

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830051

研究課題名(和文)新規抗体を用いた統合失調症脆弱性因子DISC1の分子機能と活性制御機構の解析

研究課題名(英文)Re-evaluation of DISC1 using knockout mice and new antibodies

研究代表者

黒田 啓介(KURODA, Keisuke)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80631431

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)：DISC1は統合失調症脆弱性因子の1つであり世界中で様々な研究が行われてきた。我々はこれまでに既存の抗DISC1抗体が内在性DISC1を正しく認識していないことを報告している。本研究ではDISC1に関する既存の報告の再評価と、DISC1本来の機能の解明を行った。DISC1ノックアウトマウスを用いた解析から、これまでDISC1の主な機能として報告されてきた神経細胞の遊走制御が、ノックダウンベクターのオフターゲット効果であり、間違いである可能性が高いことを報告した。またDISC1がRNA結合蛋白質としてmRNAの輸送を制御しシナプスの伝達効率に関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1) is a promising candidate gene for susceptibility to psychiatric disorders, including schizophrenia. We previously generated a DISC1 knockout (KO) mouse and developed DISC1 antibodies. We found that no available antibodies to DISC1 without us recognized the endogenous DISC1. The DISC1 KO mouse displays no gross abnormalities, but it does show altered synaptic plasticity and abnormal emotional behaviors. So that we re-evaluate DISC1 using KO mice and new antibodies and investigate true function of DISC1 in synapse. We found that cell migration defect caused by DISC1 knockdown is an off-target effect of shRNA. This result suggests that DISC1 studies using DISC1 shRNAs should be interpreted with caution. We used proteomic analysis to screen for DISC1 interactors and identified several RNA-binding proteins. We found that DISC1 binds ITPR1 mRNA with HZF, thereby regulating its dendritic transport for synaptic plasticity.

研究分野：神経化学

 キーワード：DISC1 統合失調症 モデルマウス ノックアウトマウス 抗体 オフターゲット プロテオミクス解析
シナプス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約1%が罹患し、思春期・青年期に発症する精神障害である。幻覚・妄想などの陽性症状と対人的接触性の低下や意欲発動性の減退といった陰性症状に加え、記憶の低下といった認知機能の障害など多彩な精神症状を呈する。統合失調症患者の神経画像解析や死後脳解析から、中枢神経系の発達障害が発症に関与していると考えられている。また、双生児研究を中心とした遺伝学的研究により、発症には遺伝因子の関与が比較的強いと推測されている。これまでに、DISC1、Neuregulin-1、DysbindinやCOMTなど有力な脆弱性遺伝子が複数同定されている。しかし、統合失調症の分子機構は現在なお不明である。

DISC1は、統合失調症、難治性うつ病、双極性障害などの精神疾患を高率で発症するスコットランドの家系の遺伝学的解析の結果、第1染色体と第11染色体の相互転座部位に局在する遺伝子として2000年に報告された。その後、この染色体相互転座により、DISC1蛋白質の発現量が低下し十分機能していない可能性が高いと報告された。また、DISC1は、弧発性の統合失調症にも関連していると複数報告されている。これらの報告から、統合失調症の病態解明に向けDISC1の生理機能の解明が熱望された。多くの研究者がDISC1の機能解析を行い、一流紙を含む様々な雑誌に多くの報告がされてきた。しかし、これらの解析結果は1つ1つは問題ないものの、互いの報告には矛盾する点が多くあり、近年のDISC1研究はやや複雑な状況となっている。

我々は、DISC1の発現低下が統合失調症を引き起こすというヒトでの研究結果に基づき、DISC1 KOマウスを作製し解析を行った。その結果、DISC1 KOマウスは、胎生致死や発育不全はなく、脳構造も一見正常であった。しかし、詳細な解析を行ったところ、電気生理解析や行動解析において、統合失調症様の異常を見出した。さらに、この行動異常は抗精神病薬であるクロザピンの投与によって改善することを見出した。これらの結果から我々はDISC1 KOマウスを新たな統合失調症モデルマウスとして報告した。

また我々は、一連のKOマウスの解析の中で、これまでに市販されてきた抗DISC1抗体がKOマウスのウエスタンブロット(WB)において野生型と比べバンドパターンが変化せず、内在性のDISC1を認識していないことを見出した。そこで多種類の抗体を作製しKOマウスを用いて抗体の評価を行ったところ、DISC1のN末とC末をそれぞれ抗原部位とする2種類の新規抗DISC1抗体の作製に成功した。これらの抗DISC1抗体を用いてDISC1蛋白質の性状について再評価を行ったところ、DISC1が非常に発現量の少ない蛋白質であること、DISC1がこれまで報告されていた中心体やミトコンドリアではなくTrans-Golgi

network(TGN)に局在していること、これまでの抗体がDISC1を正しく認識していないこと、これまでの実験で使用されてきた一部のマウス系統においてゲノム上のmutationによりDISC1が発現していないことを見出した。これらの結果から、近年のDISC1研究の複雑化は、抗体が正しくDISC1を認識していなかったことが原因であると報告した。(引用文献)

2. 研究の目的

上記のような状況から、これまでのDISC1の研究成果について再評価が必要であるという認識が世界中で広まりつつある。本研究は我々の所有している新規抗DISC1抗体とDISC1 KOマウスを用い、DISC1に関する既存の報告についての再評価と、DISC1本来の機能の解明を目的として行った。

3. 研究の方法

我々の研究室は、非常に優秀な抗DISC1抗体とノックアウト(KO)マウスを有している。また、これまで、プロテオミクス手法を用いた蛋白質の機能解析の研究を多数行っている。これらのメリットを生かすため、以下のように研究を遂行した。

また、研究代表者は名古屋大学において研究志向の学部生を指導するための予算(基礎医学研究者育成プロジェクト)において雇用されており、つねに複数人の学部生や大学院生を指導している。学生が研究に参加しやすいよう、新規の実験系の立ち上げが必要な場合には、なるべく研究代表者が条件検討を行った上で、研究協力者である学生達と実験を行うとともに、大学院生や学部生が互いに指導が出来るよう心がけ、研究を遂行した。

(1) DISC1に関する既存の報告についての再評価

これまでDISC1の主な機能として、神経細胞の遊走制御が多くの論文で報告されている。これらの研究ではDISC1の発現を抑制するDISC1ノックダウンベクターを遊走中の神経細胞に導入し、その遊走が遅れることを報告している。我々は、DISC1ノックダウンベクターの効果をDISC1 KOマウスを用いて確認した。

(2) DISC1本来の機能の解明

我々はこれまでの電気生理学的解析において、DISC1 KOマウスのシナプス機能に異常があることを見出している。しかしながら成体脳におけるDISC1の機能は報告されていない。そこでDISC1の成体脳における機能を解明するために、プロテオミクス手法を用いて、DISC1の相互作用分子を成体脳から同定した。DISC1を固相化したアフィニティーカラムを作成し、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を行いDISC1の相互作用分子を同定した。

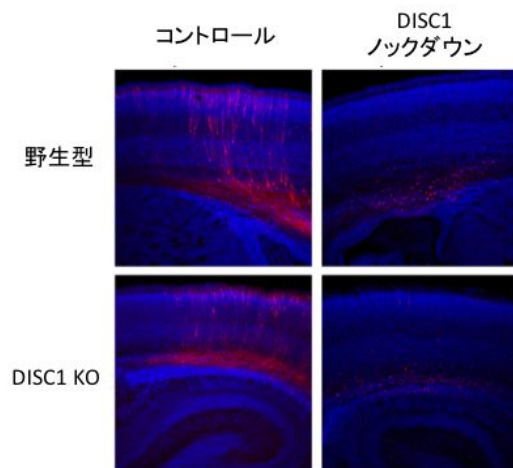
(3) DISC1 コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作製と解析

DISC1 は胎生期や新生児期に発現の多い蛋白質であり、成体での発現はきわめて少ない。よって、DISC1 KO マウスの表現型が DISC1 の機能欠失による直接の影響なのか、発達期に DISC1 が機能しなかったことによる間接的な影響なのかを解明するためには、DISC1 を時期・場所・細胞種特異的に KO して解析を行う必要がある。我々が持っている非常に優秀な抗 DISC1 抗体を利用して、DISC1 CKO マウスを作製し、DISC1 KO マウスで示された表現型や、DISC1 ノックダウンで認められた異常について CKO マウスを利用して再評価と解析を行った。

4. 研究成果

(1) DISC1 に関する既存の報告についての再評価

我々の DISC1 KO マウスはマウス *Disc1* 遺伝子の exon 2, intron 2, exon 3 を含んだゲノム領域が欠損している。そこで、exon 2 上の配列をターゲットとする DISC1 ノックダウンベクターを DISC1 KO マウスに導入し、神経細胞の遊走を観察した。その結果、野生型マウスにおいて観察された DISC1 ノックダウンベクターによる神経細胞の遊走阻害が、exon 2 を持たないはずの DISC1 KO マウスにおいても同じように観察された。このことは、DISC1 ノックダウンベクターによって示された現象が DISC1 を介していない、つまりオフターゲット効果であることを示している。本研究については、共同研究者らとともに、最終年度に論文発表を行った(引用文献)。



(2) DISC1 本来の機能の解明

我々はこれまでの電気生理学的解析において、DISC1 KO マウスのシナプス機能に異常があることを見出している。しかしながら成体脳における DISC1 の機能は報告されていなかった。そこで DISC1 を固相化したアフィニティーカラムを作成し、成体ラット脳可溶性物を用いたアフィニティーカラムクロマト

グラフィー解析を行った。その結果、新規の DISC1 相互作用分子として SYNCRIP や HZF などの RNA 結合タンパク質を同定した。SYNCRIP や 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) 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。我々は生化学的解析から 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 KO マウスでは ITPR1 mRNA の樹状突起局在に異常が認められた。全長の DISC1 cDNA を DISC1 KO マウスの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 KO マウスの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。さらに 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 KO 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可能性が高いことが明らかになった。本研究については、共同研究者とともに最終年度に論文発表を行った(引用文献)。

我々は、上記以外にも DISC1 の新規抗体を用いた解析から、DISC1 が Trans-Golgi network (TGN) に濃縮することを報告している。これに基づき、DISC1 が何らかの分泌蛋白質の制御を行っていると考え、DISC1 結合蛋白質のうち、蛋白質分泌に関与する分子の同定を試みた。本研究については、共同研究者と共に論文作成中である。

これら以外にも世界中に新規抗体と DISC1 KO マウスを分与しており、多くの論文が報告されている。

(3) DISC1 CKO マウスの作製と解析

我々は、理研 CDB 変異マウス開発チームと共同で、DISC1 CKO マウスを作製した。しかしながら当初の計画より作製に時間がかかり、詳細な解析を行うことが出来なかった。

<引用文献>

Kuroda K, Yamada S, Tanaka M, Iizuka M, Yano H, Mori D, Tsuboi D, Nishioka T,

Namba T, Iizuka Y, Kubota S, Nagai T, Ibi D, Wang R, Enomoto A, Isotani-Sakakibara M, Asai N, Kimura K, Kiyonari H, Abe T, Mizoguchi A, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K, Kaibuchi K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene in the mouse. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 1;20(23):4666-83. DOI: 10.1093/hmg/ddr400.

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.* 2015 May;18(5):698-707. DOI: 10.1038/nn.3984.

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5件)

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.* 2015 May;18(5):698-707. 査読有
DOI: 10.1038/nn.3984.

Park SJ, Jeong J, Park YU, Park KS, Lee H, Lee N, Kim SM, Kuroda K, Nguyen MD, Kaibuchi K, Park SK. Disrupted-in-schizophrenia-1 (*DISC1*) Regulates Endoplasmic Reticulum Calcium Dynamics. *Sci Rep.* 2015 Mar 3;5:8694. 査読有
DOI: 10.1038/srep08694.

Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M, Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 2014 Sep 17;33(18):2098-112. 査読有
DOI: 10.15252/embj.201488289.

Nakai T, Nagai T, Wang R, Yamada S, Kuroda K, Kaibuchi K, Yamada K.

Alterations of GABAergic and dopaminergic systems in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene. *Neurochem Int.* 2014 Jul;74:74-83. 査読有
DOI: 10.1016/j.neuint.2014.06.009.

Yun J, Nagai T, Furukawa-Hibi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Greenberg ME, Yamada K. Neuronal Per Arnt Sim (PAS) domain protein 4 (NPAS4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2655-64. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.413310.

[その他]

作製した新規抗 *DISC1* 抗体の市販化
Merck Millipore Corporation
ABN425 | Anti-*DISC1* Antibody
http://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/Anti-DISC1-Antibody,MM_NF-ABN425

作製した *DISC1* KO マウスの寄託と配布
理化学研究所 バイオリソースセンター
RBRC03709 B6.B6CB-Disc1<tm1Kozo>
http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC03709

学部生の指導
名古屋大学医学部学生研究会
<http://med.nagoya-u.ac/nsam/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 啓介 (KURODA, Keisuke)
名古屋大学・大学院医学系研究科
特任助教
研究者番号：80631431

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし