

## [0020]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2005年

<https://doi.org/10.15017/6244>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 20, 2006-07. 九州大学生体防御医学研究所  
バージョン :  
権利関係 :



## ゲノム構造学分野

### Division of Genome Analysis

当部門は、突然変異検出技術 (PCR-SSCP 法) を利用したヒトゲノムの多様性解析をテーマとしてゲノムプロジェクト発足以来参画してきた。この多様性解析は全塩基配列決定後のゲノムプロジェクトの主要なテーマのひとつであり、我々はさらなる方法論および情報抽出技術を開発することにより遺伝子多型および変異が人間の疾病とどのように関わっているかを解明し、病気の予防、診断、治療に役立てることを目指している。さらに遺伝子機能解析の方法論確立のために、DNA 結合能に基づいて単離された転写因子 MIBP1 の標的遺伝子の検索および他の細胞内蛋白質との相互作用の解析を行っている。また、DNA の自己組織化能力を利用して次世代の素材・素子を開発するために、プログラミングによりナノ構造体を作製する研究も行っている。

平成 17 年度の当分野の異動は以下の通りであった。4 月より堤孝信 (システム生命科学府博士 1 年)、10 月より空閑太亮 (医学系大学院生) が新に加わった。増本和海は卒業研究後にシステム生命科学府博士 1 年に進学し引き続き在籍した。また岩本千佳、梅原敬弘 (理学部 4 年生) が卒業研究のために 1 年間在籍した。10 月には医学系大学院生の秦暢宏が米国テキサス州立大学 MD アンダーソン癌センターに留学した。

#### A. ヒトゲノム多型マーカーの大規模解析

##### a. PCR-SSCP 法に基づいた解析システムによる遺伝子転写制御領域の多型解析

個人間の遺伝的素因 (いわゆる体質) の違いはヒトゲノムの配列のわずかな違いに起因する。このような違い (多型) のなかで最も多いのが一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNP) であり、高血圧症・癌など多因子疾患の遺伝的要因の解明には SNP を用いた関連解析が有効であると考えられている。しかし、このためには多数の検体について多数の領域 (SNP) を解析する必要があり、それを可能にする効率的で低コストの方法が不可欠である。我々は従来の SSCP 法をキャピラリー電気泳動装置に応用した PLACE-SSCP 法を開発してきた。この方法は PCR 産物を末端蛍光標識し非変性条件で電気泳動を行うことにより、塩基配列の異なるフラグメントを分離するもので、SNP のスクリーニングやタイピング、プール解析による SNP アレル頻度の算出に利用できる。これまでにこの方法をマルチキャピラリーの電気泳動装置 (ABI Prism3100, 3700) に応用するなどいくつかの改良を重ね、高感度化、ハイスループット化を実現してきた。

大規模な SNP の検出およびアレル頻度算出を効率よく行うためには実験管理及び産出されたデータの処理を行うシステムの開発も重要である。我々は、試料管理、PCR プライマーの設計からシーケンシング、プール DNA の PLACE-SSCP 解析による多数の SNP のアレル頻度の決定、結果のデータベース化まで (シーケンサー・ラボロボット等の周辺機器との連携、データ取得及び解釈を含む) を一括して行う大規模な実験情報管理システム (laboratory information management system: LIMS) “dbQSNP” を構築している。このシステムは UNIX 上で稼動するリレーショナルデータベースであり、実験によるデータ収集工程

の管理を行う dbQSNP conductor , 得られた結果を web 上で公開する dbQSNP public , 及び dbQSNP conductor から dbQSNP public へデータを移行するためのツールである Transfer Tool の3部からなる . さらにこのシステムは , 米国 NCBI の公共データベースである GenBank 及び dbSNP のデータを自動的に取得しそれらに対し高速に Blast 検索を行うことで , 公開データベース更新時に配列と最新の外部情報との関連を表示するような機能を実装している . この方法を利用して遺伝子転写開始点領域の SNP 約 10,000 個を網羅的に解析し dbQSNP データベースとして公開した(<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/>).

#### **b. 遺伝子転写制御領域の多型の周期性の発見**

上記システムを用い , 転写開始点近辺に特有の SNP 密度分布を見出したことをきっかけに , 公共データベースに登録されているヒト全ゲノム中の SNP について情報学的解析を行った . その結果 , 転写開始点領域では SNP 密度にヌクレオソーム DNA の長さと一致する周期性があるという興味深い知見が得られた . さらに , 転写開始点領域を CpG アイランドを含むものとそうでないものに分類して解析したところ , CpG アイランドの配列をもつ転写開始点領域のみがこの周期性を示すことが判明した . また , 同様な周期性はヒトとチンパンジーの種間での塩基置換の分布においても認められた . これらの結果はゲノム進化において SNP の生成または維持の過程で転写開始点領域に特異的なクロマチン構造が関与している可能性を示唆する .

#### **c. 胞状奇胎を用いた全ゲノムハプロタイプの直接決定**

多因子疾患の原因遺伝子をゲノムワイドな関連解析により同定するアプローチは現実的なものとなりつつあるが , これを行うためには解析対象とする SNP の選択も重要である . そのためには日本人ゲノムの連鎖不平衡地図の情報が不可欠である . 我々はゲノム創薬・治療薬分野の和氣教授らとの協力体制のもとに単一精子由来の胞状奇胎 74 試料の DNA を用いて約 28 万個の SNP をタイピングした . これにより得られた 74 セットのゲノムワイドな確定ハプロタイプをもとに情報学的解析を行い , 日本人ゲノムのハプロタイプブロック構造を決定した . また , 関連解析を効率よく行うために tagSNP の選定を行った . これらの結果を高度検索機能を有するデータベース「D-Haplo-DB」(<http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp>) に集約し , 公開した . さらにこれらの結果と , HapMap Project で統計的に推定された日本人集団のハプロタイプを比較し , 同 project のデータの問題点を検討した . また , ここで得られた tagSNP の有用性を種々のシミュレーションから検討し , ゲノムワイドな関連解析を行った場合 , 約 60% の確率で原因遺伝子を相関係数 ( $r^2$ ) 0.8 以上として検出しようと推定した .

#### **B. 遺伝子の変異および多型と各種疾患との関連の解析**

九州大学医学部病態修復内科との共同研究で疾患感受性に関連した遺伝子多型の解析を PLACE-SSCP 法を利用して行っている . 細菌感染感受性に関わることが判明しているマンノース結合レクチン(MBL) 遺伝子上の SNP を PLACE-SSCP 法により解析し , 感受性アレルの頻度に地域差がないという結果を得た . この解析には日本人集団の遺

伝的均質性を検討する目的で作製した国内7地域のそれぞれ約400人分のDNAプールを用いた。また、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子同定のために、SNPを用いた患者対照相関解析を行っている。候補遺伝子として、免疫系細胞のシグナル伝達系遺伝子群及びアポトーシス関連遺伝子群を選定し、それぞれの遺伝子領域からSNPを検出した。得られたSNPについて患者、健常者それぞれ100名以上から作製したプールDNAにおけるアレル頻度をPLACE-SSCP法により算出した。これまでに、複数の遺伝子上のSNPが疾患と有意に関連することが見出された。現在、これらの遺伝子のハプロタイプと疾患感受性との関連を調べている。

医学部脳神経外科との共同研究では脳腫瘍抑制遺伝子を探索する目的でPLACE-SSCP法を利用した定量的ヘテロ接合性欠失(LOH)解析の手法を開発し、病態により異なる領域が欠失しているのを検出するのに成功した。

また、福岡大学眼科との共同研究で眼科領域遺伝性疾患の遺伝子診断を確立するためにいくつかの疾患に対して遺伝子解析を行っている。家族性滲出性硝子体網膜症(FEVR)の患者の遺伝子解析を行い、これまでに見出したfrizzled 4(FZD4, Wntシグナルの細胞表面受容体)の変異に加えて共受容体をコードするLRP5にも複数の突然変異を同定し、さらにLRP5に変異がある患者では骨密度も低下していることを見出した。

さらに、疾患関連解析を効率よく行うためのツールとしてWindows上で独立に作動するSNP同定、アレル頻度定量解析ソフトウェア「QSNP lite」を開発した。これは、「dbQSNP」と同様にSSCP解析によるSNPタイピング及びアレル頻度決定とシーケンシングによるSNP配列の同定、確認を統合して行うものである。また、多数サンプルの解析を行うことを可能とするための実験手順の設定、キャピラリーアレイシーケンサーからのデータ管理等を行う機能を有している。

### C. 転写因子 MIBP1 の機能解析

転写因子 MIBP1 (*c-myc* Intron 1 Binding Protein 1) は癌遺伝子 *c-myc* のイントロン1領域にある発現調節領域に結合するたんぱく質として同定された。全長 cDNA にコードされる MIBP1 は 2437 アミノ酸からなる巨大な分子で、zinc フィンガーと呼ばれる DNA 結合ドメインを N 末側と C 末側の離れた 2 箇所に持つ。したがってこの蛋白質はゲノム上の 2 ヶ所に結合し、結合した配列を引き寄せるといった機能をもつのではないかと考えられる。MIBP1 と同じファミリーに属する他の因子は免疫応答などに関わる様々な遺伝子の調節領域に結合することが知られている、しかし MIBP1 による標的遺伝子発現の詳細な分子メカニズム、及び、脳で高い発現を示す生理学的意味は不明である。

*in situ* hybridization の解析で、MIBP1 は成体ラット脳の嗅球・大脳皮質・海馬・小脳で強く発現し、ニューロンで強く、グリアではほとんど見られなかったこと、ラット胎児では胎生 16 日目から 18 日目の細胞分裂が完了したニューロンからなる大脳の cortical plate で顕著に強く発現していたことから、MIBP1 は神経細胞の分化や維持に関与している可能性が示唆されている。また、我々はマウス胚性腫細胞 P19 細胞においてレチノイン酸(RA)処理(神経細胞様に分化させるための処理)の3時間以内に MIBP1

mRNA 発現が誘導され、さらに分化後期まで発現が維持されることを見出している。これらの結果をふまえて、神経分化における MIBP1 の役割を明らかにするために、MIBP1 の発現誘導が可能な P19 細胞株を樹立した。さらに、MIBP1 と相互作用するたんぱく質を免疫沈降法により同定した。

#### D. DNA を利用したナノ構造体の設計

DNA の塩基配列は生命現象を空間的、時間的に規定する情報を担っている。即ち膨大な情報を記述しうる物質である。さらに DNA はこれらの情報を読み出すための物理化学的性質を同時に保有している。我々はこの DNA の情報記述能力とその読み出し機構、即ち ACGT の適切な並びと、A:T 及び G:C の塩基対形成能を利用して、生命を描くのではなく、1次元から3次元までのあらゆる指定されたナノ構造体を積み木細工として作製する方法を研究し、将来ナノマシンの設計に役立てようと考えている。我々は先ず、構造体を構成するオリゴヌクレオチド配列を、二段階のアルゴリズムで決定をするソフトウェアを開発した。第一段階は望ましい箇所でのみハイブリダイズする配列とその相補配列対の集合を選択するもので、全ての対合は一定の融解温度 ( $T_m$ ) の範囲に収まるように選ぶ。第二段階で、相補配列対をデザインされた形に添うように割り当て、期待する二重鎖の  $T_m$  が十分高く、それ以外の全ての望ましくない対合の  $T_m$  が十分低くなるようにオリゴヌクレオチド配列を決定する。これに従ってオリゴヌクレオチドを設計・合成し、適切な緩衝液中で混合後、加熱・徐冷によりハイブリダイズさせ所定の構造を形成させアガロース電気泳動によって確認した。構造体の可視化、評価は原子間力顕微鏡により行った(生体分子計測研究所との共同研究)。本年度は AAMOT (Almost Anything Made Of Triangles) と我々が名付けた正三角形を基盤としたデザインシステムに特化したプログラムを開発し、これに基づいたチューブ構造などの3次元の複雑な構造体の作製を確認した。

## 業績目録

### 原著論文

1. Horiuchi T, Gondo H, Miyagawa H, Otsuka J, Inaba S, Nagafuji K, Takase K, Tsukamoto H, Koyama T, Mitoma H, Tamimoto Y, Miyagi Y, Tahira T, Hayashi K, Hashimura C, Okamura S, Harada M. 2005.  
Association of MBL gene polymorphisms with major bacterial infection in patients treated with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT.  
Genes Immun. 6, 162-166.
2. Tahira T, Baba S, Higasa K, Kukita Y, Suzuki Y, Sugano S, Hayashi K. 2005.  
dbQSNP: a database of SNPs in human promoter regions with allele frequency information determined by single-strand conformation polymorphism-based method.

Human Mutation, 26, 69-77.

3. Qin M, Hayashi H, Oshima K, Tahira T, Hayashi K, Kondo H. 2005.  
Complexity of the genotype-phenotype correlation in familial exudative vitreoretinopathy with mutations in the LRP5 and/or FZD4 genes.  
Human Mutation, 26, 104-112.
4. Shikata K, Kukita Y, Matsumoto T, Esaki M, Yao T, Mochizuki Y, Hayashi K, Iida M. 2005.  
Gastric juvenile polyposis associated with germline SMAD4 mutation.  
Am. J. Med. Genet., 134, 326-329.
5. Kukita Y, Miyatake K, Stokowski R, Hinds D, Higasa K, Wake N, Hirakawa T, Kato H, Matsuda T, Pant K, Cox D, Tahira T, Hayashi K. 2005.  
Genome-wide definitive haplotypes determined using a collection of complete hydatidiform moles.  
Genome Res., 15, 1511-1518.
6. Hata N, Yoshimoto K, Yokoyama N, Mizoguchi M, Shono T, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Guan Y, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K. 2005.  
Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis.  
Clin. Chem., 52, 370-378.
7. Higasa K, Hayashi K. 2006.  
Periodicity of SNP distribution around transcription start sites.  
BMC Genomics, 7, 66.
8. Qin M, Kondo H, Uno H, Fujiwara E, Uchino E, Tahira T, Hayashi K. 2006.  
Novel OPA1 mutations identified in Japanese pedigrees with optic atrophy.  
Molecular Vision, 12, 485-491.
9. Asakawa T, Nishi K, Mizuno R, Yoneda K, Okada T, Hayashi K. 2006.  
Build-to-order nanostructures using DNA self-assembly.  
Thin Solid Films. 509, 85 – 93.
10. Jespersgaard C, Larsen LA, Baba S, Kukita Y, Nakamura M, Higasa K, TahiraT, ChristiansenM, Vuust J, Hayashi K, Andersen PS. 2006.  
Optimization of capillary array electrophoresis single strand conformation polymorphism (CAE-SSCP) analysis towards routine molecular diagnostics.

Electrophoresis, in press.

11. Hata N, Shono T, Yoshimoto K, Yokoyama N, Kawamura T, Nagata S, Matsumoto K, Hayash K, Iwaki T, Sasaki T. 2006.

An astroblastoma case associated with loss of heterozygosity on chromosome 9p.

J. Neurooncol, in press.

## 学会発表

1. 浅川剛, 堤孝信, 水野里香, 米田和弘, 春田洋孝, 岡田孝夫, 林 健志 (2005, 12/7-10)  
Build-To-Order DNA Nanostructures In the Triangle-Based Design System  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
2. 増本和海, 田平知子, 日笠幸一郎, 浅川剛, 久木田洋児, 林 健志 (2005, 12/7-10)  
タグ配列付加プライマーを用いることによるPLACE-SSCP法でのSNP検出感度の改善  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
3. 坂口大志, 山井美沙, 宮川弘, 堀内孝彦, 塚本 浩, 田平知子, 林 健志 (2005, 12/7-10)  
全身性エリテマトーデス(SLE)疾患感受性遺伝子の大規模探索  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
4. 宮武克行, 久木田洋児, Renee Stokowski, David Hinds, 日笠幸一郎, 和氣徳夫, 平川俊夫, 加藤秀則, 松田貴雄, Krushna Pant, David Cox, 田平知子, 林 健志 (2005, 12/7-10)  
胞状奇胎を用いた全ゲノムハプロタイプの直接決定  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
5. 秦 明輝, 林 英之, 大島健司, 田平知子, 林健志, 近藤寛之 (2005, 12/7-10)  
Complexity of the genotype-phenotype correlation in familial exudative vitreoretinopathy with mutations in the LRP5 and/or FZD4  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡
6. Koichiro Higasa, Yoji Kukita, Tomoko Tahira and Kenshi Hayashi (2005, 5/11-15)  
Periodicity of SNP distribution around transcription start sites  
19th annual meeting on genome science, Cold Spring Harbor, USA
7. Kukita Y, Miyatake K, Stokowski R, Hinds D, Higasa K, Wake N, Hirakawa T, Kato H,

Matsuda T, Pant K, Cox D, Tahira T, Hayashi K. (2005, 10/25-29)

A genome-wide definitive haplotype structure determined using a collection of complete hydatidiform moles.

56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics,  
Salt Lake City, USA



## ゲノム機能学分野

### Division of Disease Genes

当研究室では、一個の遺伝子の異常により起きる単一遺伝子病や、複数の遺伝子と環境因子の相互作用により発症する多因子病の解析と共に、ストレスや薬物への応答遺伝子の解析を行うことにより、遺伝情報制御機構の観点から生命現象を理解することを目指しており、さらに疾病の診断および治療法の確立にも寄与したいと考えている。

2005 年の研究室への新たな参加者は歯学府博士課程2年の新井 伸作、システム生命科学府博士課程1年として、岡山大学出身の田中 邦佳、九州大学理学部 4 年生の蘭 直純、福吉 由起、および事務補佐員の峰尾 さやかである。また科学技術振興調整費による特別研究員の後藤 大輝は、2006 年 3月にペンシルバニア州立大学に分子進化学研究のためポスドクとして渡米した。

#### A. 統合失調症の分子基盤の解明

統合失調症は主に思春期に発病し、幻覚、妄想、思考障害などの陽性症状や、感情の平板化、寡動、意欲・自発性の欠如などの陰性症状を特徴として、多くは慢性に経過する頻度の高い精神疾患である。複雑な遺伝様式から多因子病と考えられており、同胞発症相対リスク  $\lambda_s$  は 10 程度であり遺伝子の関与が高いことが知られている。この疾患の感受性遺伝子を同定し、分子機構を解明するために、遺伝統計学的、機能ゲノム学的および発生工学的アプローチをとっている。

##### a. 罹患同胞対解析

JSSLG (Japanese Schizophrenia Sib-Pair Linkage Group) として、1次罹患同胞対連鎖解析終了後、検体の集積を続け先の解析で用いた 122 家系由来のサンプルを含む 236 家系の 268 罹患同胞対について、5,861 個の SNP (Illumina Bead Array Linkage Panel IV) を用いて解析を行った。連鎖不平衡状態の SNP を除き MERLIN での解析により、1p21.2-1p13.2 (LOD=3.39) に連鎖が認められ、また 14q11.2-q13.2 (LOD=2.33) と 20p12.1-p11.2 (LOD=2.33) に連鎖が示唆された。これらの領域は Lewis(2003)らによるメタ解析で指摘されている 10 の連鎖領域にほぼ含まれるが、これまでそれほど注目されていなかった領域でもある。今回の解析はアジアの単一集団を対象とした大規模な罹患同胞対解析としては現在のところ唯一の研究である。以上の結果から異なる集団間で共通の疾患感受性遺伝子が存在するものの、それらは集団特異的な効果を有していることが考えられた。

##### b. 関連解析

(1) 候補遺伝子関連解析: 統合失調症の「グルタミン酸伝達異常仮説」に基づきグルタミン酸受容体遺伝子群の包括的な関連解析を進めている。その際遺伝子全領域を対象とすること、また検出力を上げることを目指し、全領域にわたりほぼ等間隔に SNP を選択し、SNP 間の連鎖不平衡(LD)の程度を考慮したローカスワイド関連解析を行っている。

NMDA受容体のアンタゴニストであるPCPIにより統合失調症様症状が生じることから、NMDA受容体サブユニット遺伝子は統合失調症感受性候補遺伝子として注目される。そこで *GRIN2D* を対象に関連解

析を行った。全てのエクソンとエクソン-イントロン境界およびエクソン1の5'上流1.7 kbの領域について32人の日本人統合失調症検体を用いて多型の検索を行った。その結果13個のSNPと1個のSTRを見出した。これらのSNPから頻度およびHardy-Weinberg平衡を加味して有用なSNPを選択し、これにデータベースから選択したイントロン10のSNPを新たに加えた合計7個のSNPについて、統合失調症例群201名と、健常群221名の検体についてタイピングを行った。ゲノタイプとアレル頻度について両群間での比較を行ったが、いずれのSNPについても有意差は認められなかった。各SNP間のLDを検討したところ、SNP4-SNP5間を除きLDが保たれていた。ペアワイズのハプロタイプ関連解析を行ったところ、SNPによる5種類の組み合わせによるハプロタイプに有意差が認められた。多重検定のためFDR(BL法)による補正を行ったところ、閾値の $P$ 値が $2.908 \times 10^{-3}$ においてSNP3-SNP6、SN5P-SNP6、SNP6-SNP7の有意差が確認された。これらの結果から*GRIN2D*が統合失調症の発症に関連していることと結論した。

一方統合失調症の死後脳のマイクロアレイ解析を含めた発現解析からシナプス関連遺伝子の疾患への関与が示唆されている。そこで当該遺伝子のローカスワイド関連解析を、平成14年度から日本学術振興会による論博プログラムの支援を受けている韓国の江原大学医科学研究所講師のLee Hee Jae氏が行った。その結果シナプシン2遺伝子(*SYN2*)とコンプレキシン2遺伝子(*CPLX2*)の特定のハプロタイプにおいて、多重検定の補正後の $P$ 値がそれぞれ $1.92 \times 10^{-2}$ および $9.0 \times 10^{-3}$ を示し、これらの遺伝子と疾患との関連が明らかになった。

(2) ゲノムワイド関連解析: 先の罹患同胞対解析から効果の弱い遺伝子の関与が示唆された。このような遺伝子の検出には関連解析が有力であることから(Risch, 2000)、ゲノムワイドな関連解析をスタートした。九州大学生体防御医学研究所 山本 健 博士および東海大学医学部 猪子 英俊 博士の協力を得て、ゲノムワイドに分布した約27,000個のマイクロサテライトマーカーにつき、プールした1次サンプル(罹患群、健常群の157検体ペア)を用いた関連解析を行った。またサンプルについては藤田保健衛生大学医学部精神医学教室 岩田 仲生 博士、および名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野 尾崎 紀夫 博士の協力を得た。データ取得マーカー数26,962個であり、そのなかで有意マーカー数は3,242(12.0%)であった。1~18番、20番染色体はほぼ終了した。これと並行して2次サンプル(罹患群、健常群の150検体ペア)を用いてマーカーの絞り込みを行った。データ取得マーカー数2,176個であり、その中で有意マーカー数720(33.1%)であった。1~5番染色体、9~18番染色体、20番染色体についてはほぼ終了している。今後2次スクリーニングを終了し、3次スクリーニングによるさらなる絞り込み、ついで、4次スクリーニングによる個別タイピングによる有意マーカーの選別と、その付近のSNPを用いたタイピングにより、統合失調症感受性遺伝子の同定を行う予定である。

### c. 精神作用薬応答遺伝子群の探索

NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストであるPCPは統合失調症様症状を引き起こすことが知られている。PCP投与(5 mg/kg)1時間および4時間後のラットの大脳の5部位(内側前頭皮質、側坐核、線条体、海馬、後帯状皮質)から、マイクロアレイ(Agilent Technologies, G4105A)を用いて生食投与群に比べ1.5倍以上の変化を来す90種類の遺伝子を見出した。その中で2.5倍以上の変化を来す12種類の遺伝子を定量的RT-PCR法により確認した。現在それらについてのローカスワイド関連解析を行っている。今後これを進めることにより、疾患感受性遺伝子の同定を目指す。

#### d. 変異マウスの作製

先に遺伝統計学的解析により関連が認められた *GRIA4* について個体レベルでの機能解析を行うためにノックアウトマウスを作出した。現在行動解析のための戻し交配とともに、組織レベルでの他の AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの分布や発現の変化を検討中である。また同様に関連を認めた *GRM3* についてもノックアウトマウスを作出中である。

#### B. 遺伝性脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) の分子機構の解明

遺伝性脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) は九州大学神経内科によって見出された常染色体優性遺伝形式をとる緩徐進行性の中樞神経の変性症である。4 世代にわたる家系を対象に 776 個のマイクロサテライトマーカを用いてゲノムワイドに連鎖解析を行ったところ、3p26.2-pter の 3.3 Mb の領域に連鎖が認められた (MLS 5.18)。ついでこの領域の存在する 7 個の遺伝子のエクソン、およびエクソン-イントロン領域について変異検索を行った。その結果、コンタクチン 4 遺伝子 (*CNTN4*) に家系内の罹患者全員が有し、健康者 520 名には存在しない 1 変異を見出した。

#### C. Pelizaeus-Merzbacher 病の病因解析

中樞神経系の髄鞘形成不全を特徴とする Pelizaeus-Merzbacher 病は PLP 遺伝子 (*PLP1*) の点変異だけでなく、*PLP1* を含む大きなゲノム領域の重複や欠失によっても引き起こされる。今年度は異なるタイプの遺伝子異常による極めて稀な PLP 欠損型 PMD (PLP null 症候群) 2 例を見出した。さらに各々について遺伝子構造変化を詳細に調べ、その機能的解析を行った。*PLP1* は量的効果のある遺伝子であり発現量の厳密な制御が重要であることから、遺伝子発現調節機構の研究をエピジェネティックな側面も含め進めている。

#### D. グルタミン酸受容体遺伝子の比較ゲノミクス

ヒトにおける高次脳機能の進化機構の解明を目的として、グルタミン酸受容体遺伝子の比較ゲノム研究を開始した。本年度はその基礎データとして、グルタミン酸受容体遺伝子群 26 遺伝子のほとんどにあたる 21 遺伝子の全翻訳領域とその上流約 1kb のチンパンジーにおける塩基配列の決定を行った (国立情報研の藤山 秋佐夫博士、理研の豊田 敦博士、黒木 陽子博士、北里大の服部 正平博士らとの共同研究)。その結果、いずれのグルタミン酸受容体遺伝子についても  $Ka/Ks$  はヒト-チンパンジーともに平均よりも小さく、翻訳領域への強い進化的制約が示唆された。またヒト-チンパンジー間でのアミノ酸置換を 78 箇所同定した。これら全てについて他の類人猿 4 種及びその他の霊長類 5 種について該当配列を解析し、ヒト特異的アミノ酸置換を 21 箇所同定した。

### 業績目録

#### 原著論文

1. Makino, C., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y. 2005.

Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene,

- GRIN2D, and association study with schizophrenia.  
*Psychiatr. Genet.* 15: 215-221.
2. Lee, H.J., Song, J.Y., Kim, J.W., Jin, S.Y., Hong, M.S., Park, J.K., Chung, J.H., Shibata, H., and Fukumaki, Y., 2005  
Association study of polymorphisms in synaptic vesicle-associated genes, *SYN2* and *CPLX2*, with schizophrenia.  
*Behav. Brain Funct.* 1: 15(7 pages)
3. Furuya, H., Shinnoh, N., Ohyagi, Y., Ikezoe, K., Kikuchi, H., Osoegawa, M., Fukumaki, Y., Nakabeppu, Y., Hayashi, T., Kira, J., 2005.  
Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformant.  
*Biochem Pharmacol.* 69: 503-516, 2005.
4. JSSLG: Arinami, T., Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Ujike, H., Tanaka, Y., Morita, Y., Mineta, M., Takeichi, M., Yamada, S., Imamura, A., Ohara, K., Shibuya, H., Ohara, K., Suzuki, Y., Muratake, T., Kaneko, N., Someya, T., Inada, T., Yoshikawa, T., Toyota, T., Yamada, K., Kojima, T., Takahashi, S., Ohmori, O., Shinkai, T., Nakamura, M., Fukuzako, H., Hashiguchi, T., Niwa, S., Ueno, T., Tachikawa, H., Hori, T., Asada, T., Nanko, S., Kunugi, H., Hashimoto, R., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Arai, H., Ohmura, T., Kusumi, I., Koyama, T., Yoneda, H., Fukumaki, Y., Shibata, H., Kaneko, S., Higuchi, H., Yasui-Fukrukori, N., Numachi, Y., Itokawa, M. and Okazaki, Y., 2005.  
Genome-wide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosome 1p, 14q, and 20p.  
*Am. J. Hum. Genet.* 77,
5. Shibata, H., Aramaki, T., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, O., and Fukumaki, Y., 2006.  
Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (*GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*) with schizophrenia.  
*Psychiatry Res.* 141, 39-51.
6. Deng, X., Shibata, H., Takeuchi, N., Rachi, N., Sakai, M., Hideaki Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, O., and Fukumaki, Y., 2006.  
Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes *SLC1A1*, *SLC1A3* and *SLC1A6* with schizophrenia.  
*Am. J. Med. Genet.* In press.
7. Miura, S., Shibata, H., Furuya, H., Ohyagi, Y., Osoegawa, M., Miyoshi, Y., Matsunaga, H., Shibata, A., Matsumoto, N., Iwaki, A., Taniwaki, T., Kikuchi, H., Kira, J. and Fukumaki, Y., 2006.  
The *CNTN4* locus at 3p26 is a candidate gene of SCA16  
*Neurology.* In press.

## 総説

服巻 保幸. 2006.

グルタミン酸受容体遺伝子のポリモルフィズム  
CLINICAL NEUROSCIENCE 24: 210-214.

## 学会発表

1. Deng, X., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N., and Fukumaki, Y. (4/18-21, 2005)  
Association study of the glutamate transporter genes, *SLC1A1* and *SLC1A2* with schizophrenia in the Japanese population.  
HUGO's 10<sup>th</sup> Human Genome Meeting, Kyoto, Japan.
2. 後藤 大輝, 柴田 弘紀, 高司 雅文, 二宮 英彰, 田代 信継, 服巻 保幸 (9/19-22, 2005).  
5q33.1 領域における統合失調症感受性遺伝子の検索.  
日本人類伝学会第 50 回大会, 倉敷.
3. 三浦 史郎, 柴田 弘紀, 古谷 博和, 松永 宏美, 三好 安, 子副川 学, 大八木 保政, 山田 猛, 谷脇 考恭, 吉良 潤一, 服巻 保幸 (9/19-22, 2005).  
脊髄小脳失調症 16 型の遺伝子解析.  
日本人類伝学会第 50 回大会, 倉敷.
4. Fukumaki, Y. (9/28-30, 2005).  
Genome-wide linkage and association studies of schizophrenia.  
第 48 回神経化学学会大会, 福岡.
5. 後藤 大輝, 柴田 弘紀, 高司 雅文, 二宮 英彰, 田代 信維, Ngamwong Jarusuraisin, 服巻 保幸 (10/1, 2005).  
統合失調症感受性遺伝子候補領域 5q33.1 におけるローカスワイド関連解析.  
第 13 回日本精神・行動遺伝医学学会, 福岡.
6. Furuya, H., Ikezoe, K., Hayashi, T., Fukumaki, Y., Nakabeppu, Y., Kira, J. and Fujii, N. (10/19-22, 2005)  
Some flavonoids prevent cis- and trans-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell transformants.  
5<sup>th</sup> The International Myotonic Dystrophy Consortium, Quebec, Canada.
7. Goto, H. Shibata, H., Takaji, M., Ninomiya, N., Tashiro, T., Jarusuraisin, N. and Fukumaki, Y. (10/25-29, 2005).  
Locus-wide association study in the 5q33.1 region for schizophrenia susceptibility genes.  
55th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. Salt Lake City, Utah, USA.
8. 服巻 保幸 (12/7-10, 2005).  
多因子病のゲノム解析 糸口として.  
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
9. 岩城明子, 松本直樹, 越智昌子, 鳥巢浩幸, 吉良龍太郎, 原寿郎, 竹下研三, 服巻保幸 (2005, 12/7-10).  
Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝子解析: PLP 欠損を招く新たな機構.  
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
10. Deng, X., Rachi, S., Sakai, M., Takeuchi, N., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N. and Fukumaki, Y. (12/7-10, 2005).  
Association study of the glutamate transporter genes, *SLC1A3* and *SLC1A6* with schizophrenia in the Japanese population.  
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
11. 竹内 尚子, 境 真由美, 鄧 湘東, 柴田 弘紀, 二宮 英彰, 田代 信維, 岩田 伸生, 尾崎 紀夫, 服巻 保幸 (12/7-10, 2005).

- 中性アミノ酸トランスポーター1型及び2型遺伝子(*SLC1A4, SLC1A5*)と統合失調症との関連解析.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
12. 柴田 弘紀, 後藤 大輝, 田中 邦佳, 黒木 陽子, 豊田 敦, 服部正平, 榊 佳之, 藤山 秋佐夫, 服巻 保幸(12/7-10, 2005).  
ヒト-チンパンジー分岐後におけるグルタミン酸受容体遺伝子群の分子進化学的解析.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
13. 佐方 功明, 荒巻 敏寛, 岩城 明子, 川上 良介, 伊藤 功, 藏 忍, 續 輝久, 服巻 保幸 (12/7-10, 2005).  
AMPA型グルタミン酸受容体サブユニット GluR4 KO マウスの作製とその解析.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
14. 後藤 大輝, 柴田 弘紀, 高司 雅史, 二宮 英彰, 田代 信維, Jarusuraisin Ngamwong, 服巻 保幸 (12/7-10, 2005).  
ローカスワイド関連解析による統合失調症感受性遺伝子の探索.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
15. 古谷 博和, 岩城 徹, 鈴木 諭, 野田 和人, 池添 浩二, 岩城 明子, 服巻 保幸, 藤井 直樹(12/7-10, 2005).  
eIF2Bに遺伝子変異を認めない成人発症 leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM) 症例の分子病理学的解析.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
16. 三浦 史郎, 柴田 弘紀, 古谷 博和, 松永 宏美, 三好 安, 子副川 学, 大八木 保政, 山田 猛, 谷脇 考恭, 吉良 潤一, 服巻 保幸(12/7-10, 2005).  
脊髄小脳失調症16型の原因遺伝子の探索.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
17. 柴田 篤志, 岩城 明子, 服巻 保幸(12/7-10, 2005).  
人工 pri-mRNA 発現系を用いたジーンサイレンシング.  
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.