

CalDAG-GEFI 遺伝子の多型解析

分担研究者 川寄 弘詔 九州大学大学院医学研究院精神病態医学 講師

研究要旨：我々は CalDAG-GEFI 遺伝子の第 9 イントロンに 1 つのあたらしい SNP (IVS9(-92)) を発見した。本研究において、既知である 6 つの SNP はその半数が多型性を示したのみであった。

4 つの多型性を示すマーカーのアレル頻度およびゲノタイプ頻度について、統合失調症罹患群および健常群における比較を行ったが、統計学的な有意差は見出せなかった。

ハプロタイプ頻度においても、統合失調症罹患群およびコントロール群の比較において統計学的な有意差を見出せなかった。

A. 研究目的

我々は、線条体に多く発現し、カルシウム (calcium (EF-hand)) と ジアシルグリセロール (diacylglycerol (DAG)) の両方に結合ドメインを持つ新しいグアニンヌクレオチドエクスチェンジファクター (guanine nucleotide exchange factor (GEF)) である CalDAG-GEFI とそのオルソログの CalDAG-GEFII について報告した。

これらの遺伝子は GEF 遺伝子ファミリーによって調整される新しいセカンドメッセンジャーシステムの一部であり、この GEF 活性は cAMP やカルシウム、DAG に代表される主要な細胞内セカンドメッセンジャーの結合によって制御されていることが判明した。最近では、細胞内における本経路が種々の機能を持つことから、一般的に、“non-kinase second messenger pathway” と呼ばれている。CalDAG-GEFI と CalDAG-GEFII のメッセンジャー RNA はともに、ほとんど、脳と造血細胞系に限局的に発現している。

CalDAG-GEFI タンパクは線条体の GABA 神経の出力系神経 (GABAergic output neuron) の神経終末に局在化していることが示されている。

統合失調症の病態生理学的機構のひとつとして大量の線条体 GABA 神経系の出力神経系における調節異常が関与していると推定されており、CalDAG-GEI 遺伝子は統合失調症の分子生物学的研究の良い候補遺伝子となり得ると考えられる。また、この遺伝子ファミリーは近年着目されつつある。“non-kinase second messenger pathway” のひとつである cAMP-GEFII 遺伝子が自閉症の発病機序と関連があることが報告されている。

このように、本遺伝子ファミリーは哺乳類の中枢神経系の神経精神医学的機能において重要な役割を持つことが示唆されており、最近では、統合失調症と双極性障害との遺伝学的な連続性も指摘されている。統合失調症を遺伝学的に解析することは、将来的に双極性障害の遺伝学的解析にも貢献することになると考えられる。

そこで我々は統合失調症への CalDAG-GEFI 遺伝子の関与を評価するために、日本人の統合失調症罹患群と健常群における CalDAG-GEFI 遺伝子上の一塩基多型 (SNPs) について調べた。

B. 研究方法

対象群：

我々は、全体で437名(平均年齢47.1、男性：247名(45.7歳)、女性：188名(48.8歳))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193名(平均年齢51.1歳、男性103名(49.6歳)、女性90名(52.64歳))および健常対照群242名(平均年齢43.6歳、男性144名(42.6歳)、女性98名(45.1歳))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。

PCRの反応溶液の総量は10 μ 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 μ lを混入し、反応させた。

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

DHPLC法：多型のスクリーニングを行うために、12名のDNAサンプルからPCRにより増幅されたDNA断片を用いて automated Wave DNA fragment analysis system を利用したDHPLC法による解析を行った (Transgenomic, U. S. A.)。

直接塩基配列決定法：

PCRで増幅したDNA断片のうち、DHPLCにおいて、ヘテロデュプレックス溶出パターンを示したDNA断片は、直接塩基配列法で、多型の存在の確認を行った。

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 μ lに Shrimp alkaline phosphatase (Roche) 1U、10x Dephosphorylation buffer (Roche) 1.3 μ l、Exonuclease I、2U (NEW ENGLAND BioLabs)を混合し総量を3 μ lにしたものを加え、37 $^{\circ}$ C1時間、80 $^{\circ}$ 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、表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：

すべての報告されている CalDAG-GEFI 遺伝子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 Fig 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、スタットビュー・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 ($\alpha=0.05$)。

クレイドグラム解析は、コンピュータ・ソフトウェアのネットワーク・プログラム (NETWORK ver. 4.1.0.6 (Fluxus Technology Ltd., Germany)) を用いて、すべての対象サンプルについてプロットした (Fig 2)。

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 3 つの SNP で計算した。

(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。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された。

C. 研究結果

我々は、CalDAG-GEFI 遺伝子の 18 箇所のエクソンとその周辺領域の増幅を行い、そのうちの 16 箇所の増幅に成功した。

エクソン 13 と 17 については、PCR で増幅できなかった。その他の 16 箇所のエクソンに対し DHPLC によるスクリーニングを行った結果、3 つのフラグメントがヘテロデュプレックス溶出パターンを示した。

全部で 4 つの SNP が 3 つのフラグメントから同定され、直接塩基配列決定法により解析が行われた。

我々は、全部で 437 名のサンプルについて直接塩基配列決定法により、ゲノタイプ解析を行った。その結果、1 つの新規 SNP と 6 つの既知の SNP が同定された。その 7 つの SNP のうち 3 つはモノモルフィックであったが、4 つは多型性 (ポリモルフィック) を示した (Table 2)。6 つの既知の SNP のうちのひとつに関しては新しいゲノタイプの種類 (genotypic variation) が認められた。

多型性を示すこれら 4 つのゲノタイプの分布は、ハーディー・ワインバーグの平衡 (Hardy-Weinberg's equilibrium) を満たし

ていた。

上記の 4 つの SNP に対するカイ二乗検定を行ったところ、193 名の統合失調症罹患群と 244 名のコントロール群の間に有意な差は見られなかった。

だが男女間での比較においてわずかな差が見られた (Table 3-1, 3-2)。

4 つの SNP から 12 個のハプロタイプがフェイズ・プログラムにより (PHASE) により予測された (Table 4)。

ハプロタイプの分布は統合失調症罹患群およびコントロール群の 2 群の比較において、統計学的な有意差を示さなかった。

D' 値は 3 つの SNP のローカスにおいて、高い LD の存在を示した (Table 5)。ネットワーク・プログラム (NETWORK) によるクレイドグラム解析の結果を Figure 3 と Figure 4 に示した。

D.E. 考察と結論

本研究において我々は統合失調症群およびコントロール群の 2 群の比較において、CalDAG-GEFI 遺伝子多型について統計学的な有意差を見出すことは出来なかった。しかし、さらに詳細なかつ多くの CalDAG-GEFI 遺伝子多型を用いての解析は今後も必須であろう。更に、我々は今回導入したクレイドグラムのような新しい解析手法が、複雑な CalDAG-GEFI 遺伝子機能と統合失調症の病態生理学的機構の解明に必須であることを強調したい。

F. 健康保険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

Mitsuyasu H, Kobayashi Y, Gotoh L,

Oribe N, Takata A, Kawasaki H,
Kanba S:

Genetic analysis of the human
striatum-enriched CalDAG-GEFI gene
with Japanese schizophrenia patients.
The American Society of Human
Genetics 2007 Annual Meeting ,
2007.10.26, アメリカ・サンディエゴ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table1: List of primers for amplifications

Primer name		Sequence (5'→3')	Length (nt)	Product size(bp)	PCR	DHPLC	Domains and Codons
D1E1	F	attGTGTGGGAGTGTACATGCGT	23	238			
	R	gttCCGTCTCTCACACACAATGG	23				
D1E2	F	attAGACTCCCGCTCTGCCTCT	22	211			ATG
	R	gttCTAGGCTCAGGCTCCGTGT	22				
D1E3	F	attAGCTCAGCCACCTGTCTTTG	23	230			
	R	gtTAGGAGCGAGGCTCATTCTG	22				
D1E4	F	attCGTGTCTCCTAGAACCCAGGC	23	261			
	R	gtTCAAACCCACTCCCAGAAAC	22				
D1E5	F	attGGGCTATCTTGGGTGACTCC	23	272			
	R	gttCGAGAGAGCAACATGACCCT	23				
D1E6	F	attGTGTGTCTGTGTGAGTGGGG	23	279			SCR 1
	R	gttGAACTCTCTTCCAGCCCACA	23				
D1E7	F	attGTGGCTATCAGTGAGGGGAG	23	296			SCR 2
	R	gttGGAAGGGTTGGCCTGACT	21				
D1E8	F	attCTCAGTGACTCCCTGCCTCT	23	287			SCR 2
	R	gttCTTAACCCCTCTGAGCCTCC	23				
D1E9-1	F	attCCTCACCCCTCCTACATTT	23	291			SCR 3
	R	gttCCAGGATGCTAAAGAGCTGC	23				
D1E9-2	F	attCAACTATGGCAACTACCGGC	23	299			SCR 3
	D'=	gttGAAACTGTCAACCCCTGGTG	23				
D1E10	D'=	attGTCTAGCTTCTGACCCGAGC	23	285		O	
	R	gttGGTGAGGTGGCTGCTAAGAG	23				
D1E11	F	attCAGGGATTCCCCTCTCTGTT	23	293			
	R	gttCTTGAACAGGACACTOGTGC	23				
D1E12	F	attACTCTCCCTCTTCTGGCTC	23	233			EF-hand
	R	gttACAAGAACTGAAGCCCAGG	23				
D1E13	F	attCAGCGGTGGATGGTTCTG	21	300	×		DAG binding domain
	R	gttGCTTGAGAAGGGCTCTGG	21				
D1E14	F	attCTCTCCTCCTGTGGTTCTGC	23	290		O	DAG binding domain
	R	gtTGCGCCTCTGATTTTAAGGT	22				
D1E15	F	attGGATGGGATGGAGGGTATTC	23	274		O	DAG binding domain
	R	gttCCACAGGCCAGTACAGAATG	23				
D1E16	F	attCAGGGACCTGGAAGTGTGTT	23	205			TAA (stop codon)
	R	gttGGAGCCATTTGGATAAAGCA	23				
D1E17	F	attGGGTGTCTTCCTCACAACCT	23	299	×		
	R	gttGTATACCATCCCCCTACCCC	23				

× : Not amplified by PCR

O : Indicated heteroduplex pattern by DHPLC

Table2: List of SNPs on CalDAG-GEFI gene and Result of DHPLC

Database		This study			Information	
dbSNP				Amplified		
rs-number	Allele	JSNP number	Name	region	DHPLC	Allele
rs12223914	C/A					
rs2073798	C/A	IMS-JST000351				
rs2073797	G/C	IMS-JST000350				
rs2904961	G/A					
rs2959651	G/A					
rs2959650	T/G			D1E4	mono	splice-site [NM_153819] intron [NM_005816]
rs11231864	T/C			D1E5	mono	Ile(atT) → Ile(atC) [NM_153819] intron [NM_005816]
rs546323	G/C					G:0.940 C:0.060
rs547280	C/A			} D1E6	mono	
rs681791	T/C					
rs2301563	T/C	IMS-JST057663		D1E7	mono	G:0.989 A:0.011
rs550930	T/C					
rs667237	T/C					
rs536017	C/A					
	NONE		IVS9(-92)	} D1E10	hetero	A/Del
rs556356	T/C		IVS9(-44)			C
rs10897524	/Dmax (D>0)		IVS10(+12)			T/C
rs553618	/Dmin (D<0)		IVS10(-43)	D1E11	hetero	C
rs2284301	G/A	IMS-JST034087				
rs12146679	T/G					
rs11231862	C/A					
rs11231863	G/C					
rs4014428	Del/GT					
rs5792333	Del/TG					
rs1207182	T/C					
rs1207181	C/T					
rs1211410	G/A					
rs1212452	T/C					
rs11231861	G/A					
rs580374	G/A					
rs494128	T/C					
rs12420660	G/A					
rs2301562	G/C	IMS-JST057662				Gly(gGg) → Ala(gCg)
rs533515	G/T		IVS14(+45)	} D1E14	hetero	G/T/Del G
rs534221	G/A		IVS14(+73)			
rs4609610	G/A					
rs4357696	T/C					
rs559977	G/A					C:0.812 A:0.188
rs2277310	A/C	IMS-JST074205	Exon15	D1E15	hetero	A/C Gly(ggA) → Gly(ggC)
rs7930951	A/G					
rs2267918	G/A					
rs7945230	T/C	IMS-JST021497				
rs7948197	G/A					
rs7930520	G/A					
rs7929585	T/C					
rs9667585	T/A					
rs3725	G/A					

Table3-1: Analysis of genotype and allele frequency detected by direct sequencing

	Total		Sc		Control		Female		Male		Female-Sc		Female-Control		Male-Sc		Male-Control			
	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	count	freq	P-value	
Total	435		193		242		189		246		91		98		144		102			
* IVS9(-92)	A/A	77	0.177	35	0.181	42	0.174	37	0.196	40	0.163	19	0.209	18	0.184	24	0.167	16	0.157	
	A/Del	206	0.474	99	0.513	107	0.442	93	0.492	113	0.459	47	0.517	46	0.469	61	0.424	52	0.510	0.382
	Del/Del	152	0.349	59	0.306	93	0.384	59	0.312	93	0.378	25	0.275	34	0.347	59	0.410	34	0.333	
	A	360	0.414	169	0.438	191	0.395	167	0.442	193	0.392	85	0.467	82	0.418	109	0.379	84	0.412	0.456
	Del	510	0.586	217	0.562	293	0.605	211	0.558	299	0.608	97	0.533	114	0.582	179	0.622	120	0.588	
IVS9(-44)	C/C	435	1.000	193	1.000	242	1.000	189	1.000	246	1.000	91	1.000	98	1.000	144	1.000	102	1.000	
	T/C	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	T/T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	C	870	1.000	386	1.000	484	1.000	378	1.000	492	1.000	182	1.000	196	1.000	288	1.000	204	1.000	
	T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
* IVS10(+12)	C/C	154	0.354	60	0.311	94	0.388	61	0.323	93	0.378	26	0.286	35	0.357	59	0.410	34	0.333	
	C/T	206	0.474	99	0.513	107	0.442	93	0.492	113	0.459	47	0.517	46	0.469	61	0.424	52	0.510	0.382
	T/T	75	0.172	34	0.176	41	0.169	35	0.185	40	0.163	18	0.198	17	0.174	24	0.167	16	0.157	
	C	514	0.591	219	0.567	295	0.610	215	0.569	299	0.608	99	0.544	116	0.592	179	0.622	120	0.588	0.456
	T	356	0.409	167	0.433	189	0.391	163	0.431	193	0.392	83	0.456	80	0.408	109	0.379	84	0.412	
IVS10(-43)	C/C	435	1.000	193	1.000	242	1.000	189	1.000	246	1.000	91	1.000	98	1.000	144	1.000	102	1.000	
	C/T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	D=D/Dmax (I)	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	D=D/Dmin (I)	870	1.000	386	1.000	484	1.000	378	1.000	492	1.000	182	1.000	196	1.000	288	1.000	204	1.000	
	T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
IVS14(+45)	G/G	175	0.402	71	0.368	104	0.430	69	0.365	106	0.431	30	0.330	39	0.398	65	0.451	41	0.402	
	G/Del	209	0.480	100	0.518	109	0.450	92	0.487	117	0.476	49	0.539	43	0.439	66	0.458	51	0.500	
	Del/Del	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0.743
	T/Del	51	0.117	22	0.114	29	0.120	28	0.148	23	0.094	12	0.132	16	0.163	13	0.090	10	0.098	
	T/T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	G/T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	G	559	0.643	242	0.627	317	0.655	230	0.609	329	0.669	109	0.599	121	0.617	196	0.681	133	0.652	0.802
	T	51	0.059	22	0.057	29	0.060	28	0.074	23	0.047	12	0.066	16	0.082	13	0.045	10	0.049	
	Del	260	0.299	122	0.316	138	0.285	120	0.318	140	0.285	61	0.335	59	0.301	79	0.274	61	0.299	
IVS14(+73)	G/G	435	1.000	193	1.000	242	1.000	189	1.000	246	1.000	91	1.000	98	1.000	144	1.000	102	1.000	
	G/A	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	A/A	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
	G	870	1.000	386	1.000	484	1.000	378	1.000	492	1.000	182	1.000	196	1.000	288	1.000	204	1.000	
	A	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	
* EXON15	A/A	178	0.409	72	0.373	106	0.438	69	0.365	109	0.443	30	0.330	39	0.398	67	0.465	42	0.412	
	A/C	205	0.471	98	0.508	107	0.442	93	0.492	112	0.455	49	0.539	44	0.449	63	0.438	49	0.480	0.707
	C/C	52	0.120	23	0.119	29	0.120	27	0.143	25	0.102	12	0.132	15	0.153	14	0.097	11	0.108	
	A	561	0.645	242	0.627	319	0.659	231	0.611	330	0.671	109	0.599	122	0.622	197	0.684	133	0.652	0.456
	C	309	0.355	144	0.373	165	0.341	147	0.389	162	0.329	73	0.401	74	0.378	91	0.316	71	0.348	

*: Used for LD analysis

Table3-2: Analysis of Diplotypes and Haplotypes predicted by Phase

Diploptype	Total		Sc		Control		Female		Male		Female-Control		Male-Sc		Male-Control		P-value	
	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq		
Total	435		193		242		189		246		102		98		144			
-CGC/AT-A	177	0.407	85	0.440	92	0.380	80	0.423	97	0.394	41	0.451	39	0.398	53	0.368		
-CGC/-CGC	145	0.333	55	0.285	90	0.372	56	0.296	89	0.362	23	0.253	33	0.337	57	0.396		
AT-A/ATTA	44	0.101	18	0.093	26	0.107	23	0.122	21	0.085	10	0.110	8	0.078	13	0.090		
-CGC/ATGC	24	0.055	12	0.062	12	0.050	9	0.048	15	0.061	5	0.055	7	0.069	4	0.056		
ATGC/AT-A	18	0.041	6	0.031	12	0.050	6	0.032	12	0.049	4	0.044	2	0.020	10	0.069		
AT-A/ATGA	7	0.016	5	0.026	2	0.008	3	0.016	4	0.016	2	0.022	3	0.029	1	0.007		
-CGC/-C-C	4	0.009	2	0.010	2	0.008	1	0.005	3	0.012	1	0.011	1	0.010	2	0.014		
AT-A/ATTC	4	0.009	3	0.016	1	0.004	3	0.016	1	0.004	2	0.022	1	0.010	0	0.000		
-CGC/ATGA	3	0.007	2	0.010	1	0.004	2	0.011	1	0.004	1	0.011	1	0.010	0	0.000		
-CGC/-C-A	2	0.005	2	0.010	0	0.000	1	0.005	1	0.004	1	0.011	1	0.010	0	0.000		
ACGC/ACGC	2	0.005	1	0.005	1	0.004	2	0.011	0	0.000	1	0.011	0	0.000	1	0.010		0.232
ATGC/ATGC	1	0.002	1	0.005	0	0.000	0	0.000	1	0.004	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
AT-A/-CGA	1	0.002	0	0.000	1	0.004	1	0.005	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
ATTA/-C-C	1	0.002	0	0.000	1	0.004	1	0.005	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
ATTC/AT-C	1	0.002	1	0.005	0	0.000	0	0.000	1	0.004	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
-C-C/-CGA	1	0.002	0	0.000	1	0.004	1	0.005	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
$\lambda = D/D_{max} (D \times 0)$																		
Haplotype	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq	Count	Freq
Total	870		386		484		378		492		204		196		288			
-CGC	500	0.575	213	0.552	287	0.593	205	0.542	295	0.600	95	0.522	110	0.561	177	0.615		
AT-A	251	0.289	117	0.303	134	0.277	116	0.307	135	0.274	59	0.324	57	0.291	77	0.267		
ATTA	45	0.052	18	0.047	27	0.056	24	0.064	21	0.043	10	0.055	8	0.039	14	0.045		
ATGC	44	0.051	20	0.052	24	0.050	15	0.040	29	0.059	9	0.050	11	0.054	6	0.031		
ATGA	10	0.012	7	0.018	3	0.006	5	0.013	5	0.010	3	0.017	4	0.020	2	0.010		
-C-C	6	0.007	2	0.005	4	0.008	4	0.011	0	0.000	2	0.011	0	0.000	2	0.010		
ATTC	5	0.006	4	0.010	1	0.002	3	0.008	2	0.004	2	0.011	2	0.010	2	0.007		0.308
ACGC	4	0.005	2	0.005	2	0.004	3	0.008	3	0.006	1	0.006	1	0.005	0	0.000		
-C-A	2	0.002	2	0.005	0	0.000	1	0.003	1	0.002	1	0.006	1	0.005	0	0.000		
AT-C	1	0.001	1	0.003	0	0.000	1	0.003	0	0.000	0	0.000	1	0.005	0	0.000		
-C-C	1	0.001	0	0.000	1	0.002	1	0.003	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000		
-CGA	1	0.001	0	0.000	1	0.002	0	0.000	1	0.002	0	0.000	0	0.000	0	0.000		

Table4: Haplotypes of CalDAG-GEFI

Haplotype	Total		Control		Schizophrenia		vs others		all		
	n	frequency	n	frequency	n	frequency	X ²	p	X ²	p	
A	-CGC	500	0.575	287	0.593	213	0.552	1.489	0.222		
B	AT-A	251	0.289	134	0.277	117	0.303	0.721	0.396		
C	ATTA	45	0.052	27	0.056	18	0.047	0.367	0.545		
D	ATGC	44	0.051	24	0.050	20	0.052	0.022	0.882		
E	ATGA	10	0.011	3	0.006	7	0.018	2.693	0.101		
F	-C-C	6	0.007	4	0.008	2	0.005	0.298	0.585	13.593	0.938
G	ATTC	5	0.006	1	0.002	4	0.010	2.587	0.108		
H	ACGC	4	0.005	2	0.004	2	0.005	0.052	0.820		
I	-C-A	2	0.002	0	0.000	2	0.005	0.052	0.820		
J	AT-C	1	0.001	0	0.000	1	0.003	1.255	0.263		
K	-CTC	1	0.001	1	0.002	0	0.000	0.798	0.372		
L	-CGA	1	0.001	1	0.002	0	0.000	0.798	0.372		
		870		484		386					

Table5: Calculated value of linkage disequilibrium

		count				frequency				D	
		IVS10(+12)		ExON15		IVS10(+12)		ExON15		IVS9(-92) Exon15	IVS10(+12) Exon15
		C	T	C	A	C	T	C	A		
total	IVS9 (-92) Del	510	0	507	3	0.586	0.000	0.583	0.003		
	A	4	356	54	306	0.005	0.409	0.062	0.352		
	C	511	3			0.587	0.003				
	EXON15 A	50	306			0.057	0.352				
Schizophrenia	IVS9 (-92) Del	217	0	215	2	0.562	0.000	0.557	0.005		
	A	2	167	27	142	0.005	0.433	0.070	0.368		
	C	217	2			0.562	0.005				
	EXON15 A	25	142			0.065	0.368				
Control	IVS9 (-92) Del	293	0	292	1	0.605	0.000	0.603	0.002		
	A	2	189	27	164	0.004	0.390	0.056	0.339		
	C	294	1			0.607	0.002				
	EXON15 A	25	164			0.052	0.339				

D' = D/Dmax (D > 0)
D' = D/Dmin (D < 0)

Dmin = max(-PaPc, -PbPd) = (-1) × min(PaPc, PbPd)
Dmax = min(PaPd, PbPc)
D = PaPbPd - PadPbc

Pa + Pad + Pb + Pbd = 1
Pa = Pac + Pad
Pb = Pbc + Pbd
Pc = Pac + Pbc
Pd = Pad + Pbd

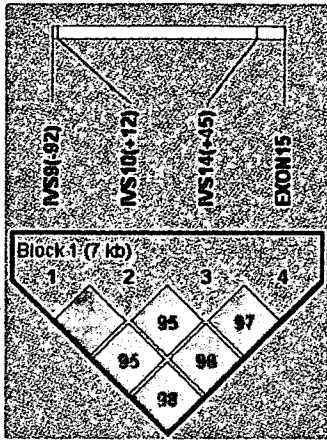


Figure 2. Linkage disequilibrium coefficient (D') and haplotype blocks of the CaldAG-GEFI gene

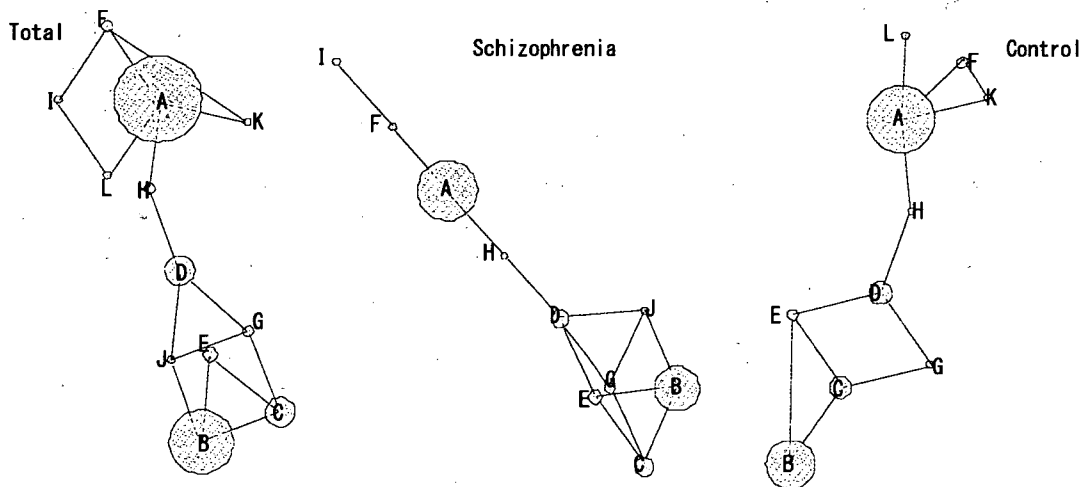


Figure 3. Cladogram of the CaldAG-GEFI gene using 4 haplotypes.

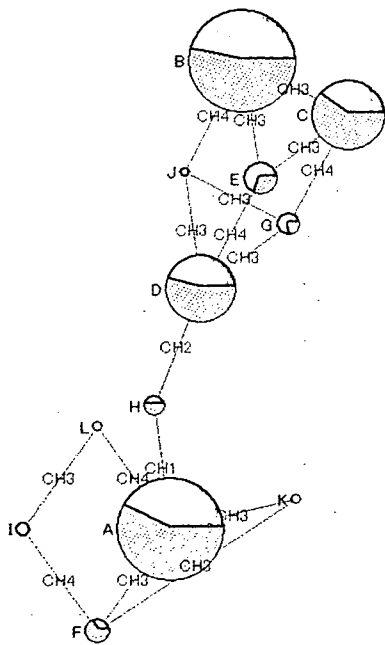


Figure 4. Cladogram of the CaldAG-GEFI gene using 4 haplotypes.

Yellow and blue region indicate the frequency of control and schizophrenia, respectively. Red dotted circles indicate statistical significant haplotypes (none).

cAMP-GEFII 遺伝子と統合失調症の相関解析

分担研究者 川寄 弘詔 九州大学大学院医学研究院精神病態医学 講師

研究要旨：我々は cAMP-GEFII 遺伝子のエクソンおよびプロモーター領域を対象とし、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および新規 SNP の検索を行った。続いてその中で P 値の低い二つの SNP を選択し、それらを含む二つの領域についてサンプルを増やし追実験を行ったが有意な差は現われなかった。

A. 研究目的

cAMP-GEF 遺伝子は、Rap1-GEF (guanine nucleotide exchange factor) 遺伝子ファミリーに属しており、その GEF 活性は cAMP、カルシウムおよびジアシルグリセロール (diacylglycerol (DAG)) のような代表的なセカンドメッセンジャー分子の結合により、それぞれの GEF ドメインがポジティブな制御を受け活性化され、Ras スーパーファミリーの small GTPases を活性化することによって、細胞内のシグナルを伝達することが知られている。

本経路は、プロテインキナーゼによるリン酸化カスケードによるシグナル伝達とは異なることが報告されている。ドーパミン受容体を介したシグナルは細胞内の cAMP 濃度を変化させることが知られており、プロテインキナーゼ A を介した経路以外にも、cAMP と GEF の結合部位をもつ cAMP-GEFII を介したシグナル伝達経路が発見されている。また cAMP-GEFII は中枢神経での発現が強いため、本遺伝子は遺伝要因との関連が示唆されている、双極性障害をはじめとする種々の精神疾患の有望な候補遺伝子の一つである。

今回我々は、双極性障害の対照疾患として、疫学的に遺伝要因が強いと報告されており多因子遺伝疾患である統合失調症罹患群、および健常群の DNA サンプルを用いて、候補遺

伝子として細胞内 cAMP の結合部位をもつ cAMP-GEFII 遺伝子を選択し、エクソンおよびプロモーター領域のゲノタイピングおよび新規 SNP の検索を行った。

B. 研究方法

対象群：

我々は、全エクソンおよびプロモーター領域を対象とした一次実験において、DSM-IV により診断された統合失調症群 96 名（平均年齢 55.2 歳、男性 61 名、女性 35 名）および健常対照群 112 名（平均年齢 23.7 歳、男性 86 名、女性 26 名）を対照とした実験を行い、まず、有意な傾向のあるマーカーを選出した。

続いて、一次実験で得られた優位な傾向のある多型マーカーを含む領域を対象とし、それらマーカーと統合失調症の相関解析を行う二次実験を行った。この二次実験において我々は、DSM-IV により診断された統合失調症群 79 名を一次実験の統合失調症群 96 名に新たに加えた統合失調症群 175 名（平均年齢 51.5 歳、男性 98 名、女性 77 名）および完全に新規な健常対照群 138 名（平均年齢 48.4 歳、男性 77 名、女性 61 名）を対照とした。

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。我々は一次実験においては全エクソンおよびプロモーター領域、二次実験においては一次実験において低い P 値が得られた 2 つの SNP とその周辺を対象とした実験を行った。遺伝子上の SNP とエクソンの位置を図 1 として示した。

PCR の反応溶液の総量は 10 μ 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、d NTP 各 2mmol、10xPCR Buffer II (Roche) 1 μ 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 μ l に Shrimp alkaline phosphatase (Roche) 1U、10x Dephosphorylation buffer (Roche) 1.3 μ l、Exonuclease I、2U (NEW ENGLAND BioLabs) を混合し総量を 3 μ l にしたものを加え、37°C 1 時間、80°C 15 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 :

cAMP-GEFII 遺伝子上のデータベースに登録済みの DNA 多型については、データベースの情報を参考とし本研究において使用した。SNP データベースは、NCBI dbSNP build120 (dbSNP) and JSNP database (JSNP) を用いた。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。

統計学的解析は、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 ($\alpha=0.05$)。ソフトウェアは単変量解析については StatView-J ver4.11(SAS Institute Inc., U.S.A.) を使用した (表 2, 3)。

ハプロタイプ解析はコンピュータ・ソフトウェアであるフェイズを用いてハプロタイプを決定した後、カイ二乗検定による解析を行った (表 4)。

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 (図 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。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された。

C. 研究結果

本研究の一次実験において我々はエクソン 17 および 22 周辺のイントロンに存在する 2 つのマーカーのアレル頻度において有意な傾向を確認した。しかし他のマーカーにおい

ては有意な傾向が見られなかった (表1)。

つづいて我々は一次実験において有意な傾向の見られたマーカーを含む 2 つの領域を対象とした二次実験を行った。これらの領域には他に 5 つの SNP が存在しているため、それらも対象とした 7 つの SNP についてゲノタイピングを行った。

実験で得られたゲノタイプ頻度およびアレルタイプ頻度を元にカイ二乗検定を行った。その結果、ゲノタイプ頻度における比較では有意差は得られなかった (表2)。アレルタイプ頻度の比較においてひとつのマーカーが優位さを示したがボンフェローニの多重検定補正によりこの有意差は消失した (表3)。

つづいて二次実験の結果を元にハプロタイプ解析を行った。実験対照とした 7 つのマーカーから 14 のハプロタイプが推定された。カイ二乗検定により統計解析を行ったが有意差は得られなかった (表4)。

さらに LD 解析を行った結果イントロン 17 周辺の 5 つの SNP が 1 つの LD ブロックを形成していることがわかった (図2)。

D.E. 考察と結論

今回の研究において我々はエクソン 17、22 周辺のイントロンに存在する 7 つの SNP に対して解析を行った。

Genotype 頻度の解析解析対象とした 7 つの SNP では有意差が認められなかった。

Allele 頻度の解析では、I22SNP 2 について健常群と統合失調症罹患群の間の比較において、有意差が見られたが、その他の SNP では有意差が認められなかった。

Haplotype 解析では、7 つの SNP から 14 個の Haplotype が推定され、健常群と統合失調症罹患群の間の比較において、有意差はみられなかった。

LDblock の解析では、17 SNP1 から 17 SNP4 までが同じ block に属することがわかった。これにより、今後は TagSNP を選択

することで、実験を簡略化することができる。

また、今回 genotype 頻度や Allele 頻度の解析で有意差がみられた I22SNP1、I22SNP2 については、LDblock は形成されなかった。

cAMP-GEF II 遺伝子の SNP の解析において、有意な結果が得られ、本遺伝子は統合失調症の研究における良い候補遺伝子であり、今後より詳しい研究がなされる必要があると考えられる。

F. 健康保険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

Kawasaki H, Mitsuyasu H, Kobayashi Y, Gotoh L, Oribe N, Takata A, Kanba S:

Association analysis of human cAMP-GEFII gene polymorphisms with Japanese schizophrenia patients. The American Society of Human Genetics 2007 Annual Meeting, 2007.10.25, アメリカ・サンディエゴ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1、一次実験のアリル頻度

name	registration		Allele	Allele Frequency		p-value
	JSNP	DbSNP		MS	Sc	SC vs. Control
P1-1	174011	3813814	G>A	0.578	0.631	0.094
E3-1		6433382	A>G	0.540	0.571	0.490
I9-1			C>T	0.826	0.789	0.457
I9-3			G>A	0.986	0.979	0.568
I16-1	042318	2290374	A>G	0.737	0.753	0.861
I17-4	076341	3214814	del>T	0.805	0.894	0.075*
I22-1	014164	2242079	A>G	0.820	0.902	0.084*
I22-2			G>C	0.966	0.983	0.288
I23-1			A>G	0.885	0.898	0.887
I23-2			T>C	0.936	0.925	0.770
I23-3			C>T	0.935	0.952	0.600
I23-4			T>del	0.945	0.946	0.518
I25-1	123977	729486	G>C	0.840	0.819	0.212
I29-1			A>T	0.641	0.665	0.850
I29-2			A>T	0.816	0.841	0.752
I29-3	042322	2290378	G>A	0.654	0.672	0.923
I29-4			G>C	0.995	0.989	0.496
I29-5			C>T	1.000	0.989	0.133

(* = P<0.09)

表 2、二次実験のゲノタイプ頻度

name	genotype&allele type	dbSNP	Control	Schizophrenia	P-value
I17-01	11 bp/11 bp	n.r	0.775	0.806	0.497
	11 bp/Del		0.196	0.183	
	Del/Del		0.029	0.011	
I17-02	C/C	rs11687902	0.768	0.811	0.644
	C/T		0.217	0.177	
	T/T		0.014	0.011	
I17-03-01	G/G	rs11687990	0.775	0.811	0.634
	G/A		0.203	0.177	
	A/A		0.022	0.011	
I17-03-02	C/C	rs13026645	0.703	0.794	0.172
	C/T		0.261	0.177	
	T/T		0.036	0.029	
I17-04	Del/Del	rs3214814	0.739	0.794	0.516
	Del/T		0.246	0.194	
	T/T		0.014	0.011	
I22-01	A/A	rs2242079	0.775	0.800	0.080
	A/G		0.181	0.194	
	G/G		0.043	0.006	
I22-02	C/C	n.r	1.000	0.977	0.202
	C/G		0.000	0.017	
	G/G		0.000	0.006	

表 3、二次実験のアリル頻度

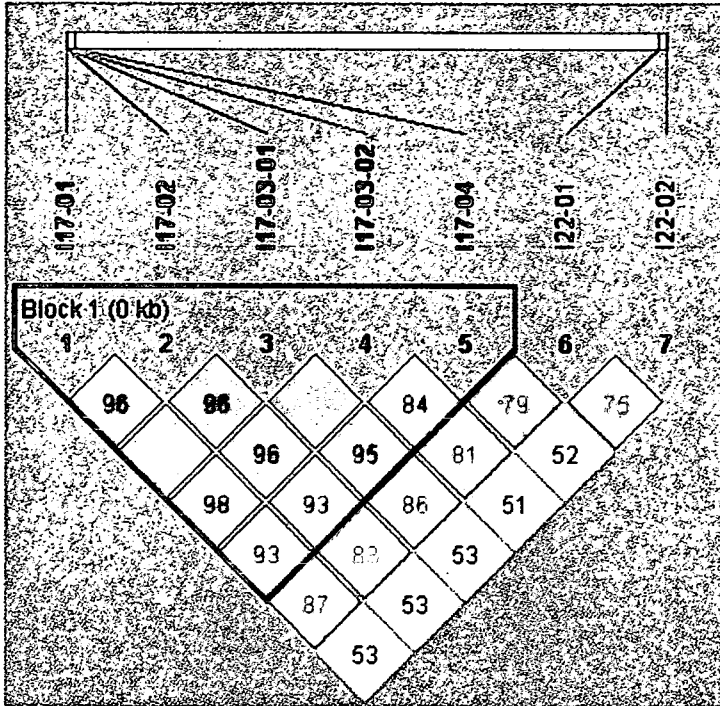
name	alleletype	Control	Schizophrenia	P-value
I17-01	11 bp	0.873	0.897	0.348
	Del	0.127	0.103	
I17-02	C	0.877	0.900	0.358
	T	0.123	0.100	
I17-03-01	G	0.877	0.900	0.358
	A	0.123	0.100	
I17-03-02	C	0.833	0.883	0.075
	T	0.167	0.117	
I17-04	Del	0.862	0.891	0.268
	T	0.138	0.109	
I22-01	A	0.866	0.897	0.227
	G	0.134	0.103	
I22-02	C	1.000	0.986	0.046 *
	G	0.000	0.014	

(* = P<0.05)

表 4、ハプロタイプ頻度

haplotype	Control	Schizophrenia	P-value
+CGC-AC	0.793	0.843	0.150
-TAT+GC	0.105	0.071	
+CGT-AC	0.040	0.017	
+CGC+AC	0.018	0.014	
+CGC-GC	0.014	0.017	
-TAT+AC	0.007	0.014	
-TAT+GG	0.000	0.009	
-CAT+GC	0.007	0.000	
-TAT-GC	0.004	0.003	
+TGC-AC	0.007	0.000	
+CGC-AG	0.000	0.006	
-CGT-GC	0.004	0.000	
-TAT-AC	0.000	0.003	
-CGC-GC	0.000	0.003	

図2、LDブロック



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

5-HT トランスポーター遺伝子の多型

分担研究者 川寄弘詔
九州大学大学院医学研究院精神病態医学 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：セロトニントランスポーター遺伝子に見られる SERTPR (serotonin transporter linked polymorphic region) と SERTin2 (Serotonin Transporter Variable Number of Tandem Repeats in Second Intron) と呼ばれる 2 つの多型について、双極性障害患者群と健常対照者群で比較を行った。このうち、SERTPR について、二群間のゲノタイプ頻度及びアレル頻度で有意差を認めた。これは、セロトニントランスポーター遺伝子の機能変化が、気分障害の病態に関連している可能性を示唆する結果であると思われる。

A. 研究目的

セロトニン (5-HT) は、動植物界に広く存在する生体活性アミンであり、中枢神経系においては、神経伝達物質として、摂食行動、睡眠、体温調節、性行動、痛覚、神経内分泌、認知、記憶などの調節に関わっている。5-HT の細胞内への取り込みに働くポンプ機能をもつセロトニントランスポーター (5-HTT) は、5-HT の神経伝達を終了させ、シナプス間隙における 5-HT 濃度を調節する役割をもつ。5-HTT は、抗うつ薬の作用部位の一つであり、気分障害の発病機序との関係が示唆されている。遺伝子の多型による 5-HTT の機能の変化は、様々な精神疾患に関連している。ヒトの 5-HTT 遺伝子は、31kb の長さを持ち、第 17 染色体長腕 q11.1-q12 に存在し、14 のエクソンからなる。ヒト 5-HTT 遺伝子の 5' 上流の転写調節部位中には機能性多型が存在し、SERTPR と呼ばれている。これは、44bp の配列の挿入の有無による insertion/deletion 多型であり、挿入がある場合は 1 型 (long type、16 回繰り返

型)、挿入のない場合は s 型 (short type、14 回繰り返し型) と呼ばれる。S 型のプロモーターは 1 型のプロモーターに比較し、in vitro での基礎転写活性が約 50%低いことが示されている。また、血小板の 5-HT 取り込み活性も s 型で低く、1 型で高いことが報告されている。5-HTT 遺伝子の第 2 イントロンには 16 ないし 17bp のエレメントが 9 回、10 回、ないし 12 回繰り返す VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 多型が存在し、SERTin2 と呼ばれている。この多型も in vitro での転写活性の違いや血小板の 5-HT の取り込み、5-HTT 発現数の違いに関連していることが報告されている。上記 2 多型は、気分障害との関連が示唆されている。特に、SERTPR 多型との関連では、大うつ病性障害や、双極性障害においては s アレルの頻度が高いという報告や、s アレルを持つ群では、抗うつ薬による躁転のリスクが高いという報告、さらには多型の種類によって、抗うつ薬である SSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor) の効果に差があるとい

う報告などがされており、非常に注目されている。今回、我々は対照群 77 名、双極性障害患者 23 名について、上記 2 多型の解析を行った。

B. 研究方法

精神疾患の分類と診断の手引き第 4 版 (DSM-IV) の双極性障害の診断基準を満たすものを、構造化面接 (structured clinical interview for DSM : SCID) により集めた。双極性障害患者群は、計 23 名であり (男性 : 11 名、女性 : 12 名、平均 42.61 才)、いずれも九州大学病院で入院中及び外来通院中の患者である。健常対照群は、計 77 人であり (男性 : 43 名、女性 : 34 名、平均 35.39 才)、久山町住民、九大病院職員及び学生から集めた。対照群は、社会経済状態、身体的状態、精神的状態などを質問紙票により収集した情報に基づいて選択された。これらの質問紙票は気質性格質問票 (Cloninger, Svrakic, & Przybeck, 1993)、(Kijima et al., 1996)、ベック抑うつ質問票 (Beck, Ward, & Mendelson, 1961)、状態特性不安検査 (Spielberger, Gorsuch, & Lushene, 1970)、モーズレイ強迫症状評価尺度 (Hodgson & Rachman, 1977) などの心理検査バッテリーの情報を含む。対照者の選択基準を、(1) 精神疾患の既往歴がないこと、(2) 就業して社会適応が良好であること、および (3) 知的問題がないこととした。精神疾患の除外は、SCID のスクリーニングモジュールを用いた。対象者全員には説明と同意を得た。この研究は九州大学大学院倫理委員会の承認を得て、そのガイドラインに従い実施された。

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、ゲノタイプ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。我々は日本人サンプルの SNP データベースである JSNP に登録されている ADORA1 遺伝子上の 29 個の 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図 1 として示した。

PCR の反応溶液の総量は 10 μ 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、d NTP 各 2mmol、10xPCR Buffer II (Roche) 1 μ l を混入し、反応させた。

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

遺伝子型の決定 :

Agilent2100 Labchip を用いた電気泳動法により SERTPR, SERTin2 の遺伝子多型を決定した。

統計解析 :

2 つの多型について、双極性障害群と健常対照者群の二群間で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。

(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。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された

C. 研究結果

結果を Table1 及び Table2 に示す。

SERTPR についての genotype frequency は、