

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460284

研究課題名(和文) DISC1とNRG1/ErbBシグナル伝達

研究課題名(英文) DISC1 regulates NRG1/ErbB signal pathway

研究代表者

森 大輔 (MORI, DAISUKE)

名古屋大学・脳とこころの研究センター・特任准教授

研究者番号：00381997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は多くの遺伝因子が報告されているが、DISC1とNeuregulin-1はそのリスク遺伝子として知られている。これらの分子は分子間相互作用し、脳内神経細胞において密接に重要な機能を有していると考えられる。本研究では、DISC1がNeuregulin-1分子のゴルジ体を起点とする細胞内輸送に関与し、適切なNeuregulin-1分泌過程の重要な調節の部分に寄与していることを、DISC1ノックアウトマウスの利用によって証明した。

研究成果の概要(英文)：DISC1 is a candidate gene for susceptibility to schizophrenia. We have reported that DISC1 protein is accumulated on Golgi apparatus in cultured neurons, which suggests that it is a component of transporting vesicles budding from Trans-Golgi network. However, the functional significance of DISC1 on Golgi-apparatus has been essentially unknown. Here, we report that DISC1 interacts with intracellular domain of precursor pro-Neuregulin-1 (pro-NRG1) and regulates its secretion and then propose our hypothesis that DISC1 promotes the formation and budding of vesicles including DISC1-interacting proteins. For the more strict quantification of secretion, we developed a synchronized budding system of single-passed transmembrane protein through Golgi apparatus, and revealed that the budding of pro-NRG1 and the secretion of mature NRG1 were relatively impaired in full-length DISC1 deficient hippocampal neuron.

研究分野：分子生物学

キーワード：統合失調症 DISC1 Neuregulin 細胞内輸送

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にもかかわらず、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 (Weinberger, et al., Mol Psychiatry, 2005)。近年の研究により、神経回路網の発達障害が抑制性-興奮性神経回路のバランス異常をもたらし、発症脆弱性を高めていると推定されている。DISC1、Neuregulin-1 は、これまでの遺伝子解析により、強い発症脆弱性因子である。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未だ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、シナプス形成に参与している (Mei et al, Nat. Rev. Neuroscience, 2008)。Neuregulin-1 と ErbB4 が GABA 作動性の抑制性ニューロンのシナプス形成に参与することが明らかにされ、統合失調症との関連が注目されている (Pietro F. et al., Nature, 2010)。一方、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、シナプス形成に参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、PSD-95、Karilin-7、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 複合体は滑脳症の原因遺伝子であり、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 が NDEL1/LIS1 複合体と Kinesin-1 との結合を仲介する積み荷受容体としてはたらき、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ことが明らかにされている。 (Taya et al., 2007, J. Neurosci.; Shinoda et al., 2007, J. Neurosci.)。このように、DISC1 と Neuregulin-1 は最も有力な統合失調症発症脆弱性因子であるが、両者の関連は長らく不明であった。

研究代表者は、DISC1 KO マウスを作製し、その表現型解析を行った。また市販されている抗体には特異的 DISC1 を認識するものがなかったために、特異的抗体を新規に作製した。その結果、複数の行動解析によりこのマウスが統合失調症様の表現型を示し、統合失調症発症脆弱性モデルマウスとして使用できることがわかった。細胞内局在の解析では、DISC1 は神経細胞のゴルジ体膜上に局在が認められ、輸送タンパク質の選別および輸送に参与していることが示唆された。

Neuregulin-1 の細胞膜への輸送プロセスは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。本研究に先駆け、ゴルジ膜上で DISC1 が Neuregulin-1 と選択的に直接結合し、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ことを示すデータを得た。この結果は、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。

2. 研究の目的

統合失調症の発症原因、発症機序およびその分子病態は現在もなお不明な点が多く、解明に向け研究の推進が望まれている。本研究では、有力な統合失調症発症脆弱性因子 (DISC1、Neuregulin-1 など) に焦点を当て、その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する。研究代表者は、DISC1 欠損神経細胞で、Neuregulin-1 の細胞外分泌量が減少していることを発見し、DISC1 が Neuregulin-1 の細胞内輸送と分泌の制御に関与する可能性を見出した。DISC1 が制御する Neuregulin-1 の細胞内輸送機構およびシナプス形成への関与を、遺伝子組み替えマウスを用いる手法で明らかにする。DISC1 ノックアウト(KO)マウスおよび Neuregulin-1 トランスジェニック(TG)マウスを用いた個体レベルの分子生物学および行動薬理的解析から、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) NRG1 分子のゴルジ体からの細胞内輸送

Neuregulin-1 はゴルジ体を起点に細胞内輸送、分泌のプロセスを辿るため、遺伝子の upstream に FM4 ドメインを融合させたプラスミドベクターの改良版を作成した。この改良版による V5-Neuregulin-1 の発現は Shield-1 化合物の添加により、FM4 ドメインが小胞体およびゴルジ体膜より解離した。GFP タグを同時に付けることにより、細胞内輸送におけるタイムラプス観察が可能になった。

4 . 研究成果

(1) DISC1 欠損マウスにおける Neuregulin-1 の分泌異常

Neuregulin-1 は中枢神経系細胞、末梢神経系細胞のみならず、心筋細胞、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などさまざまな組織で発現し、恒常性の維持と初期発生の両方に深く関与していることが知られている。Neuregulin-1 は EGF ファミリーの一員であ

る。前駆体型 Neuregulin-1 は細胞膜上で剪断され、EGF ドメインを含む細胞外領域ペプチドがリガンドとして、EGFR/ErbB 受容体に結合し、下流のシグナルを活性化する。

前駆体型 Neuregulin-1 の適切なプロセッシングの調節機構は、下流のシグナル伝達に強い影響を与えるために非常に厳密に制御されていると考えられているが、その前段階であるゴルジ体から細胞膜までの輸送制御についてはほとんど調べられていない。Neuregulin-1 は発現量が非常に低く、さらに多種多様なアイソフォームが存在するために、その正確な分泌量を測定する系は存在していなかった。本研究では、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と細胞内領域の両方に V5 タグ配列を挿入したプラスミドベクターを作製し、培養神経細胞に導入する。今年度はこのプラスミドベクターが完成し、その発現を確認した。

しかし、野生型と DISC1 変異型の神経細胞で、V5-Neuregulin の発現による分泌量を比較したが、有意な結果は得られなかった。そこで、Neuregulin-1 はゴルジ体を起点に細胞内輸送、分泌のプロセスを辿るため、遺伝子の upstream に FM4 ドメインを融合させたプラスミドベクターの改良版を作成した。この改良版による V5-Neuregulin-1 の発現は Shield-1 化合物の添加により、FM4 ドメインが小胞体およびゴルジ体膜より解離した。つまり、V5-Neuregulin-1 の分泌制御をコントロールすることが出来た。この系を用いることにより、Neuregulin-1 の分泌制御の定量的な測定が可能になり、DISC1 ノックアウトマウス由来の神経細胞でその分泌量が減少していた。

以上の実験結果より、全長の DISC1 タンパク質が分泌型 Neuregulin-1 の細胞外分泌量を調節する分子であることが明らかになった。

さらに、in vivo で Neuregulin-1 のような膜貫通型分泌性因子の正確な細胞外への分泌量を定量することは、その発現量が非常に少ないために非常に困難であった。本研究では、DISC1 が Neuregulin-1 の分泌量を制御する分子メカニズムを明らかにし、その分泌量を正確に測定するため、二種類の変異マウスを準備した。共同研究者の Lin Mei 博士より、細胞外領域の EGF ドメインの上流に HA タグ配列を挿入し、神経細胞特異的に発現する Neuregulin-1 トランスジェニックマウスの供与を受けた。このマウス由来の脳組織切片および培養海馬神経細胞より Neuregulin-1 の分泌を調べたところ、DISC1 ノックアウトマウスにおいていずれもその分泌量が減少していることを明らかにした。

(2) DISC1 依存的な Neuregulin-1 の分泌調節メカニズムの解明

アフィニティーカラムクロマトグラフィと LC-MS/MS を用いた DISC1 結合分子の網羅的解析を行った。その結果、DISC1 結合蛋白質として AP-1、AP-3、ARFGEF2 や PACS-1 などを同定した。AP-1 と AP-3 はアダプター蛋白質としてゴルジ体あるいは Trans-Golgi Network (TGN) からの輸送小胞の選択的な出芽を制御していることがよく知られている。ARFGEF2 は GDP 型の不活性型の ARF を GTP 型の活性型に変換する因子である。活性化された ARF は AP-1 や AP-3 をゴルジ膜に引き寄せるアンカー蛋白質として輸送小胞の出芽を制御する。PACS-1 は IGF2 受容体などの細胞質領域の acid cluster に結合して AP-1 や AP-3 に繋ぐ scaffold 蛋白質として働き IGF2 受容体の TGN と late endosome 間の輸送を制御している。

神経細胞内において、DISC1 はゴルジ体、特にトランスゴルジ体表面に非常に強く濃縮している。DISC1 はこれらのアダプター分

子と相互作用することにより TGN や late endosome で積み荷分子としての Neuregulin-1 の輸送を制御している可能性を考えた。

DISC1 は ARFGEF2 分子と相互作用することを明らかにし、分子モデルとして以下の仮説を立てた。DISC1 は ARFGEF2 を積み荷分子 Neuregulin-1 にリクルートすることにより近隣の ARF 分子を活性化し、Neuregulin-1 を含む小胞の出芽、輸送、分泌を促進する調節に関与していると予測した。

先述の FM4-Shield1 システムで評価したところ、ARFGEF2 の阻害剤である Brefeldin A の存在下、および ARFGEF2 の酵素活性欠損型変異の過剰発現、変異型 ARF1 分子の過剰発現によって Neuregulin-1 の分泌量の低下が見られた。以上の実験より、DISC1 が ARFGEF2 による Neuregulin-1 の輸送、分泌を特異的に活性化するアダプター分子であることを証明した。

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 2 件)

1. Ishizuka, K., H. Kimura, C. Wang, J. Xing, I. Kushima, Y. Arioka, T. Oya-Ito, Y. Uno, T. Okada, D. Mori, B. Aleksic, and N. Ozaki. 2016. Investigation of Rare Single-Nucleotide PCDH15 Variants in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. PLoS One. 11:e0153224. 査読あり
2. Maesawa, S., E. Bagarinao, M. Fujii, M. Futamura, K. Motomura, H. Watanabe, D. Mori, G. Sobue, and T. Wakabayashi. 2015. Evaluation of resting state networks in

patients with gliomas: connectivity changes in the unaffected side and its relation to cognitive function. PLoS One. 10:e0118072. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

第39回 日本神経科学大会 2015年7月30日
ニューレグリン-1 前駆体の細胞内輸送機構、森大輔、兵庫県神戸市神戸国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 大輔 (MORI, Daisuke)

名古屋大学脳とこころの研究センター
特任准教授

研究者番号：00381997

(2)研究分担者

なし