

ヒト高次脳機能関連遺伝子群の分子進化学的解析

●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>

ヒトの高次脳機能が形成、維持されてきた進化的な道筋とその自然選択のターゲットとなった遺伝子機能の解明をめざし、ヒトとチンパンジーを用いて比較集団遺伝学的解析及び分子進化学的解析を行う。特にヒト化のプロセスに関わったような、「古い」自然選択の検出を目指す。絞り込んだ候補遺伝子群の対象領域を複数検体で全変異検出し、頻度スペクトラム法による中立性の検定を行う。対象として、高次脳機能の障害であるヒトの精神疾患に強く関連する遺伝子群 30 個を選択し、それらの上流調節領域のリシークエンシングを行う。得られる全変異のデータを用いて中立性の検定を行い、ヒトの高次脳機能に関連するヒト特異的な自然選択のターゲットとなった遺伝子領域を同定する。自然選択が検出された遺伝子領域についてはハプロタイプ推定による連鎖不平衡解析を行うとともに、合体シミュレーションによるハプロタイプの年代推定を行う。また同定した遺伝子群の機能解析を通じて自然選択を受けた形質の実体を解明し、ヒト高次脳機能形成の進化機構のシステムの理解を試みる。

<2008 年度の研究の当初計画>

これまでに精神疾患との関連が複数の遺伝統計学的研究で強く支持された遺伝子、及び統合失調症を中心に複数の精神疾患に関連することが報告されている遺伝子のうち、前年度の特定領域研究で既に解析済みのグルタミン酸受容体遺伝子等を除く、30 遺伝子を選択した。これらの中立性の検定をヒトとチンパンジーで行う。翻訳領域よりも多様性に富み、かつ機能的解析も比較的容易な 5' 上流調節領域約 5 kb を対象に、全変異検出をすすめる。各領域をいくつかの PCR 断片に分割し、ヒト 72 検体（日本人 24、C ヨーロッパ人 24、アフリカ系アメリカ人 24）及びチンパンジー 24 検体について塩基配列決定による全変異検出を行う。得られた両種の多型情報を 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学的に検定する。有意な自然選択が検出された領域については、PHASE プログラムによるハプロタイプ推定と連鎖不平衡解析、さらに Genetree プログラムを用いた合体シミュレーションによるハプロタイプの年代推定を行う。チンパンジーでヒトと同様な中立からの有意なずれが観察された場合は、チンパンジー 24 検体をさらに追加して同様の解析を行い、ヒト及びチンパンジーで自然選択を受けた領域を詳細に検討する。ヒト特異的な自然選択のパターンを示す遺伝子領域が同定された場合、アレル間または種間の機能的解析を行う。本研究計画は上流調節領域を解析するので、同定された領域の機能をルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性測定で検討する。さらにそれぞれのタンパク質産物に適した方法（酵素活性測定、卵母細胞に導入して電気生理学的解析など）で解析を行い、同定された配列の生物学的意義を解明する。本研究計画に必要なヒト 3 大集団の計 250 検体分、およびチンパンジー 63 個体分（うち 52 個体が非血縁）のゲノム DNA は全て抽出済みである。また実験に必要な機器類はすでに現有しており、解析に必要なソフトウェアも開発済みである。

<2008 年度の成果>

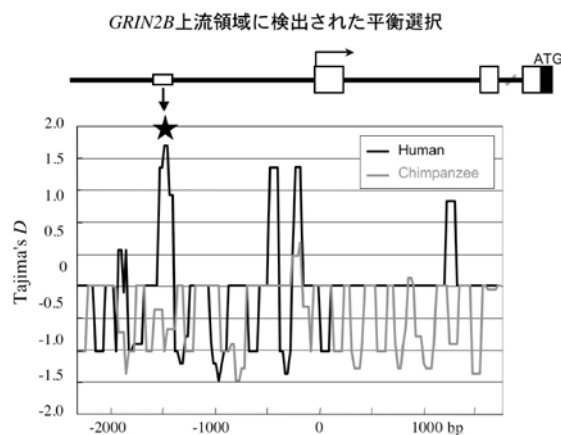
1) グルタミン酸受容体遺伝子上流調節領域の全変異検出に

による自然選択の検出

NMDA 型 5 種、AMPA 型 4 種、カイニン酸型 5 種及びメタボトロピック型 5 種の遺伝子上流領域各 4-5 kb を対象に、ヒト 72 検体及びチンパンジー 50 検体で全変異検出を行い頻度スペクトラム法 (Tajima's D (以下 TD)) による中立性の検定を行った。

①領域全体の解析では、*GRIA2*が日本人において、*GRIK5*がアフリカ系アメリカ人においてそれぞれ有意な負の TD を示し（それぞれ $TD = -2.14$, $TD = -1.94$ ）、集団特異的な純化選択が示唆された。また *GRM1* はヨーロッパ人において有意な正の TD ($+2.66$) を示し、ヒトにおける平衡選択が示唆された。またチンパンジーにおける有意な負の TD は *GRIN2B* ($TD = -2.04$)、*GRIN2* ($TD = -1.80$)、*GRIA4* ($TD = -1.99$)、*GRIK3* ($TD = -1.79$)、*GRIK4* ($TD = -1.83$) で検出されチンパンジーにおける純化選択が強く示唆された。

②ウィンドウ解析 (ウィンドウサイズ 100 bp、ステップ 20 bp) では、*GRIN2B* 転写開始点の上流 1.5 kb 付近においてヒト特異的に TD が有意な上昇 ($TD = +2.19$) 領域が見出された (下図)。同様に、*GRM1* 転写開始点の上流 3.7 kb 付近において日本人とヨーロッパ人で TD が有意な上昇 ($TD = +2.25$, $TD = +2.17$) が見出された。いずれの領域もチンパンジーでは有意な自然選択は検出されず、これらの領域はヒト特異的な平衡選択の対象となった可能性が示唆された。



2) 統合失調症関連遺伝子群の上流領域全変異検出による自然選択の検出

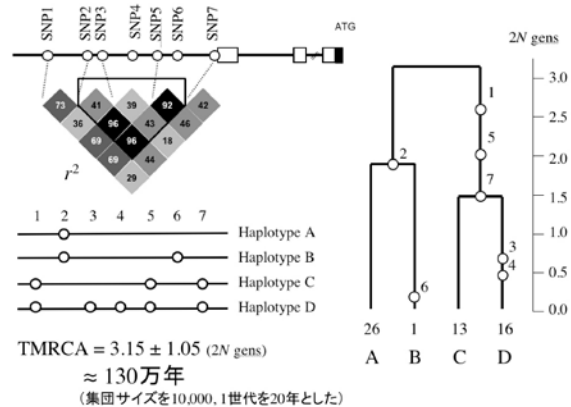
統合失調症との極めて優位な関連がメタ解析により確認されている遺伝子群のうち、*COMT*、*DRD1*、*SLC18A1* の上流領域 5 kb を対象にグルタミン酸受容体遺伝子群と同様の全変異検出を進めたが、これまでのところ中立からの有意な逸脱は観察されなかった。

3) *GRIN2B* 上流領域の連鎖不平衡解析と合体シミュレーションによるハプロタイプ年代推定

1) の②で有意な平衡選択を検出した *GRIN2B* の領域の全変異データのハプロタイプ推定と連鎖不平衡解析を行った (右頁の図)。その結果、TD 上昇のピークをなす common SNP (rs12368476) (図中の SNP2) を含む連鎖不平衡ブロック ($r^2 > 0.9$) を見出した。Genetree による合体シミュレーションを

行ったところ、平衡選択の対象となったと考えられるこの領域の2種のハプロタイプの起源は130万年前と極めて古く、平衡選択によって安定した2種のハプロタイプが維持されて来たことが示唆された。このブロック内に含まれる別のcommon SNP (rs1019385) (図中のSNP7) は、統合失調症との関連が繰り返し報告されており (Miyatake et al 2002; Di Maria et al 2004; Martucci et al 2006)、メタ解析でも極めて有意な関連が報告されている (Allen et al 2008)。したがって我々が *GRIN2B* 上流領域に見出した平衡選択は、統合失調症に関連する表現型をそのターゲットとしていると結論した。

平衡選択が検出された *GRIN2B* 上流領域のハプロタイプ年代推定



<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ゲノムワイドな多型情報の整備にともなって盛んに行われるようになり、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。しかしいずれの研究もゲノム全体の多型性の経験的分布からの逸脱を検出するもので (outlier approach と呼ばれる)、正の自然選択のみを検出し、他の様式の自然選択 (平衡選択など) は検出されない。本研究課題で目標とするヒト化のプロセスに働いたような様々なタイプの「古い」自然選択の検出を行うためには、全変異検出と頻度スペクトラム法による中立性の検定が必須となる。ヒトの適応度に極めて重要な高次脳機能に関係する自然選択を、全変異検出と頻度スペクトラム法で探索している研究は2009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自然選択の検出のために必要なチンパンジーの多型解析も必要となるが、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) 対象とする領域に繰り返し配列がある場合があり、塩基配列決定が困難になる場合もあり、逆方向からのプライマーを設定して出来る限り対処したが、繰り返し配列どうしが300 bp以下に近接している場合は内部にプライマーを設定できず、解析対象から除外せざるを得なかった。
- 2) 検出された変異は多数の挿入欠失変異を含んでいた。しかし挿入欠失変異は進化的な解釈が難しいため、解析から除外せざるを得なかった。
- 3) 遺伝子によっては (たとえば *GRM5* の上流領域など) 解析対象として設定した転写開始点を含む上流5 kb以上にわたって、パラログが存在するものがあり、PCRによる解析の対象から除外せざるを得なかった。

<今後の課題>

- 1) 精神疾患関連遺伝子群の上流調節領域のリシーケ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) 中立進化からの逸脱を検出した *GRM1* 上流領域などの全変異検出を、検体を追加して行い、合体シミュレーションによりハプロタイプ年代推定を行う。
- 4) 平衡選択が検出された *GRIN2B* 上流領域に存在するSNPの下流遺伝子に与える影響を、ルシフェラーゼコンストラクトを作製し、検討する。

<成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)
統合失調症とグルタミン酸伝達に関わる分子の遺伝子群との関連解析を文献1, 2, 4, 6として、さらに家族性神経疾患の遺伝子解析を文献3, 5として論文に発表した (いずれの研究も応用ゲノム班員服巻保幸博士との共同研究である) :
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.* 2009. In press.
2. 0806251934
Arai S, Shibata H, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Association analysis of the glutamic acid decarboxylase 2 and the glutamine synthetase genes (*GAD2*, *GLUL*) with schizophrenia. *Psychiatric Genet.* 2009. 19 (1) : 6-13 (2009) .
3. 0806261720
Miura S, Shibata H, Kida H, Noda K, Yamamoto K, Iwaki A, Ayabe M, Aizawa H, Taniwaki T, Fukumaki Y. Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy in the lower extremities, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough. *J Neurol Sci.* 2008. 273 (1-2) : 88-92 (2008) .
4. 0806251922
Deng X, Sagata N, Takeuchi N, Tanaka M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Shibata H, Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes *SLC1A4*, *SLC1A5* and the glycine transporter genes *SLC6A5*, *SLC6A9* with schizophrenia. *BMC Psychiatry.* 8 (1) : 58 (2008) .
5. 0801231954
Iwaki A, Kawano Y, Miura S, Shibata H, Matsuse D, Li W, Furuya H, Ohayagi 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) .
6. 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) .
- 2) データベース/ソフトウェア
該当なし。