

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23700443

研究課題名（和文）

DISC1/Neuregulin-1の細胞内輸送機構と統合失調症

研究課題名（英文）

Intracellular transport of DISC1/Neuregulin-1 and schizophrenia

研究代表者

森 大輔 (Mori Daisuke)

名古屋大学・医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：00381997

研究成果の概要（和文）：

本研究は、統合失調症発症脆弱性因子である DISC1、Neuregulin-1 に焦点を当て、その生理機能や分子間ネットワークを解明することにより、統合失調症の分子病態を理解することを目的としたものである。DISC1 による Neuregulin-1 の細胞内輸送機構を明らかにするために、DISC1 結合分子の網羅的なスクリーニングを行った。その結果、AP ファミリーなどの小胞輸送制御に関与する分子が複数同定された。また、Neuregulin-1 の分泌量を培養神経細胞で定量できる実験系を確立し、DISC1 依存的に Neuregulin-1 の分泌量が減少していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that DISC1 would be involved in vesicular transport of various proteins and mRNAs which maintain neuronal function. Previously, we have identified direct interaction of DISC1 and Neuregulin-1, which is a ligand of ErbB3 and ErbB4. To understand the sense of their association, we have attempted to analyze their common interacting proteins. As a result of the comprehensive screenings, we have identified AP family proteins, which have essential roles for intracellular vesicle trafficking. Moreover, we have established a new experimental system that enables us to quantify the secretion of processed Neuregulin-1 by immunoblotting. We found that the processed Neuregulin-1 was decreased in cultured hippocampal neuron from DISC1-deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学

キーワード：分子・細胞・神経生物学

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は世界人口の約 1%が罹患する重篤な精神神経疾患である。青年期に発症することが多いが、その発症機序はよく分かっていない。統合失調症患者の多くには、神経発達（神経細胞の移動、軸索形成、シナプス形成等）に何らかの障害があり、環境因子（周産期のウイルス感染など）が加わって発症脆

弱性が生じ、その後のストレス等で発症するという説が有力である(Weinburger, et al., Mol Psychiatry,2005)。

遺伝子解析により、有力な発症脆弱性因子として、DISC1、Neuregulin-1、Dysbindin などが見つかっている。しかし、統合失調症は多重遺伝因子疾患であり、遺伝子間の有機的な関連性はほとんど不明である。

Neuregulin-1 は EGF ファミリーの成長因子で、ErbB3/4 受容体を介して神経の分化、成長、シナプス形成に関与している。また、DISC1 はスコットランドの統合失調症を頻発する家系から責任遺伝子として報告された。その後の研究で DISC1 は神経細胞の遊走、軸索形成、シナプス形成に関与することが分かっている。

DISC1 の結合分子としては、NDEL1/LIS1 複合体、FEZ1、GSK-3 $\beta$ 、Kinesin-1 モーターなどがすでに報告されている(Korth et.al, Rev Neurosci.,2009)。NDEL1/LIS1 複合体は滑脳症の責任遺伝子であり、細胞質ダイニンと結合して神経細胞の遊走を制御し、大脳皮質の層構造の形成に重要なはたらきをする(Sasaki et al., 2005, Mol.Cell.Biol.)。

DISC1 は NDEL1/LIS1 複合体と相互作用し、Kinesin-1 との結合を仲介する積み荷受容体としてはたらく。その結果、NDEL1/LIS1 複合体の軸索内輸送を制御し、軸索伸長を促進させる(Taya et al., 2007, J. Neurosci.)。一方、私は、有糸分裂調節キナーゼである CDK5/CDK1 および Aurora-A が NDEL1 をリン酸化し、微小管重合を調節することで、神経細胞の軸索伸長を促進することを明らかにしてきた(Mori et al., 2007, Mol.Cell.Biol.; Toyooka et al., J.Cell.Biol., 2008; Mori et al.,2009, Nat.Cell.Biol.; 森大輔, 2009細胞工学12月号)。

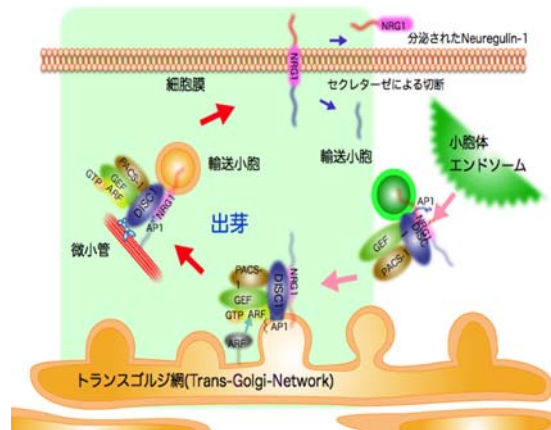
以上のような経過から、私は DISC1 と NDEL1 は軸索内輸送において密接な関係があることに興味を持ち、DISC1 の機能解析を開始した。アフィニティクロマトグラフィーによって DISC1 の結合分子の探索を行い、NDEL1/LIS1 複合体、Kinesin-1 モーター複合体、Neuregulin-1 といった神経回路の形成に必要な因子、PACS-1、AP-1、AP-3 といった小胞輸送を制御する蛋白質群などを同定した。

Neuregulin-1 は細胞膜およびゴルジ体膜上で、特異的セクレターゼによるプロセッシングを受け成長因子として機能する。Neuregulin-1 の細胞膜への輸送プロセスは神経細胞の分化と成熟において極めて重要である。図 1 は、DISC1 の機能に関するモデル仮説を示す。

## 2. 研究の目的

Neuregulin-1 の細胞膜への輸送プロセスは、プロセッシングを受けたのちに ErbB 経路を活性化するリガンドとして機能するため、神経細胞の成熟とシナプス形成において極めて重要である。私は、ゴルジ膜上で DISC1 が、前駆体型 Neuregulin-1 と選択的に直接結合し、ゴル

図 1 DISC1はNRG1の細胞膜への輸送および分泌を制御する



ジ体から細胞膜までの細胞内輸送を制御することによって、その分泌量を直接制御すると考えている。

神経発生に重要な役割を持つ DISC1 と Neureglin-1 が、分泌および輸送制御というところで、機能的な分子間ネットワークを形成することを初めて示唆するものである。本研究では、DISC1 が制御する Neuregulin-1 の細胞内輸送機構を、生化学的、細胞生物学的な手法で明らかにすることにより、統合失調症の診断や治療への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) DISC1 および NRG1 前駆体の神経細胞における局在

我々は、DISC1 の生物学的な機能を明らかにするために、DISC1 ノックアウトマウスと DISC1 の特異的抗体を作成した(黒田ら、Human Molecular Genetics, 2011)。その結果、DISC1 は発生時の海馬などで強い発現が見られることがわかった。また、神経培養細胞においては、ゴルジ体マーカーと相関の高い局在が観察された。

さらに、DISC1 のゴルジ体での機能を調べるために、ゴルジ体のどの領域に存在しているかを調べるために、種々のマーカーを用いて共免疫染色をおこなった。

前駆体の NRG1 の局在についてはほとんど分かっていない。タンパク質構造は、1 回あるいは 2 回膜貫通型の成長因子であり、そのエンドサイトーシスにはゴルジ体を起点とする輸送、分泌経路があると考えた。NRG1 全長 cDNA を GFP と融合した発現ベクターを作成し、その局在を培養神経細胞にて観察した。

## (2) DISC1 および Neuregulin-1 複合体に結合する分子の検索

DISC1 および Neuregulin-1 がゴルジ体、特にトランスゴルジ網に濃縮することは、前述の免疫染色の実験によって示唆された。

さらに、生化学的に細胞内小器官を分画することによって、ゴルジ体成分を濃縮したところ、DISC1 および Neuregulin-1 の濃縮が確認できている。

我々の研究機関では、高精度および高感度な LC-MS/MS 装置(LTQ-Orbitrap)が導入され、同様の結合分子の同定実験が幅広く行われて目覚ましい成果を挙げているため、本研究課題においても成果が期待できる。

DISC1/Neuregulin-1 の小胞輸送経路がどのような分子群によって行われているかを推測するために結合分子を網羅的プロテオミクス的手法によりスクリーニングした。そして、機能的に有力なものから、DISC1 との直接の分子間相互作用を解析した。

## (3) 分泌型 Neuregulin-1 の直接的な定量を可能にするプラスミドベクターの開発

前駆体型 Neuregulin-1 の適切なプロセッシングの調節機構を解析するために、細胞外分泌量を定量する系を確立した。細胞内局在と分泌量が同時に検出できるように、Neuregulin-1 遺伝子の細胞外領域に V5 タグ配列を、細胞内領域の C 末端側に FLAG タグ配列を挿入したプラスミドベクターを製作した。

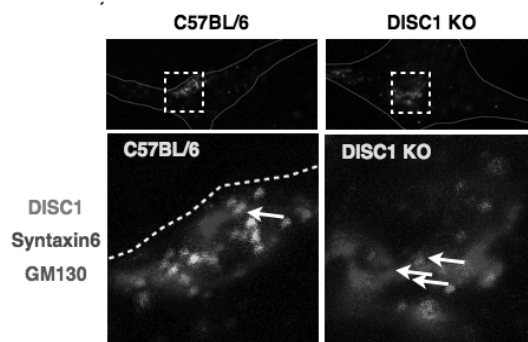
そのベクターを培養神経細胞に導入し、培養上清に含まれる Neuregulin-1 をウェスタンブロット法により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) DISC1 および NRG1 前駆体の神経細胞における局在

我々は、出生前のマウス胎児から海馬を単離し、培養神経細胞を作成した。その細胞を用いて DISC1 の免疫染色をしたところ、ゴルジ体に局在が観察された。いろいろなゴルジ体マーカーと共局在を調べたところ、Syntaxin6 や VAMP7 などのトランスゴルジ網および小胞のマーカーと一部共局在が見られたところから、DISC1 はトランスゴルジ網に局在していることが明らかになった(図 2)。NRG1 前駆体に関しては、抗体による免疫染色は成功しなかった。しかし、GFP 融合前駆体型 NRG1 遺伝子の発現解析により、前駆体型 NRG1 はゴルジ体に局在し、さらに、小胞として出芽する小胞として機能することが示唆された。

## 図2 DISC1はトランスゴルジ網にある



### (2) DISC1 および Neuregulin-1 複合体に結合する分子の検索

筆者らは、DISC1 と前駆体型 Neuregulin-1 は分子間相互作用することを発見した。また、DISC1 は細胞内ではゴルジ体に強く局在し、前駆体型 Neuregulin-1 はゴルジ体からベジクルを形成して細胞膜へと輸送されると考えられる。このプロセスに DISC1 が関与していると推測されるが、その分子機構を解明するために、DISC1 分子、Neuregulin1 分子についてそれぞれアフィニティクロマトグラフィーを行い、網羅的に結合分子をスクリーニングした。その結果、DISC1 と Neuregulin-1 の細胞内小胞輸送に関与する、共通のアダプタータンパク質の同定に成功した。その結果、PACS-1、AP-1、AP-3 といった小胞輸送を制御する蛋白質群などを同定した。

### (3) 分泌型 Neuregulin-1 の直接的な定量を可能にするプラスミドベクターの開発

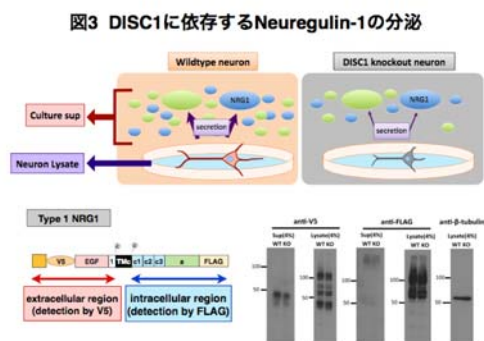
DISC1 ノックアウトマウス由来の神経細胞の培養上清に分泌された Neuregulin-1 は、野生型の神経細胞の場合と比較して、有意に減少していた。さらに、定量的な精度を高めるために、ゴルジ体を起点とする成長因子の出芽・輸送の同調を可能にする実験系の開発を試み、実用化することに成功した(図 3)。この方法は、1 回膜貫通型の構造を持つ分泌因子の前駆体に広く利用できる方法であると考えている。

以上の実験から、厳密に制御された分泌因子の定量法の確立により、DISC1 は Neuregulin-1 の分泌量を直接制御することを明らかにした。またこの研究は、DISC1 と Neuregulin-1 が機能的な分子間ネットワークを形成していることを初めて示唆するもの

である。

Neuregulin-1 は ERBB シグナル経路のリガンドであるため、神経細胞の成熟とシナプス形成において極めて重要である。その上流で、DISC1 が Neuregulin-1 の分泌量を正常に制御することは、神経細胞の成熟とシナプス形成において重要であると考えられる。

統合失調症の発症脆弱性の原因は細胞内の広範囲の異常により生じると思われるが、ゴルジ体からの輸送異常がその一員である



と考え、その分子機構を明らかにして疾患の治療に役立てたいと考えている。

## 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 1 件)

黒田啓介、森大輔、貝淵弘三 他 21 名  
Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene in the mouse  
Human Molecular Genetics 誌  
査読有

2011 年 9 月

20 巻、頁 4666-4683

[学会発表] (計 1 件)

森大輔、貝淵弘三

Molecular regulation of pro-Neuregulin intracellular trafficking

ニューレグリン前駆体の細胞内輸送機構

ポスター演題

日本神経科学会

2012 年 9 月 18 日、名古屋国際会議場

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 大輔 (Mori Daisuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任講師

研究者番号：00381997

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし