



Novel missense polymorphism in the Regulator of G-protein signaling 10 gene : Analysis of association with schizophrenia

菱本, 明豊

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3146

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003146>

※ 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。



【 148 】

氏 名・(本 籍) 菅原 明豊 (京都府)
博士の専攻分野の名称 博士(医学)
学 位 記 番 号 博い第1608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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Novel missense polymorphism in the Regulator of G-protein
signaling 10 gene: analysis of Association with schizophrenia
(RGS10 遺伝子における新奇ミスセンス多型と統合失調症
との相関研究)

審 査 委 員

主査 教 授 新福 尚隆
教 授 久野 高義
教 授 上野 易弘

はじめに

Gタンパク質を介した神経シグナル伝達の機能的障害は、統合失調症の病態生理に関わる可能性が示唆されている。Regulator of G-protein signaling (RGS) は G タンパク質 α サブユニットに対し GTP 水解促進 (GAP) 活性として働き、G タンパク質シグナル伝達系においてネガティブな調節を担うタンパク質である。RGS タンパク質は現在までに哺乳類で 20 種以上のサブタイプが同定され、すべての RGS タンパク質は RGS ドメインと呼ばれる種をこえてよく保存された 120 個のアミノ酸からなる領域を持ち、このドメインが GAP 活性の中心的役割を持つ。機能的には、ドーパミン受容体、GABA 受容体、セロトニン受容体、グルタミン酸受容体などの G タンパク質共役型受容体を介した細胞内伝達の抑制的制御に関わっている。

最近、RGS ファミリーの 1 つである RGS4 の mRNA が統合失調症の死後脳において減少していることが報告され、RGS4 遺伝子内のいくつかの 1 塩基多型 (SNP) と統合失調症との相関が明らかにされている。加えて、黒質での RGS2、RGS4 遺伝子の発現はドーパミン D1, D2 受容体によって制御されていることが知られている。このように RGS タンパク質は、統合失調症の病態への関与のみならず精神神経疾患の治療薬の標的蛋白である可能性を秘めている。

RGS10 は RGS ファミリーに属し、173 個のアミノ酸から成る。RGS10 遺伝子は、5 個のエクソンから成り、染色体 10 番 (10q26.11) に位置している。RGS10 は 2 つの G タンパク質のサブユニット Gai3, Gαz に特異的に働き、中枢神経系、中でも統合失調症の病態生理に関わると考えられている前頭前皮質や海馬に豊富に発現している。動物実験では急性、慢性の電気けいれん刺激によりこの領域での RGS10 の mRNA は、他の RGS タンパク質が変化しないにもかかわらず特異的に減少することが明らかにされている。さらに、ヒトにおいて電気けいれん療法は、精神病症状を改善させることでも知られている。このような知見を踏まえ、我々は RGS10 遺伝子のアミノ酸置換を伴う (ミスセンス) 多型が存在すれば、その多型がこのタンパク質の GAP 活性に影響を及ぼし、統合失調症の生物学的脆弱性に関与するかもしれないという仮説を立てた。

この仮説を検証するために我々は RGS10 遺伝子のアミノ酸置換を伴う翻訳領域内の機能的と考えられる多型の有無の検索を行い、その多型が統合失調症と関連があるかどうかを調べるために、相関研究を行った。加えて、RGS10 遺伝子の既報告のミスセンス多型と統合失調症との相関も調べた。

対象と方法

本研究は神戸大学大学院医学系研究科遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認のもとで行われている。本研究に参加した対象者には研究の趣旨を十分に説明

し文書による同意を得た。

対象は DSM-IV の診断基準を満たす統合失調症患者 311 人（男性 178 人、女性 133 人、平均年齢 50.7±17.2 歳）とコントロール 345 人（男性 205 人、女性 140 人、平均年齢 52.0±18.5 歳）である。

我々は 311 人の統合失調症患者から無作為に 33 人を選び出し、ダイレクトシーケンス法により、RGS10 遺伝子の翻訳領域の変異検索を行った。RGS10 遺伝子の構造は NCBI データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NT_030059, AF045229) により決定した。遺伝子 DNA は全血から得た。次のプライマーを用いて PCR 法により全翻訳領域を増幅し、遺伝子配列を解析した。プライマーは次の通りである。

プライマーペア一 1: 5'-GGA AAC CAG TGG CCA TCT GT-3' と 5'-CTC TGT GTC CTC ACA GCA CA-3' (增幅サイズ 285 bp, アニーリング温度 (Ta) 60°C)

プライマーペア二 2: 5'-GGC AGT GCT GAC CAT TGC AT-3' と 5'-GAG TGC TAC GAC AGA CA-3' (308 bp, Ta 60°C)

プライマーペア三 3: 5'-GGG GTT TTC GAA GAG TAA CT-3' と 5'-GGC AAC TTC AGA ATC TAT TG-3' (295 bp, Ta 56°C)

プライマーペア四 4: 5'-CCT TTC TCT TGC CAC AGC AG-3' と 5'-GGA GTC TAA CAT CGG GTG TT-3' (346 bp, Ta 58°C)

プライマーペア五 5: 5'-GGG ATG ATT TAT GGC CTG GA-3' と 5'-CCC ATT GAA GGG TTT TGT AC-3' (329 bp, Ta 56°C)

同定した Val38Met 多型はプライマーペア二を用いて RGS10 遺伝子を増幅し、制限酵素 *Nla*III によって確認した。Met38 は 168bp, 119bp, 21bp に切断され、Val38 は 168bp, 21bp に切断された。また、我々はプライマーペア四を用いて、RGS10 遺伝子エクソン 4 にある既報告のミスセンス多型 Ala88Val についても変異頻度の検索を行った。変異同定には制限酵素 *Stu*I を用いた。

統合失調症患者とコントロールにおける RGS10 遺伝子の遺伝子型とアレル頻度の差の統計解析には両側 Fisher's exact 検定を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

RGS10 遺伝子のエクソン 2 に 1 個のミスセンス多型 CTG→ATG、(Val38Met : 38 番目のバリンがメチオニンに変異) を同定した。相補型 DNA の塩基位置は 244 番であった。この翻訳領域においてその他のミスセンス多型やサイレント変異は同定出来なかった。表 1 に統合失調症とコントロールにおける Val38Met 多型の遺伝子型頻度とアレル頻度を示す。両群におけるこの多型の遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg 平衡を満たしていた。この多型について、統合失調症患者と

コントロール間における遺伝子型頻度とアレル頻度に有意な差は認めなかつた。

(遺伝子型 : $\chi^2 = 1.371$, d.f. = 2, $P = 0.574$; アレル : $\chi^2 = 0.060$, d.f. = 1, $P = 0.833$)

既報告の Ala88Val 多型については、我々の日本人サンプルでは見つからなかつた。

考察

本研究において我々は RGS10 遺伝子に新奇のアミノ酸置換を伴う多型を同定した。この Val38Met 多型が RGS10 の機能に影響を及ぼすかどうかは明らかではないが、RGS10 の GAP 活性を担う RGS ドメイン内に存在する多型であることから、G タンパク質共役型受容体を介した細胞内伝達を変化させる可能性がある。今後、RGS10 の酵素活性を評価する等、この多型の機能的解析が必要である。

本研究では RGS10 遺伝子の Val38Met 多型と統合失調症に相關は認めなかつたことから、RGS10 遺伝子が統合失調症の病態に重要な役割を果たすという証拠を得ることは出来なかつた。しかし、この相關研究における検出力はおよそ 0.12 であり、RGS10 遺伝子の Val38Met 多型と統合失調症の相關を認めないとする我々の結果がタイプ II エラーである可能性を除外出来ない。従って、もっと大きなサンプル数で統合失調症とこの多型の相關研究を行う必要がある。さらに、RGS10 遺伝子が統合失調症の生物学的脆弱性に寄与するかどうかを明らかにするには、RGS10 遺伝子のプロモーター領域やイントロン、翻訳領域下流などにおける多型を検索する必要がある。加えて、RGS10 遺伝子が位置する 10q26.11 は、双極性障害（躁うつ病）の連鎖部位の 1 つであり、こうした他の精神疾患とこの多型との相關研究も必要である。

表 1

統合失調症とコントロールにおける RGS10 遺伝子 Val38Met 多型の遺伝子頻度と

アレル頻度

対象グループ	遺伝子型		アレル	
	n (%)	n (%)	Val	Met
Val/Val	Val/Met	Met/Met		
統合失調症	300(96.5)	11(3.5)	0(0.0)	611(98.2) 11(1.8)
コントロール	335(97.1)	9(2.6)	1(0.3)	679(98.4) 11(1.6)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1607 号	氏名	菱本 明豊
論文題目	<p>Novel missense polymorphism in the Regulator of G-protein signaling 10 gene: analysis of Association with schizophrenia</p> <p>RGS10 遺伝子における新奇ミスセンス多型と統合失調症との相関研究</p>		
審査委員	主査	新井 隆	
	副査	久野 高義	
	副査	上野 昌弘	
審査終了日	平成 16 年 4 月 6 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

G タンパク質を介した神経シグナル伝達の機能的障害は統合失調症の病態生理に関わるものと考えられている。Regulator of G-protein signaling (RGS) は G タンパク質 α サブユニットに対し GTP 水解促進 (GAP) 活性として働き、G タンパク質シグナル伝達系の負の調節を担う。結果的に、RGS タンパク質はドーパミン受容体、GABA 受容体、セロトニン受容体、グルタミン酸受容体などの精神疾患に関連があるとされる G タンパク質共役型受容体を介した細胞内伝達の持続時間を縮小させる。

RGS ファミリーの 1 つである RGS4 の転写が統合失調症の死後脳において減少していることが報告され、RGS4 遺伝子内のいくつかの 1 塩基多型 (SNP) が統合失調症と相関していることや黒質での RGS2、RGS4 遺伝子の発現はドーパミン D1、D2 受容体によって特異的に調整されていることなどから、RGS タンパク質は精神神経疾患の治療薬の標的になる可能性を秘めている。

本研究で調べられている RGS10 は RGS ファミリーに属し、5 個のエクソン、173 個のアミノ酸から成る。RGS10 遺伝子は染色体 10 番 (10q26.11) に 36.5kb にわたって位置している。RGS10 遺伝子が位置する 10q26 は統合失調症や双極性障害 (躁うつ病) の候補遺伝子座位の 1 つである。RGS10 は統合失調症の病態生理に関わると考えられている前頭前皮質や海馬に豊富に発現している。動物実験では急性、慢性の電気けいれん刺激によりこの領域での RGS10 の mRNA は他の RGS タンパク質に比較して特異的に減少する。電気けいれん療法は精神疾患の精神症状を改善させることでも知られている。このような知見を踏まえ、申請者らは RGS10 遺伝子のアミノ酸置換を伴う (ミスセンス) 多型が存在すれば、その多型がこのタンパク質の GAP 活性に影響を及ぼし、統合失調症の生物学的脆弱性に関与するかもしれないという仮説を立て RGS10 遺伝子の翻訳領域の変異検索を行った。

近年、レセプター関連遺伝子から、前シナップス関連タンパクや後シナップス関連タンパクのカスケードにその対象を移行しつつある統合失調症の、一連の遺伝子関連研究の一環として対象遺伝子選択は妥当なものと考えられる。

本研究は、統合失調症との関連で注目されている RGS ファミリーのなかで、前頭前皮質および海馬での発現が豊富な RGS10 遺伝子に着目し、1. 統合失調症患者 33 人を対象に

RGS10 遺伝子の翻訳領域の変異検索を行い、エクソン 2 に新奇のミスセンス変異 (Val38Met) を発見したこと、2. 統合失調症患者 311 人と対照群 345 人でのこの Val38Met 多型および既知の 1 塩基多型 (Ala88Val) の 2 つの多型で関連研究を行い、遺伝子型頻度、アレル頻度共に有意差を認めなかったことを報告している。RGS10 遺伝子エクソン 2 にアミノ酸置換を伴う新奇の変異を発見したこと、RGS10 と統合失調症との関連は見つけられなかつたものの、新奇のミスセンス変異を報告し、日本人集団での頻度が明らかにされたこと、これまでに疾患と関連した RGS10 の分子遺伝研究は報告されていないこと、また、これまで頻度が明らかでなかった Ala88Val 頻度データが得られたことに意義がある。

本研究は、RGS ファミリーの、特に RGS10 について、その遺伝子の翻訳領域の変異検索を行い、新奇に同定したアミノ酸置換を伴う多型と統合失調症との相関を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた統合失調症と RGS10 の関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。