

年に Braff らが、12 例の統合失調症が 20 例の対照より PPI が小さいことを報告し⁷⁾、統合失調症の情報処理障害・認知障害を反映していると考察した。PPI の障害は、その後多くの報告で再現され、統合失調型人格障害¹⁰⁾、患者の第 1 度近親者¹¹⁾でも認められることから、脳内の病態が臨床症状として表現される以前の、より原因の近くに位置する神経機能障害を反映すると考えられている。つまり、PPI の減弱は統合失調症における endophenotype (中間表現型) とされている。PPI は動物でも観察され、フェンサイクリジン、MK-801^{脚註2)}などの NMDA 受容体阻害薬で障害されることから^{33,41)}、統合失調症における PPI の障害もグルタミン酸仮説を支持する根拠と考えられている。

3. グルタミン酸関連受容体の遺伝子解析

グルタミン酸受容体は大きく 2 つに分類される。1 つは、多量体を構成して陽イオンチャネルを形成するイオンチャネル型であり、もうひとつは G 蛋白^{脚註3)}と共役する代謝調節型である。イオンチャネル型は、さらにアゴニストの種類によって、AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 型、カイニン酸型、

NMDA 型の 3 つに分けられる。グルタミン酸受容体を候補遺伝子とした関連研究は、2000 年以降急速に増えてきている (表 1)。当然、フェンサイクリジンの作用部位である NMDA 受容体が最もよく調べられている。NMDA 受容体は、R1^{脚註4)}サブユニットと R2^{脚註4)}サブユニットによって多量体が形成される。R1 サブユニットは、全脳において発生初期から永続して発現する必須サブユニットで、発現部位と時期がそれぞれ異なる 4 種類の R2 サブユニットと多量体を構成することで、発生・発達および脳部位特異的機能調節が行われている。R1 サブユニットの発現を 5% まで抑えたノックダウンマウスが、統合失調症モデル動物の指標である自発運動量の亢進と常同行動の増加を示し、また、陰性症状様の社会性行動の減少も示した⁴⁵⁾。そのため、R1 サブユニットをコードする *NR1* が候補遺伝子として注目されたが、これまで有意な関連の報告は 1 報のみである¹⁷⁾ (表 1)。

R2 サブユニットでは、有意な関連の報告が複数見られる。我々は、R2A^{脚註4)}サブユニットをコードする *NR2A*^{脚註4)} 遺伝子のプロモーター領域^{脚註5)} に GT^{脚註6)} の繰り返し多型を同定し、375 例の統合失調症と 378 例の対照を用いた関連

-
- 2) MK-801: NMDA 受容体と結合する阻害薬 (アンタゴニスト)。dizocilpine とも呼ばれる。これを放射性同位元素 [³H] (トリチウム) で標識して、組織と結合する MK-801 の放射活性を測定することで NMDA 受容体の量が計測できる。
- 3) G 蛋白: GTP (グアノシン三リン酸) 結合蛋白のことで、受容体には G 蛋白と共役するタイプとしないタイプがある。神経伝達物質が G 蛋白共役型受容体と結合すると、G 蛋白と共役して GTP の結合・加水分解を起点とする細胞内シグナル伝達カスケードが活性化される。
- 4) NMDA 受容体は、2 種類のサブユニットが複数結合してイオンチャネルを形成する多量体である。全脳に胎生期から生涯を通じて発現している R1 サブユニットと、脳の部位・発生時期によって発現の異なる R2 サブユニットから構成される。R1 サブユニットは、NMDA 受容体の必須ユニットで単独でも受容体機能を構成できる。一方、R2 サブユニットは R1 サブユニットと多量体形成して初めてチャネル機能を持つ。R2 サブユニットは、R2A, R2B, R2C, R2D の 4 種類の亜型があり、それぞれの遺伝子が *NR2A*, *NR2B*, *NR2C*, *NR2D* である。R1 サブユニットの遺伝子は、*NR1* である。
- 5) プロモーター領域: タンパクの鋳型となる遺伝子は、ゲノム DNA 上にアデニン (A), チミン (T), グアニン (G), シトシン (C) の 4 種類の塩基の並びとしてコードされているが (3 つの塩基が 1 つのトリプレットという単位となって 1 つのアミノ酸に対応)、その上流にある塩基配列はタンパクそのものには対応せず、遺伝子の転写 (転写産物が mRNA と呼ばれ、これが翻訳されてタンパクとなる) の調節を担っている。このように遺伝子をコードしている領域の上流にあって、遺伝子 mRNA の転写を制御しているゲノム領域をプロモーター領域という。転写は、プロモーター領域に諸種の転写因子が結合することによって制御されている。

表1 グルタミン酸受容体を統合失調症の候補遺伝子とした研究

	遺伝子	多型またはハプロタイプ	結果	報告者	報告年
イオンチャネル結合型					
AMPA 型	<i>GluR3</i>	SNP 4 ^{a)}	$p=0.011$	Fujii Y et al. ¹⁷⁾	2003
	<i>GluR4</i>	SNP4-5 ^{b)}	$p=0.029$	Makino C. et al. ⁴⁰⁾	2003
	<i>GluR4</i>	SNP3-4-5 ^{b)}	$p=0.043$	Makino C. et al. ⁴⁰⁾	2003
カイニン酸型	<i>GluR5</i>	連鎖解析	negative	Chen A.C. et al. ¹³⁾	1997
	<i>GluR5</i>		negative	Shibata H. et al. ⁵⁵⁾	2001
	<i>GluR6</i>	連鎖解析	negative	Chen A.C. et al. ¹²⁾	1996
	<i>GluR6</i>		negative	Shibata H. et al. ⁵⁶⁾	2002
	<i>GluR7</i>	928T>G	$p=0.010$	Begni S. et al. ³⁾	2002
NMDA 型	<i>NR1</i>		negative	Sakurai K et al. ⁵³⁾	2000
	<i>NR1</i>		negative	Williams N.M. et al. ⁶³⁾	2002
	<i>NR1</i>		negative	Tani A. et al. ⁶⁰⁾	2002
	<i>NR1</i>	IVS10-17C>GTAA	negative	Hammond L. et al. ²¹⁾	2002
	<i>NR1</i>		negative	Hung C.C. et al. ²⁷⁾	2002
	<i>NR1</i>	1001G>C	$p=0.0085$	Begni S. et al. ⁴⁾	2003
	<i>NR2A</i>	-679(GT)n	$p=0.05$	Itokawa M. et al. ²⁹⁾	2003
	<i>NR2B</i>	2664C>T	negative	Nishiguchi N. et al. ⁴⁶⁾	2000
	<i>NR2B</i>	366C>G	$p=0.04$	Ohtsuki T. et al. ⁴⁷⁾	2001
	<i>NR2B</i>	2664C>T	positive (clozapine effect)	Hong C.J. et al. ²⁵⁾	2001
	<i>NR2B</i>	-200T>G	$p=0.016$	Miyatake R. et al. ⁴⁴⁾	2002
	<i>NR2B</i>		negative	Williams N.M. et al. ⁶³⁾	2002
	<i>NR2B</i>	2664C>T	positive (clozapine effect)	Chiu H.J. et al. ¹⁴⁾	2003
	<i>NR2C</i>		negative	Williams N.M. et al. ⁶³⁾	2002
<i>NR2D</i>		negative	Williams N.M. et al. ⁶³⁾	2002	
代謝調節型					
	<i>mGluR2</i>		negative	Joo A. et al. ³²⁾	2001
	<i>mGluR3</i>	1131C>T	$p=0.002$	Marti S.B. et al. ⁴²⁾	2002
	<i>mGluR4</i>		negative	Ohtsuki T. et al. ⁴⁸⁾	2001
	<i>mGluR7</i>	1536A>T	negative	Bray N.J. et al. ⁸⁾	2000
	<i>mGluR7</i>	1536A>T	negative	Bolonna A.A. et al. ⁶⁾	2001
	<i>mGluR8</i>	-2846C>T	negative	Bolonna A.A. et al. ⁶⁾	2001

a) SNP4=rs1468412(A>T)

b) SNP3=rs609239(A>G), SNP4=rs641574(A>G), SNP5=rs659840(A>G)

研究で、繰り返しの長いアレルと統合失調症の関連を見いだした²⁹⁾ (表1)。このGT配列は繰り返しの長さに依存して転写活性を抑制し、かつ繰

り返しが長いほど死後脳でMK-801^{脚注2)} 結合部位が減少していた (図1)。また、繰り返しの長さ と PANSS (Positive and Negative Syn-

6) GT:ゲノムDNA上には、マイクロサテライトと呼ばれる短い塩基配列単位の繰り返しが多数存在するが、われわれもグアニン (G) とチミン (T) がGTGTGTGT・・・と繰り返すマイクロサテライトを*NR2A* 遺伝子のプロモーター領域に同定した。

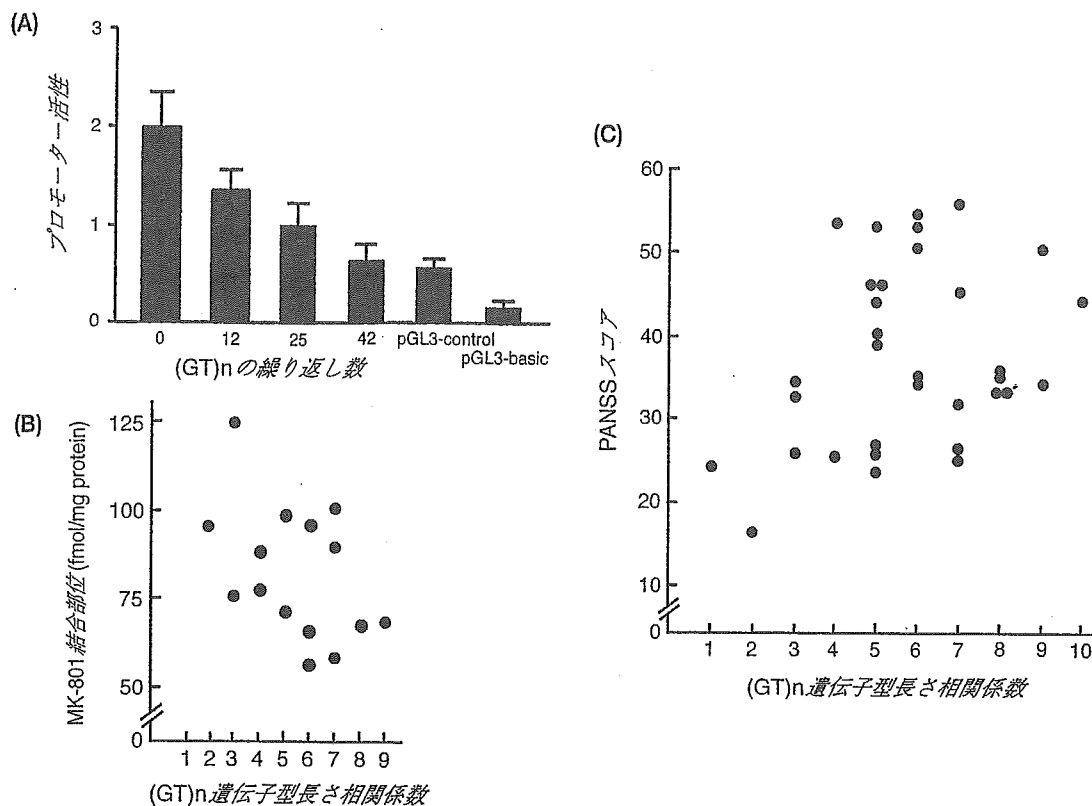


図1 NMDA NR2A サブユニット遺伝子プロモーター上の (GT)n 多型と諸種表現型との関連
 (A) GT リピートの繰り返し数と転写活性の関連。pGL3-control はポジティブコントロール、pGL3-basic はネガティブコントロールの活性を表す。(B) 死後脳における MK-801 結合部位数と (GT)n 遺伝子型との関連。調べた脳部位は lateral occipitotemporal gyrus (Brodmann's area 36) で、Spearman's $\rho = -0.83$, $P = 0.0077$ の負の相関が見られた。(C) PANSS で評価した慢性臨床転帰と (GT)n 遺伝子型との関連。Spearman's $\rho = 0.72$, $P = 0.01$ の正の相関が見られた。(文献 29 より引用)

drome Scale) で評価した慢性転帰の重症度との間に相関が確認された²⁹⁾。NR2A 遺伝子が他の R2 サブユニット遺伝子と比べて興味深いのは、生後から徐々に発現が開始し成人期にプラトーに達するという、統合失調症の発症危険年齢に対応する発達依存を示すということと、統合失調症の病態に関連すると考えられる大脳皮質に高い発現が見られるという 2 つの条件を満たしているからである。因みに我々は双極性気分障害でも

NR2A 遺伝子を解析したが、関連は検出できなかった³⁰⁾。NR2B^{脚注 4)} のプロモーター領域にも -200 T>G が同定され、100 例の統合失調症と 100 例の対照を用いた関連研究で有意な関連が報告された⁴⁴⁾。-200 T>G は、転写調節因子の結合部位である Sp1 に位置していた。培養細胞実験で、患者で有意に頻度の高かった G アレル^{脚注 7)} を持ったコンストラクト^{脚注 8)} が T アレル^{脚注 7)} のものより有意に転写活性が低いことが認められた。

7) アレル：個体は、遺伝子の載った染色体を両親から 1 本ずつ伝播されるため、同じ遺伝子につき 2 つ持つ。親から受けついで同遺伝子座の 1 つ 1 つを対立遺伝子 (アレル) と呼ぶ。NR2B 遺伝子の 200 塩基上流に T が G に変わる多型が同定された。遺伝子型としては、両方の親から T をもらった TT 型、片親から T・片親から G をもらった TG 型、両方の親から G をもらった GG 型の 3 種類がある。統合失調症では対照に比べて GG, TG など G アレルを持つ個体が多かった。

表2 連鎖領域から同定された統合失調症関連遺伝子

遺伝子	遺伝子座位	人種	連鎖の報告	追認	遺伝子改変動物の表現型 ^{a)}
<i>RGS4</i>	1q21-22	USA, Indian	Yes	Yes	Yes
<i>DTNBP1</i>	6p22	Irish	Yes	Yes	No
<i>NRG1</i>	8p12-21	Icelandic	Yes	Yes	Yes
<i>CN</i>	8p12-21	USA, Africa	Yes	No	Yes
<i>DAAO</i>	12q24	French Canadian	No	No	No
<i>G72</i>	13q34	French Canadian, Russian	Yes	Yes	No
<i>PRODH</i>	22q11	USA	Yes	No	Yes

文献 22 より改変引用

a) 遺伝子改変動物が統合失調症関連行動を表現型として示したものを Yes と表記した。

これらの報告は、2A、2B サブユニットの発現量を抑制する多型が統合失調症の遺伝的リスクファクターである可能性を示唆した点で、グルタミン酸仮説を支持している。

4. グルタミン酸神経伝達に影響する可能性のある遺伝子の解析

これまでに統合失調症で連鎖が報告された染色体領域は、10 以上の染色体にわたっている。いったん連鎖が示唆された領域が、他施設により否定されることも多い。これは、統合失調症の異種性によるものとも、多重の統計処理を行う全ゲノムスキャンの偶然の偽陽性とも考えられている。したがって、複数の報告で追認された領域は偽陽性の可能性が低いといえる。このような複数の施設が追認した領域から、昨年来相次いで統合失調症と関連する遺伝子が絞り込まれてきた (表 2)。これらの遺伝子は、それぞれグルタミン酸の神経

伝達に関与する可能性が期せずして明らかとなった (図 2)。

染色体 8p は、5 つの人種にわたって複数のグループから連鎖が報告されてきた^{5,9,34,52)}。Stefansson らは、110 例の患者を含む 33 家系を用いて連鎖解析を行い、8p12-21 に LOD 値^{脚註 9)} 2.53 を得た⁵⁷⁾。その領域 (5 cM) からマイクロサテライトマーカーを 75 kb^{脚註 10)} 間隔で選び、さらに感受性領域を絞り込んだ。その結果、600 kb にわたる 2 種類のハプロタイプ^{脚註 11)} が複数の家系で共有されていた。その領域にコードされていた遺伝子が *neuregulin-1* (*NRG1*) であった⁵⁷⁾。彼らは *NRG1* 上に同定された 181 の一塩基置換 (single nucleotide polymorphism: SNP) について、394 例の患者と 478 例の対照例をタイピングしたが、いくつかの SNP で弱い有意差がみられたものの、どれもアミノ酸置換を伴わないものやスプライスサイトからはずれたものであった。

8) コンストラクト: *NR2B* のプロモーター領域に相当する DNA 配列と蛍光を発する遺伝子をタンデムに並べプラスミッドベクターに組み入れたものを指す。コンストラクトを培養細胞へ導入し、培養細胞の発する蛍光量によってプロモーター活性を測定する。

9) LOD 値: あるゲノム領域が疾患に連鎖している確率の指標で、logarithm of the odds の略。連鎖解析において、DNA マーカー間の組み換え推定値を関数として算出される。LOD 値が -2 より小さいとき、その領域は疾患との連鎖が否定される。3 より大きいとき 95% 以上の確率で連鎖していると結論づける。

10) kb, Mb: ゲノム DNA は塩基の連なりであるが、1000 塩基対の長さを 1 kb (kilo-base), 100 万塩基対を 1 Mb (mega-base) と表示する。

11) ハプロタイプ: ゲノム DNA 上で 2 点間の距離が近い、組み換えのおきにくい領域では、メンデルの独立の法則から外れて、DNA 多型 (マーカー) 同士が互いに連鎖して子供に伝播される。これら、互いに密接に連鎖している (連鎖不平衡にあるともいう) 遺伝子多型の組み合わせをハプロタイプと呼ぶ。

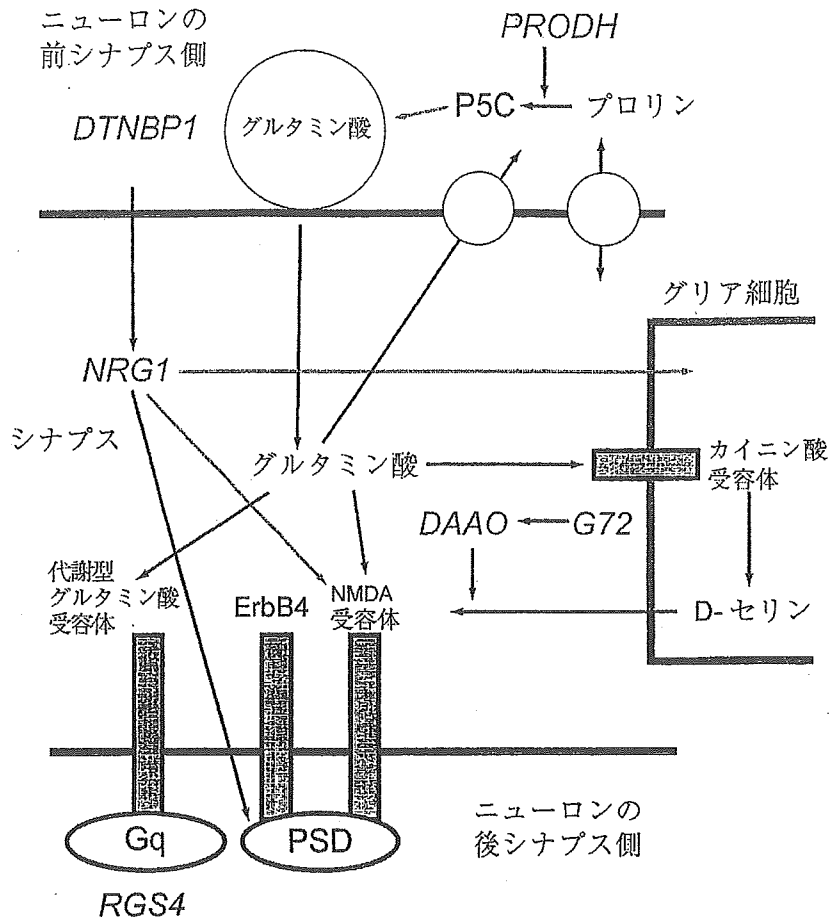


図2 グルタミン酸神経シナプスにおける統合失調症関連遺伝子のネットワーク
 濃い矢印は直接の相互作用を表し、薄い矢印は間接的相互作用を示している。関連遺伝子は網掛けにしてある。

Gq=GTP結合タンパクのサブユニット, NRG1=neuregulin-1, DTNBP1=dysbindin, DAAO=D-amino acid oxidase, RGS4=regulator of G-protein signalling-4, PRODH=proline dehydrogenase, P5C=Δ1-pyrroline-5-carboxylate, ErbB4=NRG1受容体, PSD=post synaptic densityタンパク (文献22より引用)

しかし、ハプロタイプ解析では5'端の12のSNPと4つのマイクロサテライトマーカーからなるハプロタイプ^{脚注11)}に有意差が見られ、これを統合失調症のリスクハプロタイプ(オッズ比2.2)であると報告した。NRG1は、中枢神経を含む多くの臓器で発現しており、胎生期には神経

細胞のmigration^{脚注12)}に影響を与える。成人の神経系では、NMDA受容体を含む神経伝達物質受容体の発現や活性化に影響している⁴⁹⁾。Stefanssonらは、さらにNRG1とNRG1受容体遺伝子であるErb4のノックアウトマウス^{脚注13)}のヘテロ接合体を調べ、自発運動量の亢進や

12) migration: 大脳皮質の神経細胞は、脳室帯という脳室に面した部位で誕生する。最終分裂を終えた神経細胞は、胎生期11-17日頃に表層へ向かって移動し皮質で6層構造を形成する。この神経細胞の移動がmigrationである。統合失調症では、migrationの障害を示唆する証拠がかねてから報告されており、神経発達障害仮説の根拠の一部とされている。

PPIの障害を報告した⁵⁷⁾。さらに、*NRG1*のヘテロ接合体ではNMDA受容体密度が16%低下していることを確認した。

染色体6pは、6p25-24^{2,26,28)}、6p23-22^{26,28,62)}、6p21-24^{54,58)}と多数の連鎖が報告されてきた。Straubらは、270家系1425名を用いて連鎖解析を行い、6p22.3に連鎖の最大LOD値2.22をみとめた⁵⁹⁾。さらに、6p22領域の20のマーカーを用いてtransmission disequilibrium test (TDT)を行ったところ、単独でもハプロタイプ^{脚註11)}でもこの領域にあるdystrobrevin-binding protein 1 (dysbindin, *DTNBP1*) 上にあるマーカーが有意に統合失調症と関連していた⁵⁹⁾。DTNBP1はdystrophin^{脚註14)} 蛋白複合体の1つで、脳内のPSD (postsynaptic densities) 蛋白と相互作用してNMDA受容体の活性を調節している。なお、我々も*DTNBP1*ハプロタイプと統合失調症との関連を日本人サンプルで確認している(未発表)。

染色体13q22-34も、複数のグループが連鎖を報告している^{5,9,37)}。Chumakovらは、フランス系カナダ人の統合失調症213例と対照241例を用いて、13q34から5 Mb^{脚註10)} にわたって191個のSNPについて関連地図を作成した¹⁵⁾。この領域に、統合失調症と関連を示したSNPの連続が

65 kbと1400 kbにわたる2つの領域 Bin A, Bin B^{脚註15)} として検出された。183名ずつのロシア人患者・対照を用いて再検した結果、65 kbのBin Aにおける2つのSNPが再び有意な関連を示した。このBin AからG72遺伝子^{脚註16)} が同定された¹⁵⁾。Yeast two hybrid法により、G72はD-amino acid oxidase (DAAO) と相互作用をすることが判明した。DAAOはD-セリンの酸化酵素であるが、D-セリンは脳内に内在している²³⁾、NMDA受容体をアロステリック^{脚註17)} に活性化する。かつて、D-セリンの不足が統合失調症で予測され、D-セリンの患者への投与が試みられ、統合失調症の症状が改善したと報告された⁶¹⁾。今年になって、統合失調症で血清中D-セリンが対照群より減少していることも報告された²⁴⁾。Chumakovらは、さらにDAAOの4つのSNPも統合失調症と関連していることを報告した¹⁵⁾。G72とDAAOのリスクSNPを同時に持った個体のオッズ比(5.02)は、それぞれを単独に持った個体のオッズ比(1.89および1.04)の相加値を上回っていた。これは、12q24にコードされているDAAO遺伝子と、13q34のG72遺伝子が相乗的に作用して統合失調症発症に寄与していると解釈され、個別遺伝子の独立した効果だ

-
- 13) *Erb4* のノックアウトマウス：マウスの*NRG1*受容体遺伝子にあたる*Erb4*を、遺伝子操作によって発現できなくなったのがノックアウトマウスである。遺伝子は両方の親から1つずつ一対持っているが、両方ともノックアウトしたマウス(ホモ接合体)は生存できず死産してしまったため、片親からの遺伝子のみノックアウトしたマウス(ヘテロ接合体)が実験に用いられた。
- 14) dystrophin：Duchenne/Becker型筋ジストロフィーの原因分子として同定されたdystrophinであるが、筋組織だけでなく中枢神経系でも発現していることが確認されている。また、筋ジストロフィー患者の病変は筋組織のみならず、認知障害や注意欠陥障害など中枢神経症状も認められた。dystrophinはシナプス形成や神経終末の伝達調節を行っていることが明らかになっている。
- 15) Bin A, Bin B：191のSNPの中から、統合失調症と $p < 0.05$ の有意水準で関連を示したSNPがM1-M5と名づけられ、1380 kbにわたる領域に分布していたが、この領域をBin Bと命名した。 $p < 0.01$ で関連を示したM12とM22というSNPもBin Bより染色体末端方向に、65.9 kbの間隔で同定されここがBin A領域と名づけられた。
- 16) G72 遺伝子：Bin A領域をくまなく検索した結果、同定された2つの遺伝子がG72とG30と命名された。2つの遺伝子は、ゲノムの同じ領域の互いに逆のDNA鎖(DNAは2本鎖である)にコードされており、G72がG30を包み込むような位置関係にあった。G72は、扁桃体、尾状核、脊髄などで発現していた。
- 17) アロステリック：活性中心から離れた部位に基質と異なった分子が結合すると、タンパクの高次構造などが変化して酵素活性が変化する場合がある。これをアロステリックな調節という。NMDA受容体では、マグネシウムイオン、グリシン、D-セリンなどがチャンネル中心と離れた場所に結合して、チャンネルの活性を変化させることから、アロステリックな調節が働いていると考えられている。

けでなくエピスタティック^{脚註18)}な効果も関与していることが推察された。

染色体22q11は、この領域の欠失が顔面や心臓の奇形をともなうVCSF (velo-cardio-facial syndrome) を来す。VCSFの20-30%が統合失調症や類縁精神疾患を発症することから、22q11には統合失調症の感受性遺伝子が存在すると考えられていた。また、複数の施設もこの領域に連鎖を報告していた^{16,36,51)}。Liuらは、VCSFで欠失が共通しやすい22q11の1.5Mの領域について、18のSNPを用いてTDTとHHRR (haplotype-based haplotype relative risk) 解析を行った結果、proline dehydrogenase (*PRODH*)のSNPおよびハプロタイプが有意に統合失調症に関連していると報告した³⁸⁾。22q11の微小欠失は、一般人口でも0.025%の頻度で生じるが、統合失調症では2%と頻度が高い。さらに、統合失調症でも13歳以下に発症する小児発症例では6%と特に頻度が高い。そこでLiuらは、患者を若年発症と成人発症に分けて検討し、*PRODH*との関連における統計的有意水準および相対危険率の両方が、若年発症例で上昇することを報告した³⁸⁾。この*PRODH*は、プロリンをΔ1-ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) に変換し、P5Cはさらに還元されてグルタミン酸になる。

今年に入って、calcineurin (CN) が統合失調症の候補遺伝子として話題を呼んだ。これまでのポジショナルクローニングによって絞り込まれた遺伝子と異なり、遺伝子改変動物の行動解析から統合失調症との関連が示唆された。Miyakawarらは、CNのノックアウトマウスで、自発運動量の増大、社会性行動の減少、PPIの障害など統合失調症関連の行動異常を見出した⁴³⁾。その結果に基づいて、ヒトDNAの遺伝子解析を行って統合失調症との関連が示された¹⁹⁾。興味深いことに、CNの4つのサブユニット、CN結合蛋白7つ、

機能的にCNと共役する蛋白5つが、これまでに連鎖が示唆された染色体座位にそれぞれ一致して存在しているという¹⁹⁾。それらの中で、多施設から連鎖の報告が出ている染色体領域にのっているサブユニット遺伝子*PPP3R1* (calcineurin B subunit, 染色体2p14)、*PPP3CA* (calcineurin A α subunit, 染色体4q24)、*PPP3CC* (calcineurin A β subunit, 染色体8q21.3) と結合蛋白遺伝子*FKBP5* (FK506 binding protein 5, 染色体6p21.31) について12例の患者を解析し、同定したSNPについてアメリカ人の210組のトリオ (罹患者とその両親) を用いてTDTを行った結果、*PPP3CC*で有意な関連が認められた¹⁹⁾。*PPP3CC*の5つのSNPからなるハプロタイプは、南アフリカの200組のトリオでも関連の傾向が認められた。我々もCN関連遺伝子を日本人統合失調症で網羅的に調べており、現在までに染色体8p上のCN関連遺伝子の関与を確認している (未発表)。CNのノックアウトマウスでは、NMDA受容体を介した海馬の長期抑制が低下しており⁶⁴⁾、CNもグルタミン酸神経系に機能的関連があると考えられる。

5. おわりに

連鎖解析や広範な領域を対象とした連鎖不平衡SNPマッピングは、病因・病態の仮説に基づかないポジショナルなアプローチであるが、これらの方法によって絞り込まれたneuregulin-1、dysbindin、G72、proline dehydrogenaseといった遺伝子、および動物実験から端緒についたcalcineurin系遺伝子群が、間接的にせよグルタミン酸神経伝達に影響を与える可能性が示され、一方でグルタミン酸神経伝達に直接関与する候補遺伝子解析でも、興奮性アミノ酸神経伝達の変調が統合失調症発症に結びつくというデータが蓄積されつつあるというのは、異なったアプローチによる結果の偶然の収斂であるが故に興味深い。し

18) エピスタティック：2つ以上の遺伝子が互いに相加的でない非線形な相互作用を示すとき、エピスタティックな効果が存在する (エピスタシス) という。

かし、統合失調症の発症メカニズムについてあまりの単純化にも注意が必要である。グルタミン酸神経伝達は、広範な神経機能に関わる回路であり、従って間接作用を含めるとカスケードに機能的につながる分子は多岐にわたって当然である。また、統合失調症に関連するグルタミン酸神経伝達系遺伝子といっても、機能的多型まで同定されたのはごくわずかである。今後は、さらなる遺伝的再現研究、病因 SNP の同定作業が必要であることはもちろんのこと、個別遺伝子-疾患関連だけではなく複数遺伝子のネットワーク-疾患関連を調べて行くために、ハード、ソフトを含めた方法論の改良・進歩や大規模サンプル解析が必要となってくると思われる。このような継続的作業が、統合失調症におけるグルタミン酸仮説のさらなる詳細な検討を可能にし、かつ統合失調症の1つ1つの分子病理を明らかにしていくものと期待される。

文 献

- 1) Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R. et al.: The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*, 79; 565-575, 1983
- 2) Bailer, U., Leisch, F., Meszaros, K. et al.: Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 42; 175-182, 2000
- 3) Begni, S., Popoli, M., Moraschi, S., Bignotti, S., Tura, G.B., Gennarelli, M.: Association between the ionotropic glutamate receptor kainate 3 (GRIK3) ser310ala polymorphism and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 7; 416-418, 2002
- 4) Begni, S., Moraschi, S., Bignotti, S. et al.: Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53; 617-619, 2003
- 5) Blouin, J.L., Dombroski, B.A., Nath, S.K. et al.: Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet*, 20; 70-73, 1998
- 6) Bolonna, A.A., Kerwin, R.W., Munro, J., Arranz, M.J., Makoff, A.J.: Polymorphisms in the genes for mGluR types 7 and 8: association studies with schizophrenia. *Schizophr Res*, 47; 99-103, 2001
- 7) Braff, D., Stone, C., Callaway, E. et al.: Pre-stimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*, 15; 339-343, 1978
- 8) Bray, N.J., Williams, N.M., Bowen, T. et al.: No evidence for association between a non-synonymous polymorphism in the gene encoding human metabotropic glutamate receptor 7 and schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 10; 83-86, 2000
- 9) Brzustowicz, L.M., Honer, W.G., Chow, E.W. et al.: Linkage of familial schizophrenia to chromosome 13q32. *Am J Hum Genet*, 65; 1096-1103, 1999
- 10) Cadenhead, K.S., Geyer, M.A., Braff, D.L.: Impaired startle prepulse inhibition and habituation in patients with schizotypal personality disorder. *Am J Psychiatry*, 150; 1862-1867, 1993
- 11) Cadenhead, K.S., Swerdlow, N.R., Shafer, K.M. et al.: Modulation of the startle response and startle laterality in relatives of schizophrenic patients and in subjects with schizotypal personality disorder: evidence of inhibitory deficits. *Am J Psychiatry*, 157; 1660-1668, 2000
- 12) Chen, A.C., Kalsi, G., Brynjolfsson, J. et al.: Lack of evidence for close linkage of the glutamate GluR6 receptor gene with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 153; 1634-1636, 1996
- 13) Chen, A.C., Kalsi, G., Brynjolfsson, J. et al.: Exclusion of linkage of schizophrenia to the gene for the glutamate GluR5 receptor. *Biol Psychiatry*, 41; 243-245, 1997
- 14) Chiu, H.J., Wang, Y.C., Liou, Y.J., Lai, I.C., Chen, J.Y.: Association analysis of the genetic variants of the N-methyl D-aspartate receptor subunit 2b (NR2b) and treatment-refractory schizophrenia in the Chinese. *Neuropsychobiology*, 47; 178-181, 2003
- 15) Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O. et al.: Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99; 13675-13680, 2002
- 16) Coon, H., Jensen, S., Holik, J. et al.: Genomic scan for genes predisposing to schizophrenia. *Am J Med Genet*, 54; 59-71, 1994
- 17) Fujii, Y., Shibata, H., Kikuta, R. et al.: Posi-

tive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 13; 71-76, 2003

18) Gattaz WF, Gattaz D, Beckmann H.: Glutamate in schizophrenics and healthy controls. *Arch Psychiatr Nervenkr*, 231; 221-225, 1982

19) Gerber, D.J., Hall, D., Miyakawa, T. et al.: Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100; 8993-8998, 2003

20) Gottesmann I.I.: *Schizophrenia genetics: the origin of madness*. Freeman and Company: New York, NY, 1991

21) Hammond, L., Castanotto, D., Rice, S.R. et al.: Alteration of branch site consensus sequence and enhanced pre-mRNA splicing of an NMDAR1 intron not associated with schizophrenia. *Am J Med Genet*, 114; 631-636, 2002

22) Harrison, P.J., Owen, M.J.: Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet*, 361; 417-419, 2003

23) Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T. et al.: The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett*, 296; 33-36, 1992

24) Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E. et al.: Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 60; 572-576, 2003

25) Hong, C.J., Yu, Y.W., Lin, C.H., Cheng, C.Y., Tsai, S.J.: Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (GRIN2B) genetic variants and psychopathology and clozapine response in schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 11 (4): 219-222, 2001

26) Hovatta, I., Lichtermann, D., Juvonen, H. et al.: Linkage analysis of putative schizophrenia gene candidate regions on chromosomes 3p, 5q, 6p, 8p, 20p and 22q in a population-based sampled Finnish family set. *Mol Psychiatry*, 3; 452-457, 1998

27) Hung, C.C., Chen, H.Y., Chen, C.H.: Systematic mutation analysis of the human glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 1 gene (GRIN1) in schizophrenic patients. *Psychiatr Genet*, 12; 225-230,

2002

28) Hwu, H.G., Lin, M.W., Lee, P.C. et al.: Evaluation of linkage of markers on chromosome 6p with schizophrenia in Taiwanese families. *Am J Med Genet*, 96; 74-78, 2000

29) Itokawa, M., Yamada, K., Yoshitsugu, K. et al.: A microsatellite repeat in the promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene suppresses transcriptional activity and correlates with chronic outcome in schizophrenia. *Pharmacogenetics*, 13; 271-278, 2003

30) Itokawa, M., Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Ishitsuka, Y., Detera-Wadleigh, S., Yoshikawa, T.: Genetic analysis of a functional GRIN2A promoter (GT)_n repeat in bipolar disorder pedigrees in humans. *Neurosci Lett*, 345; 53-56, 2003

31) Javitt, D.C.: Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J Clin Psychiatry*, 9; 12-35, 1987

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

33) Keith, V.A., Mansbach, R.S., Geyer, M.A.: Failure of haloperidol to block the effects of phencyclidine and dizocilpine on prepulse inhibition of startle. *Biol Psychiatry*, 30; 557-566, 1991

34) Kendler, K.S., MacLean, C.J., O'Neill, F.A. et al.: Evidence for a schizophrenia vulnerability locus on chromosome 8p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry*, 153; 1534-1540, 1996

35) Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W. et al.: Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*, 20; 379-382, 1980

36) Lasseter, V.K., Pulver, A.E., Wolyniec, P.S. et al.: Follow-up report of potential linkage for schizophrenia on chromosome 22q: Part 3. *Am J Med Genet*, 60; 172-173, 1995

37) Levinson, D.F., Holmans, P., Straub, R.E. et al.: Multicenter linkage study of schizophrenia candidate

- regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III. *Am J Hum Genet*, 67; 652-663, 2000
- 38) Liu, H., Heath, S.C., Sobin, C. et al.: Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99; 3717-3722, 2002
- 39) Luby, E., Cohen, B.D., Rosenbaun, G. et al.: Study of a new schizophrenomimetic drug-Sernyl. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, 81; 363-369, 1959
- 40) Makino, C., Fujii, Y., Kikutá, R. et al.: Positive association of the AMPA receptor subunit GluR 4 gene (GRIA4) haplotype with schizophrenia: linkage disequilibrium mapping using SNPs evenly distributed across the gene region. *Am J Med Genet*, 116B; 17-22, 2003
- 41) Mansbach, R.S., Geyer, M.A.: Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2; 299-308, 1989
- 42) Marti, S.B., Cichon, S., Propping, P., Nothen, M.: Metabotropic glutamate receptor 3 (GRM3) gene variation is not associated with schizophrenia or bipolar affective disorder in the German population. *Am J Med Genet*, 114; 46-50, 2002
- 43) Miyakawa, T., Leiter, L.M., Gerber, D.J. et al.: Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100; 8987-8992, 2003
- 44) Miyatake, R., Furukawa, A., Suwaki, H.: Identification of a novel variant of the human NR2B gene promoter region and its possible association with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 7; 1101-1106, 2002
- 45) Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. et al.: Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98; 427-436, 1999
- 46) Nishiguchi, N., Shirakawa, O., Ono, H., Hashimoto, T., Maeda, K.: Novel polymorphism in the gene region encoding the carboxyl-terminal intracellular domain of the NMDA receptor 2B subunit: analysis of association with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157; 1329-1331, 2000
- 47) Ohtsuki, T., Sakurai, K., Dou, H., Toru, M., Yamakawa-Kobayashi, K., Arinami, T.: Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 6; 211-216, 2001
- 48) Ohtsuki, T., Toru, M., Arinami, T.: Mutation screening of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 (GRM4) gene in patients with schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 11; 79-83, 2001
- 49) Ozaki, M., Sasner, M., Yano, R. et al.: Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature*, 390; 691-694, 1997
- 50) Perry TL.: Normal cerebrospinal fluid and brain glutamate levels in schizophrenia do not support the hypothesis of glutamatergic neuronal dysfunction. *Neurosci Lett*, 28; 81-85, 1982
- 51) Pulver, A. E., Karayiorgou, M., Wolyniec, P. S. et al.: Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: part 1. *Am J Med Genet*, 54; 36-43, 1994
- 52) Pulver, A.E., Lasseter, V.K., Kasch, L. et al.: Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes. *Am J Med Genet*, 60; 252-260, 1995
- 53) Sakurai, K., Toru, M., Yamakawa-Kobayashi, K., Arinami, T.: Mutation analysis of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 296; 168-170, 2000
- 54) Schwab, S.G., Hallmayer, J., Albus, M. et al.: A genome-wide autosomal screen for schizophrenia susceptibility loci in 71 families with affected siblings: support for loci on chromosome 10p and 6. *Mol Psychiatry*, 5; 638-649, 2000
- 55) Shibata, H., Joo, A., Fujii, Y. et al.: Association study of polymorphisms in the GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) with schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 11; 139-144, 2001
- 56) Shibata, H., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N., Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the GluR 6 kainate receptor gene (GRIK2) with schizophrenia. *Psychiatry Res*, 113; 59-67, 2002
- 57) Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V. et al.: Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71; 877-892, 2002
- 58) Straub, R.E., MacLean, C.J., Ma, Y. et al.:

Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry*, 7; 542-559, 2002

59) Straub, R.E., Jiang, Y., MacLean, C.J. et al.: Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71; 337-348, 2002

60) Tani, A., Kikuta, R., Itoh, K., Joo, A. et al.: Polymorphism analysis of the upstream region of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (GRIN1): implications for schizophrenia. *Schizophr Res*, 58; 83-86, 2002

61) Tsai, G., Yang, P., Chung, L.C. et al.: D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 44; 1081-1089, 1998

62) Turecki, G., Rouleau, G.A., Joobers, R. et al.: Schizophrenia and chromosome 6p. *Am J Med Genet*. 74; 195-198, 1997

63) Williams, N.M., Bowen, T., Spurlock, G. et al.: Determination of the genomic structure and mutation screening in schizophrenic individuals for five subunits of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Mol Psychiatry*, 7; 508-514, 2002

64) Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M. et al.: Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell*, 107; 617-629, 2001

Hypoglutamatergic Hypothesis of Schizophrenia : evidence from genetic studies

Masanari ITOKAWA^{1,2)} and Takeo YOSHIKAWA²⁾

1) *Department of Schizophrenia Research, Tokyo Institute of Psychiatry*

2) *Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute*

Schizophrenia is a relatively common but genetically complex disorder, making the identification of susceptibility genes formidable. However, progress in genetic studies on schizophrenia during the past ten years has revealed several replicated linkage loci, which span over multiple chromosomal regions. Since last year, several causal genes have been isolated from those linkage regions. All of these have proven to have some functional relevance to glutamatergic neurotransmission. These results are interesting because the "hypoglutamatergic hypothesis" for pathophysiology of schizophrenia has been articulated since the early eighties. This hypothesis has been supported both by pharmacological evidence that administration of NMDA-type glutamate receptor antagonists induces schizophrenia-like symptoms and by neurophysiological studies. Recent lines of evidence from a candidate gene approach have also endorsed the hypothesis. Here, we introduce the overview of recent progress in genetic studies that converge to depict the hypothesis of glutamatergic hypofunction in schizophrenia.

(Authors' abstract)

<Keywords: linkage analysis, association study, NMDA receptor, hypoglutamatergic hypothesis, schizophrenia>



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

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

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

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

Received by T. Sekiya

Abstract

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

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

the transcript with preceding poly(A) addition signal was also detected.

2. Materials and methods

2.1. Determination of the genomic organization of *KCNV1*

A partial cDNA sequence for *KCNV1* was obtained from GenBank (accession No. T89084). To determine the full-length cDNA sequence, we searched the database for expressed sequence tags (ESTs), and found that the EST sequence AW163488 contained the most 5' region of *KCNV1*. RNA protection assay was undertaken, but the 5' end could not be extended beyond the AW163488 clone (see below). The genomic structure was predicted by comparing the cDNA sequence with the bacterial artificial chromosome (BAC) clone sequence (accession No. AC027451). This structure was confirmed by sequencing other BAC clones isolated from Human Bacterial Artificial Chromosome DNA Pools Release IV (Research Genetics) using the following primer set: T89084-5', 5'-CCAACAAT-CAGAAAGCTGTCC-3' (3' end at nt 2460: A of ATG initiation codon counted as +1); T89084-3', 5'-CTTCAT-TCCCTCCCAACTGA-3' (3' end at nt 2203). Motif search for transcription factors in the promoter region was performed using the TRANCFAC (<http://www.gene-regulation.com/>) and TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) databases.

2.2. RNase protection assay

Antisense [³²P]-UTP-labeled riboprobes were synthesized using Riboprobe in vitro Transcription Systems (Promega). Two different DNA fragments were amplified from BAC DNA by PCR using two primer sets: for exon 1, 5'-GAGAGAGAATTCGATCCTGCCACTCCCCTCTG-3'

(5' end at nt -1091, see Figs. 1 and 2) and 5'-GAGA-GAAAGCTTAGCTCCCGGCACATCTGGT-3' (5' end at nt -811); and for exon 2, 5'-GAGAGAGAATTC-TTGCCTCAGCTAAGAGTCA-3' (5' end at nt -501) and 5'-GAGAGAAAGCTTCAGAGGAAGGGTCGCGC-TAAGAGA-3' (5' end at nt -239). These amplicons were cloned into *EcoRI/HindIII*-double digested pGEM-3Zf(-) vector (Promega), and mRNA was purified from NB1 neuroblastoma cells using ISOGEN (Nippon Gene). RNase protection assay was performed using an RPAII kit (Ambion).

2.3. Construction of mutants for luciferase assay

The 5' to -3' and 3' to -5' deletion mutants were constructed using PCR-based techniques (Costa et al., 1996). The promoter sequence (nt -1350 to -873) of *KCNV1* was amplified from BAC DNA by PCR using the primer set (F-1350: 5'-TCTGAGATGCCTGCTGAAAA-3', 5' end at nt -1350; R-873: 5'-TCTTAGTCTACACGT-GAGGTCTGA-3', 5' end at nt -873), and then cloned into pGL3-basec vector (Promega) for luciferase assay. Another four upstream (F) and four downstream (R) primers were prepared to make a series of 5' and 3' deletion mutants: F-1184, 5'-TGCAAGTGATTTCAGGATG-3' (5' end at nt -1184); F-1107, 5'-CTCACCTCCCTCCCTTAGAT-3' (5' end at nt -1107); F-1041, 5'-TCAGAGCTAGA-GCGGGCGGGCGGACA-3' (5' end at nt -1041); F-949, 5'-AGGCGCTGGGTAGAG-3' (5' end at nt -949); R-911, 5'-GAGGGAAACTGTGTTCCAGC-3' (5' end at nt -911); R-973, 5'-CACCTCCCTC-CGGGCTCC-3' (5' end at nt -973); R-1029, 5'-GCTCTAGCTCTGA-GAGCCAC-3' (5' end at nt -1029); R-1232, 5'-TAGT-GAGGTGCCCGGTGACA-3' (5' end at nt -1232).

Random mutagenesis was performed based on PCR as follows (Svetlov and Cooper, 1998; Xu et al., 1999): PCR reactions were performed with MasterAmp 2X PCR Premix

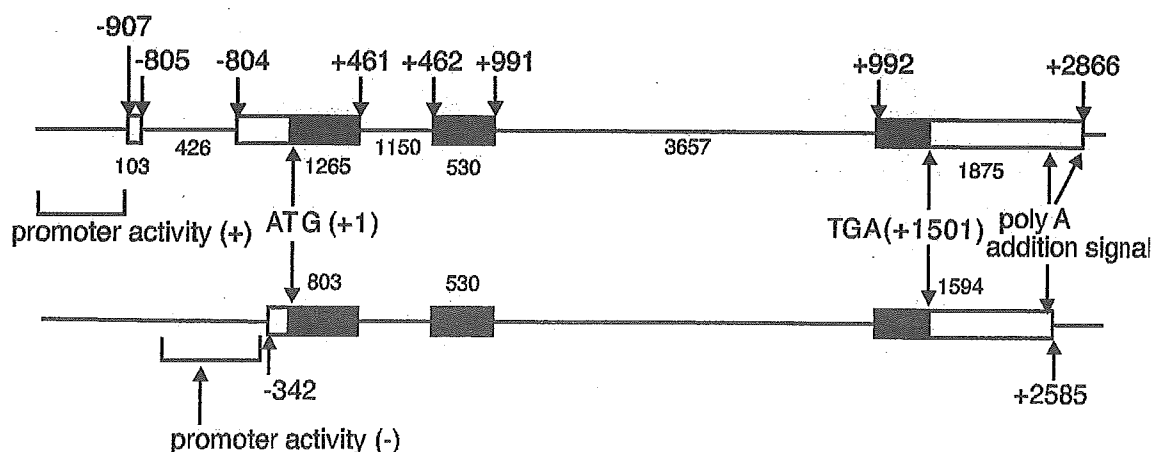


Fig. 1. Genomic structure of the *KCNV1* gene. Upper panel shows the newly determined genomic organization, including the new 5' exon, and extended 3' end with locations of poly(A) signal sites. Below is the genomic structure deduced from reported cDNA sequence (accession No. AF167082). Open reading frames are indicated as closed boxes. Exon and intron sizes (bp) are also shown.

(Epicentre) K buffer containing 0.5 mM MnCl₂, and with the primers F-1184 and R-873. Amplicons were cloned into pGL3-basic vector, then sequenced using a DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham).

Mutants lacking one of the potential promoter elements identified by random mutant analysis were generated according to PCR-based techniques (Costa et al., 1996). The primers F-1056d (5'-CTGGGCGAGTGGCTCTCAGAGCTAG-3'; 5' end at nt -1056) and R-1066d (5'-CACCAGCAGAGGGGAGTGGCAGGAT-3'; 5' end at nt -1066) were used to generate D1-Δ mutant, F-1037d (5'-AGCTAGAGCGGGCGGGGCGGACACG-3'; 5' end at nt -1037) and R-1042d (5'-GAGCCACTCGCC-CAGTGCTTCCAGC-3'; 5' end at nt -1042) for D2-Δ, F-1029 (5'-GGCGGACACGCTTAGCGTAAGCGCA-3'; 5' end at nt -1029) and R-1022d (5'-GCTCTAGCTCTGAGAGCCACTCGCC-3'; 5' end at nt -1022) for D6-Δ, F-981d (5'-GGTGGAGGCGGGGCAAGGCAAGGCA-3'; 5' end at nt -981) and R-976d (5'-TCCGGGC-TCCTGGCCCCTG-3'; 5' end at nt -976) for D4-Δ, F-973d (5'-GGGGCAAGGCAAGGCAGCAGGCGCT-3'; 5' end at nt -973) and R-967d (5'-CACCTCCCTCCGGGCTCCTGGCCCC-3'; 5' end at nt -967) for D5-Δ, and F-940d (5'-AGTTTCCCTCCTGGACCGGTTCGAGT-3'; 5' end at nt -940) and R-920d (5'-CCCAGCGCC-TGCTGCCTTGCCCTTGC-3'; 5' end at nt -920) for D3-Δ.

2.4. Cell culture and transfection

NB1 neuroblastoma cells were purchased from Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium and RPMI1640 (1:1) supplemented with 10% FBS. Cells were grown in a 25-cm² flask and passaged to 60–70% confluence (1–3 × 10⁵ cells/well) in a 24-well plate 1 day before transfection. Transfection was performed using LipofectAMINE2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 μg of plasmid DNA (reporter/internal reporter=10:1) and 3 μl of LipofectAMINE2000 were mixed in 100 μl of OPTI-MEM (Invitrogen). After 20 min of incubation, 500 μl of OPTI-MEM was added to individual wells of the 24-well plates, and LipofectAMINE2000/plasmid mixture was then added to each well containing cells. After incubation in a CO₂ incubator at 37 °C for 4 h, the medium was changed to Dulbecco's modified Eagle's medium and RPMI1640 (1:1) supplemented with 10% FBS. Incubation of transfected cells was continued in a CO₂ incubator at 37 °C for 48–72 h.

2.5. Luciferase assay

Transcriptional assay was performed using a PicaGene Dual SeaPansy kit (Toyo Ink). Transfected cells were washed with PBS and incubated in 500 μl of cell lysis buffer for 15 min at room temperature with shaking. After 100 μl of

luciferase assay reagent was added to 100 μl of cell lysate, luciferase assay was performed using Lumat LB 9507 (EG and G Berthold). The vectors pGL3-basic and pGL-control (Promega) were used as negative and positive controls, respectively. The latter contained the SV40 promoter.

3. Results

3.1. Genomic structure of *KCNVI*

A partial cDNA sequence of *KCNVI* has previously been reported (Hugnot et al., 1996). However, we could not detect promoter-like sequences in the 5' upstream region of prior exon 1 when we compared the genomic BAC clone sequence (accession No. AC027451) with the cDNA sequence (accession No. AF167082). A homology search of human *KCNVI* cDNA sequences using the dbEST database detected an EST clone, AW163488, that contained an extra 5' sequence. Sequence comparison between the EST clone AW163488 and the BAC clone AC027451 revealed that AW163488 encoded a novel 5' exonic sequence and therefore the *KCNVI* gene included at least four exons (Fig. 1). To determine the transcription start site, we conducted an RNA protection assay and detected multiple potential transcription start sites, all within the new exon 1 sequence (Fig. 2). Inspection of the 5' upstream genomic sequence through the TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC>) and TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) (Wingender et al., 2000) databases revealed no TATA or CAAT boxes in the promoter region of *KCNVI*, consistent with the existence of multiple transcription start sites. Instead, three Sp1 and one Ap4 elements were identified in the upstream region of the newly detected exon 1 (Fig. 3). GC-rich boxes were also scattered, indicating that *KCNVI* includes an Sp1-driven promoter without TATA or CAAT. Data on the genomic organization of *KCNVI* generated by this study has been deposited in GenBank with the accession No. AB105051.

Analysis of the 3' untranslated region (UTR) revealed two different EST sequences with different 3' ends. One EST, T89084, ends at nt 2585 with a preceding AUUAAA sequence as a poly(A) signal. The other EST, T07452, ends at nt 2866 with AAUAAA (Fig. 1). These results suggest that *KCNVI* undergoes alternative poly(A) addition.

3.2. Luciferase assay of 5'- to -3' or 3'- to -5' deletion mutants

To identify the core promoter region of *KCNVI*, we prepared a series of 5'- to -3' and 3'- to -5' deletion constructs that were fused to the firefly luciferase plasmid, pGL3-basic (Fig. 4). These deletion constructs were transfected into NB1 neuroblastoma cells expressing endogenous *KCNVI*. The pRL-TK vector containing cDNA encoding *Renilla* (sea pansy) luciferase was used as an internal control

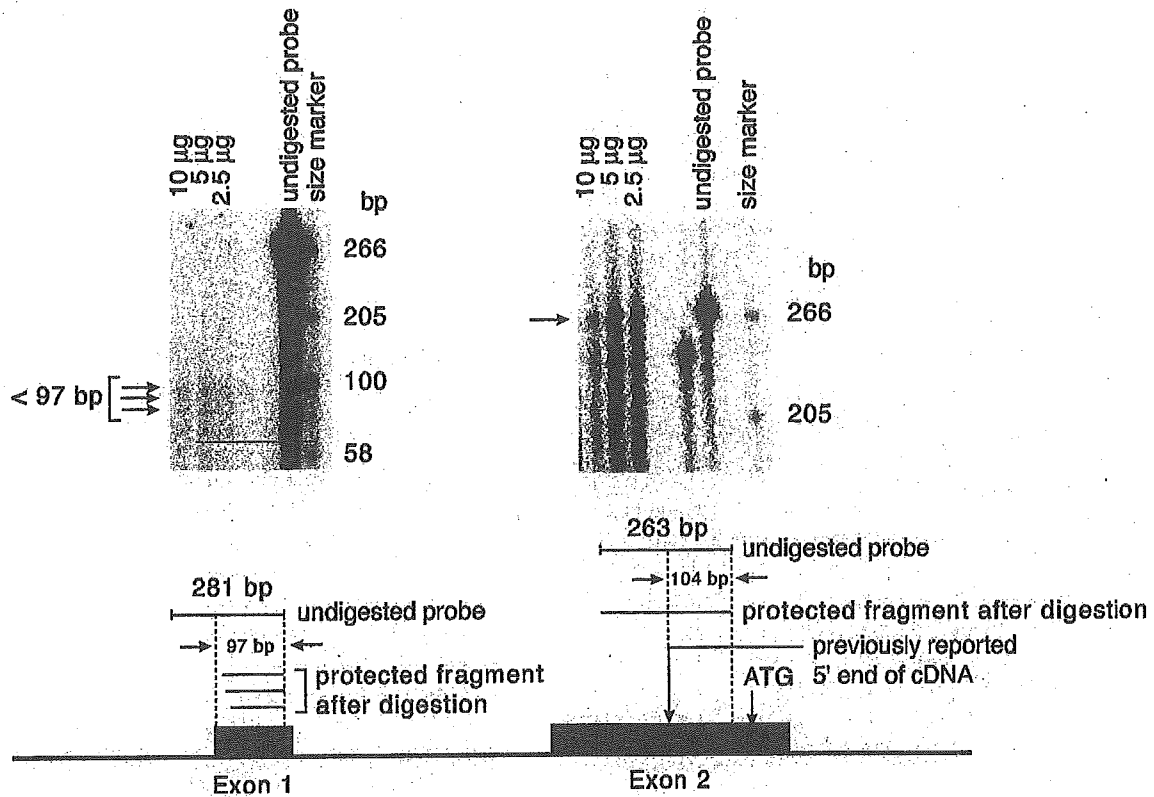


Fig. 2. Results of RNase protection assay. Antisense RNA probes specific for exon 1 (281 bp, left panel) and exon 2 (263 bp, right panel) were hybridized using 2.5, 5 or 10 μg of total RNA from NB1 cells, and were separated on 5% polyacrylamide–8 M urea gels after digestion. The exon 1 probe displayed three major protected bands, all slightly less than the size (97 bp) deduced from the EST sequence (AW163488) (left panel). The exon 2 probe displayed one major protected band, the same size as the undigested probe (right panel). The previously reported 5' end of the cDNA is based on the sequence of accession No. AF167082.

reporter. Transcriptional activity was expressed relative to the internal control. Sequential deletion of 5' sequences up to nt –1041 exerted no significant effect on transcriptional activity, but deletion of the 5' sequence to nt –949 resulted in dramatic reduction of promoter activity (Fig. 3). Sequential deletion of 3' sequences beyond nt –911 likewise substantially reduced transcriptional ability compared with the –1350/–911 and –1350/–873 constructs (Fig. 4). These results demonstrate that the core promoter region resides within the genomic sequence spanning nt –1041 to –911. This region contains three Sp1 and one Ap4 box consensus sequences (Fig. 3).

3.3. Luciferase assay of randomly mutated promoters

To determine the essential elements in the core promoter region of *KCNV1*, random mutagenesis was performed using PCR-based techniques (Svetlov and Cooper, 1998; Xu et al., 1999). Taq DNA polymerase is known to exhibit high intrinsic error rates when Mn^{2+} -containing buffer is used. We analyzed 22 amplicons generated in Mn^{2+} -containing buffer. Of these, 10 clonal sequences (RM1–RM10 in Fig. 5) displayed reduced transcriptional activity. On average, four mutations per clone were introduced. In

the 10 clones, some mutated sites were excluded as candidates for essential promoter elements, as other clones with identical mutations displayed no transcriptional changes. These observations suggested that mutations in six different loci (D1–D6 in Fig. 5) might possess functional roles. Three of the six loci, D4, D5 and D6, overlapped with Sp1 motifs, indicating the importance of Sp1 consensus sequences as promoter elements. The D1 locus was outside the core region (Fig. 5) but was considered for further analysis, as the RM4 and RM6 clones with mutations in this locus exhibited drastic reduction of luciferase activity (data not shown). The D3 stretch was the longest (19 bp) in which the Ap4 motif was embedded. The D2 locus sequence (TCAG) did not show any match with known promoter consensus, but the sequence comprising the D2 stretch and the 5' next C base (CTCAG) was also seen in the D3 stretch (Fig. 5), suggesting that this sequence may play a role in the transcriptional regulation of *KCNV1*.

3.4. Luciferase assay of internal deletion mutants

To determine whether the D1–D6 sequences can act as essential elements for promoter activity, deletion mutants

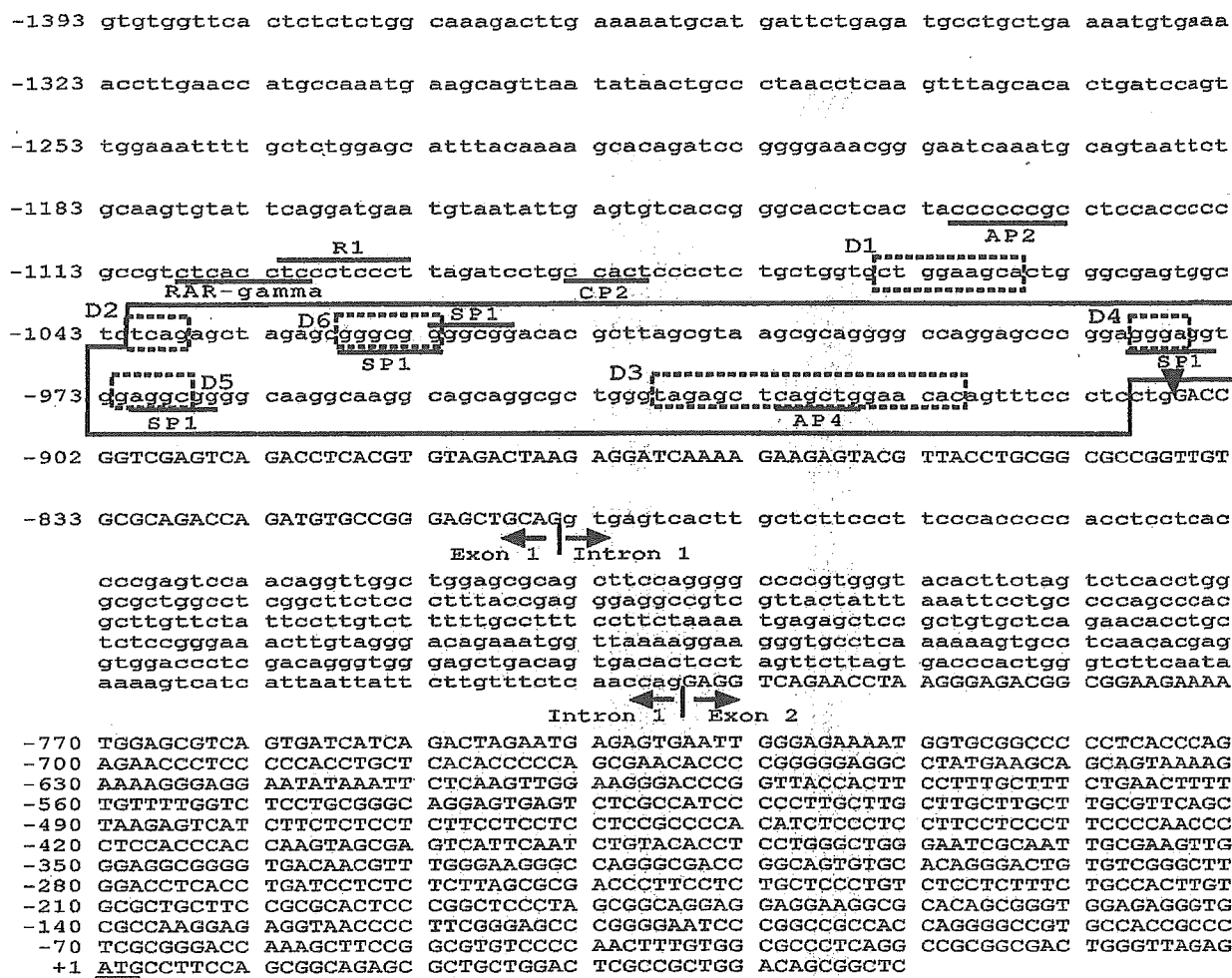


Fig. 3. Promoter sequence of the *KCNV1* gene. The boxed region is the core promoter region of the *KCNV1* gene. Consensus motifs are underlined. Hatched boxes (D1 to D6) show sequence elements analyzed in luciferase assay by preparing deletion constructs (see Figs. 4 and 5). Arrowhead indicates putative transcription start site.

lacking each of the stretches from D1 to D6 were made and examined. All constructs except for D1- Δ (Δ -1065/-1057) displayed $\leq 50\%$ of the activity of the normal

core promoter sequence (-1350/-873) (Fig. 6). As the D1- Δ construct retained the same level of activity as the core promoter, the D1 stretch may not be important for

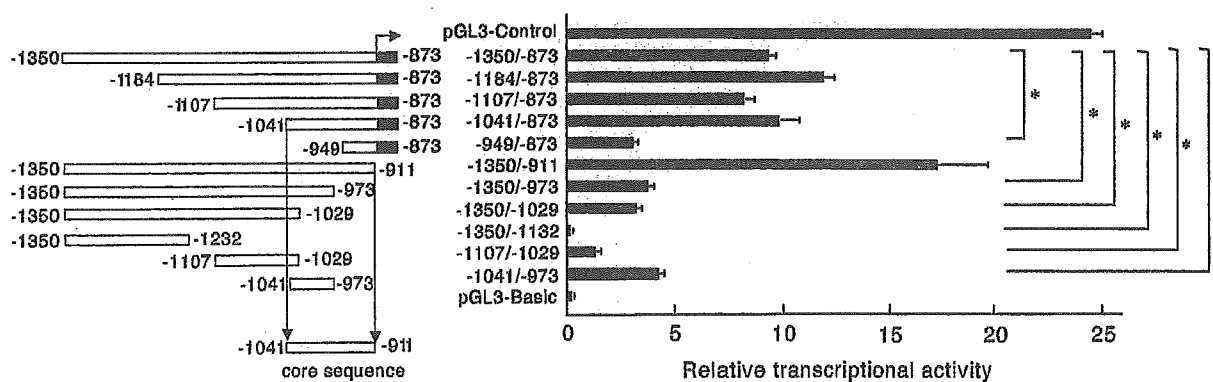


Fig. 4. Results of luciferase assay using 5' to 3' or 3' to 5' deletion mutants. Diagram of deletion mutants is shown at left. Open boxes indicate untranscribed sequences and closed boxes transcribed sequences. Arrow indicates the most 5' putative transcription start site. Values on the right panel represent mean \pm SE of at least two independent transfections, each with triplicate determinations. Luciferase activities are normalized to that of internal control, pRL-TK (see text).

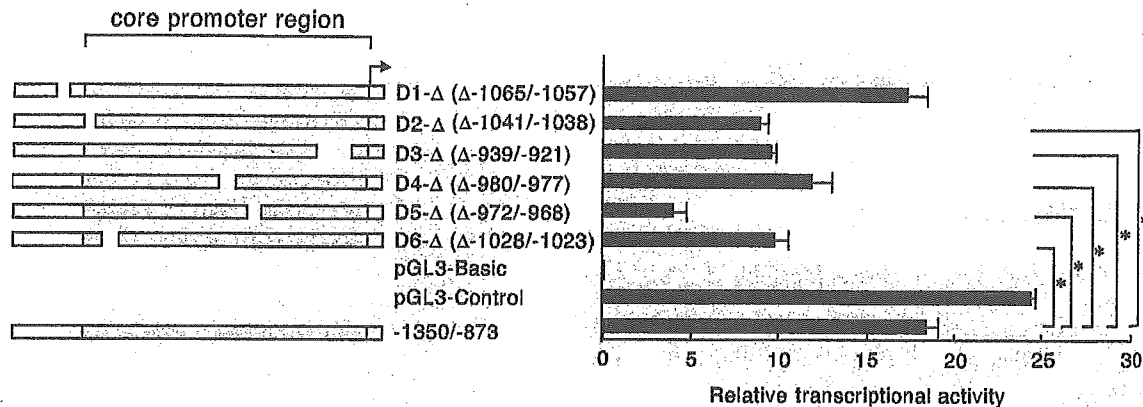


Fig. 6. Results of Luciferase assay using internal deletion mutants. Diagrams of D1 to D6 deletion mutants are shown at left. Closed boxes indicate core promoter region determined by analyses of 5' to -3' or 3' to -5' deletion mutants. Arrow indicates the most 5' transcription start site. Values on the right represent mean \pm SE of at least two independent transfections, each with triplicate determinations. Luciferase activities are normalized to that of internal control, pRL-TK (see text). * $P < 0.01$ by Tukey–Kramer multiple comparison test.

transcription. The reduction in activity induced by the D4- Δ ($\Delta - 980/-977$), D5- Δ ($\Delta - 972/-968$) and D6- Δ ($\Delta - 1028/-1023$) constructs suggests that the three Sp1 motifs are functional. Furthermore, the fact that the D5- Δ construct resulted in a larger decrease in transcriptional activity than the D4- Δ and D6- Δ constructs suggests that the most 3' Sp1 consensus exerts a larger effect than the other two. Although reduction of promoter activity provoked by D3- Δ ($\Delta - 939/-921$) might be due to the deletion of the Ap4 element, the transcriptional decrease might also be attributable to disruption of the (T)CAG sequence embedded in D3, as the D2- Δ ($\Delta - 1041/-1038$) that lacked the same sequence displayed decreased promoter activity.

4. Discussion

Since human genome sequences have started to become available, numerous unknown genes have been uncovered using *in silico* analysis. However, experimental evidence has largely remained lacking, particularly for the identification of 5' end exons and promoters. *KCNV1* was previously reported to comprise three exons, but the present study demonstrated the existence of both a novel 5' exon and the real promoter sequence in the upstream region of that exon. We have also shown that a random mutagenesis approach based on PCR in Mn^{2+} -containing buffer is useful for introducing mutations and determining important sequence elements in promoter analysis.

Two novel potential promoter elements were detected in this study: the short element [(T)CAG of D2] and the long element (TAGAGCTCAGCTGGAACAC of D3). The long element contains the Ap4-binding motif (CTCAGCTG). Interestingly, this Ap4 motif also includes the short element. However, the Ap4 does not seem to bind the genomic region surrounding the D1, so the short element is predicted to

represent a new as-yet unknown consensus motif. Further promoter analyses, including gel shift assay, are warranted to elucidate the precise molecular mechanisms endowed by the short and long elements.

The promoter for *KCNV1* is characterized by a lack of both TATA and CAAT-boxes, and by the existence of GC-rich regions with multiple Sp1 consensus elements, as commonly observed in house-keeping genes. These features are also shared by other K^+ channel genes, including the *Kv1.4*, *Kv1.5* and *Kv3.1* genes. Expressions of these K^+ channel genes are, however, tissue-specific rather than ubiquitous. Gan et al. (1999) demonstrated that the *Kv3.1* gene displays a strong negatively acting element in the 5' upstream region and a weak cell type-specific enhancer in the proximal region of the promoter. Mori et al. (1995) reported a silencer element in the promoter region of the *Kv1.5* gene. These findings strongly suggest that cell type-specific enhancer/silencer elements may exist in the promoter of *KCNV1*, which is predominantly expressed in the brain (Sano et al., 2002). Identification of these regulatory elements in *KCNV1* must be left to future studies.

Inspection of the 3' UTR of *KCNV1* detected two different poly(A) sites. More than 100 genes exhibit alternative poly(A) sites (Edwards-Gilbert et al., 1997). Selection of poly(A) sites is involved in fine-tuning of gene expressions via mRNA stability, tissue-specific expression and so on. Further analysis of *KCNV1* regulatory elements is therefore important.

Mikami et al. (1999) have mapped the BAFME susceptibility locus to 8q23-24. *KCNV1* represents a compelling candidate in terms of both position and function. Information on the new 5' exon, promoter sequence and alternative poly(A) sites revealed in this study could prove helpful in developing mutation screening for this gene in epileptic disease. Moreover, given that locus control regions located distant to specific genes could regulate expression (Li et al., 2002), further analysis of regulatory

sequences and a wide-range mutation search of *KCNV1* appear warranted to determine the role of this gene in human pathophysiology.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Joanne Meerabux for her helpful comments. This project was partially supported by grants from the Epilepsy Research Foundation, Japan, and the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (1267096).

References

- Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., Steinlein, O.K., 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403–406.
- Browne, D.L., Gancher, S.T., Nutt, J.G., Brunt, E.R., Smith, E.A., Kramer, P., Litt, M., 1994. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNA1*. *Nat. Genet.* 8, 136–140.
- Charlier, C., Singh, N.A., Ryan, S.G., Lewis, T.B., Reus, B.E., Leach, R.J., Leppert, M., 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat. Genet.* 18, 53–55.
- Costa, G.L., Bauer, J.C., McGowan, B., Angert, M., Weiner, M.P., 1996. Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. *Methods Mol. Biol.* 57, 239–248.
- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K.L., Milcarek, C., 1997. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res.* 25, 2547–2561.
- Gan, L., Hahn, S.J., Kaczmarek, L.K., 1999. Cell type-specific expression of the Kv3.1 gene is mediated by a negative element in the 5' untranslated region of the Kv3.1 promoter. *J. Neurochem.* 73, 1350–1362.
- Hugnot, J.P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Weille, J., Heurteaux, C., Mattei, M.G., Lazdunski, M., 1996. Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *EMBO J.* 15, 3322–3331.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 91–123.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., Stamatoyannopoulos, G., 2002. Locus control regions. *Blood* 100, 3077–3086.
- Mikami, M., Yasuda, T., Terao, A., Nakamura, M., Ueno, S., Tanabe, H., Tanaka, T., Onuma, T., Goto, Y., Kaneko, S., Sano, A., 1999. Localization of a gene for benign adult familial myoclonic epilepsy to chromosome 8q23.3–q24.1. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 745–751.
- Mori, Y., Folco, E., Koren, G., 1995. GH3 cell-specific expression of Kv1.5 gene. Regulation by a silencer containing a dinucleotide repetitive element. *J. Biol. Chem.* 270, 27788–27796.
- Salinas, M., de Weille, J., Guillemare, E., Lazdunski, M., Hugnot, J.P., 1997. Modes of regulation of shab K⁺ channel activity by the Kv8.1 subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 8774–8780.
- Sano, A., Mikami, M., Nakamura, M., Ueno, S., Tanabe, H., Kaneko, S., 2002. Positional candidate approach for the gene responsible for benign adult familial myoclonic epilepsy. *Epilepsia* 43 (Suppl. 9), 26–31.
- Singh, N.A., et al., 1998. A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat. Genet.* 18, 25–29.
- Svetlov, V., Cooper, T.G., 1998. Efficient PCR-based random mutagenesis of sub-genic (100 bp) DNA fragments. *Yeast* 14, 89–91.
- Wang, Q., et al., 1996. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 12, 17–23.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I., Schacherer, F., 2000. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 28, 316–319.
- Xu, H., Petersen, E.I., Petersen, S.B., el-Gewely, M.R., 1999. Random mutagenesis libraries: optimization and simplification by PCR. *Bio-Techniques* 27, 1102–1104.