

平成22年 3月 30日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700333

研究課題名（和文）統合失調症発症脆弱性因子DISC1の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1)

研究代表者

田谷 真一郎 (TAYA SHINICHIRO)

国立精神・神経センター・神経研究所・診断研究部・室長

研究者番号：60362232

研究成果の概要（和文）：

統合失調症は世界人口の約1%で発病がみられる重篤な精神障害である。しかし、統合失調症の発症原因は未だ明らかにされていない。本研究では、統合失調症脆弱性因子DISC1とその結合蛋白質の生理機能を明らかにすることにより、統合失調症発症の分子メカニズムを理解することを目的とする。DISC1とその結合分子を解析することで、DISC1が軸索伸長・シナプス形成・神経細胞の移動に関与することを明らかにした。以上の結果は、DISC1の機能解析が統合失調症発症の分子メカニズムにつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Schizophrenia is a disease affecting about 1% of the population in the world. However, pathogenesis of schizophrenia is unclear, several hypotheses are reported. To understand molecular level of schizophrenic pathogenesis, I focused on DISC1 and its interacting molecules. In this study, I showed that DISC1 and its interacting molecules regulate axon elongation, synapse formation, and neuronal migration. These results suggest that the functional analysis of DISC1 leads to molecular level of schizophrenic pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

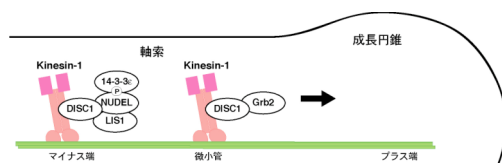
科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約1%が思春期・青年期に発症し、多くの難治例が存在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。既存の治療では十分な効果が得られない難治例も多い。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（海馬や前頭前野皮質などの神経細胞のシナプス形成不全など）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。近年、統合失調症、難治性大うつ病、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 Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) が報告された。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ている可能性が高いと報告された。従って、相互転座の保因者では DISC1 蛋白質の発現量が低下することで、DISC1 が十分機能していないと考えられる。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。DISC1 遺伝子の 704 番目のセリンがシステインに置換する SNP 変異が報告され、704 番目のセリン型が発症に関連することが報告された。一方、DISC1 の 704 番目のシステイン型が難治性大うつ病の発症に関連することも報告されている。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ている。

2. 研究の目的

これまでに、DISC1 が“積み荷”分子を軸索内の微小管モーター蛋白質である Kinesin-1 と連結させる“積み荷受容体”として機能することで、“積み荷”の軸索先端への局在化、軸索の伸長を制御していることを明らかにしてきた。しかし、DISC1 の活性制御機構は全く不明である。本研究の目的は、DISC1 の生理機能の解明を生化学的・細胞生物学的に解析することで、統合失調症の病態を解明することである。



積み荷受容体としての DISC1 の機能

(1) DISC1 の活性制御機構の解明

私共は、生体内で DISC1 がリン酸化されることを見出している。さらに、DISC1 はリン酸化されることで、Kinesin-1、14-3-3 ε 等の DISC1 結合蛋白質と結合状態が変化することを見出している。従って、DISC1 の活性制御機構に DISC1 のリン酸化が関与している可能性が高いと考えられる。本研究期間内で、DISC1 の責任リン酸化酵素並びにリン酸化サイトを同定する。

(2) DISC1 の軸索伸長に関する作用機序の解明

私共は、DISC1 が“積み荷”となる NUDEL/LIS1/14-3-3 ε 複合体を Kinesin-1 と連結させる“積み荷受容体”として機能することで、“積み荷”の軸索先端への局在化を制御していることを明らかにしてきた。近年、LIS1 が神経細胞内の伸長する微小管の先端に局在する plus-end-tracking proteins (+Tips) やその結合蛋白質 IQGAP の局在を制御することが報告された。本研究期間内で、DISC1 が LIS1 の局在を制御することで微小管 +Tips やその結合蛋白質 IQGAP にどのような影響を与えるか解析する。

(3) シナプス形成・成熟における DISC1 の機能解析

私共は、DISC1 結合分子として Pur α や Syncrin に代表される mRNP 複合体構成蛋白質を多数同定している。mRNP 複合体は、ポストシナプスでの蛋白質合成を制御することで、シナプス形成・成熟に重要な役割を果たす。本研究期間内で、DISC1 が mRNP 複合体の樹状突起への輸送および局所的な蛋白質合成の制御に関与するのか検討する。

(4) DISC1 変異による統合失調症の病態解明

DISC1 遺伝子に何らかの変異を持つマウスで統合失調症様形質が認められることから、DISC1 のアミノ酸変異は統合失調症の分子機構に密接に関与している可能性が高いと考えられる。本研究期間内で、DISC1 のスプライシングフォーム、統合失調症と関係の高い 704 番目のセリン型 DISC1、難治性大うつ病と関係の高い 704 番目のシステイン型 DISC1 の機能の違いを明らかにする。

(5) 統合失調症モデルマウスの作製と解析

DISC1 蛋白質の発現量の低下が統合失調症と関係していると予測されるため、モデルマウスとしては DISC1 ノックアウトマウスが適切であると考えられる。しかし、これまでに DISC1 ノックアウトマウス作製の報告はなさ

れていない。本研究期間内で、DISC1 ノックアウトマウスの作製と解析を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) DISC1 の活性制御機構の解明

私共は、生体内で DISC1 がリン酸化されていることを見出している。現在、DISC1 をリン酸化する酵素として ERK、PKA、PKC、Rho-kinase、MRCK などの分子を考えている。まず、*in vitro* で DISC1 を約 20 種類の DISC1 リン酸化酵素候補によるリン酸化アッセイを行う。次に DISC1 を効率よくリン酸化した酵素に注目して、DISC1 の欠損ミュータントを用いてリン酸化サイトを絞り込む。リン酸化酵素にはコンセンサス配列が報告されているので、最終的には DISC1 のポイントミュータントを作製することでリン酸化サイトを決定する。さらに、リン酸化状態の DISC1 を検出する抗リン酸化 DISC1 抗体の作製に着手する。

DISC1 はリン酸化されることで、Kinesin-1 との結合が弱まり、14-3-3 $\epsilon$  と結合することを見出している。本研究では、どのリン酸化酵素がこれらの現象を制御しているのか検討する。具体的には、DISC1 をリン酸化した後、Kinesin-1、14-3-3 $\epsilon$  との結合実験を *in vitro* で試みる。

#### (2) DISC1 の軸索伸長に関する作用機序の解明

すでに、ラット海馬初代培養神経細胞において RNAi による DISC1、NUDEL、LIS1、14-3-3 $\epsilon$  の発現抑制の系は確立できている。そこで、各分子を発現抑制させた軸索の成長円錐での微小管+Tips やその結合蛋白質 IQGAP の局在を免疫染色により検討する。

#### (3) シナプス形成・成熟における DISC1 の機能解析

DISC1 発現抑制下における mRNP 複合体の樹状突起への輸送について生細胞を用いてリアルタイムで観察する。具体的には Pur $\alpha$  や Syncrin に代表される mRNP 複合体構成蛋白質やこれら蛋白質に結合する GFP 標識した mRNA を観察する。

#### (4) DISC1 変異による統合失調症の病態解明

DISC1 のスプライシングフォーム、統合失調症と関係の高い 704 番目のセリン型 DISC1、難治性大うつ病と関係の高い 704 番目のシステイン型 DISC1 の機能の違いを明らかにする。

すでに報告されている DISC1 のスプライシングフォームを作製する。また、704 番目のセリン型、システイン型 DISC1 も作製する。

#### (5) 統合失調症モデルマウスの作製と解析

DISC1 蛋白質の発現量の低下が統合失調症と関係していると予測されるため、統合失調症のモデルマウスとして DISC1 ノックアウトマウスの作製を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) DISC1 の活性制御機構の解明

これまでに、DISC1 の活性制御機構に DISC1 のリン酸化が関与している可能性が高いという予備的な結果を得ている。DISC1 の責任リン酸化酵素として ERK、PKA、Rho-kinase を同定した。また、リン酸化サイトを決定し、リン酸化抗体を数種類作製した。

また、ERK による DISC1 のリン酸化が Kinesin-1 との結合を阻害することを見出した。さらに、ラット海馬初代培養神経細胞において、軸索先端部で ERK が活性化していることを見出した。以上の結果から、ERK は軸索先端部で DISC1 をリン酸化することで、“積み荷” をモーター蛋白質である Kinesin-1 から外す機能があるのではないかと考えている。

#### (2) DISC1 の軸索伸長に関する作用機序の解明

DISC1 が LIS1 の局在を制御することで微小管+Tips やその結合蛋白質 IQGAP の局在化制御することを明らかにした。

統合失調症は多因子疾患であることから、DISC1 のみを解析していても統合失調症発症の分子メカニズムの解明に繋がりにくい。これまでに DISC1 結合分子の同定を試みてきたが、より効率よく同定するための技術開発を行った。さらに、多数の DISC1 新規結合分子を同定することに成功した。

#### (3) シナプス形成・成熟における DISC1 の機能解析

ラット海馬初代培養神経細胞を用いて、DISC1 の発現抑制によりシナプス形成が成熟しないことを見出した。

さらに、DISC1 の新規結合分子として Girdin を同定した。DISC1 は Girdin と共に生後の海馬の歯状回において、神経細胞の移動・発達に重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上の結果から、*in vitro* でも *in vivo* でも DISC1 が神経発達に関与していることが示唆される。

#### (4) DISC1 変異による統合失調症の病態解明

統合失調症と関係の高い 704 番目のセリン型 DISC1、難治性大うつ病と関係の高い 704 番目のシステイン型 DISC1 の機能の違いを解析

するために発現系を確立した。しかしながら、704番目のセリン型DISC1、704番目のシステイン型DISC1をラット海馬初代培養神経細胞に発現させても顕著な違いは認められなかった。

#### (5) 統合失調症モデルマウスの作製と解析

目的のエクソンを飛ばしたDISC1のノックアウトマウスを作製することに成功した。しかし、DISC1は非常に多くのスプライシングフォームを形成するらしく、現在作製したノックアウトマウスでどのようなスプライシングフォームを発現しているのか調査しなければならない。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

全て査読有り

1. Nagai T, Kitahara Y, Shiraki A, Hikita T, **Taya S**, Kaibuchi K, Yamada K. Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience Letter*, 470, 134-138, 2010
2. Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, **Taya S**, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron*, 63, 774-787, 2009
3. Hikita T, **Taya S**, Fujino Y, Taneichi-Kuroda S, Ohta K, Tsuboi D, Shinoda T, Kuroda K, Funahashi Y, Uruguchi-Asaki J, Hashimoto R, Kaibuchi K. Proteomic analysis reveals novel binding partners of dysbindin, a schizophrenia-related protein. *Journal of Neurochemistry*, 110, 1567-1574, 2009
4. Hashimoto R, Ohi K, Okada T, Yasuda Y, Yamamori H, Hori H, Hikita T, **Taya S**, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kaibuchi K, Takeda M, Kunugi H. Association analysis between schizophrenia and the AP-3 complex genes. *Neuroscience Research*, 65, 113-115, 2009

5. Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, **Taya S**, Funahashi Y, Hattori A, Shimada A, Ménager C, Kawabata S, Fujii K, Iwamatsu A, Segal RA, Fukuda M, Kaibuchi K. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Developmental Cell*, 16, 675-686, 2009
6. Taneichi-Kuroda S, **Taya S**, Hikita T, Fujino Y, Kaibuchi K. Direct interaction of Dysbindin with the AP-3 complex via its mu subunit. *Neurochemical International*, 54, 431-438, 2009

〔学会発表〕(計2件)

**田谷真一郎**、浦口淳子、黒田啓介、坪井大輔、貝淵弘三

統合失調症関連因子DISC1は分子の輸送に関与し、軸索伸長を制御する  
第61回日本細胞生物学会  
2009年6月2日-4日、名古屋市 名古屋国際会議場

**田谷真一郎**、貝淵弘三

Risk factors for schizophrenia and their physiological functions  
第31回日本神経科学大会  
2008年7月9日-11日、東京国際フォーラム

〔その他〕

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

田谷 真一郎 (TAYA SHINICHIRO)

国立精神・神経センター・神経研究所・

診断研究部・室長

研究者番号：60362232