

## Evidence That Variation in the Peripheral Benzodiazepine Receptor (*PBR*) Gene Influences Susceptibility to Panic Disorder

Kazuhiko Nakamura,<sup>1\*</sup> Kazuo Yamada,<sup>2</sup> Yoshimi Iwayama,<sup>2</sup> Tomoko Toyota,<sup>2</sup> Aizou Furukawa,<sup>3</sup> Takahiro Takimoto,<sup>4</sup> Hayato Terayama,<sup>5</sup> Kazuhiko Iwahashi,<sup>4</sup> Nori Takei,<sup>1</sup> Yoshio Minabe,<sup>1</sup> Yoshimoto Sekine,<sup>1</sup> Katsuaki Suzuki,<sup>1</sup> Yasuhide Iwata,<sup>1</sup> Anitha Pillai,<sup>1</sup> Yurie Nakamoto,<sup>3</sup> Kazutaka Ikeda,<sup>6</sup> Mitsunobu Yoshii,<sup>3</sup> Isao Fukunishi,<sup>3</sup> Takeo Yoshikawa,<sup>2</sup> and Norio Mori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry and Neurology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute (BSI), Saitama, Japan

<sup>3</sup>Department of Neural Plasticity, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Division of Neurophysiology, Graduate School of Environmental Health, Azabu University, Sagami-hara-shi, Japan

<sup>5</sup>First Department of Anatomy, School of Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

<sup>6</sup>Department of Molecular Psychiatry, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan

Panic disorder (PD) is the repeated sudden occurrence of panic attacks, episodes characterized by psychological symptoms. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) is closely associated with personality traits for anxiety tolerance, and that it holds promise as a biological marker of stressful conditions. We have performed association analyses using the polymorphism to determine the PBR in PD. We screened the subjects for sequence variations within the 5' region, the coding region (exons 2–4), and the 3' noncoding region. One novel missense variant in exon 4, derived from the nucleotide transition in codon 162 (CGT → CAT:485G > A) resulting in an arginine-to-histidine (Arg → His) change, was detected in these subjects. The 485G > polymorphism of the PBR gene was analyzed in 91 PD patients and 178 controls. The genotypic and allelic analyses of the 485G > A revealed significant differences between the panic patients and the comparison subjects ( $P = 0.021$  and  $0.014$ , respectively). The present study provides new and important evidence that variation in the PBR gene influences susceptibility to PD. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** panic disorder; peripheral benzodiazepine receptor; polymorphism

### INTRODUCTION

Panic disorder (PD) is a disabling psychiatric condition associated with significant impairment of psychosocial and occupational functioning. Epidemiological studies have consistently estimated lifetime prevalence rates at 2–4% [Kessler et al., 1994; Weissman et al., 1997]. Family studies have consistently shown a higher prevalence, ranging from 7.7% to 20.5% among first-degree relatives of probands [Weissman

et al., 1997]. Twin studies have shown concordance rates of 25% for monozygotic twins and 10% for dizygotic twins [Skre et al., 1993], suggesting a genetic component in the development of this disease. Recent molecular genetic studies related to PD have so far mainly focused on cholecystokinin (CCK), serotonin (5-HT), dopamine (DA), and some other neuroactive systems. Positive findings were reported on the association between PD with CCK and CCK B receptor (*CCK-BR*) genes [Wang et al., 1998; Kennedy et al., 1999]. No associations have been found between *CCK-BR* gene variants and PD [Hamilton et al., 2001; Hattori et al., 2001; Yamada et al., 2001]. As for the 5-HT system, a positive association between PD and the 102T-C polymorphism in *HTR2A* gene was reported [Inada et al., 2003]. Several studies have detected associations between PD and the adenosine A2 receptor gene as well as catechol O-methyltransferase gene polymorphisms [Deckert et al., 1998; Woo et al., 2002], while other study did not replicate these findings [Yamada et al., 2001].

In this study, we focused on the peripheral benzodiazepine receptor (PBR). Our previous study indicated that the PBR is closely associated with personality traits for anxiety tolerance, and that it holds promise as a biological marker of stressful conditions [Nakamura et al., 2002]. We speculated that PBR might influence susceptibility to PD. PBR receptors are membrane proteins pharmacologically and structurally distinct from central-type benzodiazepine receptors, which are associated with the GABA<sub>A</sub> receptor-chloride channel complex. Acute stress is associated with increases in PBR in several tissues, whereas chronic stress is associated with a decrease in PBR binding capacity [Gavish et al., 1992; Drugan, 1996]. Also, decreased PBR levels have been demonstrated in several psychiatric disorders, such as generalized anxiety disorder (GAD) [Weizman et al., 1987; Ferrarese et al., 1990; Rocca et al., 1991], generalized social phobia (GSP) [Johnson et al., 1998], PD [Marazziti et al., 1994], and posttraumatic stress disorder (PTSD) [Gavish et al., 1996]. FG7142, a benzodiazepine receptor inverse agonist, induced severe anxiety that resembled panic attacks and biological characteristics of anxiety in healthy subjects [Dorow et al., 1983].

The purpose of this study was to clarify the nature of the relationship between the PBR and PD.

### MATERIALS AND METHODS

#### Subjects

The diagnoses of PD were based on DSM-IV [American Psychiatric Association, 1994]. Diagnoses were made by two

\*Correspondence to: Kazuhiko Nakamura, M.D., Ph.D., Department of Psychiatry and Neurology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, 431-3192, Japan. E-mail: nakamura@hama-med.ac.jp

Received 4 February 2005; Accepted 17 May 2005

DOI 10.1002/ajmg.b.30211

trained psychiatrists by interview. The PD patients consisted of 48 males, aged 22–80 years (mean age  $41.7 \pm 13.7$ ) and 43 females, aged 22–66 years (mean age  $37.2 \pm 12.3$ ). The participants were outpatients and inpatients of several psychiatric hospitals in Japan. Subjects for comparison were recruited from among hospital staff members who were documented to be free of psychoses, and from among company employees who showed no evidence of psychiatric problems during brief interviews by psychiatrists. They included 90 males (mean age  $47.5 \pm 10.4$ ) and 88 females (mean age  $51.1 \pm 8.9$ ). This study was approved by the Ethics Committee of each participating institute, with all participants giving written informed consent. Genomic DNA was isolated from leukocytes using a DNA extraction kit (Stratagene, La Jolla, CA).

#### PCR Conditions

PCR amplifications were performed in a 20  $\mu$ l reaction mixture containing 100 ng of genomic DNA, 15 pM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 U Ex Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan). "Touchdown" PCR was done as follows: after denaturing at 94°C for 5 min, 30 sec at 94°C, 30 sec at 67 or 68°C (1°C down per cycle), and 1 min at 72°C for the first 10 cycles; followed by 25 subsequent cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 57 or 58°C, and 1 min at 72°C. Final elongation was 7 min at 72°C. MasterAmp BN, EN, and IN buffers (Epicentre Technologies, Madison, WI) were used in several amplifications (Table I).

#### Mutation Screening of the PBR Gene Using Cycle Sequencing

The 5'-flanking region and coding regions of the PBR gene from 28 PD patients were screened by direct sequencing, using the primer sets listed in Table I. Sequencing was performed on both strands using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems).

#### Genotyping

Assay-by-Design™ SNP genotyping products were used to score SNPs (Applied Biosystems; <http://www.appliedbiosystems.com/>), based on the TaqMan assay method [Ranade et al., 2001]. Genotypes were determined using an ABI 7900

sequence detection system instrument (Applied Biosystems) and SDS v2.0 software (Applied Biosystems).

#### Statistical Analyses

Departure from the Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the Arlequin program [Schneider et al., 1997]. The allelic distributions were compared between patients and controls by chi-square statistics, unless any of the cells in a 2 × 2 table contained expected values of less than 5, in which case Fisher's exact test was used. Differences in genotypic distribution were assessed by the CLUMP program, which determines an empirical *P*-value using the Monte-Carlo method [Sham and Curtis, 1995]. All significance levels were set at 5%. Power calculations were performed based on the published method [Cohen, 1988].

## RESULTS

### Polymorphism Within the PBR Gene

Nine PCR primer sets were constructed based on the human PBR gene sequence. The PBR gene consists of four exons (Fig. 1). Exon 1 encodes a short 5' untranslated segment, and exons 2, 3, and 4 combine code 169 amino acids of the PBR protein. We screened 28 subjects for sequence variations within the 5' region, the coding region (exons 2–4), and the 3' noncoding region using the sequence method. The 5' region was divided into five fragments. This region contained adenosine single nucleotide repeats ranging from wild-type 8 to 15 bp. The A-to-G substitution of A13 ± 1024A > G allele (accession no. AB076378; Nakamura K and Furukawa A) was detected in one of these subjects (Fig. 2). Another, one of these subjects was found to contain a novel missense variant in exon 2, derived from the nucleotide transition in codon 35 (CGC → CAC: 103G > A) resulting in an alanine-to-threonine (Ala → Thr) change (accession no. AB076381; Nakamura K and Furukawa A) (Fig. 3). Since this represented a rare variant, it was not included in further study. One novel missense variant in exon 4, derived from the nucleotide transition in codon 162 (CGT → CAT: 485G > A) resulting in a arginine-to-histidine (Arg → His) change, was detected in these subjects (Fig. 3). Two variants were derived from the nucleotide transitions in 569G > A (accession no. AB076379; Nakamura K and Furukawa A) or 650G > T (accession no. AB076380; Nakamura K

TABLE I. Primers Used to Screen the Sequence Variants Within the PBR Gene

Amplified region	Primers (5'–3') (F: Forward; R: Reverse)	Annealing temperature (°C)	PCR product length (bp)
P-1	(F) TGCAGTGAGCCGAGATTGTG (R) GCAGGGTCCAAGGAGAACTGT	68–58 <sup>a</sup> ExTaq, Master Amp EN	314
P-2	(F) GTCCTAGGAAAGCCATACTGCAGC (R) TCCACTCCCATGCAGGGTGTGT	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	246
P-3	(F) CAGCCTTGAAGTGCAGCAAGAC (R) AGTTCCCTGAGCTGTTGACGCAG	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	312
P-4	(F) GAGAGCCAGTCAGAAAGTGGCT (R) CGGCCAGACCCAACATCTAAAAC	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	276
P-5	(F) CTCGGAGATCGGCTCTTGTGCT (R) ACCGGGAGCTCACTCCTCAAA	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	230
Exon 1	(F) AGGAGGAGCCGAGAGACTTGTCT (R) CTGCCAAGAGTCGCAGCCAT	68–58 <sup>a</sup> ExTaq, Master Amp IN	328
Exon 2	(F) TGACTGGTTGATCTGTGGGTGA (R) AAACCATGCCATGGTCCATGGC	68–58 <sup>a</sup> EXTaq, Master Amp BN	427
Exon 3	(F) AATGGTGTCTTGAAGTCCGGC (R) GATCAGGGAACACATGCTGTGG	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	202
Exon 4	(F) TGGTGGATCTCTGCTGGTCAGT (R) CCAAGAACATGCTCTAAGCATGCAG	67–57 <sup>a</sup> ExTaq	392

<sup>a</sup>Touch-down PCR.

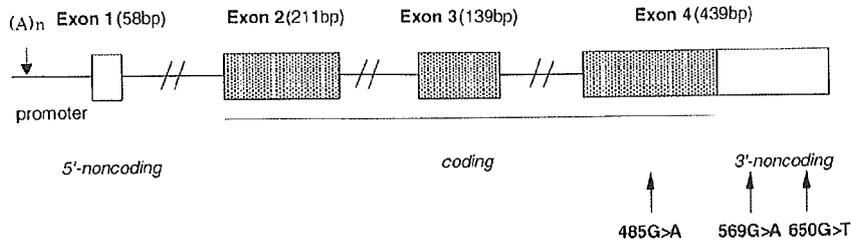


Fig. 1. The genomic structure and positions of the polymorphism of the human *PBR* gene. Boxes represent the exons. Shaded boxes represent the coding sequences within the exons. Polymorphisms indicated by have been found by sequencing in the subgroup of 28 individuals with the panic disorder.

and Furukawa A) (Fig. 3). The polymorphism 485G > A is almost linked to 650G > T in the 3' noncoding region.

**Case-Control Analysis of the *PBR* Gene**

The 485G > A polymorphism of the *PBR* gene was analyzed in 91 PD patients and 178 controls. The genotypic and allelic distributions are shown in Table II. The genotypic and allelic analyses of the 485G > A revealed significant differences between the panic patients and the control subjects ( $P = 0.021$  and  $0.014$ , respectively).

**DISCUSSION**

To our knowledge, this is the first study to report on the *PBR* gene of patients with PD. In Japanese case-control subjects, we have found evidence of an association between the *PBR* polymorphism and PD.

The etiology of anxiety disorders is complex, and etiological factors have been sought in the field of genetics as well as in the environment [Hettema et al., 2001]. In our previous study, we found a significant correlation between platelet *PBR* densities and the degrees of the anxiety trait, as determined by the STAI (State-Trait Anxiety Inventory). There is considerable empirical support for a role of the anxiety trait in PD [Cox, 1996]. This trait has also been found to be a risk factor for the development of PD [Schmidt et al., 1997] and has a strong heritable

component [Stein et al., 1999]. Panic attacks are associated with significantly increased odds of mental disorders [Goodwin et al., 2004]. Therefore, the *PBR* gene may have a role in the onset of PD. Indeed, upregulation of *PBR* was demonstrated in healthy subjects after exposure to acute stress, while down-regulation is a consistent finding during chronic stressful conditions [Gavish et al., 1992; Drugan, 1996]. A decrease in *PBR* has also been demonstrated in several psychiatric disorders, such as GAD [Weizman et al., 1987; Ferrarese et al., 1990; Rocca et al., 1991], GSP [Johnson et al., 1998], PD [Marazziti et al., 1994], and PTSD, but not in obsessive-compulsive disorder (OCD) [Gavish et al., 1996] or major depression [Weizman et al., 1995]. In our present study, the G/G genotype was significantly more frequent in the PD subjects than in the control subjects. Patients had a nearly twofold higher rate (OR = 1.7, 95% CI: 1.11–2.58) of the G allele compared to control subjects. Before the onset of PD, individuals with the G/G genotype showed high anxiety sensitivity and an increase in *PBR*. Subsequently, down-regulation of *PBR* is a consistent finding during a history. Our study might show that individuals with the G/G genotype may have one of the risk factors for the onset of PD.

The cDNA for the *PBR* mRNA has been cloned in humans. The cDNA sequence of the 18-kDa protein specifies an open reading frame of 169 amino acids rich in tryptophan residues, with high-sequence homology across the species. This gene is located on chromosome 22q13.31 band. It is composed of four

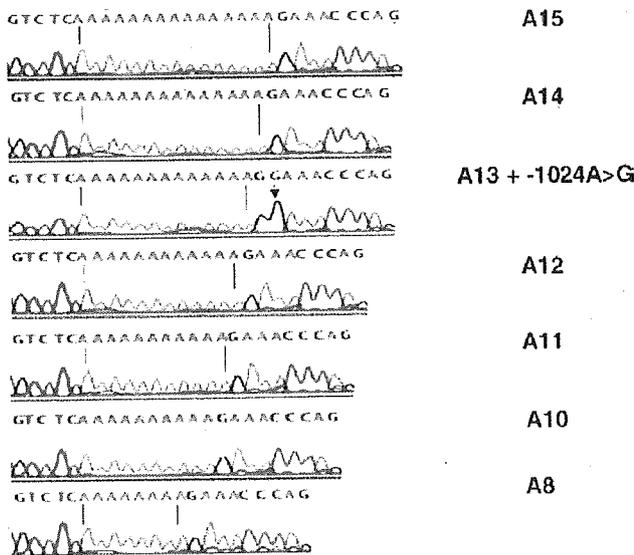


Fig. 2. The *PBR* 5' upstream region contained adenosine single nucleotide repeats ranging from wild-type 8 bp to 15 bp. The A-to-G substitution of A13 – 1024A > G allele was detected in one of these subjects.

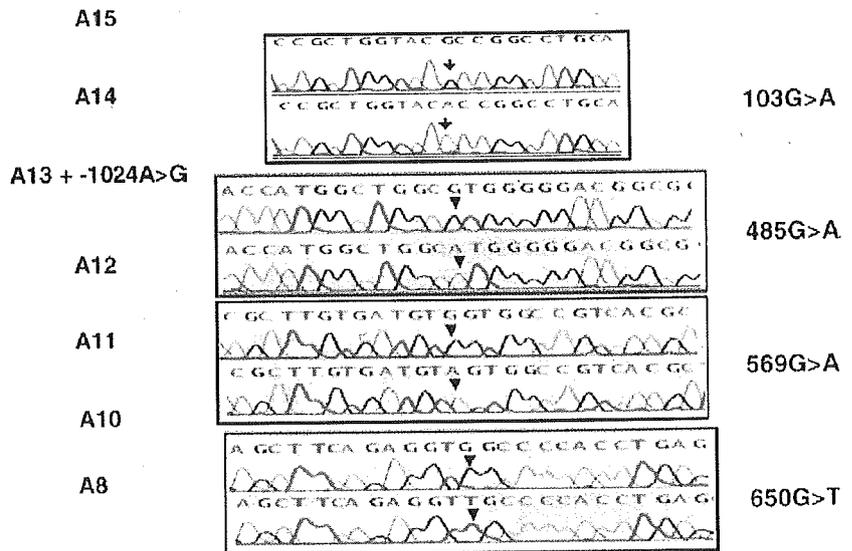


Fig. 3. Figure shows the sequence patterns of the 103G > A polymorphism in exon 2 and 485G > A, 569G > A, 650G > T polymorphisms in exon 4 of the *PBR* gene.

TABLE II. Genotypic and Allelic Distribution of the 485G &gt; A Polymorphism of the PBR Gene in Panic Disorder Patients and Comparison Subjects

	Genotype (%)					Allele (%)		
	N	G/G	G/A	A/A		G	A	
Panic disorder	91	55 (60.4)	34 (34.4)	2 (2.2)	$P^a$	144 (79.1)	38 (20.9)	$P^b$
Comparison subjects	178	87 (48.9)	72 (40.4)	19 (10.7)		246 (69.1)	110 (30.9)	

<sup>a</sup>In the genotypic distribution of the 485G > A polymorphism of the PBR gene, there was a significant difference ( $P^a = 0.021$ ) between the panic disorder patients and the comparison subjects.

<sup>b</sup>In the allelic distribution of the 485G > A polymorphism of the PBR gene, there was a significant difference ( $P^b = 0.014$ ) between the panic disorder patients and the comparison subjects.

exons, with the first exon and half of the fourth exon being untranslated [Riond et al., 1991; Chang et al., 1992]. The gene has one transcription initiation site. An alternatively spliced PBR mRNA was found in human tissue. The PBR promoter in humans does not contain a TATAA box but contains multiple Sp1 boxes [Lin et al., 1993]. The present study revealed a polymorphism of adenosine repeats in the 5' region of PBR. A 15-adenosine single nucleotide repeat region was found at -1,024 to -1,039 bp upstream from the translation initiation site of the PBR gene. In this study, variations in the lengths of these single nucleotide repeats were found to vary from the wild-type 15 to 8 bp. This polymorphism may influence basal transcriptional activity. The TFSEARCH computer program predicted the transcriptional factor [Ferrari et al., 1992; Harley et al., 1992; Pontiggia et al., 1994]. The program predicted that the A-to-G substitution of the AB+-1024A>G allele presumably reduced the binding affinity. Disruption of the formation of sharp angles in DNA may affect the architecture of the SRY-DNA complex. However, the functional and physiological properties of this variation of the adenosine repeat remain unclear. Further functional studies are necessary to define the physiological significance of this variation.

The use of benzodiazepines has become widespread because of their efficacy, safety, and tolerability. Benzodiazepines associated with central benzodiazepine receptors are used to treat insomnia and anxiety. However, benzodiazepine dependence, toxicity, and abuse have arisen as difficult problems. The development of new medicines from the point of view of PBR has attracted much interest. We found that PBR may be associated with PD. In this regard, our results about the 485G > A SNP might be of great importance. Further studies with a large sample size and a different ethnic sample are clearly needed to verify our findings.

In conclusion, the present study provides new and important evidence that variation in the PBR gene influences susceptibility to PD.

## REFERENCES

- American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorder, 4th ed. Washington DC: APA.
- Chang YJ, McCabe RT, Rennett H, Budarf ML, Sayegh R, Emanuel BS, Skolnick P, Strauss JF III. 1992. The human "peripheral-type" benzodiazepine receptor: Regional mapping of the gene and characterization of the receptor expressed from cDNA. *DNA Cell Biol* 11:471-480.
- Cohen J. 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd edition. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Association. 215p.
- Cox BJ. 1996. The nature and assessment of catastrophic thoughts in panic disorder. *Behav Res Ther* 34:363-374.
- Deckert J, Nothen MM, Franke P, Delmo C, Fritze J, Knapp M, Maier W, Beckmann H, Propping P. 1998. Systematic mutation screening and association study of the A1 and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. *Mol Psychiatry* 3:81-85.
- Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M, Braestrup C. 1983. Severe anxiety induced by FG 7142, a  $\beta$ -carboline ligand for benzodiazepine receptors (letter). *Lancet* 2:98-99.
- Drugan RC. 1996. Peripheral benzodiazepine receptors: molecular pharmacology to possible physiological significance in stress-induced hypertension. *Clin Neuropharmacol* 19:475-496.
- Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Piolti R, Trabucchi M, Frattola L. 1990. Decreased density of benzodiazepine receptors in lymphocytes of anxious patients: Reversal after chronic diazepam treatment. *Acta Psychiatr Scand* 82:169-173.
- Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 11:4497-4506.
- Gavish M, Katz Y, Bar-Ami S, Weizman R. 1992. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Neurochem* 58:1589-1601.
- Gavish M, Laor N, Bidder M, Fisher D, Fonia O, Muller U, Reiss A, Wolmer L, Karp L, Weizman R. 1996. Altered platelet peripheral-type benzodiazepine receptor in posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 14:181-186.
- Goodwin RD, Lieb R, Hoefler M, Pfister H, Bittner A, Beesdo K, Wittchen HU. 2004. Panic attack as a risk factor for severe psychopathology. *Am J Psychiatry* 161:2207-2214.
- Hamilton SP, Slager SL, Helleby L, Heiman GA, Klein DF, Hodge SE, Weissman MM, Fyer AJ, Knowles JA. 2001. No association or linkage between polymorphisms in the genes encoding cholecystokinin and the cholecystokinin B receptor and panic disorder. *Mol Psychiatry* 6: 59-65.
- Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1992. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255: 453-456.
- Hattori E, Yamada K, Toyota T, Yoshitsugu K, Toru M, Shibuya H, Yoshikawa T. 2001. Association studies of the CT repeat polymorphism in the 50 upstream region of the cholecystokinin B receptor gene with panic disorder and schizophrenia in Japanese subjects. *Am J Med Genet* 105:779-782.
- Hettema JM, Neale MC, Kendler KS. 2001. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158: 1568-1578.
- Inada Y, Yoneda H, Koh J, Sakai J, Himeji A, Kinoshita Y, Akabame K, Hiraoka Y, Sakai T. 2003. Positive association between panic disorder and polymorphism of the serotonin 2A receptor gene. *Psychiatry Res* 118:25-31.
- Johnson MR, Marazziti D, Brawman-Mintzer O, Emmanuel NP, Ware MR, Morton WA, Rossi A, Cassano GB, Lydiard RB. 1998. Abnormal peripheral benzodiazepine receptor density associated with generalized social phobia. *Biol Psychiatry* 43:306-309.
- Kennedy JL, Bradwejn J, Koszycki D, King N, Crowe R, Vincent J, Fourie O. 1999. Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Mol Psychiatry* 4:284-285.
- Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, Wittchen H-U, Kendler KS. 1994. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51:8-19.
- Lin D, Chang YJ, Strauss JF III, Miller WL. 1993. The human peripheral benzodiazepine receptor gene: Cloning and characterization of alternative splicing in normal tissues and in a patient with congenital lipid adrenal hyperplasia. *Genomics* 18:643-650.

- Marazziti D, Rotondo A, Martini C, Giannaccini G, Lucacchini A, Pancioli-Guadagnucci ML, Diamond BI, Borison R, Cassano GB. 1994. Changes in peripheral benzodiazepine receptors in patients with panic disorder and obsessive compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 29:8-11.
- Nakamura K, Fukunishi I, Nakamoto Y, Iwahashi K, Yoshii M. 2002. Peripheral-type benzodiazepine receptors on platelets correlate with the degrees of anxiety in normal human subjects. *Psychopharmacology* 162: 301-303.
- Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13:6115-6124.
- Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ, Curb D, Olshen R, Risch N, Cox DR, Botstein D. 2001. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphism. *Genome Res* 11:1262-1268.
- Riond J, Mattei MG, Kaghad M, Dumont X, Guillemot JC, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. 1991. Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *Eur J Biochem* 195: 305-311.
- Rocca P, Ferrero P, Gualerzi A, Zanalda E, Maina G, Bergamasco B, Ravizza L. 1991. Peripheral-type benzodiazepine receptors in anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand* 84:537-544.
- Schmidt NB, Lerew DR, Jackson RJ. 1997. The role of anxiety sensitivity in the pathogenesis of panic: Prospective evaluation of spontaneous panic attacks during acute stress. *J Abnorm Psychol* 106:355-364.
- Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L. 1997. Arlequin ver.1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Sham PC, Curtis D. 1995. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59:97-105.
- Skre I, Onstad S, Torgersen S, Lygren S, Kringlen E. 1993. A twin study of DSM-III-R anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand* 88:85-92.
- Stein MB, Jang KL, Livesley WJ. 1999. Heritability of anxiety sensitivity: A twin study. *Am J Psychiatry* 156:246-251.
- Wang Z, Valdes J, Noyes R, Zoega T, Crowe RR. 1998. Possible association of a cholecystokinin promoter polymorphism (CCK-36CT) with panic disorder. *Am J Med Genet* 81:228-234.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lepine JP, Newman SC, Oakley-Browne MA, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen HU, Yeh EK. 1997. The cross-national epidemiology of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 54:305-309.
- Weizman R, Tanne Z, Granek M, Karp L, Golomb M, Tyano S, Gavish M. 1987. Peripheral benzodiazepine binding sites on platelet membranes are increased during diazepam treatment of anxious patients. *Eur J Pharmacol* 138:289-292.
- Weizman A, Burgin R, Harel Y, Karp L, Gavish M. 1995. Platelet peripheral-type benzodiazepine receptor in major depression. *J Affect Disord* 33: 257-261.
- Woo JM, Yoon KS, Yu BH. 2002. Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *Am J Psychiatry* 159:1785-1787.
- Yamada K, Hattori E, Shimizu M, Sugaya A, Shibuya H, Yoshikawa T. 2001. Association studies of the cholecystokinin B receptor and A2a adenosine receptor genes in panic disorder. *J Neural Transm* 108:837-848.

# 機能的な精神疾患の系統的遺伝子解析



豊田倫子  
(とよた ともこ)

財団法人長寿科学振興財団リサーチレジデント/  
理化学研究所精神総合センター・脳神経研究グループ  
分子精神科学研究チーム非常勤研究員

- 1969年生まれ
- 略歴：1997年 愛媛大学医学部卒業、東京医科歯科大学医学部精神神経医学教室入局、99年 同大学大学院歯学総合研究科入学、2001～02年 アメリカ National Institute of Mental Health留学、04年より現職。2004（平成16）年度若手研究者表彰・奨励事業 財団会長賞受賞。医学博士。
- 専門分野：精神神経医学

## 研究にあたってのエピソード

さまざまな土地で多くの方々にお会いし、採血へのご協力をいただいた。そのみなさんから励ましの言葉をかけていただいたり、闘病生活の大変さを語っていただくことがあり、そのたびに、病因解明を急がなければという気持ちを新たにした。

## 研究の目的

私の研究テーマである「機能的な精神疾患の系統的遺伝子解析」というタイトルを読まれた読者の方々には、その内容はおそらくイメージしづらいものと思われる。まず初めに、そのタイトルから説明させていただこうと思う。また、私の研究分野である精神医学や遺伝子研究といったものに馴染みの薄い読者の方々のご理解の一助として、本文中に専門用語の解説を付けた。かえって読みづらくなるかもしれないが、ご容赦いただきたい。

### ●「機能的な精神疾患」とは

心、つまり精神に変調をきたす病気はさまざまあるが、「器質性」と「機能的な（あるいは内因性）」という分類方法がある。前者は、脳や体の病気が原因となって精神症状が起きるもので、後者は、はっきりとした原因が見当たらないのに精神症状が起こるもの、とい

う分け方である。つまり、「機能的な精神疾患」とははっきりした身体的病気がない、原因がわからない「心の病気」のことである。その代表的なものとして、「統合失調症」と「気分障害」という2つの病気が知られている。

原因はわからないが、現在では遺伝素因と環境要因がその発症に関与していると考えられている。

遺伝素因とは、いわゆる持って生まれた体質のことである。この体質を決めるものが「遺伝子」という物質であるが、これについては、のちほど説明する。

環境要因とは、遺伝素因以外すべてをさすと考えてもらいたい。その人を取り巻く外的な環境、たとえば、胎児にとっては母親の子宮であり、社会人にとっては職場環境であったり、あるいは生活環境であったり、とさまざまなことをさす。

### ●遺伝子からのアプローチ

私は、統合失調症と気分障害の原因を探るための仕事を行っている。その

手段として上述した遺伝素因から調べる方法、つまり体質を規定している遺伝子を扱い、調べているのである。

では、なぜ遺伝子を調べるのかという点について、以下にもう少し具体的に説明する。

世の中には「心の病気」で苦しんでいる方はきわめておおいである。とてありふれた病気なのである。しかし、その原因についてはほとんど何もわかっていないことは、すでに述べたとおりである。

なぜ、原因がわからないのか。精神疾患は古くから知られている病気であり、その病因については、諸種の仮説が唱えられてきたが、未だ決定的なことはわかっていない状況にある。その診断は、患者さんの主観的な訴えによるところが大きい。身体的な病気では、たとえば、血圧や血糖値など客観的な指標が存在するが、心の状態はその本人でしかわからない。一目で誰にでも評価できるような客観的な物差しがないのである。そのため、身体疾患

と比べて診断にやや曖昧な部分が残ることは否めない。これが、病気の原因を見出しづらくしている一つの理由と言えよう。

さて、遺伝子という言葉は最近ではよく耳に思う。いわゆる遺伝子病というのは、遺伝形式がはっきりしており、その責任遺伝子(発症に寄与する遺伝子)自体がすでに知られている。ある特定の遺伝子の異常が、その個人の身体的な形質に強く影響することがほとんどである。

一方、統合失調症や気分障害の発症に関与する遺伝子であるが、病気への関与がはっきり示されたものはまだ見つかっていない。その理由として、まず遺伝形式が明らかではないこと、また、遺伝子の効果は非常に弱く、かつ、一つではなく複数の遺伝子が発症に関与しているであろうということが推測される。さらに、責任遺伝子が発症に及ぼす影響の程度も、一人ひとりの患者さんによって異なるとも考えられている。これらのことから、精神疾患における責任遺伝子を見つけることがむずかしくなっているのである。

## 研究の主な内容

### ●神経障害発達仮説

では、どのような方法によって責任遺伝子を見つけることができるのか。その一つの方法として、われわれは病気に関連する特徴に注目した。

ここで、統合失調症におけるPMX2Bという遺伝子の研究を取り上げて説明したい。これは、本文タイトルにある仕事の一つとしてわれわれが行った研究であるが、本研究では、統合失調症罹患者と斜視の関係、さらに、PMX2Bという遺伝子上に発見した多型(個人差)との関係を探ったものである。

統合失調症の病気の原因にはさまざまな仮説があるが、その一つとして、「神経発達障害仮説」というものがある。人の脳は、胎児でいる間に活発に発達、発育していくが、この胎生期になにかしらの原因によって脳の発育障害が起こったために、その人が将来、統合失調症を発症しやすくなる基盤ができるという仮説である。これまで、この仮説を支持するさまざまな根拠が示されているが、その一つに、統合失調症で

は「身体微少奇形」が多く見られる、という報告がある。身体微少奇形とは、脳と同じく外胚葉に由来する身体組織に見られるわずかな奇形のことである。

### ●身体微少奇形としての斜視

一方、臨床場面において、統合失調症の患者さんに眼位の異常、いわゆる「斜視」が多く見られる印象を持っていたが、これまで実際のその頻度を観察した報告はなされていなかった。

斜視も上述の身体微少奇形の範疇に入り得るものである。そのため、われわれはまず、統合失調症と健常対照者との間で斜視の頻度に差があるかどうかを調べてみた。

斜視の分類方法にはさまざまな方法があるが、今回われわれは、眼球の偏位方向(「内斜視」、「外斜視」、「上斜視」など)と、偏位がときどき起こる「間欠性」か、常に起きている「恒常性」かという分類方法を用いた。統合失調症罹患患者346名、健常対照者542名についてその頻度を調査したところ、眼球の偏位方向としては、内、外、上斜視の3種類が調査対象に認められ、おののについて間欠性か、恒常性かという

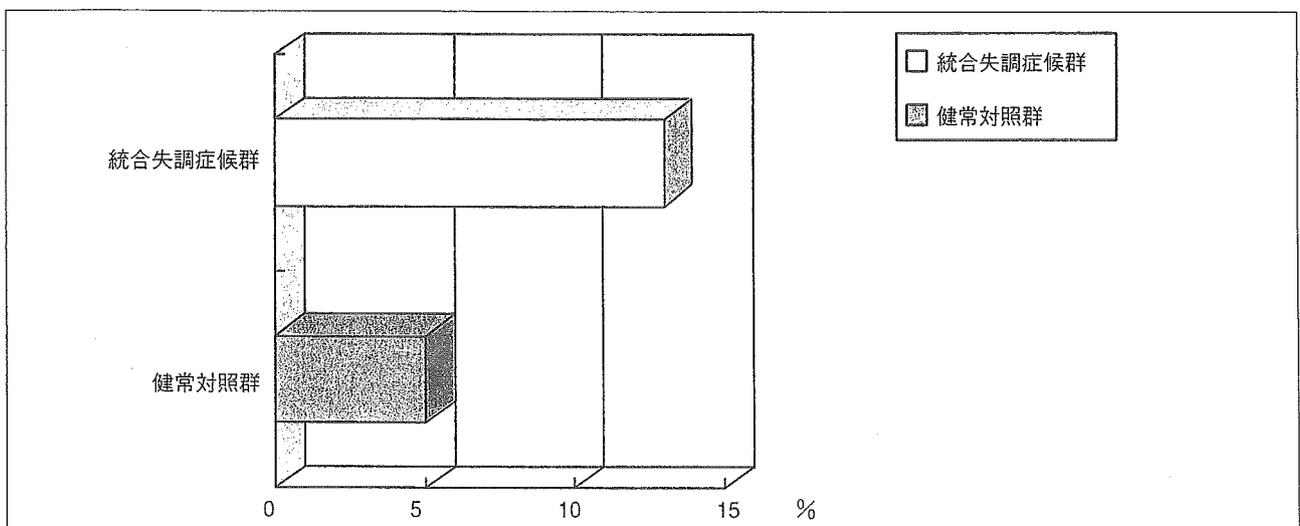


図1 統合失調症候群と健康対照群の斜視の頻度

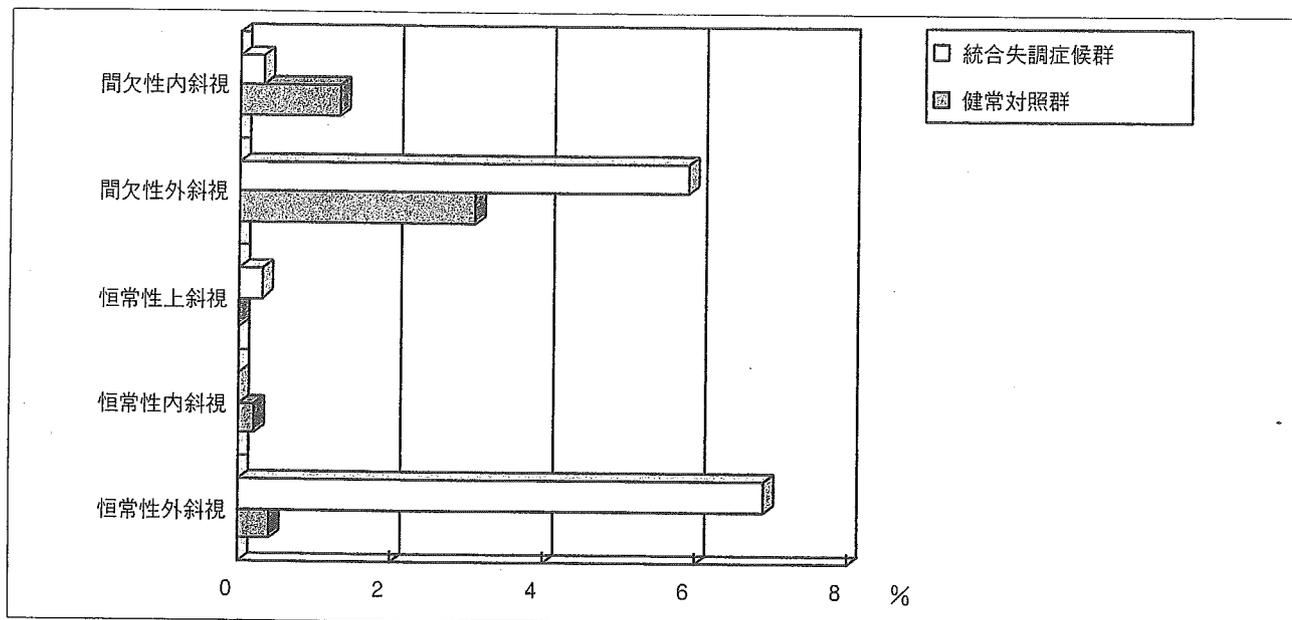


図2 統合失調症候群と健常対照群にみられた斜視の種類

組み合わせで6種類の斜視分類を行った。なお、頭部外傷などによって生じた器質性斜視、弱視による調節性斜視、偽斜視は除外し、先天性斜視を対象とした。

この結果、統合失調症候群では健常対照者と比較して斜視の頻度が高いことが明らかになったが(図1)、とくに恒常性外斜視の頻度が統合失調症候群において著しく高いことが判明した(図2)。

ところで、先天性斜視についても精神疾患と同様に、環境要因と遺伝素因の双方が発症に関与していると考えられている。近年、congenital fibrosis of the extraocular muscles type2 (CFEOM2) という症候群性の斜視の責任遺伝子がPMX2A という遺伝子であることが報告された。このPMX2A という遺伝子は、転写因子に分類される。

### ●遺伝子から得られる情報

ここで、少し遺伝子について説明する。遺伝子は、DNA(デオキシリボ核酸)という4種類の塩基が並んだ物質からなるが、その並び順(配列)そのものが生命情報をコードしている暗号である。

遺伝子にはエクソンとイントロンと呼ばれる領域が存在しているが、遺伝子のDNA配列情報を写し取って、最終的には遺伝子のエクソン部分を写したRNA(リボ核酸)という物質の配列がつくられ(転写)、そのRNAの情報をもとにアミノ酸という物質が合成され、タンパク質ができる(翻訳)のである(タンパク質はアミノ酸という物質から構成されている)。こうしてできたタンパク質は、生物が生命を維持するために必要な種々の働きをするのである。

転写因子とは、遺伝子の転写の段階での働きを調節するタンパク質であり、体を構成する細胞の分化や増殖に重要な働きをしていることがわかっている。つまり、PMX2A 遺伝子はPMX2A という転写因子をコードする遺伝子なのである。このPMX2A という転写因子は、動眼神経、滑車神経という眼を動かす神経系の発生段階において重要な働きをする一方、チロシン水酸化酵素遺伝子ドーパミンベータ水酸化酵素遺伝子などの転写を促進することが報告されている。

チロシン水酸化酵素とドーパミンベ

ータ水酸化酵素は、脳内の情報伝達に関わる物質であるドーパミンの生成に関与する酵素である。統合失調症ではこのドーパミンの働きが過剰になっている、という仮説は有名である。

### ●遺伝子配列の変異

そこでわれわれは、統合失調症を発症し、かつ斜視を持つ人のPMX2A 遺伝子について、その配列上に変異がないかどうかを調査したが、特記すべき変異は見当たらなかった。

次に、われわれはPMX2B という遺伝子について調べてみた。PMX2B 遺伝子とは、PMX2A 遺伝子と起源が同じであると考えられる相同遺伝子であり、その配列はPMX2A 遺伝子とほとんど同じである。このPMX2B は3つのエクソンを有するが、アラニンというアミノ酸をコードする配列が9個連続して並んでいる部位と、20個連続した配列部位(どちらもエクソン3上に存在)がある(図3)。さらに、タンパク質レベルでも同じく転写因子であり、その働きも、PMX2A とよく似ているという特徴を持っている。

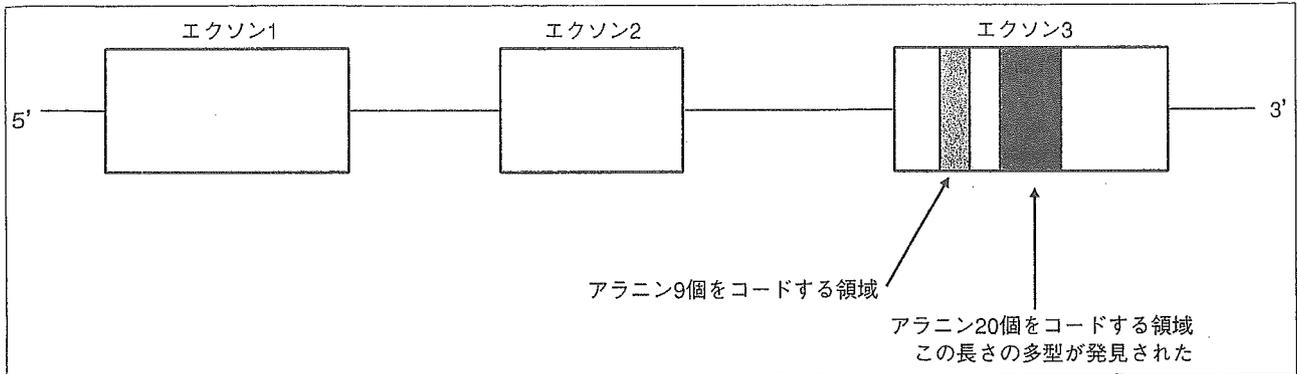


図3 PM2B遺伝子の構造

われわれはPMX2B 遺伝子の配列上に変異があるかどうかを調べたところ、アラニンが20個連続している部分でアラニンの個数が減っていたり(欠失)、増えていたり(伸長)する多型を発見した。この多型と統合失調症との関連を統計解析によって調べたところ、統合失調症全体とアラニンが20個連続している部分の多型とに関連がみられた。また、斜視を伴う統合失調症と上記多型との関連についても統計解析を行った結果、恒常性外斜視において多型との関連が強く見られることがわかった。一方、健常対照群では多型と斜視との関連は見られなかった。

### ●アラニン長関与の可能性

これらの結果、次のことが推測される。

まず、健常対照群内では、斜視の有無と多型との間には関連がなかったことから、PMX2B 遺伝子の変異だけでは斜視は生じないと言える。しかし、統合失調症群とこの遺伝子変異との間には関連があり、かつ斜視を伴う統合失調症群でより強い関連があったことから、PMX2B 遺伝子変異と、統合失調症の発症に関与する未知の要因(患者さんが持っていると推測される要因)とが重なり、相互に作用することによって恒常性外斜視が起りやすくなるのではないかと推測された。

次に、PMX2B の転写因子としての

働きがアラニン長の多型によって変化するかどうか、つまり多型の機能を検討した。この目的で、PMX2B のアラニンの長さを人為的に変えた構造物を複数作成し、それらをルシフェラーゼアッセイという方法を用いて検討した。

その結果、アラニンの長さが長い場合と短い場合とでは、どちらも転写活性(転写因子としての働き)が低下したが、長い場合ではとくに低下が顕著であった。また、転写因子にはアラニンの繰り返しが見られ、その多型としてはアラニン挿入が報告されてきたが、PMX2B 遺伝子では挿入ではなく欠失という多型、それも一般人口で頻度が多く見られたということも特徴的であった。

### 今後の課題と展望

精神疾患の病気の原因を解明することは非常にむずかしい、と繰り返し述べた。その困難を打破するために、疾患と関連する生物学的な特徴に着目し解析する方法を今後も進めていくことが重要と考える。

また、遺伝子解析においては、サンプル数の大きさがきわめて重要である。解析対象となるサンプル数が多いほど、より信頼のおける結果を導きやすくなるのである。

話は変わるが、2001年にアメリカ東

海岸にある National Institute of Mental Health (NIMH) に約1年間留学する機会を長寿科学振興財団より与えていただいた。そこで躁うつ病の責任遺伝子を探すために、アメリカで収集されたサンプルを解析していた。

アメリカでは、遺伝子研究のためのサンプル収集に力が注がれており、それに携わる人の数も多く、組織だっている。日本とはかなり状況が異なることを今さらながら痛感する。

研究を実りある、皆さんに還元できるものにするためには、なるべく多くの患者さん、そのご家族、また、健常対照としての一般の方々にわれわれの研究を理解していただき、研究への参加を呼びかけ、お願いする必要がある。私の今後の仕事はこの部分が大きくなると思われるが、われわれの研究に協力してもらったみなさんに有益な情報を提供できる日が少しでも早くくるように、今後も努力していきたいと考えている。

最後に、リサーチレジデントとして採用いただいた長寿科学振興財団および受け入れ先機関である理化学研究所脳科学総合研究センター分子精神科学研究チームの吉川武男チームリーダー、ならびにチームのメンバー一同、そして、最後までこの粗文を読んでいただいた読者のみなさんに感謝申し上げます。

# マイクロアレイを用いた疾患感受性遺伝子の同定

山田和男<sup>1)</sup>/岩山佳美<sup>1)</sup>/吉川武男<sup>1)</sup>

〔SUMMARY〕 疾患感受性遺伝子の同定においては、連鎖解析から高密度マーカーを用いた関連解析、または機能的候補遺伝子解析へと進むストラテジーがとられてきた。しかし複雑遺伝疾患の解析では、この方法には限界があり、全染色体領域について網羅的に関連解析(whole-genome association study; WGA)を行う必要性が論じられてきた。そして、それが近年のジェノタイピング技術の進歩とともに可能なものとなりつつある。本稿では、いくつかの大規模ジェノタイピング法、中でもマイクロアレイの出現によって疾患感受性遺伝子同定の手法がどう変わっていくか、その可能性と問題点について紹介する。〔臨床検査 49:509-515, 2005〕

〔KEYWORDS〕 複雑遺伝疾患, 疾患感受性遺伝子, SNP, 全染色体領域アソシエーション・マッピング

## はじめに

糖尿病・高血圧・精神疾患などの発症には多くの罹患脆弱性遺伝子(疾患感受性遺伝子)とそれに環境要因などが加わった複雑な機構が存在すると考えられている。それゆえ、これらの疾患は多遺伝子性疾患(polygenic disease), 多因子疾患(multifactorial disease), 複雑遺伝疾患(complex disease)などとも呼ばれる。また、有病率が高いことから「ありふれた疾患(common disease)」とも呼ばれている。単一遺伝子疾患(メンデル型遺伝疾患)については、罹患率の低さなどから家系収集の困難さはあるものの、浸透率が高

く、また遺伝様式や遺伝子頻度の推定がしやすいことなどから、遺伝子同定に至る方法論はほぼ確立されている。一方、複雑遺伝疾患の遺伝学的解析では、罹患率は高いものの「疾患の異種性(heterogeneity)」, 「低浸透率(low penetrance)」などに起因する様々な困難が付きまとう。しかし、この数年の周辺技術の進歩はWGAという新たなストラテジーを可能とし、今後の展開が期待されている<sup>1,2)</sup>。

## 疾患感受性遺伝子の同定

発病に関与する遺伝子を同定する手法としては、①機能的な面から遺伝子を探索するアプローチ(functional approach)と②遺伝子の染色体上での存在座位を探索するポジショナルなアプローチ(positional approach)などがある。機能的なアプローチについての詳細は他稿に譲るが、例えば、アフィメトリック(Affymetrix)社のHuman Genome U 133 Plus 2.0 Arrayでは47,000以上の転写産物を1枚のマイクロアレイで解析することが可能であり、包括的な全ゲノム発現プロファイリングを効率よく行うことができる。しかし、発現された転写産物は生体内で起きているネットワークとしての複雑な反応の結果であり、必ずしも原因遺伝子(疾患感受性遺伝子)の変化を直接示すものではない。また、複雑遺伝疾患では癌関連遺伝子の研究でしばしば見られるようなドラスティックな変化が個々の遺伝子発現で見られることも稀である。

1) YAMADA Kazuo, IWAYAMA Yoshimi, YOSHIKAWA Takeo  
理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム

一方、ポジショナルなアプローチでは、疾患の病態に対してなんら仮定を置かず、ただ染色体のどの座位にあるかという観点から遺伝子の特定を目ざす。遺伝子マーカーとしては主に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) が用いられる。ポジショナルなアプローチは連鎖解析 (linkage study) と関連解析 (association study) の2つに大別される。

## 全染色体領域アソシエーション・マッピングの可能性

家系集積性が低い、高齢発症である、個々の遺伝子効果が弱い、などの理由で連鎖解析での成功が望めない複雑遺伝疾患に対しては関連解析が重要な役割を果たすであろうことは予想されてき

た。しかし、1999年に Kruglyak は「WGA を成功させるためには各サンプルに対して 500,000 SNPs の解析が必要である」という膨大なジェノタイピングを要求する試算を出した<sup>3)</sup>。この膨大なジェノタイピングは従来の実験法では現実には実行困難なものであり、WGA に基づく戦略は研究室レベルでは到底不可能なものであった (2001年に Reich らが North-European population の連鎖不平衡のデータを元に出した比較的楽観的な試算でも 55,000 SNPs の解析というものであった<sup>4)</sup>。したがって、500,000~1,000,000 個以上の研究に適した SNPs の同定と、それを解析する大規模で効率の良い技術の開発が待たれてきた。

本稿執筆時点で、NCBI BUILD 124 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi)) に登録されているレファレンス SNP は 10,054,521

### 連鎖解析 (Linkage study)

染色体は組換えを伴う減数分裂を経て両親から子供に伝達されるが、近傍に存在する対立遺伝子間では組換えを起こしにくく (組換え率  $\theta \approx 0$ )、離れるにつれて組換えを起こしやすくなる ( $0 < \theta < 0.5$ )。したがって、両親の染色体上の疾患感受性遺伝子の近傍にある遺伝子多型 (マーカー) は組換えの影響を受けずに子孫に伝達される確率が高い。この現象を連鎖 (linkage) と呼び、罹患同胞では同じ多型が共有されやすく、健常同胞では共有されにくい。連鎖解析では組換えが独立に起きているかどうかを統計的に検定する。連鎖研究は家系内の組換えを前提とすることからある程度の範囲 (10~30 cM) までしか座位の特定は行えず、より狭い領域まで疾患感受性座位を絞り込んでいくことには適さない。原因遺伝子に到達するには連鎖解析後に詳細な連鎖不平衡に基づくマッピング (関連解析) が求められる。

### 関連解析 (Association study)

健常対照群に比して疾患群で特定の対立遺伝子が多く共有されている現象を関連 (association) と呼び、対立遺伝子自体が病因に寄与しているかもしくは近傍の病因遺伝子と連鎖不平衡にある可能性を示唆する。関連研究の主な手法としては、①対立遺伝子の分布頻度を罹患者と一般健常者とで比較するものと、②対立遺伝子の両親から子孫への伝達の偏りを検討するものがある。前者は

case-control study と呼ばれ、後者としては伝達連鎖不平衡テスト (transmission disequilibrium test ; TDT) などがよく用いられる。関連研究では疾患感受性遺伝子のごく近傍 (人種、染色体座位によって異なるが、50~100 kb 程度) でしかシグナルが検出されない。そのため、検索には非常に多くのマーカーを必要とするが、もし検出されればそのまま遺伝子特定につながる可能性が高い。

### 連鎖不平衡

### (linkage disequilibrium ; LD)

対立遺伝子群が互いに近傍に存在するために組換えを起こさずに世代を超えて受け継がれていき、統計的に強い関連を示す場合、それらは「連鎖不平衡にある」という (いずれ悠久の歴史を人類が経れば、非常に近い座位に存在する対立遺伝子群間でもやがて組換えが起こり、関連を失った「平衡状態に達する」であろうが、現在はまだ過渡的な「不平衡状態にある」と考える)。LD が保たれている領域をハプロタイプ・ブロックなどと呼ぶ。遺伝統計では、 $D'$ 、 $r^2$  などの指標がよく用いられる。平均 50~100 kb 程度の距離と考えられ、仮に同一ブロック内に疾患感受性変異が存在すれば、その範囲内の対立遺伝子はいずれもマーカーとなりうる。各民族など遺伝的に均一な集団では血縁関係のない罹患者間でも同じ対立遺伝子が検出されると仮定する。

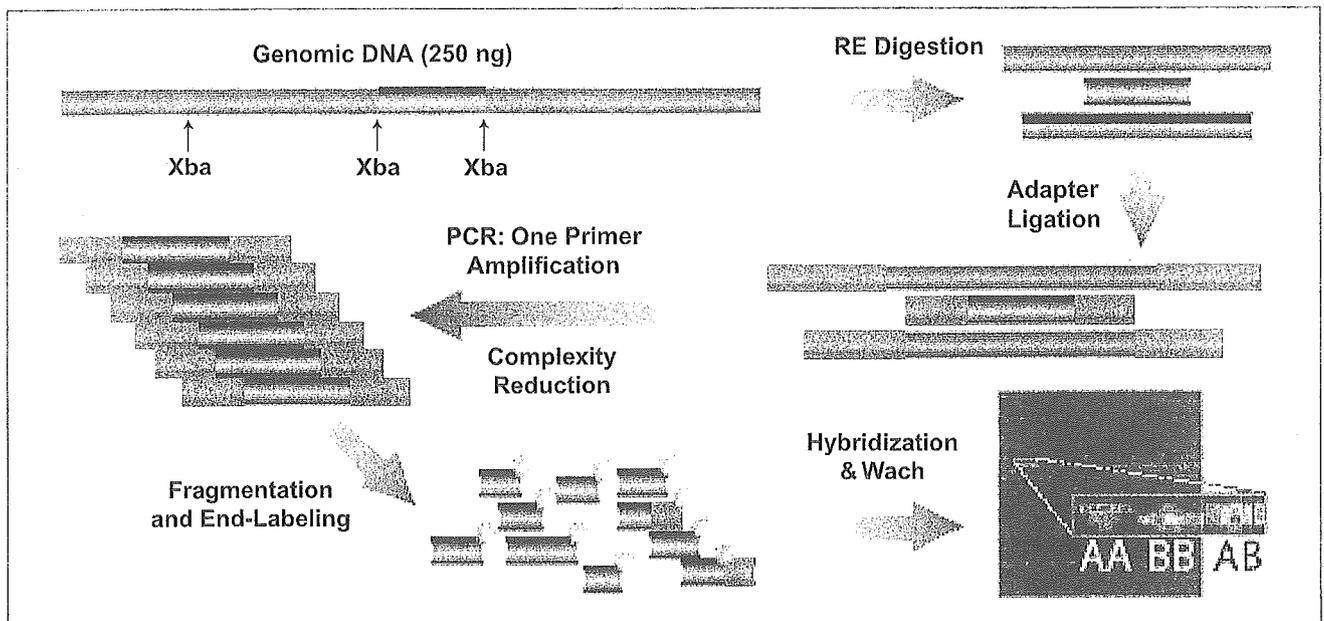


図1 GeneChip Mapping 100 K Array(アフィメトリックス社)の原理

個まで増え、そのなかで多型性が確認されたものが5,054,675個に及ぶ。そして、最新のアレイ技術はWGAを日常的に使用できる技術の1つに変えつつある。いよいよ機は熟し、WGAの時代となった。

## ■ SNP ジェノタイピング・サービスの最新技術

個々のSNPの大規模SNP解析システムとしては、MassArrayシステム(<http://www.hitachi-hitec.com/science/bio/snp.html>), TaqMan Assay (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index.jsp>)などがある。MassArrayシステムでは、MALDI-TOF質量分析計(Mass Spectrometer)を用いて1サンプルを2~3秒で解析可能であり、1日に1万ジェノタイピング以上のハイスループットが期待できる。また、TaqMan Assayでは、PCR増幅だけの1ステップで、標的SNPの対立遺伝子に蛍光プローブを標識し、その蛍光シグナルを検出する。PCR反応後、数分間で384サンプルプレートのシグナルが検出できる。TaqMan Assayでは疾患関連遺伝子探索用にデザインされた200万SNPsが利用可能であり、カスタムSNPsについても個々にオーダーすることができる。このほかにも様々なSNP検出法が考案されており、商

業的に利用可能である(Third Wave; <http://www.twt.com/>, Parallele; <http://www.parallelebio.com/>, Perlegen; <http://www.perlegen.com/>など)。しかし、これらは興味のある遺伝子領域のSNPを検出するという枠を出るものではない。ハイスループットとはいっても、これらの方法を用いてWGAを行うことは時間的・コスト的にも研究室レベルでは現実的ではない。しかし、アフィメトリックス社のGeneChip Mapping 10 K/100 K Array, イルミナ社のBeadArrayテクノロジーなどのチップテクノロジーはその研究環境を一変させるものである。ある程度の規模の予算があれば、一研究室でWGAを行うということが選択可能な戦略となりつつある。

### 1. GeneChip Mapping 100 K Array(アフィメトリックス社; <http://www.affymetrix.co.jp/>)

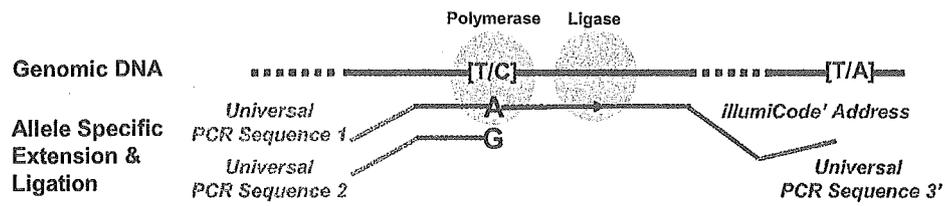
2004年7月、100,000 SNPsを網羅するGeneChip Mapping 100 K Arrayが発売され、初めてのWGAプラットフォームとなった。各SNPのジェノタイプを決定する原理は次のステップによる(図1)。

(1) 全ゲノムDNA(250 ng)を制限酵素(XbaIまたはHindIII)で切断する。

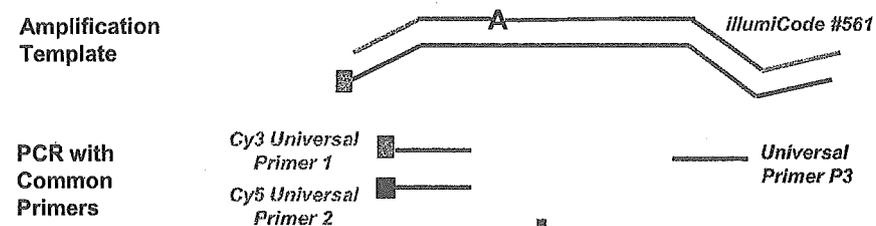
(2) 4塩基(bp)の特異的突出末端に対応するアダプターを結合(Adapter Ligation)する。短く切断されたすべてのDNA断片は両端に共通の配列をもつことになる。

# GoldenGate™ Assay

## Allele Specific Extension and Ligation



## Amplification



## Hybridization to Universal illumineCode™ Array

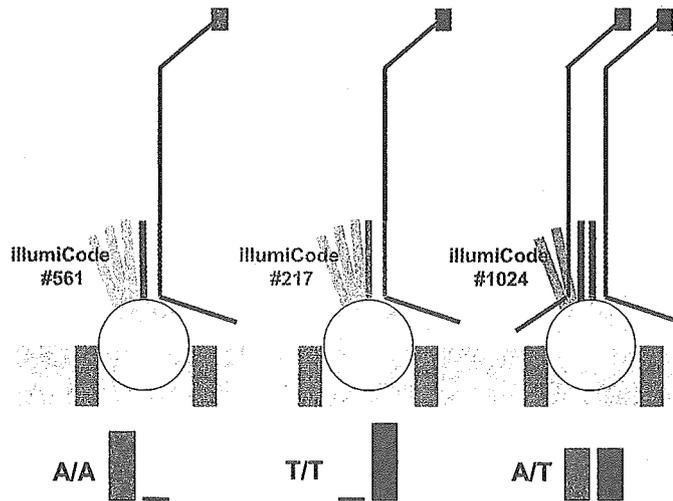


図2 BeadArray テクノロジー(イルミナ社)の原理

(3) アダプター配列を認識するプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅する。PCR 条件は、250~2,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するように最適化されている (Complexity Reduction)。

(4) 増幅した DNA をアレイにハイブリダイズ

させるのに適した短いフラグメントに切断し (Fragmentation), 蛍光標識する (End-Labeling)。

(5) GeneChip Mapping 100 K Set アレイにハイブリダイズさせる (Hybridization & Wash)。

(6) 高解像度スキャナーでシグナルを読み取

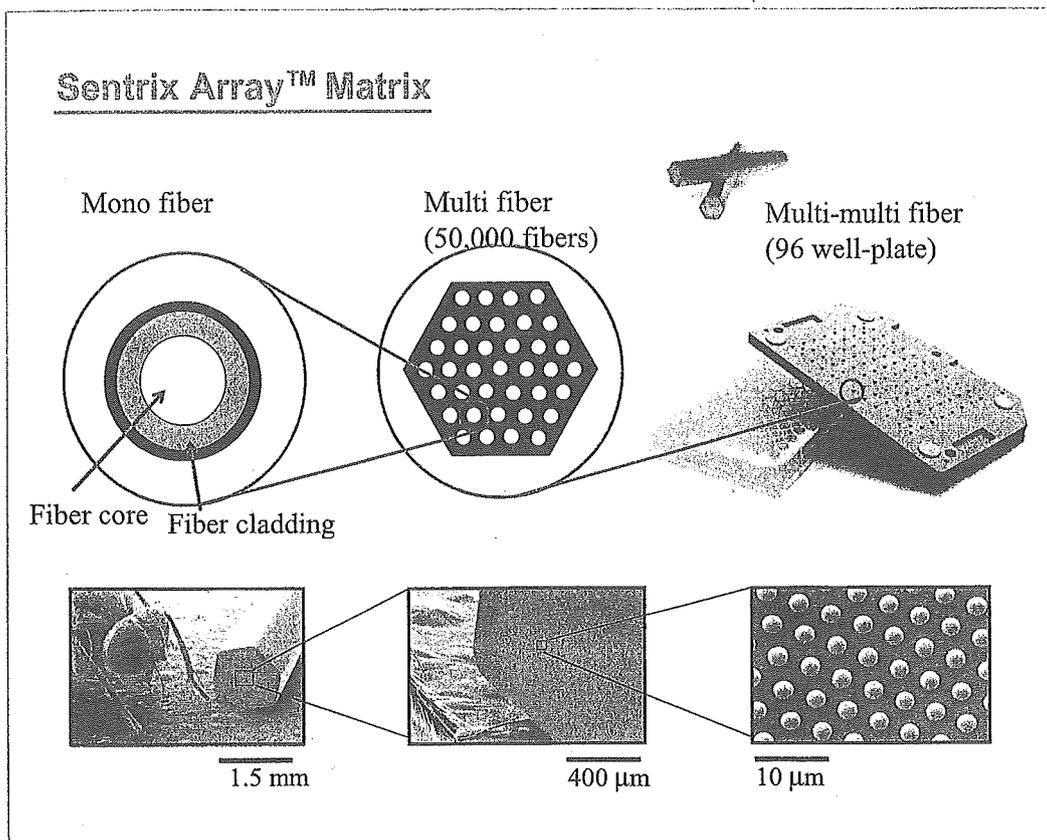


図2 つづき

り，ソフトウェアにより自動的にジェノタイプを決定する。

アフィメトリックス社の100 K SNPChipは現在の疾患遺伝子検索の状況を一変させる可能性がある。従来のジェノタイピングと比べると，①労力の著しい軽減，②疾患感受性遺伝子に直接辿り着く可能性(SNPs間の平均距離が23.6 kb)，③250 ng/sampleという少量のDNAでの実験，④正確性が高く，ジェノタイピングエラーに左右されにくい解析，などが利点として挙げられる。また，連鎖解析や癌抑制遺伝子の不活化の研究で用いられるヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity; LOH)などの解析には，10,204個のSNPが配置されたGeneChip Mapping 10 K Arrayも利用可能である。アフィメトリックス社のニュースリリースでは2005年度中には500 K Arrayの発売も予定しているという。Kruglyakが示唆した500,000 SNPsによるWGAが，いよいよ現実のものとなりつつある。

2. BeadArrayテクノロジー(イルミナ社：  
<http://www.illumina.co.jp/>)

現在発売されている Sentrix Array Matrix で

は，50,000本の光ファイバーからなる1本の光ファイバー束上に個々のSNPを同定するための $3\ \mu\text{m}$ のビーズが $6\ \mu\text{m}$ 間隔で配置されている(図2)。それぞれのビーズはilluminaCodeと呼ばれる1,620種類のシーケンスオリゴタグのいずれかで修飾されている。ジェノタイピングの原理は，GoldenGate Assayと呼ばれ，次のようなステップからなる(図2)。

(1) ゲノムDNA上で対立遺伝子特異的に伸張反応を行い，両端に共通配列をもち，個々の対立遺伝子にilluminaCode配列を付けたフラグメントを合成する(AAllele Specific Extension and Ligation)。

(2) 両端の共通配列を用いて，蛍光標識したプライマーでPCR反応を行う(Amplification)。

(3) アレイ上の相補的なilluminaCodeをもつビーズと結合反応を行う(Hybridization to Universal IlluminaCode Array)。

(4) 高密度スキャナーで蛍光シグナルを読み取り，ジェノタイピングを行う。

50,000本の光ファイバーはいずれかのilluminaCodeでランダムに修飾されており，各対立

遺伝子に対して平均  $50,000 \div 1,620 \approx 30.9$  個のビーズが用意されることになる。この冗長性が正確なジェノタイピングを可能にしている。カスタムアレイでは1ウェル当たりユーザーが指定した1,536個のSNPが配置され、1アレイで96サンプルが一度に解析できる。連鎖解析用には5,861個のSNPsがプロットされたアレイセット(Lin-kage IV Panel)が用意されている。遺伝子のエクソン領域を中心に100,000 SNPを1枚のアレイに搭載したBeadArrayの発売が今春に予定されており、来年には1,000,000 SNPs Arrayも発売されるという。現時点ではカスタムメイドのハイスループット・SNPジェノタイピングとしては、最も稼動コストが安価なプラットフォームである。国際HapMapプロジェクト(<http://www.hapmap.org/>)では、およそ60%のジェノタイピングで使用されている。

## ■ 全染色体領域アソシエーション・マッピングの問題点

チップテクノロジーによって膨大なジェノタイピングデータを手にすることが可能だとして、どのようなことが問題となるであろうか。最も大きな課題は、いかにしてそこから本当に疾患に関連するSNPを同定するかである。遺伝統計学的には次のような問題がよく議論される。

### 1. 多重検定の問題

通常、統計検定は有意水準5%あるいは1%を基準として行うことが多い。しかし、100,000個のSNPsについて独立な検定を行えば5,000個あるいは1,000個のSNPが偽陽性として検出されることが予想され、「多重検定の問題」といわれる。多重検定による偽陽性を補正するために、「Bonferroniの補正」、「False Discovery Rate (FDR)法」、「Holms-Sidak法」、「Permutation法」など、様々な方法が考案されている。しかし、WGAではいずれもかなり厳しい基準となる。期待できるP値はサンプル数と遺伝子の疾患に与える影響の強さによって決まる。「本当に関与しているのでP値が高くなる」というものではない。多重検定に対しての補正を行えば、影響の弱い遺伝子は多くの偽陽性の中に埋もれてし

まい、検出できなくなる。逆にある程度以上の効果をもつ遺伝子変異があれば、一網打尽に検出できる可能性もある。実際には、アソシエーション・マッピングは探索的な研究というべきものであり、得られた結果に様々なエビデンスを積み上げて蓋然性を獲得していく必要がある。

### 2. 集団の階層化

集団の階層化(研究対象の集団がいくつかの遺伝的に異なる集団の混合であることを指す)による偽陽性がよくcase-control studyでは問題になる。Devlin & RoederのGenomic Control法、PritchardらによるSTRUCTURE解析法、といった階層化によるバイアスを減らす方法が検討されている。しかし、どれだけのマーカーでどの程度の階層化が検出できるのかなど、現実的な適応には問題点も多い。一方、TDTなどのfamily-based methodsでは基本的には階層化の問題を回避することが出来るが、十分な検出力をもつtriad(両親と罹患者の3人からなる家系解析単位)のサンプル収集は容易ではない。

### 3. 集団遺伝学的・系統発生的検討

民族・集団が異なると、SNP頻度・連鎖不平衡マップが異なる。また、複雑遺伝疾患では関与する対立遺伝子の異種性(allelic heterogeneity)や座位の異種性(locus heterogeneity)などが相互に影響を与える可能性もある。最終的には数多くの集団を詳細に調べて、集団遺伝学的・系統発生的検討を行っていく必要がある。

## ■ 今後の展望

本稿作成中に、Affymetrix GeneChip Mapping 100 K Arrayを使用した初めての疾患感受性遺伝子同定の論文が出された<sup>9)</sup>。96人の患者と50人の健常対照者の解析で、全染色体領域から原因遺伝子がピンポイントで検出されている。この疾患では影響(オッズ比)が比較的強い遺伝子が存在したことが成功の最も大きな要因ではあるが、今後これに続く成果が多く疾患で得られることを期待している。また、いうまでもないことながら、疾患研究は患者・家族・臨床医、そして社会全体の理解と協力のもとに進められていくものであり、近い将来に研究が還元されていくこと

を願うものである。

謝辞 本稿作成に当たり、以下の方々には多大なご協力をいただきました。ここに氏名を掲げて謝意を表します(敬称略)。

板倉智敏(理化学研究所脳科学総合研究センター・リサーチリソースセンター)、福本恵介(同)、細田英明(アフイメトリクスジャパン株式会社)、Michael Paumen(同)、藤田裕治(同)、浅岡広彰(イルミナ株式会社)。

### 文 献

1) Hirschhorn JN, Daly MJ : Genome-wide association studies for common diseases and complex

traits. Nat Rev Genet 6 : 95-108, 2005  
 2) Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, et al : Genome-wide association studies ; theoretical and practical concerns. Nat Rev Genet 6 : 109-118, 2005  
 3) Kruglyak L : Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. Nat Genet 22 : 139-144, 1999  
 4) Reich DE, Cargill M, Bolk S, et al : Linkage disequilibrium in the human genome. Nature 411 : 199-204, 2001  
 5) Klein RJ, Zeiss C, Emily Y, et al : Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration 10.1126/science. 1109557 (Science Express Research Articles)



## 平成 17 年度公益信託臨床検査医学研究振興基金 研究奨励金授与候補者の応募要項

### 目 的

本基金は臨床検査医学(臨床病理学, 臨床検査診断学, 検査診断学, 病態検査学等)および臨床検査分野において活躍し, 学術的貢献の期待が大きいと認められる若手研究者に研究奨励金を贈り, 将来に向けて若手研究者を育成することを目的といたしております。

### 対 象

臨床検査医学(臨床病理学, 臨床検査診断学, 検査診断学, 病態検査学等)および臨床検査分野に関する研究のうち, 本基金の目的に合致するもの。

### 応募資格

研究奨励金授与候補者は, 以下のいずれかに該当しない研究者とします。

- (1) 応募締切日において年齢 50 歳以上の方
- (2) 教授, 病院・研究所等の部長職以上にある方
- (3) 過年度において当基金(振興会合)の研究奨励金を受けられた方

助成金額 1 件 100 万円以内

### 推薦方法

推薦者は別紙所定の用紙に候補者名と, 詳細な履歴, 研究分野, 研究題目, 研究内容と推薦理由等必要事項をご記入のうえ, 本基金事務局宛ご送付願います。

締 切 日 平成 17(2005)年 6 月 30 日必着

### 選考方法

本基金の運営委員会が委嘱した選考委員会において選考のうえ, 運営委員会で決定します。

### 研究奨励金の贈呈

平成 18(2007)年 2 月の予定

### 推薦書送付先

〒103-8670 東京都中央区八重洲 1-2-1  
 みずほ信託銀行株式会社  
 プライベートバンキング企画部福祉信託係  
 公益信託 臨床検査医学研究振興基金  
 ☎ 03-3274-9210 FAX 03-3274-9504

- (注) 1. 研究奨励金は贈呈後の 1 年間に使用することを原則とします。  
 2. 当研究奨励金の受領者に対しては, 研究成果報告書(経過と結果)および奨励金の使用状況についての収支報告書(証拠書類を付けて)を求めるほか, 特に条件はつきません。しかし, 研究終了時にはしるべき専門誌に研究成果を発表していただくことといたします。

なお, 発表する際は“公益信託臨床検査医学研究振興基金より研究奨励金を授与された研究である”旨を表記していただきます。

3. 応募に際しては, 代表研究者が, 当該研究が行われる主たる大学・研究所等の施設長又は機関長から, この研究奨励金を申し込むことについての承諾を必ず得てください。

公益信託臨床検査医学研究振興基金  
 Charitable Trust Laboratory Medicine Research Foundation of Japan

信託管理人 河合 忠  
 運営委員長 中原 一彦

## 精神疾患感受性候補遺伝子 IMPA2 の機能解析

大西哲生\* 大羽尚子\*  
 佐藤友美\*\* Sung-Kee Chung\*\*\*  
 平林義男\*\*\*\* 山田和男\*  
 茂野佳美\* 古市貞一\*\*  
 吉川武男\*

抄録：IMPA2 (inositol monophosphatase 2) は、統合失調症、躁うつ病、小児熱性けいれんの発症脆弱性関連領域 18p11.2 に存在するが、その遺伝子産物の機能は全く不明である。IMPA2 には、構造的に極めて近縁なタンパク質をコードする IMPA1 が存在する。そこで、本研究では IMPA1 と IMPA2 遺伝子産物の機能を比較検討した。IMPA2 とその近縁分子 IMPA1 はマウス脳において特徴的な発現パターンを示した。IMPA2 は IMPA1 と比較すると極めて低効率ではあるが、inositol monophosphate をマグネシウム依存的に脱リン酸化する活性を示した。IMPA1 は以前より気分安定薬リチウムの標的酵素の候補と考えられてきたが、IMPA2 は通常条件でのリチウムによる阻害は限定的であった。以上の結果より、IMPA2 は IMPA1 とは異なる特異的な機能を果たしていると考えられた。

精神薬療研究年報 第37集：42～48, 2005

**Key words :** bipolar disorder, inositol monophosphatase, IMPA1, IMPA2, lithium

## はじめに

躁うつ病、統合失調症においては、その発症には環境因子に加え、遺伝的背景の影響が強いことが知られてきた。我々は精力的に患者 DNA サンプルの収集を進め、遺伝解析によって染色体上の責任領域の同定を行ってきた。染色体 18p11.2 は、躁うつ病、統合失調症において我々が注目してきた領域であるが、実際の責任遺伝子の同定には至っていない。この領域には、我々が有力な候補遺伝子として新規に同定した IMPA2 (myo-inositol

monophosphatase 2) が存在している<sup>1)</sup>。IMPA2 とは別に、myo-inositol (1 or 4) monophosphate を脱リン酸化し、気分安定薬リチウムの治療濃度によって阻害されることから、リチウムの標的、あるいは病態そのものに関連すると考えられてきた分子として IMPA1 がある。しかしながら、遺伝解析では IMPA1 の躁うつ病への関連は否定<sup>10)</sup>されている。IMPA2 については、躁うつ病に加え統合失調症においても遺伝統計学的な関連がある<sup>12)</sup>ことを我々は示した。他グループからも、アラブ人躁うつ病患者で関連を示す結果<sup>9)</sup>が発表されてい

\* 理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1,  
 \*\* 理化学研究所脳科学総合研究センター 分子神経形成研究チーム；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1,  
 \*\*\* Pohang 科学技術大学 (韓国)；〒790-784 韓国ポハン市, \*\*\*\* 理化学研究所脳科学総合研究センター  
 平林研究ユニット；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

\* Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. \*\*Laboratory for Molecular Neurogenesis, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. \*\*\*Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, South Korea. \*\*\*\*Hirabayashi Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan.

る。我々は死後脳を用いた解析では、IMPA2 mRNA が躁うつ病において有意に増加していることも見いだしている（未発表データ）。IMPA2 の躁うつ病との遺伝統計学的関連については否定的なデータもある。一方で、IMPA2 は小児の熱性けいれんの遺伝学的疾患脆弱性規定因子の一つである可能性<sup>9)</sup>が最近示された。このように躁うつ病をはじめとするいくつかの疾患への関与が疑われるにもかかわらず、この遺伝子産物の酵素タンパク質としての基本的な characterization は従来全くなされておらず、酵素活性の有無さえ不明であった。

そこで本研究においては、主に IMPA2 の生化学的な性質について IMPA1 と比較検討することとした。

## 方 法

### *In situ* hybridization

マウス（生後7日）脳における IMPA1,2 の転写産物の局在の検討は、Sadakata らの方法<sup>9)</sup>に基づいて行った。pBluescript KS にマウス IMPA1 もしくは IMPA2 cDNA のほぼ全長を組み込み、T7 もしくは T3 ポリメラーゼにより antisense または sense プローブを合成した。

### プラスミドと培養細胞

ヒト IMPA1 および IMPA2 cDNA を HA タグタンパク質発現ベクター SR-HA<sup>10)</sup>ベクターのクロニング部位に挿入した (SR-HA-IMPA1, SR-HA-IMPA2)。これらのプラスミドをもとに、IMPA1, IMPA2 の 1 アミノ酸置換 (Asp → Asn) 変異体を発現するプラスミド (SR-HA IMPA1 DN, SR-HA-IMPA2 DN) を常法により作成した。同様に V5 タグ付加 IMPA 発現プラスミド V5-IMPA1, IMPA2 も作成した。

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293T 細胞は、DMEM/10% fetal calf serum 中で常法により培養した。遺伝子導入の前日に細胞を再播種し、翌日リン酸カルシウム法により遺伝子導入を行った。免疫沈降実験においては 6 cm dish 一枚、組み替えタンパク質を精製するためには各プラスミドを 10 cm dish 15 枚のスケールで行った。遺伝子導入 48 時間後に細胞を回収し、その後免疫沈降実験も

しくは組み替えタンパク質の精製実験に用いた。

### 免疫沈降による IMPA 複合体解析

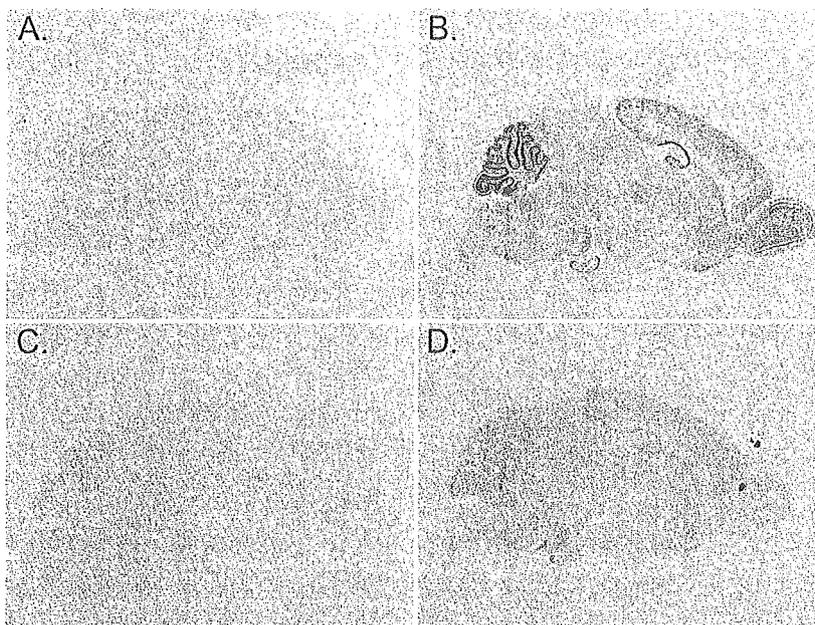
Yamashita, Ohnishi らの方法<sup>11)</sup>に基づいて HA タグタンパク質の免疫沈降実験を行った。SR-HA-IMPA1, SR-HA-IMPA2 もしくは空ベクター (SR-HA) 遺伝子導入により十分遺伝子発現が誘導された細胞を回収して、lysis buffer F (200  $\mu$ l/6 cm dish) に懸濁し、超音波処理で細胞を破碎した。15000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 15 min の遠心処理により得た上清を免疫沈降実験に用いた。HA affinity matrix (Roche) による免疫沈降物を lysis buffer でよく洗浄したあと、2xSDS sample buffer 中で 100  $^{\circ}$ C, 3min 処理して電気泳動サンプルとした。SDS-PAGE, PVDF 膜に転写後、抗 HA 抗体 (Roche), 抗 V5 抗体 (Invitrogen), 抗 IMPA1 抗体, 抗 IMPA2 抗体のいずれかで、ECL (Amersham Bioscience) による Western blot 法で検出した。

### 組み替えタンパク質の精製

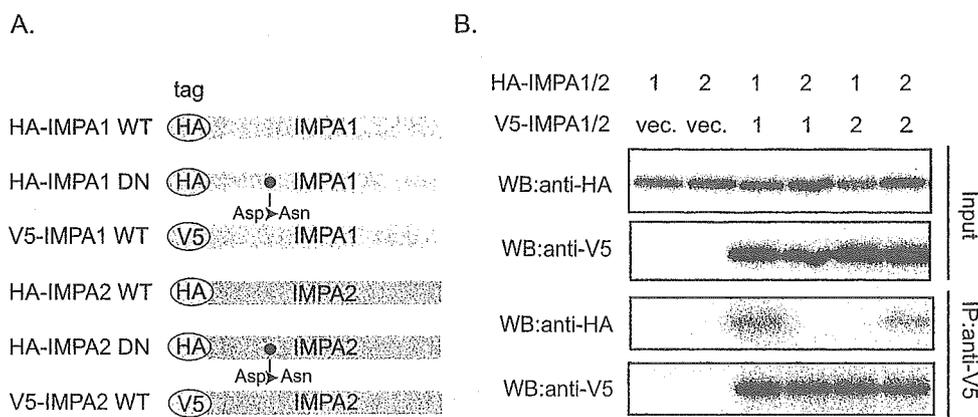
一過性遺伝子導入 HEK293T 細胞からの組み替えタンパク質の産生についての詳細は、Yamashita, Ohnishi らの文献<sup>11)</sup>を参照されたい。簡単には lysis buffer 中に回収した細胞を懸濁し、超音波処理で細胞を破碎した後、バッチ法により HA-affinity matrix (Roche) に HA タグ付加タンパク質の吸着を行った。計 6 回の洗浄に引き続き、HA peptide (Roche) を添加、37  $^{\circ}$ C で incubate することにより HA 付加タンパク質を特異的に上清に回収した (Elution 1)。この溶出操作をもう一度繰り返し (Elution 2), Elution 1,2 とともに終濃度 25% になるよう glycerol を添加した後、使用時まで -80  $^{\circ}$ C で保管した。組み替えタンパク質の精製度は、SDS-PAGE に続く銀染色、抗 HA, IMPA1 もしくは IMPA2 特異的抗体での Western blot 解析により評価した。

### 酵素活性の測定

一部のイノシトールリン酸は化学合成<sup>9)</sup>した。他の多くのものは和光純薬、ナカライテスク、Alexis, Calbiochem, Sigma 等から購入した。酵素活性の測定には、50 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM EGTA, 1 mM の基質および 0 ~ 5 mM MgCl<sub>2</sub> 存在下 37  $^{\circ}$ C で保温し、遊離する無機リン酸を Biomol Green 試薬 (Biomol Reseach Lab.) により比色定



**Fig. 1** Distribution of IMPA transcripts in mouse brain  
Whole brain sections (sagittal, P7) were stained with IMPA1 sense (A), IMPA1 antisense (B), IMPA2 sense (C) or IMPA2 antisense (D) probes.



**Fig. 2** Complex formation between IMPA1 and IMPA2  
(A) A diagram showing the V5 or HA-tagged IMPA proteins used in this study. In IMPA1 DN and IMPA2 DN, an aspartate residue conserved between IMPA1 and IMPA2 and essential for the enzymatic activity, was mutated to asparagine. (B) HEK293T cells were transfected with either HA-IMPAs and V5-IMPAs or empty vector (vec.) as shown. Input (upper two panels) and immunoprecipitate (lower two panels) by V5 antibody were subjected to western blot analysis using HA or V5 antibodies.

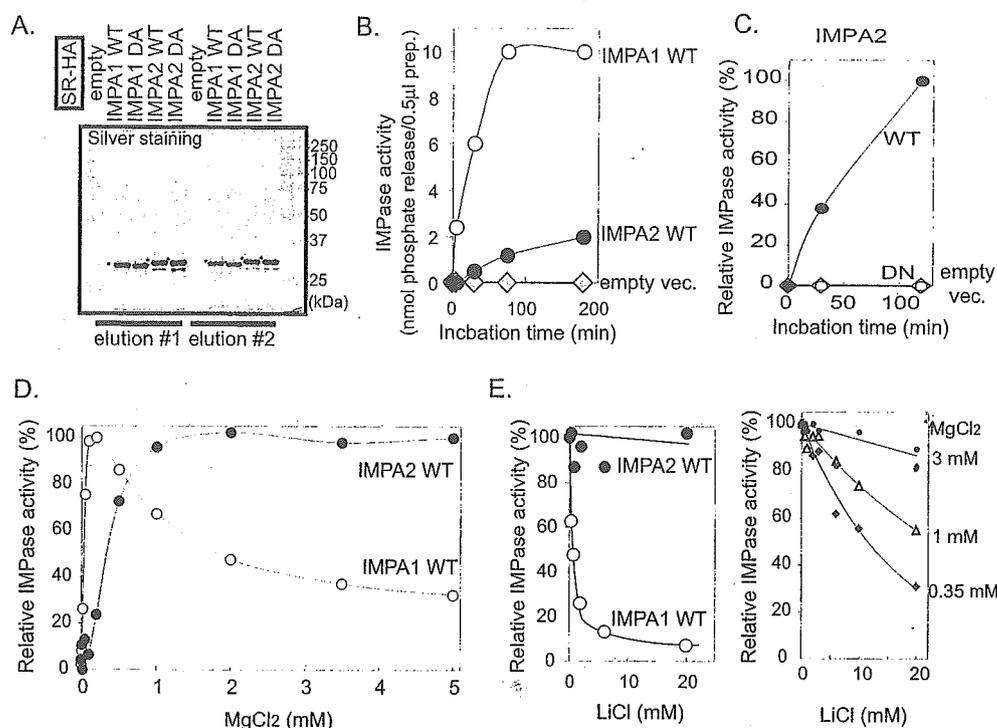
量することで活性を評価した。遊離無機リン酸の絶対量は、リン酸カリウムによる標準曲線から計算した。

結 果

IMPA 遺伝子転写産物の脳内分布

IMPA1,2 の遺伝子発現が脳内で見られること

は、いくつかの報告で明らかになっているが、その詳細な発現パターンについての情報は全く存在しない。我々は、脳内にどのように IMPA 転写産物が分布しているのかを生後 7 日のマウスを使った *in situ* hybridization により検討した。Fig. 1 にあるように、IMPA1,2 の大まかな発現パターンは極めて似ており、ともに全脳で広く発現するこ



**Fig. 3** Enzymatic characterization of IMPA2

(A) Recombinant IMPA1 and IMPA2 were analyzed by SDS-PAGE and silver staining. (B) Inositol 1-monophosphatase activity with IMPA1 WT, IMPA2 WT and vector preparation were tested. (C) Inositol 1-monophosphatase activity was tested with IMPA2 WT, IMPA2 DA and vector preparation. (D) Inositol 1-monophosphatase activity of IMPA1 WT and IMPA2 WT preparation in various concentrations of magnesium chloride were tested. (E) Relative inositol 1-monophosphatase activity of IMPA1 WT and IMPA2 WT preparation were tested in various concentrations of lithium chloride, in the presence of 2mM (left), and 0.35, 1 or 3 mM (right) of magnesium chloride.

とが判明した。一方で、小脳の層構造などで特徴的な発現パターンの違いが認められた。

#### IMPA2の複合体形成能

IMPA1はホモダイマーを形成することが報告されている<sup>7)</sup>。一方で、*in situ* hybridizationの結果より、IMPA1とIMPA2転写産物の脳内分布は極めて類似している。そこで我々はIMPA2が、IMPA1と同様ホモダイマーを形成する能力があるのかとともに、IMPA1とヘテロダイマーを形成して機能分子を形成する可能性があるのかを検討した。そのために、V5-IMPA1, V5-IMPA2, HA-IMPA1, HA-IMPA2を発現するプラスミドを構築し、V5-IMPAとHA-IMPAの組み合わせでHEK293T細胞に同時に発現させ、抗V5抗体による免疫沈降物中に含まれるHA-IMPAタンパク質の有無をWestern blotにより解析した(Fig. 2)。この結果でもIMPA1同士での共免疫沈降は認められ、これ

はIMPA1のホモダイマー形成能を反映したものと考えられる。IMPA2同士の共沈降も認められたが、IMPA1-IMPA2複合体は検出されなかった。従って、IMPA2はIMPA1と同様ホモ複合体を形成するが、細胞内ではIMPA1とヘテロダイマーを形成しないのではないかと考えられる。

#### IMPA2の酵素活性

組み替えタンパク質はIMPA1, IMPA2とも高い精製度を示し、遺伝子導入293T細胞からほぼ同じ収量を得た(Fig. 3A)。cDNAが挿入されていないvector(empty)も同様にtransfectionし、精製の操作を行いコントロールサンプルとした。また、IMPA1およびIMPA2組み替えタンパク質中には、それぞれIMPA2, IMPA1タンパク質は検出されないことを特異抗体によるWestern blotで確認した(data not shown)。IMPA1は、イノシール1リン酸の中でもinositol 1-phosphate (I 1-