鐘状へと順次形態を変化させながら進行する。

この過程において、上皮組織と間葉組織の間では BMP (Bone Morphogenetic Protein), FGF (Fibroblast Growth Factor), TNF (Tumor Necrosis Factor), WNT, Sonic Hedgehog

An attempt to identify causative mutations for tooth agenesis with whole exome sequencing.  
Murakami A.<sup>1</sup>, Yasuhira S.<sup>2</sup>, Mayama H.<sup>1</sup>, Hiroyuki M.<sup>3</sup>, Maesawa C.<sup>2</sup>, and Satoh K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Orthodontics, Department of Development Oral Health Science, School of Dentistry, Iwate Medical University

<sup>2</sup> Department of Tumor Biology, Institute of Biomedical Sciences, Division of Dental Education

<sup>3</sup> Department of Oral Medicine, School of Dentistry

<sup>1,3</sup> 19-1 Uchimaru, Morioka, Iwate, Japan

<sup>2</sup> 1-1-1 Idaidori, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate, Japan

<sup>1,3</sup> 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>2</sup> 岩手県紫波郡矢巾町医大通 1 丁目 1 番 1 号

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 45 : 13-22, 2020

(SHH) など多数のシグナル因子とその受容体を介した情報伝達が行われ、下流の細胞内標的を含め複雑なネットワークが形成されている<sup>1)</sup>。一例を挙げると、歯発生の最初期に歯胚上皮が分泌因子である Bmp4 を発現すると、近接する間葉組織に細胞膜上の受容体を介して転写因子である Msx1 の発現を誘導する。間葉における Msx1 の発現は同様に転写因子である Pax9 と共に間葉における Bmp4 の発現を促し、ポジティブフィードバックループを形成して間葉組織での安定的な発現を維持する。一方間葉で分泌された Bmp4 は上皮細胞に p21 の発現を介した細胞周期停止やアポトーシスをもたらし、歯の発生に必要な蕾状から帽状への形態変化やエナメル結節の形成を上皮組織に誘導する<sup>23)</sup>。これらの知見の大部分はマウスをモデルとして行われた研究から得られたものであるが、Msx1 や Pax9 のオルソログをコードする遺伝子はヒトで非症候群性に見られる歯の先天欠如の原因としても報告されており、歯の発生の基本的な枠組はヒトにおいてもほぼ同様と考えられる<sup>4)</sup>。

6本以上の永久歯の先天欠如は明瞭なメンデル型の遺伝様式（特に常染色体性優性）を示す場合が多く、単一遺伝子座の変異が原因と考えられる。この場合優性となるのは、関連する遺伝子がハプロ不全性をもつためとされる。これまでに報告された非症候群性先天歯欠損の原因遺伝子には、前述のホメオボックス転写因子をコードする PAX9, MSX1 のほかに、Wnt- $\beta$ カテナン経路に関与する分子をコードする WNT10A/B, AXIN2, 主に外胚葉の形態形成に関与するシグナル分子とその受容体をコードする EDA, EDAR 等がある<sup>4)</sup>。冒頭でふれたシグナル伝達経路は、複数の器官発生において役割を持つ場合が少なくなく、対応する遺伝子の欠損が非症候群性に、歯発生のみに表現型をもたらすものはむしろ例外的である。しかし最近行われた 100 例以上の歯欠損の網羅的スクリーニングにおいても、既知の原因遺伝子上に変異が同定されたのは半数ほどであり<sup>5)</sup>、未発見の原因変異が数多く存在することが予想される。

近年までメンデル遺伝病の新規遺伝子座における原因変異探索は家系内の連鎖解析と染色体ウォーキングの組み合わせにより行われるのが一般的であった。しかしマッピングの精度をあげるためには大家系が必要になることや染色体ウォーキングやサンガー法による塩基配列決定の速度に制約があることから、実際に変異が特定される例は大きな研究プロジェクトによる少数の報告に限られていた<sup>6)</sup>。超並列シーケンサー（いわゆる次世代シーケンサー、NGS）の登場はこの状況を劇的に変化させた。比較的少数の家系内の検体から全エクソン領域の配列決定を行い、マッピングを行うことなく遺伝様式と合致する変異を直接抽出する方法がメンデル遺伝病の原因変異探索において一般的となりつつある<sup>7)</sup>。

このような背景を踏まえ、本研究では遺伝様式が比較的明瞭な永久歯の先天欠如発生二家系を対象に NGS を用いた全エクソーム解析による新規原因変異の探索を行った。

なお、本研究として平行して別家系の患者を対象に行った既報遺伝子座位のターゲットシーケンシングによる新規変異探索の結果については、すでに発表済である<sup>8)</sup>。

## II. 対象と方法

### 1. 被験者

2014 年から 2016 年の期間に岩手医科大学付属病院歯科医療センター矯正歯科を受診し、家族性に歯の先天欠如が見られる患者で本研究の趣旨に同意が得られた患者 2 名（男性 1 名：欠損歯数 4 本、女性 1 名：欠損歯数 9 本）とそれぞれの家族成員計 6 名を被験者とした。全被験者に症候群等の全身的な疾患はなかった。本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認を得ている（承認番号 01243：ヒトにおける歯の先天欠如に関わる遺伝子要因の探索）。個人情報保護の観点から、得られたシーケンスデータは予め定められた記憶媒体（外付けハードディスク）にのみ保存することとした。

## 2. DNA 抽出

被験者より得た血液サンプルから DNA extractor WB kit (和光純薬, 大阪) を使用してゲノム DNA を抽出した。血液サンプルには全血を使用し, 0.5 ml の全血から抽出した DNA を 100  $\mu$ l の TE に回収後, 電気泳動 (0.75% agarose gel) 及び Nano drop によるクオリティチェックと濃度測定を行なった。

## 3. 次世代シーケンサーによる一次解析

得られた DNA からのライブラリー作成, エクソン濃縮, イルミナ社 HiSeq2000 による一次解析を株式会社インフォバイオ (東京) に外注した。細かい解析パラメーターの設定等が外注では困難なため, 納入された解析結果のうち一次解析データ (各リードの生データ) のみを用い, 二次解析以降は以下に述べるように著者らが行った。

## 4. マッピングと変異検出

計算機として MacBookPro (Retina, 13-inch, Late 2012) 及び iMac (Retina 4K, 21.5-inch, 2017) を, 主な解析ソフトウェアとして FastQC (version 0.11.8)<sup>9)</sup>, BWA (version 0.7.17-r1188)<sup>10)</sup>, GATK (version 4.1.0.0)<sup>11)</sup>, Annovar (version 2018Apr16)<sup>12)</sup> を用いた。

解析パイプラインの概要は図 1 に示す。まず, 一次解析によって得られたリードの fastq データについてリード数やリード長, ベースコールの精度を確認するために, FastQC によるクオリティチェックを行い, リードの一部を除去するトリミングの作業を行なった。次にリードを BWA によってヒトゲノムリファレンス配列である human\_g1k\_v37\_decoy (hg19) にマッピング (アライメント) し, GATK によって重複リードの除去とシーケンスクオリティの再評価を行った。マッピングしたリード群から GATK

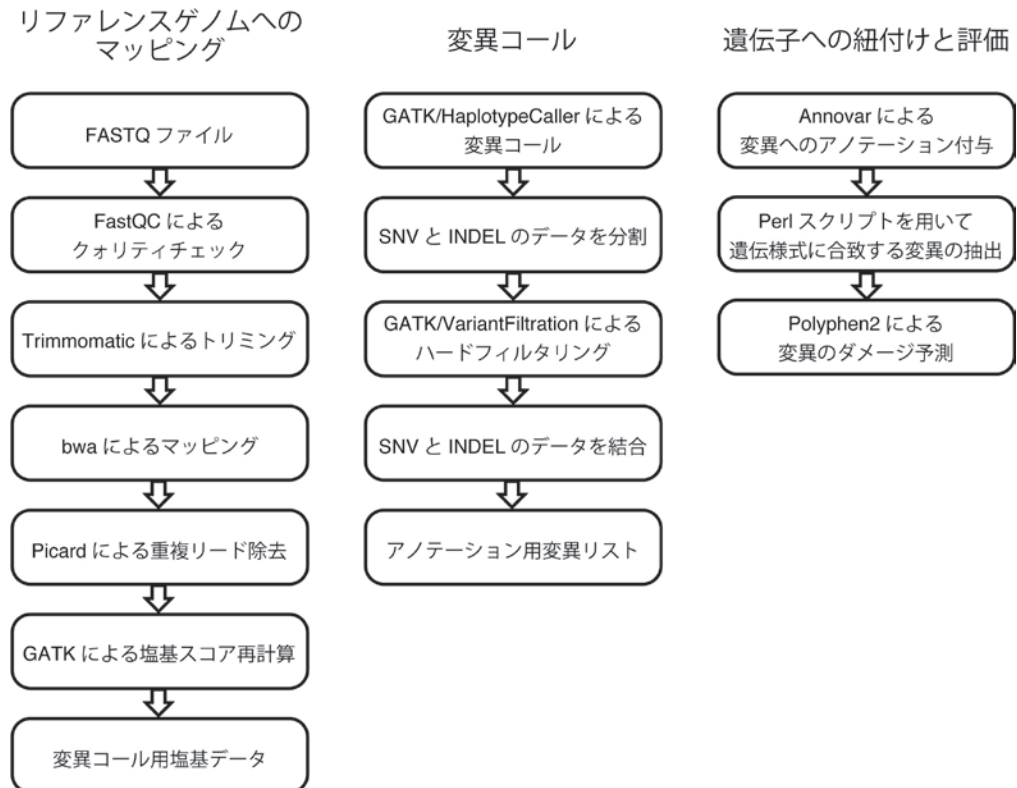


図 1 : 本研究におけるエクソーム解析の手順

の HaplotypeCaller を用いて変異を検出した後, SNV (single nucleotide variants) と INDEL (insertion, deletion) のデータを分け, それぞれ別のクオリティー基準を適用して選別を行った. 選別の基準パラメータとしては, GATK のサイトで推奨されている標準的な値を用いた. SNP と INDEL データを再度統合し, Annovar を用いて個々の変異に遺伝子情報を付与した.

## 5. 変異リストからの疾患原因変異候補の絞り込み方法

各検体の変異リストから perl スクリプトを用いて各家系で想定される遺伝様式と合致する変異のみを抽出し (結果の項を参照), 疾患の原因である可能性が低いと考えられる同義置換とエクソン/イントロン境界以外の非コード領域に存在するものを除いた. さらに一般集団中に一定の頻度以上で観察される変異は稀な疾病の原因である可能性が低いと考えられるので, dbSNP 等のデータベースを用いて頻度 0.1% (優性変異を仮定した場合) あるいは頻度 1% (劣性変異を仮定した場合) より多い変異を除いた. このような工程を経て生成された候補変異リストの中で, OMIM のデータベース上で歯の先天

欠如に関連することがすでに報告されている *WNT10A/B*, *MSX1*, *LTBP3*, *PAX9*, *EDA*, *AXIN2* 遺伝子座位に存在するものがないか確認した. また, 遺伝子の実体は報告されていないが, マッピング情報で原因遺伝子座であることが示されている領域 (10q11.2-q21, 16q12.1)<sup>13,14)</sup> についても候補変異リストの中で対応するものがないか検討した.

## 6. Polyphen2 による変異のダメージ予測

前項で抽出された変異のうちのミスセンス変異については, Polyphen2 スコア (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)<sup>15)</sup> を用いてコードするタンパク質の機能に与える影響を予測した. スコアは基本的に Annovar のデータベース ljb26\_all に含まれる値を用い, 必要に応じて Polyphen2 のオリジナルサイトで確認した.

## Ⅲ. 結 果

### 1. 家系 1

#### (1) 症状と遺伝様式

家系図と発症者を図 2A に, 発症者の歯式を表 1 に示す. 発端者 (II-1) の父親 (I-1) にも歯の欠損が見られる (故人のため聞きとりによ

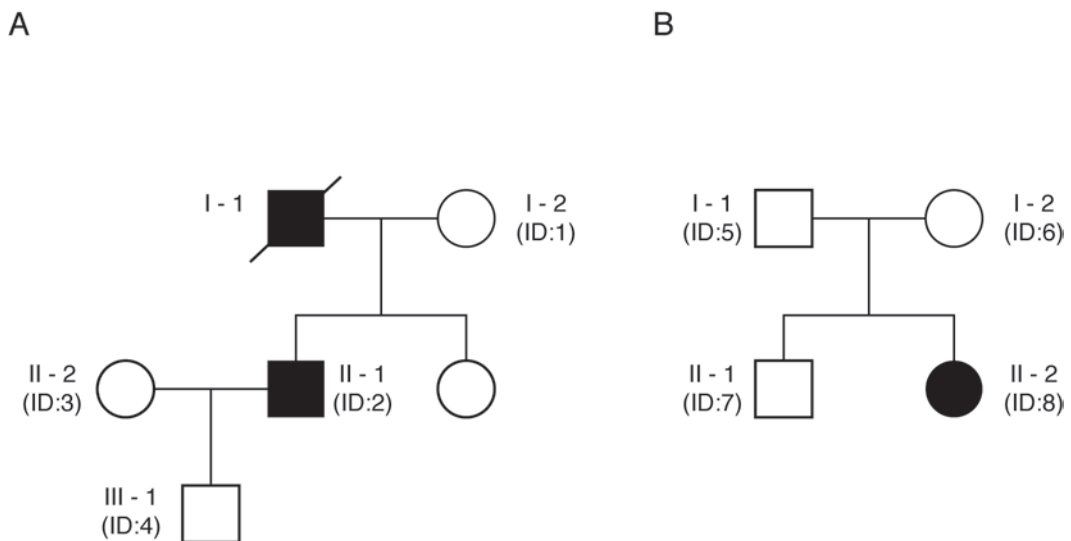


図2 : (A) 家系 1 の系図. (B) 家系 2 の系図

表 1

ID	Gender	# missing teeth*		Right								Left							
				8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
2	M	4	Upper	●	●													●	●
			Lower				●								●				
8	F	9	Upper		●		●			●				●				●	
			Lower				●				●		●			●			

●: 歯欠損, \*: 第三大臼歯を除く。

る) ことから, 単一遺伝子座の変異アレルを原因とする常染色体性優性遺伝(歯の先天欠如に一般的)の可能性が高いと考えられた。

(2) 解析

発端者 (II-1 (ID:2)) と家系内の未発症者 3 名 (発端者の母親: I-2 (ID:1), 発端者の配偶者: II-2 (ID:3), 発端者の子: III-1 (ID:4)) について全エクソーム解析と hg19 に対するマッピング, 変異検出を行った。

発端者の総変異検出数は 43616 (このうち調べた家系成員全員で共有される変異が 24927) であった。常染色体性優性遺伝であるとの仮定に基づき, ここから未発症者と共通のもの, 頻度が 0.1% より多いもの, 非コード領域に位置するもの, 同義置換を順次除くと, 候補となる変異は 45 (ミスセンス変異 34, ナンセンス変異 1, フレームシフト変異 2, スプライシング変異 4, その他 4), 40 遺伝子座にまで絞られた。歯の先天欠如の原因として報告のある 7 遺伝子座 (*WNT10A/B*, *MSX1*, *LTBP3*, *PAX9*, *EDA*, *AXIN2*) 内に位置する変異は含まれていなかった。この中で *AXIN2* については, コード領域のミスセンス変異 A603P が患者のみに存在したが, これは集団中に 4% 程度存在する common variant であることがわかった。

既報の二つの未知遺伝子座に対するマッピング情報 (*STHAG5* :10q11.2-q21 及び *STHAG2* :16q12.1, <https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS106600>)<sup>13,14)</sup> と一致するも

のを 45 の中から検索したところ, 10q11.2-q21 領域に 2 つのミスセンス変異 (*NCOA4* :Q551E, 及び *HERC4* :R1041C) が存在した。しかしこれらの変異に対する polyphen2 スコアは 0.501 及び 0.306 と低く, タンパク質機能に対する大きな影響は考えにくい。

次に新規遺伝子座における原因変異候補を絞る目的で, リスト中のミスセンス変異から polyphen2 スコアが 0.8 以下のものを除いたところ, 23 遺伝子座における計 26 の変異が残った (表 2)。これらと Gene Ontology Resource (<http://geneontology.org>) で Odontogenesis を検索語とした時のヒト遺伝子座リスト (126 遺伝子座) を比較したが, 一致するものはなかった。他方, Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org>) を用いて, 23 の遺伝子座のマウスオルソログについてノックアウト表現型を検索したところ, *Vcl* と *Slc35d1* については顎顔面領域を含む発生異常が見られることがわかった。また, GTE<sub>x</sub> (<https://www.gtexportal.org>) を用いて臓器ごとの遺伝子発現パターンを解析したところ, *PAX9* のように明確な頭頸部特異的な発現を示す遺伝子はリスト中になかったが, *PRRG2* が比較的近いパターンを示した。

2. 家系 2

(1) 症状と遺伝様式

家系図と発症者を図 2B に, 発症者の歯式を

表2

Chr	Gene	Variant location	Variant type	Polyphen2_ HDIV_score	Craniofacial phenotypes in KO mice
1	SLC35D1	splicing	NA	NA	Yes
1	TDRD10	exonic	stopgain	NA	no entry
1	MTMR11	exonic	nonsynonymous SNV	1	?
2	PMS1	exonic	nonsynonymous SNV	0.979	?
4	BOD1L1	exonic	nonsynonymous SNV	0.999	?
4	FRYL	exonic	nonsynonymous SNV	0.993	?
5	TMEM161B	exonic	frameshift deletion	NA	No
6	SYNE1	exonic	frameshift deletion	NA	No
6	NCOA7	exonic	nonsynonymous SNV	0.998	?
6	NCOA7	exonic	nonsynonymous SNV	0.902	-
9	SPACA9	exonic	nonsynonymous SNV	1	No
10	ADAMTS14	splicing	NA	NA	No
10	VCL	exonic	nonsynonymous SNV	1	Yes
10	COMMD3; COMMD3-BMI1	exonic	nonsynonymous SNV	0.999	?
11	OR4D6	exonic	nonsynonymous SNV	0.979	?
12	METTL7B	exonic	nonsynonymous SNV	0.995	
13	SKA3	splicing	NA	NA	No
13	SKA3	splicing	NA	NA	-
17	PIK3R6	exonic	nonsynonymous SNV	0.996	No
18	CEP192	exonic	nonsynonymous SNV	0.999	No
18	CEP192	exonic	nonsynonymous SNV	0.98	-
19	DOCK6	exonic	nonsynonymous SNV	1	No
19	ANKRD27	exonic	nonsynonymous SNV	1	No
19	PRRG2	exonic	nonsynonymous SNV	0.993	?
19	MED29	exonic	nonsynonymous SNV	0.99	?
19	ZNF227	exonic	nonsynonymous SNV	0.817	?

表1に示す. 発端者 (II-2 (ID:8)) の両親 (I-1 (ID:5), I-2 (ID:6)) には歯の欠損が見られないことから, 単一遺伝子座の *de novo* 優性変異が原因である可能性が高いが, 両親の変異を受け継いだことによる劣性遺伝 (変異のホモ接合あるいは複合ヘテロ接合) の可能性についても検討した.

(2) 解析

発端者 (II-2) と家系内の未発症者3名 (発端者の父親 : I-1, 発端者の母親 : I-2, 発端者の同胞 : II-1) について, 家系1と同様の工程で全エクソーム解析と変異検出を行った. 発症者エクソームの総変異数は44313 (うち家系成員全員で共有される変異が26531) であった. 常染色体あるいはX染色体優性の *de novo* 変異であるとの仮定に基づき, ここから未発症者と共通のもの, 頻度が0.1%より多いもの, 非コード領域に位置するもの, 同義置換を順次除くと, *ATAD3A* と *FBRSL1* の2つの遺伝子座における3つの変異のみが抽出された (表3). このうち *FBRSL1* に見つかった2つの変異 (1塩基欠失と1塩基置換) は隣接しており, 単独のイベントとして生じた *de novo* 変異である可能性が高い. *ATAD3A* はミトコンドリアATPaseのコンポーネントをコードし, 見つかったミスセンス変異G31Vは高いPolyphen2スコア (1.00) を示した. また *FBRSL1* は生殖器官で機能を持つタンパク質をコードし, 変異はフレームシフトを伴っていたのでやはり機能に対する影響は大きいと考えられる. しかしながら, Gene Ontology Resource や Mouse Genome Informatics に記載された情報は両者の歯発生

への特異的な関与を示唆しなかった. また, GTEx (<https://www.gtexportal.org>) を用いて臓器ごとの両遺伝子の発現を調べたが, 共に頭頸部特異的な発現は見られなかった.

次に遺伝様式を劣性と仮定して発端者がホモ接合で持つ変異を抽出したところ, パルミトイル化に関与するタンパク質をコードする *ZDHHC11B* の複合変異 (12塩基の中に2塩基挿入と2塩基欠失が1回ずつ, 1塩基置換が2回) が抽出された (表3). この遺伝子のマウスホモログ *Zdhhc11* (オルソログかどうかは不明) のノックアウトは聴覚障害をもたらすことがデータベース上に記載されているが, 歯の発生への関与を示す証拠は得られていない.

最後に発端者における劣性変異の複合ヘテロ接合 (特定の遺伝子座で両親から異なる変異アレルを受けついでヘテロ接合となっている状態) が原因であると仮定して変異抽出を行い, *CFAP99*, *AKAP7*, *LMF1* の3つが抽出された. このうち *AKAP7* と *LMF1* が持つミスセンス変異が示す polyphen2 スコアは両方のアレルとも低く, 機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた. *CFAP99* については, 片方のアレルの変異が Polyphen2 データの記録がない alternative exon に存在したため, 機能に与える影響を評価できなかった.

以上より, Gene ontology やノックアウトマウスの表現型からの強い証拠は得られなかったものの, *ATAD3A*, *FBRSL1* (*de novo* 優性変異を仮定した場合), *ZDHHC11B* (劣性変異を仮定した場合) の3遺伝子座の変異が家系2における原因変異の候補と考えられた.

表3

Chr	Gene	Variant location	Variant type	Polyphen2_HDIV_score
1	ATAD3A	exonic	nonsynonymous SNV	1
12	FBRSL1	exonic	frameshift deletion	NA
12	FBRSL1	exonic	nonsynonymous SNV	1
5	ZDHHC11B	exonic	compound variant	NA

#### IV. 考 察

本研究ではNGSを用いて得られたエクソームデータからヒトにおける歯の先天欠如に関わる新規遺伝要因の探索を試みた。

ヒトの生殖系列ではゲノムあたり世代あたり40ないし80の一塩基変異を含む様々な変異(*de novo* 変異)が生じており, これらは両親の体細胞に存在しない変異アレルを原因とした疾病を子供に引き起こすことが近年明らかになってきている<sup>16,17)</sup>. 小家系のエクソーム解析によって単一遺伝子疾患の原因を探る場合, *de novo* 以外の優性変異では遺伝様式の情報のみで候補を少数に絞るのは困難とされる<sup>7)</sup>. 歯の先天欠如で一般的な, 変異アレルの優性遺伝が原因である可能性が疑われる家系1はこのような例に該当する. 今回の解析で, 遺伝子様式に合致する原因変異の候補はコード領域で45存在し, 機能的な予測を加えても26(23遺伝子座)が残った. これらの中にはGO解析で歯発生と強い関連を示す遺伝子は存在せず, 更に限定するには, マッピング情報や歯発生の分子機構に関するより詳細な情報が必要であると考えられる.

この中で *VCL* と *SLC35D1* については, 対応するオルソログのノックアウトマウス表現型に頭頸部の異常が含まれ, 歯の先天欠如との関連が示唆された. *VCL* は, 細胞膜裏打ちタンパク質であるビンキュリンをコードする遺伝子であり, 臓器あるいは部位特異的な症状の原因とは考えにくい. ただノックアウトマウスは脳神経管と心臓の異常による胎生死を示し, 発生において何らかの特異的機能を持つ可能性は否定できない. *SLC35D1* は骨格形成や軟骨代謝に重要な役割を果たす糖ヌクレオチド輸送体をコードする遺伝子であり, ノックアウトマウスの表現型は四肢や背骨の形成の異常を伴う新生児死である. ヒトでは *SLC35D1* のホモ欠損が蝸牛様骨盤異形成症 (Schneckenbecken dysplasia) の原因であることが明らかになっている<sup>18)</sup>. いずれの遺伝子においてもマウスでのヘテロ接合型の表現型の詳細は報告されておら

ず, 少なくともヘテロ接合では顕著な全身性の表現型は示さないと考えられる. また, 候補の中で *PRRG2* はヒトにおけるその臓器毎の発現が *PAX9* に似た分布を示した. しかし既報の原因遺伝子の中で *PAX9* のようにきれいな頭頸部特異的発現分布を示すものはむしろ稀であり (例えば *MSX1* は ubiquitous な転写因子), 発現分布は十分強い根拠とは言えない点がある.

家系1とは異なり, *de novo* 優性変異, あるいは劣性変異のホモ接合が原因である可能性が疑われる家系2では, 遺伝様式だけから候補変異がごく少数に絞られることが予想され, 実際2つ (*de novo* 優性の場合) あるいは1つ (劣性の場合) の変異が候補として抽出された. 今回のように, これまでの知見が変異を持つ遺伝子と歯発生の関連を積極的に支持しない場合, 見つかった変異が原因であると結論するには, 何らかのモデル系を用いて当該変異の導入が歯発生の異常あるいはそれに関連する表現型をもたらすことを示す必要がある. 端的にはノックインマウスの作成であるが, *PAX9* ヘテロ欠損マウスが歯発生に目だった表現型を示さないことからわかるように<sup>19)</sup>, 歯欠損のように比較的軽微な表現型はモデル生物では必ずしも再現されない. したがって, 我々がすべきことは単独の証拠に依拠することではなく, *in vitro* アッセイ系の開発とそれによる変異タンパク質の活性評価や歯の発生のより詳細な理解, 歯欠如家系からの同じ遺伝子座の変異の検索などを着実に進め, 状況証拠を収集していくことであろう.

#### 謝 辞

利益相反: 本研究において, 公開すべき利益相反はない.

#### 引用文献

1. Jheon, A. H., Seidel, K., Biehs, B. & Klein, O. D. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biology* 2, 165–182 (2013) .
2. Jia, S. *et al.* Roles of Bmp4 during tooth morphogenesis and sequential tooth formation. *Develop-*



- ment 140, 423–432 (2013) .
3. Fruchard, C. The Nile crocodile, a new model for investigating heterodonty and dental continuous renewal in vertebrates. *BioSciences Master Reviews* 1 10 (2013) .
  4. Nieminen, P. Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zoology Part B Mol Dev Evol* 312B, 320–342 (2009) .
  5. Arzoo, P., Klar, J., Bergendal, B., Norderyd, J. & Dahl, N. WNT10A mutations account for  $\frac{1}{4}$  of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164A, 353–359 (2014) .
  6. Yu, C. *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258–262 (1996) .
  7. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20, 490 (2012) .
  8. Murakami, A. *et al.* Characterization of PAX9 variant P20L identified in a Japanese family with tooth agenesis. *PloS one* 12, e0186260 (2017) .
  9. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2010) . Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
  10. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760 (2009) .
  11. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297–1303 (2010) .
  12. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38, e164–e164 (2010) .
  13. Liu, W. *et al.* The Novel Gene Locus for Agene-sis of Permanent Teeth (He-Zhao deficiency) Maps to Chromosome 10q11.2. *J Dent Res* 80, 1716–1720 (2001) .
  14. Ahmad, W. *et al.* A Locus for Autosomal Recessive Hypodontia with Associated Dental Anomalies Maps to Chromosome 16q12.1. *Am J Hum Genetics* 62, 987–991 (1998) .
  15. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248 (2010) .
  16. Goldmann, J. M. *et al.* Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nature Genetics* 1 8 (2016) . doi:10.1038/ng.3597
  17. Acuna-Hidalgo, R., Veltman, J. A. & Hoischen, A. New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol* 17, 241 (2016) .
  18. Hiraoka, S. *et al.* Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nat Med* 13, 1363–1367 (2007) .
  19. Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K. & Balling, R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes & Development* 12, 2735–2747 (1998) .

# An attempt to identify causative mutations for tooth agenesis with whole exome sequencing.

Akiko MURAKAMI<sup>1</sup>, Shinji YASUHIRA<sup>2</sup>, Hisayo MAYAMA<sup>1</sup>, Hiroyuki MIURA<sup>3</sup>, Kazuro SATOH<sup>1</sup>,  
Chihaya MAESAWA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Orthodontics, Department of Development Oral Health Science, School of Dentistry,  
Iwate Medical University

<sup>2</sup> Department of Tumor Biology, Institute of Biomedical Sciences, Division of Dental Education,

<sup>3</sup> Department of Oral Medicine, School of Dentistry

[Received : December 20 2019 : Accepted : December 25 2019]

**Abstract** : Congenital tooth agenesis often shows a simple Mendelian inheritance, but recent large surveys of the affected families have located mutations in previously reported loci only in half of the cases, suggesting many causative genes to be identified. We conducted whole-exome analysis of the two affected family members using a next-generation sequencer to identify novel causative mutations. Genomic DNA of the two patients who were diagnosed with tooth agenesis at Iwate Medical University Hospital Dental Care Center Orthodontics, as well as unaffected members of the respective families was extracted from the blood and subjected to the whole-exome sequencing. No candidate mutations that agreed with the inheritance pattern were identified at the previously reported loci in either case. Forty-five nonsynonymous mutations at 40 loci were extracted as candidates in a family in which agenesis is thought to occur through dominant inheritance of a causative mutation. In the other family in which agenesis is thought to be caused by either a de novo dominant mutation or an inheritance of recessive mutations, mutations at three loci (ATAD3A, FBRSL1 (assuming de novo dominant mutation) , and ZDHHC11B (assuming recessive mutation) were identified as candidates. To narrow down the candidates may require development of an assay system, further understanding of tooth development as well as accumulation of mutation data at the candidate loci in other congenital tooth agenesis families.

**Key words** : Next generation sequencing, Odontogenesis, Tooth development, Congenital disorders