

精神疾患関連遺伝子多型の解析

Analysis of polymorphism in genes related to psychiatric diseases

松田基夫¹, 岩橋和彦¹, 信田卓夫², 小方宗次², 吉原英児¹, 荻原喜久美¹,
陰山敏昭², 柏崎直巳², 村山 洋¹, 飴野 清³, 高島明彦⁴

¹麻布大学環境保健学部

²麻布大学獣医学部

³香川医科大学医学部

⁴理化学研究所脳科学総合研究センター

Motoo Matsuda¹, Kazuhiko Iwahashi¹, Takuo Sida², Munetsugu Ogata¹, Eiji Yoshiwara¹, Kikumi Ogihara¹,
Toshiaki Kageyama¹, Naomi Kashiwazaki¹, Ohoshi Murayama, Kiyoshi Ameno¹, Akihiko Takashima⁴

¹School of Environmental Health Sciences, Azabu University

²School of Veterinary Medicine, Azabu University

³School of Medicine, Kagawa Medical University

⁴Brain Science Institute, RIKEN

Abstract: The aim of this study is to reveal polymorphism in genes associated with psychiatric disorders and/or neurodegenerative diseases. Using genomic DNA of 44 normal young adults, nucleotide sequences of the 5' region of GSK3 β gene containing the promoter region was analyzed. Polymorphic nucleotides were identified at nucleotide position, - 717 (T/C), - 338 (G/C), - 252 (G/T), - 180 (A/T), - 50 (T/C), + 457 (C/G) and + 471 (C/A). Some of them were demonstrated to be novel polymorphism and may be specific to the Japanese. Compared with other mammalian animals such as mouse, rat, bovine, dog and pig, the region between the transcription initiation site and the initiation codon was revealed to be highly varied. However sequences of the other region analyzed were highly conserved.

Lithium, a therapeutic agent for psychiatric disorder such as bipolar, inhibits GSK3 β and production of amyloid β , a main component of senile plaques in Alzheimer's disease. In addition, the level of GSK3 β is decreased in schizophrenia patients and increased depending on age. In conclusion, considering these facts, the present data may provide us basic and important information in order to study mechanism (s) by which GSK3 β gene expression is regulated.

目 的

ストレス社会と言われる現代では精神疾患の診断・予防・治療技術の向上がきわめて重要であり、そのためには発症の原因を明らかにすることが必要である。統合失調症・躁鬱病では原因の一部として

遺伝的要因が考えられるが、これら精神疾患の発症をそれぞれ十分に説明できる遺伝的背景（原因遺伝子あるいは遺伝的危険因子）は必ずしも明らかではない。そこで、抗躁薬に使われているリチウム製剤の標的となるタンパク質に着目し、その遺伝子多型の解析を進めている。

リチウムが阻害する酵素の一つとして GSK3 β (glycogen synthase kinase3 β) が知られている。GSK3 β は脳神経系において多く発現し、初期発生における体節形成や脳神経系の発生に関与している (1)。また、GSK3 β はアルツハイマー病など神経原線維変化に見られるタウタンパク質の過剰なリン酸化に関与するキナーゼとして同定された酵素である (2)。タウの過剰リン酸化は GSK3 β と家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の産物であるプレセニン1 との相互作用を介して促進される可能性が考えられている (3)。最近、リチウムがアルツハイマー病で観察される老人班の主成分であるアミロイドの産生・分泌を抑制することが報告され、GSK3 β がアルツハイマー病治療薬の標的として注目されている (4)。一方、統合失調症において GSK3 β の発現量が低下していることが報告されている (5)。したがって、GSK3 β が脳神経系の機能にとって重要な働きをもつと考えられる。しかし、それぞれの脳機能障害の発症において GSK3 β がどのように関与しているのか、そのメカニズムは明らかではない。

GSK3 β の発現量が加齢に伴い増加していること、また統合失調症患者において低下していることから、本研究では GSK3 β の発現調節と各疾患の発症との関係を明らかにすることを目的としている。今回は、GSK3 β 遺伝子の発現調節領域 (プロモーターおよび 5'非翻訳領域) を中心に多型解析と各種動物種間の比較解析を行った。

方 法

健常者から採取した血液より抽出したゲノム DNA を解析の試料とした。Lau ら (6) および Russ ら (7) が報告したヒト GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を基にして、まず転写因子 CRE 結合部位を含む領域 (以下 CRE 領域)、AP1 結合部位を含む領域 (以下 AP1 領域)、Sp1 結合部位を含む領域 (以下 Sp1 領域)、開始コドン ATG を含む領域 (ATG 領域) をそれぞれ PCR で増幅するための PCR プライマーを設計した。次いで、PCR 増幅産物の塩基配列を ABI310PRISM Genetic Analyzer を用いて決定した。

比較解析を目的として、ラット (SD)、マウス (B6)、ウシ (ホルスタイン)、ブタ (雑種)、イヌ (雑種) の血液からそれぞれゲノム DNA を抽出して

遺伝子解析に用いた。ヒト GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を基にして設計したプライマーを用いて各動物種の遺伝子 5'上流領域の PCR により増幅した。PCR 増幅産物の塩基配列を上記と同様に決定し、ヒト GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域に相当する部分であることを確認し、得られた塩基配列をヒト GSK3 β 遺伝子のものと比較した。

結果と考察

健常者 44 検体について解析した結果、転写開始点の上流領域と 5'非翻訳領域内にそれぞれ 5カ所および 2カ所に多型を確認した (-717 (T/C), -338 (G/C), -252 (G/T), -180 (A/T), -50 (T/C), +457 (C/G), +471 (C/A))。また、AP1, AP2, Sp1 など転写因子結合配列では、塩基の違いは確認されなかった。すでに多くの GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域の一塩基遺伝子多型が報告されているが、今回同定した多型には日本人特有の多型と考えられるものがあり、これが人種による精神疾患の病型の差異を反映している可能性が考えられる。

ヒト GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を基にして設計したプライマーを用いてヒト遺伝子に相当する領域が増幅できたことから、GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域が保存性の高い領域であることが示唆された。このことは塩基配列を決定し確認した。しかし、ヒトと他の動物種 (マウス、ラット、ウシ、イヌ、ブタ) との比較から、ATG 領域内にある転写開始点から翻訳開始点の約 700 塩基の領域が多様性に富むことが明らかとなった。ヒトと比較した場合、これらの動物では数塩基から 10 数塩基の欠失あるいは挿入が認められ、この違いは ATG 領域に集中していた。一方、ATG 領域以外の転写開始点上流領域は種間で保存性の高い領域であった (90%以上の相同性)。精神疾患がヒトに特有の疾患であるとすると、ATG 領域に塩基配列の多様性が認められたことは非常に興味深い。今後、精神疾患の患者の遺伝子解析も加える必要はあるが、以上の結果は GSK3 β の活性阻害だけでなく GSK3 β 遺伝子の発現調節もその治療薬の重要な標的となりうることを示唆しているものと考えられる。

要約

ヒト GSK3 β 遺伝子のプロモーター領域について多型解析を行った結果、日本人特有と考えられる新規一塩基遺伝子多型を含む遺伝子多型を同定した。また、マウス、ラット、ウシ、イヌ及びブタとの比較解析から転写開始点から翻訳開始点にかけて多様性に富む領域であることが明らかとなった。これらの結果は GSK3 β 遺伝子発現調節の詳細な解析を進める上で重要な結果であると考えている。

文献

- 1) Plyte, S.E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulver, B.J., Woodgett, J.R., Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta*: 1114: 147-162, 1992.
- 2) Ishiguro, K., Ihara, Y., Uchida, T., Imahori, K., A novel tubulin-dependent protein kinase forming a paired helical filament epitope on tau. *J Biochem (Tokyo)*: 104: 319-321, 1988.
- 3) Takashima, A, Murayama, M, Murayama, O, Kohno, T, Honda, T, Yasutake, K, Nihonmatsu, N, Mercken, M, Yamaguchi, H, Sugihara, S, Wolozin, B., Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA*.: 95: 9637-9641, 1998.
- 4) Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V. M. -Y. and Klein, P.S., GSK3 β regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature*; 423: 435-439, 2003.
- 5) Nadri, C., Lipska, B.K., Kozlovsky, N., Weinberger, D.R., Belmaker, R.H. and Agam, G., Glycogen synthase kinase (GSK) -3 β levels and activity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Brain Res Dev Brain Res*; 141: 33-37, 2003.
- 6) Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Honda, T., Tomita, T. and Iwatsubo, T., Association of presenilin 1 with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. In *Alzheimer's disease and related disorders: Etiology, pathogenesis and therapeutics.*, ed. Iqbal, K. Swaab, D.F., Winblad, B. and Wisniewski, H.M., John Wiley & Sons Ltd, pp323-331, 1999
- 7) Lau, K.F., Miller, C.C., Anderton, B.H. and Shaw, P.C., Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3 beta promoter. *Genomics*; 60: 121-128, 1999
- 8) Russ, C., Lovestone, S. and Powell, J.F., Identification of sequence variants and analysis of the role of the glycogen synthase kinase 3 beta gene and promoter in late onset Alzheimer's. *Mol Psychiatry*; 6: 320-324 2001.