

機関番号：83902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790106

研究課題名（和文） 統合失調症関連分子 dysbindin-1 の性状機能解析

研究課題名（英文） Biochemical and cell biological characterization of dysbindin-1.

研究代表者

伊東 秀記 (ITO HIDENORI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員

研究者番号：40311443

研究成果の概要（和文）：神経系組織における機能が未解明である統合失調症関連分子 dysbindin-1 の機能解析を行った。特異抗体を用いた蛍光抗体染色法により、dysbindin-1 は初代培養海馬神経細胞のスパインに局在することを明らかにした。また、dysbindin-1 を RNAi 法により発現抑制すると、海馬神経細胞の樹状突起スパインの成熟が異常となることを見いだした。この dysbindin-1 によるスパイン形成制御の分子機構を明らかにするため、dysbindin-1 結合分子を探索し、アクチン細胞骨格を制御する WAVE2 を結合分子として見いだした。さらに、dysbindin-1 は、WAVE2 の活性化に重要な Abi-1 と結合し、WAVE2/Abi-1 複合体形成を促進することがわかった。これらのことから、dysbindin-1 は WAVE2/Abi-1 複合体と協調して、樹状突起スパイン形成を制御していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We attempted to clarify physiological roles of dysbindin-1, a schizophrenia-related molecule, in nervous tissues. From immunofluorescence analysis, we found that dysbindin-1 localized at dendritic spines in primary cultured rat hippocampal neurons. RNAi-mediated dysbindin-1 knockdown led to the generation of abnormally elongated immature dendritic protrusions. We identified WAVE2 as a binding partner for dysbindin-1. We also found that Abi-1, a binding molecule for WAVE2 involved in spine development, interacts with dysbindin-1. While dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 formed ternary complex, dysbindin-1 promoted the WAVE2/Abi-1 complex formation. These results indicate possible roles of dysbindin-1 in the regulation of dendritic spine morphogenesis through the interaction with WAVE2 and Abi-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,400,000	480,000	1,880,000
2011年度	200,000	0	200,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：統合失調症、ニューロン、スパイン

1. 研究開始当初の背景  
統合失調症は、思春期から青年期にかけて約1%の高率で発症し慢性化しやすい重大な

疾患である。発症要因に関しては不明な点が多いが、薬理的な解析から、ドーパミンやグルタミン酸伝達系障害が病因であるとす

る神経伝達障害仮説や、胎生期や周生期における神経回路網の発達異常が病因であるとする神経発達障害仮説などが提唱されている。近年、発症リスクを高める脆弱性因子の検索が精力的になされ、これまでに dysbindin-1、DISC1、neuregulin などの遺伝子変異が報告されており、病態との関連を明らかにすることが期待されている。このうち dysbindin-1 は、筋ジストロフィーの病態と関連する dystrobrevin と結合する分子として見いだされ、神経細胞からの神経伝達物質放出を制御することが報告されていたが、神経発達における機能はほとんどわかっていなかった。以上のような経緯から、dysbindin-1 の神経発達における機能を明らかにすることで、統合失調症発症の分子機構の一端を解明できるのではないかと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

### (1) Dysbindin-1 の生化学的および組織化学的性状解析

組織における dysbindin-1 の発現分布や、発達に伴う発現変化などの生化学的性質については不明な点が多い。そこで、特異抗体を用いて、ラット組織における dysbindin-1 の性状を生化学的に解析する。また、ラット脳切片を用いた免疫組織染色を行い、dysbindin-1 の局在を形態学的に解析する。さらに、蛍光抗体法により初代培養ラット海馬神経細胞における局在を細胞生物学的手法により明らかにする。

### (2) 神経細胞における dysbindin-1 の機能解析

これまでに、dysbindin-1 はシナプスに局在するという報告があるが、詳細については不明な点が多い。そこで、dysbindin-1 のシナプス形成における機能を細胞生物学的手法により解析する。また、dysbindin-1 の生理機能の分子基盤を明らかにするため、結合分子の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) Dysbindin-1 の生化学的および組織化学的性状解析

#### ①Dysbindin-1 の生化学的性状解析

成獣ラット全身の様々な臓器を摘出し、蛋白質抽出液を作製し、特異抗体を用いたウェスタンブロット法により、dysbindin-1 の分布を解析した。また、胎生期から生後発達期のラット脳における dysbindin-1 の発現変化を同様に解析した。さらに、成獣ラット脳を用いた大脳分画を行い、dysbindin-1 の分布をウェスタンブロット法により解析した。

#### ②Dysbindin-1 の組織化学的性状解析

成獣ラット脳組織切片を、抗 dysbindin-1 抗体により染色し、dysbindin-1 の局在を形態学的に解析した。また、胎生 18.5 日ラットより海馬神経細胞を分離培養し、培養 21 日

後に固定し、蛍光抗体法により dysbindin-1 の局在を細胞生物学的に解析した。

### (2) 神経細胞における dysbindin-1 の機能解析

#### ①樹状突起スパイン形成における

#### dysbindin-1 の機能解析

培養 10 日後の海馬神経細胞に GFP 発現ベクターおよび dysbindin-1 RNAi ベクターを遺伝子導入し、さらに培養を 4 日間続けた後に細胞を固定し抗 GFP 抗体により免疫染色し、樹状突起スパイン形態を解析した。

#### ②新規 dysbindin-1 結合分子の探索と機能解析

蛋白質間相互作用データベースを用いて dysbindin-1 結合分子の同定を行った。そして、哺乳動物培養細胞過剰発現系を用いた免疫沈降法により dysbindin-1 と結合分子の複合体形成を検討した。Dysbindin-1 の様々な領域を含む変異体を作製し、同様に免疫沈降を行い、結合領域を決定した。また、ラット脳抽出液を用いて抗 dysbindin-1 抗体により免疫沈降を行い、内在性分子の複合体形成を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Dysbindin-1 の生化学的および組織化学的性状解析

#### ①Dysbindin-1 の生化学的性状解析

ラット全身臓器における dysbindin-1 の発現分布を検討したところ、大脳、小脳などの神経組織を含む広範な組織において分子量 50kDa 程度の分子の発現が認められた。一方、分子量 40kDa 程度の分子は、脳組織でのみ観察された。ラット脳の発達における dysbindin-1 の発現変化を検討したところ、胎生期では分子量 50kDa の分子が発現しており、発達に伴い 40kDa の分子が増加してることがわかった。大脳分画を行ったところ、dysbindin-1 は、シナプトソームおよび PSD 分画に存在することがわかった。

#### ②Dysbindin-1 の組織化学的性状解析

ラット脳切片を用いた免疫組織染色により、dysbindin-1 は、大脳皮質神経細胞、海馬神経細胞および小脳プルキンエ細胞に存在することがわかった。初代培養ラット海馬神経細胞における dysbindin-1 の局在を蛍光抗体法により検討したところ、樹状突起スパインにおける局在が認められた (図 1)。

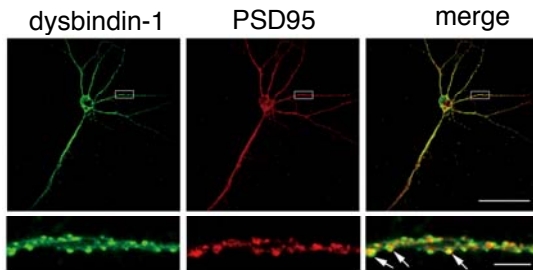


図1 樹状突起スパインにおける dysbindin-1 の局在

(2) 神経細胞における dysbindin-1 の機能解析

① 樹状突起スパイン形成における dysbindin-1 の機能解析

初代培養ラット海馬神経細胞を用いて、dysbindin-1 を RNAi 法によりノックダウンしたところ、異常に伸長した未成熟な樹状突起スパインが増加することがわかった (図2)。ノックダウン耐性の dysbindin-1 遺伝子を共発現させると、このスパイン形成異常は正常範囲にまで回復した (図2)。これらのことから、dysbindin-1 は樹状突起スパインの発達において重要な役割を果たしていると考えられた。

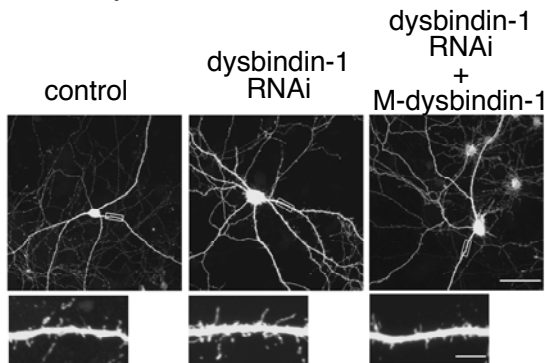


図2 dysbindin-1 のノックダウンによるスパイン形成異常

② 新規 dysbindin-1 結合分子の探索と機能解析

蛋白質間相互作用データベースを用いて dysbindin-1 結合分子の同定を行ったところ、アクチン細胞骨格を制御し、細胞伸展や細胞運動を制御することが知られている WAVE2 を見いだした。この WAVE2 と dysbindin-1 の結合は、網羅的解析により見いだされたものであり、解析が進められていなかった。そこで、COS7 細胞に遺伝子導入により dysbindin-1 と WAVE2 を一過性に発現させ、抗 dysbindin-1 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、WAVE2 と dysbindin-1 の結合が確認できた。各種の変異体を作製し、WAVE2 と dysbindin-1 の結合領域を検討したところ、dysbindin-1 の coiled-coil ドメインを含む N 末端側の領

域と WAVE2 の WHD ドメインが相互作用することがわかった。WAVE2 の細胞膜への移行と活性化には Abi-1 との結合が重要であることが知られているが、dysbindin-1 は、この Abi-1 と coiled-coil 領域を介して相互作用することがわかった。さらに、dysbindin-1 は、WAVE2/Abi-1 複合体形成を促進することが明らかとなった。これらのことから、dysbindin-1 は、WAVE2/Abi-1 複合体と協調して神経細胞の樹状突起スパイン形成を制御していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① 伊東秀記, 永田浩一. (2011) 統合失調症脆弱性遺伝子産物 Dysbindin-1 の機能-病態との関連性. 日本神経精神薬理学雑誌. 31:35-40. (査読無)

② Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata KI. (2010) Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Mol Psychiatry*. 15:976-986. (査読有)

DOI: 10.1038/mp.2010.69

③ Shinoda T, Ito H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Nagata KI. (2010) Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4. *Mol Biol Cell*. 21:1324-1334. (査読有) DOI: 10.1091/mbc.E09-10-0869

④ Nagata K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T. (2009) Interaction of a multi-domain adaptor protein, vinexin, with a Rho-effector, Rhotekin. *Med Mol Morphol*. 42:9-15. (査読有)

DOI: 10.1007/s00795-008-0433-8

[学会発表] (計12件)

① 伊東秀記, 森下理香, 西村嘉晃, 篠田友靖, 岩本郁子, 永田浩一: Functional analysis of dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine formation. 米国細胞生物学会 (デンバー) 2011.12.6.

② 伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 岩本郁子, 須藤香織, 岡本賢一, 永田浩一: Dysbindin-1, a schizophrenia risk factor, regulates dendritic spine formation: Evidence supporting neurodevelopmental hypothesis. 米国細胞生物学会 (フィラデルフィア) 2010.12.14.

③ 篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 貝淵弘三, 永田浩一: Molecular mechanism of Septin-mediated migration

of cortical neurons. BMB2010 (神戸)  
2010.12.8.

- ④伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織,  
岩本郁子, 永田浩一: Biochemical and  
histological characterization of  
MAGI-1 in rat nervous tissues. BMB2010  
(神戸) 2010.12.7.
- ⑤篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子,  
森下理香, 永田浩一: Septin の大脳皮質  
形成における機能およびその分子メカニ  
ズム. Neuro2010 (神戸) 2010.9.3.
- ⑥伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織,  
岩本郁子, 永田浩一: Dysbindin-1 は  
WAVE2/Abi-1 複合体形成を介して神経細  
胞の樹状突起形態を制御する. Neuro2010  
(神戸) 2010.9.2.
- ⑦伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織,  
岩本郁子, 永田浩一: Dysbindin-1, WAVE2  
and Abi-1 form a complex that regulates  
the dendritic spine formation. 名古屋  
大学グローバル COE プログラム第2回国  
際シンポジウム (名古屋) 2009.11.27.
- ⑧篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子,  
森下理香, 岡本賢一, 永田浩一: 大脳皮質  
形成におけるセプチンの役割. 日本生化学  
会大会 (神戸) 2009.10.24
- ⑨伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 須藤香織,  
岩本郁子, 永田浩一: Dysbindin-1 による  
WAVE2/Abi-1 複合体を介したスパイン形  
態制御. 日本生化学会大会 (神戸)  
2009.10.24.
- ⑩篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子,  
森下理香, 永田浩一: Sept14 の大脳皮質  
形成における機能. 日本神経科学大会 (名  
古屋) 2009.9.16.
- ⑪伊東秀記, 森下理香, 篠田友靖, 岩本郁子,  
須藤香織, 岡本賢一, 永田浩一:  
Dysbindin-1 による海馬神経細胞の樹状  
突起形態制御. 日本神経化学会大会 (群  
馬) 2009.6.24.
- ⑫篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子,  
森下理香, 岡本賢一, 永田浩一: 大脳皮質  
発生におけるセプチンの機能. 日本神経化  
学会大会 (群馬) 2009.6.22.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 秀記 (ITO HIDENORI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究

所・神経制御学部・主任研究員  
研究者番号: 40311443

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし