

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700415

研究課題名（和文） 新規統合失調症候補遺伝子産物CHRNA7の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of CHRNA7, a candidate gene product for schizophrenia

研究代表者

澤村 直哉（SAWAMURA NAOYA）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：40449351

研究成果の概要（和文）：

本研究では、新規統合失調症候補遺伝子産物である CHRNA7 タンパクの解析から統合失調症発症の分子メカニズムに迫るというアプローチで研究を進めてきた。特に CHRNA7 のリガンドとして知られているアミロイドβタンパクに着目して研究を行い、各種のアミロイドβタンパクにより、CHRNA7 との結合能が異なることを見出した。この結果は CHRNA7 がアルツハイマー病でも何らかの役割を果たしている可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：

The nicotinic acetylcholine receptors, key players in neuronal communication, convert neurotransmitter binding into membrane electrical depolarization. CHRNA7 is a type of the neuronal nicotinic receptor, thought to have association with Alzheimer's disease, because Aβ42 is reported binding to CHRNA7 protein with high affinity. Furthermore, the decline of senile plaques had been detected in mutant APP transgenic mice by blocking of CHRNA7. In order to figure out the starting mechanism of Aβ aggregation, we investigate the interaction between CHRNA7 and Aβ. We hypothesized that Aβ aggregation requires CHRNA7 as scaffold molecule and did several experiments to confirm this hypothesis.

We found out that Aβ43 bound to CHRNA7 with higher affinity than Aβ42 both *in vitro* and on extracellular membranes. Moreover, the decline of intracellular Aβ42 has been detected by knocking down CHRNA7's expression. Thus, CHRNA7 might be scaffold molecule with Aβ42 or

AB43 to form senile plaque, and we considered this might relate to AD profoundly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：精神神経疾患の分子メカニズム

科研費の分科・細目：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、分子・細胞・神経生物学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の1%ほどの割合で発症しているよく知られた精神疾患である。統合失調症は継続的な治療が必要にもかかわらず、社会復帰や根治が困難な例も多く、その原因・メカニズムの解明と予防・治療法の開発が待ち望まれている。近年精神疾患の研究が進むにつれ、環境的要因とともに遺伝的な要因が関係していることなどが明らかになってきた。統合失調症の病態メカニズムの研究は近年遺伝学的解析により明らかになってきた *DISC1*, *Neuregulin (NRG)* といったいくつかの候補遺伝子について、その候補遺伝子産物の解析が行われ、その分子メカニズムが徐々に明らかにされてきたところである。

平成21年度より新たな研究プロジェクトを始めるに当たり、Copy Number Variation (CNV) に基づいた大規模なゲノム解析により同定されてきた統合失調症発症に関係する候補遺伝子群に着目した (Stefansson et al. *Nature* **455**, 232-236 (2008), The International Schizophrenia Consortium. *Nature* **455**, 237-241(2008))。特にそのうちの一つである

α7 nicotinic receptor gene (CHRNA7) は以前より、統合失調症と精神遅滞に関与する遺伝子ではないかと示唆されてきた遺伝子である (Freedman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 587-592 (1997), Erdogan et al. *Am. J. Med. Genet.* **143**, 172-178 (2007))。この受容体タンパクの機能としては、ニューロンにおいて統合失調症候補遺伝子産物である *neuregulin 1* により軸索にターゲティングされるという報告があり (Hancock et al. *J. Cell. Biol.* **181**, 511-521 (2008))、また、そのノックアウトマウスでは、Morris water maze 試験により、若干の記憶障害が認められている。このことは、*CHRNA7* が作業記憶に関与していて、統合失調症発症に何らかの役割を果たしていることを示唆している (Fernandes et al. *Genes Brain Behav.* **5**, 433-440 (2006))。一方、アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイドβ蛋白が、リガンドとして *CHRNA7* に結合するという報告があるため (Wang et al. *J. Biol. Chem.* **275**, 5626-5632)、*CHRNA7* がアルツハイマー病でも何らかの役割を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、これまで申請者が行ってきたように、新規統合失調症候補遺伝子産物である CHRNA7 タンパクの解析から統合失調症発症の分子メカニズムに迫るというアプローチで研究を行う。具体的には、CHRNA7 結合タンパクの同定を行い、CHRNA7 の機能を明らかにすることによって、統合失調症発症の病態メカニズムの解明を目指す。また、CHRNA7 のリガンドとして知られているアミロイドβ 蛋白やニコチンにより、蛋白間の結合や蛋白質修飾の変化を見ることにより、アルツハイマー病や喫煙と精神疾患の病態メカニズムの関係についても調べる。

3. 研究の方法

- (1) CHRNA7 のリガンドとして知られているアミロイドβ タンパクに着目してタンパク間の結合やそれによるタンパク質修飾の変化の検出を試みた。具体的には CHRNA7 とアミロイドβ タンパクとの相互作用を分子生物学、細胞生物学、物理化学的アプローチにより調べた。
- (2) CHRNA7 のアゴニストとして知られているニコチンにより、アミロイドβ 蛋白と CHRNA7 の結合性の変化や蛋白質修飾の変化を観察した。

4. 研究成果

はじめに、CHRNA7 と Aβ の結合能を生化学的に調べるため、CHRNA7 と Aβ の *in vitro* binding 実験を行った。今回、老人斑の構成成分である Aβ40、Aβ42、近年注目されている Aβ43 を用いた。実験の結果、Aβ43 と Aβ42 両方とも強く CHRNA7 と結合していたが、Aβ43 は Aβ42 に比べてより高親和性で CHRNA7 と結合していた。

次に、CHRNA7 と Aβ との細胞膜上での

結合能を調べるため、CHRNA7 過剰発現ベクターをヒト子宮頸癌由来細胞株の HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間インキュベーションの後各種類の Aβ を培養液に添加した。さらに 1 日培養した後、細胞膜上を染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。用いた Aβ は、前述と同じ種類のものを用いた。実験の結果、Aβ43 は Aβ42 より強く CHRNA7 と結合していた。

最後に、CHRNA7 の発現抑制によって細胞膜を含む細胞内 Aβ42 の蓄積が減少するかを調べた。RNAi technique を用い、ヒト由来神経芽細胞株の SH-SY5Y 細胞において CHRNA7 を発現抑制し、その後の細胞膜を含む細胞内 Aβ 濃度を酵素免疫測定法 (Enzyme Linked Immunosolvent Assay; ELISA) で測定した。その結果、細胞膜を含む細胞内 Aβ42 の濃度が減少した結果を得た。

以上の結果から、CHRNA7 は Aβ 蓄積の足場タンパク質として働き、脳における老人斑沈着を主要な病態とするアルツハイマー病に深く関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. キョウ曄, 和田丈慶, 朝日透, 澤村直哉. Aβ 凝集時の足場としての CHRNA7 の役割. 日本薬学会第 132 年会, 2012.3.29, 北海道大学 (北海道)
2. Ju Y., Wada T., Asahi T. and Sawamura N. CHRNA7 as scaffold molecule for Aβ aggregation, 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011.9.26, 瑠璃光 (石川県)

[その他]

ホームページ等

<http://asahi-lab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤村 直哉 (SAWAMURA NAOYA)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：40449351