



Novel Polymorphism in the Gene Region Encoding the Carboxyl-Terminal Intracellular Domain of the NMDA Receptor 2B Subunit : Analysis of Association With Schizophrenia

西口, 直希

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2181

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002181>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【64】

氏 名・(本 籍) 西口 直希 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1302号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成12年9月30日

【学位論文題目】

**Novel Polymorphism in the Gene Region Encoding the
Carboxyl-Terminal Intracellular Domain of the NMDA Receptor 2B
Subunit: Analysis of Association With Schizophrenia**

(NMDA 受容体 2B サブユニットのカルボキシル末細胞内領域を
コードする遺伝子部位の新たな多型：精神分裂病との相関研究)

審 査 委 員

主査 教授 前田 潔

教授 齋藤 尚亮 教授 上野 易弘

はじめに

これまでの双生児研究、家族研究、養子研究により精神分裂病（分裂病）の病因として遺伝因子が関与していることが示唆されている。また、興奮性アミノ酸神経伝達は、分裂病の病因として関与しているかもしれない。グルタミン酸神経伝達の分裂病への関与を最も強く示唆するのは、精神症状惹起物質であるフェンサイクリジン（PCP）の作用機序に関するものである。PCPおよび、ケタミンやMK-801といった、他の*N*-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体拮抗薬はおそらくNMDA受容体を阻害することにより、精神症状をきたす。このようにNMDA受容体拮抗薬が分裂病とよく似た症状をきたすことから、分裂病ではNMDA受容体に関わる神経伝達の機能障害あるいは調節障害がおこっていることが考えられる。

NMDA受容体は、NMDA受容体1（NR1）サブユニットと、AからDよりなるNMDA受容体2（NR2）サブユニットのうちの一つからの組合せにより形成されていると考えられている。NMDA受容体機能の多様性はNMDA受容体サブユニットの組合せの違いによるものと思われる。ラットの脳内において、NR2Bサブユニットは生後間もない時には、ほぼ全域に認められるが、その後3週間で、前脳に局在するようになる。こうしたNR2Bサブユニットの局在の変化における調節障害が分裂病の病因として関与しているかもしれない。これは、分裂病の神経発達障害仮説に合致するものである。

ヒトNR2BサブユニットのcDNAのクローニングはすでに報告されている。NR2Bサブユニットには細胞質に長く伸びるカルボキシル末（C末）領域を

もつと考えられている。NR2Bサブユニットは、脳内での受容体の局在や機能を調節するシグナル伝達分子を豊富に含むシナプス後肥厚部における主要なチロシンリン酸化タンパクである。例えば、アクチン結合タンパクの一つである、 α -actinin-2はNR2Bサブユニットの細胞質内尾部に結合する。CaMKIIのNR2Bサブユニットにおける主要なリン酸化部位は、C末領域に位置する。これらの知見は、NR2BサブユニットのC末細胞内領域が細胞内情報伝達において、極めて重要な役割を担っていることを示唆するものである。

今回、我々は、分裂病の発症に関与する可能性がある、ヒトNR2BサブユニットのC末細胞内領域をコードする部位の遺伝子多型のスクリーニングを行った。この多型が分裂病の病因として関わっているかどうかを調べるために、多型の頻度を血縁関係のない分裂病群および対照群で比較検討した。

方法

この研究は神戸大学医学部の倫理委員会の承認を受けている。すべての対象者から書面によりインフォームドコンセントを得た。対象は164名の互いに血縁関係のない日本人患者で、DSM-IVにおける分裂病の診断基準を満たすものである（男性105名、女性59名、平均年齢 51.5 ± 14.1 歳）。対照群は、互いに血縁関係のない171名の健常ボランティアである（男性104名、女性67名、平均年齢 47.8 ± 14.0 歳）。

ヒトNR2Bサブユニット遺伝子の予想されるアミノ酸配列はマウスの配列と90%の相同性を持っている。マウスNMDA受容体 ϵ サブユニット（ヒトの

NR2Cサブユニットに相当)のC末領域をコードする部位が、小さいサイズのエクソン(26アミノ酸をコードする)と大きなサイズのエクソン(378アミノ酸をコードする)より成っていることから、遺伝子構造の相同性により、ヒトNR2BサブユニットのC末は一つの大きなエクソンによってほぼコードされていると思われる。この予想される大エクソンの全領域をカバーするように、約300bpのPCR産物が得られるよう7つのプライマーを設計した。標準的なPCRを行い、SSCP法を用いて22人の分裂病患者をスクリーニングした。SSCPにて異なったパターンを示すフラグメントをダイレクトシーケンスした。変異の確認および分裂病患者群と対照群間の変異解析をおこなうため、制限酵素AclIを用いた。

分裂病患者群と対照群における遺伝子頻度、遺伝子型の相違の検定には、カイ二乗検定を用いた。

結果

先に述べた方法によって得られたPCR産物のフラグメントの大きさは、予想されるものと一致していた。我々は、ヒトNR2BサブユニットのC末細胞内をほぼ全域コードする大エクソンをスクリーニングしたことになる。SSCPおよびダイレクトシーケンスにより、一つの一塩基置換が同定された。この変異はcDNAの2664番目に位置しており、アミノ酸置換を伴わないサイレント変異であり、888番目のコドンのACCからACTへの変異であった。我々が検討した領域において、アミノ酸置換を伴う変異は同定されなかった。表1に、分裂

病患者群および対照群における2664C/Tの遺伝子型、遺伝子頻度の分布を示す。分裂病群での遺伝子型、遺伝子頻度は、対照群と比べて有意な差は認められなかった（遺伝子型、 $\chi^2=0.93$ 、 $df=2$ 、 $p>0.1$ ；遺伝子頻度、 $\chi^2=0.08$ 、 $df=1$ 、 $p>0.1$ ）。

考察

我々は、NR2BサブユニットのC末の細胞内領域をコードする部位に遺伝子多型を一つ（2664C/T）見つけた。これは我々の知る限り、ヒトNR2Bサブユニット遺伝子における多型の初めての報告である。

分裂病と2664C/Tとのあいだに相関は見られないとする我々のデータから、ヒトNR2Bサブユニット遺伝子は分裂病の病因として関与している可能性は低いと考えられる。しかし、NMDA受容体はニューロン間の伝達やニューロンの遺伝子発現に影響を及ぼしており、ニューロンの可塑性、発達、成長に関与している。なかでもヒトNR2BのmRNAの分布は前頭葉、側頭葉皮質や海馬に局限しており、これらの部位は分裂病での変化が疑われているところである。したがって、NR2Bはなお分裂病における候補遺伝子である。NR2Bサブユニット遺伝子には、タンパクの機能に変化を及ぼし、その変化により分裂病の病因となりうるような多型があるかもしれない。C末細胞内領域をコードする部位以外の部位において、遺伝子マーカーあるいは機能的変異を探し、もし存在するならば、その多型が分裂病と相関するかどうかを検討する必要がある。

表 1. 分裂病群、対照群におけるNMDA受容体2B (NR2B) サブユニット遺伝子
2664C/T多型の遺伝子型、遺伝子頻度の分布

	NR2Bサブユニット2664C/T多型頻度			
	分裂病群 (N=164)		対照群 (N=171)	
	N	%	N	%
遺伝子型				
C/C	41	25.0	49	28.7
C/T	89	54.3	84	49.1
T/T	34	20.7	38	22.2
遺伝子頻度				
C	171	52.1	182	53.2
T	157	47.9	160	46.8

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1303号	氏 名	西口直希
論文題目	Novel Polymorphism in the Gene Region Encoding the Carboxyl-Terminal Intracellular Domain of the NMDA Receptor 2B Subunit: Analysis of Association With Schizophrenia NMDA受容体2Bサブユニットのカルボキシル末 細胞内領域をコードする遺伝子部位の 新たな多型：精神分裂病との相関研究		
審査委員	主 査 前田 潔 副 査 斎藤 尚亮 副 査 上野 易弘		
審査終了日	平成 12 年 8 月 21 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

NMDA 受容体は、脳内の主な興奮性神経伝達を担う興奮性アミノ酸受容体の一つであるが、近年、ニューロンの可塑性に関与し、記憶や学習、神経発達において重要な役割を担っていることが知られてきている。NMDA 受容体アンタゴニストであるフェンサイクリジン (PCP) は、精神分裂病 (分裂病) に酷似した症状を引き起こすことから、分裂病における NMDA 受容体の関与が考えられている。NMDA 受容体は R1 サブユニットと A から D の 4 つのサブファミリーからなる R2 サブユニットの組合せで形成されるチャンネル型受容体であるが、NMDA 受容体機能の多様性は、この組合せの違いによるものと考えられている。R2 サブユニットファミリーの中で、NMDA 受容体 2B (NR2B) サブユニットは、分裂病での変化が言われている前頭皮質、辺縁系に強く発現していること

から、分裂病発症に関わる候補遺伝子であると考えられる。さらに、シナプス後肥厚部で主なタンパクとして同定されたこと、種々の細胞内情報伝達分子との相互作用部位が存在することがわかってきたことから、NR2B サブユニットの C 末細胞内領域は、細胞内情報伝達において極めて重要な役割を担っており、同部位の機能変化が分裂病の発症に関与している可能性があると考えられる。以上より、本研究者は、NR2B サブユニット遺伝子の C 末細胞内領域をコードする部位、約 2000bp を Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法により遺伝子多型の存在をスクリーニングした。さらにまた、同定された多型をマーカーとして、NR2B 遺伝子が分裂病の発

症因子である可能性について検討した。統計処理にはカイ二乗検定を用いた。

文書による同意を得た分裂病患者末梢血液より、DNA を抽出し、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により関心領域を増幅した後、SSCP 原法に従い、NR2B サブユニット遺伝子のC末細胞内領域をコードする部位をスクリーニングした。SSCP 法にて異なる泳動パターンをしめしたサンプルをダイレクトシーケンスしたところ、翻訳開始領域から 2664 番目の C から T の変異 (2664C/T) が確認された。これはコドンの 3 番目に位置し、アミノ酸への翻訳には変化をもたらさないサイレント変異であった。PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法により、分裂病群 (N=164)、対照群 (N=171) においてこの多型の頻度を同定し、多型の分布を比較したところ、遺伝子型、遺伝子頻度ともに、両群間での有意差は認められなかった。このことから、NR2B サブユニット遺伝子が分裂病の発症に関与している可能性は低いと考えられた。

本研究は、NR2B サブユニット遺伝子における遺伝子多型の存在を始めて報告したものであり、NR2B サブユニット遺伝子が分裂病の発症因子である可能性について重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。