

博士論文

日本人統合失調症患者における
NMDA 受容体機能低下仮説に基づく候補遺伝子解析

吉川 茜

目次

要旨	7
第一章 研究の背景	8
1-1. 統合失調症における NMDA 受容体機能低下仮説	11
1-2. 統合失調症の遺伝学的研究	12
第二章 統合失調症病態におけるグリシン開裂系関与の検討	17
2-1. 背景	17
2-1-1. グリシン開裂系	17
2-1-2. グリシン脳症	19
2-1-3. グリシン開裂系・グリシン脳症と統合失調症	20
2-2. 目的	22
2-3. 対象と方法	23
2-3-1. 遺伝学的検討	24
2-3-1-1. 配列解析	24
2-3-1-2. エクソン欠失解析	32
2-3-2. メタボローム解析	35
2-4. 結果	38
2-4-1. 遺伝学的検討	38

2-4-1-1. 配列解析	38
2-4-1-2. エクソン欠失解析	49
2-4-2. メタボローム解析	53
2-5. 考察	58
2-5-1. 遺伝学的検討	59
2-5-2. メタボローム解析	67
2-5-3. 本研究における限界	70
第三章 NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群と統合失調症の遺伝学的検討...	73
3-1. 背景	73
3-1-1. NMDA 受容体機能の年齢依存性制御機構.....	73
3-1-2. NMDA 受容体スイッチングと統合失調症	75
3-2. 目的	79
3-3. 対象と方法	80
3-4. 結果	84
3-5. 考察	93
第四章 結語と今後の展望.....	95
謝辞	98
付録 1. 用いたプライマー配列	99
付録 2. PCR 実験条件	104

参考文献.....	106
略語一覽.....	123

図表目次

図 1A. グリシン代謝の概要	18
図 1B. グリシン開裂系と一炭素代謝	18
図 2. 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス実験手法の概要 ...	29
図 3. MLPA 法によるエクソン欠失の判定	34
図 4. グリシン開裂系遺伝子群の稀な変異探索におけるフィルタリング	41
図 5. ROC 曲線による Depth のカットオフ値設定.....	44
図 6. MLPA 法による <i>GLDC</i> エクソン欠失解析結果の代表例	50
図 7. メタボローム解析を用いたグリシン開裂系遺伝子群における稀な変異の機能解析	55
図 8. グリシン開裂系遺伝子群変異保持患者の血漿アスパラギン酸相対値と陰性尺度との相関	57
図 9. NMDA 受容体における年齢依存性スイッチング	77
図 10. スwitching 制御遺伝子群の稀な変異探索におけるフィルタリング	88

表 1. DSM-IV-TR による統合失調症の診断基準	10
表 2. グリシン開裂系遺伝子群の配列解析における対象領域	26
表 3. グリシン開裂系遺伝子群における稀な非同義置換及びスプライス部位の 変異と機能予測結果	42
表 4. グリシン開裂系遺伝子群において見出された稀な同義置換.....	46
表 5. グリシン開裂系遺伝子群において見出された多型と疾患との関連.....	47
表 6. グリシン開裂系遺伝子群において見出された多型と疾患との関連	48
表 7. グリシン開裂系遺伝子群変異保持患者の臨床症状評価と代謝産物の相関	56
表 8. グリシン脳症における原因変異	63
表 9. NMDA 受容体機能修飾にかかわるリン酸化部位	78
表 10. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における配列解析の対象領域	83
表 11. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における稀な非同義置換及びス プライス部位の変異と機能予測結果	87
表 12. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群の稀な変異保持患者の臨床的 特徴	89
表 13. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における稀な同義置換.....	91
表 14. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における多型解析.....	92

要旨

本研究は、NMDA 受容体機能低下仮説に基づき、グリシン開裂系遺伝子群及び NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群を候補とし、統合失調症病態への関与を検討した。グリシン開裂系の遺伝学的解析では、非典型グリシン脳症は本疾患に含まれておらず疾患との関連は明らかではなかったが、患者では非典型グリシン脳症の原因変異近傍の変異など、6 名で興味深い変異を認めた。また、グリシン開裂系遺伝子変異保持患者血漿のメタボローム解析では NMDA 受容体機能に関わる 3 代謝産物の有意な上昇を認め、アスパラギン酸と陰性症状の負の相関を示した。NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群では *Cdk5* において患者のみで稀な変異を見出した。

第一章

研究の背景

わが国において精神疾患により医療を受けている患者数は年間300万人を超え、中でも統合失調症は入院患者の約半数以上を占める重要な精神疾患である（平成23年度、厚生労働省調査）。統合失調症は、記憶、実行機能、注意、処理速度などの認知機能における障害を基盤とし、幻覚妄想などの陽性症状に加え、意欲低下、感情の平板化、思考や会話の貧困化、引きこもりなどの陰性症状を呈する疾患である¹。発症時期は思春期という人生早期が多いにもかかわらず、現存する治療の効果は限定的で、根治治療が存在しないため、多くの患者が再発を繰り返し慢性の経過をたどる。患者や家族の苦悩は生涯にわたり、病態の解明が切実に待たれている。

統合失調症は、1896年に Kraepelin により、経過や予後などの縦断的経過を重視した立場から、思春期に発症し、慢性かつ進行性に人格荒廃にいたる予後不良の一群として、「早発性痴呆 dementia praecox」の名で報告された。一方、Bleuler は連合弛緩、感情鈍麻、両価性、自閉を 4 徴とする横断的な精神症状に基づき、「統合失調症 Schizophrenie」という疾患概念を提唱した²。その後、Schneider は、統合失調症に比較的特異的な精神症状として、作為体験などの自我障害、及び「話しかけと応答の形の幻聴」や「考想伝播」などの一級症状を抽出し、これを重視した概念が取り入れられ、

今日の疾患概念の形成に至っている。統合失調症の診断は、現在は DSM-IV (American Psychiatric Association) などの操作的診断基準に基づき、表 1 に示すように主として臨床症状により行われ、病因を反映した疾患分類は確立されていない。統合失調症は、様々な遺伝子や環境要因が発症に関与する多因子疾患と考えられ、臨床的にも非常に多様性に富む不均一な集団であるが、共通の表現型を呈する症候群として疾患概念がまとめられている。

統合失調症の本邦における発症危険率は諸外国と同様、約 0.8% である。国や民族によらずほぼ一定で、集団差や社会文化的な要因が関与する可能性は低いと考えられている。性差については、男性に高率とする報告が多いものの、いまだ統一された見解には至っていない。発症平均年齢は、女性の方が約 5 歳高く、男性の初発ピークの年齢が 15 歳から 25 歳であるのに対し、女性では 25 歳から 35 歳、45 歳から 50 歳の 2 峰性のピークが認められる³。

統合失調症の治療は、抗精神病薬を主体とする薬物療法を中心とし、精神療法、作業療法などのリハビリテーション、患者や家族が病気の理解を深めるための心理教育などを組み合わせて行われる。今日では、従来の施設収容型の治療から、地域全体で患者の社会生活を支え、病前機能の回復を目指していく地域移行型の支援が積極的に行われるようになってきている。これに伴い、幻覚や妄想の改善にとどまる症候学的軽快のみならず、心理社会的機能の改善を重視し、患者がリカバリーを果たすための支援が重要視されている⁴。

表 1. DSM-IV-TR による統合失調症の診断基準

統合失調症

- A. 特徴的症状:以下のうち 2 つ (またはそれ以上) , おのおのは, 1 か月の期間 (治療が成功した場合はより短い) ほとんどいつも存在:
- (1) 妄想
 - (2) 幻覚
 - (3) まとまりのない会話 (例:頻繁な脱線または滅裂)
 - (4) ひどくまとまりのないまたは緊張病性の行動
 - (5) 陰性症状, すなわち感情の平板化, 思考の貧困, または意欲の欠如
- 注:妄想が奇異なものであったり, 幻聴がその者の行動や思考を逐一説明するか, または 2 つ以上の声が互いに会話しているものであるときには, 基準 A の症状を 1 つ満たすだけでよい.
- B. 社会的または職業的機能の低下 : 障害の始まり以降の期間の大部分で, 仕事, 対人関係, 自己管理などの面で 1 つ以上の機能が病前に獲得していた水準より著しく低下している (または, 小児期や青年期の発症の場合, 期待される対人的, 学業的, 職業的水準にまで達しない) .
- C. 期間:障害の持続的な徴候が少なくとも 6 か月間存在する. この 6 か月の期間には, 基準 A を満たす各症状 (すなわち, 活動期の症状) は少なくとも 1 か月 (または, 治療が成功した場合はより短い) 存在しなければならないが, 前駆期または残遺期の症状の存在する期間を含んでもよい. これらの前駆期または残遺期の期間では, 障害の徴候は陰性症状のみか, もしくは基準 A に挙げられた症状の 2 つまたはそれ以上が弱められた形 (例 : 風変わりな信念, 異常な知覚体験) で表されることがある.
- D. 統合失調感情障害と気分障害の除外:統合失調感情障害と「気分障害, 精神病性の特徴を伴うもの」が以下の理由で除外されていること.
- (1) 活動期の症状と同時に, 大うつ病, 躁病, または混合性のエピソードが発症していない。
 - (2) 活動期の症状中に気分のエピソードが発症していた場合, その持続期間の合計は, 活動期及び残遺期の持続期間の合計に比べて短い.
- E. 物質や一般身体疾患の除外 : 障害は, 物質 (例:乱用薬物, 投薬) または一般身体疾患の直接的な生理的作用によるものではない.
- F. 広汎性発達障害との関係 : 自閉性障害や他の広汎性発達障害の既往歴があれば, 統合失調症の追加診断は, 顕著な幻覚や妄想が少なくとも 1 か月 (または, 治療が成功した場合は, より短い) 存在する場合にのみ与えられる.

(DSM-IV-TR 精神疾患の分類と診断の手引 新訂版、2008、医学書院. より抜粋)

しかし、このような取り組みがなされているにもかかわらず、統合失調症患者の予後は不良であり、約50%の患者は重度な社会的障害が残存するか、長期入院を要している。約4.9%が自殺を完遂し、自殺による死亡率は一般人口に比し約10-30倍にも達する⁵。第三章では、本疾患の思春期発症という時期特異性に焦点を当てた研究について述べるが、社会的自立に向け重要な思春期における発症は、患者から就労を含む自己実現の機会を奪い、自身の人生のみならず家族の人生をも大きく損なう。社会経済的にも甚大な損失をもたらす、統合失調症の病態解明は社会的にも急務である。

1-1. 統合失調症における NMDA 受容体機能低下仮説

これまで、統合失調症における病態仮説として、さまざまな仮説が提唱されてきた。中でも、従来から現在まで、なお有力な仮説の一つである NMDA 受容体機能低下仮説について述べる。

本仮説は、1950年代後半に米国で乱用された NMDA 受容体非競合性拮抗薬 Phencyclidine ; PCP が、陽性症状のみならず、感情鈍麻、自閉、引きこもり、思考・会話の貧困化、などの陰性症状や、認知機能障害を惹起し、統合失調症と酷似した臨床症状を引き起こすことから提唱された。その後 Kim らは、患者における脳脊髄液中のグルタミン酸濃度の低値を報告し⁶、その後も死後脳における NMDA 受容体の発現異常などから、グルタミン酸神経伝達異常が病態に関わっている可能性が示唆された⁷⁻¹¹。また、PCP と同様に NMDA 受容体の非競合性拮抗薬であり、解離性麻酔薬であるケタ

ミンの投与が、患者の精神症状の増悪を引き起こす¹² ことも、本仮説を支持するものと考えられている。

一方、動物を用いた検討からも本仮説は支持されてきた。統合失調症患者の死後脳において、GABA 神経細胞数の減少や glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA の低下は繰り返し再現される所見であるが¹³、皮質辺縁系の介在神経細胞に発現する NMDA 受容体 NR1 サブユニットを生後初期にノックアウトしたマウスでは、思春期以降に統合失調症様の行動異常が惹起される¹⁴。また、近年では、PCP の慢性投与が腹側被蓋野におけるドパミン神経細胞の長期的な活性化を引き起こすことが報告され¹⁵、NMDA 受容体機能低下とドパミン過剰を結ぶ有力な知見と考えられている。このように、統合失調症で示されてきた GABA 伝達異常、ドパミン伝達異常についても、NMDA 受容体機能低下の観点から説明されうる知見が蓄積しつつある^{16,17}。

1-2. 統合失調症の遺伝学的研究

統合失調症の発症には、家系研究、双生児研究、養子研究などの臨床疫学的研究により、遺伝要因の関与が示されてきた。統合失調症には孤発例が存在する一方で、古くから家族内集積性が注目されている。Gottesman は、約 40 の家系研究を統合し、第一度親族における危険率が約 20% であることを示し¹⁸、遺伝要因が関与していることを報告した。

しかしながら、家族内集積性は家族内で共有する環境要因の影響も考慮に入れる必要があり、必ずしも遺伝要因のみの関与を示唆しない。そこで、遺伝要因及び環境要因の双方の影響を検証するため、双生児研究が行われ、一卵性双生児における統合失調症の罹患一致率が約 48%、二卵性については約 15% と、遺伝要因の重要性が改めて示された。また、養子研究では、生物学的親族が罹患者である養子と生物学的親族が非罹患者である養子との比較から、前者の方が統合失調症の罹患率が高いことが示されている¹⁹⁻²¹。このような疾患発症への遺伝要因の関与を受けて、家系を用いた連鎖解析が盛んに行われるようになり、6 番染色体短腕領域をはじめとする多数の疾患感受性部位が報告された²²。しかしながら、報告がなされた疾患感受性部位は多岐にわたり、家系ごとに異なるなど、部位を絞り込むことは困難であった。

また、薬理学的研究からもたらされたドーパミン仮説²³や前述の NMDA 受容体機能低下仮説、その他様々な仮説から想定された候補遺伝子について、比較的頻度の高い多型の関与を想定した Common Disease - Common Variant 仮説に基づき、関連研究が多数行われた²⁴⁻²⁸。近年では多数の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNPs) を高密度かつゲノムワイドにタイピングするマイクロアレイ技術の進展により、多数例を用いた全ゲノム関連研究 (Genome-wide Association Study : GWAS)²⁹が精力的に行われている。GWAS は統合失調症における双極性障害との共通の遺伝基盤を示唆するなど重大な成果をもたらしたが、検体規模の限界や統合失調症が不均一な集団であること、複数の遺伝要因や環境要因の関与により発症に至る多因子疾患である

ことなどから、再現性のある結果が得られにくく、再現されてもオッズ比は 1.2 程度³⁰と、病態を十分に説明するには困難な状況が続いている。近年ではゲノム知見の増大に基づき、コピー数多型 (Copy Number Variation : CNV) の関与³¹⁻³³や、環境要因が関与する可能性から DNA メチル化などのエピジェネティクスに関連した研究も盛んに行われている^{34,35}。

このような背景から、現在では、稀ではあるが、疾患発症への寄与度の高い変異についても注目がなされている^{36,37}。統合失調症において従来から知られている疾患発症への寄与度の高いものとして、22q11.2 の欠失が挙げられる^{38,39}。この欠失は、統合失調症のリスクを 1% から 20-40% も上昇させるが³⁸、その頻度はごく稀であり、約 1,000 名に 1 名しかこの欠失を有していない。このような疾患発症への寄与度の高い稀な変異を原因とする集団が多数集合し、共通した表現型のもとに統合失調症と診断されている可能性も想定されている。今日、次世代シーケンサーが登場し、その普及とともにこれまで技術的に困難であった稀な変異の探索について、実現化がもたらされ^{36,40,41}、病態解明において大きな前進をもたらすことが期待されている^{36,42}。

近年の網羅的な統合失調症の遺伝学的研究の結果では、4 世代にわたる統合失調症多発家系 5 家系を対象とした全エクソン解析から、NMDA 受容体とカップリングして存在する代謝型グルタミン酸受容体 5 (Metabotropic glutamate receptor 5 ; mGluR5) をコードする *GRM5* において変異が見出された⁴³。また、統合失調症 623 トリ

オサンプルを用いた全エクソン解析からも、*GRIN2A* に加え、*DLG1* や *DLG2* をはじめとする神経活動依存性に発現する、グルタミン酸作動性シナプス後部の細胞骨格関連蛋白と NMDA 受容体との複合体に多数の *de novo* CNVs / SNVs が報告されている⁴⁴。本結果は、統合失調症患者 2,536 名及び健常対照者 2,543 名を対象とした海外の大規模全エクソン解析においても、破壊的影響を有する可能性が想定される稀な変異に注目した解析で、統合失調症との関連が再現された (オッズ 19.2)。さらに、最近、36,989 名の患者と、113,075 名の健常対照者を対象とした大規模な GWAS が達成され、電位依存性 L 型カルシウムチャネルをコードする *CACNA1C* などとともに、*GRIN2A* が疾患感受性遺伝子として改めて報告されている³⁰。このように、最近の大規模な網羅的ゲノム解析からは、本病態における NMDA 受容体機能低下仮説を改めて支持する成果が得られつつある。

以上から、本研究では、NMDA 受容体機能低下仮説に基づき、新規分子遺伝学的基盤の解明を目的とし、NMDA 受容体機能との関係が示唆されているグリシン開裂系 4 遺伝子 (*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD*)、及び、NMDA 受容体スイッチング制御 3 遺伝子 (*CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5*) を候補遺伝子とし、統合失調症病態への関与について検討を行った。

具体的には、グリシン開裂系遺伝子群については、1. 全コーディング領域及びスプライス部位の配列解析、及び、MLPA 法による *GLDC* のエクソン欠失解析を行い、1-1.

グリシン脳症（常染色体劣性遺伝）の中でも精神症状を遅発性に呈し精神疾患と診断される場合のある非典型グリシン脳症が、統合失調症と診断されている患者に含まれている可能性、1-2. グリシン開裂系遺伝子群の稀な変異及び多型の統合失調症病態への関与、を検討し、見出された稀な変異については、2. メタボローム解析による機能解析を行い、代謝産物と臨床評価尺度との関係を検討した。また NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群についても、全コーディング領域及びスプライス部位の配列解析を行い、稀な変異及び多型と疾患との遺伝学的関連を検討した。

第二章

統合失調症病態におけるグリシン開裂系関与の検討

2-1. 背景

2-1-1. グリシン開裂系

グリシン開裂系 (Glycine Cleavage System : GCS) は、NMDA 受容体のコ・アゴニストであるグリシンの主要な代謝系であり、グリシンを二酸化炭素及びアンモニアに分解する⁴⁵ (図 1A)。NMDA 受容体のイオンチャネルの十分な活性化には、グルタミン酸の結合と同時に、NR1 のグリシン結合部位にコ・アゴニストであるグリシンあるいは D-セリンの結合が必要である^{46,47}。グリシン結合部位へのコ・アゴニストの結合は、NMDA 受容体グルタミン酸結合部位へのグルタミン酸の親和性を高め、グルタミン酸結合能の上昇に関与する。また、チャネル開口時間を延長し、開口頻度を増加させるなど、同受容体機能が効率的に発揮されるよう調節を行っている^{48,49}。グリシン開裂系はホモシステインや葉酸の代謝にかかわる一炭素代謝とも関連し、MTHFR (Methylenetetrahydrofolate reductase) の基質であり生体の DNA 合成に必須な 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を供給する (図 1B)⁴⁵。

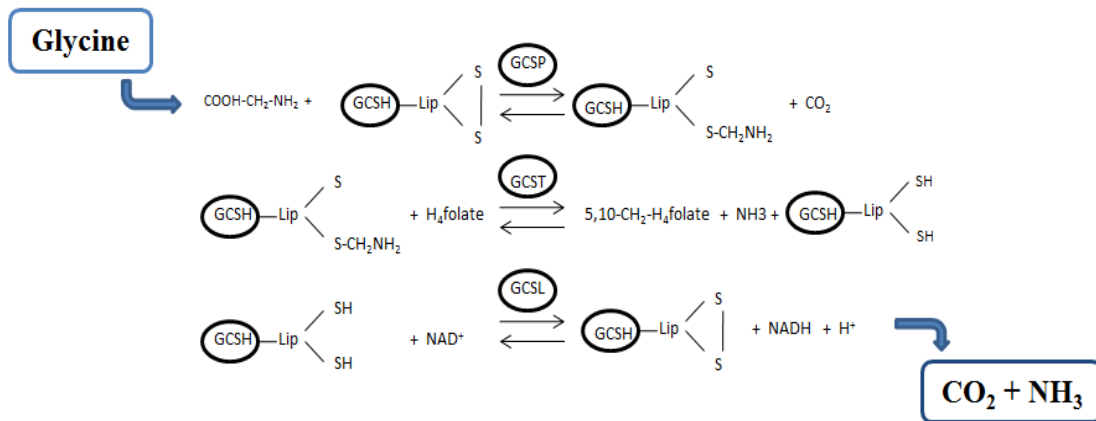


図 1A. グリシン代謝の概要

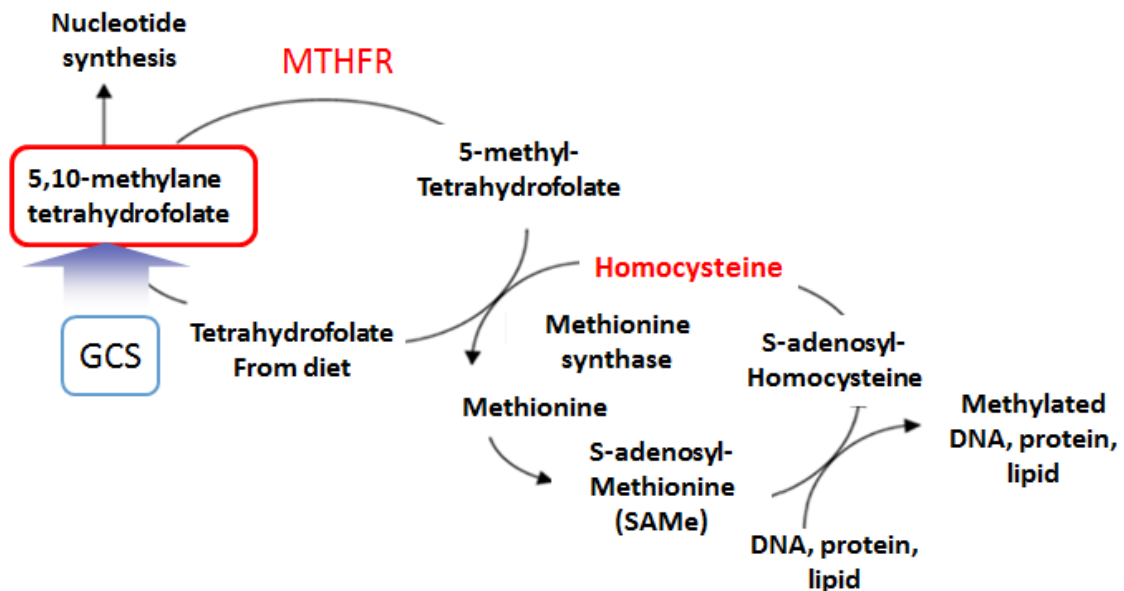


図 1B. グリシン開裂系と一炭素代謝

図 1

- A. グリシン開裂系は、P、T、H、L の 4 つのタンパクより構成され、グリシンを二酸化炭素及びアンモニアに分解する。GCSP : Glycine Cleavage System protein P、GCST : Glycine Cleavage System protein T、GCSH : Glycine Cleavage System protein H、GCSL : Glycine Cleavage System protein L、5-10-CH₂-H₄folate : 5-10-メチレンテトラヒドロ葉酸を示す。
- B. グリシン開裂系はホモシステインや葉酸の代謝を担う一炭素代謝とも関連し、MTHFR の基質 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を供給する。

グリシン開裂系は、*GLDC* (*glycine dehydrogenase*)、*AMT* (*aminomethyltransferase*)、*GCSH* (*glycine cleavage system protein H*)、*DLD* (*dihydrolipoamide dehydrogenase*) よりコードされる P、T、H、L の 4 種のタンパクから構成され、中枢神経系では、アストロサイトのミトコンドリア内膜に存在する^{45,50,51}。

グリシンは、従来、脳幹や脊髄に局在するグリシン受容体に作用し抑制性の神経伝達物質としての役割を担うと考えられてきた⁵²。しかし、グリシン開裂系の中枢における分布はグリシン受容体とは一致せず、グリシン脳症（後述）においてもグリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネの治療効果はみられない⁵⁰。グリシン開裂系は *NMDA* 受容体と共局在し、グリシン脳症の治療では *NMDA* 受容体への作用を有する薬物に効果がみられるなど、グリシン開裂系が *NMDA* 受容体機能を直接制御している可能性が示唆された⁵⁰。またグリシン脳症患者の死後脳では、*D*-セリンの著しい濃度低下が示されており、*D*-セリンを介した *NMDA* 受容体機能への関与も示唆されている⁵³。

2-1-2. グリシン脳症

グリシン開裂系遺伝子の変異による機能喪失は、血清や脳脊髄液の著明なグリシン濃度の上昇を特徴とするグリシン脳症を引き起こす^{45,54}。非常に稀な常染色体劣性遺伝病であり、日本では約 10 万人に 1 人、カナダブリティッシュコロンビア州では約 6 万出生に 1 人、フィンランドでは約 1 万出生に 1 人⁵⁵、と地域により頻度には差異がある。グリシン脳症は新生児期から乳幼児期に発症する典型例と、遅発発症型の非典型

例に大別される。典型例は、生後まもなく哺乳力障害、ミオクローヌス、全般性てんかん、昏睡などを呈し、致命的な呼吸障害などから死に至る^{54,56,57}。一方、非典型例は、新生時期は無症状で経過し、遅発性に精神症状や行動上の問題などを呈し、初めて診断される場合もある（非典型グリシン脳症）⁵⁸。非典型例の発症時期は、成人期⁵⁹のものもあり、最高齢では66歳で診断された症例もあるなど⁶⁰多様である。精神症状としては、多動や攻撃性が目立つ症例もあれば、認知機能障害、精神発達遅滞が徐々に明らかになるなど多岐にわたる^{58,61,62}。中には、34歳頃より、認知症症状を呈した症例や、17歳以降に進行性に認知機能障害や知的能力の低下が認められ、行動異常を呈するようになるなど、統合失調症と類似した経過をたどるものも報告がなされている⁵⁸。Dinopoulos A.らは非典型例50名の検討を行い、このうち3名は全くの無症状であったことを報告し、未診断例も多く存在すると考えられている⁵⁸。

グリシン脳症の原因変異は、*GLDC*のコーディング領域の変異あるいは*GLDC*のエクソン欠失によるものが80%以上を占め⁶³⁻⁷⁶（エクソン欠失は約20%⁷⁶）。次いで*AMT*の変異によるものが15%^{68,70,73,75-80}、*GCSH*によるもの^{74,77,81,84}は1%未満、スプライス部位（±5bp）の変異による症例も報告されている⁷⁸。

2-1-3. グリシン開裂系・グリシン脳症と統合失調症

統合失調症患者の血漿を用いた研究では、これまでグリシン濃度の異常が多数報告されている⁷⁹⁻⁸²。またD-セリンについても患者血清⁸³や脳脊髄液⁸⁴における濃度低下

など多くの研究が行われ、D-セリン^{85,86}及びD-サイクロセリン^{87,88}を用いた治験も行われてきた。グリシン開裂系機能亢進マウス及び低下マウスの行動解析では、行動量、不安、攻撃性、けいれん感受性などの行動異常と共に、ドパミン濃度の変動が示されている⁸⁹。グリシン開裂系の関わる葉酸およびホモシステインの代謝経路である一炭素代謝経路においては⁹⁰、*MTHFR*の677C/T多型と統合失調症の遺伝学的関連が繰り返し示されており⁹¹⁻¹⁰⁰、また、患者血清でのホモシステインの濃度上昇と精神症状との関連¹⁰¹⁻¹⁰³などが報告されている。

以上より、統合失調症患者血漿におけるグリシン濃度異常、グリシン開裂系がNMDA受容体と共局在し、D-セリン動態への関与を含めNMDA受容体機能制御に関わる可能性、グリシン開裂系の統合失調症において異常を認めるホモシステインの代謝経路への関与、グリシン開裂系の機能喪失を病因とするグリシン脳症の非典型例が精神症状を呈し精神疾患として診断される場合もあること、などから、非典型グリシン脳症が統合失調症患者群に含まれている可能性を含め、グリシン開裂系が統合失調症病態に関与している可能性を考えた。

2-2. 目的

本章では、

1. 遺伝学的検討として、

全コーディング領域の配列解析、及び MLPA 法による *GLDC* のエクソン欠失解析により、

1.1. 非典型グリシン脳症が、統合失調症患者群に含まれている可能性

1.2. グリシン開裂系遺伝子群の稀な変異及び多型の統合失調症病態への関与

を検討し、

2. 機能解析として、

変異保持患者血漿を用いたメタボローム解析を行い、代謝産物と臨床指標との関係を検討する。

以上により、グリシン開裂系の統合失調症病態への関与について明らかにすることを目的とした。

2-3. 対象と方法

方法の概要

本章では、統合失調症患者 474 名及び健常対照者 475 名を対象とし、1) 次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス及びサンガー法によりグリシン開裂系遺伝子群の全コーディング領域及びスプライス部位の配列解析、2) 統合失調症患者 474 名の MLPA 法による *GLDC* エクソン欠失解析、を行った。配列解析においては、まず、疾患発症への寄与度の高いものを含む可能性が考えられる稀な変異（非同義置換、微小な欠失/挿入、スプライス部位の変異）に注目した解析を行い、これらは全てサンガー法による確認実験を行った。また、これらの見出された稀な変異について、機能的影響を評価するため、血漿が入手可能であった患者 5 名及び健常対照者 5 名の血漿を用いたメタボローム解析を行い、変動がみられた代謝産物と臨床評価尺度との関連を検討した。さらに、それ以外の変異及び多型については、次世代シーケンサーによる配列解析結果と 1,078 個のサンガー法による確認実験結果との対比により、Receiver Operating Characteristic 曲線（以下、ROC 曲線）から算出したカットオフ値をもとに、再現性が高いと考えられる変異の抽出を行い、疾患との遺伝学的解析を行った。

なお、本研究は「精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索及び解析」（承認番号 639）として東京大学大学院医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて行われた。

2-3-1. 遺伝学的検討

2-3-1-1. 配列解析

1) 対象

東京大学医学部附属病院精神神経科及び関連施設で収集された統合失調症患者 474 名 (男性 234 名、女性 240 名、43.12 歳 \pm 15.14) 及び年齢と性別をマッチさせた健常対照者 475 名 (男性 224 名、女性 251 名、41.54 歳 \pm 12.43) を対象とした。対象は全て日本人である。患者は DSM- IV 及び DSM-IV-TR の診断基準を満たし、少なくとも 2 名以上の精神科医によって統合失調症と診断された。健常対照者は精神科医による M.I.N.I (精神疾患簡易構造化面接法) を用いた構造化面接、あるいは非構造化面接により、現在及び過去の精神疾患の既往が除外されたものを対象とした。

2) 方法

2-1) 検体調整

末梢血白血球から Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega、U.S.A.) を用いて、規定のプロトコールに従ってゲノム DNA を抽出した。TruSeq Custom Amplicon (TSCA : Illumina、U.S.A.) の推奨プロトコールに従い、Drop sense (Trinean、Belgium) を用いて二重鎖 DNA 濃度を測定し、50ng/ μ l に均一化した後、5 μ l をアプライし、総量

250ngのゲノムDNAを用いて、後述する次世代シーケンサーMiseq (Illumina) によるターゲットリシーケンスに用いた。

2-2) 対象領域

対象領域は、グリシン開裂系4遺伝子 (*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD*) の全コーディング領域及びスプライス部位 ($\pm 5\text{bp}$) とした (表 2)。

4 遺伝子の対象領域の総計は 6,790bp であった。

2-3) 塩基配列決定

塩基配列の決定は、1) TSCA を用いた次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス、及び 2) サンガー法による直接塩基配列決定 により行った。低カバレッジ領域及びアンプリコン設計困難領域は全てサンガー法による塩基配列決定を行い、全対象領域を網羅した。

表 2. グリシン開裂系遺伝子群の配列解析における対象領域

Gene	Coding region position	Exon	Splice-5	Splice+5	bp	Total coding regions (bp)
AMT	chr3:49459883-49454777	1	49459789	49459883	94	1309
		2	49459532	49459709	177	
		3	49458920	49459010	90	
		4	49457639	49457780	141	
		5	49457138	49457226	88	
		6	49456688	49456843	155	
		7	49456399	49456589	190	
		8	49455246	49455411	165	
		9	49454975	49455156	181	
		10	49454777	49454805	28	
DLD	chr7:107531696-107559704	1	107531696	107531739	43	1646
		2	107533640	107533728	88	
		3	107542178	107542267	89	
		4	107542765	107542843	78	
		5	107543918	107543997	79	
		6	107545398	107545508	110	
		7	107545801	107545954	153	
		8	107546707	107546818	111	
		9	107555946	107556146	200	
		10	107557234	107557414	180	
		11	107557713	107557912	199	
		12	107558364	107558511	147	
		13	107559450	107559549	99	
		14	107559634	107559704	70	
GCSH	chr16:81129883-81116471	1	81129731	81129883	152	557
		2	81124201	81124290	89	
		3	81121201	81121274	73	
		4	81118063	81118204	141	
		5	81116471	81116573	102	
GLDC	chr9:6645499-6533017	1	6645240	6645499	259	3278
		2	6644609	6644697	88	
		3	6620179	6620324	145	
		4	6610187	6610361	174	
		5	6606587	6606674	87	
		6	6605126	6605283	157	
		7	6604583	6604789	206	
		8	6602104	6602210	106	
		9	6595009	6595124	115	
		10	6592846	6592995	149	
		11	6592138	6592228	90	
		12	6589190	6589297	107	
		13	6588613	6588707	94	
		14	6588396	6588447	51	
		15	6587136	6587288	152	
		16	6565349	6565434	85	
		17	6558554	6558689	135	
		18	6556148	6556307	159	
		19	6554664	6554786	122	
		20	6553363	6553514	151	
		21	6550798	6550919	121	
		22	6540046	6540151	105	
		23	6536059	6536241	182	
		24	6534703	6534793	90	
		25	6533017	6533165	148	
						6790

グリシン開裂系 4 遺伝子の全コーディング領域及びスプライス部位 (± 5bp) を示す。赤字が開始コドンの始まる塩基の位置であり、青字は終始コドンの最終塩基の位置を示す。位置は GRCh37 / hg19 による。

2-3-1) 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス

アンプリコン設計は Design Studio (<http://designstudio.illumina.com/>) を用いて行い、*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD* についてそれぞれ、250bp の 32、17、6、20 アンプリコンを作成した。参照配列は UCSC hg19 とし、対象となる各エクソン領域の上流と下流 20bp を対象範囲とした。実験の行程を以下及び 図 2 に示す。

- 1) アンプリコンを含むカスタムプールをゲノム DNA へハイブリダイズ
- 2) ゲノム DNA へ未結合の余剰アンプリコンを洗浄除去
- 3) Polymerase Chain Reaction (PCR) にて増幅するための標的配列を含む産物として、DNA ポリメラーゼ及び DNA リガーゼにより、ゲノム DNA へハイブリダイズした上流側と下流側のアンプリコンを連結
- 4) 50mM NaOH にて Extension-Ligation 後の産物を一本鎖に変性
- 5) インデックスプライマーをハイブリダイズさせ、検体を標識
- 6) PCR による増幅 (95°C for 3 minutes , 25 cycles of 95°C for 30 sec, 66°C for 30 sec, 72°C for 60sec, 72°C for 5 minutes, hold at 10°C)
- 7) AMPure XP ビーズによる PCR 産物の精製
- 8) 精製量の均一化
- 9) 全検体のライブラリープールの混合、及び、熱変性
- 10) Miseq によるランを開始

2-3-2) 直接塩基配列決定法

対象領域内で Design Studio で設計が困難であった *GCSH* エクソン 4 (Chr16: 81,118,154-81,118,199) 、*DLD* エクソン 10 (Chr7: 107,557,239-107,557,318) 、次世代シーケンサーによる実験結果の確認はサンガー法により行った。それぞれ primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) にてプライマーを作成し (付録 1 参照) 、Ex-Taq (Takara, Japan) または LA-Taq (Takara) を用いて PCR で増幅を行い、ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, U.S.A.) にて純化した後、BigDye Terminator v3.1kit (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) により伸長反応を行い、ABI PRISM 3730 シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) にて塩基配列を解析した。結果は、Sequencher 4.10.1 (Hitachi Solutions, Japan) で判読を行った。なお、PCR 実験条件は付録 2 に記した。

3) 解析

3-1) 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス

Miseq Reporter ver. 2.1 において Smith-Waterman によりアライメントを行い BAM ファイルを出力し、GATK (The Genomes Analysis Toolkit <https://www.broadinstitute.org/gatk/>) により SNVs 及び欠失・挿入のコールを行い、vcf 形式で出力した。また、アンプレコンごとのカバレッジを、BAM ファイルを用いて IGV (Integrative Genomics Viewer) ver2.3 及び Amplicon Viewer ソフトウェア (Illumina) で確認した。

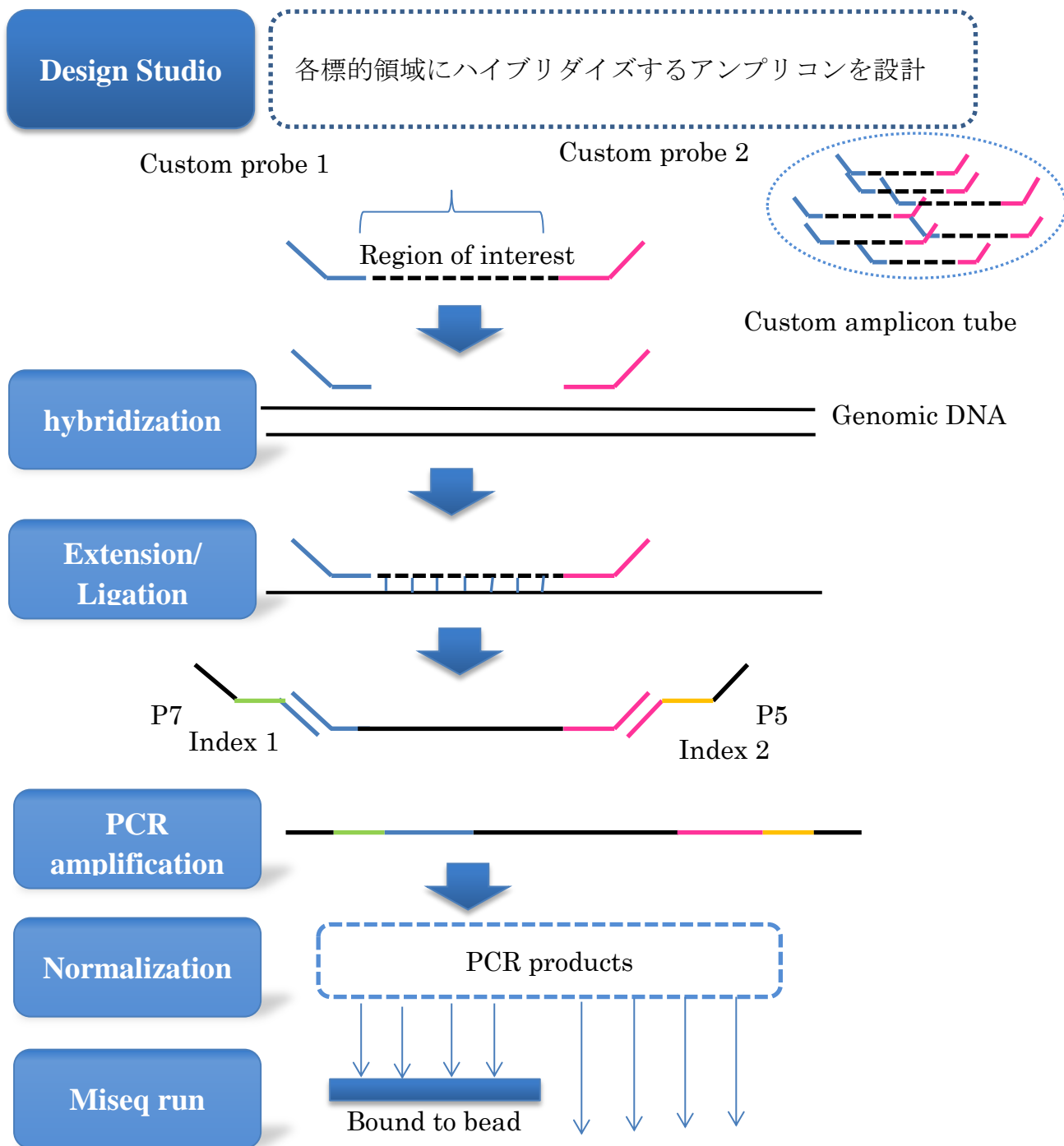


図 2. 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス実験手法の概要

アンプリコンを設計後、DNA とハイブリダイズさせ、伸長・結合の後、PCR にて増幅した。PCR 産物はビーズによる精製、ノーマライゼーションの後、ライブラリーを作成し、Miseq によりターゲットリシーケンスを行った。

3-1-1) 検体の Quality 評価

次世代シーケンサーによる配列解析結果について、出力された全ての新規非同義置換 262 個、既知の非同義置換 56 個、既知の同義置換 760 個 の計 1,078 個をサンガー法で確認し、波形不良により再現性が認められず DNA の Quality 不良と判断された検体を解析対象から除外した。

3-1-2) 稀な非同義置換及びスプライス部位の変異解析

次世代シーケンサーによる配列解析結果のフィルタリングを、非同義置換、フレームシフトを引き起こす微小な欠失あるいは挿入、スプライス部位に存在するもの、について行い、サンガー法において再現されたものの中から健常対照群で Minor Allele Frequency (MAF) が 0.5%未満のものを抽出した。一方、アンプリコンが設計困難であった領域/低カバレッジ領域についてサンガー法で確認された稀な変異を加え、最終リストとした。

3-1-3) 稀な同義置換及び多型解析

稀な同義置換ならびに多型について、まず出力データについて GATK の指標ごとの再現率を算出し、次にサンガー法による実験結果との対比により ROC 曲線を用いて再現性が高いと考えられる Depth のカットオフ値を算出した。次に、Unified Genotyper

Version = 3.3-0 を用いて変異のコールを行い、ROC 曲線から導かれたフィルタリング基準を適用し、疾患との遺伝学的関連について解析を行った。

3-2) 変異の機能予測

変異の機能予測は、SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant ; <http://sift.jcvi.org/>) 、 Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2 ; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 、 LRT (likelihood ratio test ; http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query.html) 、 Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/index.html>) 及び FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models (v2.3) ; <http://fathmm.biocompute.org.uk/>) の 5 つの機能予測プログラムが統合された機能予測ツール dbNFSP (database for nonsynonymous SNP's functional predictions ; <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>)^{104,105}を用いて行った。なお dbNFSP では、それぞれのアルゴリズムにおいて 0 から 1 の間で評価がなされ、1 に近いほど deleterious であるよう改良され、5 点を総合得点として 4 点以上を deleterious と定義した¹⁰⁵。

3-3) 統計解析

統計解析は患者群及び健常対照者群間の年齢の差の検定には Student's t-test を用いた。患者群及び健常対照者群における稀な変異総数の差の検定は Fisher の正確検定 (両側検定、95%信頼区間) で行い、 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意と判断した。

個々の変異・多型と疾患の関連の検定は、 χ^2 検定（両側検定、95%信頼区間）を用い、 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意と判断した。

2-3-1-2. エクソン欠失解析

1) 対象

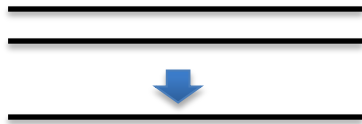
2-3-1-1.における統合失調症患者 474 名を対象とした。

2) 方法

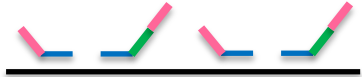
MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法によりグリシン脳症の病因の 20%以上を占める *GLDC* のエクソン欠失について有無を確認した。SALSA MLPA probe mix P209-B1 *GLDC* (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) を用い、末梢血白血球由来ゲノム DNA100ng を使用した。DNA を 98°C で変性し、各エクソンの対象配列に特異的に結合するよう、両端に隣接する 2 種のプローブをハイブリダイズさせ、これらをライゲーションした後、GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を用い PCR により増幅を行った。3,130x1 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) による電気泳動を行い、各 PCR 産物を泳動度の違いとして分離同定した (図 3)。フラグメント解析には、解析用ソフトウェア Peak Scanner Software 1.0 (Thermo Fisher Scientific、<http://peak-scanner-software.software.informer>.)

com/download/) を用いた。なお Q-fragment が 92bp のピークの 1/3 より高いシグナル強度を示す場合は DNA の Quality 不良あるいは DNA 量不足が予測されるため DNA を増量させた再実験を行い、D-fragment で 88bp、96bp のピークが 92bp の 40%を下回る場合は熱変性不良にて再実験を行った。エクソン欠失の有無は、標的部位で、65%以下を認めた場合を欠失、135%以上を認めた場合を重複と判定した。

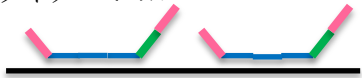
1) 熱変性



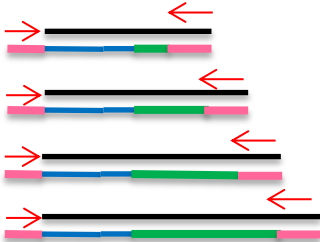
2) ハイブリダイゼーション



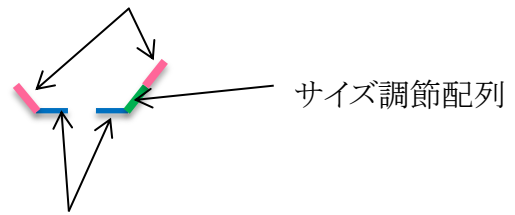
3) ライゲーション



4) PCR



全プローブ共通のプライマー配列



各配列に特異的にハイブリダイズする配列

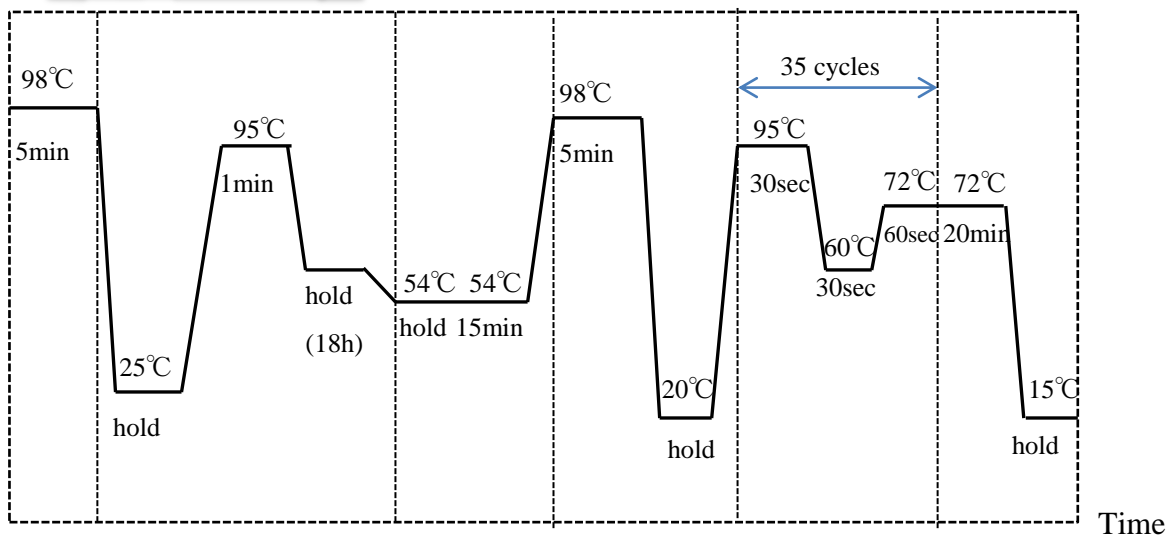


図 3. MLPA 法によるエクソン欠失の判定

2-3-2. メタボローム解析

1) 対象

2-3-1.の配列解析において見出された稀な変異の機能的意義を評価するため、グリシン開裂系遺伝子群に稀な変異を認めた統合失調症患者 15 名の中で、血漿が採取可能であった 5 名及び健常対照者 5 名を対象とし、メタボローム解析を行った。患者群は男性 2 名及び女性 3 名、平均年齢は 50.2 歳 ± 14.33 歳、健常対照者は全て女性で 39 歳 ± 2.28 歳であった。患者 5 名は、それぞれ稀な変異 *GLDC* T119I、A203V、V685M、S801N、*DLD* P39L をヘテロ接合体で保持していた。

2) 方法

2-1) 検体調整

書面及び口頭にて本人の同意を得て末梢静脈から採血を行い、検体採取後 30 分以内に 1200g、10 分間の遠心分離により血漿を取得し、使用するまで -80°C で冷凍保存した。なお、患者群では採血前日の午後 9 時以降飲食を禁止し、朝食及び服薬前の、当日午前 7 時に採血した。健常対照者群では食事摂取時間を揃えることが困難であった。

2-2) CE-TOFMS 法

本研究はヒューマン・メタボローム・テクノロジー社との共同研究により行った。以下、CE-TOFMS 法の概要について述べる。

血漿 100 μ l を、10 μ M スルホン酸メチオニン及び 10 μ M の 10-カンファースルホン酸を含む 0.45 ml のメタノールにアプライした後、よく混合した。その後、200 μ l の脱イオン蒸留水及び 0.5 ml クロロホルムを加え 4 °C、2300g で 5 分間遠心分離し、上層の溶液を 5-kDa cut off filter (Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan) を用いて遠心分離によりタンパクを除去した。濾過し回収された産物は冷凍乾燥し、解析の前に参照化合物を含む超純水 50 μ l に溶存した。超純水は Milli-Q Academic A10 (EMD Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) により生成されたものを用いた。検体を 6210 Time-of-Flight Mass Spectrometer (CE-TOFMS, Agilent Technologies, Santa Clara, C.A., U.S.A.) が設置されたキャピラリー電気泳動にアプライした¹⁰⁶。CE-TOFMS 法より得られたデータの解析はソフトウェア MasterHands¹⁰⁷ により行い、内部スタンダードを用いて標準化を行った相対値について患者群と健常群における比較を行った。

2-3) 症状評価

血漿を採取した時点における精神症状について、主治医による PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale : 陽性・陰性症状評価尺度) を用いた評価を行い、臨床症状の特徴について検討を行った。

2-4) 統計解析

患者群及び健常対照者群間の代謝産物における相対値の差の検定には Student's t-test を用い、同定された候補化合物数を考慮した Bonferroni の補正による多重検定を行い、 $p < 0.05 / 170 = 2.9 \times 10^{-4}$ のとき、統計学的に有意と判断した。

2-4. 結果

2-4-1. 遺伝学的検討

2-4-1-1. 配列解析

1) 検体の Quality 評価

次世代シーケンサーを用いた配列解析により、全 949 サンプルからコールされた全ての新規非同義置換 262 個、既知の非同義置換 56 個、既知の同義置換 760 個の計 1,078 個をサンガー法で確認し、これらの結果をもとに再現性について評価を行った。その結果、いずれの設計したアンプリコンによっても平均 10 回以上のリードが得られなかった患者 8 検体及び健常者 12 検体では、波形不良にて判読が困難であり、検体の DNA の Quality 不良と考えられた。また、これらの検体においてコールされた変異には、再現されたものは認められなかった。以上より、これらを解析対象から除外し、患者 466 名及び健常対照者 463 名を解析対象とした。

2) 稀な非同義置換及びスプライス部位の変異

以下の手順で各遺伝子について稀な非同義置換及びスプライス部位の変異を抽出し、全てをサンガー法により確認した。

GLDC では、統合失調症患者群で 3,775 個 (3,206 一塩基多型: Single Nucleotide Variations; SNVs, 569 挿入/欠失: insertion/deletions; indels) 、健常対照者群で 3,816 個 (3,017 SNVs, 799 indels) がコールされ、非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 215 個、健常者群で 143 個であった。健常対照群で MAF が 0.5% 未満のものについて、サンガー法で再現されたものは、患者群で 14 個 (12 非同義置換、2 スプライス部位) 、健常者群で 13 個 (全て非同義置換) であった。

AMT では、患者群で 724 個 (721 SNVs, 3 indels) 、健常者群で 750 個 (730 SNVs, 20 indels) がコールされ、非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 32 SNVs、健常者群で 33 SNVs であった。稀な変異かつサンガー法で再現されたものは、患者群のナンセンス変異 R253X 1 個、健常者群 7 個 (非同義置換 6 個、スプライス部位 1 個) であった。

GCSH では、患者群で 4,253 個 (3,247 SNVs, 1,006 indels) 、健常者群で 4,306 個 (3,232 SNVs, 1,174 indels) がコールされ、非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 433 SNVs、健常者群で 450 SNVs であった。稀な変異かつサンガー法で再現されたものは、患者群では 1 個 (非同義置換) 、健常者群ではスプライス部位に 2 個であった。

DLD では、患者群で 4,343 個 (3,776 SNVs, 567 indels) 、健常者群で 4,052 個 (3,686 SNVs, 366 indels) がコールされ、非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 13 個、健常者群で 12 個であった。稀な変異かつサンガー法で再現さ

れたものは、患者群で非同義置換 3 個、健常者群で 4 個（非同義置換 3 個、スプライス部位 1 個）であった。

以上のフィルタリングを図 4 に、最終的に見出された稀な変異及び dbNFSP による機能予測結果を表 3 に示す。

複数名で見出された変異としては、*GLDC* G825D が患者 2 名、*GLDC* S801N が患者 2 名、*GLDC* R410K 及び *GLDC* L429F が患者及び健常者で各 1 名ずつ、*AMT* D197H が患者及び健常者で各 2 名ずつ、*DLD* K320N が患者 2 名みられた以外は全て 1 名のみ、ヘテロ接合体で認められ、複数の変異を重複して保持する者は認められなかった。

データベース (dbSNPs : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>、1000 Genomes : <http://www.1000Genomes.org/>、NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute) : <http://www.nhlbi.nih.gov/>、HGVB (Human Genetic Variation Browser) : <http://www.Genomes.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) 上に存在する既知のものは 50 個中 14 個であった。

SZ 474 samples

CT 475 samples

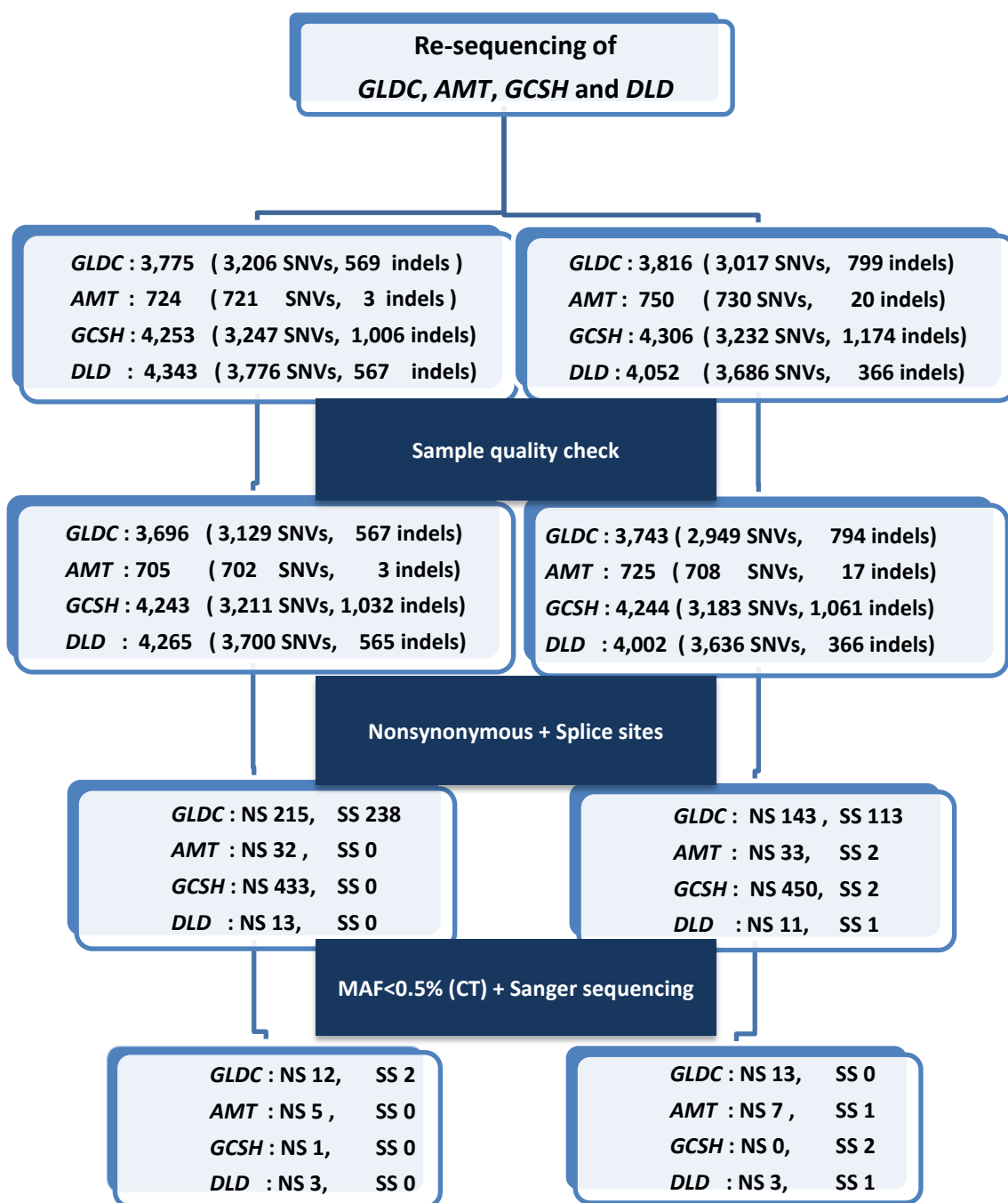


図 4. グリシン開裂系遺伝子群の稀な変異探索におけるフィルタリング
 NS、SS はそれぞれ、Nonsynonymous mutation、Splice sites mutation を表している。
 SZ: Schizophrenia、CT: Controls を示す。

表 3. グリシン開裂系遺伝子群における稀な非同義置換及び

スプライス部位の変異と機能予測結果

Gene	ID	Chromosome	Location	Exon	Reference	Alteration	Nonsynonymous/ Splice site mutations	Total dbNSFP score	Deleterious	Database
GLDC	SZ-01	chr9	6620298	Exon3	G	A	T119I	3.612		
GLDC	SZ-02	chr9	6610219	Exon4	G	A	A203V	4.559	*	
GLDC	SZ-03	chr9	6605162	Exon6	G	A	T277M	4.409	*	
GLDC	SZ-04	chr9	6595046	Exon9	C	T	R410K	3.909		
GLDC	SZ-05	chr9	6592967	Exon10	G	A	L429F	4.520	*	
GLDC	SZ-06	chr9	6592858	Exon10	T	A	D465V	4.476	*	
GLDC	SZ-07	chr9	6589190	Exon12	C	A	splice site	---		
GLDC	SZ-08	chr9	6589241	Exon12	C	G	V512L	2.963		
GLDC	SZ-09	chr9	6565349	Exon16	C	T	splice site	---		
GLDC	SZ-10	chr9	6556302	Exon18	C	T	V685M	2.963		
GLDC	SZ-11	chr9	6553423	Exon20	C	T	S801N	4.573	*	
GLDC	SZ-12	chr9	6553423	Exon20	C	T	S801N	4.573	*	
GLDC	SZ-13	chr9	6550898	Exon21	C	T	G825D	4.592	*	*
GLDC	SZ-14	chr9	6550898	Exon21	C	T	G825D	4.592	*	*
GLDC	CT-01	chr9	6645487	Exon1	C	G	A5P	4.546	*	
GLDC	CT-02	chr9	6610304	Exon4	T	C	S175G	3.574		
GLDC	CT-03	chr9	6595095	Exon9	T	C	M394V	4.488	*	
GLDC	CT-04	chr9	6595053	Exon9	C	T	A408T	4.558	*	*
GLDC	CT-05	chr9	6595046	Exon9	C	T	R410K	3.909		
GLDC	CT-06	chr9	6592967	Exon10	G	A	L429F	4.520	*	
GLDC	CT-07	chr9	6592201	Exon11	G	A	T475I	4.524	*	*
GLDC	CT-08	chr9	6556219	Exon18	G	C	D712E	2.509		
GLDC	CT-09	chr9	6556218	Exon18	C	T	V713M	4.339	*	
GLDC	CT-10	chr9	6554741	Exon19	G	C	S748W	4.573	*	
GLDC	CT-11	chr9	6554685	Exon19	T	C	M767V	2.623		
GLDC	CT-12	chr9	6553456	Exon20	C	T	R790Q	3.475		
GLDC	CT-13	chr9	6533062	Exon25	T	G	E1006D	3.153		
AMT	SZ-21	chr3	49459694	Exon2	C	T	R34H	3.353		*
AMT	SZ-22	chr3	49456800	Exon6	C	G	D197H	3.313		*
AMT	SZ-23	chr3	49456800	Exon6	C	G	D197H	3.313		*
AMT	SZ-24	chr3	49456415	Exon7	C	G	S245T	2.310		*
AMT	SZ-25	chr3	49455395	Exon8	G	A	R253X	4.000	*	
AMT	CT-21	chr3	49456800	Exon6	C	G	D197H	3.313		*
AMT	CT-22	chr3	49456800	Exon6	C	G	D197H	3.313		*
AMT	CT-23	chr3	49456542	Exon7	T	C	I247V	3.377		
AMT	CT-24	chr3	49456422	Exon7	T	C	S287G	2.477		
AMT	CT-25	chr3	49455293	Exon8	G	A	R331W	4.442	*	
AMT	CT-26	chr3	49455128	Exon9	A	C	S353A	4.407	*	
AMT	CT-27	chr3	49455097	Exon9	G	A	G363D	4.450	*	
AMT	CT-28	chr3	49456843	Exon6	G	A	splice site	---		
GCSH	SZ-31	chr16	81124216	Exon2	A	C	N73T	4.180	*	*
GCSH	CT-31	chr16	81116569	Exon5	C	A	splice site	---		
GCSH	CT-32	chr16	81116569	Exon5	C	A	splice site	---		
DLD	SZ-41	chr7	107533721	Exon2	C	T	P39L	3.232		
DLD	SZ-42	chr7	107557323	Exon10	G	T	K320N	3.059		*
DLD	SZ-43	chr7	107557323	Exon10	G	T	K320N	3.059		*
DLD	CT-41	chr7	107533649	Exon2	G	C	G15A	2.847		*
DLD	CT-42	chr7	107533652	Exon2	A	G	H16R	2.776		
DLD	CT-43	chr7	107542766	Exon4	G	T	splice site	---		
DLD	CT-44	chr7	107545471	Exon6	G	A	G136S	3.046		

*位置は GRCh37 / hg19 による。SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。
全変異はいずれも各検体で重複していなかった。

3) 稀な同義置換及び多型解析

3-1) カットオフ値設定

まず、次世代シーケンサーによる配列解析結果について、1,078個のサンガー法による確認実験結果との対比により、GATKの指標ごとの再現率を算出した。変異データの信頼性を評価する指標として、GATKにより、頻度が0.20未満のものはLow variant frequency、Quality scoreが20以上30未満のものはLow GQ、これらに該当せず信頼性の高いものがPASS(微小な欠失挿入に対してはR8)と判定される¹⁰⁸。Quality scoreはコールされた変異が誤りである確率を示し、 $10^{-(Q/10)}$ の計算式により得られる。本結果では、PASSと判定された変異の再現率は84.21%であり、Low GQと判定された変異の再現率は66.67%であった。一方、Low variant frequencyと判定された変異の再現率は、PASS及びLow GQに比し、25.53%と著しく低かった。次に、DepthについてRを用いてROC曲線を作成し、感度及び特異度が最適となるカットオフ値の算出を行ったところ、low variant frequencyを含めた解析においては、カットオフ値Depth = 30が得られたが、曲線下面積(AUC: area under the curve)が0.516と予測値の設定には不適切と考えられた。そこで、上記再現率を考慮し、PASS及びLow GQと判定されたものについて、ROC曲線を作成したところ、感度86.2%、特異度57.9%においてDepth = 21が導かれ(AUC = 0.76、図5)、このカットオフ値を解析の際、適用した。

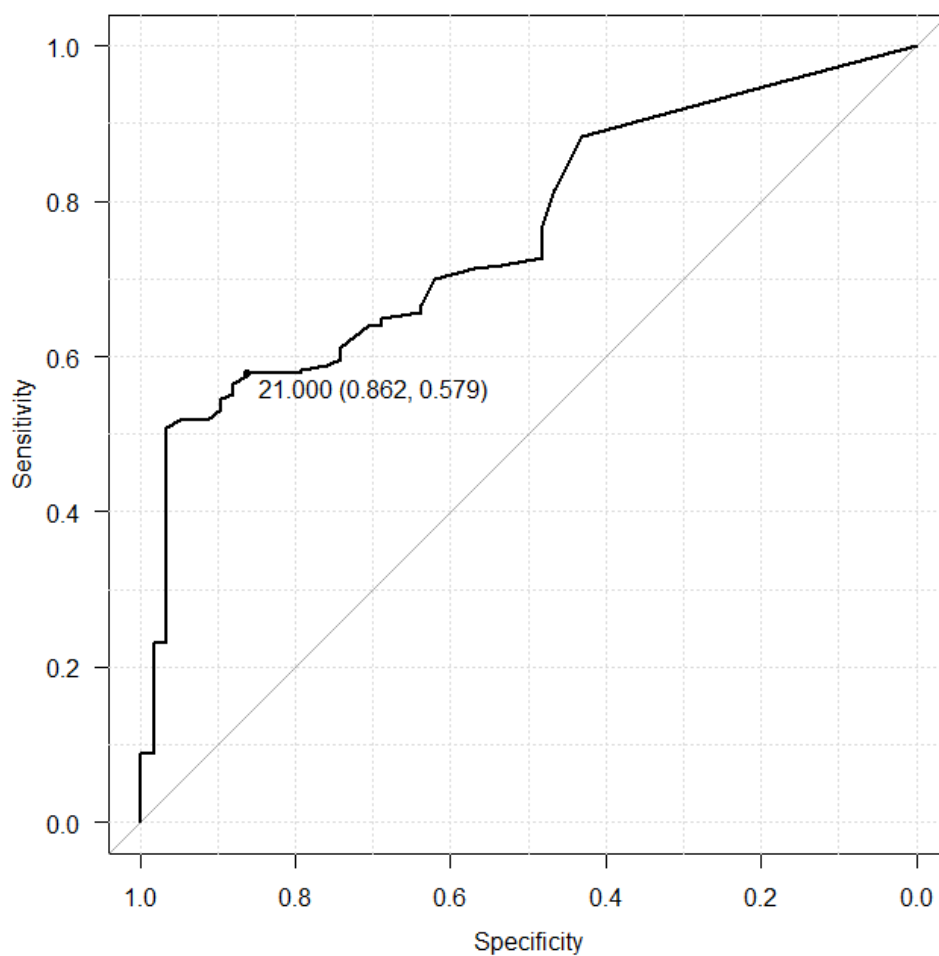


図 5. ROC 曲線による Depth のカットオフ値設定

1,078 個のサンガー法による実験結果との対比により再現性が高いと推定される次世代シーケンサーのカットオフ値を設定した。GATK により PASS 及び Low GQ と判定された変異/多型では、Depth = 21 が算出され、(AUC = 0.76)、感度 86.2%、特異度 57.9%であり、当フィルタリング基準を解析の際、適用した。

3-2) 稀な同義置換及び多型解析

グリシン開裂系遺伝子群において、3-1) で算出された基準 (PASS / low GQ を満たし Depth \geq 21) を用いて、稀な非同義置換以外の全ての変異及び多型について、再現性が高いと考えられるデータを抽出し、疾患との遺伝学的関連を検討した。

GLDC では、1) MAF 0.5%未満の同義置換については、患者群で 5 個、健常者群で 7 個が認められた ($p = 0.578$)。2) MAF 0.5%以上の非同義置換では P223R 及び V976M、同義置換では I312I、E167E、G83G が認められた。

AMT では、1) MAF 0.5%未満の同義置換については、患者群、健常者群で 1 個ずつが認められた ($p = 1.000$)。2) MAF 0.5%以上の非同義置換では、V50L 及び T72A が認められ、同義置換は認められなかった。

GCSH では、1) MAF 0.5%未満の同義置換については、患者群で 2 個が認められた ($p = 0.500$)。2) MAF 0.5%以上の非同義置換では、N73S 及び S21L、同義置換は、P30P、Y84Y、L87L が認められた。

DLD では、1) MAF 0.5%未満の同義置換については、患者群では認められず、健常者群で 1 個が認められた ($p = 0.498$)。2) MAF 0.5%以上の非同義置換及び同義置換は、認められなかった。

稀な同義置換の総数の比較、及び 0.5%以上の個々の多型いずれにおいても疾患との有意な関連は認められなかった (表 4-6)。

表 4. グリシン開裂系遺伝子群において見出された稀な同義置換

Gene	Synonymous	Schizophrenia	Controls	<i>p</i> value
<i>GLDC</i>	P974P	1	0	1
<i>GLDC</i>	K827K	1	0	1
<i>GLDC</i>	G674G	1	0	1
<i>GLDC</i>	H651H	0	2	0.248
<i>GLDC</i>	L562L	0	1	0.498
<i>GLDC</i>	E464E	1	0	1
<i>GLDC</i>	S86S	1	1	1
<i>GLDC</i>	D43D	0	1	0.498
<i>GLDC</i>	L22L	0	1	0.498
<i>GLDC</i>	R21R	0	1	0.498
<i>AMT</i>	A202A	0	1	0.498
<i>AMT</i>	L182L	1	0	1
<i>GCSH</i>	L116L	1	0	1
<i>GCSH</i>	S8S	1	0	1
<i>DLD</i>	N465N	0	1	0.498
Total	(Synonymous)	8/466	9/463	0.812

表 5. グリシン開裂系遺伝子群において見出された多型と疾患との関連

(非同義置換)

<i>GLDC</i>	Disease Status	G/G	G/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
P223R	SZ	443	7	1	451	0.000	allele
exon5	CT	457	6	0	463	0.888	0.407
<i>GLDC</i>	Disease Status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
V976M	SZ	451	16	0	467	0.706	allele
exon25	CT	444	14	0	458	0.740	0.753
<i>AMT</i>	Disease status	C/C	C/A	A/T	total	HWE	<i>p</i> value
V50L	SZ	456	6	0	463	0.888	allele
exon2	CT	453	9	0	462	0.833	0.437
<i>AMT</i>	Disease status	T/T	T/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
T72A	SZ	461	3	0	464	0.944	allele
exon2	CT	455	6	0	461	0.888	0.311
<i>GCSH</i>	Disease status	T/T	T/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
S21L	SZ	27	171	261	459	0.849	allele
exon1	CT	21	160	272	453	0.630	0.264
<i>GCSH</i>	Disease status	T/T	T/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
N73S	SZ	435	20	0	455	0.632	allele
exon2	CT	437	16	0	453	0.702	0.509

*SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。

表 6. グリシン開裂系遺伝子群において見出された多型と疾患との関連

(同義置換)

<i>GLDC</i>	Disease status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
G83G	SZ	290	161	14	465	0.136	allele
exon1	CT	231	120	14	365	0.745	0.981
<i>GLDC</i>	Disease status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
E167E	SZ	398	68	0	466	0.089	allele
exon4	CT	390	69	0	459	0.082	0.856
<i>GLDC</i>	Disease status	G/G	G/A	A/A	total	HWE	<i>p</i> value
I312I	SZ	442	9	0	451	0.831	allele
exon7	CT	453	7	0	460	0.869	0.588
<i>AMT</i>	Disease status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
R274R	SZ	400	61	1	462	0.401	allele
exon7	CT	399	60	3	462	0.652	0.784
<i>GCSH</i>	Disease status	G/G	G/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
P30P	SZ	432	14	1	447	0.021	allele
exon1	CT	446	17	0	463	0.687	0.941
<i>GCSH</i>	Disease status	A/A	A/G	G/G	total	HWE	<i>p</i> value
Y84Y	SZ	427	18	1	446	0.094	allele
exon3	CT	430	15	0	445	0.718	0.397
<i>GCSH</i>	Disease status	G/G	G/C	C/C	total	HWE	<i>p</i> value
L87L	SZ	427	18	1	446	0.094	allele
exon3	CT	430	15	0	445	0.718	0.397

*SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。

2-4-1-2. エクソン欠失解析

統合失調症患者 474 名を対象に、MLPA 法により *GLDC* のエクソン欠失解析を行った。Q-fragment 及び D-fragment の値から 10 検体が除外され、判定可能であった 464 名の患者では、エクソンの欠失は認められなかった。代表的な解析例を図 6 に示す。

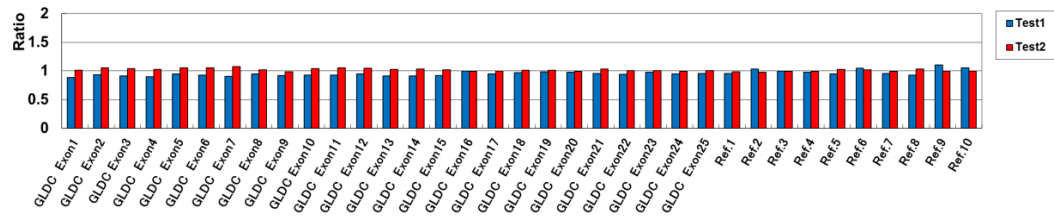


図 6. MLPA 法による *GLDC* エクソン欠失解析結果の代表例

統合失調症患者における MLPA 法による *GLDC* のエクソン欠失解析結果の代表例を示す。対照として 10 個の非ターゲット領域を用いている (Ref1-10)。本症例では 2 回の実験を行い確認した (test1、test2)。

以上の遺伝学的検討の結果をまとめて示す。

1.1. 非典型グリシン脳症が、統合失調症患者群に含まれている可能性

先行研究においてグリシン脳症の病因として報告されている変異 (表 8) の有無について本研究の対象者に存在するかを確認したが、*GLDC*におけるR410Kのヘテロ接合体が患者 1 名、健常者 1 名で認められたのみで、ホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体で変異を有する患者は認めず、また *GLDC* エクソン欠失も認めなかった。以上より、本研究の対象患者においては非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性は否定的であった。

1.2. 稀な変異及び多型の統合失調症病態への関与

稀な変異の中でも特に機能的影響が大きいと考えられる非同義置換、スプライス部位の変異総数は、*GLDC* では患者群で 14 個、健常者群で 13 個、*AMT* では患者群で 5 個、健常者群で 8 個、*GCSH* では患者群で 1 個、健常者群 2 個、*DLD* では患者群で 3 個、健常者群で 4 個であった。*GLDC* では S801N 及び G825D が患者 2 名でみられた以外は全て 1 名のみで認められた。稀な変異が疾患に関わる可能性の検定としては、変異総数について、患者群及び健常対照者群間で比較を行ったが、4 遺伝子とも有意差は認めなかった (*GLDC*: $p = 1.000$ 、*AMT*: $p = 0.419$ 、*GCSH*: $p = 0.624$ 、*DLD*: $p = 0.725$)。また、稀な同義置換についても、変異総数は、*GLDC* では患者群で 5 個、健

常者群で7個、*AMT*では患者群で1個、健常者群で1個、*GCSH*では患者群で2個、健常者群で0個、*DLD*では患者群で0個、健常者群で1個の総計患者群で8個、健常者で9個であり4遺伝子とも変異総数において明らかな有意差は認めなかった ($p = 0.812$)。多型についても、次世代シーケンサーによる配列解析結果をもとに、ROC曲線より導かれたカットオフ値 Depth 21 以上かつ PASS あるいは low GQ を満たし再現性が高いと考えられる変異データについて解析を行ったが、疾患との明らかな関連は認められなかった。

1.3. 見出された変異の特徴

前述のように、非典型グリシン脳症が統合失調症群に含まれている可能性は本研究の対象患者では否定的で、変異及び多型の遺伝学的関連は明らかではなかったが、*GLDC*では患者3名(1名のA203V、2名のS801N)において、非典型グリシン脳症の原因変異¹⁰⁹(A202V、A802V)の隣のアミノ酸置換を伴う変異が認められ、dbNFSPによる機能予測においてもA203V、S801Nは総計4.559点、4.573点と高値であった。また、グリシン脳症ではないが、神経管欠損症においてヘテロ接合体で原因変異である可能性が示唆されているG825D¹¹⁰を患者でのみ2名に認めた。

2-4-2. メタボローム解析

2-4-1.の配列解析により見出されたグリシン開裂系遺伝子群の稀な変異について、変異総数による検討では有意な関連は認められなかったが、A203V、S801N、G825Dなどの変異は疾患群にのみ含まれていたため、機能解析として、変異保持患者で血漿が得られていた5名及び健常対照者5名についてメタボローム解析を行った。170種類の候補代謝産物が同定され、変異保持患者と健常者で各代謝産物の相対値の比較を行ったところ、3代謝産物で有意な上昇が認められた(5-オキソプロリン:変異保持患者 0.0065 ± 0.0013 (平均値 \pm 標準偏差)、健常対照者 0.0014 ± 0.00032 、 $p = 9.4 \times 10^{-5}$ 、アスパラギン酸:変異保持患者 0.0033 ± 0.00044 、健常対照者 0.00095 ± 0.00039 、 $p = 4.3 \times 10^{-5}$ 、L-グルタミン酸:変異保持患者 0.097 ± 0.0050 、健常対照者 0.0120 ± 0.024 、 $p = 1.3 \times 10^{-4}$ 、多重検定補正後有意水準 $p < 0.05 / 170 = 2.9 \times 10^{-4}$ 、図7)。

次に、それぞれの代謝産物の相対値とPANSSによる臨床症状評価との相関について調べたところ、アスパラギン酸において、陰性尺度との間に負の相関が認められた($r = -0.942$ 、 $p = 0.0166$) (図8、表7B)。一方、5-オキソプロリン及びL-グルタミン酸との間には相関は認められなかった(5-オキソプロリン: $r = -0.336$ 、L-グルタミン酸: $r = 0.144$)。アスパラギン酸と陰性尺度の下位項目の検討では、常同的思考以外の全ての項目で高い負の相関値を示した(表7B)。また、総合精神病理尺度においても、16個の下位項目中8項目及び総合得点で、アスパラギン酸との間に高い相関値を認めた($r = -0.798$ 、表7C)。5-オキソプロリンにおいては、陽性尺度の下位項目である概念の

統合障害で相関係数が高値であった ($r = 0.747$)。L-グルタミン酸では、陽性尺度の下位項目である概念の統合障害に負の相関を ($r = -0.726$)、幻覚による行動とは正の相関を ($r = 0.732$)、総合精神病理尺度の下位項目心気症において、正の相関 ($r = 0.852$) を認めた (表 7C)。

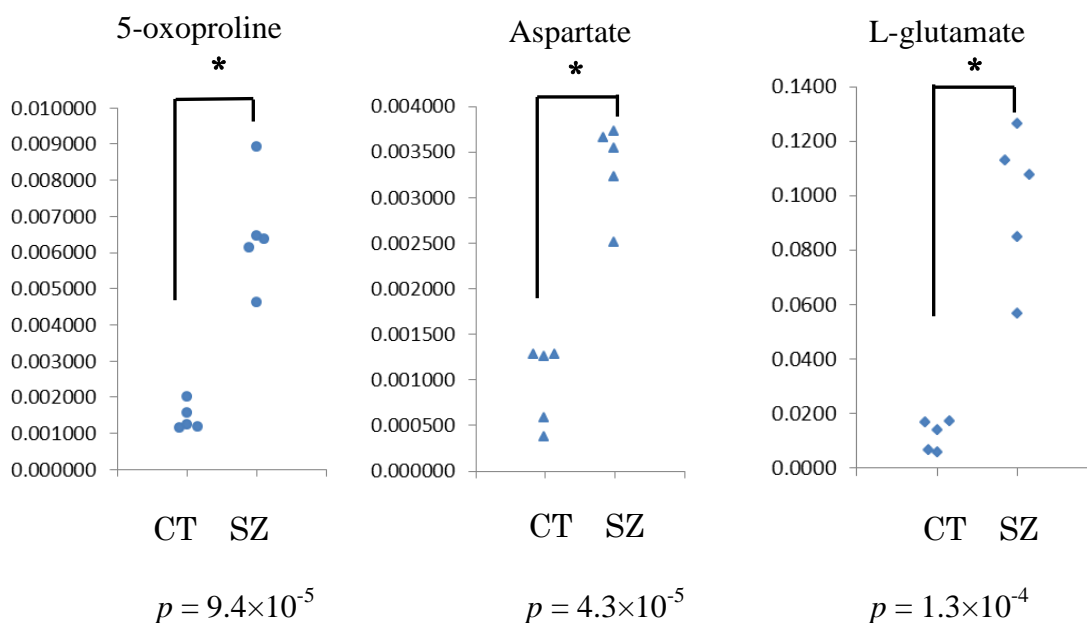


図 7. メタボローム解析を用いたグリシン開裂系遺伝子群における稀な変異の機能解析

グリシン開裂系遺伝子群に稀な変異が見出された統合失調症患者の中で、血漿が採取可能であった 5 検体について、メタボローム解析を行い、健常者 5 名との比較を行った。その結果、見出された 170 の候補代謝産物の中で、患者群において、5-オキソプロリン、アスパラギン酸、L-グルタミン酸の有意な上昇が認められた。

(多重検定補正後有意水準 $p < 0.05 / 170 = 2.9 \times 10^{-4}$)。

SZ: Schizophrenia、CT: Controls を示す。

表 7. グリシン開裂系遺伝子群変異保持患者の臨床症状評価と代謝産物の相関

7A. PANSS 陽性尺度と各代謝産物との相関係数 (r)

代謝産物	PANSS 陽性症状 評価尺度 総合得点	妄想	概念の 統合障害	幻覚による 行動	興奮	誇大性	猜疑心	敵意
5-oxoproline	-0.337	-0.116	0.747	-0.344	-0.391	-0.063	-0.270	-0.613
Aspartate	-0.229	0.234	0.358	0.089	-0.711	0.639	-0.210	-0.668
L-glutamate	0.288	0.351	-0.726	0.732	0.197	0.136	0.185	0.389

7B. PANSS 陰性尺度と各代謝産物との相関係数 (r)

代謝産物	PANSS 陰性症状 評価尺度 総合得点	情動 平板化	情動的 引きこもり	疎通性 の障害	受動性意欲低下 による 社会的引きこもり	抽象的 思考困難	会話自発性と 流暢性欠如	常同的 思考
5-oxoproline	-0.336	-0.043	-0.313	-0.662	-0.302	-0.556	-0.136	0.100
Aspartate	-0.942	-0.787	-0.879	-0.840	-0.938	-0.905	-0.789	0.010
L-glutamate	0.144	-0.055	0.175	0.349	0.124	0.332	-0.132	0.287

7C. PANSS 総合精神病理尺度と各代謝産物との相関係数 (r)

代謝産物	PANSS 総合精神病理 評価尺度 総合得点	心気症	不安	罪悪感	緊張	衝動性と 不自然な姿勢	抑うつ	運動減退
5-oxoproline	-0.136	-0.532	0.329	-'	-0.161	-0.455	0.377	0.024
Aspartate	-0.799	-0.409	-0.306	-'	-0.820	-0.808	-0.600	-0.811
L-glutamate	0.206	0.852	0.107	-'	0.152	0.495	-0.336	0.102

非流暢性	不自然な 思考内容	失見識	注意障害	判断力と 病識欠如	意志の 障害	衝動性調節 障害	没入性	自主的な 社会回避
-0.331	-0.358	-0.468	-0.325	-0.189	-0.092	0.014	-0.037	0.330
-0.813	-0.082	-0.454	-0.777	-0.526	-0.763	-0.752	-0.711	-0.609
0.245	0.672	-0.049	0.252	0.306	0.130	-0.016	0.111	-0.219

* 有意な相関値であるものは赤字で示した。

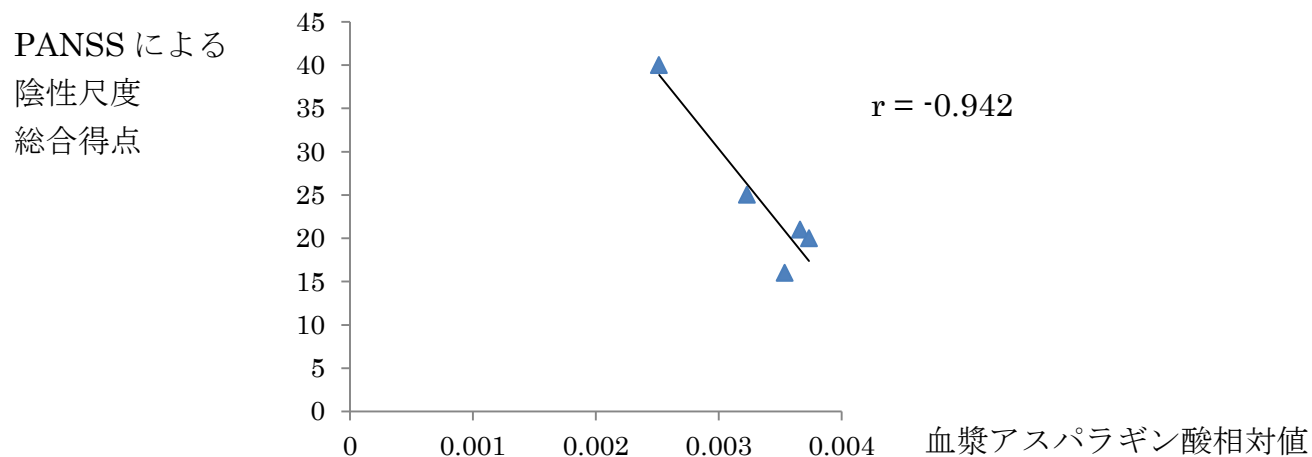


図 8. グリシン開裂系遺伝子群変異保持患者の血漿アスパラギン酸相対値と陰性尺度との相関

それぞれの代謝産物における相対値と PANSS による臨床症状評価との相関について調べたところ、アスパラギン酸において、陰性尺度との間に負の相関を認めた ($r = -0.942$, $p = 0.0166$)。

2-5. 考察

本章では、NMDA 受容体機能への関与が示唆されているグリシン開裂系について、まずは、*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD* の全コーディング領域とスプライス部位の配列解析及び MLPA 法による *GLDC* のエクソン欠失解析を行い、精神症状を遅発性に呈しうる非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている患者に含まれている可能性、及び、稀な変異及び多型の統合失調症病態への関与について検討した。その結果、本研究における対象患者においては、非典型グリシン脳症が、統合失調症患者に含まれている可能性は否定的であり、稀な変異及び多型と、疾患との明らかな遺伝学的関連は示されなかった。しかし、患者において見出された変異について詳細に検討すると、非典型グリシン脳症における原因変異の隣のアミノ酸置換を伴う変異を 3 名で (*GLDC* A203V 1 名、*GLDC* S801N 2 名)、また、グリシン脳症ではないが、神経管欠損症においてヘテロ接合体で原因変異である可能性が示唆されている *GLDC* G825D を 2 名で、*AMT* では R253X のナンセンス変異を 1 名で認めた。さらに、稀な変異の機能解析としてメタボローム解析を行い、変異保持患者における、5-オキソプロリン、アスパラギン酸、L-グルタミン酸、の有意な上昇を見出し、中でも、アスパラギン酸においては陰性尺度との間に負の相関を示した。

2-5-1. 遺伝学的検討

配列解析では、次世代シーケンサーを用いた配列解析及びサンガー法により、全対象領域を網羅した。本研究では、全ての新規非同義置換を含めた 1,078 個についてサンガー法による確認を行っており、見出された変異の正確性は高いものと考えられる。

本研究では、遺伝学的な検討として、非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている患者に含まれている可能性、及び、稀な変異や多型が統合失調症病態に関与している可能性、について検討を行った。

非典型グリシン脳症において精神症状を呈する症例が存在し精神疾患と診断される場合もあること、未診断例が多く存在すること、グリシン開裂系の NMDA 受容体機能への関与から、非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性について検討した。先行研究でグリシン脳症において原因変異として報告がなされている変異のリストを表 8 に示す^{55,58,60-69,71-75,78,109,111-121}。本研究においては、*GLDC* R410K が統合失調症患者及び健常対照者 1 名ずつに認められたが、いずれもヘテロ接合体であり、また MLPA 法で *GLDC* のエクソン欠失はみられなかったことから、可能性は否定的であった。なお *GLDC* R410K はカナダの先住民族で血族婚家系においてホモ接合体で原因変異として同定されているもので、2 名についてはグリシン脳症のキャリアである可能性がある。しかし、正確な頻度は本研究からは不明であるが、疾患頻度及び原因変異の多様性、日本人においてこれまで多くの研究がなされているに

も関わらず、日本人グリシン脳症患者で同変異が原因として同定されていないことを考えると、500名に1名の保有率は高い印象がある。カナダの先住民族は、アジア系であり、R410K がグリシン脳症の原因変異であるかは今後のさらなる検討が必要と考えられた。

統合失調症患者において非典型グリシン脳症患者は含まれていなかったものの、興味深い変異が患者6名において見出された。GLDCで患者に見出されたA203V(1名)及びS801N(2名)は、グリシン脳症の中でも当初想定していた非典型例の原因変異¹⁰⁹(A202V、A802V)の隣に存在し、A203V及びS801Nの機能的意義は明らかではないものの、特にA802Vは舞踏病や筋緊張低下など、グリシン脳症では認められることの多い神経学的異常所見を認めずに、認知機能障害などの精神症状が目立つ非典型グリシン脳症の原因変異として報告されており、興味深い¹⁰⁹。これらの変異のdbNFSPによる機能予測ではA203V、S801Nは総計4.559点、4.573点と高く、機能的影響も大きいことが示唆された。

また、本研究では、GLDC G825D¹¹⁰を患者2名で認めた。G825D¹¹⁰は、GLDCの酵素活性を24%まで低下させること¹¹⁰、本変異が報告された当時の健常者の公共データベースには存在しないこと、グリシン開裂系活性を欠いた *amt* ^{-/-} マウスで神経管欠損症の発症頻度が上昇したこと、グリシン開裂系が葉酸代謝に関与していることなどから、ヘテロ接合体で神経管欠損症の原因変異である可能性が示唆されている。神経管欠損症は、統合失調症と母体のインフルエンザ感染や冬季出生などの疫学的リスクや葉

酸代謝との関連において病態基盤を一部共有する可能性が示唆されており^{122,123}、興味深いと考えられた。しかし、本変異は近年整備された大規模な日本人健常対照者のデータベースである HGVB において、1 名存在しており、病的意義についての解釈は慎重に行う必要があると考えられた。

AMT では、ナンセンス変異 R253X をヘテロ接合体で患者 1 名に認めている。最近、血族婚の自閉症多発家系を対象とした全エクソン解析で、AMT I308F のホモ接合体が自閉症の原因遺伝子の一つとして報告されているが、同一家系内にグリシン脳症と考えられる兄弟が複数存在し、自閉症と診断されていた非典型グリシン脳症であった可能性が考察されている¹²⁴。

本研究では、また、グリシン開裂系遺伝子群における稀な変異及び多型全てについて疾患との関連を検討した。特に疾患への寄与度の高い可能性のある変異として、健常対照者群で MAF が 0.5% 未満の稀な変異に焦点をあてた。また、非同義置換だけでなく、同義置換であっても codon usage に影響を与える可能性が報告されていることから¹²⁵、同義置換を含めた解析を行っている。稀な変異が病態に関与している可能性の検定としては、病態に関与しない変異は健常者群においても患者群においてもある程度均等に存在しているが、患者群において病態に関与する寄与度の高い変異が含まれているのであれば、稀な変異総数として多くなることが想定されたため、総数について健常者群と患者群でそれぞれの遺伝子について比較したが、本比較では明ら

かな関連としては見出されなかった。個々の多型についても疾患との関連は明らかではなかった。

表 8. グリシン脳症における原因変異

gene	type of mutation	db SNP	GCS * residual activity	protein	mutation	coding DNA	Exon No.	type of NKH	other information
GLDC	missense mutation	rs121964978		p.	MIT		Exon 1	NKH	
GLDC	deletion	novel				c.28delC	Exon 1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	R59T	c.176G>C	Exon 1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel	11%	p.	L82W	c.245T>G	Exon 1	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.255+1G>A	Exon 1 3'+1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	S132W		Exon3	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	Y138F		Exon3	NKH	
GLDC	missense mutation	novel	1%	p.	N150T	c.449A>C	Exon 3	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	E153X		Exon 3	NKH	
GLDC	missense mutation	novel	2.6%	p.	Y161C	c.482A>G	Exon 4	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	G171A		Exon 4	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	T187K		Exon 4	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	D198V	c.593A>T	Exon 4	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	A202V	c.605C>T	Exon 4	atypical NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	R212K		Exon 5	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	C225R		Exon 5	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	R236X		Exon 5	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	T269M	c.806C>T	Exon 6	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	E270X		Exon 6	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	A283P		Exon 6	NKH	
GLDC	deletiom	novel				c.793delC	Exon6	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.861+1G>T	Exon 6 3'+1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	R295Y		Exon 7	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	L296R	c.887T>G	Exon 7	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	G306X		Exon 7	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	A313P		Exon 7	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	P329T		Exon 7	NKH	
GLDC	insertion	novel				c.1002_1003insT	Exon 7	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	R337X		Exon 7	NKH	

*リンパ芽球を用いてグリシン開裂系活性を測定した結果の記載のあるものについては、それを記した。

NKH : Nonketotic hyperglycinemia (非ケトン性高グリシン血症;グリシン脳症の別名)

表 8. グリシン脳症における原因変異 (つづき 1)

GLDC	missense mutation	novel		p.	Q620R	c.1859A>G	Exon 16	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.1926+1G>A	Exon 16 3'+1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	C644F		Exon 17	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	H651R		Exon 17	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	Q666X	c.1996C>T	Exon 17	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	A694P	c.2080G>C	Exon 18	NKH	
GLDC	deletion	novel				c.2081_2088del	Exon 18		
GLDC	missense mutation	novel		p.	P700A		Exon 18	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	S701P	c.2105C>T	Exon 18	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	V705M		Exon 18	NKH	
GLDC	insertion+deletion	novel				c.2153_2155deletion/insertionTCCTGGTTTA	Exon 18	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	Y725X	c.2175C>G	Exon 18	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	G728R	c.2182G>C	Exon 18	NKH	
GLDC	deletion	novel				c.2186delC	Exon 18	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	N732K		Exon 18	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.2203-2A>G	Exon 19 5'-1	NKH	
GLDC	insertion	novel				c.2265+1G>C	Exon 19	NKH	
GLDC	deletion	novel				c.2213_2214delGT	Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	rs121964980	6%	p.	R739H	c.2216G>A	Exon 19	NKH	ADHD, MR, cognitive dysfunction, behavioral problems
GLDC	missense mutation	novel		p.	H753P	c.2258A>C	Exon 19	NKH	
GLDC	deletion	novel				c.2266_2268delTCT	Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	H760Q		Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	G762R		Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	rs121964975		p.	P756S		Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	P759S		Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel				c.2293C>T	Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	G766C	c.2296G>T	Exon 19	NKH	consanguineous/indian
GLDC	missense mutation	novel		p.	P769L	c.2306C>T	Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	G771R	c.2311G>A	Exon 19	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	H775R	c.2311G>A	Exon 19	NKH	

* ADHD; Attention deficit hyperactivity disorder, MR; Mental retardation

表 8. グリシン脳症における原因変異 (つづき 2)

GLDC	splice site mutation	novel				c.2316-1G>A	Exon 19 3'-1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel	14%	p.	R790W	c.2368C>T	Exon 20	NKH	
GLDC	missense mutation	rs121964977	32%	p.	A802V	c.2405C>T	Exon 20	atypical NKH	
GLDC	deletion	novel				c.2422delC	Exon 20	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	T830M		Exon 21	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	M840K	c.2519T>A	Exon 21		
GLDC	missense mutation	novel		p.	A841P		Exon 21	NKH	
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	Y858X	c.2574T>G	Exon 22	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.2665+1G>C	Exon 22	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	D880V		Exon 22	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	L885P		Exon 22	NKH	W897Cとcompound heterozygote
GLDC	nonsense mutation	novel		p.	Q886X		Exon 22	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	Y897C		Exon 22	NKH	L885Pとcompound heterozygote
GLDC	missense mutation	novel		p.	V905G	c.2714T>G	Exon 23	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.2838+5G>A	Exon 23 3'+5	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.2839-1G>C	Exon 24 5'-1	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	P949L	c.2846C>T	Exon 24	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	S957P		Exon 24	NKH	
GLDC	insertion	novel				c.2891insA	Exon 24	NKH	
GLDC	missense mutation	novel		p.	R966G		Exon 24	NKH	
GLDC	splice site mutation	novel				c.2919+1G>A	Exon 24 3'+1	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	H14R		Exon 1	NKH	
AMT	deletion	novel				c.54delC	Exon 1	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	G19D		Exon 1		
AMT	deletion	novel				c.60delG	Exon 1	NKH	
AMT	deletion	novel				c.61delC	Exon 1	NKH	c.535delCとcompound heterozygote
AMT	missense mutation	novel				c.125A>G	Exon 1	NKH	
AMT	missense mutation	novel				c.136G>A	Exon 1	NKH	c.230C>Tとcompound heterozygote
AMT	missense mutation	novel				c.139G>T	Exon 1	NKH	

* GLDC G825D が神経管欠損症の原因遺伝子である可能性が報告されている。

表 8. グリシン脳症における原因変異 (つづき 3)

AMT	deletion	novel				c.147delG	Exon 1	NKH	c.970_972delATGと compound heterozygote
AMT	deletion	novel				c.183delC	Exon 1	NKH	
AMT	missense mutation	rs121964983		p.	H42R		Exon 2	NKH	
AMT	missense mutation	rs121964982		p.	G47R		Exon 2	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	G47W		Exon 2	NKH	
AMT	missense mutation	novel				c.212A>C	Exon 2	NKH	c.217C>Tと compound heterozygote
AMT	missense mutation	novel		p.	H71P		Exon 2	NKH	
AMT		novel				c.217C>T	Exon 2	NKH	c.212A>Cと compound heterozygote
AMT	missense mutation	novel		p.	R73C		Exon 2	NKH	
AMT	missense mutation	novel				c.230C>T	Exon 2	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	S77L		Exon 2	NKH	
AMT	splice site mutation	novel				IVS2-1G>C3	Exon 3	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	N117I		Exon 4	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	N145I		Exon 4	NKH	
AMT	deletion	novel				c.452_466del	Exon 4	NKH	
AMT	splice site mutation	novel				c.471+2T>C	Exon 4 3'+2	NKH	
AMT	deletion	novel				c.535delC	Exon 5	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	V184A		Exon 5	NKH	
AMT	nonsense mutation	rs121964986		p.	Q192X		Exon 5	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	Y197C		Exon 5	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	R222C		Exon 6	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	G230R		Exon 6	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	G241D		Exon 7	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	D248H		Exon 7	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	R268H		Exon 7	NKH	
AMT	missense mutation	rs121964981		p.	G269D		Exon 7	NKH	
AMT	missense mutation	rs121964984		p.	D276H	c.955G>C	Exon 7	NKH	
AMT	missense mutation	novel		p.	R296H		Exon 8	NKH	
AMT	missense mutation	rs121964985		p.	R320H		Exon 8	NKH	
AMT	splice site mutation	novel				c.887-1G>A	Exon 8 5'-1	NKH	
AMT	deletion	novel				c.970_972delATG	Exon 8	NKH	
AMT	deletion	novel				c.982_972GC>T	Exon 8	NKH	c.452_466delと compound heterozygote
GCSH	splice site mutation	novel				IVS4-1G>T	Exon 4 5'-1	NKH	

* AMT I308F において自閉症の原因遺伝子の一つである可能性が報告されている。

2-5-2. メタボローム解析

遺伝学的検討による稀な変異総数において、統計学的には疾患への関与は明らかではなかったが、興味深い変異が6名の患者で見出されたことから、変異の機能解析として、血漿の得られた変異保持統合失調症患者5名及び健常対照者5名（変異保持者は得られなかった）についてメタボローム解析を行った。変異保持患者群と健常対照者群で比較を行ったところ、同定された170代謝産物の中で、変異保持患者群においては5-オキソプロリン、アスパラギン酸、L-グルタミン酸が健常対照者群と比較著しく上昇していた。アスパラギン酸及びL-グルタミン酸は、NMDA受容体へのアゴニスト作用を有し、5-オキソプロリンはオキソプロリナーゼによりL-グルタミン酸に代謝されるものであり、これらはNMDA受容体機能に影響している可能性がある。そこで臨床症状に影響を及ぼしている可能性を考え、PANSSによる臨床症状評価尺度の評価得点との相関を検討したところ、アスパラギン酸と陰性尺度との間に強い負の相関を見出した。陰性尺度の下位項目では、常同的思考以外、引きこもりや情動平板化などの全ての項目において負の相関が認められ、アスパラギン酸相対値が高値である程、陰性症状が軽度であることが示された。

アスパラギン酸は、これまで、陰性症状の改善を目的とした従来の定型抗精神病薬から唯一の治療抵抗性統合失調症治療薬であるクロザピンへの薬物療法の切り替えにより患者血漿において上昇し、かつ上昇の程度が陰性尺度の改善と正に相関することが報告されている¹²⁶。クロザピンは数少ない陰性症状の改善効果が示されている薬剤

であるが、アスパラギン酸の上昇によるグルタミン酸系の活動性の亢進が、陰性症状改善に寄与した可能性が考察されており、本研究で、アスパラギン酸において陰性尺度との間に負の相関が認められたことは先行研究と矛盾しない。グリシン開裂系遺伝子群の変異は、アスパラギン酸の上昇を介し、陰性症状に影響している可能性が考えられた。陰性症状は現在の統合失調症治療において、薬物療法が比較的奏功する陽性症状とは異なり改善が得られにくく、社会復帰を妨げる最大の要因となっている。アスパラギン酸は陰性症状改善のための手掛かりとなり、グリシン開裂系が調節に関与している可能性が示唆され、治療的観点からも今後さらなる検証が必要と考えられる。

一方、5-オキソプロリンの上昇については、これまで精神症状との関連を認める報告が多数存在する¹²⁷。Liss D.B.らは45名の高5-オキソプロリン血症を呈した患者のレビューを行い、そのうち約1/3に相当する16名の患者において、双極性障害、うつ病、統合失調症、アルコール依存症、摂食障害、などの精神疾患の既往を認め、急激な精神症状の変調や意識障害、混乱した会話、亜昏迷などを呈したことを報告した¹²⁸。また、先天性高5-オキソプロリン血症の患者群では精神運動発達の遅れ、攻撃性などの精神症状が多数報告されている¹²⁸。今回の結果ではPANSS評価尺度において顕著な相関は見出されなかったものの、文献的考察からは5-オキソプロリンの高値は精神症状と何らかの関連を有する可能性があり、アスパラギン酸とともに症状を修飾している可能性も考えられた。

グルタミン酸では、症状評価尺度との間に相関は見出されていないものの、クロザピンにて加療された患者血漿において濃度上昇の報告がある⁸⁷。また、従来の定型抗精神病薬から新規抗精神病薬オランザピンへの薬物療法への切り替えにより、陰性症状が有意に改善した患者血漿においてグルタミン酸の上昇が見出されている¹²⁹。本研究では、陰性症状との相関は認められず、むしろ陽性症状における幻覚による行動や概念の統合障害で高い相関値を示し、陽性症状への影響の可能性が考えられた。

以上より、グリシン開裂系遺伝子群の遺伝学的解析から、非典型グリシン脳症の存在は否定的であったが、稀な変異の検討において、患者では、非典型グリシン脳症の原因変異の隣のアミノ酸置換を生じる *GLDC* A203V、S801N (2名)、病態基盤を一部統合失調症と共有する神経管欠損症の原因変異の可能性が示唆されている G825D (2名)、*AMT* では R253X のナンセンス変異が認められ、変異総数の検定では患者群と健常者群で統計学的有意差は得られなかったものの、病態への関与が存在する可能性が示唆された。メタボローム解析では、変異保持患者において *NMDA* 受容体機能に関与しうるアスパラギン酸、L-グルタミン酸、5-オキソプロリンの上昇を認め、アスパラギン酸量と陰性症状の強い相関が見出され、グリシン開裂系遺伝子群の変異保持患者においてはアスパラギン酸の上昇が陰性症状の軽減に関与している可能性が考えられた。

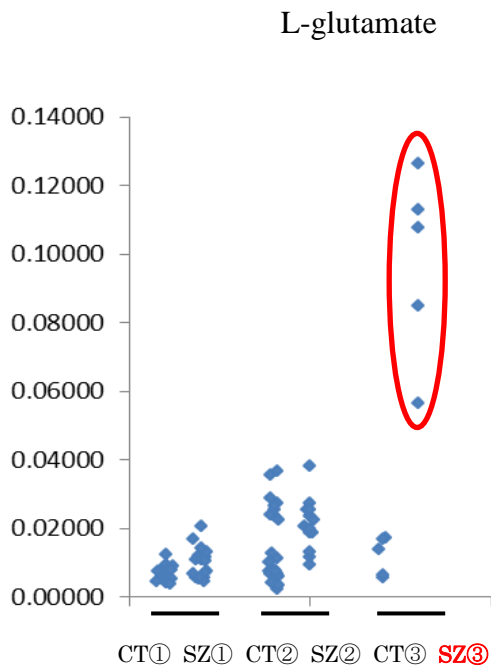
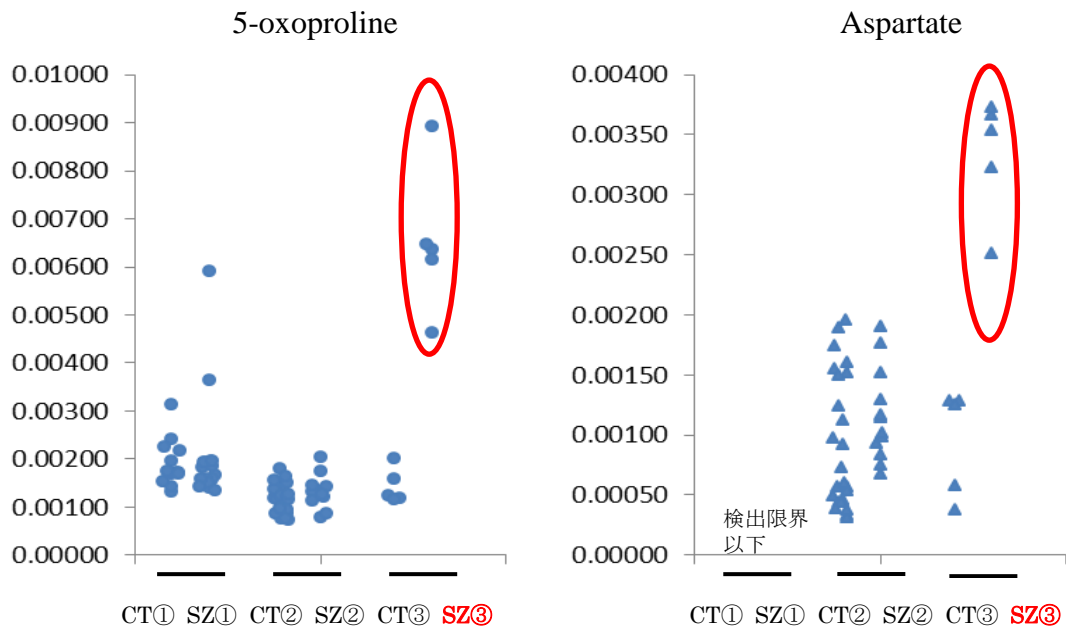
2-5-3. 本研究における限界

本研究における限界について、下記の2点があると考えている。

第1に、遺伝学的解析では、稀な変異の探索における検体規模の問題がある。本研究では、見出された変異/多型全ての遺伝学的解析を行ったが、疾患発症への寄与度の高いものの探索を目的として、特に MAF が 0.5% 未満のものに注目して解析した。しかし、本研究において用いた約 1,000 の検体規模では、統合失調症の有病率を 0.01 と仮定した場合、オッズが 6 程度の影響を有する変異については検出力 0.8 で検出していると算出される¹³⁰ものの、オッズ 3 程度のものまで検出を試みるのであれば、1,500 名対 1,500 名の計 3,000 検体が必要となる。また、本解析においては追加解析として多型についても検討を行ったが、例えば、S21L のような MAF 22.3% の多型において、GWAS で検出されているようなオッズが 1.2 のものを検出力 0.8 で検出するには、2,500 例以上ずつの検体が必要であり、検体規模としては不十分であることから、結果の解釈は慎重に行う必要があると考えられた¹³¹。今後も稀な変異の探索により遺伝要因が明らかになっていくと推測され、統合失調症においても変わらぬ地道な検体収集が必要と考える。また、本研究におけるエクソン欠失解析は *GLDC* のみで検討しており、他のグリシン開裂系遺伝子については、グリシン脳症の原因として報告はなされていないものの、十分な検討を行うことが出来ていない。

第2に、メタボローム解析では、検体数が患者及び健常者 5 例ずつと少なく、かつ、男女間、食事時間など交絡因子を十分には検討出来ていない。また 3 代謝産物の上

昇が非特異的な現象である可能性も考えられたため、かつて小池らにより同手法を用いて行われた2回のメタボローム解析の結果を参照したところ (1stセット:健常者14名、統合失調症患者17名、2ndセット:健常者24名、統合失調症患者12名、合計:健常者38名、統合失調症患者29名)¹³²、これらの上昇は、変異保持患者で顕著であると考えられた(参考図)。また、本研究では、内服薬の影響も考慮に入れる必要があると考えられるが、向精神薬服用患者が多数含まれている小池らの検討(クロザピン服用者は含まれていない)では、3代謝産物の有意な上昇は認められず、影響は否定的と推測されるが、今後、独立した検体を用いて確認する必要がある。



- CT①: 健常対照者群①のメタボローム解析結果 (先行研究 1st セット)
- SZ①: 統合失調症患者群①のメタボローム解析結果 (先行研究 1st セット)
- CT②: 健常対照者群②のメタボローム解析結果 (先行研究 2nd セット)
- SZ②: 統合失調症患者群②のメタボローム解析結果 (先行研究 2nd セット)
- CT③: 健常対照者群③のメタボローム解析結果 (本研究)
- SZ③: 統合失調症患者群③のメタボローム解析結果 (本研究: グリシン開裂系遺伝子群変異保持者)

(参考図) メタボローム解析における先行研究と本結果との比較

これまで、小池らにより統合失調症患者を対象として同様の手法によるメタボローム解析が行われているが、その結果¹³²と本研究との比較を示す。本研究において認められた 5-オキソプロリン、アスパラギン酸、L-グルタミン酸の上昇は、小池らの 1st セット及び 2nd セットの患者群及び健常対照者群では認められていない。

第三章

NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群と統合失調症の遺伝学的検討

3-1. 背景

前述のように統合失調症の NMDA 受容体機能低下仮説は有力な病態仮説であるが、その詳細な分子基盤や、統合失調症が思春期発症を呈するメカニズムは未解明のままである。

そこで、思春期における NMDA 受容体の構造変化として NMDA 受容体機能を年齢依存性に制御する同受容体スイッチングに着目し、本研究を行った。

3-1-1. NMDA 受容体機能の年齢依存性制御機構

NMDA 受容体の構造は、統合失調症の好発する思春期前から思春期にかけて以下の劇的な変化を遂げる (図 9) ^{130,131 133,134}。NMDA 受容体は、主に 2 つの NR1 サブユニット及び 2 つの NR2 サブユニットによる 4 量体で構成され、NR2 サブユニット構造が同受容体の薬理学的特性を規定する。NR2 サブユニットには 2A、2B、2C、2D と多様性があり ¹³⁵⁻¹³⁹、NMDA 受容体は年齢依存性に NR2B を主要な構成サブユニッ

トとする受容体から、NR2A を主要な構成サブユニットとする受容体へとスイッチしていく^{7,14-18} (図 9)。この「スイッチング」により、グルタミン酸への親和性が高く、チャンネルの不活化時間が遅い状態から、グルタミン酸への親和性が低く、チャンネルの不活化時間が速い状態へと、年齢に依存した NMDA 受容体の機能変化がもたらされる¹⁴⁰。スイッチングは、シナプスの形成・維持¹⁴¹、神経回路や介在神経細胞の成熟^{133,142-145}に関与し、臨界期の終了を規定する上で重要な意義を持つとされている^{14,146}。

近年、スイッチングを制御する分子基盤として種々のセリンスレオニンキナーゼによる翻訳後修飾を介したNR2Bの年齢依存的なエンドサイトーシスの存在が明らかにされた^{138,147,148}。NMDA受容体には機能制御において重要な多岐にわたるリン酸化部位が存在するが (表 9)、中でもNR2B Y1472及びS1480における年齢依存性のリン酸化制御がスイッチングに重要であり¹⁴⁹、この制御には、思春期前から思春期にかけ発現がピークに達するCasein kinase 2 (CK2)¹⁴⁹、Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma group B (EphB2)¹⁵⁰、Cyclin-dependent kinase5 (Cdk5)¹⁵¹ の関与が報告された。Clathrinにより調整されるエンドサイトーシスは、NR2B-containing NMDA受容体のシナプス表面における発現を制御する主要なメカニズムの一つである¹³⁸。NR2BサブユニットのC末端にはYEKLというClathrinのアプターであるAP-2に結合する内在化モチーフが存在する。CK2はNR2BのPDZ binding domain内 S1480を直接的にリン酸化する¹⁴⁹。これに伴い、PSD-95などのMAGUKタンパクとNR2Bとの結合が外れ、NR2B C末端の内在化モチーフであるYEKL内Y1472のリン酸化が低下する。これにより、

AP-2とYEKLが結合し、NR2Bの内在化が促され、NR2Bのシナプス表面における発現低下が引き起こされスイッチングが促進される¹⁴⁹。YEKLモチーフ内Y1472はSrcファミリーキナーゼによりリン酸化されるが、このリン酸化によってAP-2との結合が阻害されるとNMDA受容体がシナプス表面に発現する。Cdk5の阻害によりSrcのPSD-95への結合が促され、SrcによるY1472のリン酸化が増加すると、NR2BとAP-2の結合が減少し、NR2B優位のNMDA受容体のエンドサイトーシスが減少することから、Cdk5はNR2Bの内在化を促す方向に作用するとされている。

3-1-2. NMDA 受容体スイッチングと統合失調症

死後脳研究では、統合失調症患者において、海馬、視床下部背内側、側頭皮質における NR2B mRNA 発現増加^{10,152-154}とともに、前頭前野背外側部で NR2A mRNA 発現の低下¹⁵⁵、パルブアルブミン陽性介在神経細胞における NR2A mRNA の発現低下¹⁵⁶などが報告されている。NMDA 受容体のサブユニット NR2A や NR2B をコードする *GRIN2A* や *GRIN2B* などについての関連研究がこれまで精力的に行われてきたが、一貫した結果が得られていなかった¹⁵⁷⁻¹⁶³。統合失調症と酷似した精神症状を示す PCP は NR2B よりも皮質の NR2A-containing NMDA 受容体を遮断することが知られているほか、PCP により惹起されるアポトーシスは NR2A-containing NMDA 受容体に起こりやすいことも報告がなされている¹⁶⁴。さらに、現在、薬物療法において中心的な役割を果たしている非定型抗精神病薬の一つであるアリピプラゾールは、NMDA 受容体に

作用し、NR2A / NR2B 比を上昇されることが報告されている¹⁶⁴。

スイッチングの制御にかかわる CK2 では前頭前野皮質での活性低下¹⁶⁵、抗精神病薬による活性の上昇、CK2 によりリン酸化される Syntaxin 1 の著明な発現低下が示され¹⁶⁶、Cdk5 では背側前頭前野における mRNA 発現の上昇¹⁶⁷が報告されている。大脳皮質特異的な *Cdk5* ノックアウトマウスでは統合失調症に関連した皮質層構造の異常が報告されている¹⁶⁸。最近では、統合失調症患者末梢血単球を用いた網羅的 micro RNA の解析で、健常対照者群との比較において 7 micro RNA の有意な差異が見出され、これらが共通して発現制御を行うトップヒットの遺伝子が *Cdk5* であった¹⁶⁹。この報告では、ドパミン受容体シグナル経路や Notch シグナルに関与する遺伝子が *Cdk5* に引き続き有意となっている¹⁶⁹。

以上から、統合失調症の思春期発症の分子基盤に、NMDA 受容体スイッチングの制御破綻を想定し、CK2、EphB2、Cdk5 が病態へ関与している可能性を考えた。

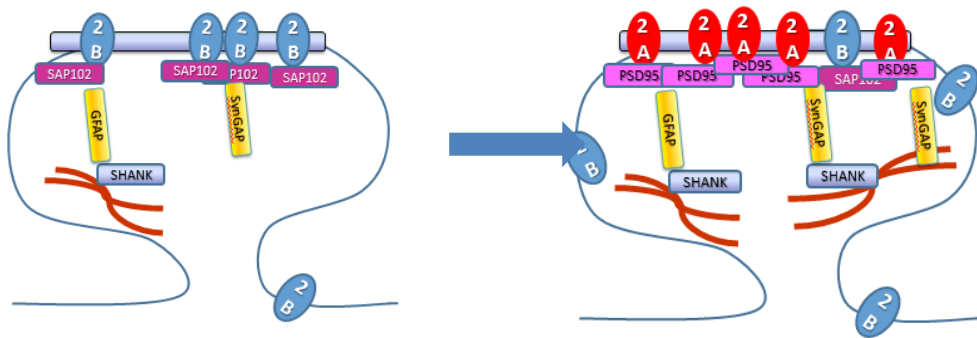


図 9. NMDA 受容体における年齢依存性スイッチング

NMDA 受容体における年齢依存性のスイッチングについて模式図を示す。思春期前から思春期にかけて NMDA 受容体の構造は主に NR2B から構成される NMDA 受容体から主として NR2A から構成される受容体へと変化する。スイッチングは、シナプスの形成・維持¹⁴¹、神経回路や介在神経細胞の成熟^{133,142-145} に関与する。

表 9. NMDA 受容体機能修飾にかかわるリン酸化部位

NMDA受容体サブユニット	リン酸化部位	リン酸化酵素
NR1	S 890	PKC
	S 896	PKC
NR2A	S 8 97	PKA
	Y 842	Src
	S 900	PKA
	S 929	PKA
	Y 1105	Src
	S 1232	Cdk5
	Y 1267	Src
	S 1291	PKC
	Y1292	Src
	S1312	PKC
	Y1325	Src
Y1387	Src	
NR2B	S1416	PKC
	Y1252	Fyn
	Y1336	Fyn
	S1303	PKC / CaMK II
	S1323	PKC
	Y1336	Fyn
	Y1472	Fyn / Cdk5/EphB2
S1480	CK2	

NMDA 受容体機能修飾に重要なリン酸化部位を示す。スイッチング制御に重要な部位は S1480 及び Y1472 とされる。本研究では S1480 及び Y1472 のリン酸化を担うもののうち、リン酸化酵素の活性自体が年齢依存性に制御される分子として CK2、EphB2、Cdk5 を解析候補として選定した。表は文献 135 より改変して記載した。

3-2. 目的

本章では、統合失調症患者 474 名及び健常対照者 475 名を対象とし、NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子 (*CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5*) における全コーディング領域及びスプライス部位の配列解析による稀な変異及び多型の解析を行い、NMDA 受容体スイッチングが統合失調症病態へ関与している可能性について検討する。

3-3. 対象と方法

1) 対象

第二章における統合失調症患者及び健常対照者と同一の対象を用いた。

2) 方法

2-1) 検体調整

第二章で述べた検体調整と同様に行った。

2-2) 対象領域

NMDA 受容体スイッチングを制御する3 遺伝子 (*CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5*) の全コーディング領域及びスプライス部位 ($\pm 5\text{bp}$) を対象領域として設定した (表 10)。

3 遺伝子の対象領域の総計は 5,374bp であった。

2-3) 塩基配列決定

対象領域の塩基配列決定は、第二章と同様、次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス及びサンガー法による直接塩基配列決定により行った。Design Studio を用い 250bp のアンプリコンを設計し、*CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5* についてそれぞれ、11、

29、19 アンプリコンを得た。なお Design Studio で設計が困難であった *CSNK2A1* エクソン 4 (Chr20: 485757-485878) 、*EphB2* エクソン 1 (Chr1: 23037476-23037541) 、*Cdk5* エクソン 1 (Chr7: 150754894-150754935) 、エクソン 4 (Chr7: 150753818-150753888) 、5 (Chr7: 150753662-150753728) については、個別に primer3 にてプライマーを作成し (付録 1 参照) 、第二章と同様、サンガー法にて塩基配列を決定した。

2-4) 稀な変異及び多型解析

第二章において DNA の Quality 不良が確認されている患者 8 検体及び健常対照者 13 検体を除外した。次に、次世代シーケンサーにより出力されたデータについて Unified Genotyper, Version=3.3-0 を用いて変異のコールを行い、GATK の指標で PASS (SNVs) / R8 (indels) 及び Low GQ を満たし、Depth が 21 以上である変異/多型データを解析対象とした。

1) 稀な非同義置換及びスプライス部位の変異

非同義置換、フレームシフトを引き起こす微小な欠失あるいは挿入、スプライス部位に存在するものを選択し、健常者群で MAF が 0.5% 未満のものを抽出し、サンガー法により確認した。

2) 稀な同義置換及び多型

稀な同義置換及び多型（非同義置換及び同義置換）については、第二章と同様に解析を行った。

アンプリコン設計困難領域はサンガー法で確認し、得られた変異及び多型を加え、最終リストとした。変異の機能予測は dbNFSP で行い、患者群及び健常対照者群における稀な変異総数の差の検定は Fisher の正確検定（両側検定、95%信頼区間）を行い、個々の変異・多型と疾患の関連については、 χ^2 検定（両側検定、95%信頼区間）を用いて検定を行い、 $p < 0.05$ のとき、統計学的に有意と判断した。

表 10. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における配列解析の対象領域

Gene	Coding region position	Exon	Splice-5	Splice+5	bp	Total coding regions (bp)			
CSNK2A1	Chr20: 489195-464605 (coding exon start; Exon 3-)	3	489066	489195	129	1298			
		4	485757	485878	121				
		5	480472	480583	111				
		6	479894	479954	60				
		7	478360	478429	69				
		8	476358	476451	93				
		9	472893	473013	120				
		10	470419	470530	111				
		11	469317	469427	110				
		12	468066	468224	158				
		13	467015	467111	96				
		14	464605	464725	120				
		EphB2	Chr1: 23037476-23240063	1	23037476		23037541	65	3098
				2	23107909		23107983	74	
3	23110880			23111574	694				
4	23189525			23189690	165				
5	23191365			23191710	345				
6	23208847			23208981	134				
7	23219372			23219544	172				
8	23221960			23222078	118				
9	23222899			23222976	77				
10	23232475			23232607	132				
11	23233198			23233455	257				
12	23234441			23234666	225				
13	23235510			23235669	159				
14	23236870			23237073	203				
15	23238932			23239097	165				
16	23239950			23240063	113				
Cdk5	Chr7:150751095-150754935	1	150754894	150754935	41	978			
		2	150754154	150754252	98				
		3	150753990	150754067	77				
		4	150753818	150753888	70				
		5	150753662	150753728	66				
		6	150752835	150752940	105				
		7	150752614	150752698	84				
		8	150752359	150752465	106				
		9	150752109	150752188	79				
		10	150751487	150751557	70				
		11	150751294	150751384	90				
		12	150751095	150751187	92				
						5374			

NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群 *CK2*、*EphB2*、*Cdk5* の全コーディング領域及びスプライス部位 (± 5 bp) を示す。

赤字が開始コドンの始まる塩基の位置であり、青字は終始コドンの最終塩基の位置を示す。位置は GRCh37 / hg19 による。

3-4. 結果

3-4-1. 稀な非同義置換及びスプライス部位の変異

CSNK2A1 では、統合失調症患者群で 3,243 個 (1,796 SNVs, 1,447 indels)、健常対照者群で 2,986 個 (1,613 SNVs, 1,373 indels) がコールされ、Quality 不良検体を除外した後、GATK の指標で PASS 及び lowGQ を達成し、かつ Depth21 以上のものは、患者群で 2,549 個 (1,383 SNVs, 1,166 dels)、健常者群で 2,444 個 (1,370 SNVs, 1,074 dels) であった。これらにおいて、非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 1SNV、健常者群で 2SNVs であり、これらは全て非同義置換であった。これらは健常者群においていずれも MAF が 0.5% 未満であり、サンガー法で確認したところ、患者群及び健常者における M339I、及び健常者における R134Q が見出された。

EphB2 では、患者群で 2,304 個 (1,904 SNVs, 400 dels)、健常者群で 1,706 個 (1,433 SNVs, 273 dels) がコールされ、Quality 不良検体を除外した後、GATK の指標で PASS 及び lowGQ を達成し、かつ Depth21 以上のものは、患者群で 1,945 個 (1,659 SNVs, 289 dels)、健常者群で 1,554 個 (1,308 SNVs, 246 dels) であった。Deletion のうち、患者群では、Chr1: 23191367 CAG→C (スプライス部位) が 279 名で認められ、健常者群では 245 名であり、 $p = 0.0344$ であったが、多重検定の補正を行うと統計学的には有意ではなかった。一方、非同義置換は、患者群で 17 個、健常者群で 11 個であ

った。健常対照群で I618N 以外はいずれも MAF が 0.5% 未満であり、全てサンガー法で確認したところ、患者群で 6 個 (5 非同義置換) 及び健常者群では 4 個 (4 非同義置換) であった。

Cdk5 では患者群で 1,192 個 (1,190 SNVs, 2 dels)、健常者群で 1,199 個 (1,157 SNVs, 39 ins, 3 dels) がコールされ、Quality 不良検体を除外した後、GATK の指標で PASS 及び lowGQ を達成し、かつ Depth21 以上のものは、患者群で 971 個 (967 SNVs, 4 dels)、健常者群で 894 個 (851 SNVs, 40 ins, 3 dels) であった。非同義置換及びスプライス部位に存在するものは、患者群で 2 個、健常者群で 1 個であった。健常者群でいずれも MAF が 0.5% 未満であり、サンガー法で確認したところ、患者群で 2 個の非同義置換が確認された。また、Design Studio でアンプリコンの設計が困難であった領域のサンガー法による塩基配列決定にて、患者 2 名においてそれぞれ P273T、スプライス部位における Chr7:150751186 C→A がみられ、最終的には患者でのみ 4 個 (3 非同義置換、1 スプライス部位) の稀な変異を認めた。

以上のフィルタリングを図 10 に、最終的に見出された稀な変異を機能予測結果とともに表 11 に、臨床的特徴を表 12 に示す。

データベース (dbSNPs, 1000 Genomes, NHLBI, HGVB) で既知かどうかを確認したが、*CSNK2A1* の M339I 以外は全て新規であった。また、*EphB2* R569W が患者 2 名と健常者 1 名でみられた以外は全て 1 名ずつで、また複数の変異を保持する者はいなかった。

稀な変異が疾患に関わる可能性の検定として、変異総数について、患者群及び健康者群間で比較を行ったが、3 遺伝子とも患者群及び健康対照者群間で有意差はみられなかったが (*CSNK2A1*: $p = 0.6237$ 、*EphB2* : $p = 1.000$ 、*Cdk5* : $p = 0.1241$)、*Cdk5* においては患者群でのみ変異を検出した。

表 11. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における稀な非同義置換
及びスプライス部位の変異と機能予測結果

Gene	Status	Chromosome	Location	Reference	Alteration	mutation	Total dbNSFP score	Deleterious
<i>CSNK2A1</i>	SZ-51	chr20	467063	C	T	M339I	4.212	*
<i>CSNK2A1</i>	CT-51	chr20	467063	C	T	M339I	4.212	*
<i>CSNK2A1</i>	CT-52	chr20	478390	C	T	R134Q	4.188	*
<i>EphB2</i>	SZ-61	chr1	23110997	G	A	R80H	4.261	*
<i>EphB2</i>	SZ-62	chr1	23111444	A	G	N229S	3.174	
<i>EphB2</i>	SZ-63	chr1	23111560	G	A	V268I	3.139	
<i>EphB2</i>	SZ-64	chr1	23222908	C	T	R569W	3.286	
<i>EphB2</i>	SZ-65	chr1	23222908	C	T	R569W	3.286	
<i>EphB2</i>	SZ-66	chr1	23234507	G	T	G734V	4.417	*
<i>EphB2</i>	CT-61	chr1	23111156	A	G	N133S	2.971	
<i>EphB2</i>	CT-62	chr1	23111326	G	A	V190M	4.280	*
<i>EphB2</i>	CT-63	chr1	23208941	G	A	V465M	3.975	
<i>EphB2</i>	CT-64	chr1	23222908	C	T	R569W	3.286	
<i>Cdk5</i>	SZ-71	chr7	150752165	C	T	R200Q	3.335	
<i>Cdk5</i>	SZ-72	chr7	150751334	G	A	P253S	3.391	
<i>Cdk5</i>	SZ-73	chr7	150751164	C	A	P273T	4.371	*
<i>Cdk5</i>	SZ-74	chr7	150751186	C	A	splice 5'+4	---	

* dbNSFP により deleterious と予測される変異
位置は GRCh37 / hg19 による。 SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。

SZ 474 samples

CT 475 samples

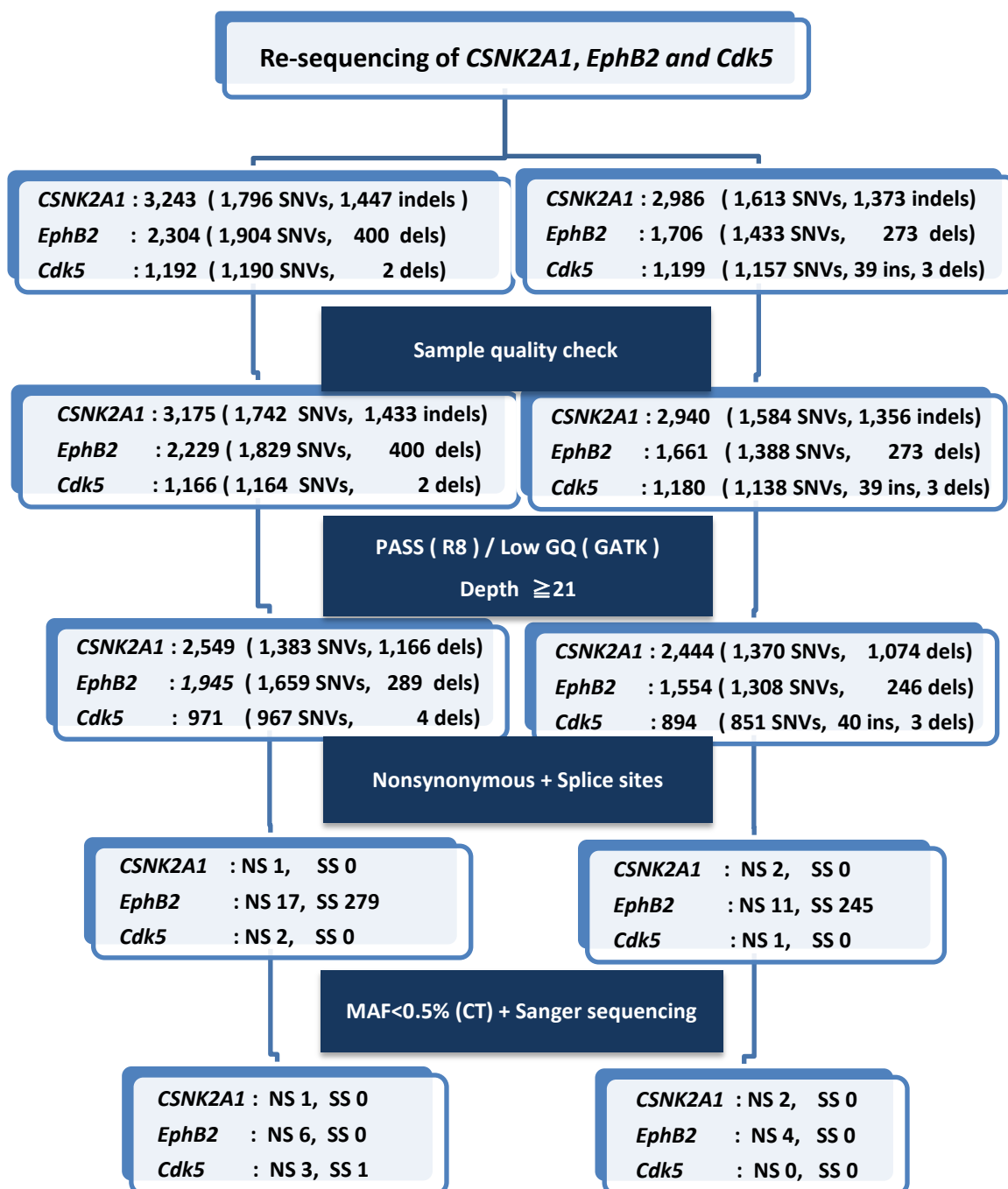


図 10. スイッチング制御遺伝子群の稀な変異探索におけるフィルタリング
 NS、SS はそれぞれ、Nonsynonymous mutation、Splice sites mutation を表している。
 SZ: Schizophrenia、CT: Controls を示す。

表 12. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群の稀な変異保持患者の臨床的特徴

Gene	ID	Chromosome	location	Reference	Alteration	Mutation	Sex	Age	Age at onset	family history
<i>CSNK2A1</i>	SZ-50	chr20	467063	C	T	M339I	M	23	19	祖父母ともに 双極性障害
<i>EphB2</i>	SZ-61	chr1	23110997	G	A	R80H	F	47	32	不明
<i>EphB2</i>	SZ-62	chr1	23111444	A	G	N229S	F	71	22	不明
<i>EphB2</i>	SZ-63	chr1	23111560	G	A	V268I	M	50	25	不明
<i>EphB2</i>	SZ-64	chr1	23222908	C	T	R569W	F	71	67	妹2人が 統合失調症
<i>EphB2</i>	SZ-65	chr1	23222908	C	T	R569W	M	45	43	不明
<i>EphB2</i>	SZ-70	chr1	23234507	G	T	G734V	F	58	21	親戚に 統合失調症
<i>Cdk5</i>	SZ-71	chr7	150752165	C	T	R200Q	F	34	29	不明
<i>Cdk5</i>	SZ-72	chr7	150751334	G	A	P253S	F	52	28	母が精神疾患で、 長期入院中
<i>Cdk5</i>	SZ-73	chr7	150751164	C	A	P273T	F	51	26	弟が双極性障害
<i>Cdk5</i>	SZ-74	chr7	150751186	C	A	splice 5'+4	F	40	25	不明

3-4-2. 稀な同義置換及び多型解析

稀な同義置換及び多型については、第二章で、算出された基準 (PASS / low GQ を満たし Depth \geq 21) を次世代シーケンサーにより出力された結果を用いて、疾患との遺伝学的関連を検討した。結果を表 13、14 に示す。

CSNK2A1 では、1) MAF 0.5%未満の稀な同義置換 及び 2) MAF 0.5%以上の非同義置換 / 同義置換はいずれも認めなかった。

EphB2 では、1) MAF 0.5%未満の稀な同義置換については、患者群で3個が認められ、健常者では1個が認められた ($p = 0.624$)。2) MAF 0.5%以上の非同義置換として、I618N が認められた。また、MAF 0.5%以上の同義置換として P459P、D575D が認められた。

Cdk5 では、1) MAF 0.5%未満の稀な同義置換として L267L を患者1名に認めたが、健常者には認めなかった ($p = 1.000$)。また、2) MAF が0.5%以上のものについては、非同義置換及び同義置換ともに認められなかった。

以上より、1) 稀な同義置換について、患者群及び健常者群における変異総数の比較では明らかな有意差は認められなかった ($p = 0.374$)。また、2) 多型解析においても疾患との明らかな関連は認められなかった。

表 13. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における稀な同義置換

Gene	Synonymous	Schizophrenia	Controls	<i>p</i> value
<i>EphB2</i>	T58T	1	0	1.000
<i>EphB2</i>	P316P	1	0	1.000
<i>EphB2</i>	G717G	1	0	1.000
<i>EphB2</i>	P853P	0	1	0.498
<i>Cdk5</i>	L267L	1	0	1.000
Total	(Synonymous)	4/466	1/463	0.374

*SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。

表 14. NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における多型解析

<i>EphB2</i>	Disease status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
P459P	SZ	174	225	67	466	0.675	allele
exon6	CT	167	218	77	462	0.682	0.443
<i>EphB2</i>	Disease status	C/C	C/T	T/T	total	HWE	<i>p</i> value
D575D	SZ	419	43	1	463	0.925	allele
exon9	CT	417	40	1	458	0.968	0.781
<i>EphB2</i>	Disease status	T/T	T/A	A/A	total	HWE	<i>p</i> value
I618N	SZ	456	9	0	465	0.833	allele
exon10	CT	455	5	0	460	0.907	0.292

*SZ : Schizophrenia, CT : Controls を示す。

3-5. 考察

本章では、統合失調症の思春期発症の分子基盤を明らかにするため、NMDA 受容体機能の年齢依存性制御にかかわる *CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5* の全コーディング領域及びスプライス部位について、統合失調症患者群及び健常対照者群について、まず、疾患発症への寄与度の高い変異が含まれると考えられる稀な変異と疾患との遺伝学的検討を行った。その結果、*Cdk5* においては、統計学的に有意ではないものの、患者群のみで、4 つの稀な新規変異 (R200Q、P253S、P273T、エクソン 12 5'splice +4) を認め、健常対照者群では認めなかった。また、その他の全ての変異及び多型についても疾患との関連についても検討を行ったが、いずれも明らかではなかった。

稀な変異について、本研究では、非同義置換 / 同義置換ともに *Cdk5* において患者群のみで変異が認められたが、前述の海外における約 2,500 例ずつの患者及び健常対照者を用いた大規模全エクソン解析においても、MAF が 0.1% 未満の disruptive な変異が患者のみに認められており³⁶、統合失調症において興味深い候補遺伝子と考えられた。また、本研究で見出された変異の中で、海外の大規模全エクソン解析結果と重複するものとして *EphB2* R80H が存在したが³⁶、本変異は患者 10 名、健常対照者 6 名において認められており、疾患との関連は明らかではないと考えられた。

本研究ではNR2BからNR2Aへのスイッチングという発達依存的現象のみに着目し、その制御因子と統合失調症との遺伝学的関連について検討を行ったが、もう一つのNMDA受容体における発達依存的現象である「NR3Aの年齢依存性発現低下」に関連して、NR3Aをコードする*GRIN3A*の稀な変異が統合失調症患者で近年報告された¹⁷⁰。統合失調症の病態解明において、NMDA受容体機能の発達依存性変化に関わる遺伝子の解析は、今後も重要と考えられる。

NMDA受容体の機能制御に関わる分子機構の解明は、年々目覚ましい発展を遂げ、さまざまな研究成果が見出されているが、認知機能改善や統合失調症治療への応用という観点からは、疾患の分子病態の解明が十分ではなく詳細な分子標的の同定が進んでいなかった。最近*Cdk5*によるNMDA受容体NR2B S1116のリン酸化の阻害が、シナプスにおけるNR2B発現上昇を介し、認知機能の改善をもたらすことがはじめて示され、認知機能障害を呈する疾患への新規標的分子としての期待が高まっている¹⁷¹。稀な変異は、検体規模に依存した探索の限界があるものの、疾患発症に大きく寄与する変異である場合があり、*Cdk5*は今回患者のみで変異が見出され、大規模検体でのさらなる検証の必要性を示唆するものと考えられる。

第四章

結語と今後の展望

本研究では、NMDA 受容体機能低下仮説に基づき、NMDA 受容体機能との関係が示唆されているグリシン開裂系 4 遺伝子 (*GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD*) 及び NMDA 受容体スイッチング制御 3 遺伝子 (*CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5*) を候補遺伝子とし、統合失調症病態への関与について検討を行った。

グリシン開裂系については、全コーディング領域とスプライス部位の配列解析及び MLPA 法による *GLDC* のエクソン欠失解析を行い、精神症状を遅発性に呈しうる非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている患者に含まれている可能性、及び、稀な変異及び多型が統合失調症病態に関与している可能性、を検討した。非典型グリシン脳症が、統合失調症患者に含まれている可能性は否定的であり、稀な変異総数の検定では患者群と健常者群で統計学的有意差は認められなかった。また、その他の変異及び多型についても疾患との明らかな遺伝学的関連は認められなかった。しかし、統合失調症患者において見出された変異の詳細を検討したところ、非典型グリシン脳症における原因変異の隣のアミノ酸置換を伴う変異 (*GLDC* A203V 1 名、*GLDC* S801N 2 名)、*GLDC* の酵素活性を低下させ、かつ統合失調症との疫学的リスクや病態基盤の一部を共有する神経管欠損症における原因変異である可能性を有する変異

(*GLDC* G825D 2名)、ナンセンス変異 (*AMT* R253X 1名)、を認め、病態への関与が存在する可能性が示唆された。メタボローム解析では、変異保持患者において NMDA 受容体機能に関与しうるアスパラギン酸、L-グルタミン酸、5-オキソプロリンの上昇を認め、アスパラギン酸量と陰性症状の強い相関がみられた。グリシン開裂系遺伝子群の変異保持患者においては、アスパラギン酸の上昇を通じて臨床症状に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群における遺伝学的検討では、*Cdk5* において統合失調症患者 4 名で稀な新規変異を検出し、健常対照者では認めず、これは海外における結果と一致した方向性を示しており、さらなる大規模での検証が必要と考えられた。

以上より、いずれの研究からも NMDA 受容体機能と関連する遺伝子群の統合失調症病態への関与が示唆され、今後も NMDA 受容体機能仮説に基づいた検討をさらに進めていくことが、病態解明に資する可能性が考えられた。

今後の展望を以下に示す。

遺伝学的検討については、より大規模な検体数での検証が必要であり、*GLDC*、*AMT*、*Cdk5* については稀な変異のさらなる検討を行いたい。特に統合失調症患者 2 名で認めた *GLDC* S801N については、興味深いと考えている。

また、メタボローム解析結果については、アスパラギン酸が陰性症状へ影響を及ぼす可能性が示唆され、陰性症状が疾患の長期化をもたらす最大の要因であることを考慮すると、今後、独立した大規模検体で追加検証を試みたい。

NMDA 受容体機能低下仮説は病態を解明する上で、やはり有望な仮説であると改めて考える。今後も同仮説を軸に研究をすすめていきたいと考えているが、より機能的な解析を行うにあたって、患者の生体脳における NMDA 受容体の観察が不可能なことが問題として存在する。最近末梢血 T 細胞 (CD4+CD25+制御性 T 細胞) に NMDA 受容体が発現し、さらに中枢性の NMDA 受容体機能を反映している可能性が示された。末梢血 T 細胞において患者の NMDA 受容体機能低下が検出できれば、病態の解明に大きく寄与する可能性、ひいては臨床現場における応用可能な生物学的指標の可能性が考えられ、挑戦したい。

精神疾患の解明に光が当てられ、病態の解明と、根治的治療法の開発に近づいていくために、医療者の責務として、今後も地道な検体収集や詳細な臨床症状の聴取、臨床検体をもとにした生物学的研究を続け、患者や家族の願いを届けたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行において、研究の機会を与えて下さり、貴重なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 精神医学教室 笠井 清登 教授、垣内 千尋 准教授に深謝を申し上げます。

また、研究にご協力いただきました患者様、ご家族の皆様、貴重な検体収集にご協力下さり、詳細な臨床情報を下さいました精神医学教室員各位、及び福井記念病院をはじめとする多くの先生方のご尽力に、深い感謝の意を表します。

東京大学大学院教育学研究科 特任研究員 加藤 佳代子様には実験の補助を行って頂きました。ここに記して感謝の意を表します。

付録 1.

用いたプライマー配列

GLDC-exon1F	397bp	5'- gagaggggccaagagcgcggctgacccttg -3'
GLDC-exon1R	397bp	5'- acgcggagcgcagcagagctcagggtagga -3'
GLDC-exon2F	244bp	5'-atttcaatgaggttcccacaag -3'
GLDC-exon2R	244bp	5'-caggaaccacaaaagacaaat -3'
GLDC-exon3F	210bp	5'-gtaacatttctcttttccc-3' ¹⁷²
GLDC-exon3R	210bp	5'-ttatgcaaatcacagtcac-3' ¹⁷²
GLDC-exon4F	244bp	5'-gcttctctaaacagcagtcag-3' ¹⁷²
GLDC-exon4R	244bp	5'-gaattccagcactttgagagg-3' ¹⁷²
GLDC-exon5F	244bp	5'-gcttagacttaccctcggg-3' ¹⁷²
GLDC-exon5R	244bp	5'-agagaaagaaacagcagagatg-3' ¹⁷²
GLDC-exon6F	290bp	5'-aaaatgaatgctgctgttactgg-3' ¹⁷²
GLDC-exon6R	290bp	5'-tacaagttggatacgcctcc-3' ¹⁷²
GLDC-exon7F	295 bp	5'-attctactctccactactctcag-3' ¹¹¹
GLDC-exon7R	295 bp	5'-acaataaaagtagagaaacatg-3' ¹¹¹
GLDC-exon8F	383bp	5'-tctttataaattgcaccaagtg-3'
GLDC-exon8R	383bp	5'-gacaatgagccttctacaccaa-3'
GLDC-exon9F	290bp	5'-actaattgtcctccatcacg-3'
GLDC-exon9R	290bp	5'-gtattttcctcgtttctcac-3'
GLDC-exon10F	332bp	5'-ctgagagctgttctatatga-3' ¹¹¹
GLDC-exon10R	332bp	5'-agtgtgcataatgtaaataac-3' ¹¹¹
GLDC-exon11F	187bp	5'-gagtttagagttgatgtttcc-3' ¹¹¹
GLDC-exon11R	187bp	5'-tactttgctaccacctcc-3' ¹¹¹
GLDC-exon12F	394bp	5'-ttgatccattttgagtgtttg-3'
GLDC-exon12R	394bp	5'-acaaagtgtgcttttccaagt-3'
GLDC-exon13F	210bp	5'-cagatgtgcatgactcatatc -3'
GLDC-exon13R	210bp	5'-ttaggtaggaccaagagacgt-3'
GLDC-exon14F	186bp	5'-gagaatggagggttgattgatg-3'
GLDC-exon14R	186bp	5'-tagttctgggcttaggtggaag-3'

GLDC-exon15F	372bp	5'-cctggcacatagcttttctcat-3'
GLDC-exon15R	372bp	5'-gtggagtggaactgtctagcaa-3'
GLDC-exon16F	325bp	5'-cttctctcagcgtctggacagt-3'
GLDC-exon16R	325bp	5'-atatgtccctcatctgctcc-3'
GLDC-exon17F	261bp	5'-ctgcatatcatagtctgatga-3'
GLDC-exon17R	261bp	5'-atcaagtcctgatccccacca-3'
GLDC-exon18F	226bp	5'-cctcectccatgtcettctc-3'
GLDC-exon18R	226bp	5'-tcagtgggaactaaggcg-3'
GLDC exon19 F	191bp	5'-ctcttgactttgctttggcc-3'
GLDC exon19 R	191bp	5'-tccaaagccatcctgaaac -3'
GLDC-exon20F	279bp	5'-aacctcccattagattaaac-3'
GLDC-exon20R	279bp	5'-gaaccacatctcagatcatga-3'
GLDC-exon21F	245bp	5'-ctgttcaatggctaaggctct-3'
GLDC-exon21R	245bp	5'-Gaagtctcttgcccattgag-3'
GLDC-exon22F	192bp	5'-aataagctgatgctaattgg-3'
GLDC-exon22R	192bp	5'-aagtggccacagccagcat-3'
GLDC-exon23F	279bp	5'-accttcagtgaggcaagtt-3'
GLDC-exon23R	279bp	5'-gtacactgtccagacatcatt-3'
GLDC-exon24F	323bp	5'- tgtcagaagattgacggtgag-3'
GLDC-exon24R	323bp	5'-caattctttgctcctattcc-3'
GLDC-exon25F	244bp	5'-aacactctcacagattcca-3'
GLDC-exon25R	244bp	5'-ttatcaaatgctctgggga-3'
AMT-exon1F	297bp	5'-agcagaggcctggactacatct-3'
AMT-exon1R	297bp	5'-gtcgaagtcatagagcgggtgc-3'
AMT-exon2F	346bp	5'-gatagagggtgctgatcttga-3'
AMT-exon2R	346bp	5'- gaatccagttcacagcaaaaa-3'
AMT-exon3F	365bp	5'-gccacgtgtagaaccaaaagac-3'
AMT-exon3R	365bp	5'-ctcagggtctgtccaagact-3'
AMT-exon4F	321bp	5'-taactaagtggtccagggtg-3'
AMT-exon4R	321bp	5'-atctccaggtccctgtctgt-3'
AMT-exon5F	236bp	5'-cccatggtagctgctcagtaag-3'
AMT-exon5R	236bp	5'-tcacacctccacacattcttc-3'

AMT-exon6F	325bp	5'-acatgctcagggcttgttct-3'
AMT-exon6R	325bp	5'-gaagctccctgtaccacatacc-3'
AMT-exon7F	365bp	5'-aggtgtgtcaagaagtgggtgtg-3'
AMT-exon7R	365bp	5'-atgggctggctagtcttatcaa-3'
AMT-exon8F	369bp	5'-aggggccttgatgctagatag-3'
AMT-exon8R	369bp	5'-tcacgtacctgtcaagcaagc-3'
AMT-exon9F	414bp	5'-tgaacatggagggtaccaagat-3'
AMT-exon9R	414bp	5'-gaatcagcctccaccttaactg-3'
AMT-exon10F	226bp	5'-cagttaagtgaggctgattc-3'
AMT-exon10R	226bp	5'-atggcagaaccaaagcttctc-3'
GCSH-exon1F	298bp	5'-ctctgccagtcaggctctgt-3'
GCSH-exon1R	298bp	5'-gagagcagagcgggtccagt-3'
GCSH-exon2F	262bp	5'-tgggaaagtctttgaaagcaa-3'
GCSH-exon2R	262bp	5'-ctcacgcagcctaaacactttt-3'
GCSH-exon3F	242bp	5'-gggattcagtgttggcttatt-3'
GCSH-exon3R	242bp	5'-gactctaattaatccagggtacaa-3'
GCSH-exon4F	306bp	5'-tgacaggaatgtacttttcgtatt-3'
GCSH-exon4R	306bp	5'-tcacaatcagctaaacttgcttt-3'
GCSH-exon5F	164bp	5'-taaggtgtctttggttcag-3'
GCSH-exon5R	164bp	5'-ctggcttgcgttatttcatact-3'
DLD-exon1F	120bp	5'-agcggaggtgaaagtattgg-3'
DLD-exon1R	120bp	5'-ctctggctcaacacgacctc-3'
DLD-exon2F	224bp	5'-gtttgccc aaaattgtctgtt-3'
DLD-exon2R	224bp	5'-gaaaggaactgcagctaagtga-3'
DLD-exon3F	230bp	5'-tategggtattgtttgctctt-3'
DLD-exon3R	230bp	5'-aatatgatcaaccctcccaaa-3'
DLD-exon4F	240bp	5'-tagcccgaatagcttgtttgt-3'
DLD-exon4R	240bp	5'-tccatccttctagttggttgc-3'
DLD-exon5F	196bp	5'-tgcttttgattattgaagtctg-3'
DLD-exon5R	196bp	5'-agacagaagagccaagtcaagc-3'
DLD-exon6F	269bp	5'-gttggtgagtgaaaactgc-3'

DLD-exon6R	269bp	5'-tcccccttaaccaagttcaaat-3'
DLD-exon7F	354bp	5'-agagtaatttttcctttgaatgattt-3'
DLD-exon7R	354bp	5'-caaagctgaatgaccatcaaaa-3'
DLD-exon8F	282bp	5'-tggagggtcgactgtactaggt-3'
DLD-exon8R	282bp	5'-ttaaagcaaaactcaatgctga-3'
DLD-exon9F	371bp	5'-tcggagcttctcataggaacat-3'
DLD-exon9R	371bp	5'-ttgcttaaagagacagggatga-3'
DLD-exon10F	361bp	5'-acttgagaaattgctggcctta-3'
DLD-exon10R	361bp	5'-ccccaaagccaatacatatttta -3'
DLD-exon11F	323bp	5'-aactgaaggtaagtagctgtgatttc-3'
DLD-exon11R	323bp	5'-ctgtttctcaaccaccaatgtc-3'
DLD-exon12F	307bp	5'tggaaagaacttttctggcagt-3'
DLD-exon12R	307bp	5'ttcaaagttttgctggaaatga-3'
Cdk5-exon1F	250bp	5'-tttaggactacaagccccagaa -3'
Cdk5-exon1R	250bp	5'- tggaggctcacacagttagga-3'
Cdk5-exon2F	254bp	5'-atttcctggcttagggaagagt -3'
Cdk5-exon2R	254bp	5'-ggcacaccctgcatatgtga -3'
Cdk5-exon6F	299bp	5'-gaagcacaagggtgaggagag -3'
Cdk5-exon6R	299bp	5'-ccttataaaagccttgggacag -3'
Cdk5-exon7F	262bp	5'- gagcacagagggaagaggact-3'
Cdk5-exon7R	262 bp	5'-ggctcagagaggagaggaaaat -3'
Cdk5-exon8F	271bp	5'-cccaggacccaaaacattatt -3'
Cdk5-exon8R	250bp	5'-gaccctcagaccctatttgtc -3'
Cdk5-exon10F	290bp	5'-gtaaaggagggtgagaagtgg -3'
Cdk5-exon10R	290bp	5'-cagggagggtcagactagaggt -3'
Cdk5-exon11F	256 bp	5'-atcagggtcactcgttcacat -3'
Cdk5-exon11R	256bp	5'-gcaggttcaggacaggtcac -3'
Cdk5-exon12F	353bp	5'-aggtaggtgaccagggtagag -3'
Cdk5-exon12R	353bp	5'-gagtgagaaattcgggctcag -3'
CSNK2A1-exon4F	342bp	5'-aaaacctatttgggaattgtttga -3'
CSNK2A1-exon4R	342bp	5'-gctttggcaccaaaaacctt -3'

CSNK2A1-exon6F 248bp	5'-caacggtaaatgagccaagtct -3'
CSNK2A1-exon6R 248bp	5'-atctgctggcttttctaccatc -3'
CSNK2A1-exon7F 259bp	5'-tcaggcttccagaccattagtt -3'
CSNK2A1-exon7R 259bp	5'-caccagtacggagaagagaagg -3'
CSNK2A1-exon8F 299bp	5'-tgactgtgtcctcagcttgaat -3'
CSNK2A1-exon8R 299bp	5'-cctgtgacaacacaaggataa -3'
EphB2-exon1F 427bp	5'-tggatggctcattctgct -3'
EphB2-exon1R 427bp	5'-cctggcacagtcaatcagc -3'
EphB2-exon2F 253bp	5'-aagaaggatgagggccaac -3'
EphB2-exon2R 253bp	5'-gtcctgaagaggggaaagg -3'
EphB2-exon3F 269bp	5'-tcaccattagactggagggttc -3'
EphB2-exon3R 269bp	5'-caccgaaaactcactccac -3'
EphB2-exon4F 297bp	5'-gctcgtgacctctctgagtctt -3'
EphB2-exon4R 297bp	5'-ccaatcctcactctgagctttt -3'
EphB2-exon5F 484bp	5'-gagtggtcacatggggaaatgt -3'
EphB2-exon5R 484bp	5'-aggagtcttttgtgaggactc -3'
EphB2-exon6F 342bp	5'-cttcctctctgatcccacagt -3'
EphB2-exon6R 342bp	5'-caccagtgcgtctcatcttg -3'
EphB2-exon9F 242bp	5'-ccaccctctccctatcacctac -3'
EphB2-exon9R 242bp	5'-atggcagaaggaggtcaaagat -3'
EphB2-exon12F 385bp	5'-cattatgaggatgatgcagagc -3'
EphB2-exon12R 385bp	5'-aattggcggttagtgaaagtgt -3'
EphB2-exon14F 384bp	5'-caatgtactggggtaagatgg -3'
EphB2-exon14R 384bp	5'-gctgcagtaaggaagacattt -3'
EphB2-exon15F 369bp	5'-tcacataaatggatgcacacg -3'
EphB2-exon15R 369bp	5'-atgatctattcctcaccctcca -3'
EphB2-exon16F 297bp	5'-cttgctttgccatcttctc -3'
EphB2-exon16R 297bp	5'-cagtggatagagcaccaggag-3'

遺伝子	Exon	PCR サーマルサイクラー温度設定	用いたPCR酵素
<i>Cdk5</i>	exon 1	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 2	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 4	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 5	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 6	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 7	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 8	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 10	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 11	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>Cdk5</i>	exon 12	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>CSNK2A1</i>	exon 4	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>CSNK2A1</i>	exon 6	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>CSNK2A1</i>	exon 7	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>CSNK2A1</i>	exon 8	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 1	(98°C 10seconds, 60°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	LA-Taq
<i>EphB2</i>	exon 2	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 3	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 4	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 5	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 6	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 9	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 12	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 14	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 15	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq
<i>EphB2</i>	exon 16	(98°C 10seconds, 55°C 30 seconds, 72°C 30seconds) × 40 cycles	Ex-Taq

参考文献

1. Crow, T.J. Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *British medical journal* **280**, 66 (1980).
2. Bleuler, E. Dementia praecox or the group of schizophrenias. (1950).
3. Kodesh, A., Goldshtein, I., Gelkopf, M., Goren, I., Chodick, G. & Shalev, V. Epidemiology and comorbidity of severe mental illnesses in the community: findings from a computerized mental health registry in a large Israeli health organization. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology* **47**, 1775-1782 (2012).
4. Andreasen, N.C., Carpenter, W.T., Kane, J.M., Lasser, R.A., Marder, S.R. & Weinberger, D.R. Remission in schizophrenia: proposed criteria and rationale for consensus. *American Journal of Psychiatry* **162**, 441-449 (2005).
5. Allebeck, P. Schizophrenia: a life-shortening disease. *Schizophrenia bulletin* **15**, 81 (1989).
6. Kim, J., Kornhuber, H., Schmid-Burgk, W. & Holzmüller, B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience letters* **20**, 379-382 (1980).
7. Deakin, J., Slater, P., Simpson, M., Gilchrist, A., Skan, W., Royston, M., Reynolds, G. & Cross, A. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journal of neurochemistry* **52**, 1781-1786 (1989).
8. Meador-Woodruff, J.H. & Healy, D.J. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Research Reviews* **31**, 288-294 (2000).
9. Tsai, G., Passani, L.A., Slusher, B.S., Carter, R., Baer, L., Kleinman, J.E. & Coyle, J.T. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Archives of general psychiatry* **52**, 829-836 (1995).
10. Gao, X.-M., Sakai, K., Roberts, R.C., Conley, R.R., Dean, B. & Tamminga, C.A. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **157**, 1141-1149 (2000).
11. Weickert, C., Fung, S., Catts, V., Schofield, P., Allen, K., Moore, L., Newell, K.A., Pellen, D., Huang, X.-F. & Catts, S. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Molecular psychiatry* **18**, 1185-1192 (2012).

12. Lahti, A.C., Holcomb, H.H., Medoff, D.R. & Tamminga, C.A. Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport* **6**, 869-872 (1995).
13. Benes, F.M. Altered glutamatergic and GABAergic mechanisms in the cingulate cortex of the schizophrenic brain. *Archives of general psychiatry* **52**, 1015-1018 (1995).
14. Belforte, J.E., Zsiros, V., Sklar, E.R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., Quinlan, E.M. & Nakazawa, K. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature neuroscience* **13**, 76-83 (2010).
15. Uramura, K., Maejima, Y., Shimomura, K., Santoso, P., Katsuda, S.-i., Kobayashi, D., Jodo, E., Kodaira, M., Otgon-Uul, Z. & Yang, Y. Chronic phencyclidine treatment induces long-lasting glutamatergic activation of VTA dopamine neurons. *Neuroscience letters* **564**, 72-77 (2014).
16. Jentsch, J.D. & Roth, R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **20**, 201-225 (1999).
17. Hashimoto, T., Arion, D., Unger, T., Maldonado-Aviles, J., Morris, H., Volk, D., Mirnics, K. & Lewis, D. Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Molecular psychiatry* **13**, 147-161 (2007).
18. Gottesman, I.I. *Schizophrenia genesis: The origins of madness*, (WH Freeman/Times Books/Henry Holt & Co, 1991).
19. Rosenthal, D., Wender, P.H., Kety, S.S., Welner, J. & Schulsinger, F. The adopted-away offspring of schizophrenics. *American Journal of Psychiatry* **128**, 307-311 (1971).
20. Rosenthal, D., Wender, P.H., Kety, S.S., Schulsinger, F., Welner, J. & Østergaard, L. Schizophrenics' offspring reared in adoptive homes. *Journal of psychiatric research* **6**, 377-391 (1968).
21. Wender, P.H., Rosenthal, D., Kety, S.S., Schulsinger, F. & Welner, J. Crossfostering: A research strategy for clarifying the role of genetic and experiential factors in the etiology of schizophrenia. *Archives of general psychiatry* **30**, 121-128 (1974).
22. Walters, K.A., Huang, Y., Azaro, M., Tobin, K., Lehner, T., Brzustowicz, L.M. & Vieland, V.J. Meta-Analysis of Repository Data: Impact of Data Regularization on NIMH Schizophrenia Linkage Results. *PloS one* **9**, e84696, 1-10 (2014).
23. Meltzer H.Y. & Stahl S.M. The dopamine hypothesis of schizophrenia: A review. *Schizophrenia Bulletin* **2**, 19-76 (1976).

24. Lewis, D.A. & Levitt, P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual review of Neuroscience* **25**, 409-432 (2002).
25. Fatemi, S.H. & Folsom, T.D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia bulletin*, **187**, 1-21 (2009).
26. Arnold, S.E., Talbot, K. & Hahn, C.-G. Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Progress in brain research* **147**, 319-345 (2005).
27. Harrison, P.J. & Law, A.J. Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biological psychiatry* **60**, 132-140 (2006).
28. Stefansson, H., Sarginson, J., Kong, A., Yates, P., Steinthorsdottir, V., Gudfinnsson, E., Gunnarsdottir, S., Walker, N., Petursson, H. & Crombie, C. Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *The American Journal of Human Genetics* **72**, 83-87 (2003).
29. Sullivan, P.F. The psychiatric GWAS consortium: big science comes to psychiatry. *Neuron* **68**, 182-186 (2010).
30. Consortium, S.W.G.o.t.P.G. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421-427 (2014).
31. Malhotra, D., McCarthy, S., Michaelson, J.J., Vacic, V., Burdick, K.E., Yoon, S., Cichon, S., Corvin, A., Gary, S. & Gershon, E.S. High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron* **72**, 951-963 (2011).
32. Stefansson, H., Meyer-Lindenberg, A., Steinberg, S., Magnusdottir, B., Morgen, K., Arnarsdottir, S., Bjornsdottir, G., Walters, G.B., Jonsdottir, G.A. & Doyle, O.M. CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature* **505**, 361-366 (2014).
33. Kirov, G., Rees, E., Walters, J.T., Escott-Price, V., Georgieva, L., Richards, A.L., Chambert, K.D., Davies, G., Legge, S.E. & Moran, J.L. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biological psychiatry* **75**, 378-385 (2014).
34. Wockner, L., Noble, E., Lawford, B., Young, R.M., Morris, C., Whitehall, V. & Voisey, J. Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients. *Translational psychiatry* **4**, e339, 1-8 (2014).
35. Halene, T.B., Peter, C.J. & Akbarian, S. Epigenetic Dysregulation in the Schizophrenic Brain. *Current Behavioral Neuroscience Reports* **1**, 86-93 (2014).
36. Purcell, S.M., Moran, J.L., Fromer, M., Ruderfer, D., Solovieff, N., Roussos, P., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Bergen, S.E., Kahler, A., Duncan, L., Stahl, E., Genovese, G., Fernandez, E., Collins, M.O., Komiyama, N.H., Choudhary, J.S., Magnusson, P.K., Banks, E., Shakir, K., Garimella, K., Fennell, T., DePristo, M., Grant, S.G., Haggarty, S.J., Gabriel, S., Scolnick, E.M., Lander, E.S., Hultman,

- C.M., Sullivan, P.F., McCarroll, S.A. & Sklar, P. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature* **506**, 185-90 (2014).
37. Gibson, G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews Genetics* **13**, 135-145 (2012).
 38. Stone, J.L., O'Donovan, M.C., Gurling, H., Kirov, G.K., Blackwood, D.H., Corvin, A., Craddock, N.J., Gill, M., Hultman, C.M. & Lichtenstein, P. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* **455**, 237-241 (2008).
 39. Bassett, A.S., Marshall, C.R., Lionel, A.C., Chow, E.W. & Scherer, S.W. Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11. 2 deletion syndrome. *Human molecular genetics* **17**, 4045-4053 (2008).
 40. Koboldt, D.C., Steinberg, K.M., Larson, D.E., Wilson, R.K. & Mardis, E.R. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* **155**, 27-38 (2013).
 41. Mardis, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics* **24**, 133-141 (2008).
 42. Zheutlin, A.B., Hultman, C.M., Wang, K., Purcell, S.M. & Cannon, T.D. Relative Contributions of Common and Rare Genetic Variation to Risk for Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biological psychiatry*, **75**, 351 (2014).
 43. Timms, A.E., Dorschner, M.O., Wechsler, J., Choi, K.Y., Kirkwood, R., Girirajan, S., Baker, C., Eichler, E.E., Korvatska, O. & Roche, K.W. Support for the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia from exome sequencing in multiplex families. *JAMA psychiatry* **70**, 582-590 (2013).
 44. Fromer, M., Pocklington, A.J., Kavanagh, D.H., Williams, H.J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D.M., Carrera, N., Humphreys, I., Johnson, J.S., Roussos, P., Barker, D.D., Banks, E., Milanova, V., Grant, S.G., Hannon, E., Rose, S.A., Chambert, K., Mahajan, M., Scolnick, E.M., Moran, J.L., Kirov, G., Palotie, A., McCarroll, S.A., Holmans, P., Sklar, P., Owen, M.J., Purcell, S.M. & O'Donovan, M.C. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* **506**, 179-84 (2014).
 45. Kikuchi, G. The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Molecular and cellular biochemistry* **1**, 169-187 (1973).
 46. Mothet, J.-P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A. & Snyder, S.H. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4926-4931 (2000).

47. Matsui, T.a., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T. & Wada, K. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: The effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *Journal of neurochemistry* **65**, 454-458 (1995).
48. Fadda, E., Danysz, W., Wroblewski, J. & Costa, E. Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology* **27**, 1183-1185 (1988).
49. Vyklický, L., Benveniste, M. & Mayer, M. Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* **428**, 313-331 (1990).
50. Sato, K., Yoshida, S., Fujiwara, K., Tada, K. & Tohyama, M. Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain research* **567**, 64-70 (1991).
51. Sakata, Y., Owada, Y., Sato, K., Kojima, K., Hisanaga, K., Shinka, T., Suzuki, Y., Aoki, Y., Satoh, J. & Kondo, H. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Molecular brain research* **94**, 119-130 (2001).
52. Benarroch, E.E. Glycine and its synaptic interactions Functional and clinical implications. *Neurology* **77**, 677-683 (2011).
53. Iwama, H., Takahashi, K., Kure, S., Hayashi, F., Narisawa, K., Tada, K., Mizoguchi, M., Takashima, S., Tomita, U. & Nishikawa, T. Depletion of cerebral D-serine in non-ketotic hyperglycinemia: possible involvement of glycine cleavage system in control of endogenous D-serine. *Biochemical and biophysical research communications* **231**, 793-796 (1997).
54. Perry, T.L., Urquhart, N., MacLean, J., Evans, M.E., Hansen, S., Davidson, A.G.F., Applegarth, D.A., MacLeod, P.J. & Lock, J.E. Nonketotic hyperglycinemia: Glycine accumulation due to absence of glycine cleavage in brain. *New England Journal of Medicine* **292**, 1269-1273 (1975).
55. Kure, S., Takayanagi, M., Narisawa, K., Tada, K. & Leisti, J. Identification of a common mutation in Finnish patients with nonketotic hyperglycinemia. *Journal of Clinical Investigation* **90**, 160 (1992).
56. Hiraga, K., Kochi, H., Hayasaka, K., Kikuchi, G. & Nyhan, W. Defective glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. Occurrence of a less active glycine decarboxylase and an abnormal aminomethyl carrier protein. *Journal of Clinical Investigation* **68**, 525 (1981).
57. Trauner, D.A., Page, T., Greco, C., Sweetman, L., Kulovich, S. & Nyhan, W.L. Progressive neurodegenerative disorder in a patient with nonketotic hyperglycinemia. *The Journal of pediatrics* **98**, 272-275 (1981).

58. Dinopoulos, A., Matsubara, Y. & Kure, S. Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia. *Molecular genetics and metabolism* **86**, 61-69 (2005).
59. Dinopoulos, A., Kure, S., Chuck, G., Sato, K., Gilbert, D., Matsubara, Y. & Degrauw, T. Glycine decarboxylase mutations: a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* **64**, 1255-1257 (2005).
60. Brenton, J.N. & Rust, R.S. Late-onset nonketotic hyperglycinemia with a heterozygous novel point mutation of the *GLDC* gene. *Pediatric Neurology* **50**, 536-538 (2014).
61. Steiner, R.D., Sweetser, D.A., Rohrbaugh, J.R., Dowton, S.B., Toone, J.R. & Applegarth, D.A. Nonketotic hyperglycinemia: atypical clinical and biochemical manifestations. *The Journal of pediatrics* **128**, 243-246 (1996).
62. Hayasaka, K., Tada, K., Fuekl, N., Nakamura, Y., Nyhan, W.L., Schmidt, K., Packman, S., Seashore, M.R., Haan, E. & Danks, D.M. Nonketotic hyperglycinemia: analyses of glycine cleavage system in typical and atypical cases. *The Journal of pediatrics* **110**, 873-877 (1987).
63. Korman, S.H., Wexler, I.D., Gutman, A., Rolland, M.O., Kanno, J. & Kure, S. Treatment from birth of nonketotic hyperglycinemia due to a novel *GLDC* mutation. *Annals of Neurology* **59**, 411-415 (2006).
64. Conter, C., Rolland, M., Cheillan, D., Bonnet, V., Maire, I. & Froissart, R. Genetic heterogeneity of the *GLDC* gene in 28 unrelated patients with glycine encephalopathy. *Journal of inherited metabolic disease* **29**, 135-142 (2006).
65. Toone, J.R., Applegarth, D.A., Kure, S., Coulter-Mackie, M.B., Sazegar, P., Kojima, K. & Ichinohe, A. Novel mutations in the P-protein (glycine decarboxylase) gene in patients with glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia). *Molecular genetics and metabolism* **76**, 243-249 (2002).
66. Chang, C.-Y., Lin, S.-P., Lin, H.-Y., Chuang, C.-K., Ho, C.-S. & Hsu, C.-H. Non-ketotic hyperglycinemia with a novel *GLDC* mutation in a Taiwanese child. *Acta paediatrica Taiwanica* **49**, 35-37 (2007).
67. Love, J.M., Prosser, D., Love, D.R., Chintakindi, K.P., Dalal, A.B. & Aggarwal, S. A novel glycine decarboxylase gene mutation in an Indian family with nonketotic hyperglycinemia. *Journal of child neurology* **29**, 122-127 (2014).
68. Meyer, S., Acquaviva, C., Shamdeen, M.G., Haas, D. & Vianey-Saban, C. A novel missense mutation in a neonate with nonketotic hyperglycinemia. *Pediatric Neurology* **43**, 363-367 (2010).
69. Brunel-Guitton, C., Casey, B., Coulter-Mackie, M., Vallance, H., Hewes, D., Stockler-Ipsiroglu, S. & Mercimek-Mahmutoglu, S. Late-onset nonketotic

- hyperglycinemia caused by a novel homozygous missense mutation in the *GLDC* gene. *Molecular genetics and metabolism* **103**, 193-196 (2011).
70. Cusmai, R., Martinelli, D., Moavero, R., Dionisi Vici, C., Vigevano, F., Castana, C., Elia, M., Bernabei, S. & Bevivino, E. Ketogenic diet in early myoclonic encephalopathy due to non ketotic hyperglycinemia. *European Journal of Paediatric Neurology* **16**, 509-513 (2012).
 71. Yoon, I., Lee, N.M., Yoo, B.H., Lee, B.S. & Yoo, H.-W. Two Novel Missense Mutations Observed in Nonketotic Hyperglycinemia. *Pediatric Neurology* **46**, 401-403 (2012).
 72. Yilmaz, B.S., Kor, D., Ceylaner, S., Mert, G.G., Incecik, F., Kartal, E. & Mungan, N.O. Two Novel Missense Mutations in Nonketotic Hyperglycinemia. *Journal of child neurology* **128**, 224-226 (2014).
 73. Tsuyusaki, Y., Shimbo, H., Wada, T., Iai, M., Tsuji, M., Yamashita, S., Aida, N., Kure, S. & Osaka, H. Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia. *Brain and Development* **34**, 72-75 (2012).
 74. Kure, S., Kojima, K., Ichinohe, A., Maeda, T., Kalmanchev, R., Fekete, G., Berg, S.Z., Filiano, J., Aoki, Y. & Suzuki, Y. Heterozygous *GLDC* and *GCSH* gene mutations in transient neonatal hyperglycinemia. *Annals of Neurology* **52**, 643-646 (2002).
 75. Hayasaka, K., Tada, K., Kikuchi, G., Winter, S. & Nyhan, W.L. Nonketotic hyperglycinemia: two patients with primary defects of P-protein and T-protein, respectively, in the glycine cleavage system. *Pediatric research* **17**, 967-970 (1983).
 76. Kanno, J., Hutchin, T., Kamada, F., Narisawa, A., Aoki, Y., Matsubara, Y. & Kure, S. Genomic deletion within *GLDC* is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *Journal of medical genetics* **44**, e69, 1-9 (2007).
 77. Kure, S., Kojima, K., Kudo, T., Kanno, K., Aoki, Y., Suzuki, Y., Shinka, T., Sakata, Y., Narisawa, K. & Matsubara, Y. Chromosomal localization, structure, single-nucleotide polymorphisms, and expression of the human H-protein gene of the glycine cleavage system (*GCSH*), a candidate gene for nonketotic hyperglycinemia. *Journal of human genetics* **46**, 378-384 (2001).
 78. Flusser, H., Korman, S., Sato, K., Matsubara, Y., Galil, A. & Kure, S. Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic *GLDC* splice mutation. *Neurology* **64**, 1426-1430 (2005).
 79. Sumiyoshi, T., Anil, A.E., Jin, D., Jayathilake, K., Lee, M. & Meltzer, H.Y. Plasma glycine and serine levels in schizophrenia compared to normal controls

- and major depression: relation to negative symptoms. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **7**, 1-8 (2004).
80. Neeman, G., Blararu, M., Bloch, B., Kremer, I., Ermilov, M., Javitt, D.C. & Heresco-Levy, U. Relation of plasma glycine, serine, and homocysteine levels to schizophrenia symptoms and medication type. *American Journal of Psychiatry* **162**, 1738-1740 (2005).
 81. Ohnuma, T., Sakai, Y., Maeshima, H., Hatano, T., Hanzawa, R., Abe, S., Kida, S., Shibata, N., Suzuki, T. & Arai, H. Changes in plasma glycine, L-serine, and D-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **32**, 1905-1912 (2008).
 82. Heresco-Levy, U., Bar, G., Levin, R., Ermilov, M., Ebstein, R.P. & Javitt, D.C. High glycine levels are associated with prepulse inhibition deficits in chronic schizophrenia patients. *Schizophrenia research* **91**, 14-21 (2007).
 83. Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S.-i. & Hasegawa, H. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry* **60**, 572-576 (2003).
 84. Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindström, L.H. & Iyo, M. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **29**, 767-769 (2005).
 85. Tsai, G., Yang, P., Chung, L.-C., Lange, N. & Coyle, J.T. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological psychiatry* **44**, 1081-1089 (1998).
 86. Heresco-Levy, U., Javitt, D.C., Ebstein, R., Vass, A., Lichtenberg, P., Bar, G., Catinari, S. & Ermilov, M. D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biological psychiatry* **57**, 577-585 (2005).
 87. Goff, D.C., Tsai, G., Manoach, D.S. & Flood, J. D-cycloserine added to clozapine for patients with schizophrenia. *The American journal of psychiatry* **153**, 1628-1630 (1996).
 88. Goff, D.C., Tsai, G., Levitt, J., Amico, E., Manoach, D., Schoenfeld, D.A., Hayden, D.L., McCarley, R. & Coyle, J.T. A placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics in patients with schizophrenia. *Archives of general psychiatry* **56**, 21-27 (1999).

89. Kojima-Ishii, K., Kure, S., Ichinohe, A., Shinka, T., Narisawa, A., Komatsuzaki, S., Kanno, J., Kamada, F., Aoki, Y. & Yokoyama, H. Model mice for mild-form glycine encephalopathy: behavioral and biochemical characterizations and efficacy of antagonists for the glycine binding site of N-methyl D-aspartate receptor. *Pediatric research* **64**, 228-233 (2008).
90. Goff, D.C., Bottiglieri, T., Arning, E., Shih, V., Freudenreich, O., Evins, A.E., Henderson, D.C., Baer, L. & Coyle, J. Folate, homocysteine, and negative symptoms in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **161**, 1705-1708 (2004).
91. Roffman, J.L., Brohawn, D.G., Nitenson, A.Z., Macklin, E.A., Smoller, J.W. & Goff, D.C. Genetic variation throughout the folate metabolic pathway influences negative symptom severity in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* **150**, 1-9 (2011).
92. Lewis, S.J., Zammit, S., Gunnell, D. & Smith, G.D. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **135**, 2-4 (2005).
93. Ellingrod, V.L., Miller, D.D., Taylor, S.F., Moline, J., Holman, T. & Kerr, J. Metabolic syndrome and insulin resistance in schizophrenia patients receiving antipsychotics genotyped for the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C/T and 1298A/C variants. *Schizophrenia research* **98**, 47-54 (2008).
94. Roffman, J.L., Gollub, R.L., Calhoun, V.D., Wassink, T.H., Weiss, A.P., Ho, B.C., White, T., Clark, V.P., Fries, J. & Andreasen, N.C. *MTHFR* 677C→ T genotype disrupts prefrontal function in schizophrenia through an interaction with *COMT* 158Val→ Met. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17573-17578 (2008).
95. Arinami, T., Yamada, N., Yamakawa-Kobayashi, K., Hamaguchi, H. & Toru, M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *American Journal of Medical Genetics* **74**, 526-528 (1997).
96. Roffman, J.L., Weiss, A.P., Purcell, S., Caffalette, C.A., Freudenreich, O., Henderson, D.C., Bottiglieri, T., Wong, D.H., Halsted, C.H. & Goff, D.C. Contribution of Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Polymorphisms to Negative Symptoms in Schizophrenia. *Biological psychiatry* **63**, 42-48 (2008).
97. Gilbody, S., Lewis, S. & Lightfoot, T. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *American journal of epidemiology* **165**, 1-13 (2007).
98. Peerbooms, O.L., van Os, J., Drukker, M., Kenis, G., Hoogveld, L., De Hert, M., Delespaul, P., van Winkel, R. & Rutten, B.P. Meta-analysis of *MTHFR* gene

- variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: evidence for a common genetic vulnerability? *Brain, behavior, and immunity* **25**, 1530-1543 (2011).
99. Kunugi, H., Fukuda, R., Hattori, M., Kato, T., Tatsumi, M., Sakai, T., Hirose, T. & Nanko, S. C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene and psychoses. *Molecular psychiatry* **3**, 435-437 (1998).
 100. Muntjewerff, J.-W., Kahn, R.S., Blom, H.J. & den Heijer, M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Molecular psychiatry* **11**, 143-149 (2005).
 101. Levine, J., Stahl, Z., Sela, B.A., Gavendo, S., Ruderman, V. & Belmaker, R.H. Elevated homocysteine levels in young male patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **159**, 1790-1792 (2002).
 102. Applebaum, J., Shimon, H., Sela, B.-A., Belmaker, R. & Levine, J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. *Journal of psychiatric research* **38**, 413-416 (2004).
 103. Brown, A.S., Bottiglieri, T., Schaefer, C.A., Quesenberry, C.P., Liu, L., Bresnahan, M. & Susser, E.S. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Archives of general psychiatry* **64**, 31-39 (2007).
 104. Liu, X., Jian, X. & Boerwinkle, E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Human mutation* **32**, 894-899 (2011).
 105. Liu, X., Jian, X. & Boerwinkle, E. dbNSFP v2. 0: A Database of Human Non-synonymous SNVs and Their Functional Predictions and Annotations. *Human mutation* **34**, E2393-E2402 (2013).
 106. Ooga, T., Sato, H., Nagashima, A., Sasaki, K., Tomita, M., Soga, T. & Ohashi, Y. Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia. *Molecular BioSystems* **7**, 1217-1223 (2011).
 107. Baran, R., Kochi, H., Saito, N., Suematsu, M., Soga, T., Nishioka, T., Robert, M. & Tomita, M. MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. *BMC bioinformatics* **7**, 530 (2006).
 108. Miseq Reporter v2.2 Theory of Operation, Secondary Analysis of Miseq Sequencing Data, Illumina, 1-46, 2012.
 109. Korman, S.H., Boneh, A., Ichinohe, A., Kojima, K., Sato, K., Ergaz, Z., Gomori, J.M., Gutman, A. & Kure, S. Persistent NKH with transient or absent symptoms and a homozygous *GLDC* mutation. *Annals of Neurology* **56**, 139-43 (2004).
 110. Narisawa, A., Komatsuzaki, S., Kikuchi, A., Niihori, T., Aoki, Y., Fujiwara, K., Tanemura, M., Hata, A., Suzuki, Y. & Relton, C.L. Mutations in genes encoding

- the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Human molecular genetics* **585**, 1-8 (2011).
111. Kure, S., Kato, K., Dinopoulos, A., Gail, C., deGrauw, T.J., Christodoulou, J., Bzduch, V., Kalmanchev, R., Fekete, G. & Trojovský, A. Comprehensive mutation analysis of *GLDC*, *AMT*, and *GCSH* in nonketotic hyperglycinemia. *Human mutation* **27**, 343-352 (2006).
 112. Pardal-Fernández, J.M., Carrascosa-Romero, M.C., de Cabo-de la Vega, C., Iniesta-López, I., Gil-Pons, E. & Martínez-Gutiérrez, A. Atypical glycine encephalopathy in an extremely low birth weight infant: description of a new mutation and clinical and electroencephalographic analysis. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape* **11**, 48-53 (2009).
 113. Dinopoulos, A., Kure, S., Chuck, G., Sato, K., Gilbert, D.L., Matsubara, Y. & Degrauw, T. Glycine decarboxylase mutations: a distinctive phenotype of nonketotic hyperglycinemia in adults. *Neurology* **64**, 1255-1257 (2005).
 114. Applegarth, D. & Toone, J. Glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinaemia): review and update. *Journal of inherited metabolic disease* **27**, 417-422 (2004).
 115. Toone, J.R., Applegarth, D.A., Coulter - Mackie, M.B. & James, E.R. Identification of the first reported splice site mutation (IVS7-1G→ A) in the aminomethyltransferase (T-protein) gene (*AMT*) of the glycine cleavage complex in 3 unrelated families with nonketotic hyperglycinemia. *Human mutation* **17**, 76 (2001).
 116. Nanao, K., Okamura-Ikeda, K., Motokawa, Y., Danks, D.M., Baumgartner, E.R., Takada, G. & Hayasaka, K. Identification of the mutations in the T-protein gene causing typical and atypical nonketotic hyperglycinemia. *Human genetics* **93**, 655-658 (1994).
 117. Kure, S., Ichinohe, A., Kojima, K., Sato, K., Kizaki, Z., Inoue, F., Yamanaka, C. & Matsubara, Y. Mild variant of nonketotic hyperglycinemia with typical neonatal presentations: mutational and in vitro expression analyses in two patients. *The Journal of pediatrics* **144**, 827-829 (2004).
 118. Kure, S., Mandel, H., Rolland, M.-O., Sakata, Y., Shinka, T., Drugan, A., Boneh, A., Tada, K., Matsubara, Y. & Narisawa, K. A missense mutation (His42Arg) in the T-protein gene from a large Israeli-Arab kindred with nonketotic hyperglycinemia. *Human genetics* **102**, 430-434 (1998).
 119. Kure, S., Shinka, T., Sakata, Y., Osamu, N., Takayanagi, M., Tada, K., Matsubara, Y. & Narisawa, K. A one-base deletion (183delC) and a missense mutation

- (D276H) in the T-protein gene from a Japanese family with nonketotic hyperglycinemia. *Journal of human genetics* **43**, 135-137 (1998).
120. Toone, J.R., Applegarth, D.A., Coulter-Mackie, M.B. & James, E.R. Recurrent mutations in P-and T-proteins of the glycine cleavage complex and a novel T-protein mutation (N145I): a strategy for the molecular investigation of patients with nonketotic hyperglycinemia (NKH). *Molecular genetics and metabolism* **72**, 322-325 (2001).
 121. Azize, N.A.A., Ngah, W.Z.W., Othman, Z., Desa, N.M., Chin, C.B., Yunus, Z.M., Mohan, A., Hean, T.S., Zakaria, S.Z.S. & Lock-Hock, N. Mutation analysis of glycine decarboxylase, aminomethyltransferase and glycine cleavage system protein-H genes in 13 unrelated families with glycine encephalopathy. *Journal of human genetics* **59**, 593-97 (2014).
 122. Zammit, S., Lewis, S., Gunnell, D. & Smith, G.D. Schizophrenia and neural tube defects: comparisons from an epidemiological perspective. *Schizophrenia bulletin* **33**, 853-858 (2007).
 123. Marzullo, G. & Fraser, F.C. Similar rhythms of seasonal conceptions in neural tube defects and schizophrenia: a hypothesis of oxidant stress and the photoperiod. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **73**, 1-5 (2005).
 124. Yu, T.W., Chahrour, M.H., Coulter, M.E., Jiralerspong, S., Okamura-Ikeda, K., Ataman, B., Schmitz-Abe, K., Harmin, D.A., Adli, M., Malik, A.N., D'Gama, A.M., Lim, E.T., Sanders, S.J., Mochida, G.H., Partlow, J.N., Sunu, C.M., Felie, J.M., Rodriguez, J., Nasir, R.H., Ware, J., Joseph, R.M., Hill, R.S., Kwan, B.Y., Al-Saffar, M., Mukaddes, N.M., Hashmi, A., Balkhy, S., Gascon, G.G., Hisama, F.M., LeClair, E., Poduri, A., Oner, O., Al-Saad, S., Al-Awadi, S.A., Bastaki, L., Ben-Omran, T., Teebi, A.S., Al-Gazali, L., Eapen, V., Stevens, C.R., Rappaport, L., Gabriel, S.B., Markianos, K., State, M.W., Greenberg, M.E., Taniguchi, H., Braverman, N.E., Morrow, E.M. & Walsh, C.A. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* **77**, 259-273 (2013).
 125. Liu, Q., Dou, S., Ji, Z. & Xue, Q. Synonymous codon usage and gene function are strongly related in *Oryza sativa*. *Biosystems* **80**, 123-131 (2005).
 126. Evins, A., Amico, E., Shih, V. & Goff, D. Clozapine treatment increases serum glutamate and aspartate compared to conventional neuroleptics. *Journal of neural transmission* **104**, 761-766 (1997).
 127. Pitt, J.J. & Hauser, S. Transient 5-oxoprolinuria and high anion gap metabolic acidosis: clinical and biochemical findings in eleven subjects. *Clinical chemistry* **44**, 1497-1503 (1998).

128. Liss, D., Paden, M., Schwarz, E. & Mullins, M. What is the clinical significance of 5-oxoproline (pyroglutamic acid) in high anion gap metabolic acidosis following paracetamol (acetaminophen) exposure? *Clinical Toxicology* **51**, 817-827 (2013).
129. Goff, D.C., Hennen, J., Lyoo, I.K., Tsai, G., Wald, L.L., Evins, A.E., Yurgelun-Todd, D.A. & Renshaw, P.F. Modulation of brain and serum glutamatergic concentrations following a switch from conventional neuroleptics to olanzapine. *Biological psychiatry* **51**, 493-497 (2002).
130. Ohashi, J., Yamamoto, S., Tsuchiya, N., Hatta, Y., Komata, T., Matsushita, M. & Tokunaga, K. Comparison of statistical power between 2×2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Annals of human genetics* **65**, 197-206 (2001).
131. Zuk, O., Schaffner, S.F., Samocha, K., Do, R., Hechter, E., Kathiresan, S., Daly, M.J., Neale, B.M., Sunyaev, S.R. & Lander, E.S. Searching for missing heritability: designing rare variant association studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E455-E464 (2014).
132. Koike, S., Bundo, M., Iwamoto, K., Suga, M., Kuwabara, H., Ohashi, Y., Shinoda, K., Takano, Y., Iwashiro, N. & Satomura, Y. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Translational psychiatry* **4**, e379, 1-8 (2014).
133. Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540 (1994).
134. Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. & Mishina, M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* **3**, 1138-1140 (1992).
135. Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* **11**, 327-335 (2001).
136. Yamakura, T. & Shimoji, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in neurobiology* **59**, 279-298 (1999).
137. Gielen, M., Retchless, B.S., Mony, L., Johnson, J.W. & Paoletti, P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**, 703-707 (2009).
138. Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M. & Roche, K.W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *The Journal of neuroscience* **24**, 6383-6391 (2004).

139. Zhao, M.-G., Toyoda, H., Lee, Y.-S., Wu, L.-J., Ko, S.W., Zhang, X.-H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H. & Li, B.-M. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* **47**, 859-872 (2005).
140. Benarroch, E.E. NMDA receptors Recent insights and clinical correlations. *Neurology* **76**, 1750-1757 (2011).
141. Gambrell, A.C. & Barria, A. NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 5855-5860 (2011).
142. Zhang, Z. & Sun, Q.Q. Development of NMDA NR2 subunits and their roles in critical period maturation of neocortical GABAergic interneurons. *Developmental neurobiology* **71**, 221-245 (2011).
143. Liu, X.-B., Murray, K.D. & Jones, E.G. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *The Journal of neuroscience* **24**, 8885-8895 (2004).
144. Lu, H.-C., Gonzalez, E. & Crair, M.C. Barrel cortex critical period plasticity is independent of changes in NMDA receptor subunit composition. *Neuron* **32**, 619-634 (2001).
145. Law, A.J., Weickert, C.S., Webster, M.J., Herman, M.M., Kleinman, J.E. & Harrison, P.J. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *European Journal of Neuroscience* **18**, 1197-1205 (2003).
146. Lau, C.G. & Zukin, R.S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 413-426 (2007).
147. Chen, B.-S. & Roche, K.W. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* **53**, 362-368 (2007).
148. Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A. & Roche, K.W. Diversity in NMDA Receptor Composition Many Regulators, Many Consequences. *The Neuroscientist* **19**, 62-75 (2013).
149. Sanz-Clemente, A., Matta, J.A., Isaac, J.T. & Roche, K.W. Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* **67**, 984-996 (2010).
150. Nolt, M.J., Lin, Y., Hruska, M., Murphy, J., Sheffler-Colins, S.I., Kayser, M.S., Passer, J., Bennett, M.V., Zukin, R.S. & Dalva, M.B. EphB controls NMDA receptor function and synaptic targeting in a subunit-specific manner. *The Journal of neuroscience* **31**, 5353-5364 (2011).

151. Zhang, S., Edelman, L., Liu, J., Crandall, J.E. & Morabito, M.A. Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience* **28**, 415-424 (2008).
152. Grimwood, S., Slater, P., Deakin, J.F.W. & Hutson, P.H. NR2B-containing NMDA receptors are up-regulated in temporal cortex in schizophrenia. *Neuroreport* **10**, 461-465 (1999).
153. Clinton, S.M., Haroutunian, V. & Meador-Woodruff, J.H. Up-regulation of NMDA receptor subunit and post-synaptic density protein expression in the thalamus of elderly patients with schizophrenia. *Journal of neurochemistry* **98**, 1114-1125 (2006).
154. Pearson, B., Leonard, S., Freedman, R. & Browning, M. Expression of the NR2B subunit of the NMDA receptor is increased in postmortem hippocampus of schizophrenics. *Schizophrenia research* **36**, 75 (1999).
155. Dracheva, S., Marras, S.A., Elhakem, S.L., Kramer, F.R., Davis, K.L. & Haroutunian, V. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* **158**, 1400-1410 (2001).
156. Bitanirwe, B., Lim, M., Kelley, J., Kaneko, T. & Woo, T. Glutamatergic deficits and parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *BMC psychiatry* **9**, 71 (2009).
157. Hong, C.-j., Yu, Y.W., Lin, C.-h., Cheng, C.-y. & Tsai, S.-j. Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (*GRIN2B*) genetic variants and psychopathology and clozapine response in schizophrenia. *Psychiatric genetics* **11**, 219-222 (2001).
158. Qin, S., Zhao, X., Pan, Y., Liu, J., Feng, G., Fu, J., Bao, J., Zhang, Z. & He, L. An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (*GRIN1*) and NR2B subunit gene (*GRIN2B*) in schizophrenia with universal DNA microarray. *European Journal of Human Genetics* **13**, 807-814 (2005).
159. Chiu, H.-J., Wang, Y.-C., Liou, Y.-J., Lai, I.-C. & Chen, J.-Y. Association analysis of the genetic variants of the N-methyl D-aspartate receptor subunit 2b (NR2b) and treatment-refractory schizophrenia in the Chinese. *Neuropsychobiology* **47**, 178-181 (2003).
160. Li, D. & He, L. Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (*GRIN2B*) and schizophrenia: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics in Medicine* **9**, 4-8 (2007).
161. Iwayama-Shigeno, Y., Yamada, K., Itokawa, M., Toyota, T., Meerabux, J., Minabe, Y., Mori, N., Inada, T. & Yoshikawa, T. Extended analyses support the

- association of a functional (GT) n polymorphism in the *GRIN2A* promoter with Japanese schizophrenia. *Neuroscience letters* **378**, 102-105 (2005).
162. Iwayama, Y., Hashimoto, K., Nakajima, M., Toyota, T., Yamada, K., Shimizu, E., Itokawa, M., Hoshika, A., Iyo, M. & Yoshikawa, T. Analysis of correlation between serum d-serine levels and functional promoter polymorphisms of *GRIN2A* and *GRIN2B* genes. *Neuroscience letters* **394**, 101-104 (2006).
 163. Tang, J., Chen, X., Xu, X., Wu, R., Zhao, J., Hu, Z. & Xia, K. Significant linkage and association between a functional (GT) n polymorphism in promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene (*GRIN2A*) and schizophrenia. *Neuroscience letters* **409**, 80-82 (2006).
 164. Chaperon, F., Müller, W., Auberson, Y., Tricklebank, M. & Neijt, H. Substitution for PCP, disruption of prepulse inhibition and hyperactivity induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: preferential involvement of the NR2B rather than NR2A subunit. *Behavioural pharmacology* **14**, 477-487 (2003).
 165. Aksenova, M., Burbaeva, G.S., Kandror, K., Kapkov, D. & Stepanov, A. The decreased level of casein kinase 2 in brain cortex of schizophrenic and Alzheimer's disease patients. *FEBS letters* **279**, 55-57 (1991).
 166. Castillo, M.A., Ghose, S., Tamminga, C.A. & Utery-Reynolds, P.G. Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex. *Biological psychiatry* **67**, 208-216 (2010).
 167. Funk, A.J., McCullumsmith, R.E., Haroutunian, V. & Meador-Woodruff, J.H. Abnormal activity of the MAPK-and cAMP-associated signaling pathways in frontal cortical areas in postmortem brain in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **37**, 896-905 (2011).
 168. Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S. & Hashimoto, M. Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development* **134**, 2273-2282 (2007).
 169. Lai, C.-Y., Yu, S.-L., Hsieh, M.H., Chen, C.-H., Chen, H.-Y., Wen, C.-C., Huang, Y.-H., Hsiao, P.-C., Hsiao, C.K. & Liu, C.-M. MicroRNA expression aberration as potential peripheral blood biomarkers for schizophrenia. *PLoS one* **6**, e21635 , 1-10 (2011).
 170. Takata, A., Iwayama, Y., Fukuo, Y., Ikeda, M., Okochi, T., Maekawa, M., Toyota, T., Yamada, K., Hattori, E. & Ohnishi, T. A Population-Specific Uncommon Variant in *GRIN3A* associated with Schizophrenia. *Biological psychiatry* **73**, 532-539 (2013).

171. Plattner, F., Hernández, A., Kistler, T.M., Pozo, K., Zhong, P., Yuen, E.Y., Tan, C., Hawasli, A.H., Cooke, S.F. & Nishi, A. Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* **81**, 1070-1083 (2014).
172. Takayanagi, M., Kure, S., Sakata, Y., Kurihara, Y., Ohya, Y., Kajita, M., Tada, K., Matsubara, Y. & Narisawa, K. Human glycine decarboxylase gene (*GLDC*) and its highly conserved processed pseudogene (ψ *GLDC*): Their structure and expression, and the identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Human genetics* **106**, 298-305 (2000).

略語一覽

AMT	Aminomethyltransferase
Cdk5	Cyclin dependent kinase 5
CK2	Casein kinase 2
CNV	Copy Number Variation
dbNFSP	Database for nonsynonymous SNP's functional predictions
DLD	Dihydrolipoamide dehydrogenase
EphB2	Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma group B
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GATK	The Genomes Analysis Tool Kit
GCSH	Glycine cleavage system protein H
GLDC	Glycine dehydrogenase
GWAS	Genomes-wide Association Study
Indels	Insertions/deletions
LRT	Likelihood ratio test
mGluR5	Metabotropic glutamate receptor 5
MAF	Minor Allele Frequency
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NKH	Nonketotic hyperglycinemia
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PCP	Phencyclidine
PCR	Polymerase Chain Reaction
Polyphen-2	Polymorphism Phenotyping version 2
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNVs	Single Nucleotide Variants
TSCA	TruSeq Custom Amplicon