九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

[0016]九州大学生体防御医学研究所年報 第16号 : 2001年

https://doi.org/10.15017/6303

出版情報：九州大学生体防御医学研究所年報. 16, 2002-09. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン：
権利関係：

遺伝情報実験センター

Research Center for Genetic Information

ゲノム構造学分野

Division of Genome Analysis

2001 年２月にヒトゲノムの全塩基配列の概要が２つのグループにより論文として発表された．この成果は，1989 年から国際協力研究として本格的に推進されてきた“ヒトゲノムプロジェクト”の第一の目標，全塩基配列の解明が目前にあることを示す．予定より早くここまで到達した背景には，ここ数年における塩基配列解析技術および情報処理技術の革新的な進歩がある．当研究室は，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計画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，当研究室ではさらなる方法論の開発および情報抽出技術の開発を目指している．ヒトゲノムの全塩基配列の解明は，生物学・医学に計りしれない影響を与えるものであるが，膨大なデータをいかに有用なものとするかは研究者全員に与えられた大きな課題である．遺伝情報の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．

平成 13 年度の当分野の異動は以下の通りであった．分子生命系大学院博士課程３年であった福田信治は研究課題 "Characterization of a transcription factor, c-myc intron binding protein 1 (MIBP1): Its function and mRNA distribution" により理学博士号を取得した．医学系博士課程４年の吉本幸司は研究課題 "Multiplexed analysis of post-PCR fluorescence-labeled microsatellite alleles and statistical evaluation of their imbalance in brain tumor" により医学博士号を取得した．当教室理学系修士課程終了後大塚 GEN 研究所研究員となった山崎有喜は研究課題 "Genetic analysis of the diabetes-related locus in rat: Genetic dissection of OLETF rat and construction of high-density comparative map" によって理学博士号を取得した．４月より理学部生物学科の中村道大，福地成彦が大学院修士 1 年に進学し，学部４年次の卒業研究に引き続き在籍した．分子生命系大学院博士課程１年として中司賢一が新に加わり，また当分野にて理学系修士課程を修了した秋枝静香は引き続いて博士課程に進学した．博士課程修了後，技能補佐員として研究を続けていた鈴木亜香里は９月に理化学研究所の特別研究員（ポスドク）として採用され就職した．理学系修士課程終了の大野研は大塚製薬研究所研究員として就職した．

A. PCR-SSCP 法による一塩基多型マーカー(SNP)の大規模解析

ヒトゲノムの配列は個人によってわずかな違いがあり，このような違い（多型）が個人間の遺伝的素因（いわゆる体質）の違いをもたらす．典型的な遺伝病のみならず，すべての疾患の発症には遺伝的素因が関与するため，ゲノム配列の多様性を解析することは医学的にも重要である．多型のなかで最も多いのが一塩基多型(single nucleotide polymorphisms : SNP) で，二本の染色体を比べると平均して約 1 kb に１つ存在する．SNP の一部は遺伝子産物の質や量の差をもたらす．一方，直接の遺伝的素因とはならないがマーカーとして有用な SNP も多数あると期待されている．このような期待のもとに SNP は世界規模で収集されてデータベースに登録されてお

り，その数は数百万個以上に達している．

我々はPCRを利用してゲノム上の突然変異を極めて迅速かつ容易に検出するPCR-SSCP法を開発し，さらにPCR産物の蛍光標識ヌクレオチドによる標識法（Post-PCR Labeling）と，標識産物のキャピラリー式の蛍光自動シーケンサーによる分離（Automated Capillary Electrophoresis）を組み合わせたPLACE-SSCP法を開発した．PCR-SSCP法は一塩基の配列変化を検出できるのでSNPの検出に役立つことは言うまでもないが，さらにプールした検体中でのSNPのアレル頻度を正確に求めることができるという特徴がある．いままでデータベースに登録されているSNPのほとんどはそのアレル頻度が調べられていないため，対象とする人種でどの程度多型性を示すかを検討する必要があるが，PLACE-SSCP法により効率的に調べることができる．さらに，SNPを用いて疾患感受性を規定する遺伝子を見つけ出すためには，多くの人のDNA解析を行い，その病気に罹っている人とそうでない人の間で特定の配列が偏って出現するかどうかを統計的に解析する必要があるが，PLACE-SSCP法はこのような解析にも適している．

ゲノム上に高密度に存在するSNPを人手をかけずに効率よく解析するために，我々はキャピラリーアレイ蛍光自動シーケンサーを用いたPLACE-SSCP法のシステムを開発している．このシステムは大量解析を行うので必然的に大量のデータ処理も必要となる．効率的にしかも正確にSNPの頻度の決定を行うためのソフトウエアのシステム開発にも取り組み，多型解析に必要な情報の方法論の開発に全力をあげている．また，実験で得られたSNP情報をデータベースとして公開し，いろいろな研究に役立てたいと考えている．

B. 遺伝子の変異および多型と各種疾患との関連の解析

我々が開発した蛍光ポストラベル法を用いるとマイクロサテライトマーカー（2−4塩基からなる繰り返し配列）の解析も効率よく行うことができる．さらに数種のマイクロサテライトマーカーを異なる蛍光色で標識し，かつPCR産物の長さを変えることで一回の電気泳動で多数のマーカーを解析する，すなわちマイクロサテライトの増幅後蛍光標識とマルチプレックス化解析法を確立した．これによって連鎖解析をきわめて容易かつ安価におこなえるようになった．この方法を利用して，眼科領域の遺伝性疾患である家族性滲出性硝子体網膜症の連鎖解析をおこない，疾患原因遺伝子の局在を決定することが出来た．

多くの癌では癌抑制遺伝子の欠失が，その発症・進行に関与している．当研究室では脳腫瘍における遺伝子欠失領域の局在を多数のマイクロサテライトマーカーを用いたLOH (loss of heterozygosity)解析により検討し，病態による遺伝子変化の違いを明らかにし，診断に役立てようとしている．

LOH解析は癌抑制遺伝子同定のための手段であり，現在までグリオーマでも多くの報告がある．その結果グリオーマの組織別にLOH解析の結果に特徴があることが示唆されている．例えば，染色体10番のLOHがglioblastomaに多く，染色体1番短腕(1p)，19番長腕(19q)のLOHがoligodendrogliomaに極めて高頻度に見られることが知られている．Oligodendrogliomaはastrocytomaより比較的予後が良く，化学療法に反応しやすいため臨床的に病理診断が重要な意味合いを持つが，診断時の確実なマーカーがなく，しかもoligoastrocytomaのようなmixed tumorなどの存在もあり病理診断にばらつきがあるのが現状である．そうした中で1p,19qのLOHがoligodendrogliomaの分子マーカーになり得るのではないかという可能性が模索されている．また，anaplastic

oligodendroglioma の中でも 1p LOH がある場合は化学療法に反応しやすいという報告もあり，臨床の現場での治療方針決定にゲノム解析が応用される可能性が開けてきた．しかし，腫瘍組織を解析する場合，正常組織の混入や腫瘍細胞の heterogenity の問題があり，客観的な LOH 判定が出来ない場合が多い．このため，報告によって LOH の頻度にばらつきがある．そこで我々はアレルを定量的に評価し，統計的な処理を行う解析システムを確立した．これによってLOHを客観的に判定する方法を確立しグリオーマのLOH解析を行った．その結果，1pLOHだけではoligodendrogliomaのマーカーになり得ず，むしろ10qのLOHがoligodendrogliomaとastrocytomaの識別診断に有用であるという結論に至った．

一方，マイクロサテライトの体細胞中での複製の誤りが癌発生の原因の一つであることが知られている（マイクロサテライト，或いは単純繰り返し配列の複製時不安定性）．そこで我々はマイクロサテライトを持つ哺乳動物細胞一大腸菌間のシャトルベクターを開発し，これが大腸がん由来培養細胞中で複製するときの誤りの「くせ」を解析した．この結果，マイクロサテライトを複製するときに DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA から脱落しやすくなる傾向があることを示唆する結果を得た．

当研究室では今後も遺伝子解析技術を生かして臨床の医学研究者と共同研究を行い，ヒトゲノム情報を医学に役立て，一方ヒトの生物学の知識を深めていきたいと考えている．

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蛋白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ヵ所に結合し，結合した配列を引き寄せるという機能をもつのではないかと考えられる．MIBP1 と同じ MHC-binding protein (MBP) 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．

MIBP1 の機能を解明するため，まず CAT アッセイにより MIBP1 が c-*myc* の発現に及ぼす影響を調べた．全長 MIBP1 は c-*myc* の P2 プロモーターからの転写を抑制することがわかった．次に yeast two-hybrid system を用いて MIBP1 と相互作用する蛋白質の検索を行い，核蛋白質 Ski-interacting protein (SKIP) を同定した．MIBP1 と SKIP の相互作用は *in vitro*, *in vivo* の両方で起きることが確認された．さらに MIBP1 を発現している細胞，組織を同定するために *in situ* hybridization を行ったところ，MIBP1 は成体ラット脳の嗅球，大脳皮質，海馬，小脳で強く発現していた．この発現はニューロンで強く，グリアではほとんど見られなかった．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．以上の結果から MIBP1 は神経細胞の分化や維持に関与しており，その機構に c-*myc* の発現調節や SKIP との相互作用が関わっている可能性が示唆された．

D. DNA を利用したナノ構造体の設計

DNA の塩基配列は例えば哺乳動物の生命現象を空間的，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，多彩な立体構造を規定し，かつその構造を DNA 自身によって自律的に形成させることを試みている（知的財産保護の観点から詳述せず）．即ち高次構造を規定する塩基配列選択のアルゴリズム開発，これを用いた実際の高次構造自律形成，形成された構造の確認，これを利用した多種の利用法の策定と実施を行っている．

業績目録

原著論文

1. Sasaki, T., Tahira, T., Suzuki, A., Higasa, K., Kukita, Y., Baba, S and Hayashi, K. 2001.
   Precise estimation of allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms by a quantitative SSCP analysis of pooled DNA.
   Am. J. Hum. Genet. 68, 214-218.
2. Suzuki, A., Maruno, A., Tahira, T. and Hayashi, K. 2001.
   Polar alteration of short tandem repeats (STRs) in mammalian cells.
   Mut. Res. 474, 159-168.
3. Harashima, S., Horiuchi, T., Hatta, N., Morita, C., Higuchi, M., Sawabe, T., Tsukamoto, H., Tahira, T., Hayashi, K., Fujita, S. and Niho, Y. 2001.
   Outside-to-inside signal through the membrane TNF-a induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells.
   J. Immunology 22, 130-136.
4. Kondo, H., Ohno, K., Tahira, T., Hayashi, H., Oshima, K. and Hayashi, K. 2001.
   Delineation of the critical interval for the familial exudative vitreoretinopathy gene by linkage and haplotype analysis.
   Hum. Genet. 108, 368-375.
5. Chawengchao, B., Petmitr, S., Ponglikitmongkol, M., Chanyavanich, V., Sangruji, T., Theerapuncharoen, V., Hayashi, K. and Thangnipon, W. 2001.
   Detection of a novel point mutation in the p53 gene in grade II astrocytomas by PCR-SSCP analysis with additional Klenow treatment.
   Anticancer Res. 21. 2739-2744.
6. Tahira, T., Higasa, K., Suzuki, A., Kukita, Y., Baba, S. and Hayashi, K. 2001.

A semi-automated data-processing system for large-scale determination of SNP allele frequency by SSCP.
Am. J. Hum. Genet. 69: (4) Suppl. 1, 459.

7. Kukita, Y., Higasa, K., Baba, S., Nakamura, M., Manago, S., Suzuki, A., Tahira, T. and Hayashi, K. 2001.
A high throughput SSCP method for large-scale analysis of SNPs/mutations using capillary-array electrophoresis system.
Am. J. Hum. Genet. 69: (4) Suppl. 1, 460.

8. Kawasaki, H., Mitsuyasu, H., Maeda, N., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Housman, D. E., Graybiel, A. M., Hayashi, K and Tashiro, N. 2001.
Polymorphism analysis of the human striatum-enriched CalDAG-GEFI gene with Japanese schizophrenia patients.
Am. J. Hum. Genet. 69: (4) Suppl. 1, 549.

9. Maeda, N., Kawasaki, H., Mitsuyasu, H., Ogomori, K., Takita, M., Tahara, A., Matsuo, Y., Tahira, T., Hayashi, K. and Tashiro, N. 2001.
Analysis of mutations in microtubule-associated protein tau (MAPT) gene in fronto-temporal dementia (FTD) in Japanese population.
Am. J. Hum. Genet. 69: (4) Suppl. 1, 549.

10. Mitsuyasu, H., Kawasaki, H., Maeda, N., Tahara, A., Matsuo, Y., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Hayashi, K. and Tashiro, N. 2001.
Polymorphism analysis of the human dopamine receptor (DRD4) gene with Japanese schizophrenia patients.
Am. J. Hum. Genet. 69: (4) Suppl. 1, 549.

11. Hayashi, K., Wenz, H-M., Inazuka, M., Tahira, T., Sasaki, T. and Atha, D. H. 2001.
SSCP analysis of point mutations by multi-color capillary electrophoresis.
Methods Mol. Biol. 163, 109-26.

12. Higasa, K. and Hayashi, K. 2002.
Ordered catenation of sequence-tagged sites and multiplexed SNP-genotyping by sequencing.
Nucleic Acids Research 30, U1-U14.

13. Fukuda, S., Yamasaki, Y., Iwaki, T., Kawasaki, H., Akieda, S., Fukuchi, N., Tahira, T. and Hayashi, K. 2002.
Characterization of the biological function of a transcription factor, c-*myc* intron binding protein 1 (MIBP1).
J. Biochemistry 131, 349-357.

14. Yoshimoto, K., Iwaki, T., Inamura, T., Fukui, M., Tahira, T. and Hayashi, K. 2002.
Multiplexed analysis of post-PCR fluorescence-labeled microsatellite alleles and statistical evaluation of their imbalance in brain tumors.
Japanese Journal of Cancer Research 93, 284-290.

総説

1. 吉本幸司, 林　健志. 2001.
   脳腫瘍のゲノム解析.
   脳の科学, 23, 992-996.
2. 吉本幸司, 林　健志. 2002.
   SNP を用いた癌研究, ゲノム医学, 2, 13-17.

著書

1. 馬場真吾, 林　健志. 2001.
   SNPs とは何か？-その意義と解析の現状. わかる実験医学シリーズ「ゲノム医科学がわかる」(菅野純夫編) pp. 32-39.
   羊土社, 東京
2. 吉本幸司, 林　健志. 2001.
   癌研究, 先端バイオ研究の進めかた (辻本豪三・田中利男　編), pp. 139-141.
   羊土社, 東京
3. 久木田洋児, 林健志. 2001.
   ヒトゲノム多様性大規模検索技術の開発.
   ゲノムサイエンスの新たなる挑戦
   (榊佳之, 小原雄治, 大木操, 金久實, 高木利久, 菅野純夫, 小笠原直毅編),
   蛋白質核酸酵素, 46, 2283-2288.
   共立出版, 東京.

学会発表

1. 和田守正, 谷口秀一, 蛯原卓也, 持田　泰, 住江愛子, 松崎彰信, 井原健二, 原　寿郎, 井上博雅, 古藤　洋, 原　信之, 前原喜彦, 杉町圭蔵, 田平知子, 林　健志, 桑野信彦 (2001, 10/3-10/5)
   薬剤排出トランスポーター遺伝子の多型と発現の個人差.
   日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮
2. 近藤寛之, 大島健司, 田平知子, 林　健志 (2001, 11/30-12/2)
   網膜色素変性症の遺伝子診断を目指した連鎖解析的手法の検討：ロドプシン遺伝子近傍にある DNA 多型の検出.
   第40回 日本網膜硝子体学会総会, 名古屋
3. 秋枝静香, 福田信治, 田平知子, 林 健志 (2001, 12/9-12/12).

Yeast two-hybrid system を用いた MIBP1 結合蛋白質の検索及び解析.

第 24 回日本分子生物学会年会，横浜.

4. 福地成彦，福田信治，秋枝静香，田平知子，林 健志 (2001, 12/9-12/12)

神経分化における転写因子 MIBP1 (c-myc intron binding protein 1) の発現の解析.

第 24 回日本分子生物学会年会，横浜.

5. 久木田洋児，馬場真吾，日笠幸一郎，中村道大，真名子幸，田平知子，林 健志 (2001, 12/9-12/12)

SNPs/突然変異大規模検索のための High-throughput SSCP 法の開発.

第 24 回日本分子生物学会年会，横浜.

6. 馬場真吾，日笠幸一郎，三浦健一，久木田洋児，大野 研，田平知子，林 健志 (2001, 12/9-12/12)

マルチキャピラリー電気泳動装置を用いた high-throughput PLACE-SSCP 法の確立および大規模 SNP 収集システムの構築.

第 24 回日本分子生物学会年会，横浜.

7. Hayashi, K., Higasa, K., Kukita, Y., Baba, S. and Tahira, T. (2001, 5/3-5/7)

SNP characterization: Allele-frequency estimation by SSCP and genotyping by multiplex sequencing. Mutation Detection 2001, Bled, Slovenia.

8. Kawasaki, H., Mitsuyasu, H., Tahara, A., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Housman, D. E., Graybiel, A. M., Tashiro, N. and Hayashi, K. (2001, 5/15-5/19)

Association of polymorphisms of the human Rap1-targeting cAMP-GEF1 gene with Japanese schizophrenia patients.

10th International Congress of Human Genetics, Vienna, Austria.

9. Mitsuyasu, H., Kawasaki, H., Tahara, A., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Hayashi, K. and Tashiro, N. (2001, 5/15-5/19)

Association analysis of polymorphisms of the human dopamine D4 receptor gene (DRD4) with Japanese schizophrenia patients.

10th International Congress of Human Genetics, Vienna, Austria.

10. Tahira, T., Higasa, K., Suzuki, A., Kukita, Y., Baba, S. and Hayashi, K. (2001, 10/12-10/16)

A semi-automated data-processing system for large-scale determination of SNP allele frequency by SSCP.

51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA.

11. Kukita, Y., Higasa, K., Baba, S., Nakamura, M., Manago, S., Suzuki, A., Tahira, T. and Hayashi, K. (2001, 10/12-10/16)

A high throughput SSCP method for large-scale analysis of SNPs/mutations using capillary-array electrophoresis system.

51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

12. Kawasaki, H., Mitsuyasu, H., Maeda, N., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Housman, D. E., Graybiel, A.

M., Hayashi, K and Tashiro, N. (2001, 10/12-10/16)

Polymorphism analysis of the human striatum-enriched CalDAG-GEFI gene with Japanese schizophrenia patients.

51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

13. Maeda, N., Kawasaki, H., Mitsuyasu, H., Ogomori, K., Takita, M., Tahara, A., Matsuo, Y., Tahira, T., Hayashi, K. and Tashiro, N. (2001, 10/12-10/16)

    Analysis of mutations in microtubule-associated protein tau (MAPT) gene in fronto-temporal dementia (FTD) in Japanese population.

    51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

14. Mitsuyasu, H., Kawasaki, H., Maeda, N., Tahara, A., Matsuo, Y., Tahira, T., Ninomiya, H., Fukumaki, Y., Hayashi, K. and Tashiro, N. (2001, 10/12-10/16)

    Polymorphism analysis of the human dopamine receptor (DRD4) gene with Japanese schizophrenia patients.

    51th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA

ゲノム機能学分野
Division of Disease Genes

当研究室では，分化や環境への応答などの基本的生命現象や，精神活動などの高次生命現象に関わる遺伝子の機能とその制御を研究対象にして，ヒトをはじめとしたホ乳類に的を絞り，細胞および発生工学を含めた分子生物学的手法を用いてその分子機構を明らかにすることを目指している．分子生物学的解析において突然変異体は極めて有用であるが，ヒトでは微生物や下等真核生物と異なり，人為突然変異体を得ることは容易ではない．従って遺伝子病は自然突然変異により引き起こされた機能異常状態としてとりわけ重要な位置を占める．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を対象とし，それらの解析を通して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．

2001 年の研究室への新たな参加者は，筑波大学から大学院博士課程へ柴田 篤志，および九州大学理学部4年生の荒巻 敏寛，高司 雅史である．

A. 分裂病関連遺伝子群の解明

a. 罹患同胞対解析

Japanese Schizophrenia Sip-pair Linkage Group として 130 家系 337 検体につき，全ゲノムにわたる 10 cM 毎のマーカー417 個を用いた連鎖解析を行い，全染色体の解析が終了した．全家系による結果では連鎖を示す LOD 値 2.2 以上の領域は見出されなかったが，親サンプルのある家系を用いた結果 3p26，22q11 に suggestive な連鎖が見られた．最も高い LOD 値は 22q11 の 2.7 である．

b. 関連解析

精神分裂病の精神薬理学的知見に基づく「ドーパミンおよびグルタミン酸伝達異常仮説」からドーパミンおよびグルタミン酸受容体遺伝子多型と精神分裂病との関連を，本学医学研究院精神病態医学分野および関連病院の協力で収集したサンプルを用いて検討している．ドーパミン D4 受容体遺伝子(*DRD4*)の発現解析を行い明らかにしたプロモータ領域につき多型を検索し，10 個の SNP を検出した。この 5 つにつき罹患群 208 名，健常群 210 名で関連解析を行ったが関連は見られなかった．また *DRD4* はパーソナリティとの関連からも注目されており，解析の結果、negative regulator 領域内の 1 個の SNP がパーソナリティを形成する 4 次元要素の一つ Reward Dependence と関連していた（Mitsuyasu et al., 2001）．

グルタミン酸受容体各サブタイプにつき体系的に解析を行っている．メタボトロピック受容体 2 型遺伝子(*GRM2*)をクローン化後全塩基配列を決定し，コード領域の多型検索を行った．その結果 10 個の非同義置換を含む 12 個の新規 SNP を同定した．各 SNP につき関連解析を行ったところ，6 個の SNP については精神

分裂病群での頻度は高かったが，統計的な有意差は認められなかった（Joo et al., 2001）.

Grin1 のノックダウンマウスでは精神分裂病様の行動異常が見られる．しかしコード領域の多型については関連が認められていない．そこで *GRIN1* のプロモーター領域の関与を検討するため，既にプロモーター領域が決定されているラット *Grin1* と相同性のある 5'上流領域約 1 kb について多型検索を行い，17 個の SNP を同定した．1個の SNP を除いてはいずれも低頻度で，分裂病罹患群 191 検体と健常群 216 検体との間に有意な差は見られなかった（Tani et al., in press）.

カイニン酸型グルタミン酸受容体 5 型遺伝子（*GRIK1*）のコード領域の変異の検索を行い，2 個の同義置換と 1 個の非同義置換からなる 3 個の新規多型を含む 6 個の SNP を同定した．頻度が高い 3 個の SNP について，またハプロタイプについて関連解析を行ったが，有意な差は認められなかった（Shibata et al., 2001）．以上から *DRD4*, *GRM2*, *GRIN1*, *GRIK1* は日本人集団での精神分裂病発症に大きな関与はないと考えられた.

一方，AMPA 型グルタミン酸受容体4型遺伝子（*GRIA4*）およびメタボトロピック受容体3型遺伝子（*GRM3*）については，検出力を上げるため約 50 kb ごとの頻度が 10%以上の SNP を用いて連鎖不平衡解析を行った．*GRIA4* については，2 個の SNP によるハプロタイプにおいて p=0.0057 で有意差が認められ（Makino et al., in press），*GRIA4* 領域に精神分裂病感受性に関与している多型が存在している可能性が示された．また *GRM3* については 3 つのハプロタイプで極めて低い値 p（$p = 8.30 \times 10^{-4}$）で有意差が認められ（Fujii et al., in press），約 100 kb の領域内に疾患感受性に寄与する変異が存在する可能性が高く，現在機能に変化を来しうる多型を探索中である.

c. モデル動物による解析

精神分裂病発症のモデルと考えられている覚醒剤逆耐性現象に関連する遺伝子の単離を，メタンフェタミン投与ラット試料から differential display を用いて行った．メタンフェタミン投与により発現が亢進するクローンとしてアンフィファイシン I cDNA をラット大脳皮質から単離し，このヒト型遺伝子である *AMPH* と精神分裂病との関連解析を行っている.

B. 低分子量ストレス蛋白質に関する研究

a. HSPB2 およびαB-クリスタリン遺伝子の組織特異的発現調節機構の解析

低分子量熱ショック蛋白質は HSP27 を始めとしてヒトでは 9 種類知られている．各々の遺伝子は異なる染色体上に位置しているが，αB-クリスタリン遺伝子と我々が発見した HSPB2 遺伝子だけは同一染色体上にわずか 959 bp を隔てて head-to-head で存在している．この近接して存在する 2 つの遺伝子の組織特異的発現調節機構を明らかにするために，αB-クリスタリン遺伝子あるいは HSPB2 遺伝子の 5'上流域を *lacZ* に連結したレポーター遺伝子を導入してトランスジェニックマウスを作製し，胎生 12.5 日胚を取り出し解

析した．その結果，HSPB2 の筋組織での発現には遺伝子間領域に存在する E-box が必須であることを見い出した（論文準備中）．さらにαB-クリスタリン遺伝子の水晶体での発現に必要なエンハンサーの同定に成功した．

b. αB-クリスタリンのストレス応答機構の解析

αB-クリスタリンは中枢神経系ではオリゴデンドロサイトに限局して発現しているが，神経変性疾患では神経細胞死に伴い増加する反応性アストロサイトに蓄積が見られる．我々は細胞レベルで熱，高浸透圧，カリウムイオンなどでαB-クリスタリンの発現が亢進することを明らかにした．プロモーター解析の結果，αB-クリスタリン遺伝子の上流に存在する熱ショック応答エレメント（HSE)がストレスによる転写活性化に重要であることが分かった．ゲルシフトアッセイによりカリウムストレスでは熱ショック転写因子（HSF2)が，一方，熱ショックでは HSF1 が HSE に結合するという結果を得た（Sadamitsu et al., 2001)．HSF1 に比較し HSF 2 の生物学的意義は不明な点が多く，現在 HSF2 の活性化機構を解析中である．

c. HSPB2 の細胞内局在の解析

HSPB2 はマウスの心臓や骨格筋で発現が見られ，特にミトコンドリアが多く含まれる赤筋で発現が高い．我々は HSPB2 リコンビナント蛋白質を抗原にして HSPB2 に対する特異抗体を作成し，C2C12，KNS81 細胞などで HSPB2 の細胞内局在を調べた．蛍光免疫染色により HSPB2 は細胞質内に顆粒状に散在しその一部がミトコンドリアへ結合している所見が得られた．細胞分画の結果，HSPB2 は非ストレス下では主に可溶性画分に存在していたが，熱ストレスをかけるとミトコンドリア画分と不溶性画分に回収された．さらに HSPB2 の強制発現により熱耐性の増加が見られた．以上の結果より HSPB2 はミトコンドリアに緩やかに結合しストレス応答に関与する可能性が示唆された（Nakagawa et al., 2001)．

業績目録

原著論文

1. Shibata, H., Joo, A., Fujii, Y., Tani, A., Makino, C., Hirata, N., Kikuta, R., Ninomiya, H., Tashiro, N., Fukumaki, Y. 2001.
   Association study of polymorphisms in the GluR5 kainate receptor gene (*GRIK1*) with schizophrenia.
   Psychiatr. Genet. 11, 139-144.
2. Nakagawa, M., Tsujimoto, N., Nakagawa, H., Iwaki, T., Fukumaki, Y., Iwaki, A. 2001.
   Association of HSPB2, a member of the small heat shock protein family, with

mitochondria.
Exp. Cell Res. 271, 161-168,

3. Sadamitsu, C., Nagano, T., Fukumak,i Y., Iwaki, A. 2001.
Heat shock factor 2 is involved in the upregulation of αB-crystallin by high extracellular potassium.
J. Biochem. 129: 813-820.

4. Joo, A., Shibata, H., Ninomiya H., Kawasaki H., Tashiro, N., Fukumaki, Y. 2001.
Structure and polymorphisms of the human metabotropic glutamate receptor type 2 gene (*GRM2*): analysis of association with schizophrenia.
Mol. Psychiatry, 6, 186-192.

5. Mitsuyasu, H., Hirata, N., Sakai, Y., Shibata, H., Takeda, Y., Ninomiya, H., Kawasaki, H., Tashiro, N., Fukumaki, Y. 2001.
Association analysis of polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) with schizophrenia and personal traits.
J. Human. Genet. 46:26-31.

6. Mizuno, S,, Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y., Sasaki, H. 2001.
Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia.
Blood 97, 1172-1179.

7. Tani, A., Ogawa, T., Nose, T., Nikandrov, N.N., Deshimaru, M., Chijiwa, T., Chang, C.C., Fukumaki, Y., Ohno, M. 2002.
Characterization, primary structure and molecular evolution of anticoagulant protein from Agkistrodon actus venom.
Toxicon 40, 803-813.

8. Tani, A., Kikuta, R., Itoh, K., Joo, A., Hiroki Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N., Fukumaki, Y.
Polymorphism analysis of the upstream regions of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (*GRIN1*): implication for schizophrenia.
Schizophrenia Res. in press.

9. Makino, C., Fujii, Y., Kikuta, R., Hirata, N., Tani, A., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N., Shibata, H., Fukumaki, Y.
Positive association of the AMPA receptor subunit GluR4 gene (*GRIA4*) haplotype with

schizophrenia: linkage disequilibrium mapping using SNPs evenly distributed across the gene region.

Am. J. Med. Genet. in press.

10. Fujii, Y., Shibata, H., Kikuta, R., Makino, C., Tani, A., Hirata, N., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N., Fukumaki. Y.

Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (*GRM3*) with schizophrenia.

Psychiatr. Genet. in press.

著書

1. 柴田弘紀、服巻 保幸. 2001.

未知遺伝子多型の検索法.

薬物動態・作用と遺伝子多型 pp. 74-85,

医薬ジャーナル

学会発表

1. 濱村みつ子, 尾崎美和子, 服巻保幸 (2001, 9/26-2/28).

小脳の矢状 aldorase C (Zebrin) mRNA stripe の細分化と移動と c-*fos* mRNA 発現との関係.

第24回日本神経科学第44回日本神経化学合同大会, 京都.

2. 谷綾子, 柴田弘紀, 菊田るみこ, 伊藤加奈子, 城尾晶子, 藤井洋, 牧野千絵子, 平田直嗣, 二宮英彰, 川嵜弘詔, 田代信維, 服巻保幸 (2001, 10/3-10/5).

イオノトロピック型グルタミン酸受容体遺伝子 (*GRIN1*, *GRIK1*) 多型と精神分裂病との関連解析.

第46回日本人類遺伝学会, 埼玉.

3. 近藤純子, 音辻美希子, 服巻保幸, 岩城明子 (2001, 12/9-12/12).

Pelizaeus-Merzbacher 病：非相同組換えによる PLP 遺伝子重複.

第24回日本分子生物学会年会, 横浜.

4. 柴田弘紀, 城尾晶子, 藤井洋, 谷綾子, 牧野千絵子, 平田直嗣, 菊田るみこ, 二宮英彰, 田代信維, 服巻保幸 (2001, 12/9-12/12).

カイニン酸受容体1型遺伝子 (*GRIK1*) の精神分裂病との関連解析.

第24回日本分子生物学会年会, 横浜.

5. 伊地知暢広, 辻本直美, 岩城徹, 服巻保幸, 岩城明子 (2001, 12/9-12/12).

αB-クリスタリン遺伝子の水晶体での発現に関与するエンハンサー領域の同定.

第24回日本分子生物学会年会，横浜.

6. 村田慎也，柴田弘紀，二宮 英彰，田代信維，服巻保幸（2001, 12/9–12/12).
Amphiphysin I 遺伝子（*AMPH*）と精神分裂病との関連解析.
第24回日本分子生物学会年会，横浜.

7. 牧野千絵子，藤井洋，菊田るみこ，谷綾子，平田直嗣，柴田篤志，柴田弘紀，二宮英彰，田代信維，服巻保幸（2001, 12/9–12/12).
AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプ4（*GRIA4*）遺伝子と精神分裂病との関連解析.
第24回日本分子生物学会年会，2001年12月9日–12日，横浜.

8. 藤井洋，柴田弘紀，牧野千絵子，菊田るみこ，谷綾子，平田直嗣，柴田篤志，二宮英彰，田代信維，服巻保幸（2001, 12/9–12/12).
代謝型グルタミン酸受容体3型遺伝子（*GRM3*）と精神分裂病の関連解析.
第24回日本分子生物学会年会，横浜.

9. 谷綾子，菊田るみこ，伊藤加奈子，城尾晶子，柴田弘紀，二宮英彰，田代信維，服巻保幸（2001, 12/9–12/12).
NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット 1 遺伝子（*GRIN1*）の 5'上流領域における多型：精神分裂病との関連解析.
第24回日本分子生物学会年会，横浜.

10. 濱村みつ子，尾崎美和子，澤田和彦，福井義浩，服巻保幸（2001, 12/9–12/12).
Weaver mutant mice におけるメタンフェタミンや CCK 投与後の脳 *c-fos* mRNA 発現の変化.
第24回日本分子生物学会年会，横浜.

11. 千々岩崇仁，山口容子，弟子丸正伸，信久幾夫，小川智久，中島欽一，上田直子，下東康之，服巻保幸，服部正策，大野素徳（2001, 12/9–12/12).
ハブ毒腺ホスホリパーゼA2 アイソザイムの地域特異的進化.
第24回日本分子生物学会年会，横浜.

12. The Japanese Schizophrenia sib-pair linkage group (JSSLG) (2001, 10/7/-10/10).
First-stage genome-wide sib-pair linkage analysis of schizophrenia in Japanese.
Ninth World Congress on Psychiatric Genetics, St. Louis.

13. Shibata, H., Joo, A., Fujii, Y., Tani, A., Makino, C., Hirata, N., Kikuta, R., Ninomiya, H., Tashiro, N., Fukumaki, Y. (2001, 10/12/-10/16).
Association study of polymorphisms in the glutamate receptor genes, *GRM2* and *GRIK1* with Japanese schizophrenia.
51st Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA.