

# 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, 岩橋和彦, 信田卓男<sup>1</sup>, 小方宗次<sup>1</sup>, 吉原英児, 荻原喜久美,  
陰山敏昭<sup>1</sup>, 柏崎直巳<sup>1</sup>, 村山 洋, 飴野 清<sup>2</sup>, 高島明彦<sup>3</sup>

麻布大学環境保健学部, <sup>1</sup>麻布大学獣医学部, <sup>2</sup>香川医科大学医学部, <sup>3</sup>理化学研究所脳科学総合研究センター

Motoo Matsuda, Kazuhiko Iwahashi, Takuo Shida,<sup>1</sup> Munetsugu Ogata<sup>1</sup>, Eiji Yoshiwara, Kikumi Ogiwara, Toshiaki Kageyama<sup>1</sup>,  
Naomi Kashiwazaki<sup>1</sup>, Ohoshi Murayama, Kiyoshi Ameno<sup>2</sup>, and Akihiko Takashima<sup>3</sup>

The School of Environmental Health Sciences, Azabu University;

<sup>1</sup>The School of Veterinary Medicine, Azabu University;

<sup>2</sup>The School of Medicine, Kagawa Medical University;

<sup>3</sup>Brain Science Institute, RIKEN

**Abstract.** The aim of this study is to reveal polymorphism in genes associated with psychiatric disorders and neurodegenerative diseases. Genomic DNA from patients affected by schizophrenia or bipolar, and normal humans were analyzed. Comparing the psychiatric disorders with normal humans, no significant differences in a ratio of polymorphism found throughout the regulatory region of GSK3 $\beta$  gene (promoter and 5'-UTR). Lithium, a therapeutic agent for psychiatric disorder such as bipolar, inhibits GSK3 $\beta$  and production of amyloid $\beta$ , a main component of senile plaques in Alzheimer's disease. In addition, the level of GSK3 $\beta$  is decreased in schizophrenia patients and increased depending on aging. The results in this study lead us to consider that 3'-UTR of GSK3 $\beta$  gene and trans acting factors for GSK3 $\beta$  transcription should be studied. In conclusion, the present data may provide us basic and important information that promote revealing the molecular mechanism for regulation of GSK3 $\beta$  gene expression.

## 目 的

ストレス社会の現代では、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、その発症の原因を明らかにすることが重要である。統合失調症、躁うつ病の発症原因には社会的・環境的ストレスが深く関わっているが、一方では遺伝的要素の関与も統計的に示されている。遺伝形式についての定説はなく多因子疾患であると考えられるが、遺伝的背景（原因遺伝子あるいは遺伝的危険因子）に関して必ずしも詳細は明らかではない。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、その遺伝子について遺伝子多型解析をおこなった。

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する glycogen synthase kinase3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (1) は、躁鬱病治療薬として用いられるリチウム製剤によりそのタンパク質リン酸化活性が阻害される酵素として知られている。また、GSK3 $\beta$  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)。家族性アルツハイマー病の原因のうち殆どをしめる原因遺伝子産物であるプレセニリン1と GSK3 $\beta$  との

相互作用を介してタウの過剰リン酸化が促進される可能性が考えられている (3)。また、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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ が脳神経系の機能にとって重要な働きをもち、痴呆症あるいは統合失調症などの機能性脳疾患発症機序の鍵となる分子であると考えられる (6)。しかし、それぞれの脳機能障害の発症においてGSK3 $\beta$ 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。そこで、統合失調症および躁鬱病の遺伝的要素の検索を目的として、GSK3 $\beta$ およびその基質 (神経特異的微小管結合タンパク質 tau) の遺伝子多型解析を行った。

## 方 法

インフォームドコンセントを得た後に、統合失調症、躁うつ病および健常者の血液よりゲノム DNA を抽出し、遺伝子多型解析に用いた。GSK3 $\beta$ の遺伝子発現調節領域 (プロモーター領域、5'非翻訳領域) とタウ遺伝子の RNA スプライシング部位において SNPs (単一遺伝子多型) を PCR 産物の直接塩基配列決定法により解析した。

Lau ら (7) および Russ ら (8) が報告したヒト GSK3 $\beta$  遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を基にして、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 ABI 310 PRISM Genetic Analyzer を用いて決定した。

既知の SNPs を含め、GSK3 $\beta$  遺伝子及び tau 遺伝子に認められた遺伝子多型の機能的意義を検討する目的で、哺乳類のヒト以外の動物種の相同な領域についてその塩基配列を明らかにし、ヒトゲノム配列と比較解析した。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)、チンパンジー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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  遺伝子のものと比較した。

本研究計画は麻布大学ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理審査委員会の承認のもとで行った。

## 結果と考察

既に健常者について解析した結果から認められている多型、すなわち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 (−717 (T/C), −338 (G/C), −252 (G/T), −180 (A/T), −50 (T/C), +457 (C/G), +471 (C/A)) については、今回の解析では、統合失調症および躁鬱病患者との関連を示唆する結果は得られなかった。しかし、最近になって、GSK3 $\beta$  のプロモーター領域の多型が精神疾患と相関を示めす結果が報告されており ( ), GSK3 $\beta$  のプロモーター領域の多型は発症に関わる遺伝要素の一つと考えられる。この報告は主に白人が対象となっており、本研究の研究結果との違いが人種間の病型の違いを反映している可能性も考えられる。従って、検体数をさらに増やし、臨床症状や予後と多型との関係を詳細に検討することが重要である。また、GSK3 $\beta$  のプロモーターは転写因子結合配列の特徴から遺伝子の神経細胞特異的発現との関係が示唆されている null-promoter に分類されるプロモーターである。本研究における比較ゲノム解析の結果は、ヒト脳神経系における GSK3 $\beta$  発現調節の詳細を明らかにする上で重要な情報を提供するものと考えられる。

数種類の哺乳動物 (産業動物、愛玩動物、霊長類) の間でのゲノム比較解析から、予想されている転写開始点近傍の 3 塩基繰り返し配列において動物種間に違いを見いだした。また、GSK3 $\beta$  遺伝子の 5'-UTR の配列が他のプロモーター領域と比べて多様であることが明らかとなった。ただし、これらの種間による違いとヒトにおける遺伝子多型との間には特に関連性を見いだすことはできなかった。

GSK3 $\beta$  の基質である tau は、選択的スプライシン

グによって6種類のアイソフォームとして発現している。スプライシング部位の変異が一部の痴呆症の原因突然変異として同定されており、スプライシングの調節に関わる部位の変異が脳神経系の障害と関係する可能性が考えられる。そこで、exon2とexon3の選択的スプライシングに着目しintron2の5'末端および3'末端の塩基配列を健常者、統合失調症あるいは躁鬱病の患者について決定し、遺伝子多型の有無を調べた。その結果、いずれの検体においても遺伝子多型となる塩基の変異は認められず、上記部位における選択的スプライシングと疾患との関連はないものと考えられた。

以上の結果から、GSK3 $\beta$ 遺伝子のプロモーター領域および5'-UTR（非翻訳領域）において統合失調症および躁鬱病との有意に関連する遺伝子多型は見いだされなかった。このことから、本研究の解析対象としなかった転写産物の安定性に関与する3'-UTR、あるいはGSK3 $\beta$ 遺伝子発現に関わるトランス調節因子の遺伝子多型を解析する必要があると思われる。しかし、GSK3 $\beta$ 遺伝子の発現調節機序は明らかではなく、精神疾患とGSK3 $\beta$ 遺伝子発現との関係を明らかにする上で、本研究の多型解析および比較ゲノム解析の結果が重要な意味を持つものと考えられる。

### 要 約

ヒトGSK3 $\beta$ 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、統合失調症および躁鬱病と有意に関連する遺伝子多型は認められなかった。このことは、mRNAの安定性に関与する領域、トランス調節因子などについて解析する必要があることを示唆している。

### 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 $\beta$  and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95: 9637-9641, 1998.
- 4) Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M.-Y. and Klein, P. S., GSK3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 disease. *Mol Psychiatry*; 6: 320-324 2001.