

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07041

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた精神疾患リスク遺伝子の神経遺伝学的解析

研究課題名(英文) Neurogenetic Analysis of Psychiatric Risk Factor Genes in Fruit Flies

研究代表者

古久保 克男(徳永克男) (FURUKUBO-TOKUNAGA, Katsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00272154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は、生涯罹患率が1%に及び高い発症頻度を示す重篤な疾患であり、その発症機構の理解は現在の神経科学の重要な課題である。本研究では、ショウジョウバエ神経筋結合部をモデルに、精神疾患の重要な遺伝子であるDISC1と他のリスク遺伝子との遺伝的相互作用を解析した。これにより、DISC1遺伝子がシナプス形成過程において、自閉症及び精神遅滞の重要なリスク遺伝子であるNeurexinと相互作用することを明らかにした。さらに、神経筋結合部を用いた同様の解析により、様々なシナプス遺伝子の発現に重要な機能を有することが知られているFMR1遺伝子とも相互作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症患者の大規模伝子関連解析により、多数のリスク遺伝子が同定され、発症機構の遺伝的要因の解明に重要な手がかりが得られつつある。しかしながら、個々の遺伝子の疾患リスクに対する効果は限定的であり、複数の遺伝子に対する多重変異体を用いた神経遺伝学的メカニズムの解明が必須の課題である。本研究では、DISC1遺伝子と自閉症関連遺伝子Neurexin1及びFMR1がシナプス形成過程において相互作用することを明らかにした。これらの結果は、統合失調症発症機構におけるシナプス仮説を支持すると共に、臨床的に異なる二つの精神疾患に共通の分子メカニズムが存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Originally identified at the breakpoint of a (1;11)(q42.1; q14.3) chromosomal translocation in a Scottish family with a wide range of mental disorders, the DISC1 gene has been a focus of intensive investigations as an entry point to study the molecular mechanisms of diverse mental dysfunctions. In this work, we have expressed the human DISC1 gene in the fruit fly and performed a genetic screening for the mutations of psychiatric risk genes that cause modifications of DISC1 synaptic phenotypes at neuromuscular junctions. We found that DISC1 interacts with dnrx1, the Drosophila homolog of the human Neurexin (NRXN1) gene, and dFMR1 in the development of glutamatergic synapses. Given that both NRX1 and FMR1 have been identified as risk factor genes for diverse psychiatric disorders including schizophrenia and autism spectrum disorders, our results suggest an intriguing converging mechanism controlled by DISC1, Neurexin, and FMR1.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 統合失調症 DISC1 シナプス NRX1 FMR1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、生涯罹患率が1%に及ぶ高い発症頻度を示す重篤な疾患であり、その発症機構の理解は現在の神経科学の重要な課題である。近年、疾患患者の大規模な遺伝子関連解析により、多数のリスク遺伝子が同定され、発症機構の遺伝的要因の解明に重要な手がかりが得られつつある。しかしながら、個々の遺伝子の疾患リスクに対する効果は限定的であり、複数の遺伝子に対する多重変異体を用いた *in vivo* における神経遺伝学的メカニズムの解明が必須の課題である。

様々な統合失調症脆弱遺伝子のなかでも DISC1 遺伝子は疾患リスクに顕著な影響力をもつ遺伝子であり、統合失調症のみならず、鬱病や双極性障害などの気分障害の発症にも関与することが知られている。DISC1 遺伝子は854個のアミノ酸をコードし、海馬・前頭葉等の様々な脳部位に加えて、発生途上にある胎児の脳においても高いレベルで発現する。加えて、DISC1 タンパク質は、シナプスのみならず、核にも存在しており、様々な細胞内因子と相互作用しつつ、突起形成・軸索輸送・幹細胞分裂等の公汎な神経機能に関与する事が示唆されている。しかしながら、DISC1 遺伝子と他のリスク因子との疾患形成過程における相互作用の解析は限られており、細胞機能と病態形成をつなぐ分子メカニズムは依然として明らかではない (Brandon and Sawa, 2011; Porteous et al., 2014)。この問題を克服するためには、体系的な神経遺伝学と分子細胞レベルの遺伝子機能の解析が必須であり、マウス等の脊椎動物に加えて、より単純化されたモデル動物を使用した *in vivo* における神経分子機能の探索が重要な手がかりを与えると期待される。

本研究では、申請者がこれまでに推進してきたショウジョウバエを使用したヒト DISC1 遺伝子の分子神経機能の解析を基礎に、ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、DISC1 遺伝子と細胞内で相互作用し、神経機能異常を誘起する脆弱遺伝子の探索を行う。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、DISC1 がショウジョウバエにおいて cAMP 応答性転写因子 (ATF 4 / CREB) を介して睡眠恒常性を制御するとともに、その過剰発現が嗅覚連合学習を阻害することを明らかにしてきた (Sawamura et al., Mol. Psychiatry 2008; Furukubo-Tokunaga, Prog. Brain Res., 2009; Furukubo-Tokunaga et al., Mol. Psychiatry 2016)。さらに、ショウジョウバエの高次機能中枢 (キノコ体) における DISC1 遺伝子の強制発現が、樹状突起形成と軸索末端の微細分岐を抑制することを明らかにするとともに、一連の領域欠失遺伝子による *in vivo* における機能ドメインの体系的解析を行ってきた (Furukubo-Tokunaga et al., 2016)。

さらに、申請者は、ショウジョウバエ幼虫の神経筋結合部におけるグルタミン酸作動性シナプスをモデルに、DISC1 神経機能を修飾する遺伝子のスクリーニングを試みてきた。統合失調症リスク遺伝子はその8割以上がショウジョウバエに存在する。リスク遺伝子変異体において DISC1 を強制発現させた幼虫シナプスの形態解析により、これまでに、DTNBP1, FMR1, CYFIP, NRX1, NLG1 等、DISC1 遺伝子の機能を *in vivo* において修飾する多数の遺伝子を同定してきた。

本研究では、申請者の上記の研究成果を基礎に、統合失調症のみならず、自閉症及び精神遅滞のリスク遺伝子であり、シナプス形成と可塑性の制御に重要な機能を持つことが知られている Neurexin (NRX1) 遺伝子と FMR1 遺伝子に焦点を絞り、DISC1 遺伝子とのシナプス形成における相互作用を解析した。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエ幼虫の神経筋接合部は、その形成過程を実態顕微鏡で観察できる大きさを持ち、さらに、グルタミン酸作動性であることから、脊椎動物の中枢シナプス形成機構の遺伝学的モデルとして解剖学的、生理学的解析に広く用いられてきた (Budnik, 2006)。多様な解析に際して神経クローン誘導を必要とせず、シナプス形成と可塑性における遺伝子間相互作用の解析にまたとない出発材料を提供している (図1)。

形態的解析に際しては、神経筋接合部を神経特異的抗体 (anit-HRP) とシナプス特異的抗体 (anti-Synaptotagmin) とで染色し、神経軸索末端の分岐様式を共焦点顕微鏡によりデジタル画像化したのち、一連のデータを画像解析プログラムにて処理し、1) 神経分岐点の数、2) 側鎖長、3) シナプスブトン数、4) シナプス総面積を集計した。この定量的解析方法を基礎に、様々な精神疾患リスク遺伝子変異体において DISC1 を発現させ、シナプス形成機構の変化を解析した。さらに、シナプスにおいて中核的機能を有するタンパク質について、前シナプス及び

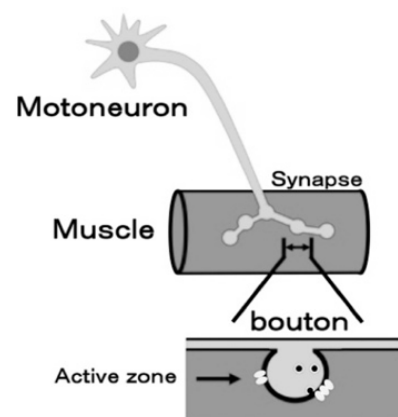


図1 ショウジョウバエ幼虫神経筋結合部。運動神経は標的筋肉上で多くの枝に分岐し、多数の巨大なシナプスを形成する。

後シナプス及び

後シナプスに於ける発現レベルと細胞内局在の変化を、免疫組織学的手法と分子生物学的手法により解析した。これにより、DISC1により誘起されるシナプス細胞における分子応答が、疾患リスク遺伝子の活性レベルによりどのように修飾されるか検討した。

#### 4. 研究成果

##### Neurexin 遺伝子との遺伝学的相互作用解析

Neurexin (NRX1) 遺伝子は、自閉症及び精神遅滞の重要なリスク遺伝子であり、シナプスの形成と可塑性に重要な機能を有することが知られている。Neurexin は、前シナプスの足場タンパク質 CASK と MINT1 と結合し、シナプス小胞の放出を制御する。ヒト Neurexin 相同遺伝子であるショウジョウバエ *dnrx1* 遺伝子の変異体において DISC1 を発現させ、シナプス形成の変化を解析した。その結果、DISC1 遺伝子強制発現が、野生型背景では神経筋接合部のシナプス総面積を減少させるものの、*dnrx1* ヘテロ接合変異体では、シナプス総面積を変化させず、代わって運動神経軸索末端の分岐数を有意に減少させる事を明らかにした。さらに、DISC1 過剰発現が、シナプス活性部位の主要な構成タンパク質である BRP タンパク質の発現レベルを上昇させることを見出した。一方、野生型では DISC1 過剰発現が前シナプス細胞における活性部位密度を増加させるが、*dnrx1* ヘテロ接合変異体では対応する変化が抑制されることを示した。加えて、DISC1 過剰発現が、野生型においては後シナプス細胞に局在する AMPA 型グルタミン酸受容体の発現レベルを上昇させるものの、*dnrx1* ヘテロ接合変異体ではその上昇が抑制されることを明らかにした。さらに、後シナプス構造の形成について詳細な解析を行い、Neurexin ヘテロ接合変異体では DISC1 過剰発現が後シナプスの足場タンパク質 DLG の発現量を増加させるのみならず、その特異的局在を阻害することを明らかにした。加えて、これらのシナプスでの変化が個体の機能レベルに与える影響について解析するために、幼虫を使用した行動解析を行った。その結果、*dnrx1* ヘテロ接合変異体では、DISC1 過剰発現により運動速度の有意な低下が起きることが示された。

一方、Neurexin と DISC1 との遺伝学的相互作用をさらに解析するために、Neurexin に対する後シナプスにおける接着パートナーであり、Neurexin とともにシナプスの形成と可塑性を制御することが知られている Neuroligin (NLG1) についても解析を行った。ショウジョウバエ Neuroligin 相同遺伝子である *dnlgl* ヘテロ接合変異体において DISC1 を発現させ、シナプス形成過程における影響を検討した。その結果、野生型で観察される DISC1 強制発現による神経筋接合部シナプス総面積の減少が、*dnlgl* ヘテロ接合変異体ではさらに促進されることが明らかとなった。

##### FMR1 遺伝子との遺伝学的相互作用解析

さらに自閉症及び精神遅滞のリスク遺伝子と DISC1 遺伝子との相互作用を検討するために、RNA 結合タンパクをコードし、多数のシナプス遺伝子の発現を制御することが知られている FMR1 について解析を行った。興味あることに、これまでに記載されている DISC1 結合タンパクの多くが FMR1 標的因子と重複しており、両遺伝子が分子レベルで相互作用していることが予想された。ショウジョウバエ神経筋結合部を使用した解析により、DISC1 過剰発現が野生型背景ではシナプス面積を減少させるが、FMR1 変異体背景ではシナプス面積は変化せず、代わってシナプスブトン数が優位に減少することが明らかとなった。

さらに、グルタミン酸受容体を始めとする FMR1 標的因子について、シナプス形成過程に於けるタンパク質発現レベルと局在の変化を、免疫組織学的手法と分子生物学的手法により体系的に解析し、DISC1 により誘起されるシナプス細胞の分子応答が、FMR1 の活性レベルによりどのように修飾されるか検討した。その結果、ショウジョウバエ FMR1 遺伝子の変異体で、DISC1 過剰発現が前シナプス活性部位の密度を有意に増加させることが示された。加えて、DISC1 過剰発現が後シナプスにおけるグルタミン酸受容体 DGLURIIIA と微小管結合タンパク質 FUTSCH の発現レベルを FMR1 と強調して制御することが示された。

DISC1 遺伝子と自閉症関連遺伝子 Neurexin 及び FMR1 がシナプス形成過程において相互作用することは、統合失調症のシナプス仮説を支持すると共に、臨床的に異なる二つの精神疾患に共通の分子メカニズムが存在することを示唆している。我々は、ショウジョウバエ脳における DISC1 強制発現が睡眠・覚醒状態を攪乱するとともに、連合学習を阻害することをこれまでに明らかにしている (Sawamura et al., Mol. Psychiatry 2008; Furukubo-Tokunaga, Prog. Brain Res., 2009; Furukubo-Tokunaga et al., Mol. Psychiatry 2016)。統合失調症の発症機序のさらなる理解ためには、シナプス形成過程での解析に加えて、高次行動レベルでのリスク遺伝子間の相互作用の解析が必要と考えられる。また、本研究課題において同定した相互作用遺伝子について、患者由来の iPS 細胞を使用した解析等によるヒト神経系における相互作用の解析を推進することが今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pandey Himani, Bourahmoune Katia, Honda Takato, Honjo Ken, Kurita Kazuki, Sato Tomohito, Sawa Akira, Furukubo-Tokunaga Katsuo	4. 巻 3
2. 論文標題 Genetic interaction of DISC1 and Neurexin in the development of fruit fly glutamatergic synapses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 npj Schizophrenia	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41537-017-0040-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Hashimoto, K., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in Drosophila nociception.
3. 学会等名 International Workshop on Frontiers in Defensive Survival Circuit Research（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oikawa I, Kondo S, Kashiwabara A, Tanimoto H, Furukubo-Tokunaga K and Honjo K
2. 発表標題 An evolutionarily conserved neuropeptide pathway that negatively regulates nociception in Drosophila.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 合同大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in Drosophila nociception.
3. 学会等名 The 48th Naito Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato, T., Honjo, K., Sakai, T., Furukubo-Tokunaga, K.
2. 発表標題 Innate Escape Behavior Induced by Activation of Dopaminergic Neurons Relevant to Punishment System in Drosophila.
3. 学会等名 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K., Honjo, K.
2. 発表標題 An Evolutionarily Conserved Neuropeptide Pathway that Negatively Regulates Nociception in Drosophila.
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K., Honjo, K.
2. 発表標題 An Evolutionarily Conserved Neuropeptide Pathway that Negatively Regulates Nociception in Drosophila.
3. 学会等名 11th Japan China Korea Graduate Student Forum (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Himani Pandey, Katia Bourahmoune, Kazuki Kurita, Akira Sawa and Katsuo Furukubo-Tokunaga
2. 発表標題 Genetic interaction of DISC1 and Neurexin in the development of fruit fly glutamatergic synapses
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Furukubo-Tokunaga Laboratory  
[http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~tokunaga/Furukubo-Tokunaga\\_Lab/Preface.html](http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~tokunaga/Furukubo-Tokunaga_Lab/Preface.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----