

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700377

研究課題名(和文)統合失調症発症関連因子DISC1と結合するmRNAの網羅的同定と機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of DISC1 using Disc1-knockout mouse

研究代表者

坪井 大輔(Tsuboi, Daisuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80584672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DISC1は有力な統合失調症発症関連分子である。しかしながら、DISC1が関わる分子病態は理解されていない。申請者はDISC1がITPR1カルシウムチャネルなどのシナプス制御タンパク質をコードするmRNAと直接結合すること、その結果、樹状突起においてmRNAのシナプスへの輸送を制御していることを明らかにした。そして、DISC1とmRNAの結合がシナプスの長期増強(Long-term potentiation; LTP)に必要なことを見出した。これらの結果は、DISC1がmRNA結合タンパク質として働き、特定のmRNAをシナプスへ輸送することで、シナプスの伝達効率を制御していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a devastating psychiatric disorder affecting 1% of the population worldwide. The DISC1 gene locus was originally identified at the breakpoint of a balanced (1;11)(q42;q14) chromosome translocation that co-segregates with schizophrenia, bipolar disorder, and recurrent major depression in a large Scottish family. Therefore, DISC1 gene is a promising susceptibility factor for schizophrenia. In the present study, using a proteomic analysis, I identified RNA-binding proteins including HZF as novel DISC1-interactors. HZF is a component of the RNA granules with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (ITPR1) mRNA, which acts as a key regulator for synaptic plasticity. DISC1 co-localized with HZF and ITPR1 mRNA in hippocampal dendrites. Furthermore, DISC1 directly associated with several mRNAs including that of ITPR1. The impairment of DISC1 function prohibited the dendritic transport of ITPR1 mRNA and caused altered synaptic plasticity

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症 神経科学 シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は世界人口のおよそ1%もの罹患率を有する重篤な精神疾患であるが、病因や病態メカニズムは殆ど明らかになっていない。これまでの統合失調症多発家系を用いた連鎖及び関連解析から、幾つかの遺伝子が統合失調症発症脆弱性因子として同定されている (Harrison and Weinberger, Mol. Psychiatry, review, 2005)。Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) は最もよく解析されている統合失調症発症脆弱性因子である。幾つかの研究グループにより、DISC1 は、神経突起の伸長やシナプス機能に関与していることが報告されていたが (Ozeki et al., Proc Natl Acad USA, 2003; Wang et al., Mol Psychiatry, 2010)、その分子機序は不明であった。

DISC1 の分子機序を明らかにするため、申請者らは DISC1 と相互作用する分子を探索した。アフィニティーカラムクロマトグラフィー解析により、DISC1 が kinesin-1 (微小管依存性モーター蛋白質) や軸索伸長因子 (NDEL 複合体、Grb2, Girdin) RNA 結合蛋白質(HZF)と相互作用していることを見出した。幼若神経において、DISC1 は軸索突起の先端に濃縮することで、軸索の伸長を促す。その軸索伸長メカニズムは、DISC1 が Kinesin-1 モーター分子と NDEL 複合体や Grb2 を繋ぐアダプター分子として働き、これらの軸索伸長因子を軸索先端へと輸送することであった。(Taya et al., J Neurosci., 2007; Shinoda et al., J Neurosci., 2007; Enomoto et al., Neuron, 2009)。しかしながら、DISC1 と輸送される蛋白質との結合がどのように制御されているかは分かっていない。成熟神経では、DISC1 が樹状突起に局在することで、シナプス形成、成熟、可塑性に関与していることを、他の研究グループ (Hayashi-Takagi et al., Nat Neurosci., 2009)や申請者は見出していた。さらに HZF

は、IP3 受容体(ITPR1/IP3R1: シナプス可塑性に関わるカルシウムチャネル)をコードする mRNA の樹状突起局在に参与していることが報告されていた(Iijima et al., Proc Natl Acad USA, 2005)。これまでに申請者は、DISC1 が HZF と協調して、ITPR1 mRNA の輸送や翻訳に関与することを明らかにした(図1)。しかしながら、DISC1 による RNA 輸送制御機構は明らかになっていない。

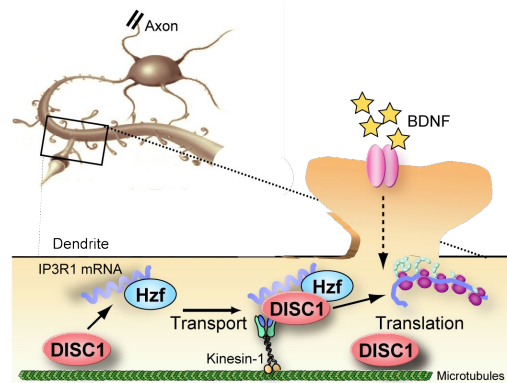


図1 成熟神経における DISC1 機能モデル
DISC1 は HZF-ITPR1 (IP3R1 と表記) mRNA 複合体と kinesin-1 とを繋ぐアダプター分子として RNA 輸送に関与する。神経栄養因子 BDNF 刺激による DISC1 蛋白質-ITPR1 mRNA 複合体の結合制御が、ITPR1 の局所

2. 研究の目的

申請者は DISC1 が関わる mRNA の輸送、及び翻訳制御機構の生理的意義とその分子メカニズムを解明するため、以下の解析を試みる。

(1) DISC1 と結合する mRNA の網羅的同定

これまで申請者は、DISC1 が ITPR1 (IP3R1 の別名) mRNA と直接結合することを見出している。RNA 結合蛋白質は、標的となる RNA の配列や立体構造を認識することで、特定の RNA と結合することが知られている。RNA 結合蛋白質の機能や RNA 結合の制御機構を解明する上で、結合 RNA の同定は重要な手掛かりとなる。

本研究において、DISC1 と相互作用する mRNA を網羅的に同定することで、DISC1 がどのような mRNA との結合を介してシナプス機能制御に関わっているかを解明する。

(2) DISC1 ノックアウトマウスを用いた RNA 輸送・翻訳機構メカニズムの解明

mRNA の輸送や翻訳制御機構は、神経シナプスの可塑性に重要な役割を果たしていることが知られている。申請者らは、DISC1 ノックアウトマウスを用いた電気生理学的解析から、海馬歯状回におけるシナプス伝達の長期増強 (LTP: Long-term synaptic potentiation) に DISC1 が関与していることを示した(Kuroda et al., Hum Mol Genet., 2011)。そこで申請者は、DISC1 の mRNA 輸送・翻訳制御機構の解明と DISC1 が関わる mRNA 制御の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) DISC1 と結合する mRNA の網羅的特定

申請者は、成体マウス脳可溶化物からの DISC1 免疫沈降実験を行った。DISC1 免疫沈降産物中の RNA は RNA 特異的検出キット (Quant-iT RiboGreen RNA detection kit, Invitrogen) を用いて確認した。共沈 RNA の確認後、申請者はコントロール IgG および DISC1 抗体を用いた免疫沈降産物からグアニジン塩により RNA を精製した。それぞれの精製 RNA に含まれる mRNA 量を定量するため、遺伝子特異的プライマーを用いた定量 PCR を行った。定量対象の mRNA に対する Ct 値をコントロール IgG に対して標準化 (DISC1-IP: RNA / コントロール IgG IP: RNA) をすることで、DISC1 免疫沈降による各 mRNA の濃縮度を評価した。

多くの mRNA 結合タンパク質は mRNA の 3'UTR (非翻訳領域) と直接結合することが知られている。そこで申請者は当該遺伝子の mRNA-3'UTR を単離、合成した。そして、定量 PCR で 2 倍以上の mRNA 濃縮度を示した遺伝子について、DISC1 と直接結合するかどうかについて検証するため、合成した 3'UTR RNA とリコンビナント DISC1 タンパ

ク質を用いて in vitro 結合実験を行った。また、DISC1 の mRNA 結合コンセンサス配列を予測するため、直接結合した 3'UTR RNA に対して配列アライメント解析を行った。

(2) DISC1 ノックアウトマウスを用いた RNA 輸送・翻訳機構メカニズムの解明

申請者は DISC1 がどのようにして結合 mRNA の細胞内輸送に関与しているかについて明らかにするため、DISC1 遺伝子ノックアウトマウス (DISC1 ^{-/-}マウス) を用いて mRNA 局在解析を行った。ITPR1 mRNA の局在解析に関しては、GFP を利用した RNA 可視化ツール (GFP-MS2 tagging construct, Bertrand et al., Mol Cell, 1998; Bannai et al., JBC, 2004) を本実験に採用した。さらに申請者は DISC1 と RNA が直接結合する領域を決定するため、様々な DISC1 サブフラグメントを用いて in vitro RNA 結合実験を行った。DISC1 の RNA 結合部位を決定後、RNA 結合能欠損 DISC1 変異体を作成した。申請者は ITPR1 mRNA 局在における DISC1-RNA 相互作用の必要性を評価するため、*Disc1*^{-/-}マウスに対して野生型 DISC1 および DISC1 変異体によるレスキュー実験を行った。

生化学的あるいは免疫組織化学的手法では経時的な蛋白質合成過程を解析することが困難であったが、既報の GFP を用いた翻訳リポート遺伝子を用いることで、局所蛋白質合成のタイムラプス解析が可能となっている (Akalu et al., Neuron, 2001)。申請者はこのリポーター遺伝子を改変し、培養海馬神経細胞において ITPR1 の局所翻訳の可視化した。そして、野生型および DISC1 ノックアウトマウス由来の神経細胞を用いて ITPR1 mRNA からのタンパク質翻訳をタイムラプス観察した (図 2)。

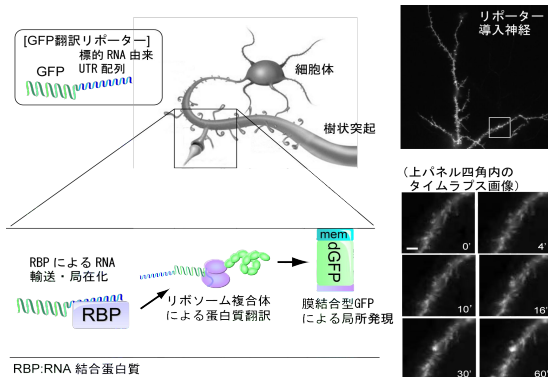


図2 ITPR1の局所蛋白質合成
 (A) ITPR1非翻訳領域とGFPを融合させたGFP翻訳リポーター遺伝子の蛋白質合成メカニズム。
 (B) GFP翻訳リポーターの蛍光発現。BDNF刺激後、樹状突起において局所的なGFP発現が認められた。

4. 研究成果

(1) DISC1と結合するmRNAの網羅的同定

申請者は、抗DISC1抗体を用いて成体マウス脳可溶化物からの免疫沈降した後、共沈RNAを用いた定量PCRを行った。40種類のシナプス機能制御遺伝子に対してDISC1免疫沈降産物への濃縮度を定量したところ、IP3受容体(ITPR1)やRho活性化制御分子(Kalrn)、電位依存性イオンチャネルサブユニット(CACNA1C, CACNA2D1, CACNA2D2, CACNA2D3, KCNC1, KCNC4)をコードするmRNAがコントロールIgG免疫沈降産物に比べて、2倍以上濃縮することが分かった(図3)。

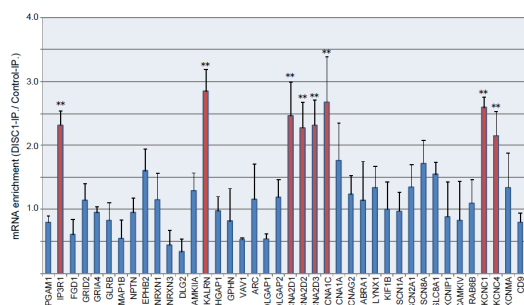


図3 抗DISC1抗体を用いたRIP解析。DISC1免疫沈降産物由来の共沈RNAに対して40種類の遺伝子特異的プライマーを用いて定量PCRを行った。ダブルアスタリスクはコントロールIgG免疫沈降産物に対して2倍以上mRNAが濃縮した遺伝子を示す。

さらに申請者は、同定mRNAsとDISC1

の相互作用を検討するため、in vitro RNA結合実験を行った。上記のmRNAの3'UTRはリコンビナントDISC1タンパク質と直接結合していることを見出した。これらの解析から申請者はITPR1 mRNA以外にシナプス制御に関わるいくつかのDISC1結合mRNAを同定した。

次に申請者は同定したmRNAの3'UTR配列をアライメント解析した。しかしながら、DISC1結合mRNAについて共通のコンセンサス配列は見出せなかった。RNA結合タンパク質の標的RNAへの結合様式は配列依存的なものとRNAフォールディングに依存した構造的な場合があることが知られている。DISC1は後者の結合様式で標的RNAと相互作用しているかもしれない。

(2) DISC1ノックアウトマウスを用いたRNA輸送・翻訳機構メカニズムの解明

申請者は成体ラット脳可溶化物を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー解析により、新規のDISC1相互作用分子としてHZFなどのRNA結合タンパク質を同定した。HZFは”メッセンジャーリボヌクレオプロテイン”と呼ばれ、IP3タイプI受容体(ITPR1、またはIP3R1)mRNAと結合することでシナプスへのmRNA輸送や翻訳制御に関わっていることが報告されている。

ITPR1はシナプス可塑性制御に重要な役割を担う細胞内カルシウムチャネルとして知られている。申請者はDISC1がHZFとともにITPR1 mRNAと結合するRNA結合タンパク質であることを見出した。神経細胞においてDISC1はシナプス近傍や微小管上に局在し、樹状突起においてHZFやITPR1 mRNAと共局在していた。野生型マウスと比べDisc1^{-/-}マウスではITPR1 mRNAの樹状突起局在に異常が認められた。申請者らはDISC1によるITPR1 mRNA局在化機構を明らかにするため、DISC1のRNA結合領域の決定を行った。様々なDISC1サブフラグメ

ントと ITPR1-3'UTR RNA を用いた in vitro RNA 結合実験を行った結果、DISC1 の N 末端領域に位置する Arginine-rich motif が RNA との結合に必須であることが分かった。そこで申請者は DISC1-RNA 間相互作用の必要性を検討するため、*Disc1*^{-/-}神経細胞を用いたレスキュー実験を行った。全長の DISC1 cDNA を *Disc1*^{-/-}神経細胞に遺伝子導入したところ、*ITPR1* mRNA の樹状突起局在異常が回復した。一方で、*ITPR1* mRNA と結合できない DISC1 変異体を *Disc1*^{-/-}神経細胞に遺伝子導入しても *ITPR1* mRNA の樹状突起局在異常は回復しなかった (図 4)。

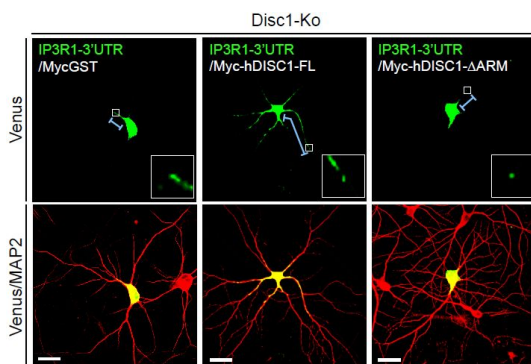


図 4 野生型および DISC1 変異体を用いたレスキュー実験
Disc1 ノックアウト神経へ Venus-ITPR1(IP3R1 と表記)-3'UTR と共に全長 DISC1(FL)や RNA 結合能欠損変異体(DISC1-ΔARM) を遺伝子導入させた。導入 2 日後、細胞体から樹状突起へ輸送された Venus-IP3R1-3'UTR の移動距離を白色バーで示す。

次に DISC1 相互作用分子として同定された HZF が DISC1-ITPR1 mRNA 複合体にどのように寄与しているかについて検討した。DISC1 や HZF を発現する細 COS7 細胞ライセートから ITPR1-3'UTR RNA をコートしたビーズを用いた RNA プルダウンアッセイを行った結果、ITPR1-3'UTR は DISC1 を共沈させた。そして、DISC1 の共沈は HZF 共発現量依存的に増加することが分かった。この結果は、HZF が DISC1-mRNA 相互作用を安定化させることを示唆していた。さらに申請者は DISC1 と HZF の相互作用が ITPR1 mRNA の樹状突起輸送に必要であることを DISC1 および HZF ドミナントネガティブ変

異体を用いて明らかにした。

申請者は研究方法の項 (図 2) で示した ITPR/IP3R1 の翻訳リポーター遺伝子を野生型および *Disc1*^{-/-}神経細胞に導入して、蛋白質翻訳における DISC1 の関与を検討した。これまでに ITPR1 は神経栄養因子 BDNF 刺激依存的に蛋白質合成されることが知られていたため、上記の遺伝子導入神経細胞に対して BDNF 刺激を行ったところ、野生型ではシナプス近傍に ITPR1 mRNA 由来の GFP 蛍光の発現が認められたが、*Disc1*^{-/-}神経細胞では発現が認められなかった。

申請者は DISC1 が関わる mRNA 輸送制御機構の生理的意義を検討するため、電気生理学的解析を行った。DISC1 と mRNA の結合を阻害する合成ペプチドをマウス海馬スライスへ導入した結果、シナプスの LTP に異常を引き起こすことが分かった。これらの結果は DISC1 が mRNA との結合を介して mRNA をシナプスへ輸送することでシナプス可塑性を制御していることを示していた。従って *Disc1*^{-/-}マウスでは mRNA 輸送が阻害されることで、外的刺激に応じたシナプスの機能可変(LTP を含む) が起こらず、適切な神経ネットワーク制御ができなくなっているものと考えられる。

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)

1. Tsuboi D, Kuroda K, Tanaka M, Namba T, Iizuka Y, Taya S, Shinoda T, Hikita T, Muraoka S, Iizuka M, Nimura A, Mizoguchi A, Shiina N, Sokabe M, Okano H, Mikoshiba K, Kaibuchi K. Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates transport of ITPR1 mRNA for synaptic plasticity. Nat Neurosci, 18:

698-707, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. 坪井大輔、統合失調症関連分子 DISC1 の分子病態メカニズム、第4回神経科学と構造生物学の融合研究会、2013.11月20日、愛知県岡崎市、生理学研究所
2. 坪井大輔、統合失調症関連分子 DISC1 の分子病態メカニズム、Neuro2013、2013.6月19~23日、京都府京都市左京区、国立京都国際会館
3. 坪井大輔、統合失調症発症関連因子 DISC1 と結合する mRNA の網羅的同定と機能解析、The 2nd Brain Diseases and Molecular Machines Conference、2013.5月27~28日、東京都港区、在日フランス大使館

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪井 大輔 (TSUBOI DAISUKE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80584672

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI KOZO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00169377