

# 統合失調症関連遺伝子群を突破口とした "humanness" の起源の解明

●柴田 弘紀

九州大学生体防御医学研究所遺伝情報実験センター

## <研究の目的と進め方>

統合失調症感受性を高める遺伝子変異は、同時にヒトをヒトたらしめた本質 (humanness) の一つである高次脳機能では有利にはたらくことで、平衡選択により維持されている」という仮説を立てこれを検証する。具体的には、統合失調症関連遺伝子群を対象にヒト及びチンパンジーの多数の検体を用いた分子進化的解析を行う。2005年度の特定領域研究「グルタミン酸受容体遺伝子群のヒト上科における多様性と"humanness"の起源」(課題番号17018027)では、グルタミン酸受容体遺伝子群を対象として、①チンパンジーの遺伝子配列決定と比較解析及び、②ヒトでの非同義SNP周辺領域におけるヒト及びチンパンジーでの分子進化的解析による平衡選択仮説の妥当性の検討を行った。しかし記載された非同義SNPの多くはきわめて頻度が低く、対象領域をより広く設定する必要が示された。

そこで本研究計画では、プロモーター領域を中心にグルタミン酸受容体遺伝子群、及び他のグルタミン酸関連遺伝子群(トランスポーター、代謝酵素など)、さらにDTNBP1など近年同定された統合失調症関連遺伝子群についてヒトとチンパンジーの分子進化的な解析を行い、統合失調症及び高次脳機能の平衡選択仮説の妥当性を検討する。

## <2007年度の研究の当初計画>

①グルタミン酸受容体遺伝子ファミリーの全26遺伝子の、上流領域4.5kbを解析対象領域として、ヒト98検体、チンパンジー50検体について塩基配列を決定する。得られた両種の全変異情報をDnaSP等のプログラムを用いてTajima's test, Fu and Li's test等により解析し、その領域の中立進化を統計的に検定する。中立からの有意なずれが観察された場合は、さらに前後の配列を追加して同様の解析を行い、特異な選択を受けた遺伝子領域をより正確に特定するとともに、EHH(Extended haplotype homozygosity)などの連鎖不平衡解析により進化のパターンを詳細に検討する。

②前年度のグルタミン酸受容体遺伝子群の研究において同定した、ヒト-チンパンジー間のアミノ酸置換を74ヶ所の全てについて他の霊長類9種の配列を決定し、ヒト特異的な(つまりヒト-チンパンジーの分岐後ヒト系譜において起こった)アミノ酸置換を同定する。また同定されたヒト特異的なアミノ酸置換がヒト集団で固定していることを、7集団からなるヒト80検体で確認する。ヒト特異的かつ固定していることが確認されたアミノ酸置換については、物理化学的性質の保存度や機能ドメインとの関係を検討することで、ヒト系譜においてグルタミン酸受容体の機能に重要な変化をもたらした塩基置換の同定を進める。また、ヒト特異的なアミノ酸置換の周辺領域については、①と同様の分子進化的解析を行い、各アミノ酸置換の進化のパターンを検討する。

③グルタミン酸トランスポーター遺伝子群及びグルタミン酸代謝酵素遺伝子群全36個の上流領域及び非同義SNP周辺領域について、①と同様の分子進化的解析を行う。

④これまでに統合失調症との有意な関連が複数の研究で報告された遺伝子の10遺伝子の上流領域及び非同義SNP周辺領域について①と同様の分子進化的手法で解析を行う。また研究遂行中に新たな統合失調症関連遺伝子が報告された場合は適宜解析対象に加えていく。

⑤以上のアプローチからヒト特異的な進化パターンを示す配列が同定された場合、CATアッセイなどの機能的解析を行い、同定された配列の生物学的意義を解明する。

## <2007年度の成果>

1) グルタミン酸受容体遺伝子上流調節領域の多型検索

NMDA型5種、AMPA型4種及びカイニン酸型5種の遺伝子上流領域の解析を行った。これまでにGRIN1は3.7 kb、GRIN2Aは1.4 kb、GRIN2Bは3.8 kb、GRIN2Cは1.8 kb、GRIN2Dは1.9 kb、GRIA1は5.1 kb、GRIA2は3.1 kb、GRIA3は3.4 kb、GRIA4は3.9 kb、GRIK1は5.3 kb、GRIK2は4.2 kb、GRIK3は2.1 kb、GRIK4は3.8 kbの解析を終えた。各遺伝子全体の中立性の検定を行ったところ、GRIN2Dにおいてヒト-チンパンジーともにFu & Li testで有意な負の値が得られ、ヒト-チンパンジーに共通した純化選択が強く示唆された。同様にGRIN2B、GRIA4、GRIK3においてチンパンジーのみで有意な負のTajima's D(それぞれ、-2.04, -1.97, -1.84,  $p < 0.05$ )が得られ、チンパンジー特異的な純化選択が強く示唆された。一方各遺伝子のウィンドウ解析では、同じくGRIN2B上流領域においてヒト特異的にTajima's Dが有意に上昇する(+2.16,  $p < 0.05$ )領域が見出され(転写開始点の上流3.0 kb付近)、この領域がヒト特異的な平衡選択を受けている可能性が示唆された。

2) GRIN2B上流領域に見られた多型の統合失調症との関連解析  
GRIN2Bの解析でTajima's Dが有意な正の値を示した領域は、

表1:グルタミン酸受容体遺伝子群で同定したヒト特異的なアミノ酸置換

遺伝子名	位置	アミノ酸配列		推定されるドメイン
		他の類人猿	ヒト	
GRIN2A	906	N	S	N-glycosylation site
GRIN2A	1006	V	A	-
GRIN2A	1221	L	M	-
GRIN2C	89	R	H	-
GRIN2C	100	G	D	-
GRIN2C	596	S	A	-
GRIN2C	933	P	S	-
GRIN2C	1021	RALPER	del	-
GRIN2C	1221	C	R	-
GRIN3A	30	G	S	N-myristoylation site
GRIN3A	71	G	D	N-myristoylation site (ヒトで消失)
GRIN3A	121	T	A	-
GRIN3A	885	S	A	-
GRIN3A	988	V	I	Casein kinase II phosphorylation site.
GRIN3A	1059	L	R	-
GRIN3B	468	V	A	N-glycosylation site
GRIN3B	499	I	L	-
GRIN3B	727	H	R	Protein kinase C phosphorylation site (ヒトで獲得)
GRIA4	5	C	S	-
GRIK5	298	P	L	-
GRIK5	809	V	I	Transmembrane
GRID1	295	M	T	-
GRID1	628	V	M	-
GRM2	6	G	A	N-myristoylation site
GRM6	125	del	GD	-
GRM6	612	H	Y	Transmembrane
GRM6	714	V	M	Transmembrane
GRM6	877	D	A	-
GRM7	520	P	A	-
GRM8	653	I	V	Transmembrane

ヒト特異的平衡選択の可能性が強く示唆される。Tajima's *D* の上昇の主な要因はこの領域に存在する2つの common SNP (rs12368476 と新規 SNP) であった。これら2つの SNP の統合失調症発症への関与を直接検討するために、日本人統合失調症罹患群 300 検体と健常対照群 300 検体を用いた関連解析を行った。その結果、有意な関連は見出されず、これらの SNP は日本人統合失調症の発症には直接の関与はしていないことが示された。

### 3) グルタミン酸受容体遺伝子群におけるヒト特異的アミノ酸置換の同定

2005 年度の特定期域研究 (課題番号 17018027) で、グルタミン酸受容体 26 遺伝子における、ヒト-チンパンジー間のアミノ酸置換 74 個を同定していた。本研究課題において、この 74 カ所の塩基置換をヒト系譜側で起きたものとチンパンジー系譜側で起きたものに選別するために、ゴリラ、オランウータンなどの他の霊長類 8 種の該当配列を決定した。その結果 41 個が、チンパンジーとの分岐後ヒト系譜側でおきた「ヒト特異的アミノ酸置換」であることを確認した。さらにそれらを世界各地の 7 集団からなるヒト 80 検体でタイピングし、そのうちの 34 個がヒトで固定していることを確認した。これら「ヒト特異的アミノ酸置換」は、チンパンジーとの分岐後に正の自然選択によってヒト集団に急速に固定した可能性がある。さらにこれら 34 個のうち、12 個は重要なモチーフの変化をもたらし、ヒト系譜において重要な機能変化をもたらしたことがアミノ酸置換であることが強く示唆された (前頁の表 1) (論文準備中)。

### <国内外での成果の位置づけ>

ヒトの系譜における正の自然選択により進化してきた遺伝子の探索は候補遺伝子アプローチ、ゲノムワイドアプローチともに盛んに行われており、脳機能に関連した一部の遺伝子についても正の自然選択が示唆されている。しかし、ヒトの適応度に極めて重要な高次脳機能に関係し、かつ平衡選択で維持されているような遺伝子多型を探索している研究は 2008 年 1 月現在他に類をみない。特にヒト-チンパンジー分岐後のヒト特異的な中立進化の検定のためにはヒトだけでなくチンパンジーの多型解析も必要となる。本研究のように類縁関係のない多数のチンパンジーサンプルから得られる、信頼度の高いチンパンジー多型情報を用いている研究は世界的にもごく少数である。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) 遺伝子の上流領域は GC リッチであることが多いため、通常の PCR 条件では増幅が困難な場合がある。本研究で対象としているグルタミン酸受容体遺伝子群の上流領域においても、PCR の条件検討に予想外の時間がかかった。しかし条件検討用のフローを整備し、またあらかじめターゲット配列の GC 含量によって増幅断片長を調整するなどして対応している。また、QIAGEN の Long PCR のキットが、GC リッチな領域の増幅の成績が大変よいことを確認し、これを標準使用する事で 1 度に解析する断片長を長くできるようになり、解析の効率化をはかることができた。

2) 実際に上流領域を解析してみると、ヒト、チンパンジーともに数多くの挿入欠失変異が観察され、新たにシークエンシングプライマーまたは PCR プライマーを設定することで対処しなくてはならない場合が予想以上に多く、時間がかかっている要因となった。

### <今後の課題>

1) グルタミン酸受容体遺伝子の上流調節領域のリシークエンシングによる全変異検出と分子進化的解析をひきつづき行う。

2) 全変異検出で得られるデュプロタイプデータから、PHASE プログラム等を用いてハプロタイプの復元解析を行うステップを、解析フローに組み込む。また将来のデータベース化に向けて検出された全変異の表示方法についても検討する。

3) グルタミン酸関連遺伝子群及び他の統合失調症関連遺伝子群の解析

同様の解析をグルタミン酸トランスポーター遺伝子群、グルタミン酸代謝酵素遺伝子群、及び統合失調症関連遺伝子群についても進める。

4) グルタミン酸受容体遺伝子群におけるヒト特異的アミノ酸置換の周辺領域における分子進化的解析

これまでに同定した 34 個のヒト特異的アミノ酸置換が高次脳機能に関連する正の自然選択によりヒト集団で急速に固定した可能性を検証するために、該当アミノ酸配列の周辺領域の多型解析をヒト及びチンパンジーで行い、上流領域の解析と同様の手法で中立進化の検討を行う。

### 5) 関連解析、機能解析

1) から 4) において、中立からの有意な逸脱が観察された領域については、統合失調症との直接の関連を、罹患群健常群各 300 検体を用いた関連解析で検討する。さらに上流領域の変異については下流の遺伝子の発現に及ぼす効果を CAT アッセイなどにより直接解析する。

以上の研究から高次脳機能に関連してヒト特異的な選択を受けた遺伝子領域を "humanness" 形成の遺伝的要因として同定し、その機能的意義の解明を目指す。

### <成果公表リスト>

#### 1) 論文/プロシーディング

関連研究として、統合失調症とグルタミン酸受容体及びトランスポーター遺伝子の関連解析 (文献 1, 3, 5) と神経変成疾患の遺伝子解析 (文献 2, 3) を発表した:

#### 1. 0801232014

Shibata H, Tani A, Chikuhara T, Kikuta R, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, *GRM4* and *GRM7*, with schizophrenia. *Psychiatric Res.* 2008. In press.

#### 2. 0801231954

Iwaki A, Kawano Y, Miura S, Shibata H, Matsuse D, Li W, Furuya H, Ohyagi Y, Taniwaki T, Kira J, Fukumaki Y. Heterozygous deletion of *ITPR1*, but not *SUMF1* in spinocerebellar ataxia type 16. *J Med Genet* 45(1): 32-5 (2008).

#### 3. 0606281711

Deng X, Shibata H, Takeuchi N, Rachi S, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N and Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes *SLC1A1*, *SLC1A3* and *SLC1A6* with schizophrenia. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 144(3):271-8 (2007).

#### 4. 0606281802

Miura S, Shibata H, Furuya H, Ohyagi Y, Osoegawa M, Miyoshi Y, Matsunaga Y, Shibata A, Matsumoto N, Iwaki, Taniwaki T, Kikuchi H, Kira J and Fukumaki Y. The *CNTN4* locus at 3p26 is a candidate gene of SCA16. *Neurology* 67(7):1236-41 (2006).

#### 5. 0601301719

Shibata H, Aramaki T, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N and Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (*GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*) with schizophrenia. *Psychiatry Res* 141(1): 39-51 (2006).

#### 2) データベース/ソフトウェア

特になし。

### <公开发表: 新聞などの報道メディア発表など>

特になし。