

図1 日本人パーキンソン患者2011検体，対照18381検体のゲノムワイド関連解析より同定された4つのパーキンソン病遺伝子座の抜粋²⁾

PDの感受性遺伝子を発見するため，ここ10年間，多くの研究がなされてきたが，アルツハイマー病におけるApoE4多型のような確実に発症リスクを高める遺伝因子はなかなか確認されていなかった。ゲノムワイド有意水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす確実なものは， α シヌクレインの3' 非翻訳領域SNP (Gasserら³⁾，筆者ら⁴⁾が同定) とゴーシェ病遺伝子GBAのrare variant⁵⁾⁶⁾の2つの遺伝子のみであった。

2. パーキンソン病のGWAS (ゲノムワイド関連解析)

パーキンソン病に関しても30~50万SNPチップのGWASが数個論文報告されたが，小~中人数の解析であり，これらの論文では確実なことは言えなかった。我々は，大規模の患者対照集団と，56万個のSNPを搭載したイルミナHap550アレイを用いて，GWASと，2つの独立な再現研究を行い，PDの遺伝リスク因

子を明らかにしようとした。患者検体は，11施設より提供され，総数としては，患者2,011検体，対照18,381検体を用いた。まず，GWASステージとして，患者1,078検体，対照2,628検体について，それぞれ56万個のSNP型を決定した²⁾。

SNPや検体のジェノタイプ成功率などのよい患者988検体，対照2,521検体の，435,470 SNPのジェノタイプをもちいて，GWASステージのtrend検定では， $P < 5 \times 10^{-8}$ のゲノムワイド有意水準を超える遺伝子は α -synucleinのみであったものの，その一方で，Quantile-Quantile解析からは， α -synuclein以外の領域のSNPにおいても，帰無仮説のもとで予想される χ^2 統計量分布からの，有意，かつ強力なインフレーションを観察した。このことは，これらインフレートしたSNPの中に，真なる感受性座が存在していること意味している。

そこで，GWASステージで関連を認めたp値

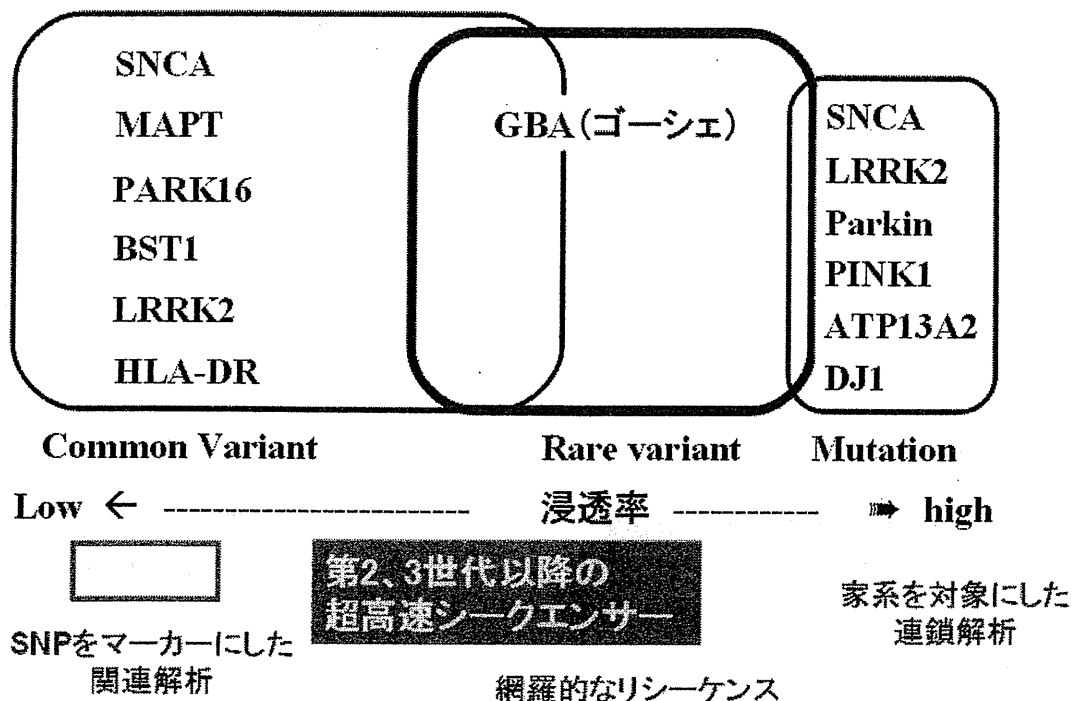


図2 パーキンソン病の遺伝メンデル遺伝性変異以外に、SNPとしてシヌクレイン (SNCA), PARK16, BST1, LRRK2, rare variantとしてゴーシェ遺伝子 (GBA) が重要。

上位から337 SNPそれぞれが、2つの独立した患者・対照検体セットでも有意か、を検証する再現研究を行った。さらに全検体 (PD 2,011検体, 対照18,381検体) のジェノタイプデータを用いてメタ解析を行ったところ、絶対的な有意水準 $P < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする4つのPD感受性遺伝子座を見いだした²⁾。

まず2つの新しいPD感受性座を、1q32 (PARK16と命名, $P = 1.52 \times 10^{-12}$) と4p15 ($P = 3.94 \times 10^{-9}$) に発見した。1q32領域は、3つの遺伝子 (NUCKS1, RAB7L1, SLC41A1) を含む連鎖不平衡ブロックであるが、発現量的形質座(eQTL)解析から、NUCKS1が、最も有力な責任遺伝子であると考えた (図1a)。また、4p15領域は、BST1のみを含んでいた。さらに、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子である、 α -synuclein (4q22, $P = 7.35 \times 10^{-17}$, 図1b) とLRRK2 (12q12, $P = 2.72 \times 10^{-8}$) の領域を同定した。 α -synucleinは、我々も以前報告した確

実なPD感受性遺伝子である。また、本研究で初めて、LRRK2領域のありふれた多型が、ゲノムワイド水準でPDと関連することが示された。

次にヨーロッパ起源の集団のPDのGWAS研究を行っていたグループと、データを交換した。彼らの研究では、 α -synuclein領域、Tau領域のみに、強い関連が検出されていた⁷⁾。そこで、我々の発見したPARK16・BST1・LRRK2の再現研究を依頼したところ、PARK16とLRRK2の関連は強く再現されたが、BST1は再現されなかった。逆に、我々は、彼らの検出したTauの関連の再現を試みたが、我々の検体セットでは、再現されなかった。よって、 α -synuclein・PARK16・LRRK2は2人種に共通のPDリスクであり、Tau・BST1はのリスク多型の影響は人種特異的であると考えた²⁾。

また孤発性PDの発症に、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子が、密に関係していること

表 日本人集団における各遺伝リスクの大きさ (寄与度)

遺伝リスクマーカー	日本人集団における リスクアレル頻度	オッズ比	人口寄与危険度 (もしこのリスクが、 日本人集団になかったら、 何%の患者が減るか)	
PARK16	rs947211	0.50	1.30	13.0
BST1	rs11931532	0.42	1.24	9.1
SNCA	rs11931074	0.58	1.37	17.6
LRRK2	rs1994090	0.08	1.39	3.0
Tau	rs393152	1.00	1.30	23.0
GBA	RecNcil	0.0018	7.21	1.1 (GBA内の11個の変異を 全てたし合わせると、4.6)

人口リスク寄与度 (もしこのリスクが日本人集団になかったら、何%の患者が減るかの指標) を示す。SNPはオッズ比は低いが人口リスク寄与度は高い。GBAなどのrare variantはその逆である。

を明示した。原因変異により常染色体優性遺伝性PDを引き起こす遺伝子が、そのSNPを通して、孤発性PDの遺伝リスクとなったことは興味深い。このような関係は、PDを超えて、ほかの疾患に対しても、あてはまると思われる⁹⁾。

PARK16領域には、3つの遺伝子が存在するが、発現量的形質座解析から、NUCKS1が、最も有力な責任遺伝子であると考えた (図1a)。NUCKS1は、リン酸化部位をふくむ核タンパクであるが、神経系における機能は、未知であり、新たなPD発症のパスウェイを開拓する可能性がある⁹⁾。

BST1は、細胞内Ca²⁺貯蔵からのCa²⁺放出を誘発するサイクリックADPリボースの形成を触媒する酵素であり⁹⁾、最近提唱されている、ドパミン細胞死のCa²⁺ストレス説を想起させ、興味深い。これらは従来のPD病態説からは全

く新規な遺伝子であり、従来説にとらわれず、新規なものを同定できるところにGWASの強みがある。

さらに最近アメリカの別グループのGWASから、HLA-DR抗原の領域との関連が報告された ($P = 1.9 \times 10^{-10}$)。PD脳ではDR抗原陽性のミクログリアが検出されること、NSAIDsは疫学的にPDのリスクを減少させることなどもあり、PDと炎症の関係を示しており興味深い¹⁰⁾。

3. 第二世代のGWAS

さらにパーキンソン病においては、さらなる国際共同研究として欧米の5つのグループがそれぞれ独立に行っていたGWASを合わせてメタ解析を行い (計患者5333, 対照12019)、有意なSNPをさらに患者7053, 対照9007で再現実験を行い、ゲノムワイド有意水準 $P < 5 \times$

10⁻⁸を超える遺伝子を従来の6個の他に、*ACMSD*, *STK39*, *LAMP3*, *SYT11*, *CCDC62*の5個を同定した¹¹⁾。

GWASによって多数の疾患感受性遺伝子が同定されたものの、それらは遺伝要因全体の一部しか説明できないことから (missing heritability), SNPとしては、このような圧倒的な数の試料を各地から集めてゲノムワイドメタ解析を行いより多くの感受性遺伝子を同定することが行われだしており、「第2世代のGWAS」とも言われている。

おわりに

おそらく数10個あるパーキンソン病の疾患感受性遺伝子としては、 α シヌクレイン, GBA, 今回のPARK16, BST1, LRRK2など以外に確立されたものは少ないのが現状であり、今後のGWASからさらなる遺伝子の解明, そこから新たな疾患パスイェとそこからの治療薬開発が期待される (図2)。これら4座位 (1q32, 4p15, 4q22, 12q12) の, 人口リスク寄与度 (もしこのリスクが日本人集団になかったら, 何%の患者が減るかの指標) を示すが, それぞれ13%, 8%, 18%, 3%と見積もられ, SNPはオッズ比は低い人口リスク寄与度は高い。GBAなどのrare variantはその逆であり, どちらも重要である (表)²⁾。

しかし現在のSNPチップによるGWASでは, アレル頻度の低いものは同定不可能であり (搭載されていない), rare variantは見過ごされてしまう。エクソンキャプチャー, 次世代シーケンサーによるエキソームリシーケンシングが行われており, 期待される。

文献

- 1) Farrer MJ: Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7:306-318, 2006.
- 2) Satake W, et al: Genome-wide association study identifies

- common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1303-1307, 2009.
- 3) Mueller JC, et al: Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57: 535-541, 2005.
- 4) Mizuta I, et al: Multiple candidate gene analysis identifies a-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006.
- 5) Mitsui J, et al: Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66:571-576, 2009.
- 6) Sidransky E, et al: Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361: 1651-1661, 2009.
- 7) Simon-Sanchez J, et al: Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1308-1312, 2009.
- 8) Ostvold AC, et al: Molecular cloning of a mammalian nuclear phosphoprotein NUCKS, which serves as a substrate for Cdk1 *in vivo*. *Eur J Biochem* 268: 2430-2440, 2001.
- 9) Yamamoto-Katayama S, et al: Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. *J Mol Biol* 316: 711-723, 2002.
- 10) Hamza TH, et al: Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 42:781-785, 2010.
- 11) International Parkinson Disease Genomics Consortium: Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377:641-649, 2011.

第19回日本乳癌学会学術総会のご案内 本学会総会は下記日程で開催します。

会期: 2011年9月2日 (金) ~4日 (日)
 会場: 仙台国際センター 東北大学百周年記念会館
 〒980-0856 仙台市青葉区青葉山無番地
 022-265-2211 (代)
 会長: 大内憲明 (東北大学病院がんセンター長 東北大学腫瘍外科学分野教授)
 テーマ: 「未来のために、今できること-Challenge to the Future」
 連絡先: 事務局 東北大学大学院医学系研究科外科病態学講座腫瘍外科学分野
 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1番1号
 TEL. 022-717-7214 FAX. 022-717-7217
 運営準備室
 日本コンベンションサービス株式会社 東北支社
 〒980-0824 仙台市青葉区支倉町4-34 丸金ビル6階
 TEL. 022-722-1311 FAX. 022-722-1178
 E-mail: 19jbcsc@convention.co.jp

<Special Article>

孤発性パーキンソン病の分子病態機序はどこまで解明されたか

戸田達史*

要 旨

- 孤発性パーキンソン病の発症機序としては、ミトコンドリア呼吸系酵素の障害、炎症反応、酸化ストレス障害が一因とされてきたが、遺伝性パーキンソン病家系の解析などから6つのメンデル遺伝性原因遺伝子が明らかにされ、蛋白分解異常の重要性が示された。
- ゲノムワイド関連解析による新たな疾患感受性遺伝子の同定や、コーシェ病変異も rare variant として重要である。
- α -シヌクレインのミスフォールド蛋白質が近隣の神経細胞に伝播していくシヌクレインプリオン仮説も提唱されている。
- ミクログリアの活性化を伴う継続的な炎症状態も注目される。

はじめに

パーキンソン病(PD)は、臨床的には、振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害を主徴とし、認知症、自律神経障害などのさまざまな随伴症状を呈する神経変性疾患である。わが国には16万人以上の患者が存在するが、今後社会の高齢化に伴いさらなる患者数増加が予想されている。一部は遺伝性であるが、患者の約95%は孤発性であり、本稿では孤発性PDの分子病態機序について、現在主流となっている仮説に加え、最近のトピックスも含めて概観する。

孤発性PDは多因子遺伝性疾患である

症例的には大多数(90%以上)の孤発性PDの原因は、現時点では不明であるが、加齢および複

数の影響力の弱い遺伝因子(おそらく数十個からなる)と環境要因の組み合わせにより発症する多因子遺伝性疾患と考えられている。Fig. 1に示すように各遺伝要因と環境要因の総和が閾値を超えたときに発症すると考えられている(Fig. 1)。遺伝要因が関係するということの根拠は、①患者の約10%に家族内発症がみられる、②患者の同胞における有病率の一般集団の有病率に対する比(λ_s)は6.7(アイスランドの報告)、③一卵性双生児での疾患一致率(55%)が二卵性双生児での一致率(18%)の約3倍であった、ということから示唆されている。

一方、PD症例の90%以上は孤発性発症であるが、5~10%は家族性(その一部はメンデル遺伝性)に発症する。メンデル遺伝性PD家系の連鎖解析などから、6つのメンデル遺伝性PD原因遺伝子(α -シヌクレイン、パーキン、*LRRK2* 遺伝子

* T. Toda(教授): 神戸大学大学院医学研究科神経内科学。

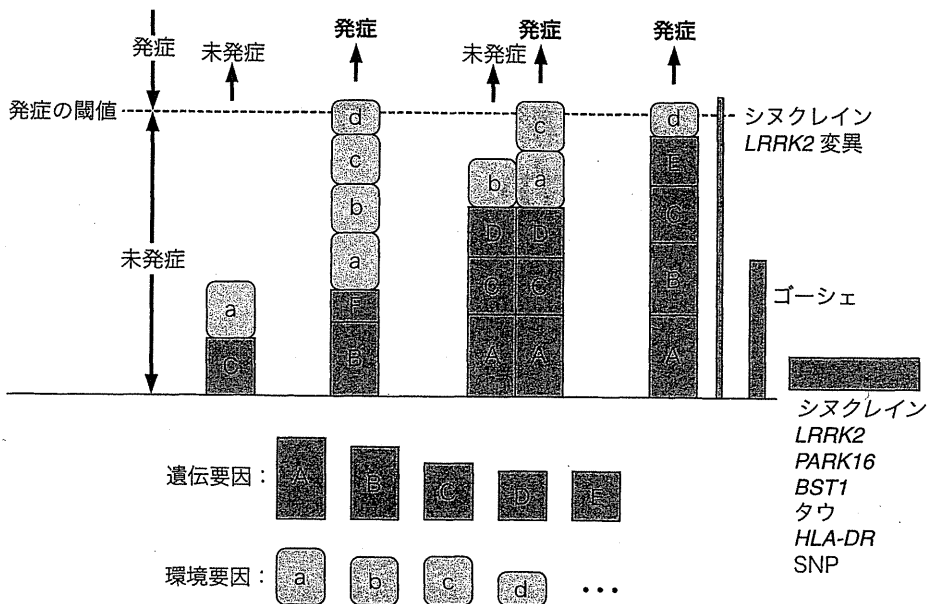


Fig. 1. 孤発性 PD は多因子遺伝性疾患

PD, アルツハイマー病, または生活習慣病を含むほとんどの疾患は, 複数の遺伝的要因と複数の環境要因の積み木の総和が, ある閾値を超えたとき発症すると考えられている. メンデル遺伝性変異以外に, common variant として α -シヌクレイン, *PARK16*, *BST1*, *LRRK2*, タウ, *HLA-DR* の SNP が, また rare variant としてゴーシェ病遺伝子が重要である.

など)が明らかにされた. これまでにレビー小体の主要構成成分である α -シヌクレインのほか, プロテアソーム系に関係する遺伝子(パーキン, *UCH-L1*), ミトコンドリアに関係する遺伝子(*PINK1*, *DJ-1*), 酸化ストレスに関係する遺伝子(*DJ-1*)などが同定されている. 孤発性 PD, メンデル遺伝性 PD とも, 一部共通の発症メカニズムが存在していると考えられ, それらを切り口にして孤発性 PD の病態解明が進んでいる¹⁾.

メンデル遺伝性 *PARK* 遺伝子の孤発性 PD 病態における立ち位置

1) *PARK1*, *PARK4*(α -シヌクレイン)について→1997年に *PARK1*(α -シヌクレイン)遺伝子が同定されたのを皮切りに, 次々に *PARK* 遺伝子の同定が進むと, そのほとんどが孤発性 PD の病態メカニズムにも関係する蛋白であることが判明した(Table 1, Fig. 2)¹⁾. もっともインパクトが強かったのは, *PARK1* 遺伝子産物 α -シヌクレイン

蛋白が, メンデル遺伝性 PD, 孤発性 PD 両方のレビー小体の主要成分であったという報告である. α -シヌクレインはメンデル遺伝性 PD, 孤発性 PD の病態に共通した分子であることにより, α -シヌクレイン変異の解析は, 孤発性 PD のモデルにもなると考えられる. アミノ酸変異をもつ α -シヌクレインは *in vitro* で重合化が促進することが知られており, 野生型 α -シヌクレイン蛋白もリン酸化やニトロ化を受けて患者脳で蓄積していることが報告されている²⁾. また, *PARK4* が, 野生型 α -シヌクレインを含む 1.6~2.0 Mb の三重重複であったことが報告され, 正常 α -シヌクレインの mRNA, 蛋白発現レベルが増加すれば発症にいたることが示された.

現在, α -シヌクレイン蛋白は生理的には可溶性単量体(monomer)として存在し, 特定の構造をとらないが, 種々の要因で重合化, 不溶化, 凝集する過程で何らかの神経毒性をもたらすと考えられている. そして, 孤発例では, α -シヌクレインの

Table 1. 孤発性 PD の機序に関する主な仮説とエビデンス

機序	エビデンス
ミトコンドリア機能障害	患者にミトコンドリア機能低下 パーキンソン様症状を起こす神経毒(MPTP, rotenone など)はミトコンドリア機能を障害 ミトコンドリア機能に関係する遺伝子がメンデル遺伝型家系で同定(PINK1, DJ-1 など)
プロテアソーム機能低下	プロテアソーム機能に関係する遺伝子がメンデル遺伝型家系で同定(パーキン, UCH-L1 など) PD 動物モデルでプロテアソーム活性低下
酸化ストレス	患者で酸化ストレスマーカーの増加 パーキンソン様症状を起こす神経毒(MPTP, rotenone, 6-OHDA など)の作用過程でフリーラジカル産生 メンデル遺伝型家系遺伝子の 1 つ DJ-1 は酸化ストレス防御作用
α -シヌクレイン蓄積	レビー小体の主成分は α -シヌクレイン メンデル遺伝型家系でみられるアミノ酸変異をもつ合成蛋白の凝集性促進 メンデル遺伝型の正常 α -シヌクレイン遺伝子重複家系で, 蛋白・遺伝子発現レベルが上昇 培養細胞, 動物モデルで, 封入体を伴った神経細胞死

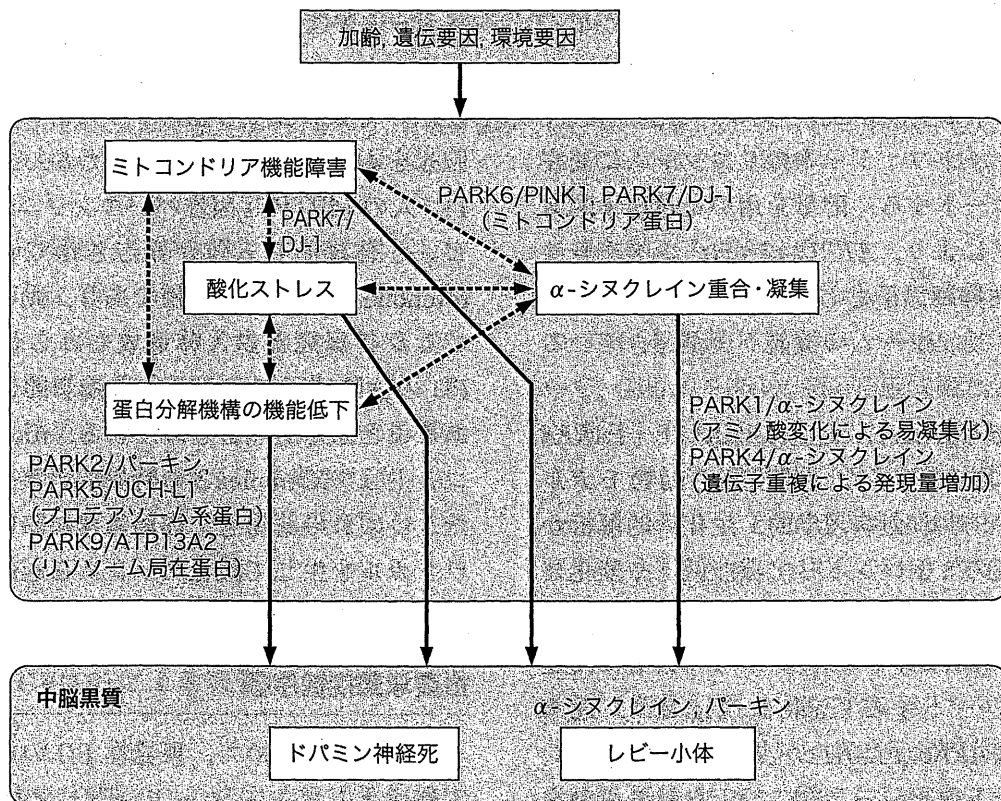


Fig. 2. 孤発性 PD 発症機序と PARK 遺伝子

重合が促進されるような, 変異以外の要因が働いて, 発症にいたると考えられている³⁾. その際には α -シヌクレインが小胞体-ゴルジ体の小胞輸送を障害し, 神経変性を起こすことが報告されている⁴⁾.

2) PARK2 (パーキン), PARK9 (ATP13A2) について→孤発性 PD の病理では, レビー小体がユビキチン抗体で染まる, 脳でオートファジーの亢進がみられる, という報告がある. このことと, 蛋白分解機構に関する PARK 遺伝子の存在によ

り、プロテアソーム系、オートファジー系の蛋白分解機構の破綻がPDの病態に関係するという仮説がたてられた(Table 1, Fig. 2)^{5,6)}。PARK2(パーキン)蛋白の機能については、ユビキチン・プロテアソーム系蛋白分解において、基質にユビキチンを結合させるE3ユビキチンリガーゼであることが明らかにされた。ユビキチンリガーゼはプロテアソームにより分解を受けるべき蛋白質にユビキチンという目印をつける酵素であり、ユビキチン・プロテアソーム系の破綻によって本来分解される蛋白質(すなわちパーキンの基質)が蓄積することで神経変性を引き起こしていると考えられている。このパーキンの基質はさまざまな報告があるが、真の基質はどれであるか結論が出ていない。

PARK9(ATP13A2)は近年発見され、進行が早く核上性上方注視麻痺を呈するなど非典型的である。原因遺伝子はlysosomal type 5 P-type ATPaseと呼ばれ、オートファジー系のリソソームに局在する蛋白をコードする。酵母を用いた遺伝学的スクリーニングにより、ATP13A2が α -シヌクレインの細胞毒性抑制因子として同定された⁷⁾。劣性遺伝であり、リソソームの機能不全が起きていると考えられる。

3) PARK6(PINK1), PARK7(DJ-1), PARK8(LRRK2)について→また、剖検脳や動物モデル(薬物性PDモデル)の病理学的・生化学的解析から、孤発例でのミトコンドリア機能低下や酸化ストレスマーカーの増加が報告されていた。PARK6(PINK1), PARK7(DJ-1)は、これらの機構に関連する蛋白をコードする(Table 1, Fig. 2)⁸⁾。近年パーキンとPARK6(PINK1)が共同してミトコンドリアのオートファジー(ミトファジー)の役割を担うことが明らかにされ、変異があると機能低下した異常ミトコンドリアの除去ができなくなると考えられる⁹⁾。PARK7の原因はDJ-1蛋白であり、ミトコンドリアに移行し抗酸化作用をもちドパミン細胞死との関係が注目される。またPARK8は常染色体優性遺伝形式を呈するものの中で最多であり、原因蛋白はLRRK2というキナーゼであり、

疾患型変異はキナーゼ活性の亢進をもたらすことから、そのリン酸化基質がPDにおいて重要な役割を担うと考えられる。シヌクレインに対するキナーゼ活性が注目されているが定かではない。

神経毒の解析

PDの症状を引き起こす薬物として、MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), ロテノン(rotenone), 6-OHDAなどが知られており、これらの作用機序からも、病態を考察することができる。これらの神経毒のうち、病理学的にも孤発性PDと類似する所見を示すのが、MPTPとrotenoneである。MPTPは麻薬の合成過程の副産物であり、脳内でMPP⁺となりドパミントランスポーターを介してドパミン神経に取り込まれ、エネルギー産生場であるミトコンドリア電子伝達系のComplex Iを阻害することにより、神経細胞死をもたらすということがわかっている(Table 1)。人のMPTP起因性パーキンソニズムでは、レビー小体様の封入体が報告されている。また、rotenoneは、農薬の一種であり、動物モデルでドパミン神経死と封入体形成がみられる。農薬がPDの危険因子であるという疫学的研究の報告があることから注目されている。rotenoneもミトコンドリアComplex Iの特異的阻害薬である。また、いずれの薬物も、作用過程において、フリーラジカルを生じて酸化ストレスを起こすことも知られている(Table 1)。

主要な発症機序

これらをまとめて、孤発性PDの神経死にいたる機序として、①ミトコンドリア機能障害により、細胞内エネルギー産生が低下する、②蛋白分解機構(プロテアソーム系、オートファジー系など)機能低下により、神経細胞内に構造異常をきたした蛋白が貯まって、細胞毒性をもつ、③酸化ストレス(活性酸素物質: reactive oxygen species (ROS))が細胞毒性をもつ、などがさまざまな割合で関与していること、そして④ α -シヌクレイン

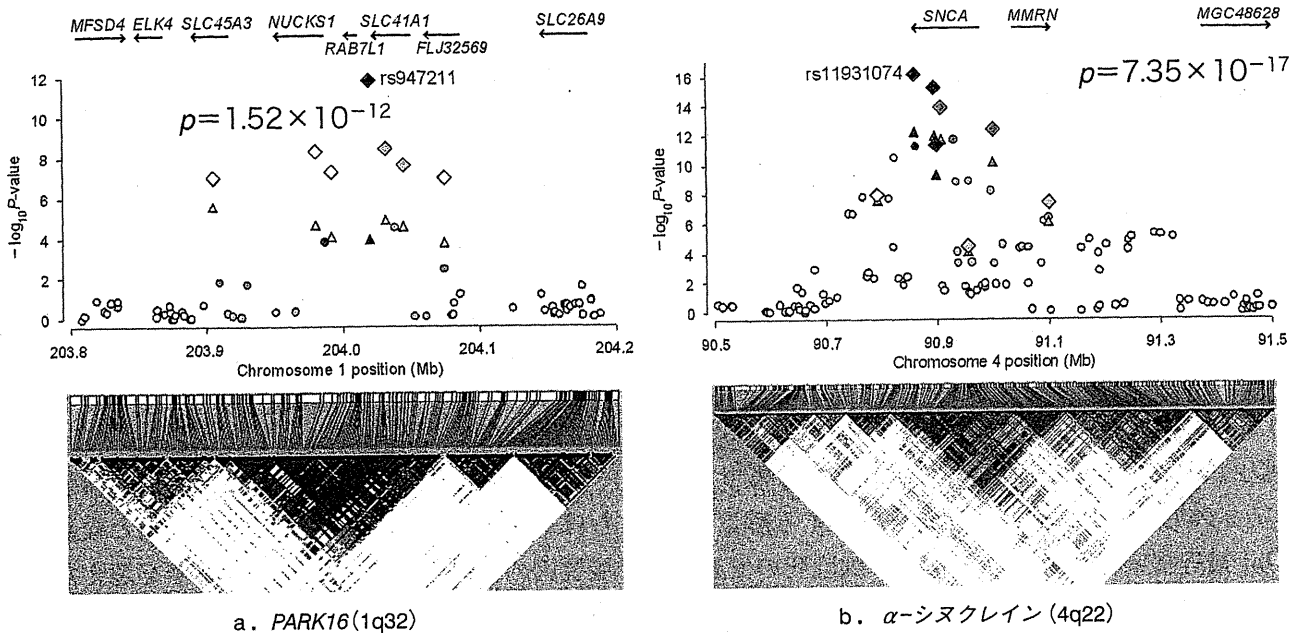


Fig. 3. 日本人 PD 患者 2011 検体, 対照 18381 検体のゲノムワイド関連解析より同定された 4 つの PD 遺伝子座の抜粋

このうち 2 つはまったく新規の領域であった。とくに (a) は非常に強い関連を示し、白人集団でも関連が再現されたことから *PARK16* と名づけた。また残りの 2 つは、常染色体優性遺伝性パーキンソン症の原因遺伝子 α -シヌクレイン (b) と *LRRK2* を含む領域が同定された。縦軸は $-\log P$, すなわち上にいくほど関連が強い。 [文献 10) より引用]

蛋白がこれらの経路あるいは別の経路に関与していることについては、あまり異論がない。さらに各機序の関与を裏づける報告も剖検脳の病理学的・生化学的解析から得られている (Table 1)。これらの機序は複数の遺伝要因や環境要因の影響のもとで、それぞれ、あるいは互いに影響しあって、孤発性 PD の病態を形成していくと現在のところ考えられている (Fig. 2)。

ゲノムワイド関連解析 (Genomewide Association Study : GWAS) による孤発性 PD 感受性遺伝子の同定 ●

ここ 10 年間孤発性 PD の疾患感受性遺伝子の発見を目指した多くの研究がなされてきたが、アルツハイマー病における ApoE4 多型のような確実に発症リスクを高める遺伝因子はなかなか確認されていなかった。ゲノムワイド有意水準 ($p < 5 \times 10^{-8}$) を満たす確実なものは、 α -シヌクレインの 3' 非翻訳領域 SNP (Gasser ら, 筆者らが同定) とゴーシェ病遺伝子 *GBA* の rare variant の 2 つ

の遺伝子のみであった。

われわれは、大規模の患者対照集団と、56 万個の SNP を搭載したイルミナ Hap550 アレイを用いて、GWAS を行い、PD 発症に関わる 2 つの新しい遺伝子座 *PARK16*; *BST1* を同定した (Fig. 3a)。また、常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子 α -シヌクレイン、*LRRK2* の孤発性 PD への関与を証明した (Fig. 3b)。白人の PD の GWAS 研究を行っていたグループと共同し、 α -シヌクレイン・*PARK16*・*LRRK2* は 2 人種に共通の PD リスクであり、タウ・*BST1* のリスク多型の影響は人種特異的であることを示した¹⁰⁾。

また孤発性 PD の発症に、常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子が密に関係していることを示した。原因変異により常染色体優性遺伝性 PD を引き起こす遺伝子が、その SNP を通して、孤発性 PD の遺伝リスクとなったことは興味深い。すなわち、 α -シヌクレイン、*LRRK2* が関与する病理経路が、孤発性を含めた PD 全体の病因の根幹をなすことを示している。一方、微小管の安定化に

働くタウは、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症などの原因産物として知られており、PD と他神経変性疾患との共通の病理経路の存在をも示唆している¹⁰⁾。

PARK16 領域には、3つの遺伝子が存在するが、発現量の形質座解析から、*NUCKS1* が、もっとも有力な責任遺伝子であると考えた (Fig. 3a)。*NUCKS1* は、リン酸化部位を含む核蛋白であるが、神経系における機能は、未知であり、新たなPD 発症病態を開拓する可能性がある。*BST1* は、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵からの Ca^{2+} 放出を誘発するサイクリック ADP リボースの形成を触媒する酵素であり、最近提唱されているドパミン細胞死の Ca^{2+} ストレス説を想起させ、興味深い。これらは従来のPD 病態説からはまったく新規な遺伝子であり、従来説にとらわれず、新規なものを同定できるところにGWAS の強みがある。

さらに最近別グループのGWAS から、HLA-DR 抗原の領域との関連が報告された。PD 脳ではDR 抗原陽性のミクログリア(後述)が検出されること、非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)は疫学的にPD のリスクを減少させることなどもあり、PD と炎症の関係を示しており興味深い¹¹⁾。

PD とゴーシェ病とまれな多型 (rare variant) ●

リピドーシスの常染色体劣性遺伝のユダヤ人ゴーシェ病家系内にPD 患者が多いことから、PD では*GBA* (glucocerebrosidase, 1q21) 変異のヘテロ保因者が有意に多いことが報告された¹²⁾。東京大学神経内科とわれわれの共同研究グループは、*GBA* 遺伝子の全11 エクソンとその近傍をPD 患者534人、対照544人リシーケンスして塩基配列変化の有無を調べ、11種類の疾患原性点変異が同定された。ヘテロでもつ保因者はPD 患者534人中50人(9.4%)、対照544人中2人(0.37%)であり、PD と*GBA* 変異は強く関連していた($p = 6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比28.0)¹²⁾。

さらに全世界での米国人、フランス人、ポルトガル人、台湾人など計約10,000人の患者対照集団

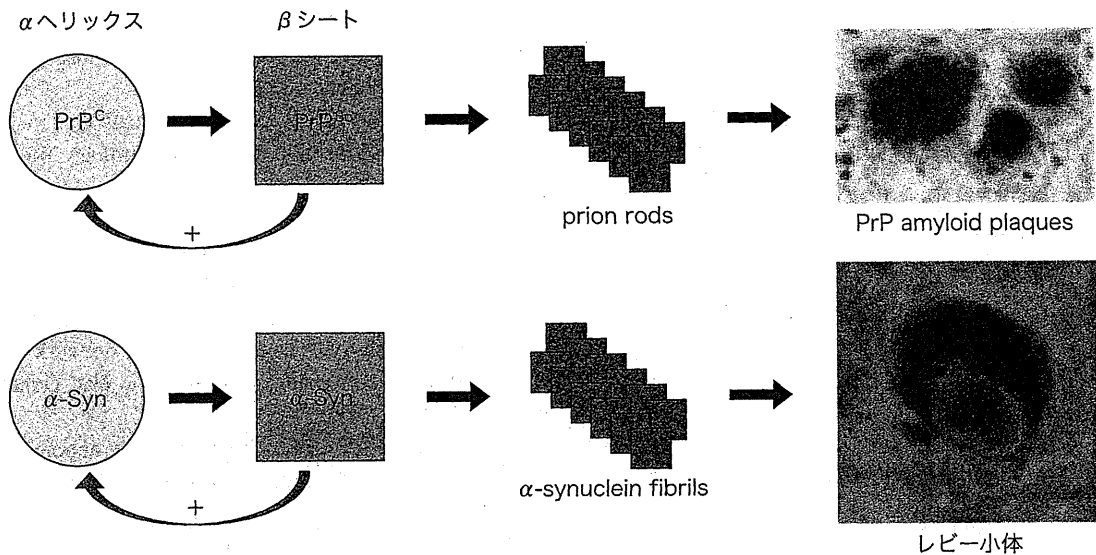
のメタ解析により、どの人種にても*GBA* 遺伝子はリスクとなり平均オッズ比は5である¹³⁾。*GBA* 変異は確実なPD リスク因子であり、SNP によるCommon Disease-Common Variants 仮説と異なり、Common Disease-Multiple Rare Variant 仮説によるものである。すなわち、頻度は低いが発症へのeffect size が大きい。なぜリスクとなるかの原因は不明であるが、単なる酵素活性低下でなく、*GBA* 変異の蛋白分解機構への負担によることも推定されている。

PD、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝要因と複数の環境要因の積み木の総和が、ある閾値を超えたとき発症すると考えられている。これまでみてきたように α -シヌクレインや*LRRK2* の変異はそれ1つだけで閾値に到達し発症するが、対象患者はほとんど存在しないので積み木の幅はとても狭い。ゴーシェ病遺伝子などのrare variant は中等度の高さをもつが10%以下の患者にしか当てはまらないため幅は狭い。一方SNP は、それ自体のオッズは低いがほとんどの患者に当てはまるため、積み木の幅は広い。いずれも重要である (Fig. 1)。

シヌクレインプリオン仮説 ●

本特集別稿を参照されたいが、Braak らは α -シヌクレインの蓄積部位を多数例のPD 脳で詳細に検討し、この蛋白質の異常蓄積はまず嗅球、延髄から始まり、徐々に上行して橋、中脳に及び、最終的に大脳皮質にいたるという仮説を提唱し、Braak 仮説として有名である。

一方、PD の治療を目的として胎児の中脳腹側組織を移植し10年以上経過した患者脳を病理学的に検索したところ、驚くべきことに移植された神経細胞にレビー小体が認められた¹⁴⁾。また α -シヌクレインを高発現する神経細胞とマウスの幹細胞を共培養する*in vitro* 実験や、 α -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスの海馬に幹細胞を移植する*in vivo* 実験にて、いずれの場合にも幹細胞の細胞質に α -シヌクレインの凝集体が



未知の環境要因→嗅覚器や腸管(外界)→自律神経叢や嗅球でα-シヌクレインのミスフォールディング→放出伝播?

Fig. 4. PDのシヌクレインプリオンモデル

[文献16]より引用]

形成されること、α-シヌクレインがエンドサイトーシスによって幹細胞に取り込まれることが示された。これらの知見は、α-シヌクレインが近接する神経細胞に「伝染」する可能性を示している。またごく最近、細胞内のα-シヌクレインが、他の細胞に移動し凝集し、その凝集体の量が継時的に増加すること、α-シヌクレイン蛋白の細胞内取り込みに関してエンドサイトーシス阻害薬の同時注入により、取り込みの減少が明らかとなった¹⁵⁾。

α-シヌクレインもプリオン蛋白質と同様に、αヘリックス構造とβシート構造をとりうることから、何らかのきっかけでβシート化したα-シヌクレインがシードとなって凝集を開始するとともに、細胞外に放出されて近隣の細胞に取り込まれ、プリオン病と同様の機序で病変が進展するという、PDのプリオンモデルが提唱されている(Fig. 4)。さらにこのモデルと Braak 仮説を合わせてPDの発症機序として、未知の環境要因が嗅覚器や腸管など外界に接した神経組織に作用し、自律神経叢や嗅球において最初にα-シヌクレインのミスフォールド蛋白質が形成され、逆行性に細

胞体まで輸送され、中枢神経内で放出されて近隣の神経細胞に連続的に伝播していく、という大胆な仮説もある(Fig. 4)¹⁶⁾。中枢神経内におけるα-シヌクレインの伝播を防ぐことで(例：エンドサイトーシス阻害薬)PDの進行を抑制するという、新たな治療戦略が考えられる。

ミクログリアと炎症反応●

孤発性PD患者剖検脳や家族性PD患者剖検脳、さらにMPTP誘導性PDモデル動物脳の黒質線条体部において共通にみられる病理変化として、ミクログリアの活性化と集積がある。ミクログリアは活性化するとHLA-DRやiNOSやCOX-2を発現し、インターロイキン(IL)-1βやIL-6などの炎症性サイトカインを含む種々のサイトカインを産生し、炎症反応の特徴の多くを示す。また、活性化したミクログリアは炎症性サイトカイン以外に、活性酸素やNO、プロテアーゼ類などの神経傷害性因子も産生する。とくに活性酸素やNOなどのフリーラジカルはPDにおける神経変性の進行機序に関与するため、ミクログリ

アの活性化や脳内炎症反応はPDの発症や進行に密接に関わっている¹⁷⁾。MPTP曝露16年後の死後、脳においても活性化ミクログリアが存在し、ミクログリアの活性化を伴う長期間にわたる継続的な炎症状態がPDの病態の進行において重要な意味をもつ可能性を示唆している。GWASでHLA-DR抗原の領域が同定されたことも興味深い¹¹⁾。

おわりに

PDのメカニズムの解明にあたっては、メンデル遺伝型PDの原因遺伝子の研究成果が大きく貢献してきた。今後は未知のメンデル遺伝型遺伝子の同定のみならず、孤発性PDにおいて大規模なGWAS, rare variant解析から、新規の感受性遺伝子が同定され、新しい機序、創薬の手がかりがみつかる可能性がある。次世代シーケンサーによるエクソームリシーケンスも開始され、今後はパーソナルゲノム解析が医学研究に応用されよう。

また、プリオン仮説は異常蛋白凝集を特徴とする神経変性疾患に共通した病態機序である可能性がある。同時に、異常蛋白の細胞間伝播は神経変性疾患に共通の治療ターゲットとなる可能性を秘めており、今後に期待する。

文献

- 1) Farrer MJ : Genetics of Parkinson disease : paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7 : 306, 2006
- 2) Fujiwara H et al : alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4 : 160, 2002
- 3) Uversky VN : Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103 : 17, 2007
- 4) Cooper AA et al : Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313 : 324, 2006
- 5) McNaught KS et al : Proteasomal dysfunction in sporadic Parkinson's disease. *Neurology* 66 [Suppl 4] : S37, 2006
- 6) Martinez-Vicente M, Cuervo AM : Autophagy and neurodegeneration : when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6 : 352, 2007
- 7) Gitler AD et al : Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* 41 : 308, 2009
- 8) Schapira AH : Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7 : 97, 2008
- 9) Narendra DP et al : PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 28 : e1000298, 2010
- 10) Satake W et al : Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41 : 1303, 2009
- 11) Hamza TH et al : Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 42 : 781, 2010
- 12) Mitsui J et al : Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66 : 571, 2009
- 13) Sidransky E et al : Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361 : 1651, 2009
- 14) Li JY et al : Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14 : 501, 2008
- 15) Hansen C et al : alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 121 : 715, 2011
- 16) Olanow CW, Prusiner SB : Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 : 12571, 2009
- 17) Sawada M et al : Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 5 : 254, 2008

A functional variant in *ZNF512B* is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese

Aritoshi Iida¹, Atsushi Takahashi², Michiaki Kubo³, Susumu Saito³, Naoya Hosono³, Yozo Ohnishi³, Kazuma Kiyotani⁴, Taisei Mushihiro⁴, Masahiro Nakajima¹, Kouichi Ozaki⁵, Toshihiro Tanaka⁵, Tatsuhiko Tsunoda⁶, Shuichi Oshima⁸, Motoki Sano⁹, Tetsumasa Kamei¹⁰, Torao Tokuda¹¹, Masashi Aoki¹², Kazuko Hasegawa¹³, Koichi Mizoguchi¹⁴, Mitsuya Morita¹⁵, Yuji Takahashi¹⁶, Masahisa Katsuno^{17,18}, Naoki Atsuta¹⁷, Hirohisa Watanabe¹⁷, Fumiaki Tanaka¹⁷, Ryuji Kaji¹⁹, Imaharu Nakano¹⁵, Naoyuki Kamatani², Shoji Tsuji¹⁶, Gen Sobue¹⁷, Yusuke Nakamura^{7,20} and Shiro Ikegawa^{1,*}

¹Laboratory for Bone and Joint Diseases and ²Laboratory for Statistical Analysis, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Tokyo 108-8639, Japan, ³Laboratory for Genotyping Development, ⁴Laboratory for Pharmacogenetics, ⁵Laboratory for Cardiovascular Diseases, ⁶Laboratory for Medical Informatics and ⁷Laboratory for International Alliance, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama 230-0045, Japan, ⁸Department of Neurosurgery, Chiba Tokushukai Hospital, Funabashi 274-8503, Japan, ⁹Department of Neurology, Chibanishi General Hospital, Matsudo 270-2251, Japan, ¹⁰Department of Neurology, Chigasaki Tokushukai General Hospital, Chigasaki 253-8558, Japan, ¹¹Tokushukai Group, Tokyo 102-0093, Japan, ¹²Department of Neurology, Tohoku University School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan, ¹³Department of Neurology, National Hospital Organization Sagami-hara National Hospital, Sagami-hara 228-8522, Japan, ¹⁴Department of Neurology, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka 420-8688, Japan, ¹⁵Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke 329-0498, Japan, ¹⁶Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan, ¹⁷Department of Neurology, Graduate School of Medicine and ¹⁸Institute for Advanced Research, Nagoya University, Nagoya 466-8550, Japan, ¹⁹Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan and ²⁰Department of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

Received January 19, 2011; Revised May 26, 2011; Accepted June 6, 2011

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the selective loss of motor neurons. Several susceptibility genes for ALS have been reported; however, ALS etiology and pathogenesis remain largely unknown. To identify further ALS-susceptibility genes, we conducted a large-scale case-control association study using gene-based tag single-nucleotide polymorphisms (SNPs). A functional SNP (rs2275294) was found to be significantly associated with ALS through a stepwise screening approach (combined $P = 9.3 \times 10^{-10}$, odds ratio = 1.32). The SNP was located in an enhancer region of *ZNF512B*, a transcription factor of unknown biological function, and the susceptibility allele showed decreased activity and decreased binding to nuclear proteins. *ZNF512B* over-expression increased transforming growth factor- β (TGF- β) signaling, while knockdown had the opposite effect. *ZNF512B* expression was increased in the anterior horn motor neurons of the spinal cord of ALS patients when compared with controls. Our results strongly suggest that *ZNF512B* is an important positive regulator of TGF- β signaling and that decreased *ZNF512B* expression increases susceptibility to ALS.

*To whom correspondence should be addressed at: Laboratory of Bone and Joint Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Tel/Fax: +81 354495393; Email: sikegawa@ims.u-tokyo.ac.jp

© The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a heterogeneous motor neuron disease that results from selective death of motor neurons in the brain and spinal cord (1). The predominant clinical feature of ALS is progressive wasting and weakness of limb, bulbar and respiratory muscles. The mean survival of patients after onset of symptoms is 3–5 years. Its worldwide incidence and prevalence are 0.3–2.4 and 0.7–7.0 per 100 000 each year (2). The heritability of ALS is high, with twin studies estimating it at 0.61 and the unshared environment component at 0.39 (3).

Approximately 10% of ALS cases are familial (fALS), and the remaining 90% are sporadic (sALS). Genetic factors have been reported in ALS. Detailed information regarding ALS-related genes is available via amyotrophic lateral sclerosis online genetics database and the ALS mutation database (4,5). Most fALS is monogenic in origin. At least 15 fALS loci, under various modes of inheritance, have been identified by linkage studies, and pathogenic mutations have been described in 11 genes, *SOD1*, *NEFH*, *ALS2*, *DCTN1*, *VAPB*, *SETX*, *ANG*, *TARDBP*, *FUS*, *OPTN* and *DAO*, in fALS (6–19). Despite the abundance of genes and loci identified in fALS, mutations in these genes explain only a small minority of sALS (20).

Regarding susceptibility genes for sALS, >30 association studies based on the candidate-gene approach have been reported (21,22). Among them, *NEFH*, *APEX* and *ANG* have the most evidence; associations of these genes have been found in Caucasians (23–25) and replicated in several studies (7,22,26). However, many of the reported genes are still controversial. For example, the association of non-synonymous substitution (P413L) in the chromogranin B gene (*CHGB*) is reported in French, French-Canadian and Scandinavian ALS populations (27), but has not been found in a Dutch and another French population (28,29).

The genome-wide association study (GWAS) has identified five ALS-susceptibility genes (*FGGY*, *ITPR2*, *DPP6*, *KIFAP3* and *UNC13A*) and two loci (9p21.2 and 10q26.3) in Caucasian (30–35). These results are promising, but remain slightly controversial (36–39). The association of the 9p21.2 locus has been independently replicated in three studies (34,40,41), but is not found in all populations, including those from Japan and China (42). More studies are necessary to evaluate and confirm these previously reported ALS-susceptibility genes.

To identify novel susceptibility genes for ALS, we conducted a large-scale genetic association study in Japanese ALS patients using gene-based single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (43). We identified a functional SNP that was significantly associated with ALS. The SNP was located in an enhancer region of *ZNF512B*, a previously uncharacterized transcription factor, and the susceptibility allele of the SNP had decreased enhancer activity for the *ZNF512B* promoter and decreased binding capacity to nuclear proteins. We found that in neuron cells, *ZNF512B* acts as a positive regulator of transforming growth factor- β (TGF- β) signaling, which is known to be neuroprotective and critical for maintenance and/or survival of neurons (44–46). We demonstrated the localization of *ZNF512B* in the spinal cord of ALS patients and it showed enhanced expression in motor neuron cells of the anterior horn when compared with controls.

RESULTS

Genome screening

We carried out a stepwise case–control association study (Supplementary Material, Fig. S1) as previously described (47–51). In stage 1 of the discovery series, 92 ALS and 233 control subjects were analyzed at 52 608 gene-based SNP loci selected from the JSNP database (43). Genotype information was successfully obtained for 48 939 SNPs on autosomal chromosomes passed after the quality control. Either the Chi-square test or Fisher's exact test was performed for three genetic models: dominant, recessive and allelic. Comparison of observed and expected distributions showed no evidence for inflation of the trend test statistics (inflation factor, $\lambda = 1.04$; Supplementary Material, Fig. S2). Also, principal component analysis (52) in stage 1 and HapMap samples showed no evidence of population stratification between the case and control groups (Supplementary Material, Fig. S3). In stage 2 of the discovery series, 893 SNPs that showed P -values of ≤ 0.01 in stage 1 were genotyped for an additional 1087 subjects (362 ALS cases and 725 controls). Subsequently, 10 SNPs with P -values < 0.001 were identified by the Chi-square test for the three models (Supplementary Material, Table S1).

Identification of genetic association between rs2275294 and ALS

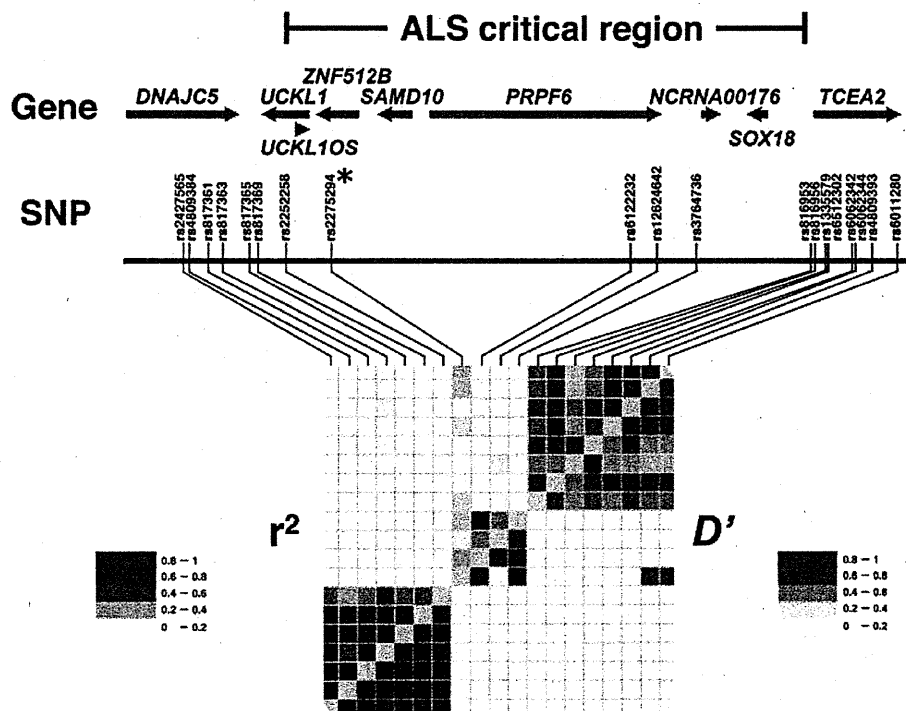
We validated the association of these SNPs using independent subjects from Biobank Japan (sample set 1). In all, 249 ALS cases and 1030 controls were genotyped and validated the association in rs2275294 (allele model, $P = 1.8 \times 10^{-3}$). The SNP was then genotyped in an independent Japanese population consisting of 602 ALS cases and 2256 controls (sample set 2). Significant association was replicated in this population (allele model $P = 5.6 \times 10^{-5}$). The combined P -values for the stepwise association study calculated by the Mantel–Haenszel method and the joint analysis were 9.3×10^{-10} and 6.7×10^{-10} , respectively (Table 1). The combined P -values remained significant after Bonferroni correction ($9.3 \times 10^{-10} \times 52\,608 \times 3 = 1.47 \times 10^{-4}$). The P -values from the Mantel–Haenszel method and the joint analysis were very similar, supporting the fact that there is no hidden confounder in our population. The minor allele frequency (MAF) of rs2275294 in 744 samples of the Japan Biological Informatics Consortium (JBIC)-genotyping data deposited in the dbSNP database was similar to that of our controls (0.414).

Evaluation of rs2275294

We assessed the stratification using principal component analysis (52). The top six principal components were associated with case–control status. The association of rs2275294 with the top six principal components included as covariates (trend model $P = 0.00287$) was similar to that in stage 1 (trend model $P = 0.00246$), suggesting no stratification. Population stratification was also assessed by evaluating differences in population structure among all case and control sample sets using Wright's F statistics (53). There was no difference in the population structure among these groups (Supplementary Material, Table S2). Potential confounding factors were also

Table 1. Association of rs2275294 in *ZNF512B* with ALS

	No. of subjects		Risk allele frequency		<i>P</i> -value	Odds ratio (95% CI)
	Case	Control	Case	Control		
Discovery series	454	958	0.491	0.422	6.3×10^{-4}	1.32 (1.13–1.55)
Sample set 1	249	1030	0.512	0.434	1.8×10^{-3}	1.37 (1.12–1.66)
Sample set 2	602	2256	0.481	0.416	5.6×10^{-5}	1.30 (1.14–1.48)
Combined	1305	4244				
Meta-analysis ^a					9.3×10^{-10}	1.32 (1.21–1.44)
Joint analysis					6.7×10^{-10}	1.32 (1.21–1.44)

^aBy the Mantel–Haenszel method.**Figure 1.** Genomic structure and linkage disequilibrium (LD) map in the ALS critical region. Top, an SNP map of a 111 kb genomic region containing *ZNF512B*. The orientation of each gene is indicated by a green arrow. An asterisk shows the landmark SNP. Bottom, an LD map as measured by D' (lower right triangle) and r^2 (upper left triangle).

examined and no significant differences in age and gender distribution were found among rs2275294 genotyped. The associations with rs2275294 were significant in two sample sets ($P = 4.1 \times 10^{-3}$ and 1.4×10^{-4}), even after adjusting for age and gender in a logistic regression analysis.

Genome analysis of the ALS critical region containing rs2275294

We constructed a linkage disequilibrium (LD) map around rs2275294 on the basis of the genotyping data for Japanese subjects used in HapMap (HapMap JPT). Because rs2275294 was unmapped in the HapMap data, we genotyped the SNP for the HapMap JPT samples and integrated the data with the HapMap JPT data. We found that rs2275294 was in strong LD with the two SNPs rs6122232 and rs3764736 ($D' > 0.85$). Subsequently, the critical region could be

confined to a 111 kb interval flanked by rs2252258 and rs816953 on chromosome 20q13.33 (Fig. 1). This region included four genes (*ZNF512B*, *SAMD10*, *PRPF6* and *SOX18*) and a part of *UCKL1*, as well as two non-protein-coding RNAs (*UCKL1OS* and *NCRNA00176*). In order to identify a more significantly associated SNP, we searched for SNPs in each gene by re-sequencing genomic DNA of 48 ALS subjects. A total of 24 SNPs were identified and their level of association was examined using 455 cases and 452 controls, but rs2275294 remained the most significantly associated (Supplementary Material, Table S3).

Functional analysis of rs2275294

To gain insight into the biological significance of rs2275294, luciferase reporter plasmids corresponding to a genomic

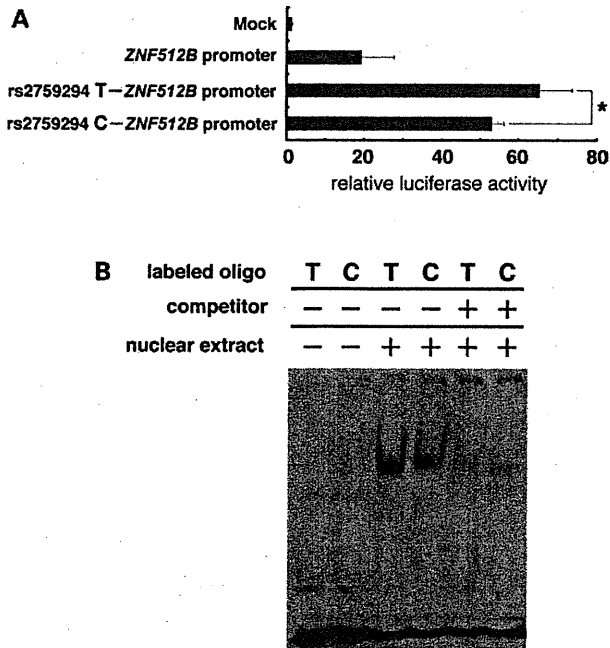


Figure 2. Functional analysis for rs2275294 in *ZNF512B*. (A) Difference in the enhancer activity of genomic DNA segments containing rs2275294. Luciferase assay in SK_N_Be(2)C cells. Enhancer activity was lower in the ALS-susceptibility allele (C allele). *ZNF512B* promoter:native promoter (nts -820 to -74) of *ZNF512B*. Data represent the mean \pm SEM ($n=6$). * $P < 0.01$ (Student's t-test). (B) Difference in binding of nuclear proteins to a cis-element containing rs2275294. An EMSA using nuclear extracts from SK_N_AS cells. The specific band was weaker in the ALS-susceptibility allele (C allele).

DNA fragment containing rs2275294 were constructed and a luciferase assay using the human neuroblastoma cell line SK_N_Be(2)C was performed. Constructs containing the ALS-susceptibility allele (C allele) of rs2275294 showed lower enhancer activity than those containing the non-susceptibility allele, indicating that the SNP affects the *ZNF512B* transcription level (Fig. 2A). We then examined the allelic difference in the binding of genomic DNA containing rs2275294 to nuclear proteins by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The DNA-protein complex from the C allele showed weaker binding (Fig. 2B). Thus, it is feasible that the presence of the susceptibility allele leads to lower *ZNF512B* levels as a consequence of decreased enhancer activity.

ZNF512B is a positive regulator in the TGF- β signaling pathway

Proteomics analysis has suggested that *ZNF512B* functions as a regulator of the TGF- β signaling pathway (54). We examined the effect of *ZNF512B* on TGF- β signaling using the TGF- β -dependent SMAD2/3-specific luciferase assay (55) in a HepG2 cell (data not shown). SMAD2/3-mediated reporter activity after TGF- β stimulation was enhanced by *ZNF512B* over-expression. The TGF- β -dependent reporter activity was activated by *ZNF512B* over-expression in a neuroblastoma

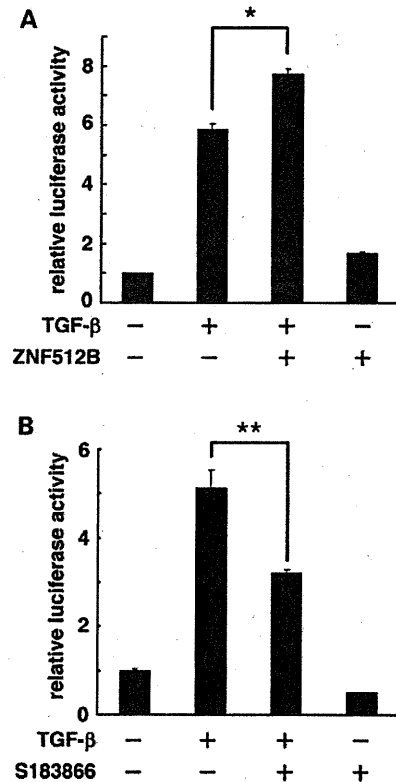


Figure 3. *ZNF512B* is a positive regulator of the TGF- β signal. (A) Luciferase assay using SBE4-luciferase. *ZNF512B* trans-activated the TGF- β -induced SMAD transcriptional activity in the SK_N_AS cell line (* $P < 0.0005$). (B) S183866, a *ZNF512B*-targeting siRNA oligonucleotide repressed the TGF- β -dependent SBE4-luciferase activity (** $P < 0.005$).

cell line SK_N_AS (Fig. 3A) and a glioblastoma cell line U87MG (Supplementary Material, Fig. S4). Next, we knocked down expression of the endogenous *ZNF512B* in SK_N_AS by using the short-interfering RNA (siRNA) technique. Real time polymerase chain reaction (PCR) showed that *ZNF512B* siRNA significantly reduced *ZNF512B* transcription, and TGF- β -dependent reporter activity was repressed by the siRNA (Fig. 3B).

ZNF512B expression in the spinal cord of ALS

The localization of *ZNF512B* in the spinal cord of ALS patients was investigated by immuno-histochemical studies. The immuno-reactivity for an anti-*ZNF512B* polyclonal antibody was intense in motor neuron cells in the anterior horn of the spinal cords of ALS patients, while it was barely detectable in those of controls (Fig. 4A-D). Glial cells in the anterior horn did not show *ZNF512B* immuno-reactivity.

DISCUSSION

By a large-scale case-control association study using gene-based SNPs and enrolling a total of more than 5500 subjects, we identified *ZNF512B* at chromosome 20q13.33 as a new susceptibility gene for ALS. rs2275294 in *ZNF512B* had

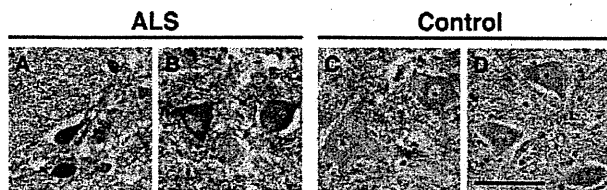


Figure 4. Immunohistochemical localization of ZNF512B in the spinal cord of ALS patients (A and B) and controls (C and D). The ZNF512B immuno-reactivity was intense in motor neuron cells in the anterior horn of ALS patients, while it was hardly detectable in those of controls. Glial cells in the anterior horn did not show ZNF512B immuno-reactivity. Scale bar, 100 μ m.

significant association that satisfied a genome-wide significance level ($P = 9.3 \times 10^{-10}$). rs2275294 affected *ZNF512B* transcription *in vitro*, and the ALS-susceptibility allele (C allele) showed lower enhancer activity for the *ZNF512B* promoter. Therefore, *ZNF512B* is presumably lower in those who have the susceptibility allele than in those who have the non-susceptibility allele. *ZNF512B* over-expression enhanced TGF- β signaling, while its knockdown decreased the signal. Our findings suggest that ZNF512B is an important positive regulator of TGF- β and that lowered ZNF512B expression is implicated in the pathogenesis of ALS susceptibility via decreased TGF- β signal.

In this study, we screened the genic regions using >52 000 gene-based SNPs from the JSNP database. The number of SNPs and their coverage are not sufficient to screen the entire genome. Our study must have many false negatives. Current commercial GWAS platforms are considered superior to ours in terms of the study power and the coverage of SNPs in the human genome. In contrast, the false-positive association of rs2275294 is unlikely. The inflation factor was low and principal component analysis showed no evidence of population stratification. We validated the association in independent Japanese panels. The statistical significance of the association for the combined P -values by two different methods fulfilled criteria of the genome-wide significance level. The results of the two analyses were very similar, which further shows that a hidden confounder in our population is unlikely. In addition, there was no difference in the population structures among the case-control sets by Wright's F statistics (53) throughout the study. The MAF of rs2275294 in 744 Japanese samples deposited in dbSNP is similar to that of our controls (0.414).

In spite of its very significant association in our study, rs2275294 in *ZNF512B* has not been found in the previous GWASs. Several explanations can be considered. The main reason is that rs2275294 was not included in the platforms of the previous GWASs. Only 15 SNPs in Illumina 610K SNP Array were mapped to the 111 kb genomic region (1 SNP/7.4 kb) corresponding to the ALS critical region we determined. Also, only 10 SNPs in Affymetrix SNP Array 6.0 were mapped to the genomic region (1 SNP/11.1 kb). In addition, rs2275294 is not even mapped in the HapMap JPT database, nor included in the CEU and YRI HapMap data sets. In the Illumina and Affymetrix SNP arrays, the numbers of SNPs in the *ZNF512B* locus are only two and one, respectively. Their coverages of *ZNF512B*-SNPs in the

ALS critical region were very low, 2/15 (13%) and 1/10 (10%), respectively. The low coverage of the region might have led to the false-negative association in the previous GWASs. No SNP was in strong LD ($r^2 > 0.8$) with rs2275294 in CHB-JPT, CEU and YRI in the 1000 Genomes data (Supplementary Material, Table S4). Hence, we speculate that rs2275294 has been identified by virtue of our platform. Still another explanation is the ethnic difference of ALS susceptibility.

A number of GWASs in ALS have been performed recently. They report the identification of five candidate genes and two candidate loci (30–35). Among them, only five gene loci (*DPP6*, *ITPR2*, *FLJ10986*, *KIFAP3* and *UNC13A*) were included in our platform. We checked 16 SNPs in *DPP6*, 23 in *ITPR2*, 2 in *FLJ10986*, 9 in *KIFAP3* and 4 in *UNC13A*; however, their associations were not replicated in our study (Supplementary Material, Table S5). The small number of samples and the low coverage of SNPs in our platform may have resulted in false-negative association. Ethnic differences may be another reason for no replication. The 9p21.2 SNP that has been reported in the previous study (42) was not included in the present study. The tested SNPs for previous associations were negative, but no evidence can be provided for the chromosome 9p21.2 locus. Because the powers of Japanese and Chinese were only 0.37 and 0.11, respectively (42), the negative association may be due to a lack of power in the study. More extensive association studies using larger panels of Japanese samples will be required to conclude the associations between previous candidate genes and ALS.

ZNF512B was originally identified as a *KIAA1196* in the course of the Kazusa Human cDNA project (56). The *ZNF512B* cDNA is 5919 bp long and encodes an 893 amino-acid protein that is ubiquitously expressed in various tissues, including the brain and spinal cord (56). Our immunohistochemical studies confirmed its localization in the spinal cord. The ZNF512B protein showed no significant homology with any proteins in the public database. It contains six C2H2-type zinc finger domains and is predicted to act as a transcription factor. The ALS-susceptibility SNP rs2275294 was localized to intron 12 of *ZNF512B*. We have demonstrated that the genomic region containing rs2275294 can act as an enhancer of the *ZNF512B* promoter and that the susceptibility allele of rs2275294 had reduced transcriptional activity, which was likely due to its decreased binding capacity to trans-factors. Further studies for the upstream factors of *ZNF512B* are necessary to clarify the molecular pathogenesis of ALS related to *ZNF512B*.

We showed that ZNF512B is a positive regulator of the canonical TGF- β signaling pathway through SMAD2/3. TGF- β signal is essential for the survival of neurons (44–46). Upregulation of PAI-1 by SMAD3-dependent induction in astrocytes mediates the neuroprotective activity of TGF- β against NMDA receptor-mediated excitotoxicity (57). TGF- β signal has been implicated in the pathogenesis of ALS. Plasma TGF- β 1 level is significantly increased in ALS patients compared with healthy controls, and there is a significant positive correlation between TGF- β 1 concentration in ALS patients and duration of their disease (58). A microarray analysis showed a 4.8-fold increased expression of *SMAD4* in ALS compared with neurologically normal controls (59).

Also, phosphorylated SMAD2/3 immuno-reactivity is increased in the remaining spinal motor neurons and glial cells in sporadic and familial ALSs, as well as in *Sod1* transgenic mice (60). These findings suggest that the TGF- β signal is increased in ALS.

Several studies have shown an association between duration of ALS and TGF- β levels. Houi *et al.* (58) found a positive correlation between the plasma concentration of TGF- β 1 in ALS patients and the duration of disease. Another group reported that TGF- β 1 concentrations in serum and cerebrospinal fluid did not differ between ALS patients and controls, but were higher in ALS patients with a terminal clinical status than in controls (61). These data suggest that TGF- β is increased in the motor neuron cells of ALS patients during the disease process. As *ZNF512B* is a critical enhancer of TGF- β signaling, its genetic association may be related to the progression of the disease rather than its onset.

We have demonstrated the localization of *ZNF512B* in the spinal cord of ALS patients, and that *ZNF512B* expression in the motor neurons of ALS patients was significantly increased compared with that of controls (Fig. 4). It is biologically plausible that *ZNF512B* is a positive regulator (co-activator) of neuroprotective TGF- β signaling (Fig. 3) and may act as a protector against ALS. Taken together with the results of luciferase assay and EMSA that showed allelic differences in *ZNF512B* expression level (Fig. 2), a patient harboring the susceptibility allele would have decreased *ZNF512B* expression level compared with a patient harboring non-susceptibility alleles. The decreased *ZNF512B* enhancer activity by the susceptibility allele leads to insufficient increase in *ZNF512B*, which leads to insufficient increase in the TGF- β signal that results in decreased potential for survival and/or recovery of motor neurons. The discovery of this ALS-susceptibility gene and its pathway should shed light on ALS pathogenesis and facilitate development of targeted therapies.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 1305 ALS patients diagnosed as having probable, probable and laboratory-supported, or definite ALS according to the El Escorial revised criteria (62) were included in the study. All subjects were unrelated Japanese individuals. We obtained a total of 703 DNA samples from the Biobank Japan project (63). All patients were screened for mutations in *SOD1*, *TARDBP* and *ANG* and none was detected. The mean age of cases was 60.8 years (range: 28–82 years), and 66.1% were male. 74.4% had a spinal onset, 19.6% a bulbar one and 6% a multiple and the others. We obtained a total of 602 DNA samples from the Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS), Jichi Medical University and The University of Tokyo. The mean age was 61.5 years (range: 27–89 years), and 62.0% were male. 70.4% of the patients had a spinal onset and the remaining had a bulbar one. We recruited 4244 controls through several medical institutes in Japan. Their mean age was 66.8 years (range: 18–98 years), and 48.0% were male. All controls had negative medical and family histories for

neurodegenerative disorders. Written informed consent was obtained from all the subjects. The ethical committees at the participating institutions approved this project.

SNP genotyping

Using standard protocols, genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes. SNPs were genotyped using the multiplex PCR-based invader assay (Third Wave Technologies) as described previously (64). A total of 52 608 gene-based SNPs were selected from the JSNP database on the basis of the haplotype block structure reported previously (43,65). We calculated the total number of independent SNPs in this study to be 43 052 (the SNPs in LD: $r^2 > 0.80$ were considered as one SNP). We checked the cryptic relatedness for each pair of samples by identity-by-state by estimating the average number of shared alleles between two individuals (V_1) using 48 884 autosomal SNPs. Six individuals in controls were related ($V_1 > 1.65$). They were excluded from the analysis. A stepwise screening method was adopted to increase the statistical power (66). In stage 1, 92 ALS and 233 control subjects were analyzed. We applied the SNP quality control filters of call rate of ≥ 0.95 in both cases and controls and P -value of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) test of $\geq 1.0 \times 10^{-2}$ in controls. A total of 48 939 SNPs on autosomal chromosomes passed the quality control filters and were analyzed for the association. The data of this study are available at the JSNP database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>). Among the SNPs analyzed in stage 1, 893 SNPs showing the smallest P -values (0.01 or smaller) were selected for stage 2. Three models (i.e. allelic, dominant and recessive) were tested for the association. Since these three models are not independent, 893 SNPs were isolated. In stage 2, we genotyped an additional 1087 subjects consisting of 362 ALS cases and 725 controls. Stage 1 and stage 2 were defined as the discovery series of this research and the following sample sets were defined as sample set 1 and sample set 2.

SNP discovery

Appropriate genome sequences were extracted from the UCSC Genome Bioinformatics website. The critical region contained five genes (*ZNF512B*, *SAMD10*, *PRPF6*, *SOX18* and part of *UCKLI*) and two non-protein-coding RNAs (*UCKLIOS* and *NCRNA00176*). We defined the exon–intron boundaries of each gene and designed PCR primer sets for the critical region except for repetitive sequence regions. Each PCR was performed with 5 ng of mixed genomic DNA derived from three ALS subjects; 16 mixed samples were amplified in the GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 96°C for 30 s, annealing at 60–65°C for 30 s, extension at 72°C for 2 min and post-extension at 72°C for 7 min. PCR products served as templates for direct sequencing by the fluorescent dye-terminator cycle sequencing method.

Statistical analysis

For general statistical analyses, we used R statistical environment version 2.6.1 and programs created by our group. The Chi-square test or Fisher's exact test was applied to a two-by-two contingency table in three genetic models: an allele frequency model, a dominant-effect model and a recessive-effect model. Principal component analysis was performed using the smartpca program (52). We calculated the association in case-control status of stage 1 by using a twostats of EIGENSOFT (52). The top six principal components were associated with case-control status. Genotype data from the HapMap project were used (67) to estimate the population structure. The significance of stratification was determined using the Wright method (53). The Mantel-Haenszel method was used for meta-analysis. An automated laboratory system and bar-coding were employed to reduce clerical errors. The accuracy of our system has been guaranteed in data of the HapMap project (67). We checked HWE and personally retyped some SNPs from genome screening in duplicated samples. We also obtained age- and gender-adjusted odds ratios by logistic regression analysis by program R. Haploview 4.1 was used to infer the LD structure of the ALS critical region. An LD pattern was created based on the JPT HapMap data. Luciferase assay data were analyzed by Student's *t*-test.

Luciferase assay

We cloned DNA fragments containing rs2275294, nucleotides (nts) 190–208 of intron 12 of *ZNF512B*. The fragments for both alleles as three tandem copies were inserted into pGL3-Basic vector (Promega) upstream of its luciferase gene in 5'→3' orientation together with the *ZNF512B* core promoter of nts –820 to –74 of its 5' flanking region. We transfected SK_N_Be(2)C cells with 400 ng of each reporter construct using FuGene 6 transfection reagent (Roche) together with 8 ng of pRL-TK vector (Promega) as a control. After 24 h, the cells were lysed in a passive lysis buffer and luciferase activities were measured using Dual-Luciferase Reporter Assay System (Toyo Ink). The entire coding sequence of *ZNF512B* was cloned into pcDNA3.1, which had a Myc-tag sequence. We also co-transfected with SBE4 (four copies of Smad Binding Element) luciferase reporter vector (55)/Myc-tagged *ZNF512B* or SBE₄-luciferase reporter vector/Myc-tagged pcDNA3.1, and pRL-TK vector using Trans-IT LT reagent (TAKARA Bio). After 24 h, we treated the cells with 10 ng/ml of TGF-β for 24 h. The cells were lysed in a passive lysis buffer and luciferase activities were measured using Dual-Luciferase Reporter Assay System (Toyo Ink).

Electrophoretic mobility shift assay

A nuclear extract from SK_N_AS cells was prepared as previously described (68) and incubated with oligonucleotides (nts 184–203 of intron 12 of *ZNF512B*) that were labeled with digoxigenin-11-ddUTP using the Dig Gel Shift Kit (Roche). The reaction was carried out at a room temperature with an additional 1 mg/ml of poly[d(I-C)]. For the competition assay, the nuclear extract was pre-incubated with

unlabeled oligonucleotides (200-fold molar excess) before adding digoxigenin-labeled oligonucleotide. The protein-DNA complex was separated on a non-denaturing 6% polyacrylamide gel in 0.25× Tris-borate-EDTA buffer. We transferred the gel to membrane and detected the signal with a chemiluminescent detection system (Roche) according to the manufacturer's instructions.

RNAi experiment

Double-strand stealth RNAi oligonucleotides (ZNF512B-S183866 for *ZNF512B* and negative universal control medium GC duplex for negative control) were purchased from Invitrogen. The RNAi oligonucleotides were transfected into a cell line using Lipofectamine RNAiMAX reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). After 24 h, we also transfected with SBE₄-luciferase reporter vector and pRL-TK vector. We treated the cells with TGF-β (10 ng/ml) for 24 h, collected the cells and measured luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Toyo Ink).

Immuno-histochemistry

Autopsy specimens of lumbar spinal cord were obtained from clinically and histopathologically diagnosed ALS patients (13 males and 9 females, age 41–79 years) and from neurologically normal patients (4 males and 3 females, age 42–76 years). The autopsy times in relation to death for the cases and controls (average ± SD) were 4.0 ± 2.8 h and 4.5 ± 5.2 h, respectively. 6-μm-thick sections were prepared from paraffin-embedded tissues. The sections were microwaved for 20 min in 50 mM citrate buffer (pH 6.0) and then treated with a TNB blocking buffer (PerkinElmer) before incubation with an anti-ZNF512B antibody (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). The immuno-reactivity was detected using EnVision+ System-HRP (Dako). The sections were photographed with an optical microscope (BX51, Olympus).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all ALS patients who participated in the study. We also thank all members of Japanese ALS Association and all participating doctors and staff from collaborating institutes. The DNA samples used for this research were provided from the Leading Project for Personalized Medicine in the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and from JaCALS. JaCALS members included Drs M. Ito, J. Senda (Nagoya University), H. Takano (Niigata University), A. Kawata, H. Hayashi (Tokyo Metropolitan Neurological Hospital), I. Aiba (Higashi Nagoya National Hospital), A. Taniguchi (Mie University), Y. Izumi (University of Tokushima), M. Sakai, M. Konagaya (Suzuka National Hospital), H. Mizusawa (Tokyo Medical and Dental University), T. Yuasa (Kamagaya General Hospital), T. Fujita (Takumikai

Neurology Clinic), M. Ikeda, K. Okamoto (Gunma University), S. Akimoto, H. Sasaki (Hokkaido University), T. Imai (Miyagi National Hospital) and S. Kuzuhara (National Center Hospital of Neurology and Psychiatry).

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by grants from the Leading Project of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Japan; Health and Labour, Sciences Research Grants for Research on Measures for Intractable Diseases and Comprehensive Research on Aging and Health from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan; and by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (19500314) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Japan (A.I.).

REFERENCES

- Wijesekera, L.C. and Leigh, P.N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J. Rare Dis.*, **4**, 3.
- Cronin, S., Hardiman, O. and Traynor, B.J. (2007) Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology*, **68**, 1002–1007.
- Al-Chalabi, A., Fang, F., Hanby, M.F., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Ye, W. and Rijsdijk, F. (2010) An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **81**, 1324–1326.
- Wroe, R., Wai-Ling Butler, A., Andersen, P.M., Powell, J.F. and Al-Chalabi, A. (2008) ALSOD: the Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Database. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **9**, 249–250.
- Yoshida, M., Takahashi, Y., Koike, A., Fukuda, Y., Goto, J. and Tsuji, S. (2010) A mutation database for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mutat.*, **31**, 1003–1010.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X. *et al.* (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**, 59–62.
- Al-Chalabi, A., Andersen, P.M., Nilsson, P., Chioza, B., Andersson, J.L., Russ, C., Shaw, C.E., Powell, J.F. and Leigh, P.N. (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 157–164.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C. *et al.* (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, **29**, 160–165.
- Hadano, S., Hand, C.K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R.S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R. *et al.* (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat. Genet.*, **29**, 166–173.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J. *et al.* (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat. Genet.*, **33**, 455–456.
- Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R., Gillingwater, T., Webb, J. *et al.* (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 822–831.
- Chen, Y.Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A. *et al.* (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1128–1135.
- Greenway, M.J., Andersen, P.M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swinger, R., Kieran, D., Prehn, J. *et al.* (2006) ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, **38**, 411–413.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F. *et al.* (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, **40**, 572–574.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E. *et al.* (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, **319**, 1668–1672.
- Kwiatkowski, T.J. Jr, Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T. *et al.* (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, **323**, 1205–1208.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P. *et al.* (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, **323**, 1208–1211.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H. *et al.* (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **465**, 223–226.
- Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V. *et al.* (2010) Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 7556–7561.
- Beleza-Meireles, A. and Al-Chalabi, A. (2009) Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **10**, 1–14.
- Simpson, C.L. and Al-Chalabi, A. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 973–985.
- Schymick, J.C., Talbot, K. and Traynor, B.J. (2007) Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, R233–R242.
- Figlewicz, D.A., Krizus, A., Martinoli, M.G., Meininger, V., Dib, M., Rouleau, G.A. and Julien, J.P. (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1757–1761.
- Hayward, C., Colville, S., Swingle, R.J. and Brock, D.J. (1999) Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, **52**, 1899–1901.
- Greenway, M.J., Alexander, M.D., Ennis, S., Traynor, B.J., Corr, B., Frost, E., Green, A. and Hardiman, O. (2004) A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*, **63**, 1936–1938.
- Skvortsova, V., Shadrina, M., Slominsky, P., Levitsky, G., Kondratieva, E., Zherebtsova, A., Levitskaya, N., Alekhin, A., Serdyuk, A. and Limborska, S. (2004) Analysis of heavy neurofilament subunit gene polymorphism in Russian patients with sporadic motor neuron disease (MND). *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**, 241–244.
- Gros-Louis, F., Andersen, P.M., Dupre, N., Urushitani, M., Dion, P., Souchon, F., D'Amour, M., Camu, W., Meininger, V., Bouchard, J.P. *et al.* (2009) Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 21777–21782.
- Blasco, H., Corcia, P., Veyrat-Durebex, C., Coutadeur, C., Fournier, C., Camu, W., Gordon, P., Praline, J., Andres, C.R. and Vourc'h, P. (2010) The P413L chromogranin B variation in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.*, doi:10.3109/17482968.2011.522587.
- van Vught, P.W., Veldink, J.H. and van den Berg, L.H. (2010) P413L CHGB is not associated with ALS susceptibility or age at onset in a Dutch population. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, E77; author reply E78.
- Schymick, J.C., Scholz, S.W., Fung, H.C., Britton, A., Arepalli, S., Gibbs, J.R., Lombardo, F., Matarin, M., Kasperaviciute, D., Hernandez, D.G. *et al.* (2007) Genome-wide genotyping in amyotrophic lateral sclerosis and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol.*, **6**, 322–328.
- Dunckley, T., Huentelman, M.J., Craig, D.W., Pearson, J.V., Szelinger, S., Joshipura, K., Halperin, R.F., Stamper, C., Jensen, K.R., Letizia, D. *et al.* (2007) Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **357**, 775–788.
- van Es, M.A., Van Vught, P.W., Blauw, H.M., Franke, L., Saris, C.G., Andersen, P.M., Van Den Bosch, L., de Jong, S.W., van 't Slot, R., Birve, A. *et al.* (2007) ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.*, **6**, 869–877.