

平成 28 年 10 月 6 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791220

研究課題名(和文) ドパミン系とグルタミン酸系との調節因子DARPPのコントローラーPin1の解析

研究課題名(英文) Analysis of modulatory effects of Pin1 on DARPP-32 function.

研究代表者

日野 瑞城 (HINO, MIZUKI)

福島県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80396663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症関連因子DARPP-32はフォスファターゼ1(PP1)の脱リン酸化活性およびプロテインキナーゼA(PKA)の活性化の抑制をリン酸化依存的に行っているが、そのリン酸化レベルの調節はドパミン刺激、グルタミン酸刺激によって拮抗的に調節されている。
本研究ではDARPP-32がリン酸化依存的にPin1によってプロリン残基の異性化を受け、PP1/PKAに対する抑制活性が調節されていると予想し、リコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析を進めている。また、in silico解析により細胞内シグナルカスケードにおけるDARPP-32, Pin1が相互作用する相手の因子の探索を行った。

研究成果の概要(英文)：DARPP-32, which is thought to be involved in schizophrenia, controls the protein phosphatase (PP1) and protein kinase A (PKA) in a phosphorylation-dependent manner, and its phosphorylation level is regulated by dopaminergic and glutaminergic stimulations. .
We hypothesize that Pin1 isomerizes phosphorylated DARPP-32 and controls the inhibitory activity of DARPP-32 on PP1 and PKA. We conducted biochemical analysis to examine the hypothesis. We also made in silico analysis to predict the common binding partners of DARPP-32 and Pin1.

研究分野：精神医学

キーワード：DARPP-32 Pin1 統合失調症 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は妄想、幻覚、まとまりのない発語、ひどくまとまりのないまたは緊張病性の行動、陰性症状によって特徴づけられる精神疾患である (DSM-5)。統合失調症はあらゆる人種地域を通じて人口の 1%程度が罹患しているとされ、common disease であると考えられている。統合失調症の一卵性双生児の発症一致率が 30-50%と高いものの 100%ではないことから遺伝と環境の両方の関与が示唆されている。遺伝学的解析によりいくつかの遺伝子 (DISC1, HSPA1B, MBP, NCAM1, NRG1, COMT など) が統合失調症と相関すると報告されているが、これらは単独で統合失調症発症を決定するものではない。common disease であることと単一の原因遺伝子が発見されていないことから、統合失調症は多因子疾患であると考えられている。

このように統合失調症が多因子疾患であると考えられている中で、その発症原因については様々な仮説が提唱されているが、いづれも仮説に留まっている。有力な仮説としてドパミン仮説、グルタミン酸仮説が挙げられる。

ドパミン仮説：統合失調症の妄想や幻覚といった陽性症状は基底核や中脳辺縁系のドパミンシステムの過活動によって生じるという仮説である。既存の抗精神病薬 (統合失調症治療薬) に共通する薬理学的ターゲット因子として dopamine receptor D2 (DRD2) があり、抗精神病薬は基本的にドパミンアンタゴニストである。抗精神病薬が陽性症状に対して効果があることはドパミン仮説によって説明することができる。また、ドパミン作動性に作用する覚醒剤は統合失調症の陽性症状に類似した幻覚、妄想を引き起こす。一方で抗精神病薬が陰性症状に対して効果が小さいことについてはドパミン仮説だけでは十分に説明できない。

グルタミン酸仮説：統合失調症の症状が脳内のグルタミン酸システムの活動低下によって生じるという仮説である。フェンサイクリジン、ケタミン、ジゾシルピンなどの NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬が統合失調症の陽性および陰性症状に類似した反応を引き起こすことから提唱された。統合失調症の陽性症状だけでなく陰性症状に対しても説明できるためドパミン仮説を補完する仮説であると考えられている。

DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein 32 kDa, もしくは Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B (PPP1R1B))は中枢神経系のなかでドパミン作動性神経の投射を受ける領域に主として発現しているタンパク質である。DARPP-32 は Protein

phosphatase 1 (PP1)の脱リン酸化活性の抑制およびプロテインキナーゼ A (PKA)の活性化の抑制をリン酸化状態依存的に行っているが、DARPP-32 のリン酸化状態の調節はドパミン刺激、グルタミン酸刺激によって拮抗的に調節されている (図 1)。

DARPP-32 には 4 ケ所 (T34, T75, S97, S130)のリン酸化サイトが存在し、T34, T75 のリン酸化はそれぞれ PP1, PKA の阻害に関与しており S97, S130 は T34, T75 のリン酸化-脱リン酸化を調節しているものと考えられている。なお (T34, T75)はその直後のアミノ酸がプロリンとなっており後述の Pin1 の潜在的な基質である。

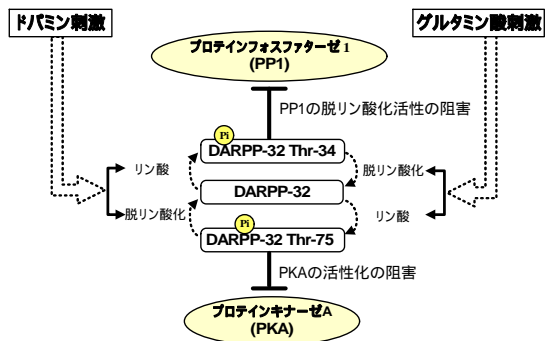


図 1

このように DARPP-32 はドパミン、グルタミン酸両経路の下流にあって双方のシグナルを集約してキナーゼ・フォスファターゼへとシグナルを伝達する脳内因子である。DARPP-32 は統合失調症との関連において検討されており、我々も統合失調症患者死後脳サンプルを用いて DARPP-32, calcineurin (DARPP-32 を脱リン酸化する)の脳内における分布の解析をおこなっている (Kunii ら 2011 a, Kunii ら 2011 b, Nishiura ら 2011, Kunii, Hino ら 2014)。

タンパク質を構成する各アミノ酸の間のペプチド結合は一般にシス体比べてより安定なトランス体を取っている。例外的にプロリン残基についてはアミノ基側ペプチド結合がシス体としても比較的安定である。ペプチジルプロリルイソメラーゼはタンパク質分子中のプロリン残基のシス トランス間の異性を触媒する酵素である。タンパク質分子中のプロリン残基におけるシス トランス変換はポリペプチド主鎖の折れ曲がりの方向を反転させ蛋白質全体の構造と機能に大きな影響を及ぼす (図 2)。

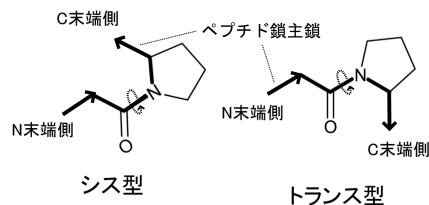


図 2

また、タンパク質を基質とする多くの酵素（キナーゼ、フォスファターゼ、プロテアーゼ等）はトランス型とシス型のプロリンを基質とする場合の反応のし易さに差があることから、プロリン残基のシス トランス異性化はリン酸化などのタンパク質の翻訳後修飾や分解、タンパク質間相互作用を On/Off するスイッチとして働いていることが示唆されている。Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) はプロリルイソメラーゼの一種で、リン酸化されたタンパク質の - (リン酸化-Ser/Thr) - (Pro) - 配列を特異的に認識し異性化する酵素である (Yaffe ら 1997)。この配列は MAPK ファミリーや CDK ファミリーのコンセンサス配列であり、Pin1 はこれらのキナーゼと協調してシグナル伝達に関与していると考えられている。脳・神経組織における機能としては Pin1 は樹状突起スパイン、突起幹に存在し、グルタミン酸作動性シグナル伝達により誘導されるタンパク質合成を抑制的に調節することで長期記憶形成に関与している (Westmark ら 2010)。神経変性疾患では Pin1 はリン酸化 Tau に作用し神経変性疾患を防ぐことが *in vitro* 実験から明らかにされ、さらに Pin1 ノックアウトマウスで若年性の AD (アルツハイマー病) 様神経変性疾患が引き起こされることが示された (Liou ら 2003)。一方で精神疾患、なかでも統合失調症発症における Pin1 の関与については報告がなかった。

2. 研究の目的

前節をまとめると次のようになる。

1. DARPP-32 は神経細胞においてドパミンシグナル、グルタミン酸シグナルの両者をリンクしていると考えられており、統合失調症の病態の鍵の一つである可能性がある。

2. DARPP-32 はリン酸化状態依存的に PP1 や PKA の活性調節を行っているが、そのリン酸化サイト (T34, T75) はその直後がプロリンとなっている。

3. Pin1 は - (リン酸化-Ser/Thr) - (Pro) - 配列を特異的に認識しプロリンのシス トランス異性化を行う酵素で、リン酸化によるシグナルの On/Off をするスイッチとして働いている。

上の 2,3, の知見は DARPP-32 の T34, T75 とその直後のプロリンが Pin1 による異性化を受けられる可能性を示している。そこで本研究では DARPP-32 がリン酸化依存的に Pin1 によってプロリン残基の異性化を受け、PP1/PKA に対する抑制活性が調節されていると予想しこの仮説のもとに統合失調症発症メカニズムにおける DARPP-32 の役割を Pin1 の視点から解析することを目的とした。より具体的にはリン酸化された DARPP-32 が Pin1 による異性化の基質となるか、さらに

DARPP-32 のプロリン残基の異性化が DARPP-32 による PP1/PKA 活性を抑制する能力に影響を与えるかを検討することを目的とした。さらに、統合失調症との関連では統合失調症死後脳における Pin1 の発現解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

・リン酸化型 DARPP-32 と Pin1 の結合の解析

リン酸化型 DARPP-32 に対して Pin1 が作用し DARPP-32 のプロリン残基のシス トランス異性化を触媒するか生化学的な解析を試みた。DARPP-32 および Pin1 をリコンビナントタンパク質として発現させるため野生型および変異導入コンストラクト (DARPP-32-WT, DARPP-32-T34A, DARPP-32-T75A, DARPP-32-T34A,T75A, Pin1-WT) を作成した。

・統合失調症死後脳を用いた Pin-1 の発現解析

統合失調症における Pin1 発現量の変動を解析することを目的に定量系の構築を試みた。2種類の市販抗体を用いたサンドウィッチ法でリコンビナント Pin1 タンパク質を補足・標識し、マルチプレックス装置 (Luminex) を用いて解析した。

・統合失調症死後脳を用いた GSK3β 関連因子の発現解析

ネットワーク/パスウェイ解析 (IPA (Ingenuity Pathways Analysis), Ingenuity 社) により DARPP-32 と Pin1 の両者と直接/間接的に相互作用する因子として GSK3β を見出した。GSK3β とそのパスウェイ上関連する因子について統合失調症群と健常コントロール群との間でタンパク質発現解析を行った。解析には MILLIPLEX® Multiplex Assays 試薬とマルチプレックス装置 (Luminex) を用いた。

4. 研究成果

リン酸化型 DARPP-32 と Pin1 の結合の生化学的解析は継続中である。特に DARPP-32 による PP1 阻害活性、PKA 阻害活性におよぼすプロリン異性化の影響について解析を進める。

統合失調症患者群の死後脳における Pin1 タンパク質発現量を健常対照群との間で比較することを目的に Pin1 定量法の構築を試みた。定量には多項目同時測定系 (Luminex) を用いたがその理由として 1. 高感度、高精度、広い定量範囲であること、2. 要求されるサンプル量が少ないこと、の二点があり、とくに後者については貴重な脳組織を用いて解析を行う上で必要な条件である。Pin1 に対するモノクローナル抗体 (Capture Antibody) を

ポリスチレンビーズに固相化し、評価用標準物質としてリコンビナント Pin1 を用いた。二次抗体 (Detection Antibody) には抗 Pin1 ポリクローナル抗体を用いて測定系とした。リコンビナント Pin1 に対する反応性を感度 (検出限界値)、正確性、直線性、ダイナミックレンジ (測定範囲) の項目について評価したが、要求される水準を満たさなかった。統合失調症患者死後脳における Pin1 発現量解析は ELISA 等の他の手法を用いることを検討している。

Pin1 が DARPP-32 を調節しているのであればその生物学的な意味はネットワーク/パスウェイ解析により DARPP-32 と Pin1 の両者と直接/間接的に相互作用する因子を見出すことで予測できると考えた。ネットワーク/パスウェイ解析の結果 GSK3 β を見出した。GSK3 β とそのパスウェイ上関連する因子について統合失調症群と健常コントロール群との間でタンパク質発現解析を行った。結果については論文として投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

日野瑞城, 國井泰人, 松本純弥, 和田明, 長岡敦子, 丹羽真一, 高橋均, 柿田明美, 赤津裕康, 橋詰良夫, 山本孝之, 矢部博興
統合失調症患者死後脳前頭前皮質における Akt シグナル伝達系蛋白質群の多項目同時測定 日本統合失調症学会 第 11 回年会 2016 年 3 月 26 日 群馬県前橋市

〔その他〕

ホームページ
精神疾患ブレインバンク・DNA バンク
<http://www.fmu-bb.jp/>

福島県立医科大学医学部神経精神医学講座
<http://fmu-hpa.jp/neuropsych/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野瑞城 (HINO MIZUKI)
福島県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 80396663