

変性反応を 95° C で 30 秒間、アニーリング反応を 60° C で 30 秒間、伸長反応を 72° C で 1 分間という過程を 40 回繰り返した後に、72° C で 5 分間保温反応させた。1160-bp の断片は、1 $\mu$ M の各プライマー、0.2mM の dNTP、50ng の鋳型 DNA、0.025U/ $\mu$ l のケーオーディー・ダッシュ・ポリメラーゼ(東洋紡、日本)、ケーオーディー・ダッシュ 1xPCR バッファーおよび DMSO を 10% 含む 20 $\mu$ l の反応溶液で増幅された。反応温度条件は、96° C で 1 分間のあとに、変性反応を 95° C で 30 秒間、アニーリング反応を 63° C で 2 秒間、伸長反応を 74° C で 30 秒間の過程を 33 回繰り返した後に、74° C で 5 分間保温反応させた。

次に、上記二つの DNA 断片を 26 多型の遺伝子型決定のためにシーケンシング法に用いた。まず、鋳型の断片は 2 単位のシュリンプ・アルカリ・フォスファターゼ(ロッッシュ、アメリカ合衆国)と 2 単位のエクソヌクレアーゼ I(ニューイングランドバイオラボ、アメリカ合衆国)により 37°C で 1 時間反応処理された。2 つの酵素活性は 80°C で 15 分間の熱処理により不活化された。サイクル・シーケンシング反応はビッグ・ダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・レディ・リアクション・キット・バージョン・2.0(アプライド・バイオシステムズ、アメリカ合衆国)を使い、説明書に従って、実行した。鋳型断片とプライマー(表 1 および図 1)に合わせて、プロトコールに若干の変更を加えた。伸長反応産物をマルチスクリーン 96-ウェル・フィルター・プレート(ミリポア、アメリカ合衆国)で精製した。サンプルの電気泳動およびデータ解析はエービーアイ・プリ

ズム 3100 および 3700DNA 分析器(アプライド・バイオシステムズ、アメリカ合衆国)を用いた。すでに報告されている(Mitsuyasu et al., 2001)ように位置-947 番目から-156 番目までの 792-bp の断片をシーケンシングの鋳型として利用した 133 名については、その領域に関しては重複して遺伝子型を得た。この 792-bp 断片には、12 個の多型(-713C/T、-616G/C、-615A/G、-603del/T、-600G/C、-598G/T、-597(G)2-5、-521T/C、-376C/T、-364A/G、-291C/T および-234C/A)(表 1 および図 1)が含まれており、1160-bp の断片から得られた結果の確認のために使用された。

### 2. 3. 集団遺伝学解析

2 種類の多型性(以下バイアレリックとする)を示す多型のハーディ・ワインバーグ平衡はカイ二乗検定によって評価した。相(phase)が未決定の遺伝子型データについて LD の係数である  $D'$  および  $r^2$  をハプロビュー 3.2 ソフトウェア(以下 Haploview とする)(Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005)を用いて計算した。LD の計算は、バイアレリックマーカーのうち頻度が少ない(以下マイナーとする)アレル頻度が 0.01 以上であった 14 多型(120-bp TR、-1217G/del、-1106T/C、-906T/C、-809G/A、-768G/A、-713C/T、-616G/C、-603del/T、-600G/C、-521T/C、-376C/T、-291C/T および 12-bp 反復)および複数の多型性(マルチアレリック)を示す 3 多型(-930C/G/T、-597(G)2-5 および 48-bp VNTR)の合計 17 多型についておこなった。Haploview はバイアレリックのデータのみしか扱えないため、我々は、-930C/G/T についてはアレ

ル T をもつ個人を除外し、また、-597(G)2-5 についてはアレル(G)2 およびアレル(G)5 をもつ個人を除外した。同様の理由により、48-bp VNTR については、4/4、2/4、2/2 の遺伝子型をもつ個人のみを計算に含めた。LD ブロックは Gabriel ら (Gabriel et al., 2002) が記述した信頼区間法により決定した。Haploview の LD 解析はこのソフトウェアの信頼区間法を選択することにより実行した。

DRD4 遺伝子の 4.4 kb の領域内の LD ブロックを調査して、Haploview 内のタガー・ソフトウェア (以下 Tagger とする) を使ってタグ SNP (ハプロタイプ・タグ・マーカ) を選択した。Tagger によって、 $r^2$  値が 0.8 以上になるマーカのみが LD ブロックの一部として選ばれた。

Tagger で選択されたタグ・マーカはフェイズ・バージョン 2.1 ソフトウェア (以下 PHASE とする) (Stephens & Donnelly, 2003; Stephens, Smith, & Donnelly, 2001) によるハプロタイプ推定に使用された。推定されたハプロタイプの分布は (1) 統合失調症患者全員と対照者群全員、(2) 女性統合失調症群と女性対照者群、(3) 男性統合失調症群と男性対照者群のあいだでそれぞれカイ二乗検定により比較した。

我々は、さらに、ハプロタイプ・トレンド・レグレッション・プログラム (以下 HTR と

いう ) (<http://statgen.ncsu.edu/zaykin/htr.html>) (Zaykin et al., 2002) を用いてスライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析を実施した。このプログラムはハプロタイプ頻度を推定して、患者群と対照者群

間でハプロタイプの相関解析をスライディング・ウインドウの方法で実施する。本研究では、ウインドウ幅を 2 マーカから 6 マーカまでと設定した。

#### 2. 4. 統計学的手法

17 個の多型マーカの遺伝子型頻度を

(1) 統合失調症患者群全員と対照者群全員、(2) 女性統合失調症患者群と女性対照者群、(3) 男性統合失調症患者群と男性対照者群においてカイ二乗検定によって比較した。分割表においては、期待値が 5 以下のセルがある場合、フィッシャーの正確確率検定を用いた。すべての統計検定の有意水準 (アルファ) を両側検定の 0.05 とした。オッズ比 (以下 OR とする) を 95% 信頼区間 (以下 CI とする) とともに計算した。

単変量解析の次に、性別、年齢、および 17 個の多型マーカを独立変数として、ステップワイズ・ロジスティック回帰分析を実施した。従属変数は統合失調症罹患を 1 とし、対照を 0 とした。

多重仮説検定の補正のために、ボンフェローニ変法を用いた。多重検定が行われているので、通常のボンフェローニ法によれば、アルファ水準 0.05 は検定の数で割った数字となる。しかし、いくつかの多型のあいだには LD が存在するので、この補正はあきらかに厳格すぎる。それゆえ、我々はボンフェローニ変法 (Nyholt, 2004) を使用した。この方法に従うと、独立したマーカの有効数が算出されて、ボンフェローニの補正での分母として利用される。ボンフェローニ法に対する別の補正法 (Li & Ji, 2005) も、多型の有効数を計算するために

使用された。

統計学的な計算は、ビーエムディーピー統計ソフトウェア (BMDP 統計ソフトウェア、アメリカ合衆国) およびエスピーエスエス 13.0 ジェイ (SPSS ジャパン、日本) を用いた。2×2 以外の分割表の場合は、フィッシャー正確検定を計算するためにスタットイグザクト (サイテル・ソフトウェア、アメリカ合衆国) を利用した。

我々のサンプル・サイズは、ジー\*パワー・ソフトウェア (Erdfelder, Faul, & Buchner, 1996) による計算では、有意水準を 0.05、効果量を  $W=0.10$  (小) としたとき、事後の検出力は、0.848 であった。

## C. 研究結果

### 結果

#### 3. 1. 多型の同定および遺伝子型の決定

図 1 は DRD4 遺伝子の遺伝学的構造および報告された多型の位置を示している (表 2 参照)。我々は約 4.9 キロ bp (以下 kbp とする) の範囲に含まれる 28SNP および 6 個の反復・欠失多型を含む 34 多型に関する情報を収集した。ディーブスニップ (以下 dbSNP とする) (Sherry, Ward, & Sirotkin, 1999)、ジェイスニップ (JSNP) (Haga, Yamada, Ohnishi, Nakamura, & Tanaka, 2002; Hirakawa et al., 2002)、他の文献および我々の実験からデータを得た。図 1 に示すように、エクソン 1 の 3' 側末端から 1.5kbp から始まる約 1.8kbp の領域には 22 個の SNP を含む合計 27 多型が存在する。この多型の分布密度は、ゲノム全体での SNP の平均分布密度 ( $0.827\text{SNPs/kbp}$  (dbSNP) あるいは

$1.91\text{kbp/SNP}$  (Sachidanandam et al., 2001)) と比較すると  $12.2\text{SNP/kbp}$  と非常に密度が高い。我々が本研究において遺伝子型を決定した DRD4 遺伝子上の 27 多型の要約を表 2 に示した。これらの多型には 4 個の新規の SNP (-1102G/A、-930C/G/T、-598G/T および-234C/A) および一塩基反復多型 (-597(G)2-5) が含まれる。-597(G)2-5 多型は、従来データベース上で -602G/del あるいは-602(G)8-9 と報告されていた (Mitsuyasu et al., 2001; Mitsuyasu et al., 1999; Okuyama et al., 2000)。本実験において-602(G)7 アレルと-602(G)10 アレルが同定された。さらに、-598G/T という新規の SNP が-602(G)7-10 の中に同定された。そのため、-602(G)8-9 多型はグアニン・ヌクレオチドが 2 回から 5 回まで反復する多型 (-597(G)2-5)、-598G/T、およびその上流側の変異のない 4 つのグアニン・ヌクレオチド配列の組み合わせとみられる。それゆえ我々は-602G/del あるいは-602(G)8-9 のかわりに、-597(G)2-5 という表記を提案する。-598G/T は dbSNP データベースに -598G/A/del として登録されているが、我々の研究では-598G と-598T 遺伝子型だけ示された。このため、我々はこの SNP を新規として分類した。

本研究においては各多型間の関連性を理解するために、新規の 4 つの SNP を含めたこれらの多型に、従来からよく研究されている 120-bp TR および 48-bp VNTR を追加し、解析を行った。120-bp TR はエクソン 1 の 5' 末端から 5' 側上流 0.8kbp に位置している。48-bp VNTR はエクソン 3 上に位置している。ハプロタイプ解析によると、

48-bp VNTR の 4 回繰り返しアレルは近傍の 2 つの SNP (IVS3(+43)A/G と IVS3(-32)C/G) と強く連鎖していることが報告されている(Ding et al., 2002) ことより、我々は本遺伝子における 3' 側領域の多型の代表マーカーとして 48-bp VNTR 多型を選択した。

27 多型について遺伝子型を決定した(エクソン 1 の 13bp 欠失が技術的問題のため解析できなかった)。21 個の SNP はバイアレリックの SNP(置換 19、挿入・欠失 2)であり、1 個の SNP が 3 種類の多型を示す(トリアレリック) 多型であった。5 個の SNP (-1123C/T、-615A/G、-364A/G、-11C/T および+31G/C) は今回の対象では多型性は認められなかった(モノモルフィック)。21bp 欠失に関しても同定できなかった。4 つのマーカー(-1102G/A、-598G/T、-234C/A および-128G/T) は対象群内でマイナー・アレルが 1 つのみ(シングルトン) しか観察されなかった。これらの多型は疾患の相関の解析には用いなかった。48-bp VNTR の 7 回反復は日本人集団においては非常に稀であった。4/7 のヘテロ接合体はわずかに 4 名のみ観察されただけだった。バイアレリック多型の遺伝子型の分布はハーディ・ワインバーグ平衡に一致していた(データは示されていない)。

### 3. 2. 統合失調症との相関

統合失調症の発症の危険に対する多型の影響を評価するために、17 多型について単変量および多変量解析を行った。とくに、既知の 12SNP (-1217G/del、-1106T/C、-906T/C、-809G/A、-768G/A、-713C/T、-616G/C、-603del/T、-600G/C、-521T/C、

-376C/T および-291C/T) および 3 つの反復多型(120-bp TR、12-bp 反復および 48-bp VNTR) および新規の 2 多型 (-930C/G/T および-597(G)<sup>2-5</sup>) を解析した。単変量解析の結果を表 2 に示す。

統合失調症患者群と対照者群間の比較においては、多重仮説検定の補正前でさえも統計学的に有意差を示す多型は認められなかった(表 2)。女性の統合失調症患者と女性対照者を比較した場合、一多重仮説検定の補正前においては、-713C/T( $p=0.049$ ) と -521T/C( $p=0.046$ 、表 2)において統計学的な有意差を認めた。-713C/T の場合、マイナー・アレル頻度が極めて低かった(女性統合失調症患者では 0.02、女性対照者群では 0)。統合失調症患者群では 4 名のヘテロ接合体がみられた(マイナー・アレルのホモ接合体はみられなかった)のに対して、女性対照者群ではヘテロ接合体は 0 名であった。女性対照者群よりも女性統合失調症患者においてアレル-521C の頻度が高かった( $p=0.034$ 、OR:1.58、95%CI: 1.06-2.37)。遺伝子型 T/T を基準とした場合に各遺伝子型の OR を比較すると、T/C の OR は 2.11 (95%CI: 1.10-4.07) であり、C/C の OR は 2.33 (95%CI: 1.01-5.38) であった。もし、-521C アレルが優性遺伝の形式の場合、遺伝子型 C/C および T/C の女性群の OR は、遺伝子型 T/T をもつ女性群に対して 2.17 (95%CI: 1.17-4.04、 $p=0.021$ ) となる。しかし、ボンフェローニ補正あるいは LD を考慮した緩やかな修正ボンフェローニ補正(Li & Ji, 2005; Nyholt, 2004)を適用した場合、これらの結果は有意ではなくなった。

男性群においては、多重検定の補正以前でも、統合失調症患者群と対照者群間に有意差は認められなかった(表2)。同様に、ステップワイズ・ロジスティック回帰解析では、多型と統合失調症のあいだに有意な相関は認められなかった。

統合失調症の発症に対する個々の多型の影響を同定できなかつたため、我々は次にDRD4のハプロタイプが統合失調症の発症危険性に影響するかを検討した。ハプロタイプ推定のソフトウェアを使用する前に、他の多型と強いLDにある多型を最初に除去しておくことが有効である。したがって、我々は17多型の全ての組み合わせにおいてLD係数 $D'$ と相関係数 $r^2$ を決定した(図2および表3)。

国際ハップマップ・プロジェクトのDRD4のデータには、日本人で多型性を示すわずか5個のSNP(rs3758653(5'側上流領域)、rs3889692(エクソン3)、rs11246226、rs936465、rs4331145(3'側下流領域))しか含まれていない。これらのSNPをHaploviewで解析した。下流側の3SNPを含む1つのLDブロックがつけられただけだった。ハップマップの残りの2SNP(rs3758653(本研究では-906T/C)およびrs3889692(本研究では遺伝子型は決定していない))と他のSNPは相関性がみられなかった( $r^2$ 値は0.024-0.061)。この結果はDRD4遺伝子全体にわたってLDが低いことを示している。

我々は、DRD4遺伝子の4.4kbpの領域のLD解析と、HaploviewのTaggarによるタグ・マーカー選択のために、我々の遺伝子型のデータを使用した。2つの小さなLDブロックが同定された。1つは-1217G/delと

-1106T/Cとの間( $D' = 0.98$ ,  $r^2 = 0.59$ )にみられ、もう1つは-291C/Tと12bp反復多型の間( $D' = 0.96$ ,  $r^2 = 0.86$ )にみられた。他の多型では非常に弱い相関しかみられなかった( $r^2 < 0.8$ )。しかし、-376C/Tと48-bp VNTRは比較的高い相関係数を示した( $r^2 = 0.78$ )。そのため、DRD4遺伝子でLDが低いという結果として、我々は独立した多型の数を17から16へ減らすことしかできなかった。

48-bp VNTR多型は-376C/Tと強い相関を示したが( $D' = 0.91$ ,  $r^2 = 0.78$ )、120-bp TRから12-bp欠失までの領域の他の多型とは高い相関 $r^2$ 値は示さなかった(表3)。120-bp TRと-906T/Cとのあいだの $D'$ 値( $D' = 0.91$ )および120-bp TRと-291C/Tとのあいだの $D'$ 値( $D' = 0.90$ )は0.90以上であった。しかし、それぞれに対応する $r^2$ 値が0.80未満であり、これらの多型は既にセクション2.材料と方法において記述したように多型を除去する我々の基準に適合しなかったため、除外できなかった。

16マーカーを用いると、PHASEでは、合計136種類のハプロタイプが推定された。我々はアレル頻度が0.01以上のハプロタイプ20種類の分布を、(1)全対象、(2)女性群、および(3)男性群について統合失調症群と対照群間で比較した。カイ二乗検定によりハプロタイプ頻度を解析した場合、統計学的な有意差はみられなかった。16のタグ・マーカーを用いたウィンドウ幅が2から6までのスライディング・ウィンドウ解析では、多重検定の補正前であっても、統合失調症患者群と対照群間に統計学的な有意差は示されなかった。図3はス

ライディング・ウインドウの幅が2と3の場合の解析結果を示している(図3)。

#### D. 考察

DRD4 遺伝子の遺伝学的構造、および統合失調症における潜在的な遺伝学的影響を明らかにするために、我々は、DRD4 遺伝子上の4つの新規 SNP を含めた27多型について216名の日本人統合失調症患者および243名の健常対照者の遺伝子型を決定した。

驚くべきことではないが、ヨーロッパ系あるいは他の集団と比較すると、日本人集団でのいくつかの多型はアレル頻度が異なることが分かった。たとえば、-615A/Gは白人では多型性を示すが、我々の研究ではモノモルフィックだった(Ronai et al., 2004)。-364A/G、-11C/T、+31G/C(Cichon et al., 1995)、および強迫性障害とパニック障害を示した一個人で報告された21bp欠失(Cichon et al., 1995)についても同様の現象が観察された。他の多型(-1102A、-930T、-713T、-598T、-597(G)2、-597(G)5、-234A および-128T)は、日本人集団では、ひじょうにアレル頻度が低かった(表2)。

統合失調症と DRD4 遺伝子多型の関連を評価するために、我々は、日本人統合失調症患者群と健常対照者群のあいだで相関解析を実施した。単変量解析では多重仮説検定の補正後は統計学的に有意なマーカーはみられなかった。

統合失調症において、-521T/C多型に関する相反する報告がある。オクヤマらは、この多型のTアレルではDRD4の転写の効率がCアレルと比べて40%低下したと報告

しており、さらに、日本人においてはこのマーカーが統合失調症と相関していると報告した(Okuyama et al., 1999)。しかし、中国人や白人など他の人種ではこれらの結果を再現する試みは成功しなかった(Ambrosio et al., 2004; Jonsson et al., 2001; Xing et al., 2003)。これらの結果から、統合失調症では遺伝学的な異質性が存在することが推測される。しかし、別の日本人集団についての-521T/Cに関する我々の否定的な所見から、オクヤマらの結果が第1種の過誤を反映しているという可能性が示唆される。

我々は、また、LD解析とハプロタイプ解析を実施した。しかし、SNPが高密度であるという点とLDが低いという点から見ると、DRD4 遺伝子領域は例外的な領域である。その結果として、ハプロタイプに基づく相関解析方法の検出力は、SNPに基づく方法と大きな差がない。DRD4 遺伝子領域には、2つのSNPのみを含むだけの2つのLDブロックが形成されるだけであった。その結果、ほとんどの多型は独立した変数として残った。これらの結果はDRD4の集団遺伝学的構造についての報告(Wang et al., 2004)と一致している。統合失調症のハプロタイプによる相関解析では統計学的な有意差はみられなかった。

今回の研究においては、いくつかの限界があることを心にとどめておくべきである。ひとつの問題は、対照者の集団が統合失調症患者と完全には適合されていない可能性である。男性の対照者の大多数は年齢が50歳の日本の自衛隊隊員である。この集団の特徴のいくつかは他の健常対照者集団とは異なるかもしれない。理想的には、

バランスのとれた対照集団の選択のために、また、遺伝学的な変数とともに統計学的モデルに包括するために、より詳細な社会経済的情報が収集されるべきである。統合失調症の発症における環境要因の影響という点からもまた、環境要因に関する情報も可能なかぎり収集することが重要である。

結論として、我々は、日本人集団において DRD4 遺伝子の多型の構造を詳細に報告した。LD 解析により 2 つの小さなブロックが明らかになった。もっとも注目すべき点は本遺伝子全領域にわたり LD が低かったことである。LD 解析により選択された 16 個のタグ・マーカーを用いたハプロタイプ解析では、統合失調症の発症危険性と相関しないことが明らかになった。ドーパミン情報伝達系における DRD4 の生物学的な役割や、48bp リピート多型と相関した機能的効果についての報告にも関わらず、本遺伝子が統合失調症の発症危険性に有意に寄与するということを否定する文献が増加しているが、本報告はこれらの文献の内容と同一のものである。

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N and Kanba N.: Genetic

Structure of the Dopamine Receptor D4 Gene (*DRD4*) and Lack of Association with Schizophrenia in Japanese Patients. J Psych. Res. 2006.

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)  
なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

図1 DRD4の多型の図解

DRD4 遺伝子は全長が約 3.9 k b p で、4 つのエクソンから構成される (黒色の四角はコーディング領域、白色の四角は非翻訳領域、斜線のある四角は複数の転写開始点を示す)。-1217 番目から+31 番目 (数字は開始コドン (ATG) の第 1 番目の塩基を 1 とした相対的な位置を示す) の領域が、本研究にて詳細に調査した領域である。合計 34 個の多型 (矢印) がデータベース (dbSNP ; Sherry et al., 1999、JSNP; Hirakawa et al., 2002)、文献 (PubMed)、および我々の実験データから収集された。34 個のうち 28 個の多型 (実線矢印) (4 個の新規多型 (アスタリスク) を含む) の遺伝子型を決定した。遺伝子型決定のために、5 つの DNA 断片 (太線) (長さが 549-bp、606-bp、1160-bp、792-bp、366-bp) が 5 つのプライマー対 (実線矢印) を使用して増幅され、示されたプライマー (矢頭) を使用して塩基配列を決定した (詳細は表 1 に示した)。白色矢頭の横の実線はそのプライマーで塩基配列を決定した領域およびその方向を示す。各断片上に存在する多型マーカーの正確な位置を縦方向の破線で示した。構造と各塩基の位置は AC021663 (GenBank) データベースの塩基配列に基づいた。

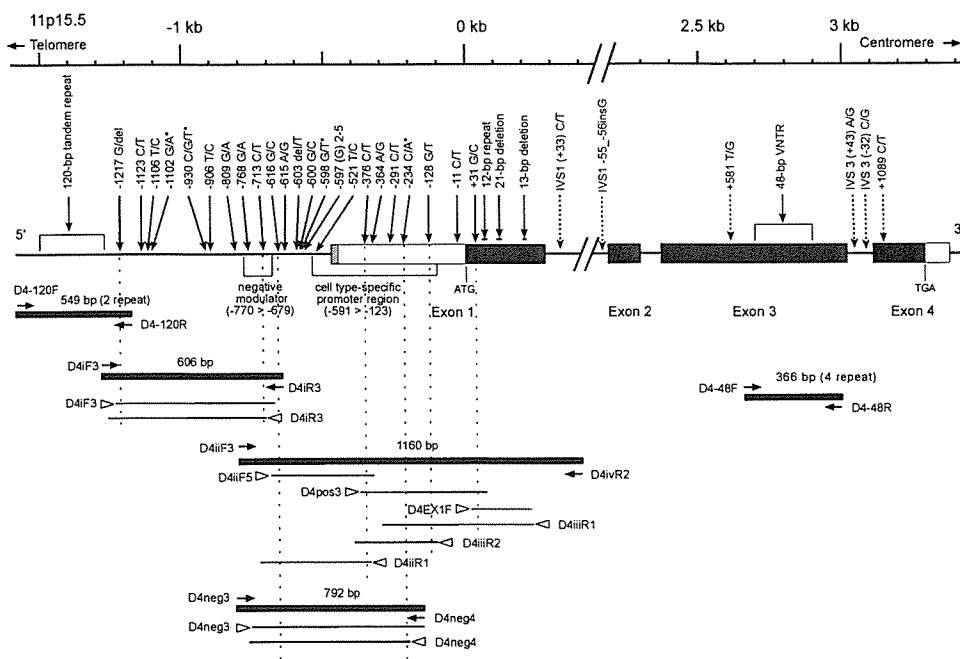




図2 DRD4 遺伝子の多型における LD の  $D'$  係数の図示

菱形の中の数字は各マーカー同士の  $D'$  値を示す。LD の表示は Haploview ソフトウェアによる。値のない菱形は完全な LD ( $D' = 1$ ) を示す。濃い灰色の菱形は強い LD を示す。薄い灰色の菱形は情報とならない多型同士であることを示す。白色の菱形は低い LD を示す。LD ブロックは Haploview のアルゴリズム (Gabriel et al., 2002) により決定した。



図3 DRD4 遺伝子のスライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析

X 軸は本研究で解析した各多型を示す。Y 軸は、各マーカーにおける、また、スライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析（ウインドウ幅 2 と 3）における $-\log_{10}(P \text{ 値})$ を示す。白丸は、各多型の単一マーカーの解析（単変量解析）の結果を表す。二つの黒い四角を結ぶ横線は 2 つのマーカーでのスライディング・ウインドウ解析の p 値を示す。三つの三角形を結ぶ破線は 3 つのマーカーでのスライディング・ウインドウ解析の p 値を示す。

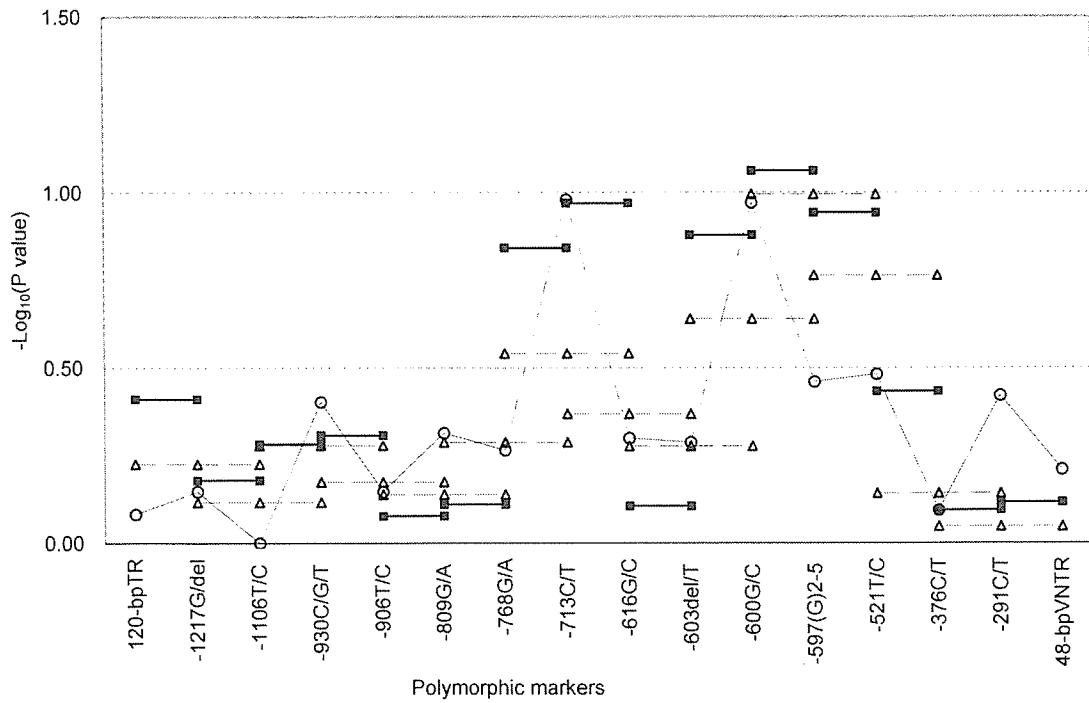


表 1 実験に使用したプライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	方向	位置 <sup>e</sup>		産物の長さ(bp)	使用目的
D4-120F <sup>a</sup>	GTTGTCTGTCTTTTCTCATTGTTTCCATTG	センス	-1726	-1697	} 429, 549	Amp <sup>f</sup>
D4-120R <sup>a</sup>	GAAGGAGCAGGCACCGTGAGC	アンチセンス	-1179	-1199		Amp
D4iF3	CACACCTGTCCCTGGTGACAGG	センス	-1256	-1236	} 606	Amp, Seq <sup>g</sup>
D4iR3	CCCACCCGTTGCACAGTTGATC	アンチセンス	-651	-672		Amp, Seq
D4iiF3	TACCTAGCTCACGGTCTTGGGC	センス	-765	-744	} 1160	Amp
D4ivR2	CTGGAAGCTCCGCACCAGAAAG	アンチセンス	395	374		Amp
D4iiF5	GCTGTCCGCCAGTTTCGGAG	センス	-706	-686		Seq
D4pos3 <sup>b</sup>	CTCAGGTCTTTCTGCGTCTGGC	センス	-472	-451		Seq
D4EX1F <sup>c</sup>	CGCCATGGGGAACCGCAG	センス	-4	14		Seq
D4iiiR1	GTGGCCACGCTCACGCACACG	アンチセンス	182	162		Seq
D4iiiR2	CGCTGAGCACCGCGGACAACG	アンチセンス	-17	-37		Seq
D4iiR1	TCGACGCCAGCGCCATCCTAC	アンチセンス	-346	-366		Seq
D4neg3 <sup>b</sup>	CAGGTCACAGGTCACCCCTCTT	センス	-947	-926	} 792	Amp, Seq
D4neg4 <sup>b</sup>	TTGCTCATCTTGAATTTTGC	アンチセンス	-156	-177		Amp, Seq
D4-48F <sup>d</sup>	AGGTGGCACGTCGCGCCAAGCTGCA	センス	2612	2636	} 174+(48xN <sup>h</sup> )	Amp
D4-48R <sup>d</sup>	TCTGCGGTGGAGTCTGGGGTGGGAG	アンチセンス	2929	2905		Amp

<sup>a</sup>Seaman et al. (1999).

<sup>b</sup>Mitsuyasu et al. (1999, 2001).

<sup>c</sup>Catalano et al. (1993).

<sup>d</sup>Nanko et al. (1993).

<sup>e</sup>位置は最初のATGのAを1とする(GenBank: AC021663).

<sup>f</sup>Amp PCR増幅

<sup>g</sup>Seq, 直接塩基配列決定法

<sup>h</sup>N, エクソン3の48bp繰り返し配列の数

表 2 日本人統合失調症と対照の DRD4 遺伝子多型の遺伝子型頻度の比較

-600G/C	n	240	210	103	94	137	116	rs10902180	-	
	G/G	0.953	0.950	0.107	0.981	1.000	0.949			0.983
	G/C	0.038	0.010	0.019	0.000	0.000	0.051			0.017
-598G/T	n	238	207	100	93	130	114		-	
	G/G	1.000	0.995	1.000	0.989	1.000	1.000			
	G/T	0.000	0.005	0.000	0.011	0.000	0.000			
-597(G) <sub>2-5</sub>	n	239	210	103	94	136	116	(rs3842250) (IMS-JST186019)		
	G2/G3	0.004	0.000	0.347 <sup>a</sup>	0.010	0.000	0.000			0.000
	G3/G3	0.151	0.124	0.097	0.117	0.191	0.129			
	G3/G4	0.481	0.438	0.553	0.479	0.426	0.405			
	G3/G5	0.004	0.010	0.010	0.011	0.000	0.009			
	G4/G4	0.360	0.419	0.330	0.372	0.382	0.457			
-521T/C	n	239	206	102	93	137	113	rs1600955	IMS-JST186020	
	T/T	0.389	0.325	0.330	0.402	0.237	0.048			
	T/C	0.481	0.515	0.441	0.548	0.511	0.487			
-376C/T	n	237	212	102	95	125	117	rs916455	IMS-JST186021	
	C/C	0.130	0.160	0.157	0.215	0.109	0.115			
	C/T	0.814	0.835	0.808 <sup>a</sup>	0.843	0.832	0.922 <sup>a</sup>			
-364A/G	n	237	212	102	95	117	117	rs916456	-	
	A/A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
	A/G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
-291C/T	n	234	214	102	95	132	119	rs916457	IMS-JST186022	
	C/C	0.752	0.743	0.380	0.735	0.789	0.765			
	C/T	0.209	0.238	0.296	0.189	0.212	0.277			
-234C/A	n	237	212	101	95	136	117		-	
	C/C	0.996	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000			
	C/A	0.004	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000			
-128G/T	n	237	214	102	95	135	119		-	
	G/G	0.996	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000			
	G/T	0.004	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000			
-11C/T	n	239	197	93	88	131	109		-	
	C/C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
	C/T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
+31G/C	n	239	197	92	88	130	106		-	
	G/G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
	G/C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
12-bp repeat (+64→87)	n	239	197	104	89	135	108	rs10902180	-	
	2/2	0.736	0.690	0.240	0.721	0.768	0.676			
	2/1	0.222	0.294	0.231	0.258	0.215	0.306			
	1/1	0.042	0.025	0.048	0.034	0.037	0.019			
21-bp deletion (+106→126)	n	239	197	102	88	134	106		-	
	+/+	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
	+/-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
48-bp VNTR (+2589→2880)	n	237	212	102	95	135	117	rs10902180	-	
	4/4	0.696	0.736	0.618	0.716	0.726	0.681			
	4/3	0.186	0.160	0.167	0.158	0.200	0.164			
	4/5	0.055	0.047	0.059	0.063	0.052	0.034			
	4/3	0.013	0.014	0.029	0.000	0.000	0.026			
	4/5	0.017	0.009	0.000	0.011	0.030	0.009			
	4/7	0.013	0.005	0.000	0.000	0.022	0.009			
	2/2	0.004	0.009	0.010	0.021	0.000	0.000			
	5/5	0.008	0.005	0.000	0.011	0.015	0.000			
	3/3	0.000	0.005	0.000	0.011	0.000	0.000			
	5/2	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.009			
	5/3	0.004	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000			
	5/6	0.004	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000			

<sup>a</sup> Polymorphism names of each SNP or the number below names stand for nucleotide variation and relative position to the first nucleotide of the initiation codon of reference sequence AC021663 (141798 = +1).

<sup>b</sup> P values of chi square test (with Yates' correction for 2x2 table) or Fisher's exact test<sup>c</sup> were not corrected for multiple testing. There was no statistical significance after correction. Detailed statistical method was described in the text.

<sup>d</sup> dbSNP, a database of single nucleotide polymorphisms at National Center for Biotechnology Information.

<sup>e</sup> JSNP, a database of common gene variations in the Japanese population (Hirakawa et al., 2002).

<sup>f</sup> del, insertion / deletion polymorphism.

<sup>g</sup> n: the number of subject genotyped at each polymorphism.

表3 DRD4 多型の LD 値 ( $r^2$ )

	120-bp TR	-1217G/del	-1106T/C	-930C/G/T	-906T/C	-809G/A	-768G/A	-713C/T	-616G/C	-603del/T	-600G/C	-597(G) <sub>2-5</sub>	-521T/C	-376C/T	-291C/T	12-bp repeat
-1217G/del	0.04															
-1106T/C	0.03	0.59														
-930C/G/T	0.05	0.00	0.00													
-906T/C	0.66	0.04	0.03	0.06												
-809G/A	0.46	0.00	0.01	0.06	0.62											
-768G/A	0.06	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01										
-713C/T	0.03	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00									
-616G/C	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.00	0.02								
-603del/T	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.28							
-600G/C	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.04						
-597(G) <sub>2-5</sub>	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.14	0.00					
-521T/C	0.00	0.07	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02				
-376C/T	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.05	0.05	0.08	0.00	0.03	0.02			
-291C/T	0.43	0.02	0.02	0.06	0.39	0.28	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.02		
12-bp repeat	0.47	0.03	0.02	0.08	0.37	0.27	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.86	
48-bp VNTR	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.04	0.06	0.08	0.00	0.04	0.02	0.78	0.02	0.02

Paiwise LD maeasures ( $r^2$ ) were calculated by Haploview software.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（総括・分担） アデノシン A1, A2A・ドーパミン D1, D2 受容体遺伝子と統合失調症の相関解析

（主任又は分担）研究者 川崎弘詔  
九州大学病院 講師

（研究協力者）織部直弥、光安博志  
九州大学大学院医学研究院精神病態医学

研究要旨

我々は ADORA1, ADORA2A, DRD1 そして DRD2 遺伝子上の 19 の SNP について双極性障害の対照疾患として統合失調症罹患群、および健常群にてゲノタイピングを行った。ADORA1 の SQ3 ハプロタイプが統合失調症罹患群およびコントロール群との比較において統計学的有意差を示したが、多段階検定の統計的補正により有意差は消滅した。ロジスティック解析により ADORA1 の SQ6 ハプロタイプが統合失調症発症に高いリスクを持つことが示唆された。LD 解析によりこれらの遺伝子のハプロタイプはより単純化できる可能性が示唆された。より多くのサンプルを用いて、これらの遺伝子の詳細なハプロタイプ解析を行っている。これらの結果は、統合失調症の遺伝に関するより深い理解につながると考えられる。

A. 研究目的

統合失調症治療に用いられてきた古典的な定型抗精神病薬の効果はドーパミン D2 レセプター (DRD2) 阻害能力と正の相関をすることから、ドーパミン神経系の機能異常が統合失調症の病態生理に重要な役割を果たすということは広く知られている。

また、選択的ドーパミン D1 レセプター (DRD1) 阻害薬である SCH23390 が PCP により惹起される統合失調症様行動を阻害す

ることも報告されており、ドーパミン D1 神経系の関与についても示唆されている。

さらにアデノシン神経伝達系は、ドーパミン神経伝達系と機能的な相互作用があることが報告されている。

以上のことからドーパミン D1, D2 神経伝達系と相互作用をするアデノシン A1, A2A (ADORA1 and ADORA2A) 神経伝達系も統合失調症の病態に対して何らかの働きを持つ可能性が考えられる。

そこで統合失調症の病態生理に対する

アデノシン神経系・ドーパミン神経系の遺伝的な関与を評価するため、これらの4つの遺伝子上の報告された SNP をマーカーとして統合失調症罹患群および健常群に対して相関解析を行った。

## B. 研究方法

対象群：

我々は、全体で144名(平均年齢 52.7 歳、男性：84 名、女性：60 名)の日本人を本研究において対象とした。

対象は DSM-IV により診断された統合失調症群 72 名(平均年齢 57.8 歳、男性 41 名、女性 31 名) および健常対照群 72 名(平均年齢 46.4 歳、男性 43 名、女性 29 名)である。

ゲノム DNA 抽出：

ゲノム DNA は Lahiri and Nurnberger の方法およびキアゲンカラム(Qiagen columns (Qiagen, GmbH))を用い、末梢静脈血の白血球から抽出した。

PCR：

上記の方法により得られたゲノム DNA をテンプレートにし、PCR 法により、ゲノタイピングを行うそれぞれの領域を増幅した。増幅に用いたプライマーのペアは Table 1 に記載した。我々は ADORA1 の 7 つの SNP、ADORA2A の 3 つの SNP、DRD1 の 1 つ SNP、DRD2 の 8 つの SNP を解析の対象とした。遺伝子上の SNP とエクソンの位置を Figure 1 として示した。

PCR の反応溶液の総量は 10  $\mu$ l とし、その溶液中にゲノム DNA 50ng、各プライマー 10pmol、dimethylsulfoxide 10%、

AmpliTaq polymerase(Roche) 0.25unit、dNTP 各 2mmol、10xPCR Buffer II (Roche) 1  $\mu$ l を混入し、反応させた。

温度条件は、初めに 94°C 1 分間、次に 94°C 30 秒 (denaturation)、56°Cまたは 62°C 30 秒 (primer annealing)、72°C 1 分 (extension)を 40 サイクル繰り返した後、最後に 72°C 5 分間 (final extension) とした。

直接塩基配列決定法：PCR 法により増幅された DNA フラグメントを含んだ反応液 10  $\mu$ l に Shrimp alkaline phosphatase (Roche) 1U、10x Dephosphorylation buffer (Roche) 1.3  $\mu$ l、Exonuclease I、2U (NEW ENGLAND BioLabs) を混合し総量を 3  $\mu$ l にしたものを加え、37°C1 時間、80°C15 分の熱処理を加えた。そして、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)に付属のプロトコールに従いダイレクトシーケンスに用いるテンプレートを準備し、Table 1 に示したプライマーを用いてシーケンシング反応を実行した。反応液の一部はプロトコールに従い、シーケンサ 3100 Genetic Analyzer (ABI) を使用してキャピラリー電気泳動を行い、各サンプルの塩基配列を決定した。

塩基配列解析および統計学的解析：

本研究で用いた各遺伝子のすべての報告されている DNA 多型については、データベースに基づいて本研究において使用した。データベースは、NCBI dbSNP build120 (dbSNP) and JSNP database (JSNP)を用いた。CalDAG-GEFI 遺伝子領域の報告されている DNA 多型は、Table 2 および Figure 1

に示した。加えて、我々は新しい SNP の探索も行った。得られた塩基配列の解析は、コンピュータ・ソフトウェアである DNASTAR (Seqman II, MegAlign) (DNASTAR, U. S. A.) を用いた。

それらの結果に基づいて、4つの多型マーカーからなるハプロタイプをコンピュータ・ソフトウェアであるフェイズ(PHASE)を用いて推測した。

統計学的解析は、stattview・ソフトウェア (StatView-J ver. 4.11 (SAS Institute Inc., U. S. A.)) を用いてカイ二乗検定を行った ( $\alpha=0.05$ )。

ゲノタイピングは PCR 法とダイレクトシークエンシング法により行われた。目的部位を PCR 法により増幅した後 3100 シークエンスアナライザーを用いて解析している。SNP の情報はデータベース JSNP を参照している (Table 1)。

統計解析：

ゲノタイピングの結果を元にしてゲノタイプ頻度・アレル頻度のカイ二乗検定による統計解析を行った ( $\alpha=0.05$ )。

有意差の水準を  $p=0.05$  とした。ソフトウェアは StatView-J ver4.11 (SAS Institute Inc., U. S. A.) を使用した (Table 2 and Table 3)。

我々はコンピュータ・ソフトウェアであるフェイズ 4 を用いてハプロタイプ解析を行った (Table 4)。推定されたハプロタイプを元に SPSS 13.0 J for Win6 (SPSS Inc.) を用いて変数減少法と尤度法によるロジスティック解析を行った (Table 5)。

連鎖不均衡解析 (LD) に関しては、フェイズで計算したハプロタイプの情報に基づきペアワイズ LD コエフィシエント  $D'$  を Haploview 3.2 を用いて計算した (Figure 2)。

(倫理面への配慮)

血液採取に際しては、文書および口頭にてインフォームド・コンセントを本人および家族 (代諾者) から取得した。本研究は、九州大学医学部ヒトゲノム・遺伝子研究倫理委員会からの承認を得て行われた。

### C. 研究結果

本研究において我々は 4 つの遺伝子上に 11 の PCR フラグメントを作り 19 の SNP を解析した (ADORA1: 7 SNPs, ADORA2A: 3 SNPs, DRD1: 1 SNP and DRD2: 8 SNPs)。だが、それらのマーカーでの統合失調症罹患群と健常群の間の比較においてゲノタイプ、アレル頻度の両方において有意な差は見られなかった (Table 2 and 3)。

さらにハプロタイプ解析と多変量解析 (multi-variate statistical analysis) を行った。

それぞれの受容体遺伝子の多型のハプロタイプ解析の結果を Table 4 に示す。カイ二乗検定の結果 ADORA1 の SQ3 ハプロタイプと DRD2 の SQ5 ハプロタイプが有意差を示した。だがこの有意差は多段検定の統計的補正により消滅した。

step-down procedure 法による Logistic regression 解析により ADORA1 の SQ6 ハプロタイプが統合失調症に高いリスクを持つ可能性があることが示唆された (OR:



3.87, 95%CI: 1.46-10.23, p-value: 0.006) for schizophrenia (Table 5)。

各遺伝子のポリモルフィズムを元に LD 解析を行った結果、ADORA1 の A1-11-1 と A1-14-1 がひとつのブロックを形成し、同様に ADORA2A の A2A-02-1 と A2A-03-1 がひとつのブロックを形成した。DRD2 の 8 つのポリモルフィズムは 3 つの LD ブロックに分かれた (Figure 2)。

#### D. 考察

今回、我々は、日本人統合失調症において、アデノシン神経系およびドーパミン神経系に關与する ADORA1, ADORA2A, DRD1 そして DRD2 遺伝子上の 19 の SNP についてゲノタイピングを行った。

単変量解析として、それぞれの多型のアレル頻度、ゲノタイプ頻度を統合失調症群およびコントロール群で統計学的に比較したが、有意差は認められなかった。

ハプロタイプ解析、連鎖不均衡解析も行ったが、いずれも有意な結果は得られなかった。

ロジスティック解析により ADORA1 の SQ6

ハプロタイプが、統合失調症発症に高いリスクを持つことが認められた。

今回、解析した遺伝子に関しては、対象例数を増加し、より詳細な解析を行うことが今後も必要であると考えられる。

#### E. 健康危険情報

特記事項無し

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

投稿予定。

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)  
なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

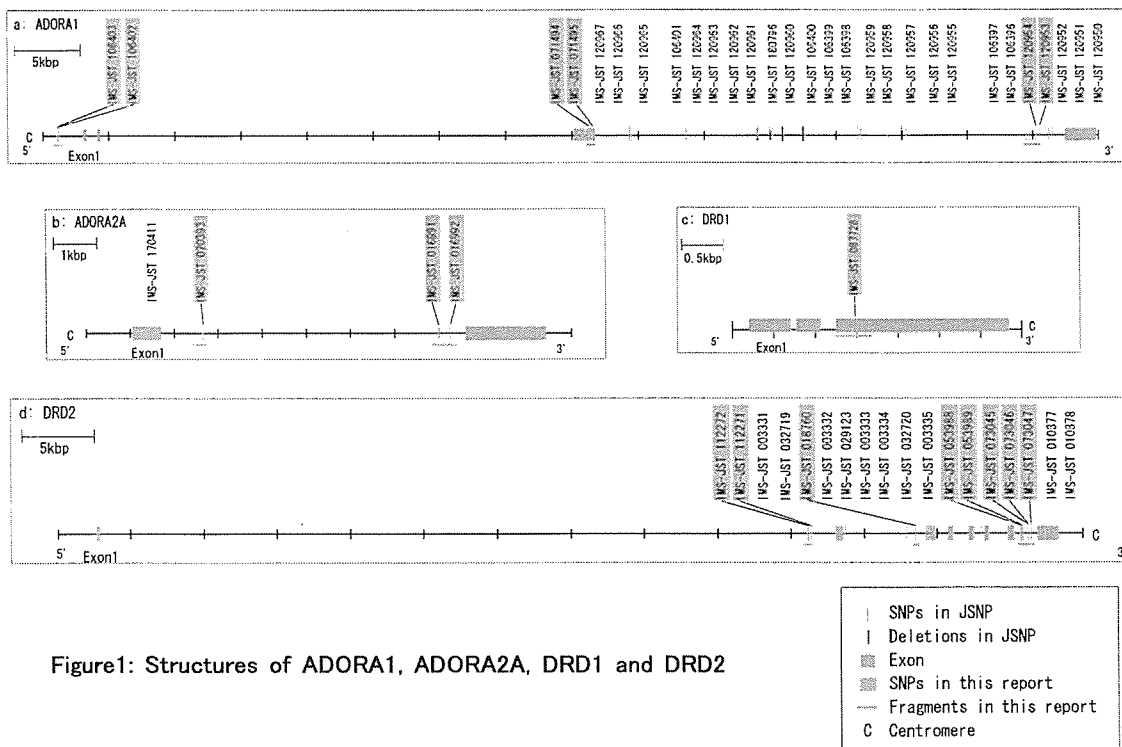


Figure1: Structures of ADORA1, ADORA2A, DRD1 and DRD2

Table1: Primers and Markers list

Fragment name	5'	Forward	3'	5'	Reverse	3'	Fragment size	Marker name	JSNP	Nucleotide substitution	Amino acid	Allele frequency	
A1-01		tggaggcagagctggcttr			tcatctcattctggatgac		460	A1-01-1	IMS-JST 106403	Intron	C→T		
A1-02		tacatcggcctcagggtgc			tgaggactggagcacgatg		443	A1-01-2	IMS-JST 106402	Intron	C→G	0.984	
								A1-02-1	IMS-JST 71494	Exon	Gtg→Ctg	Val→Leu	
								A1-02-2	IMS-JST 71495	Exon	gcT→gcG	Ala→Ala	0.838
A1-11		tagatcagggaacacagacc			tgtgactccaccattaacagc		386	A1-11-1	IMS-JST 120957	Intron	C→T	0.545	
A1-14		agcagttatgaggattacctg			acttgctagatcaatgtctc		555	A1-14-1	IMS-JST 120954	Intron	C→T		
								A1-14-2	IMS-JST 120953	Intron	C→T	0.929	
A2A-02		tactcggcatggattccacc			tccatttgcctcatgctg		313	A2A-02-1	IMS-JST 20393	Intron	C→T	0.596	
A2A-03		ttagcaatgtaagatggcc			taacaggagagcaggcatcc		553	A2A-03-1	IMS-JST 16991	Intron	C→T	0.700	
								A2A-03-2	IMS-JST 16992	Intron	C→T	0.884	
D1-01		ctgatgtctttctcttagg			tgatcaggatgaaggctgcc		456	D1-01-1	IMS-JST 87728	Exon	ttG→ttA	Leu→Leu	0.864
D2-01		tatgcttcattaccttagaac			aggctggtgtcgcattatc		546	D2-01-1	IMS-JST 112272	Intron	G→A		
								D2-01-2	IMS-JST 112271	Intron	A→G	0.638	
D2-04		tgtcctcgcaggagctag			tgggctcagttcctagtcc		310	D2-04-1	IMS-JST 18760	Intron	T→C	0.645	
D2-08		tatgtgtccaggaaagtac			tcatccggcagtaaaaggg		436	D2-08-1	IMS-JST 53988	Intron	T→G	0.645	
								D2-08-2	IMS-JST 53989	Intron	T→G		
								D2-09-1	IMS-JST 73045	Intron	A→C		
								D2-09-2	IMS-JST 73046	Intron	T→G		
								D2-09-3	IMS-JST 73047	Intron	C→A	0.631	

Table2: Genotype frequency of ADORA1, ADORA2A, DRD1 and DRD2

A1-01-1							A1-01-2							A1-02-1										
n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p		n	C/C	C/G	G/G	X <sup>2</sup>	p		n	G/G	G/C	C/C	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	56	0.857	8	0.143	0.000	1.314	0.252	56	0.929	4	0.071	0.000	4E-30	>9999	62	0.645	22	0.355	0.000	1.557	0.212			
Schizophrenia	55	0.768	13	0.232	0.000		55	0.929	4	0.071	0.000		62	0.738	15	0.242	0.000							
A1-02-2							A1-11							A1-14-1										
n	T/T	T/G	G/G	X <sup>2</sup>	p		n	T/T	T/C	C/C	X <sup>2</sup>	p		n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	65	0.738	17	0.262	0.000	2.339	0.126	71	0.197	36	0.507	21	0.296	0.063	0.602	64	0.750	15	0.234	1	0.016	2.943	0.056	
Schizophrenia	62	0.855	9	0.145	0.000		45	0.217	23	0.500	13	0.283		63	0.603	23	0.365	2	0.032					
A1-14-2							A2A-02							A2A-03-1										
n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p		n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p		n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	62	0.855	9	0.145	0.000	0.339	0.56	71	0.266	31	0.437	14	0.197	0.116	0.731	71	0.465	33	0.465	5	0.070	0.53	0.467	
Schizophrenia	64	0.891	7	0.109	0.000		70	0.357	29	0.414	16	0.229		61	0.541	24	0.393	4	0.066					
A2A-03-2							D1-01							D2-01-1										
n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p		n	G/G	G/A	A/A	X <sup>2</sup>	p		n	G/G	G/A	A/A	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	71	0.803	14	0.197	0.000	0.045	0.831	70	0.714	20	0.286	0.000		72	0.417	30	0.417	12	0.167					
Schizophrenia	61	0.787	13	0.213	0.000		65	0.803	13	0.197	0.000	1.255	0.263	69	0.464	29	0.420	8	0.116	0.74	0.39			
D2-01-2							D2-04							D2-05-1										
n	A/A	A/G	G/G	X <sup>2</sup>	p		n	C/C	C/T	T/T	X <sup>2</sup>	p		n	T/T	T/G	G/G	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	72	0.444	29	0.403	11	0.153	0.247	0.619	62	0.258	26	0.419	20	0.323	0.859	0.354	54	0.389	15	0.278	18	0.333	1.593	0.207
Schizophrenia	69	0.478	27	0.391	9	0.130		67	0.209	27	0.403	26	0.388		64	0.406	26	0.406	12	0.188				
D2-05-2							D2-05-3																	
n	T/T	T/G	G/G	X <sup>2</sup>	p		n	A/A	A/C	C/C	X <sup>2</sup>	p		n	T/T	T/G	G/G	X <sup>2</sup>	p					
n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency	n	frequency					
Control	53	0.358	23	0.434	11	0.208	0.303	0.592	70	0.329	31	0.443	16	0.229	0.169	0.681	70	0.357	33	0.471	19	0.271	0.014	0.906
Schizophrenia	63	0.381	29	0.460	10	0.159		67	0.373	27	0.403	15	0.224		67	0.284	29	0.433	19	0.284				
D2-05-3																								
n	C/C	C/A	A/A	X <sup>2</sup>	p																			
n	frequency	n	frequency	n	frequency																			
Total control	66	0.379	31	0.470	10	0.152	0.003	0.953																
Schizophrenia	64	0.391	29	0.453	10	0.156																		

Table3: Allele frequency of ADORA1, ADORA2A, DRD1 and DRD2

A1-01-1					A1-01-2					A1-02-1											
n	C	T	X <sup>2</sup>	p	n	G	C	X <sup>2</sup>	p	n	G	C	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	112	104	0.929	8	0.071	1.465	0.226	112	108	0.964	4	0.036	0		124	102	0.823	22	0.177	1.888	0.17
Schizophrenia	112	99	0.884	13	0.116		112	108	0.964	4	0.036		124	109	0.879	15	0.121				
A1-02-2					A1-11					A1-14-1											
n	T	G	X <sup>2</sup>	p	n	T	C	X <sup>2</sup>	p	n	C	T	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	130	113	0.869	17	0.131	2.64	0.104	142	64	0.451	78	0.549	0.075	0.963	128	111	0.867	17	0.133	3.173	0.205
Schizophrenia	124	115	0.927	9	0.073		92	43	0.467	49	0.533		126	99	0.786	27	0.214				
A1-14-2					A2A-02					A2A-03-1											
n	C	T	X <sup>2</sup>	p	n	C	T	X <sup>2</sup>	p	n	C	T	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	124	115	0.927	9	0.073	0.364	0.546	142	83	0.585	59	0.415	0.213	0.899	142	99	0.697	43	0.303	0.779	0.677
Schizophrenia	128	121	0.945	7	0.055		140	79	0.564	61	0.436		122	90	0.738	32	0.262				
A2A-03-2					D1-01					D2-01-1											
n	C	T	X <sup>2</sup>	p	n	G	A	X <sup>2</sup>	p	n	G	A	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	142	128	0.901	14	0.099	0.051	0.821	140	120	0.857	20	0.143	1.456	0.228	144	90	0.625	54	0.375	0.818	0.664
Schizophrenia	122	109	0.893	13	0.107		132	119	0.902	13	0.098		138	93	0.674	45	0.326				
D2-01-2					D2-04					D2-05-1											
n	A	G	X <sup>2</sup>	p	n	C	T	X <sup>2</sup>	p	n	T	G	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	144	93	0.646	51	0.354	0.223	0.895	124	58	0.468	66	0.532	0.742	0.69	108	57	0.528	51	0.472	3.863	0.145
Schizophrenia	138	93	0.674	45	0.326		134	55	0.410	79	0.590		128	78	0.609	50	0.391				
D2-05-2					D2-05-3																
n	T	G	X <sup>2</sup>	p	n	A	C	X <sup>2</sup>	p	n	T	G	X <sup>2</sup>	p							
n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency		n	frequency	n	frequency								
Control	106	61	0.575	45	0.425	0.463	0.794	140	77	0.550	63	0.450	0.326	0.85	140	69	0.493	71	0.507	0.22	0.696
Schizophrenia	126	77	0.611	49	0.389		134	77	0.575	57	0.425		134	67	0.500	67	0.500				
D2-05-3																					
n	C	A	X <sup>2</sup>	p																	
n	frequency	n	frequency																		
Control	132	81	0.614	51	0.386	0.036	0.982														
Schizophrenia	128	79	0.617	49	0.383																

Table4-1: Haplotypes of ADORA1

ADORA1											
Haplotype	Total		Control		Schizophrenia		vs others		all		
	n	frequency	n	frequency	n	frequency	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p	
SQ1	CC3TTCC	80	0.323	49	0.371	31	0.267	3.054	0.081		
SQ2	CCGTCCC	59	0.234	31	0.235	27	0.233	0.002	0.969		
SQ3	CCGTCTC	24	0.097	7	0.053	17	0.147	6.178	0.013		
SQ4	CCCTCCC	18	0.073	9	0.068	9	0.078	0.081	0.776		
SQ5	CCGGCCC	9	0.036	7	0.053	2	0.017	2.261	0.133		
SQ6	TCGTCCC	7	0.028	5	0.023	4	0.034	0.311	0.577		
SQ7	CCGGCTC	6	0.024	2	0.015	4	0.034	0.977	0.325		
SQ8	TCGTCC	6	0.024	2	0.015	4	0.034	0.977	0.325		
SQ9	CCGTTC	5	0.020	4	0.030	1	0.009	1.469	0.226		
SQ10	CCCTTC	5	0.020	4	0.030	1	0.009	1.469	0.226		
SQ11	CCGTCT	4	0.016	0	0.000	4	0.034	4.626	0.032		
SQ12	CCGTCTC	3	0.012	1	0.008	2	0.017	0.483	0.487		
SQ13	CCGGTCC	2	0.008	1	0.008	1	0.009	0.008	0.927		
SQ14	CCGTCC	2	0.008	1	0.008	1	0.009	0.008	0.927		
SQ15	CCGGCCC	2	0.008	1	0.008	1	0.009	0.008	0.927	36.727	0.990
SQ16	CCGGCTC	2	0.008	2	0.015	0	0.000	1.772	0.183		
SQ17	TCGTCCC	2	0.008	1	0.008	1	0.009	0.008	0.927		
SQ18	CCGTTC	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
SQ19	CCGTCT	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
SQ20	CCGGCT	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ21	CCCTCT	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ22	CCCTCT	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ23	CCGGCTC	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ24	CCGGCT	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ25	CCGTCCC	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
SQ26	CCGGCCC	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
SQ27	TCGTCT	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
SQ28	TCGTCTC	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ29	TCGGCCC	1	0.004	1	0.008	0	0.000	0.882	0.348		
SQ30	TCGTCTC	1	0.004	0	0.000	1	0.009	1.143	0.285		
		249		132		116					

Table4-2: Haplotypes of ADORA2A

ADORA2A											
Haplotype	Total		Control		Schizophrenia		vs others		all		
	n	frequency	n	frequency	n	frequency	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p	
SQ1	CCC	128	0.481	69	0.486	59	0.476	0.027	0.869		
SQ2	TTC	76	0.286	43	0.303	33	0.266	0.437	0.509	4.001	0.780
SQ3	TCC	35	0.132	16	0.113	19	0.153	0.953	0.329		
SQ4	CCT	27	0.102	14	0.099	13	0.105	0.208	0.648		
		266		142		124					