

- 熱田英範, 武田充弘, 新垣 浩, 本橋伸高, 西川 徹. せん妄に対する非定型抗精神病薬の使用経験. 第100回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004年5月.
5. 平澤俊行, 新垣 浩, 車地暁生, 本橋伸高, 西川 徹. 遷延性のうつ状態に donepezil, 1-dopa が有効であった1例. 東京精神医学会, 第71回学術集会, 東京, 2004年7月.
6. 櫻井新一郎, 石井澄和, 海野麻未, 嶋津 奈, 山本直樹, 西川 徹. 統合失調症様異常発現薬および抗精神病薬のラット脳内遊離アミノ酸含有量に対する影響. 第34回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004年7月.
7. 青木美佳, 山田和男, 茂野佳美, Joanne Meerabux, 岩本和也, 大羽尚子, 鷹雄 瞳, 豊田倫子, 深澤正幸, 中谷紀章, 西村幸子, 関健二郎, Brian Dean, 加藤忠史, 糸原重美. 西川 徹, 吉川武男. ネットリン G1 遺伝子およびネットリン G2 遺伝子の統合失調症発症に及ぼす影響. 第34回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004年7月.
8. 車地暁生, 伊藤 卓, 石井澄和, 西川 徹. 不安惹起物質 (FG7142) により生後発達依存性に発現するマウス脳内遺伝子に関する研究. 第34回日本神経精神薬理学会, 東京, 2004年7月.
9. 堀川英起, 田口裕佳子, 竹内崇, 大島一成, 西川 徹, 宮本めぐみ. 利用者から見たデイケア, スタッフからみたデイケア - 大学病院デイケアにおける利用者およびスタッフの視点の比較-. 日本デイケア学会第9回年次大会, 東京, 2004年9月
10. 谷口 豪, 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津 奈, 櫻井新一郎, 西川 徹. ラット大脳皮質において D-セリンによって発現が誘導される遺伝子 *dsr-2* の研究. 第47回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004年9月.
11. 嶋津 奈, 山本直樹, 海野麻未, 櫻井新一郎, 西川 徹. D-セリン制御分子 *dsm-1* の発現クローニング. 第47回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004年9月.
12. Kurumaji A, Ito T, Ishii S, Nishikawa T. Effects of anxiogenic drugs on BTG2 mRNA in the mouse brain. 第47回日本神経化学学会大会, 大阪, 2004年9月.
13. 山本直樹, 谷口豪, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 嶋津奈, 竹内崇, 竹林裕直, 柏淳, 新垣浩, 車地暁生, 西川徹. 脳の D-セリンシステムを標的とした統合失調症の新規薬物治療法開発に関する研究. 第37回精神神経系薬物治療研究報告会, 2004年12月.
- その他
1. 西川 徹, 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未, 柏 淳, 金子雄二郎. ストレスに年齢依存的応答を示す遺伝子. 科学技術振興調整費「ストレス性脳機能障害とその修復課程の分子機構解明および治療法の開発」研究班平成15年度研究報告会, 東京, 2004年1月.
2. 西川 徹, 柏 淳, 伊藤 卓, 金子雄二郎, 山本直樹, 石井澄和, 海野麻未. 覚せい剤・麻薬によるラット大脳新皮質の発達依存的遺伝子応答およびアミノ酸の変化. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)「規制薬物の依存及び神経毒性の発現に係わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究」班平成15年度研究報告会, 普及啓発事業, 東京, 2004年1月.
3. 山本直樹, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 竹林裕直, 石井澄和, 海野麻未, 兼松宗太郎, 金子雄二郎, 竹内崇, 柏淳, 車地暁生, 西川 徹. 脳内D-セリンシステムの分子機構とその統合失調症の病態および治療法開発における意義に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「精神疾患の分子病態解明による新しい治療・予防法の開発に関する研究」班平成16年度研究成果報告会, 東京, 2004年12月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)
1. 特許取得
本分担課題と直接関係するものはない
2. 実用新案登録

- なし
3. その他
特記すべきことなし

ラット視床下部における網羅的な遺伝子発現解析に関する研究

分担研究者 三國 雅彦

群馬大学大学院医学系研究科 脳神経精神行動学分野 教授

研究要旨:

感情障害を中心としたストレス関連疾患のモデル動物における視床下部機能の分子機構を研究するためのツールを開発するため、ラット視床下部の cDNA ライブラリーからランダムに選択した大量クローンの部分塩基配列の決定を行い、視床下部における発現遺伝子のカタログ化を試みた。本研究で得られたこれらの ESTs は、ストレス関連疾患における視床下部の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するための有用なゲノム資源である。

A. 研究目的

身体的あるいは心理的なストレス性刺激が、生体のホメオスタシスを崩壊し、感情障害などのストレス関連性疾患を誘発することが知られている。視床下部—下垂体—副腎皮質系（hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA 系）は生体の主要なストレス応答系に属し、海馬や扁桃体などの大脳辺縁系からの制御を受けている。われわれはこれまでに海馬におけるストレス応答遺伝子を網羅的に探索する目的で、ラット海馬に発現している全遺伝子 (Expressed Sequence Tags : ESTs) のカタログ化を行い、それらを用いた DNA マイクロアレイを作成した (Tanaka et al, 2004)。視床下部は上記の通り海馬より支配を受け、HPA 系の起始核が存在するが、ストレス関連性疾患における視床下部の分子機構や病態生理学的意義については未だ不明な点が多い。そのため、視床下部で発現している遺伝子 (Expressed

Sequence Tags : ESTs) を包括的に解析することは、ストレス関連疾患の発症機構の解明において重要であると考えられる。そこで本研究では、ストレス関連疾患モデルにおける視床下部機能の分子機構を研究するためのツールを開発するため、ラット視床下部の cDNA ライブラリーからランダムに選択した大量クローンの部分塩基配列の決定を行い、視床下部における発現遺伝子のカタログ化を試みた。

B. 研究方法

(1) ESTs 獲得および部分塩基配列決定
実験には成獣ラットの正常視床下部組織から作製された両方向性 cDNA ライブラリーを用いた。まず、プラスミド DNA を ExAssist ヘルパーファージを用いた in vivo excision 法により、ファージミドからプラスミドに直接変換した。このプラスミド DNA を SOLR E.coli に導入し、IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)、X-gal

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)を含んだLB/Ampアガロースプレート上に発育させた。形成されたコロニーをプレートから無作為に選択しプラスミドDNAを抽出した。プラスミドに挿入されたcDNAクローンの3'もしくは5'端から200-700 bpの部分塩基配列を、PCR法を利用したCycle sequencing法により、T7もしくはT3プライマーを用い決定した。獲得された各々の塩基配列の評価と塩基のトリミングを行った後、ベクター配列を取り除き、200bp以上で、判別不能の塩基が1%以下のものを良好な塩基配列として選択した。

(2) データベース解析

ラット視床下部から得られた11,096個のESTsの塩基配列についてクラスタリングを行い、共通する塩基配列を含むものを1つのクラスターとした。クラスターの代表配列を全米バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のGenBankデータベースで検索した。

BLASTNプログラムを用いて、日々更新されるGenBankのラット塩基配列に対し、得られた代表配列をヌクレオチドレベルで比較した。スコアが370以上であった場合、同一のものと判定した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、群馬大学医学部附属動物実験施設の倫理規定に従った。

C. 研究結果

(1) ESTs獲得および部分塩基配列決定

ラットの正常視床下部組織から作製された両方向性 cDNA ライブラリーから、11,096 個の ESTs の塩基配列を得た。

(2) データベース解析

獲得した塩基配列についてクラスタリングを行い、代表配列を GenBank のラット塩基配列に対して BLASTN プログラムを用いて比較した。

現在検索結果を解析中であるが、すでに2000種類以上の既知遺伝子を同定した。

D. 考察

本研究で用いたESTsによるアプローチは、組織における既知遺伝子および新規遺伝子を同定し、特徴付けるための有用な手段である。過去数年の間、多くの組織や培養細胞系から構築されたcDNAライブラリーから多くのESTsが収集され研究されてきた。しかしながら、ラットの視床下部から大規模にESTsを収集した報告は未だない。本研究では、視床下部に発現した11,096個のESTsを収集し、2000種類以上の既知遺伝子を同定した。田中らは、すでにラット海馬の網羅的遺伝子発現解析によって2,594種類の既知遺伝子を同定している(Tanaka et al, 2004)。本研究で得られた2000種類以上の既知遺伝子は、海馬ではみとめなかったNeuropeptide Y2 receptor, Orexin precursor, voltage dependent anion channel 3などの摂食、情動に関連する遺伝子を含んでいる。現在解析中であり、今後、既知遺伝子について、その遺伝子がコードするタンパク質の主な機能に基づき分類を行う。海馬をはじめ、他の臓器との比較を行い、

視床下部の遺伝子発現の特性を評価する。一方、ヌクレオチドデータベースに登録されている既知の遺伝子と一致をみなかったESTクローンについて、ペプチドデータベースとの比較により、他種の既知遺伝子のホモログあるいはスーパーファミリーを同定したい。

発現遺伝子の分子カタログを確立することは、組織特異的なcDNAマイクロアレイの開発を発展させると考えられる。すなわち、これらのクローンを用いることにより低費用で多数のcDNAマイクロアレイを作製することができる。また、アレイの作製に際し現在市販されているアレイに含まれていないcDNAを多く含むことができるため、視床下部研究のための独自のツールを提供することが可能である。このアプローチを介して同定される新規の遺伝子の機能を解析することは、ストレス関連疾患の病態の根底にある分子機構を明らかにし、治療に有用な新しい分子標的の発見を導くのに有用であると考えられる。視床下部特異的な機能に関する情報を集積し、本研究で得られたESTsをヒトの染色体上に配置することにより、連鎖解析による記憶や学習あるいはストレスに関連した疾患の候補遺伝子座でのポジショナルクローニングを容易にすることが可能になったと考えられる。

E. 結論

本研究では、ESTsを用いたラットの視床下部で発現している遺伝子のカタログ化を試みた。11,096個のESTsの塩基配列を獲得し、2,000種類以上の既知遺伝子を

同定した。本研究で得られたこれらのESTsは、感情障害を中心としたストレス関連疾患における視床下部の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するための有用なゲノム資源である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawamoto, T., Horikawa, Y., Tanaka, T., Kabe, N., Takeda, J., and Mikuni, M. : Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder. *Molecular Genetics and Metabolism* 82: 238-245, 2004

Tanaka, T., Horikawa, Y., Kawamoto, T., Kabe-Sakurai, N., Takeda, J., and Mikuni, M. : Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray. *Molecular Brain Research* 129: 20-32, 2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

双極性障害の連鎖領域における候補遺伝子の解析に関する研究

分担研究者 塩江 邦彦 山梨大学大学院・精医学工学総合研究部・神経医学・臨床倫理学 講師

研究要旨

双極性障害の候補領域 21 番長腕 22.3 にある TRPM2 の転写調節領域の解析を行った。新たなエキソンを見だし、その周辺にある多型を発見した。しかし双極性障害患者 92 名の関連研究では有意な結果は得られなかった。

A. 研究の背景および目的

双極性障害における連鎖領域のうち我々は 21 番の長腕 22.3 に注目し、双極性障害の疾患感受性遺伝子の解明を目的として有力な候補遺伝子について多型解析を行ってきた。

脳に多く発現する新しいタイプのカルシウムチャネル TRPM2 (transient receptor potential melastatin 2) は、機能的、位置的に有力な候補遺伝子であるが、最近、双極性障害患者由来の Bリンパ芽球細胞株の一群でその mRNA 量の有意な低下が報告されたため、この遺伝子の転写調節領域を解析した。さらに新たに見いだしたエキソン 1 周辺の多型についての関連研究を行った。

B. 対象と方法

TRPM2 には長さの異なる mRNA があり、その長い方を LF-TRPM2 短い方を SSF-TRPM2 と名付けた。

1. LF-TRPM2 と SSF-TRPM2 の転写開始点の解析は Human brain, caudate nucleus polyA⁺ mRNA を鋳型に 5' RACE を行った。
2. LF-TRPM2 と SSF-TRPM2 の発現は 3 種類の λ gt10 cDNA library と MTC Panels (27 組織) を鋳型として PCR を行った。
3. FLAG tag を付加した LF 及び SSF-TRPM2 タンパクの強制発現ベクターを HEK293 細胞に導入した。Fura2/AM を使って、5mM H₂O₂ で刺激を加えた 13 分後の Ca²⁺ 流入活性を測定した。
4. 双極性患者 40 名の血液より得た DNA にて、新たに発見した exon-1 の周辺の多型について変異スクリーニングを行った。PCR は GenAmp 9600/2400 (Perkin Elmer)、SSCP は DNA フラグメント解析用電気泳動装置 (Amersham Pharmacia Biotech)、シークエンスには ABI 310 (ABI) を使用した。

新たな多型については、日本人の双極性患者群 (92 人)、対照群 (92 人) での関連解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究参加者には文書にて説明し、署名による同意を得た。

本研究は山梨医科大学倫理委員会による承認を受けている。

C. 研究結果

1. LF-TRPM2 の転写開始点の解析の結果、従来の exon 1 を先頭とする転写物ではなく、約 3 kb 上流に存在する exon -1 を先頭とする転写物が得られた。northern blot 解析を行ったが、従来の exon 1 を先頭とする転写物は認められなかった。一方、SSF-TRPM2 は exon 5 に隣接する intron 4 を 56 bp 含む exon5 SSF から、転写されていることが認められた。
2. SSF-TRPM2 は、caudate nucleus のみで発現していた。
3. LF-TRPM2 と SSF-TRPM2 ともに Ca²⁺ 流入活性を認めた。さらに両者の間で、Ca²⁺ 流入活性に有意な差を認めた。
4. TRPM2 に新たな exon-1 の周辺の多型見いだしたが、双極性障害患者での関連研究では有意な結果は得られなかった。

D. 考察

TRPM2 は①躁うつ病での連鎖が報告された感受性領域に存在すること、②機能的にも脳に発現し、③双極性障害患者で異常があカルシウムチャネルであることから、候補遺伝子としてはそれぞれ有望である。気分障害などの複雑遺伝疾患における感受性遺伝子の同定には統計的検出力を考慮した十分な数のサンプルによる case-control あるいは家系での関連解析による証明が必要である。

E. 結論

TRPM2 の転写調節領域を徹底して検索し重要な知見を得た

た。双極性障害患者の関連解析では有意差は認めなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Manabu Shinohara, Hiroko Mizushima, Masami Hirano, Kunihiko Shioe, Mie Nakazawa, Yoshimitsu Hiejima, Yutaka Ono, Shigenobu Kanba: Eating disorders with binge eating behavior are associated with s allele of 3'-UTR VNTR polymorphism of dopamine transporter gene. Journal of Psychiatry & Neuroscience 29 (2) : 134-137, 2004.

2. 学会発表

Shioe, K : Brain imaging of serotonin transporters: availability for assessment and treatment of anxiety disorders. World Congress of Behavioral and Cognitive Therapies 2004, July, 2004, Kobe, Japa

研究成果の刊行 : 山梨大学 平成16年度

Manabu Shinohara, Hiroko Mizushima, Masami Hirano, Kunihiko Shioe, Mie Nakazawa, Yoshimitsu Hiejima, Yutaka Ono, Shigenobu Kanba: Eating disorders with binge eating behavior are associated with s allele of 3'-UTR VNTR polymorphism of dopamine transporter gene. Journal of Psychiatry & Neuroscience 29 (2) : 134-137, Mar 2004

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社	出版地	ページ	出版 年
伊藤 卓, 西川 徹	3. 最初期遺伝子と 核内情報伝達系	加藤進昌, 上島国利, 小山司	新規抗精神病 薬のすべて	先端 医学社	東京	270-275	2004
大島一成, 西川 徹	18. 精神科領域の 救急 第7章 経験すべき症状・ 病態①緊急を要す る疾患・病態	奈良信雄	臨床研修実践 マニュアル	南江堂	東京	328-331	2004
西川 徹	5. 統合失調症 第8章 Common Diseases ⑩精神疾患・心身 医学	奈良信雄	臨床研修実践 マニュアル	南江堂	東京	541-542	2004
西川 徹	6. 神経化学から	風祭元, 山下格	心の科学セレ クション 統合失調症	日本 評論社	東京	541-542	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ebihara, T., Ohba, H., Kikuchi, M., Yoshikawa, T.	Structural characterization and promoter analysis of human potassium channel Kv8.1 (<i>KCNV1</i>) gene.	Gene	325	89-96	2004
Horiuchi, Y., Nakayama, J., Ishiguro, H., Ohtsuki, T., Detera-Wadleigh, S.D., Toyota, T., Yamada, K., Nankai, N., Shibuya, H., Yoshikawa, T., Arinami, T.	Possible association between a haplotype of the GABA-A receptor alpha 1 subunit gene (<i>GABRA1</i>) and mood disorders.	Biol. Psychiatry	55	40-45	2004
Toyota, T., Yoshitsugu, K., Ebihara, M., Yamada, K., Ohba, H., Fukasawa, M., Minabe, Y., Nakamura, K., Sekine, Y., Takei, N., Suzuki, K., Ito, M., Meerabux, J.M.A., Iwayama-Shigeno, Y., Tomaru, Shimizu, H., Hattori, E., Mori, N., Yoshikawa, T.	Association between schizophrenia with ocular misalignment and polyalanine length variation in <i>PMX2B</i> .	Hum. Mol. Genet.	13	551-561	2004
Nakatani, N., Aburatani, H., Nishimura, K., Semba, J., Yoshikawa, T.	Comprehensive expression analysis of a rat depression model.	Pharmacogenomics J	4	114-126	2004
Arai, M., Itokawa, M., Yamada, K., Toyota, T., Arai, M., Haga, S., Ujiike, H., Sora, I., Ikeda, K., Yoshikawa, T.	Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese.	Biol. Psychiatry	55	804-810	2004
Itokawa, M., Kasuga, T., Yoshikawa, T., Matsushita, M.	Identification of a male schizophrenic patient carrying a de novo balanced translocation, t(4;13)(p16.1;q21.31).	Psychiatry Clin. Neurosci.	58	333-337	2004
Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Yoshida, Y., Toyota, T., Itokawa, M., Hattori, E., Shimizu, H., Yoshikawa, T.	Family-based association study of schizophrenia with 444 markers and analysis of a new susceptibility locus mapped to 11q13.3.	Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)	127B	11-19	2004

Ide, M., Muratake, T., Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Iwamoto, K., Takao, H., Toyota, T., Kaneko, N. Minabe, Y., Nakamura, K., Kato, T., NorioMori, N., Asada, T., Toshiyuki Someya, T., TakeoYoshikawa, T.	Genetic and expression Analyses of <i>FZD3</i> in Schizophrenia.	Biol. Psychiatry	56	462-465	2004
Yamada, K., Nakamura, K., Minabe, Y., Iwayama-Shigeno, Y., Takao, H., Toyota, T., Hattori, E., Takei, N., Sekine, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Miyoshi, K., Honda, A., Baba, K., Katayama, T., Tohyama, M., Mori, N., Yoshikawa, T.	Association analysis of <i>FEZ1</i> variants with schizophrenia in Japanese.	Biol. Psychiatry	56	683-690	2004
Kunugi, H., Iijima, Y., Tatsumi, M., Yoshida, M., Hashimoto, R., Kato, T., Sakamoto, K., Inada, T., Suzuki, T., Iwata, N., Ozaki, N., Yamada, K., Yoshikawa, T.	No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in Japanese: a multi-center study.	Biol. Psychiatry	56	376-378	2004
Fukasawa, M., Aoki, M., Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Takao, H., Meerabux, J., Toyota, T., Nishikawa, T., Yoshikawa T.	Case-control association study of human netrin G1 gene in Japanese schizophrenia.	J. Med. Dent. Sci.	51	121-128	2004
Stork, O., Zhdanov, A., Kudersky, A., Yoshikawa, T., Obata, K., Pape, H.-C.	Neuronal functions of the novel serine/threonine kinase Ndr2.	J. Biol. Chem.	279	45773 - 45781	2004
Munakata, K., Tanaka, M., Mori, K., Washizuka, S., Yoneda, M., Tajima, O., Akiyama, T., Nanko, S., Kunugi, H., Tadokoro, K., Ozaki, N., Inada, T., Sakamoto, K., Fukunaga, T., Iijima, Y., Iwata, N., Tatsumi, M., Yamada, K., Yoshikawa, T., Kato, T.	Mitochondrial DNA 3644T→C mutation associated with bipolar disorder.	Genomics	84	1041 -1050	2004

Washizuka S, Iwamoto K, Kazuno A, Kakiuchi C, Mori K, Kametani M, Yamada K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Yoshikawa T, Kato F	Association of mitochondrial complex I subunit gene <i>NDUFV2</i> at 18p11 with bipolar disorder in Japanese and the National Institute of Mental Health Pedigrees.	Biol. Psychiatry	56	483-489	2004
Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto Y, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T	A Missense Variation in Human Casein Kinase I Epsilon Gene that Induces Functional Alteration and Shows an Inverse Association with Circadian Rhythm Sleep Disorders.	Neuro psychopharmacology	(4)	1-9	2004
Ozaki N	Pharmacogenetics of antipsychotics.	Nagoya J Med Sci	67 (1-2)	1-7	2004
Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup JK	Comparison of G-Protein Selectivity of Human 5-HT _{2C} and 5-HT _{1A} Receptors.	Ann N Y Acad Sci	1025	570-7	2004
Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D	Modification of Human 5-HT _{2C} Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution.	Mol Psychiatry	9 (1)	55-64	2004
Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R	Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia.	Hum Mol Genet	13 (21)	2699 -2708	2004
Nokura K, Kanbayashi T, Ozeki T, Koga H, Zettsu T, Yamamoto H, Ozaki N, Shimizu T, Kawase T	Hypersomnia, asterixis and cataplexy in association with orexin A-reduced hypothalamic tumor.	J Neurol	251 (12)	1534-5	2004
Koizumi H, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Takei N, Iyo M	Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers.	Am J Med Genet	126B (1)	43-45	2004

Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I	Study of Association between alpha-Synuclein Gene Polymorphism and Methamphetamine Psychosis/Dependence.	Ann N Y Acad Sci	1025	325-334	2004
Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N:	No Association Is Found between the Candidate Genes of t-PA/Plasminogen System and Japanese Methamphetamine-Related Disorder: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse.	Ann N Y Acad Sci	1025	34-38	2004
Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N	No Association With the Neuregulin 1 Haplotype to Japanese Schizophrenia.	Mol Psychiatry	9(2)	126-127	2004
Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujike H, Iyo M	Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	132B (1)	70-73	2004
Inada T, Iijima Y, Uchida N, Maeda T, Iwashita S, Ozaki N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H	No Association Found between the Type 1 Sigma Receptor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abuse in the Japanese Population : A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse.	Ann N Y Acad Sci	1025	27-33	2004
Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N	Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population.	Biol Psychiatry	56 (9)	698-700	2004
Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I :	Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers.	Ann N Y Acad Sci	1025	316-324	2004

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H:	Association analysis of the G308A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia.	Journal of Neural Transmission	111 (2)	217-222	2004
Harano M, Uchimura N, Abe H, Ishibashi M, Iida N, Yanagimoto K, Tanaka T, Maeda H, Sora I, Iyo M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Ujike H:	A Polymorphism of DRD2 Gene and Brain Atrophy in Methamphetamine Psychosis.	Ann N Y Acad Sci	1025	307-315	2004
Deng XX, Shibata HH, Ninomiya HH, Tashiro NN, Iwata NN, Ozaki NN, Fukumaki YY:	Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia.	BMC Psychiatry	4 (1)	21	2004
Kakiuchi C, Ishiwata M, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Kato T	Association of the XBP1-116C/G polymorphism with schizophrenia in the Japanese population.	Psychiatry and Clinical Neurosciences	58	438-440	2004
Ohtsuki T, Tanaka S, Ishiguro H, Noguchi E, Arinami T, Tanabe E, Yara K, Okubo T, Takahashi S, Matsuura M, Sakai T, Muto M, Kojima T, Matsushima E, Toru M, Inada T:	Failure to find association between PRODH deletion and schizophrenia: population screening using simple PCR method.	Schizophr Res	67	111-113	2004
Takahashi N, Tomita K, Higuchi T, Inada T:	The inter-rater reliability of the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) using a Structured Interview Guide for Montgomery-Asberg Depression Scale (SIGMA).	Hum Psychopharmacol Clin Exp	19	187-192	2004
Iijima Y, Inada T, Ohtsuki T, Senoo H, Nakatani M, Arinami T:	Association between chromogranin B gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population.	Biol Psychiatry	56 (1)	10-17	2004

Ohtsuki T, Inada T, Arinami T:	Failure to confirm association between AKT1 haplotype and schizophrenia in a Japanese case-control population.	Mol Psychiatry	9(11)	981-983	2004
Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H:	Analysis of enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder.	Neuropsychobiology	50 (3)	206-210	2004
Suzuki K, Takei N, Iwata Y, Sekine Y, Toyoda T, Nakamura K, Minabe Y, Mori N:	Do olfactory reference syndrome and Jiko-shu-kyofu share a common entity?	Acta Psychiatrica Scandinavia	109	150-155	2004
Sekizawa T, Iwata Y, Nakamura K, Matsumoto H, Suzuki A, Minabe Y, Mori N:	Childhood-onset schizophrenia and tryptophan hydroxylase gene polymorphism.	American Journal of Medical Genetics	128B	24-26	2004
Takebayashi K, Sekine Y, Takei N, Minabe Y, Isoda H, Sakahara H, Mori N:	Metabolite alterations in basal ganglia associated with psychiatric symptoms of abstinent users: A proton MRS study.	Neuropsychopharmacology	29	1019-1026	2004
Tani K, Takei N, Kawai M, Suzuki K, Sekine Y, Toyoda T, Minabe Y, Mori N:	Augmentation of milnacipran by risperidone in treatment for major depression.	International Journal of Neuropsychopharmacology	7	55-58	2004
Minabe Y, Shirayama Y, Hashimoto K, Routledge C, Hagan JJ, Ashby CR:	The effect of the acute and chronic administration of the selective 5-HT ₆ receptor antagonist SB-271046 on the activity of midbrain dopamine neurons in rats: An in vivo electrophysiological study.	Synapse	52	20-28	2004

Kawai M, Minabe Y, Takagai S, Ogai M, Matsumoto H, Mori N, Takei N:	Poor maternal care and high maternal body mass index in pregnancy as a risk factor for schizophtrenis in offspring.	Acta Psychiatrica Scandinavica	110	257-263	2004
Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, Toyota T, Ujike H, Sora I, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M:	Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia.	Neuroscience Letters	368	41-45	2004
Inoue K, Yamada A, Fujii R, Nakatani J, Matsubara C, Ishii M, Aburatani H, Umino A, Nishikawa T, Takumi T:	Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex..	Eur J Neurosci	20	2909-2916	2004
Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T:	Effects of psychotomimetic and antipsychotic agents on neocortical and striatal concentrations of various amino acids in the rat.	J Neurochem	90	1378-1388	2004
Kawamoto, T., Horikawa, Y., Tanaka, T., Kabe, N., Takeda, J., and Mikuni, M.	Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder.	Molecular Genetics and Metabolism	82	238-245	2004
Tanaka, T., Horikawa, Y., Kawamoto, T., Kabe-Sakurai, N., Takeda, J., and Mikuni, M.	Expression profile of mRNAs from rat hippocampus and its application to microarray.	Molecular Brain Research	129	20-32	2004
Shinohara,M., Mizushima,H., Hirano,M., Shioe,K., Nakazawa, M., Hiejima,Y., Ono, Kanba,S.:	Eating disorders with binge eating behavior are associated with s allele of 3'-UTR VNTR polymorphism of dopamine transporter gene.	Journal of Psychiatry & Neuroscience	29 (2)	134-137	2004

Aoki-Suzuki, M., Yamada, K., Meerabux, J., Iwayama-Shigeno, Y., Ohba, H., Iwamoto, K., Takao, H., Toyota, T., Suto, Y., Nakatani, N., Dean, B., Nishimura, S., Seki, K., Kato, T., Itohara, S., Nishikawa, T., Yoshikawa, T.	A family-based association study and gene expression analyses of netrin-G1 and -G2 genes in schizophrenia.	Biol. Psychiatry	57	382-393	2005
Iwayama-Shigeno, Y., Yamada, K., Itokawa, M., Toyota, T., Meerabux, J.M.A., Minabe, Y., Mori, N., Inada, T., Yoshikawa, T.	Extended analyses support the association of a functional (GT) _n polymorphism in the <i>GRIN2A</i> promoter with Japanese schizophrenia.	Neurosci. Lett	378	102-105	2005
Saito S, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Inada T, Ozaki N:	No association was found between a functional SNP in ZDHHC8 and schizophrenia in a Japanese case-control population.	Neurosci Lett	374 (1)	21-24	2005
Miura H, Qiao H, Kitagami T, Ohta T, Ozaki N:	Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice.	Psychopharmacology (Berl)	177 (3)	307-14	2005
Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H:	Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders.	Neural Transm	(2)	303-307	2005
Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H:	A missense polymorphism (H204R) of a Rho GTPase-activating protein, the chimerin 2 gene, is associated with schizophrenia in men.	Schizophr Res	73 (2-3)	383-385	2005
Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T:	The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology.	Curr Biol	15	587-593	2005

Yamada K, Ohnishi T, Hashimoto K, Ohba H, Iwayama-Shigeno Y, Toyoshima M, Okuno A, Takao H, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Shimizu E, Itokawa M, Mori N, Iyo M and Yoshikawa T:	Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels.	Biol Psychiatry			In press
Meerabux JMA, Ohba H, Fukasawa M, Suto Y, Aoki-Suzuki M, Nakashiba T, Nishimura S, Itohara S and Yoshikawa T:	Human netrin-G1 isoforms show evidence of differential expression.	Genomics			In press
Meerabux JMA, Iwayama-Shigeno Y, Sakurai T, Ohba H, Toyota T, Yamada K, Ruby Nagata R, Irukayama-Tomobe Y, Shimizu H, Yoshitsugu K, Ohta K and Yoshikawa T:	Association of an orexin 1 receptor 408Val variant with polydipsia-hyponatremia in schizophrenics.	Biol Psychiatry			In press
Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N:	Haplotype association between GABA _A receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder.	Pharmacogenomics			In press
Kinoshita Y, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Yoneda H, Iwata N, Ozaki N:	Association study of the calcineurin A-gamma subunit gene (PPP3CC) haplotype in Japanese schizophrenia.	Journal of Neural Transmission			In press
Suzuki A, Nakamura K, Sekine Y, Minabe Y, Takei N, Suzuki K, Iwata Y, Kawai M, Takebayashi K, Iyo M, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Mori N:	An association study between COMT gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder.	Psychiatry Genet			In press
Shirayama Y, Takahashi S, Minabe Y, Ogino T	¹ H NMR spectroscopy shows an increase in the NAAG and glutamate contents in the hippocampus of amygdaloid kindled rat.	Journal of Neurochemistry			In press

新井誠、山田和男、豊田倫子、羽賀誠、氏家寛、曾良一郎、池田和彦、吉川武男、糸川昌成	双極性障害および統合失調症における性差と神経細胞接着分子の関連研究	脳と精神の医学	15	477-488	2004
糸川昌成、山田和男、吉川武男	臨床遺伝と病態理解—遺伝子研究からみた病態仮説	医学のあゆみ	Vol. 208, No. 3	146-152	2004
吉川武男、中谷紀章	動物モデルを用いた気分障害標的遺伝子探索.	分子精神医学	Vol.4 No.1	98-99	2004
中谷紀章、吉川武男	うつ病の病態動物モデル	CLINICAL NEUROSCIENCE	Vol. 22	170-172	2004
服部栄治、吉川武男	気分障害において注目される遺伝子	分子精神医学	Vol.4 No.2	120-125	2004
山田和男、吉川武男	連鎖不平衡マッピング	生体の科学	55	548-549	2004
山田和男、吉川武男	感情障害疾患関連遺伝子の探索	臨床精神医学	Vol.33 No.10	1321 -1326	2004
吉川武男、豊田倫子、吉次聖志、山田和男、糸川昌成、三辺義雄、中村和彦、都丸義郎、武井教使、熊倉徹雄、森則夫	精神疾患関連表現型の遺伝子解析	精神神経学雑誌	Vol. 106, No.12	1585 -1592	2004
吉川武男	動物モデルと遺伝子研究—動物モデルが示唆するもの	精神神経学雑誌	Vol. 106, No.8	1037 -1044	2004
西川 徹	Schizophreniaの分子病態—内在性D-セリンおよび発達依存的発現制御を受ける遺伝子の意義—第1回Schizophrenia研究会	臨床精神薬理	7	87-112	2004
西川 徹	統合失調症のグルタミン酸仮説	生体の科学	55	544-545	2004
西川 徹	mrt1をめぐって 統合失調症の神経生物学. mrt1; Possible implication in the pathophysiology of schizophrenia.	Schizophrenia Frontier	5	18-24	2004
西川 徹	Special Review 「脳内D-セリンの代謝と生理作用」	細胞工学	23	1180 -1185	2004

村岡新一郎, 梶井 靖, 山本直樹, 海野麻未, 柏 淳, 伊藤卓, 金子雄二郎, 西川 徹	統合失調症の発症に関与する遺伝子の発達薬理学的研究	精神薬療研究年報	36	49-52	2004
内匠 透, 藤井律子, 吉村淳, 井上 浄, 渡辺康仁, 漆戸智恵, 岡部繁男, 西川 徹	抗精神病薬標的分子としてのRNA結合蛋白の機能解析	精神薬療研究年報	36	90-94	2004
吉川武男, 大西哲生	動物モデルを用いたうつ病の分子遺伝学的アプローチ	日薬理誌	Vol. 125	25-32	2005
吉川武男	統合失調症関連表現型の遺伝子解析—眼位異常を中心に	脳21	Vol. 8	39-43	2005
吉川武男, 渡邊明子, 豊田倫子, 石塚祐一	マウスにおけるプレパルスインヒビションの遺伝学的解析	分子精神医学	Vol.5 No.2	139-144	2005
古田 光, 西川 徹	統合失調症 標準治療と最新治療—メリットとデメリット	Clin Neurosci	23	106-107	2005
嶋津 奈, 西川 徹	モノアミン障害・アンフェタミンモデル 統合失調症の仮説とそのモデル検証.	分子精神医学	5	58-63	2005
西川 徹	統合失調症の分子薬理学的解析—ドーパミン受容体およびNMDA受容体作用薬を用いたアプローチ— 特集1 統合失調症: 分子から治療まで.	脳21	8	9-15	2005
山田和男, 岩山佳美, 吉川武男	マイクロアレイを用いた疾患感受性遺伝子の同定	臨床検査			印刷中



Structural characterization and promoter analysis of human potassium channel Kv8.1 (*KCNV1*) gene

Mitsuru Ebihara, Hisako Ohba, Mika Kikuchi, Takeo Yoshikawa*

Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Received 9 June 2003; received in revised form 10 September 2003; accepted 10 September 2003

Received by T. Sekiya

Abstract

The voltage-gated K⁺ channel (Kv) family comprises four subfamilies: Kv1, Kv2, Kv3 and Kv4. Kv6, Kv7, Kv8 and Kv9 subfamilies have also recently been reported. The gene for Kv8.1 (*KCNV1*) maps onto chromosome 8q23.3, a locus for benign adult familial myoclonic epilepsy. Despite sequence identity with other K⁺ channel genes, *KCNV1* does not display K⁺ channel activity when expressed in *Xenopus* oocytes, instead inhibiting activity of Kv2 and Kv3 channels. The present study investigated the molecular structure of *KCNV1*. In silico analysis detected a new 5' noncoding exon, which extended the reported cDNA sequence to approximately 600 bp. A promoter motif was found only in the upstream region of the newly detected exon 1. To determine the transcriptional mechanism of *KCNV1*, we generated a series of deletion mutants and random mutants, and examined promoter activities using the luciferase system. Three Sp1 motifs were found to be active in the core promoter sequence, spanning from nt –1350 to –911 (A of the ATG initiation codon was counted as +1). At least two additional sequences were detected as essential elements for promoter activity. A possible alternative 3' end was also detected at 280 bp downstream from the reported 3' end. These results provide useful information in developing *KCNV1* screening for epileptic disease.
© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Epilepsy; BAFME; Luciferase assay; Random mutagenesis; Sp1; Alternative poly(A) site

1. Introduction

A huge number of K⁺ channel genes have been reported for the human genome (Jan and Jan, 1997). Based on the number of membrane-spanning domains, K⁺ channel subunits can be divided into three structural classes: channels with two, four or six transmembrane channels. Those with six transmembrane channels are further divided into six conserved families: voltage-gated (Kv), KQT, Eag, Slo, CNG and SK. Based on sequence similarities, the Kv family can be further divided into four subfamilies (Kv1–4). Recently, four new subfamilies (Kv6–9) have been reported. The Kv8.1 (*KCNV1*) protein displays approximately 40% sequence identity with other K⁺ channel subunits. However,

the *KCNV1* subunit does not generate K⁺ channel activity in *Xenopus* oocytes, instead acting to suppress Kv2 and Kv3 channels (Hugnot et al., 1996; Salinas et al., 1997). In COS cells, *KCNV1* does not inhibit the Kv2.2 current when cotransfected with Kv2.2, but changes the kinetic properties of Kv2.2 (Salinas et al., 1997).

Some K⁺ channel genes are known to be associated with human diseases, such as long QT syndrome, episodic ataxia and epilepsy (Browne et al., 1994; Wang et al., 1996; Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998). Mutations in the *KCNQ2* and *KCNQ3* channel genes are suggested to cause benign familial neonatal convulsions (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998). *KCNV1* is located on chromosome 8q23.3, the susceptibility region for benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) (Mikami et al., 1999), making this gene an interesting candidate for the disease.

The present study determined the whole genomic structure of *KCNV1*, and identified a new 5' exon and promoter sequence. Analysis of the *KCNV1* promoter revealed the essential elements for transcription. An alternative 3' end of

Abbreviations: Kv, voltage-gated K⁺ channel; BAFME, benign adult familial myoclonic epilepsy; nt, nucleotide; bp, base pair; A, adenosine; EST, expressed sequence tag; BAC, bacterial artificial chromosome; UTR, untranslated region.

* Corresponding author. Tel.: +81-48-467-5968; fax: +81-48-467-7462.

E-mail address: takeo@brain.riken.go.jp (T. Yoshikawa).