

ラット視床下部 cDNA ライブラリーからストレス関連因子を  
網羅的にスクリーニングする方法の確立研究

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：**

昨年われわれは、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明らかにするため、視床下部 cDNA ライブラリーを作成した。今回、視床下部—下垂体—副腎皮質系のネガティブフィードバックの視床下部における分子機構に注目し、作成したライブラリーから計算機上で、関連因子のスクリーニングを行い、候補因子の一部を挙げる事ができた。今後、実際のアッセイによる結果と比較し、ライブラリーの有効な利用方法を確立する。

**A. 研究目的**

生体の主なストレス反応系である視床下部下垂体—副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA 系) の機能異常はうつ病を中心とするストレス関連疾患の発症に大きく関与している。

われわれは、はじめに HPA 系を制御する組織に注目した。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、Cell Organism Diffense に関わる遺伝子のクローンを用いて DNA マイクロアレイを作成した (Tanaka et al, 2004)。

続いて、HPA 系の起始核を含む視床下部について、海馬と同様の方法でカタログ化を行った。視床下部は HPA 系の最終産物であるグルココルチコイドによって、ネガティブフィードバックを受けていることが知

られている。そこで、海馬とは異なる視点で、感情障害関連因子の候補をスクリーニングすることを計画した。

視床下部は、HPA 系の出発点となる神経ペプチドの副腎皮質刺激ホルモン遊離因子 (CRH) を産生しており、CRH の合成および分泌はグルココルチコイドによって抑制される。抑制の分子機構は、CRH 遺伝子上流域のグルココルチコイドレスポンスエレメントを介した転写制御という直接的な機構から、辺縁系を介した間接的な制御機構まで、多様な系の関与が考えられているが、その詳細は解明されていない。

視床下部における HPA 系のネガティブフィードバック機構に関与する遺伝子を挙げるため、先に作成したラット視床下部 cDNA ライブラリーを用いて、計算機による一次スクリーニングを試みた。

## B. 研究方法

グルココルチコイドによる視床下部での CRH 合成、分泌抑制に関与する遺伝子をスクリーニングするため、2つのアプローチを行った。一方はグルココルチコイドに直接制御される因子として、グルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) コンセンサス類似配列を上流に持つ遺伝子の検索、他方は CRH 合成分泌機構に関与する機能を持つ遺伝子の検索である。

### (1) グルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) の検索

ラット視床下部 cDNA ライブラリーに含まれる既知遺伝子 (2858 個) について、統合データベースである UCSC ゲノムブラウザーを用いて、転写開始点から 10kb 上流までの塩基配列を抽出した (現在進行中)。

抽出した塩基配列上に存在する GRE を検索するために、現在までに検証されている転写因子結合領域をもとに作成された公開データベース TRANSFAC および転写因子結合領域検索プログラム MATCH を用いた。カットオフ値はマトリクス類似性 0.90、コア類似性 0.95 とした。

### (2) ジーンオントロジー (GO) を用いた CRH 合成分泌関連因子の検索

ラット視床下部 cDNA ライブラリーに含まれる既知遺伝子 (2858 個) について、ジーンオントロジー (GO) 注釈付けを付記した。われわれは、現在までに作成したラットの海馬と視床下部のライブラリーについて、注釈に含む単語によって簡便に遺伝子を選択できるツールを付け加えた。CRH の合成分泌に関わる機能として、Receptor

activity, Transcription factor, Processing, Protein transport, Vesicle, Exocytosis を注釈に含む遺伝子を抽出した。

(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) グルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) を上流に持つ遺伝子

現在までに 96 個の遺伝子について検索を行った結果、34 個 (35%) の遺伝子の上流に GRE 候補領域をみとめた。グルココルチコイド受容体遺伝子の他、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体などの核内受容体やストレス関連因子では、ヒートショック蛋白 40 ホモログ (Dnajb9) に GRE 候補が存在した。

### (2) CRH 合成分泌に関与する機能を持つ遺伝子

それぞれの単語を注釈に含む遺伝子の数と代表的な遺伝子を示した。

Receptor activity: 136 (GABAA など)

Transcription factor: 85 (STAT5B など)

Processing: 51 (Protein convertase 2 など)

Protein transport: 90 (Rab3a など)

Vesicle: 83 (Snap25 など)

Exocytosis: 26 (Vamp2 など)

(一部に重複する遺伝子あり)

## D. 考察

われわれは一昨年ラット海馬、昨年にはラット視床下部について cDNA ライブラ

リーのカタログ化を行った。これらのライブラリーには未知遺伝子も含めて複数のストレス関連遺伝子が存在しているはずである。その検証には実際のアッセイが不可欠であるが、5000種類を超える遺伝子を実験系に取り入れるためには優先順位をつける必要があった。

今回われわれは、グルココルチコイドによるCRH合成分泌抑制機構に注目した。この抑制機構に関連する遺伝子の候補を、グルココルチコイドによって直接転写制御を受けている遺伝子（＝遺伝子上流にGREが存在する）とCRHの合成分泌機構に関わる遺伝子（＝合成分泌経路に介在する）という2通りのアプローチで絞り込むことを試みた。

計算機上で公開データベースを用いて、GREを検索する方法を確立した。検索作業は進行中であるが、現在までの結果から、この方法で、ライブラリー全体の約1/3に候補を絞ることができると推測できる。実際にグルココルチコイド（デキサメサゾン）投与ラットのアッセイを行い、カットオフ値を調整することで、より効率的なスクリーニング法に質を高められるはずである。このGRE予測は、未知遺伝子についても応用が可能であり、新規のグルココルチコイド反応遺伝子の発見も期待できる。

また、我々は、G0の注釈付けに基づいた機能による候補遺伝子のスクリーニングにも成功し、約400個をリストアップした。G0とはCellular component, Biological process, Molecular functionの3要素について矛盾なく注釈付けを行っていき現在発展中の世界的なプロジェクトであるが、大量の遺伝子について機能分類を行う場合にも、G0単語を用いることが有用であった。

今後、候補遺伝子のマイクロアレイを作成し、グルココルチコイド投与ラットで実際に増減するものを再び絞り込む予定である。

現在世界には、塩基配列データベース、アミノ酸配列データベースをはじめ、様々なデータベースが存在しており、その多くは研究用に公開されている。今回の我々の研究は、自作のライブラリーおよび公開データベースと実際の実験系を結び付けるという点で重要である。

## E. 結論

視床下部におけるグルココルチコイドによるネガティブフィードバック関連遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法として、計算機上でのGRE候補推定とG0注釈に基づく選択を行った。今後、実際のアッセイの結果と比較し、関連遺伝子のスクリーニング法を確立する。

## 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・医学工学総合研究部 講師

研究要旨

*TRPM2* 遺伝子の転写調節開始点周辺に挿入、欠失を伴う一塩基置換を発見した。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。*GRK3* 遺伝子転写調節領域に同定した複数の多型について関連は認めなかった。

A. 研究の背景および目的

双極性障害の発症は、社会心理学的要因といった環境要因だけでなく、家系研究、双生児研究および養子研究から遺伝的要因が関与していることは周知の見解である。双極性障害の疾患感受性遺伝子を同定するため、家系を用いた連鎖解析が数多く行われている。これまでに、1q21-42, 4p16, 10q21-26, 11p15, 12q23-24, 13q11-32, 18p11, 18q21, 21q21, 22q11-12, Xq26 など、多数の連鎖部位の報告があるが、全ての研究で一致した結果は得られていない。これは、結果に再現性がないというよりも、双極性障害の発症が、単一遺伝子疾患ではなく、遺伝と環境の双方の要因が複雑に関与する複雑遺伝形質疾患であるため、また、複数の遺伝子が双極性障害の発症に関与しているが、それぞれの遺伝子の影響が弱いためと考えられる。我々はこれまでに行われた多くの連鎖解析の報告から、複数のグループで一致した連鎖部位である 21 番染色体長腕 22.3 領域 (21q22.3) および 22 番染色体長腕 12 領域 (22q12) に注目した。

1994 年、Straub らによって、東ヨーロッパのユダヤの一家系を用いた連鎖解析が行われ、21q22.3 にある DNA マーカー PFKL (phosphofructokinase, liver type) 近傍でロッドスコア 3.41 が得られた、という報告がなされた<sup>1)</sup>。以後、同領域周辺に関して、複数の報告があり、これらの結果から、21q22.3 における

PFKL から D21S171 にかけての領域が、双極性障害の疾患感受性遺伝子が存在する候補領域の一つとして考えられるようになった<sup>2) 3) 4)</sup>。我々は、この候補領域にある遺伝子の中で、脳内での発現が強いといった組織特異性や遺伝子の機能から、*TRPM2* (transient receptor potential melastatin 2) 遺伝子に注目した。*TRPM2* 遺伝子は、21q22.3 上に存在し、ゲノム上約 90 kb にわたる 32 個のエキソンからなる遺伝子として同定された。また、同遺伝子は、脳での発現が強く、主要な転写物は 6.5 kb の長さで、タンパク質としては 1503 アミノ酸残基からなるカルシウムチャネルである。さらに、線条体特異的な転写物 (5.5 kb) も存在することがわかった<sup>5)</sup>。

一方で、2002年に、これまでに報告された全ゲノム連鎖解析の結果をまとめたメタ分析の論文で、双極性障害と連鎖する部位として、13番染色体と22番染色体が有意であるという結果が得られた<sup>6)</sup>。特に、22番染色体の22q12は双極性障害の候補領域として注目されている<sup>7) 8) 9) 10)</sup>。この領域に存在する遺伝子の中で、機能および組織特異性といった両側面から、*GRK3* (G protein receptor kinase 3) 遺伝子に注目した。同遺伝子は、双極性障害の感受性領域である22q12領域に存在し、*ADRBK2* (adrenergic, beta, receptor kinase 2) としてクローニングされ、現在は、GRKファミリーの一員で

ある。GRK3遺伝子は、21個のエキソンからなる約190 kbの長さの遺伝子で、転写物は約3.6 kbの長さである。また、GRK3タンパクは688アミノ残基からなり、Gタンパク受容体のリン酸化酵素として機能している。また、北欧の双極性障害患者の153家族と275家族の2つのグループを調査対象として、多型解析をしたところ、同遺伝子のプロモーター領域に、双極性障害患者に有意に認められる一塩基置換を認めた、という報告がある<sup>11)</sup>。

これまでの双極性障害の疾患感受性遺伝子の多型解析は、エキソンやイントロンを中心とした報告が多いが、双極性障害の発症年齢は20～30歳代であり、遺伝的要因だけでなく環境要因もあるため、脳内で発現する遺伝子の転写調節の異常が双極性障害の病態生理に関わっている可能性がある。そのため本研究では、位置的にも機能的にも有力な候補遺伝子であるTRPM2遺伝子およびGRK3遺伝子それぞれについて、転写調節領域の解析を詳細に行った上で、同領域に存在する変異・多型を検出し、各々の遺伝子の転写調節領域にある多型と日本人の双極性障害の発症との関連を検討した。

## B. 対象と方法

### 1. TRPM2 遺伝子の解析

コンピューター解析により第1エクソンを含むプロモーター領域のGCおよびCpG含有量の解析を行った。その上で、ヒト尾状核のmRNAを用いた5' RACE法およびNorthern blot法を行い、転写開始点を徹底的に解析した(詳細についてはUemuraらの論文を参照<sup>12)</sup>)。同解析の結果を元に、双極I型障害患者20名の末梢リンパ球より得られたDNAを用いて、転写開始領域より5'上流部約2 kbpにわたって定型的なPCR法により増幅し、sequencing法により塩基配列を確認した。プライマーはSSCP(single strand conformation polymorphism)法で感度が高くなるように、増幅する塩基配列が原則として400 bp以下となるように設定した。得られたPCR産物をSSCP法によって変異スクリーニングを行い、direct sequencing法により多型を

同定した。検出された対象領域の多型について、双極性I型及びII型障害患者群(DSM-IV診断による)92名(男性43名、女性49名、平均年齢:45.8±12.4)と年齢と性を一致させた対照群92名(平均年齢:47.3±14.1)を対象とし、関連解析を行った。

### 2. GRK3 遺伝子の解析

TRPM2遺伝子と同様に、第1エクソンより5'上流部約1.8kbpにわたって定型的なPCR法により増幅し、sequencing法により塩基配列を確認した。その後、双極性I型及びII型障害患者群(N=92)と年齢と性を一致させた対照群(N=92)を対象とし、関連解析を行った。

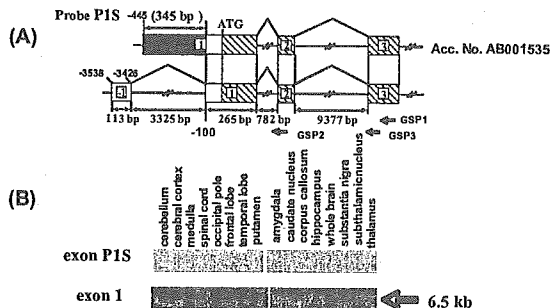
(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学倫理委員会の承認を経て行われ、研究対象者には、研究主旨を文書及び口頭にて十分に説明し、書面にて同意を得た。また、個人を特定することが不可能なように研究対象者を番号化し、また、個人情報漏洩がないように厳重に注意しながら研究を行った。

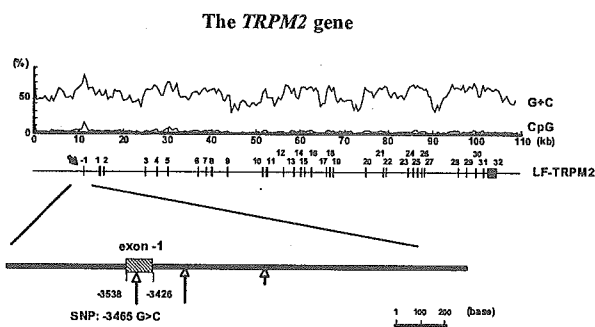
## C. 研究結果

### 1. TRPM2 遺伝子の転写開始点解析及び多型解析

5'RACE法およびNorthern blot法により、従来のexon 1(610 bp)は、5'側が345 bp短くなったexon 1'(265 bp)であること、その約3\_kb上流に、exon -1(113 bp)が存在していることを同定し、TRPM2遺伝子が従来知られていた開始コドンを含む第1エクソンよりも上流の非翻訳領域のみからなる新規エクソンから開始していることが明らかとなった(Fig.1)。また、このexon -1は、コンピューター解析上、GCおよびCpG含有量が多く、CpG islandと予測されうる領域に存在していた(Fig.2)。この結果をもとに、SSCP法を用いて転写開始領域より5'上流部約2\_kbにわたって、変異を検索していくと、7 bpの挿入(-3282\_-3283ins)及び49 bpの欠失(-3110\_-3062del)を伴うexon -1内の一塩基置換(-3465 G>C)を発見した(Fig. 2)。しかしながら、この多型の出現と双極性障害患者92名との関連は認められなかった(Table 1)



**Fig. 1** Localization of the novel first exon of the *TRPM2* gene. (A) Schema of the *TRPM2* gene from 5' UTR to exon 3. GSP1-H, GSP2-H and GSP3-H were used as primers for 5' RACE with human caudate nucleus mRNA. We detected exon  $\delta$ 1, which is located 3325 bp upstream from the novel exon 1. Exon  $\delta$ 1 is a non-coding exon. The novel exon 1 (265 bp) is 345 bp shorter than exon 1. Probe P1S is the specific PCR product for previous *TRPM2*. (B) Northern blot analyses of *TRPM2* transcript. Human brain multiple tissue Northern blots (Clontech) were hybridized with probes labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP. Probe P1S is located in the first exon of previous *TRPM2* transcript, but now in intron  $\delta$ 1 of the *TRPM2* gene.



**Fig. 2** Genomic structure of the *TRPM2* gene and polymorphisms genotyped. (Upper) G+C and CpG content analysis of *TRPM2* gene. The novel exon  $\delta$ 1 indicated by an arrow is located in the CpG island. (Lower) The locations of the three polymorphisms are shown. Nucleotide position one (1) is the first adenine of the initiation codon (ATG).

**Table 1** Genotype and allele frequencies of SNPs in the *TRPM2* promoter region

	genotype			allele	
	l*/l	l/s**	s/s	l	s
control (n=92)	91	1	0	182	2
bipolar disorder (n=92)	88	4	0	176	8

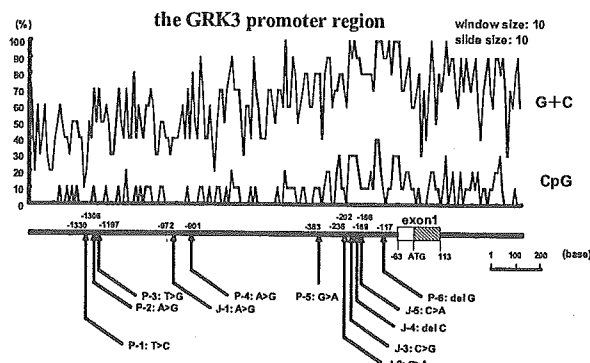
\* l: no polymorphism detected/larger allele

\*\* s: a SNP with one 7 bp-insertion and one 49 bp-deletion/shorter allele

## 2. *GRK3*遺伝子の多型解析

exon 1を含む転写開始領域約1.8kbpの変異を解析したところ、北欧の家系において双極性障害との関連が示唆された同遺伝子のプロモーター領域の多型P-5 (G>A)だけでなく、P-1 (T>C), P-2 (A>G)も、日本人を対象にした本研究

では双極性障害患者群、対照群ともに認められなかった。一方で、P-3 (T>G), P-4 (A>G), P-6 (del G)は認められ、その他に新たにJ-1~5の5つの変異も得られた (Fig. 3)。しかしながら、双極性障害患者92名と、それぞれの多型の関連をみたが、ハプロタイプを含めて有意な差は認められなかった (Table 2, 3)。



**Fig. 3** Genomic structure of the *GRK3* gene from 5' upstream regulatory region to exon 1 and polymorphisms genotyped. (Upper) G+C and CpG content analysis of the *GRK3* promoter region. The first exon of the *GRK3* gene is located in the GC rich region. (Lower) The locations of the 11 SNPs are shown. Nucleotide position one (1) is the first adenine of the initiation codon (ATG).

**Table 2** Genotype frequencies of SNPs in the *GRK3* promoter region

SNPs	P-1		P-2		P-3		J-1		P-4			
	-1330 T/C	-1306 A/G	-1197 T/G	-972 A/G	-901 A/G	-383 G/A	-236 G/A	-202 C/G	-189 C/del C	-186 C/A	-117 G/del G	
genotype	T/T	T/C	A/A	A/G	T/T	T/G	A/A	A/G	A/A	A/G	G/G	G/del G
control (n = 92)	92	0	92	0	84	8	91	1	84	8		
bipolar disorder (n = 92)	92	0	92	0	88	4	92	0	88	4		

SNPs	P-5		J-2		J-3		J-4		J-5		P-6		
	-383 G/A	-236 G/A	-202 C/G	-189 C/del C	-186 C/A	-117 G/del G	-383 G/A	-236 G/A	-202 C/G	-189 C/del C	-186 C/A	-117 G/del G	
genotype	G/G	G/A	G/G	G/A	C/C	C/G	C/C	C/del C	C/C	C/A	C/A	G/G	G/del G
control (n = 92)	92	0	91	1	91	1	87	5	91	1	91	1	
bipolar disorder (n = 91)	91	0	90	1	89	2	89	2	91	0	91	0	

Table 3 haplotype frequencies of SNPs in the GRK3 promoter region

control	bipolar disorder	P-1 -1330 T/C	P-2 -1306 A/G	P-3 -1197 T/G	J-1 -972 A/G	P-4 -901 A/G
175	180	T	A	T	A	A
8	4	T	A	G	A	G
1	0	T	A	T	G	A

control	bipolar disorder	P-5 -383 G/A	J-2 -236 G/A	J-3 -202 C/G	J-4 -189 C/delC	J-5 -166 C/A	P-6 -117 G/delG
176	177	G	G	C	C	C	G
1	1	G	A	C	C	C	G
1	2	G	G	G	C	C	G
5	2	G	G	C	delC	C	G
1	0	G	G	C	C	A	delG

## D. 考察

### 1. 双極性障害と *TRPM2* 遺伝子

双極性障害において、細胞内  $Ca^{2+}$  動員の異常が認められ、その治療薬が  $Ca^{2+}$  動員に調整的に働くことは多くの研究から明らかにされている<sup>13) 14)</sup>。我々が注目している *TRPM2* は、カルシウムチャネルの遺伝子であるが、ADP-ribose や  $H_2O_2$  等の活性酸素種により、細胞内に  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> が生じ、それが *TRPM2* タンパクの C 末端側ドメインに存在する NUDIXモチーフに結合することによりチャネルが活性開口し、その結果、 $Ca^{2+}$  や  $Na^{+}$  が細胞内に大量流入して細胞死をもたらすことが報告されている<sup>15) 16)</sup>。このことは、虚血などで神経細胞死をもたらす、神経系の可塑性にも関与していると考えられる。

*TRPM2* 遺伝子の転写調節開始点を詳細に検討し、その後、多型解析を行ったところ、挿入、欠失を伴う一塩基置換をみつけたが、双極性障害との関連は認められなかった。しかしながら、双極 I 型障害患者由来の B リンパ芽球細胞株のうち、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の高い群において、*TRPM2* mRNA 量が有意に低下していることが報告され<sup>17)</sup>、その後、同グループによって、*TRPM2* 遺伝子の mRNA 量が有意に低下している群を対象に、多型解析を行ったところ、intron 18 および intron 19 内に有意差のある一塩基置換を発見している<sup>18)</sup>。また、2005 年、McQuillin らより、600 人の双極性障害患者を対象として、関連解析を行ったところ、*TRPM2* 遺伝子の exon 11 にアス

パラギン酸からグルタミン酸へとアミノ酸置換をとまなう一塩基置換 ( $P=0.008$ ) を発見したとの報告もある<sup>19)</sup>。

### 2. 双極性障害と *GRK3* 遺伝子

今回、Barrett らによって双極性障害との関連が示唆された多型 P-5 (-383 G > A) は、本邦では、双極性障害患者群、対照群ともに認められなかった。また、プロモーター領域で、いくつかの多型も得られたが、双極性障害との関連は認められなかった。これまでに行われた多くの連鎖解析によって、*GRK3* 遺伝子が双極性障害の位置的候補遺伝子であるというだけでなく、この遺伝子の転写物が脳内で強く発現しており、特にドーパミン作動性神経路における発現が強く認められること、G タンパク受容体のリン酸化酵素として機能しており、Dopamine D1 receptor のリン酸化や脱感作に関与していることが報告されている<sup>20) 21)</sup>。また、ラットに methamphetamine を急性投与し、大脳皮質に存在する遺伝子 (8000 個) の発現を GeneChip でスクリーニングしたところ、発現量が最も増加していたのは *GRK3* 遺伝子であったという報告や、双極性障害患者由来のリンパ芽球様細胞株を用いて Western blot analysis を行ったところ、双極 II 型障害患者よりも双極 I 型障害患者において、*GRK3* タンパクの量が低下していた、という報告もある<sup>22)</sup>。さらに、自殺を遂げた抑うつ状態患者群の死後脳において、前頭前野における *GRK2/3* タンパク量の増加が認められている<sup>23)</sup>。

今回、我々は、*TRPM2* 及び *GRK3* 遺伝子における転写調節領域を中心として、多型解析を行った。ケース・コントロール研究において、両遺伝子ともに双極性障害との関連は見出せなかった。しかしながら、*TRPM2* 及び *GRK3* 遺伝子は、その位置的な意義だけでなく、機能的にも双極性障害の重要な疾患感受性遺伝子の候補であると考えられる。よって、今後も引き続き症例数を増やしながら両遺伝子の転写調節領域を中心とした多型解析を進める予定である。



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ゲノムバンクの構築  
分担研究報告書

家系収集ならびに気分障害の再発に関与する遺伝子の探索

分担研究者 西川 徹  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学・教授  
研究協力者 車地暁生、伊藤 卓、海野麻未、石井澄和、山本直樹、柏 淳、  
金子雄二郎

**研究要旨** 気分障害の高精度候補遺伝子・候補領域解析と精神疾患ゲノムバンクの構築に資するため、家系ゲノムサンプルを収集するとともに、気分障害のストレス性再発に関連する新たな候補遺伝子を探索した。候補遺伝子としては、気分障害が一定の年齢以降に発症することや、ストレス反応も発達に伴って著明に変化することに着目し、ラット大脳新皮質から、薬理学的ストレスラーと考えられる不安惹起薬の GABAA 受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト FG7142 に対して、ストレス性の血中コルチコステロン増加が認められない幼若期には応答が見られず、成熟期に発現が誘導される遺伝子群を、DNA アレイ法を用いてクローニングした。この中から、拘束ストレスや他の不安惹起薬 yohimbine でも共通して発現が増加する 3 種類の遺伝子を抽出した。以上の結果は、発達に伴って成熟する新規のストレス応答システムとその分子カスケードの存在を示唆している。検出された遺伝子群は気分障害のストレス性再発に関与する可能性があるため、現在気分障害を含む精神疾患患者における変化を開始した。

#### A. 研究目的

気分障害におけるゲノム異常の可能性については、連鎖解析および相関解析を中心に精力的に進められているが、現在のところ発症の原因となる遺伝子座または遺伝子の変化は見出されていない。一方、気分障害は再発を繰り返すことが多く、新しい治療・予防法開発のためにも、再発の分子機構の解明も急がれている。

このため、本研究では気分障害における遺伝子異常に新たな観点からアプローチすることをめざしている。すなわち、1) 気分障害は 20 代から 30 代の一定の年齢以降に発症する、2) 気分障害の発症や再発にはストレスが深く関与すると考えられているが、ストレスに対する応答も発達に伴って著しく変化し、齧歯類では、ストレス負荷後の血中コルチコステロン濃度の上昇を指標にすると、生後 2 日から 12 日頃

まではストレスに対する反応が極めて低い、3) 副腎皮質ステロイドとその制御系である、視床下部—下垂体—副腎系は、気分障害における異常が報告されている、等の点に着目した。これらの所見は、気分障害およびその再発に関係する神経回路や分子カスケードは特定の年齢で機能的成熟を遂げることを示唆している、そこで、気分障害のストレス性再発に関連する新たな候補遺伝子として、薬理学的ストレスラーである不安惹起薬に対する応答が、ストレス低反応期には目立たないが、成熟期では著明な遺伝子を探索した。

#### B. 研究方法

本年度の研究は、東京医科歯科大学の実験動物委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

## 1. 対象および薬物

動物実験には、生後 8 および 56 日令の C57/BL 系雄性マウスを用いた。マウスは  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 55%、8 時より 20 時を明期とする明暗条件下で飼育した。試薬は、すべて市販のものを用いた。ストレスラーとしては、強い不安惹起作用をもつ GABAA 受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニストの FG7142 (N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide,  $10 \sim 40\text{mg/kg}$ ) を用いた。FG-7142 は、0.1% の Tween 80 に懸濁し皮下注射 (s.c.) により投与した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常に free base で計算した。

## 2. RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) による RNA finger printing

生後 8 日齢または 56 日齢の動物に FG-7142 または 0.1% の Tween を投与後 1 時間で断頭し、大脳新皮質より total RNA を抽出した。それぞれの実験群において、8-10 匹の等量をプールし、生後 8 日齢の FG 7142 投与群と対照群、ならびに生後 8 週齢の FG7142 投与群と対照群の合計 4 群の total mRNA サンプルを作製した。これらのサンプルを用いて、8,374 クローンに対する DNA チップスクリーニング (IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を行った。さらに転写産物の全長を明らかにするため、RAP-PCR クローンにもとづいて、ラット脳 cDNA ライブラリーのスクリーニング、RACE 法 (rapid amplification of cDNA ends)、Cap site hunting 法等により解析を進めた。

## 3. 遺伝子発現の定量的解析

DNA チップスクリーニングで変化が認められた遺伝子については、より定量性の高いリアルタイム PCR 法を用いて、その変化を確認した。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。得られた PCR 増幅曲線から LightCycler Software を用いて、

GAPDH および標的遺伝子の mRNA 量の相対値を算出した。なお、PCR 産物の特異性の検討は、PCR 後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。さらに、ストレス反応の特徴を明らかにするため、大脳新皮質だけでなく海馬と線条体において、拘束ストレス負荷後や、不安惹起効果をもつ yohimbine を投与後における変化と比較した。

## C. 研究結果

本研究のスクリーニング実験において、大脳新皮質を対象としたのは、これまでの c-Fos 発現を使った脳の活動性変化の検討から、この部位が不安惹起薬 FG7142 急性投与への応答が発達に伴って最も著しく変化することが明らかになり、ストレス応答の発達との関連が推測されたためである。

若年成熟期にあたる 56 日齢と老年期初期に相当する 540 日齢の間で、FG7142 に対する応答に差が認められる遺伝子を大脳新皮質の finger print 上で探索したところ、540 日齢の方発現量の増加が大きい転写産物が検出され、anxiogenic-responsive transcript 6 (axg6)、axg7、axg8 および 10 (A63A30: axg10) と名付けた。DNA チップスクリーニングにより、該当する遺伝子として、これまでストレスに対する反応が知られていなかった 8 種類の遺伝子が検出され、anxiogenic-responsive transcript 1 (axg1) ~8 と名付けた。このうち 3 種類の遺伝子、axg6、axg7、axg8 は、成熟マウスの大脳皮質において、拘束ストレス負荷ならびに不安惹起薬である yohimbine 投与によっても発現が増加することがわかった。特に、axg6 遺伝子に関しては、海馬や線条体でも、FG7142、yohimbine および拘束ストレスの負荷後に発現が誘導された。

## D. 考察

本研究において、FG7142 を不安惹起性ストレスラーとして選択したのは、1) ヒトや動物に不安を選択的に引き起こすことが報告されており、2) 動物実験では、FG7142 投与時に他のストレス負

荷時と共通して、血中の副腎皮質ホルモンの上昇、脳内ノルアドレナリンニューロンの活動上昇、前頭葉のドーパミン伝達亢進等が認められる、3)GABA 受容体ベンゾジアゼピン結合部位の逆作動薬であることが確立され、4)脳への移行が容易で末梢から投与しても脳の GABA 受容体に作用させることが可能、等の所見にもとづいている。

気分障害等のストレスによる再発に關与する新規候補遺伝子の検索は、FG-7142 への応答が生後発達に伴って最も著しく変化する脳部位に、成熟期に作動する特異的なストレス応答系あるいはストレス防御系が存在するという発達学的仮説にもとづいて、大脳新皮質で行った。その結果、ストレスサーに対して、年齢依存的な反応を示す遺伝子が実在することが初めて明らかになり、以上の発達学的仮説が支持された。

本研究で検出された、FG-7142 投与によりストレス応答の臨界期以降に発現が誘導されるようになる遺伝子は、これまでストレス反応性の報告がなく、大脳新皮質のストレス応答・防御機構の新たな分子カスケードを構成すると考えられる。特に他の不安惹起薬や拘束ストレスでも明らかな発現誘導が生ずる 3 種の遺伝子 (axg6-8) は、ストレス負荷時の細胞応答の基本的な分子カスケードを構成している可能性があり注目される。

今後はさらに、これら遺伝子 (axg6-8) の局在、機能、気分障害・ストレス性精神障害またはそれらのモデルにおける病態やヒト相同遺伝子の変化を検討する。現在 axg8 について、組織化学的解析およびヒト相同遺伝子の相関解析を進めている。

## E. 結論

マウス大脳新皮質において、強い不安を惹起するストレスサーである GABA<sub>A</sub> 受容体逆アゴニスト、FG7412 による発現の増加が、ストレス低反応を示す幼若期には見られず、成熟期に著明になる遺伝子群を初めて検出し、このうち 3 種は成熟期に他の不安惹起薬やストレスでも発現誘導が生ずることを明らかにした。したがって、これら 3 種の遺伝子は成熟期のストレス応答に關与

し、気分障害その他の精神疾患のストレス性再発に關与する可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. 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.
2. 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
3. Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakurai S, Nishikawa T: Inhibition of D-serine accumulation in the *Xenopus* oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as D-serine modulator-1. *J Neurochem*. 96: 30-42, 2006.
4. Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dsr-2 from rat cerebral neocortex. *J Neurochem*, 95: 1541-1549, 2005.
5. Nishikawa T: Metabolism and functional roles of Endogenous D-serine in mammalian brains. *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 28: 1561-1565, 2005.
6. Inoue K, Terashima T, Nishikawa T, Takumi T:

Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex.

7. 黒田裕子, 新垣浩, 宮崎美里, 正木秀和, 大島一成, 車地暁生, 西川徹: 治療経過中に退行し, 復職プログラムと集団精神療法が有効であった遷延うつ病の症例. 精神科 6 巻 1 号: 65-70, 2005.

(2) 著書

1. 西川 徹: 6. 神経化学から. (風祭元, 山下格編). 心の科学セレクション 統合失調症. pp.541-542. 日本評論社, 東京, 2005.

(3) 総説

1. 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.
2. 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.
3. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理的解析—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.

(4) その他

1. 西川 徹: 分子生物 - 統合失調症. 東京大学医学部 M1 基礎統合講義 精神疾患の基礎医学. 東京, 2.8, 2005.
2. Nishikawa T: Glutamate dysregulation in schizophrenia. Recent Progress in Basic and Clinical Research of Neuropsychiatric Diseases, Seoul, 2.25, 2005.
3. 西川 徹: 「統合失調症治療と NMDA 受容体グリシン結合部位作動薬」, 第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 3.24, 2005.
4. 新垣浩, 小林一広, 岩間久行, 西川徹: Clozapine による治療が社会機能の改善をもたらした 1 例. 臨床精神薬理 8 巻 12 号 2108-2111, 2005.
5. 新垣浩, 岩間久行, 西川徹: Clozapine 抵抗性の

体感幻覚統合失調症の 1 例. 臨床精神薬理 8 巻 12 号 1993-1996, 2005.

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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡崎祐土, 峯田 聖, 谷井久志	統合失調症の遺伝学.	澤明	脳神経疾患病態の分子生物学	南山堂	東京	2005	73-84
稲田俊也, 稲垣 中, 中谷真樹, 堀 宏治, 樋口輝彦, 岩本邦弘		稲田俊也	ヤング躁病評価尺度日本語版 (YMRS-J) による躁病の臨床評価	じほう	東京	2005	1-54
稲田俊也, 笹田和見		稲田俊也, 笹田和見	ひと目でわかる向精神薬の薬効比較 エビデンス・グラフィックバージョン第4巻. 副作用と有害事象のエビデンス<抗不安薬・睡眠薬>	じほう	東京	2005	1-138
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	2005	73-90
西川徹	1 統合失調症. 第7 章神経・精神疾患の分子機構.	森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛	脳神経科学イラストレイテッド (改訂第2版)	羊土社	東京	2006	276 - 283
岩本邦弘, 徳倉達也, 稲田俊也	抗パーキンソン病薬は出来るだけ併用するべきでないか?	上島国利, 三村将, 中込和幸, 平島奈津子	EBM精神疾患の治療2006-2007	中外医学社	東京	2006	70-76
岩本邦弘, 稲田俊也, 稲垣中		稲田俊也	各種ガイドライン・アルゴリズムから学ぶ統合失調症の薬物療法	アルタ出版	東京	2006	1-87.
Nishikawa T	Neuroanatomical and molecular changes in stress responses.	Kato N, Kawata M and PitmanRK ( eds )	PTSD brain mechanisms and clinical implications.	Springer-Verlag	Tokyo	2005	3-11
Morio A, Ujike H, Nomura A, Tanaka Y, Morita Y, Otani K, Kishimoto M, Harano M, Inada T, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S	No Association between CART (Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript) Gene and Methamphetamine Dependence			Ann NY Acad Sci	New York		印刷中
Ujike H, Sakai A, Nakata K, Tanaka Y, Kodaka T, Okahisa Y, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Hori T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S	Association Study Between The Dihydropyrimidinase-related Protein 2 Gene And Methamphetamine Psychosis			Ann NY Acad Sci	New York		印刷中
Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Otani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S	The glycine transporter 1(GlyT-1) gene is associated with methamphetamine-induced psychosis			Ann NY Acad Sci	New York		印刷中
Nomura A, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Otani K, Morita Y, Morio A, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S	Association studies of the tumor necrosis factor-alpha gene and its receptor gene in methamphetamine dependence			Ann NY Acad Sci	New York		印刷中
Otani K, Ujike H, Sakai A, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Kishimoto M, Morio A, Morita Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S	Association study between cytochrome P450 2D6 genotype and patients with methamphetamine Dependence / Psychosis			Ann NY Acad Sci	New York		印刷中

Kishimoto M, Ujike H, Tanaka Y, Nomura A, Otani K, Morita Y, Morio A, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S	Association study between the FZD3 gene and methamphetamine psychosis			Ann NY Acad Sci	New York	印刷中
--	---	--	--	-----------------	----------	-----

雑誌

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	382-39	2005
Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JMA, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T	Extended analyses support the association of a functional (GT) <sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia.	Neurosci. Lett	378	102-105	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	57	1493-1503	2005
Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, Kato T	DNA methylation status of the SOX10 CpG island correlates with its down-regulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia.	J Neurosci	25	5376-5381	2005
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	86	112-116	2005
Meerabux J, 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	58	401-407 Cover Photo	2005
Hattori E, Liu C, Zhu Hand, Gershon ES	Genetic tests of biologic systems in affective disorders.	Molecular Psychiatry	10	719-740	2005
Ide M, Yamada K, Toyota T, Iwayama-Shigeno Y, Ishitsuka Y, Minabe Y, Nakamura K, Hattori N, Asada T, Mizuno Y, Mori N, Yoshikawa T	Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease.	Human Genetics	117	520-527	2005
Kato T, Iwayama-Shigeno Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Nanko S, Yoshikawa T	Gene expression and association analyses of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia.	Molecular Psychiatry	10	1045-1055	2005
Iwamoto K, Bundo M, Nakatani N, Yoshikawa T, Kato T	Altered RNA editing of serotonin 2C receptor in a rat model of depression.	Neuroscience Research	53	69-76	2005
Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T	Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder.	Biochem Biophys Res Commun	336	1136-43	2005
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, Osamu 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, Ohnuma T, Kusumi I, Koyama T, Yoneda H, Fukumaki Y, Shibata H, Kaneko S, Higuchi H, Yasui-Furukori N, Numachi Y, Itokawa M, Okazaki Y	Genome-wide high density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p. 14q, and 20p.	Am J Hum Genet	77	937-944	2005
Kato T, Iwamoto K, Kakiuchi C, Kuratomi G, Okazaki Y	Genetic or epigenetic difference causing discordance between monozygotic twins as a clue to molecular basis of mental disorders.	Mol Psychiatry	10	622-30	2005
Kaiya H, Umekage T, Harada S, Okazaki Y, Sasaki T	Factors associated with the development of panic attack and panic disorder: survey in the Japanese population.	Psychiatry Clin Neurosci	59	177-82	2005

Kazuno A, Munakata K, Mori K, Tanaka M, Nanko S, Kunugi H, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Akiyama T, Kato N, Kato T	Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with "atypical psychosis".	Psychiatry and Clinical Neurosciences	59	497-503	2005
Munakata K, Bundo M, Kato T, Ono H, Sakura N, Oosaki M, Waki C, Tanaka M	Co-existing point mutations of mitochondrial DNA in a patient with a heart abnormality and pearson syndrome-like symptoms.	American Journal of Medical Genetics	139A	162-164	2005
Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Noguchi E, Ohtsuki T, Koga M, Kato T, Itokawa M, Arinami T	A polymorphism in the PDLIM5 gene associated with gene expression and schizophrenia.	Biological Psychiatry		434-439	2005
Kato T, Kuratomi G, Kato N	Genetics of bipolar disorder.	Drugs of Today	41-5	335-344	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
Morita Y, Ujiike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Imamura T, Sakai A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S	A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia	Neurosci Lett	376	182-187	2005
Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JMA, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T	Extended analyses support the association of a functional (GT) <sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia	Neurosci Lett	378	102-105	2005
Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujiike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N	Haplotype association between GABA <sub>A</sub> receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder	Pharmacogenomics J	5(2)	89-95	2005
Morita Y, Ujiike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Otani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N	The X-box binding protein 1 (XBP1) gene is not associated with methamphetamine dependence	Neurosci Lett	383(1-2)	194-198	2005
Hori K, Funaba Y, Konishi K, Moriyasu M, Hirata K, Oyama R, Tominaga I, Inada T	Assessment of pharmacological toxicity using serum anticholinergic activity in a patient with dementia	Psychiatr Clin Neurosci	59(4)	508-510	2005
Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujiike H, Iyo M	Association Study Between Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abusers in Japan	Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)	132B	70-73	2005
Taniguchi G, Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Shimazu D, Sakurai S, Takebayashi H, Nishikawa T	Cloning of a d-serine-regulated transcript dsr-2 from rat cerebral neocortex.	J Neurochem	95	1541-1549	2005
Nishikawa T	Metabolism and Functional Roles of Endogenous D-Serine in Mammalian Brains.	Biol Pharm Bull	28	1561-1565	2005
Fujii R, Okabe S, Urashido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks CG, Takumu T	The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulate spine morphology.	Curr Biol	15	587-593	2005
Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N	No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with Schizophrenia in Japanese patients	Schizophr Res		online	2005
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	J Neural Transm		online	2005
Hashimoto T, Hashimoto K, Matsuzawa D, Shimizu E, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujiike H, Iyo M	A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	135(1)	5-9	2005
Hakamata Y, Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Ozaki N, Honjo S, Ono Y, Inada T	No association between monoamine oxidase A promoter polymorphism and personality traits in Japanese females	Neurosci Lett	389	121-123	2005

Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N	Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder	Int J Neuropsychopharmacol	8	1-5	2005
Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ujike H, Ozaki N	Association Analysis of Chromosome 5 GABA(A) Receptor Cluster in Japanese Schizophrenia Patients	Biol Psychiatry	58	440-445	2005
Ohgake S, Hashimoto K, Shimizu E, Koizumi H, Okamura N, Koike K, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Shirayama Y, Iyo M	Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis	Addict Biol	10(2)	145-148	2005
Hori K, Oda T, Asaoka T, Yoshida M, Watanabe S, Oyamada R, Tominaga I, Inada T	First episodes of behavioral symptoms in Alzheimer's disease patients at age 90 and over, and early-onset Alzheimer's disease: Comparison with senile dementia of Alzheimer's type	Psychiatry Clin Neurosci	59(6)	730-735	2005
Hashimoto R, Okada T, Kato T, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H	The Breakpoint Cluster Region Gene on Chromosome 22q11 is Associated with Bipolar Disorder	Biological Psychiatry	57 (10)	1097-1102	2005
Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kosuga A, Kamijima K, Kunugi H	The Gem interacting protein (GMP) gene is associated with major depressive disorder.	Neurogenetics	6 (3)	127-133	2005
Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M	Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia.	Biol Psychiatry	59	652-659	2006
Iwayama Y, Hashimoto K, Nakajima M, Toyota T, Yamada K, Shimizu E, Itokawa M, Hoshika A, Iyo M, Yoshikawa T	Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes.	Neurosci Lett	394	101-104	2006
Nakamura K, Yamada K, Iwayama Y, Tomoko Toyota T, Furukawa A, Takimoto T, Terayama H, Iwahashi K, Takei N, Minabe Y, Sekine Y, Suzuki K, Iwata Y,	Evidence that variation in the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) gene influences susceptibility to panic disorder.	Am J Med Genet	141B	222-226	2006
Tanii H, Fujita K, Okazaki Y	Neuroleptic malignant syndrome related to a switch to perospirone and anticholinergic withdrawal.	Am J Psychiatry	163	547-548	2006
Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Kunugi H, Koyama T	A possible association between the -116C/G single nucleotide polymorphism of the XBP1 gene and lithium prophylaxis in bipolar disorder.	International Journal of Neuropsychopharmacol	9(1)	83-88	2006
Shimazu D, Yamamoto N, Umino A, Ishii S, Sakkurai S, Nishikawa T	Inhibition of d-serine accumulation in the Xenopus oocyte by expression of the rat ortholog of human 3'-phosphoadenosine-5' phosphosulfate transporter gene isolated from the neocortex as d-serine	JNeurochem	96	30-42	2006
Arai M, Obata N, Kockelkorn TJP, Yamada K, Toyota T, Haga S, Yoshida Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T, Itokawa M	Lack of association between polymorphisms in the 5' upstream region of the DISC1 gene and mood disorders.	Psychiat Genet		in press	
Yoshitsugu K, Yamada K, Toyota T, Aoki-Suzuki M, Minabe Y, Nakamura K, Sekine Y, Suzuki K, Takei N, Itokawa M, Mori M, Yoshikawa T	Novel scale including strabismus and 'cuspidal ear' for distinguishing schizophrenia patients from controls using minor physical anomalies.	Psychiatry Research		in press	
Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Ohnishi T, Ohba H, Toyota T, Takao H, Minabe Y, Nakatani N, Higuchi T, Detera-Wadleigh SD, Yoshikawa T	Distinguishable haplotype blocks in the HTR3A and HTR3B region in the Japanese reveal evidence of association of HTR3B with female major depression.	Biol Psychiatry		in press	
Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Sakurada A, Sato M, Horii A, Kato A, Tsujimoto A, Matsubara K, Ushijima T, Sasaki H	Genome-wide profiling of promoter methylation in humans.	Oncogene		in press	
Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama Y, Yoshikawa T, Kato T	A family-based and case-control association study of SOX10 in schizophrenia.	Am J Med Genet		in press	
Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Yoshio Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osuni N, Yoshikawa T	Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia.	Schizophrenia Research		in press	



Doi N, Itokawa M, Hoshi Y, Arai M, Furukawa A, Ujike H, Sora I, Yoshikawa T in press.	A resistance gene in disguise for schizophrenia?	Am J Med Genet	in press		
Nakamura K, Chen C-K, Yoshimoto Sekine Y, Iwata Y, Pillai A, El-Wui Loh E-W, Takei N, Suzuki A, Kawai M, Takebayashi K, Suzuki K, Minabe Y, Tsuchiya K, Yamada K, Iyo M, Ozaki N, Toshiya Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, David M Ball DM, Yoshikawa T, Lin S-K, Mori N	Association Analysis of SOD2 Variants with Methamphetamine Psychosis in Japanese and Taiwanese Populations.	Hum Genet	in press		
Washizuka S, Kametani M, Sasaki T, Tochigi M, Umekage T, Kohda K, Kato T in press	Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with schizophrenia in the Japanese population.	American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)	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	Psychiatr Genet	in press		
Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Inada T	Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population	Schizophr Res	in press		
Ide S, Kobayashi H, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Tanaka K, Shen H, Iwahashi K, Itokawa M, Minami M, Satoh M, Ikeda K, Sora I	Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms	Pharmacogenomics J	in press		
Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maeno N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N	Association study between kynurenine 3-monoxygenase gene ( <i>KMO</i> ) and schizophrenia in the Japanese population	Genes, Brain and Behavior	in press		
Kobayashi H, Hatah, Ujike H, Harano M, Inada T, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Naka M, Ide S, Ikeda K, Numachi Y, I Sora I	Association analysis of d-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	in press		
Ikeda M, Ozaki N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kishi T, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Iwata N	Possible Association of b-Arrestin 2 Gene with Methamphetamine Use Disorder, but Not Schizophrenia.	Genes, Brain and Behavior	in press		
Suzuki A., Nakamura K., Sekine Y., Minabe Y., Takei N., Suzuki K., Iwata Y., JGIDA members, Mori N.	An association between COMT gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder.	Psychiatric Genetics	in press		
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	49-5	509-511	2005
大西哲生、大羽尚子、佐藤友美、Sung-Ke Chung、平林義雄、山田和男、岩山佳美、古市貞一、吉川武男	精神疾患感受性候補遺伝子IMPA2の機能解析	精神薬療研究年報	37	42-48	2005
糸川昌成、新井誠、古川愛造、小幡菜々子、柴田伸江、佐藤加奈、太朗良久美、吉田有希、氏家寛、曾良一郎、吉川武男	統合失調症の治療抵抗性・難治性に関する候補遺伝子研究.	精神薬療研究年報	37	116-120	2005
糸川昌成、吉川武男	統合失調症関連遺伝子.	日本臨床	63	437-440	2005
岡崎祐士、伊藤 勉、藤丸浩輔、今村 明	FIGS (遺伝研究用間接家族診断)	分子精神医学	5	159-170	2005
木村 卓、岩田健司、舟橋龍秀、関谷亮子、尾崎紀夫、稲田俊也	遅発性ジストニアに対するA型ボツリヌス毒素の使用経験	臨床精神薬理	8	507-514	2005
岩本邦弘、稲田俊也	遺伝研究のための精神科診断面接Diagnostic Interview for Genetic Studies (DIGS)	分子精神医学	5 (3)	43 (291)-47 (295)	2005
稲田俊也	精神症状評価尺度の基礎知識	月刊薬事	47 (8)	1367-1372	2005

宗俵奈織野, 稲田俊也	わが国における抗不安薬および睡眠薬の無作為化プラセボ対照試験	臨床精神薬理	8 (9)	1391-1396	2005
稲田俊也	非定型抗精神病薬にみられる錐体外路系副作用	薬局	56 (10)	2716-2720	2005
稲垣 中, 稲田俊也	クロロプロマジン換算	コラボネット	No. 6	8	2005
稲田俊也	精神症状評価尺度の基礎知識	精神科	7 (3)	231-235	2005
斉藤信一, 稲田俊也, 尾崎紀夫	ZDHC8と統合失調症	精神科	7 (3)	236-239	2005
袴田優子, 稲田俊也, 尾崎紀夫	人格行動特性と遺伝子多型	脳と精神の医学	16 (3)	179-193	2005
新垣浩, 岩間久行, 西川徹	特集Clozapine 症例集; Clozapine による治療が社会機能の改善をもたらした一例.	臨床精神薬理学	8	1993-1996	2005
新垣浩, 小林一広, 岩間久行, 西川徹	特集Clozapine 症例集; Clozapine 抵抗性の体感幻覚統合失調症の一例	臨床精神薬理学	8	2108-2111	2005
黒田裕子, 新垣浩, 宮崎美里, 正木秀和, 大島一成, 車地暁生, 西川徹	治療経過中に退行し、復職プログラムと集団精神療法が有効であった遷延うつ病の症例. 2005 ;	精神科	8	65 - 70	2005
西川徹	ヒトの脳に存在する遊離型D-セリンの機能と病態—精神神経疾患の治療への応用—	ファルマシア	41	863 - 868	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I 統合失調症：分子から治療まで	脳21	8	9-15	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法—	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
山本直樹, 谷口豪, 海野麻未, 石井澄和, 機井新一郎, 嶋津奈, 竹内崇, 金子雄二郎, 竹林裕直, 柏淳, 新垣浩, 車地暁生, 土田英人, 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療法開発に関する研究	精神科薬療研究年報	37	62-68	2005
糸川昌成, 吉川武男	統合失調症のグルタミン酸低下仮説.	Clinical Neuroscience	24-2	215-218	2006
糸川昌成, 吉川武男	話題になった遺伝子多型その後-DISC1.	分子精神医学	6-1	77-83	2006
久江洋企, 稲田俊也	認知機能障害と陰性症状の改善を目指したスイッチング	臨床精神薬理		印刷中	

# A Family-Based Association Study and Gene Expression Analyses of Netrin-G1 and -G2 Genes in Schizophrenia

Mika Aoki-Suzuki, Kazuo Yamada, Joanne Meerabux, Yoshimi Iwayama-Shigeno, Hisako Ohba, Kazuya Iwamoto, Hitomi Takao, Tomoko Toyota, Yumiko Suto, Noriaki Nakatani, Brian Dean, Sachiko Nishimura, Kenjiro Seki, Tadafumi Kato, Shigeyoshi Itoharu, Toru Nishikawa, and Takeo Yoshikawa

**Background:** The netrin-G1 (NTNG1) and -G2 (NTNG2) genes, recently cloned from mouse, play a role in the formation and/or maintenance of glutamatergic neural circuitry. Accumulating evidence strongly suggests that disturbances of neuronal development and the N-methyl-D-aspartate receptor-mediated signaling system might represent a potential pathophysiology in schizophrenia. We therefore set out to examine the genetic contribution of human NTNG1 and NTNG2 to schizophrenia.

**Methods:** Twenty-one single nucleotide polymorphisms (SNPs) from NTNG1 and 10 SNPs from NTNG2 were analyzed in 124 schizophrenic pedigrees. All genotypes were determined with the TaqMan assay. The expression levels of NTNG1 and NTNG2 were examined in the frontal (Brodmann's Area [BA]11 and BA46) and temporal (BA22) cortices from schizophrenic and control postmortem brains. The isoform-specific expression of NTNG1 splice variants was assessed in these samples.

**Results:** Specific haplotypes encompassing alternatively spliced exons of NTNG1 were associated with schizophrenia, and concordantly, messenger ribonucleic acid isoform expression was significantly different between schizophrenic and control brains. An association between NTNG2 and schizophrenia was also observed with SNPs and haplotypes that clustered in the 5' region of the gene.

**Conclusions:** The NTNG1 and NTNG2 genes might be relevant to the pathophysiology of schizophrenia.

**Key Words:** Neurodevelopment, laminin-1, laminin-2, postmortem brain, real-time quantitative polymerase chain reaction, alternative splicing

Schizophrenia is a severe brain disorder that usually produces a lifetime of disability, with emotional and cognitive distress for the affected individuals (Lewis and Lieberman 2000). Although schizophrenia has a worldwide prevalence of approximately 1%, the specific factors that underlie its predisposition remain elusive. A number of studies have focused on identifying genetic and environmental components that separately, or in combination, contribute to the manifestation of the disease (Lewis and Levitt 2002).

A strongly supported theory is that schizophrenia evolves from a fixed brain lesion occurring early in neurodevelopment that responds abnormally to later maturational stimuli (Chua and Murray 1996; Marenco and Weinberger 2000; Weinberger 1987). Developmental neurobiology has made great strides in detailing the molecular machinery that leads to the assembly of brain systems (Jessell 2000; Tessier-Lavigne and Goodman 1996). Several gene families that are responsible for encoding cues for

guiding axonal growth cones and cell migration have been identified. These genes include members of the immunoglobulin superfamily, ephrins, semaphorins, slits, and netrins (Chisholm and Tessier-Lavigne 1999; Tessier-Lavigne and Goodman 1996). For the cellular and signaling bases for schizophrenia pathophysiology, disturbances in N-methyl-D-aspartate (NMDA) and dopamine neurotransmission have also been strongly implicated.

The netrins are a family of diffusible axon guidance molecules related to laminin that are conserved from *Caenorhabditis elegans* to vertebrates (Ishii et al 1992; Serafini et al 1994). A netrin-related molecule, netrin-G1 (Ntng1) (also called laminin-1), has been identified in mice and shown to be distinct from the classical netrins in several aspects (Nakashiba et al 2000; Yin et al 2002). Unlike classical netrins, Ntng1 is predominantly tethered to the membrane through a carboxyl-terminal glycosyl phosphatidyl-inositol anchor. It generates several splice variants, none of which bind deleted in colorectal carcinoma (DCC) or uncoordinated 5 (UNC5), the best characterized netrin receptors. Nakashiba et al (2002) and Yin et al (2002) have recently identified a close paralogue, netrin-G2 (Ntng2) (also called laminin-2). Both *Ntng1* and *Ntng2* are elaborated within the vertebrate lineage. Comparative analysis of mouse *Ntng1* and *Ntng2* revealed complementary expression in the brain, implying nonredundant roles (Nakashiba et al 2002; Yin et al 2002). Our ongoing studies with mutant mice devoid of these proteins suggest that Ntng1 and Ntng2 are necessary in correct NMDA receptor functioning and that mutant mice show behavioral phenotypes related to schizophrenia (Nishimura et al 2004).

To define the possible roles of *NTNG1* and *NTNG2* molecules in schizophrenia, we mapped the genomic layout of human *NTNG1* and *NTNG2*, confirmed their chromosomal localization, and detected multiple splice variants of *NTNG1* transcripts. On the basis of these findings, we performed a

From the Laboratories for Molecular Psychiatry (MAS, KY, JM, YIS, HO, HT, TT, NN, TY), Molecular Dynamics of Mental Disorders (KI, TK), and Behavioral Genetics (SN, KS, SI), RIKEN Brain Science Institute, Wako; Section of Psychiatry and Behavioral Sciences (MAS, TN), Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Tokyo; Department of Pediatric Cardiology (YS), Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; and The Rebecca L. Cooper Research Laboratories (BD), Mental Health Research Institute of Victoria, Parkville, Victoria, Australia.

Address reprint requests to Takeo Yoshikawa, M.D., Ph.D., RIKEN Brain Science Institute, Laboratory for Molecular Psychiatry, 2-1 Hirosawa, Wako-city, Saitama 351-0198, Japan; E-mail: takeo@brain.riken.go.jp.

Received April 21, 2004; revised November 4, 2004; accepted November 11, 2004.

0006-3223/05/\$30.00

doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.022

BIOL PSYCHIATRY 2005;57:382-393  
© 2005 Society of Biological Psychiatry

genetic and expression study of these two closely related genes in schizophrenia.

## Methods and Materials

### Subjects

The schizophrenia pedigrees were all derived from a geographic area located in central Japan. The probands, both in- and outpatients, were followed up by hospital doctors for at least 6 months. The samples consisted of 124 families with 376 members, of whom 163 were affected. This included 1) 80 independent and complete trios (schizophrenic offspring and their parents); 2) 15 probands with one parent; 3) 13 probands with affected siblings; and 4) 30 probands with discordant siblings (Yamada et al 2004). There was some overlap in the samples from 1), 3), and 4). Consensual diagnosis was made according to DSM-IV criteria by at least two experienced psychiatrists, on the basis of direct interviews, available medical records, and information from hospital staff and relatives. None of the patients had additional Axis I disorders as defined by DSM-IV, and none of the present family members suffered from neurodegenerative disorders, including Parkinson's and Alzheimer's diseases.

The present study was approved by the ethics committee of RIKEN Brain Science Institute. All patients and family members gave informed and written consent to participate in the study.

### Determination of the Exon/Intron Structures of NTNG1 and NTNG2

The complete genomic structure of *NTNG1* was not available from the databases and was determined as described (Meerabux et al, unpublished data): briefly, mouse netrin-G1a complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) sequence NM\_030699 and G1d sequence AB038664, as well as human *NTNG1* clones BC030220 and AB023193, were aligned with human genomic bacterial artificial chromosome (BAC) clones RP11-270C12, RP11-396N10, and RP11-436H6 (GenBank identification [ID] numbers AC114491, AL590427, and AL513187, respectively; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST 2 sequences algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). For *NTNG2* genomic organization, we consulted the Ensembl Human Genome Browser ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/)), which provided annotation on the longest cDNA clone available in the databases (Vega Gene ID: OTTHUMG0000020835).

### Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

For fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis, *NTNG1* cDNA probe was prepared by polymerase chain reaction (PCR) amplification of Marathon-Ready Human adult brain cDNA (Clontech, Palo Alto, California) with a forward primer (5'-AGGGGGCGACTTGACAGGAGGC, 3' end at nucleotide (nt) -570: A of the ATG initiation codon is counted as +1) and a reverse primer (5'-GCAGTGCCTTTGGGGATGGGG, 3' end at nt 1032 in BC030220). The procedure was repeated for *NTNG2* (forward primer: 5'-CTGAGAGGTTCTGCTCCCATG, 3' end at nt 3; reverse primer: GGGTAGCAGCCCTGGCGCCAG, 3' end at nt 1313 in AB058760). The PCR products were separated on an agarose gel, and the DNA was excised, purified, and sequenced to check the fidelity of the probes. The purified DNA samples were fluorescently labeled under standard conditions and used as probes against normal metaphase chromosomes.

### Detection of Ntng1 Transcript Isoforms

On the basis of information regarding the mouse *Ntng1* splice variation, which is generated by alternative splicing of downstream exons (Nakashiba et al 2000), we designed a PCR assay to detect human splice variants from Marathon-Ready Human adult brain cDNA (Clontech), using a forward primer designed to exon 4 and a reverse primer in exon 10 (Meerabux et al, unpublished data). The PCR products were cloned into pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, California) and sequenced with the DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey). The exonic composition of each fragment was determined by aligning each sequence result against the known *NTNG1* exon sequences with SEQUENCHER software (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan).

We also performed semiquantitative analysis of *NTNG1* messenger ribonucleic acid (mRNA) splice variants by separating the PCR fragments with an Agilent 2100 bioanalyzer with the DNA1000 LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, California). The bioanalyzer software automatically calculates migration time (sec), area, size (bp), concentration (ng/ $\mu$ L), and molarity (nmol/L) of each separated band and displays the results in real time. The identities of the detected peaks were determined by comparison with the cloned isoforms run in a separate well on the same chip.

### Mutation Screening

Genomic DNA was isolated from blood samples according to standard methods. The complete coding region and exon/intron boundaries of *NTNG1* and *NTNG2* were screened for polymorphisms by direct sequencing of PCR products, from 40 unrelated schizophrenia samples. Primers used for amplification are listed in Appendix 1 (available online). Polymerase chain reaction was performed with an initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles at 94°C for 15 sec, 50°–70°C (optimized for each primer pair) for 15 sec, 72°C for 45 sec, and a final extension at 72°C for 2 min, with TaKaRa Taq polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan). Detailed information on amplification conditions is available upon request. Direct sequencing of PCR products was performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, California) and the ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Polymorphisms were detected with SEQUENCHER. The Japanese Single Nucleotide Polymorphisms (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>), The SNP Consortium (<http://snp.cshl.org/news/>), and the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases were searched for additional single nucleotide polymorphisms (SNPs).

### SNP Genotyping

Single nucleotide polymorphisms were typed in all 124 families with the TaqMan system (Applied Biosystems). Polymerase chain reactions were performed in an ABI 9700 thermocycler, and fluorescence was determined with an ABI 7900 sequence detector single point measurement and SDS v2.2 software (Applied Biosystems). Each marker was checked for allele-inheritance inconsistency within a pedigree with PEDCHECK software (O'Connell and Weeks 1998), and conflicts or flagged alleles were resolved by resequencing.

### Statistical Analyses

The initial panel of 124 families was analyzed with the pedigree disequilibrium test (PDT) program, v3.12 (<http://www.chg.duke.edu/software/pdt.html>) (Martin et al 2000, 2001). The statistically more conservative follow-up study was carried out