

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590124

研究課題名(和文)統合失調症発症脆弱性因子dysbindin-1による細胞機能制御

研究課題名(英文)Dysbindin-1, a schizophrenia-related molecule, interacts with cyclin D1

研究代表者

伊東 秀記(Ito, Hidenori)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員

研究者番号：40311443

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)：タンパク質間相互作用データベースを用いてdysbindin-1の結合分子を探索し、細胞周期調節に關与するサイクリンD3を見いだした。免疫沈降実験により、dysbindin-1AとサイクリンD1が最も効率よく複合体を形成することがわかった。また、哺乳動物培養細胞において細胞周期の進行に依存した、dysbindin-1とサイクリンD1の細胞質および核での共局在が見られた。さらに、dysbindin-1はサイクリンD1の細胞内局在を制御していることも明らかとなった。これらのことから、dysbindin-1はサイクリンD1と協調して、細胞周期調節等の過程で何らかの役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Dysbindin-1 is now widely accepted as a potential schizophrenia susceptibility gene. However, cellular functions of dysbindin-1 are largely unknown. To reveal novel functions of dysbindin-1, we tried to identify a new binding partner. We consulted with the protein interaction database and found cyclin D3 as a possible binding partner for dysbindin-1. Immunoprecipitation analysis revealed that dysbindin-1A preferentially complexes with cyclin D1 among various dysbindin-1 isoforms and D-type cyclins. Dysbindin-1 and cyclin D1 in NIH3T3 cells partially co-localized at the cytosol and the nucleus in a cell cycle progression-dependent manner. Co-expression of dysbindin-1A transferred the nuclear cyclin D1 to the cytosolic fraction in many cells. These results indicate that dysbindin-1 may control the cell cycle progression in concert with cyclin D1.

研究分野：神経生物学、生物系薬学

キーワード：統合失調症 dysbindin サイクリン

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症 (schizophrenia) は、思春期から青年期を中心に約 1% の高率で発症し、慢性化しやすい重大な障害である。遺伝疫学的な研究から、遺伝子を多く共有するほど発症率が高くなることが知られている。しかしながら、一卵性双生児でも一致率は 100% ではないことから、単一遺伝子疾患ではなく多因子疾患であると考えられている。国内外の精神科領域の研究グループによる遺伝学的解析がなされ、統合失調症の発症リスクを高める発症脆弱性遺伝子が多数同定された。その一つとして *dysbindin-1* がある。この *dysbindin-1* の神経発達における機能は、未解明な点が多かったが、私共による機能解析の結果、アクチン細胞骨格の制御に関わる、WAVE2/Abi-1 複合体と協調して神経細胞の樹状突起スパインの成熟を制御していることがわかった。この研究における *dysbindin-1* と結合する分子の探索過程において、いくつかの興味深い分子が見いだされ、これらの分子との相互作用の生理的意義を解明できれば、統合失調症発症の分子基盤の一端が明らかにできるのではないかと考えられたため、本研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

タンパク質間相互作用データベースを用いて新規 *dysbindin-1* 結合分子を検索したところ、細胞周期調節因子のひとつであるサイクリン D3 を陽性分子として見いだした。これらの分子結合の生物学的意義については全く知られていなかった。そこで、*dysbindin-1* とサイクリン D の結合を生化学的、細胞生物学的に解析し、*dysbindin-1* の新規機能を同定し、統合失調症発症の分子基盤の一端を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) *Dysbindin-1* とサイクリン D の結合の生化学的解析

COS 細胞に FLAG タグのついた *dysbindin-1* およびサイクリン D をリポフェクション法により遺伝子導入し、48 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液に抗 *dysbindin* 抗体を加え免疫沈降を行い、沈降物を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により分離後、抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。

### (2) 細胞周期進行に伴う *dysbindin-1* とサイクリン D1 の局在の変化

NIH3T3 細胞を 0.1% のウシ血清を含む培地で 48 時間培養した後に、10% 血清を含む培地を加え、4 時間後、8 時間後に細胞を固定した。その後、抗 *dysbindin* 抗体および抗サイクリン D1 抗体により二重染色を行い、*dysbindin-1* およびサイクリン D1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

### (3) 核での局在に必要な *dysbindin-1A* の分子内領域の同定

PCR 法により *dysbindin-1A* の 97、104、111、

118 番目のロイシンをセリンに置換した変異体を作製した。FLAG タグのついた野生型および変異体 *dysbindin-1A* をリポフェクション法により NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、48 時間後に細胞を固定した。一部の実験では、核外移行阻害剤であるレプトマイシン B を 6 時間作用させた後に固定した。抗 FLAG 抗体による免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

### (4) *Dysbindin-1* によるサイクリン D1 の局在制御

NIH3T3 細胞に GFP-サイクリン D1 を単独、あるいは FLAG-*dysbindin-1A* と共に遺伝子導入し、48 時間後に細胞を固定した。その後、抗 GFP 抗体と抗 FLAG 抗体による蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) *Dysbindin-1* とサイクリン D の結合の生化学的解析

*Dysbindin-1* には 3 種類のアイソフォーム (*dysbindin-1A*、*-1B*、*-1C*) が知られている。サイクリン D にはサイクリン D1、D2、D3 の 3 種類のファミリー分子がある。そこで、これらの分子を様々な組み合わせで COS 細胞に発現させ、免疫沈降法により解析したところ、サイクリン D1 は、すべての *dysbindin-1* アイソフォームと結合したが、中でも *dysbindin-1A* と最も効率よく複合体を形成していた。一方、サイクリン D2、D3 と *dysbindin-1A* との複合体形成も見られたが、サイクリン D1 の場合と比較してそれらの結合は弱い傾向にあった。また、*dysbindin-1B*、*-1C* とサイクリン D2、D3 の複合体形成は検出できなかった。これらのことから、各種の分子の中でも、*dysbindin-1A* とサイクリン D1 が最も強く結合していると考えられた。

### (2) 細胞周期進行に伴う *dysbindin-1* とサイクリン D1 の局在の変化

血清飢餓により NIH3T3 細胞の細胞周期を同調させた後に、血清を加えて培養したところ、既報の通り、4-8 時間後にサイクリン D1 の発現は著しく増加していた。それに対して、*dysbindin-1* の発現は変化が見られなかった。蛍光抗体法により *dysbindin-1* とサイクリン D1 の局在を解析したところ、血清飢餓状態では、サイクリン D1 は、主に細胞質に弱く発現しており、血清添加後 8 時間では多くの細胞で核での局在が見られた (図 1)。一方 *dysbindin-1* は、血清飢餓状態および血清添加後にも多くの細胞で細胞質での局在が見られたが、一部の細胞では核での局在も見られ、部分的ではあったがサイクリン D1 の局在と一致していた (図 1)。これらのことから、*dysbindin-1* とサイクリン D1 は、細胞周期の進行に依存して結合している可能性が考えられた。

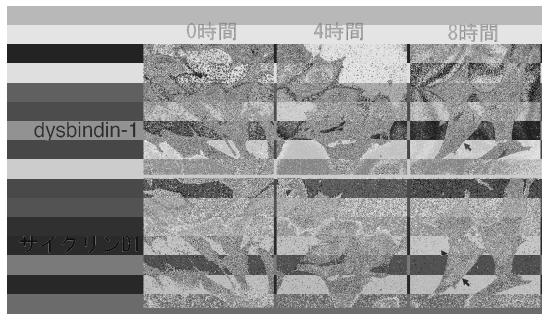


図 1. NIH3T3 細胞の細胞周期進行に伴う dysbindin-1 およびサイクリン D1 の局在変化. 48 時間の血清飢餓処理の後、血清を加えて図中に示した時間培養した。矢印：細胞質および核で dysbindin-1 とサイクリン D1 が共局在する細胞。矢頭：おもに細胞質で dysbindin-1 とサイクリン D1 が共局在する細胞。

### (3) 核での局在に必要な dysbindin-1A の分子内領域の同定

(2) の実験から、dysbindin-1 は一部核へ局在することがわかった。Dysbindin-1A の N 末端側の領域には、ロイシンに富む構造があり、この配列は、核外移行シグナルとして機能する可能性があると考えられたため、アミノ酸配列の変異体を作製し、細胞内局在を検討した。その結果、野生型 dysbindin-1A は、主に細胞質に局在が見られたが、変異体 dysbindin-1A は細胞質での局在に加えて核での局在がみられることがわかった (図 2)。この局在は、野生型を発現した細胞に、核外移行阻害剤であるレプトマイシン B を作用させた場合とよく似ていた (図 2)。これらのことから、dysbindin-1A の N 末端側に存在するロイシンに富む構造は、核外移行シグナルとして機能すると考えられた。

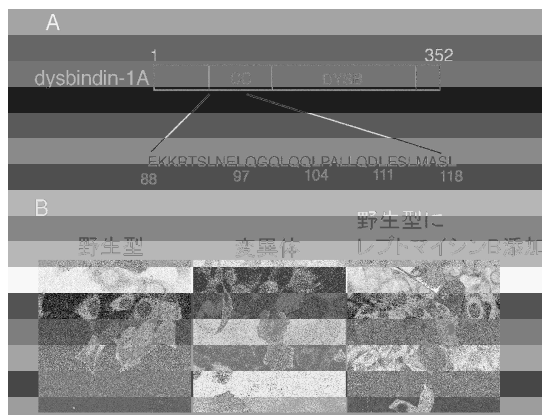


図 2. 核局在を制御する dysbindin-1A の分子内領域の同定. (A) Dysbindin-1A の分子構造. 核外移行シグナルとして機能すると予想される部位を拡大. 変異させたロイシン残基 (L) を太字で表示. CC: コイルド-コイル領域, DYSB: dysbindin ドメイン. (B)

NIH3T3 細胞に野生型, 変異体を発現させたときの局在および野生型を発現させた細胞にレプトマイシン B を作用させたときの局在。

### (4) Dysbindin-1 によるサイクリン D1 の局在制御

NIH3T3 細胞に GFP-サイクリン D1 を発現させ、その局在を蛍光抗体法により解析したところ、核で強く発現が見られる細胞と核および細胞質での局在が見られる細胞が存在していた。このとき、dysbindin-1 を共発現させると、GFP-サイクリン D1 は、多くの細胞で細胞質に強く発現が見られた。これらのことから、dysbindin-1 はサイクリン D1 の細胞内局在を制御している可能性があると考えられた。

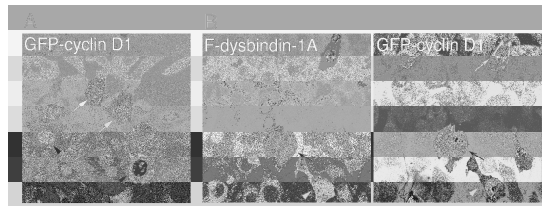


図 3. Dysbindin-1A の発現によるサイクリン D1 の細胞内局在の変化. NIH3T3 細胞に GFP-サイクリン D1 を単独 (A) あるいは FLAG-dysbindin-1A と共に発現させた (B). 矢印: GFP-サイクリン D1 が細胞質および核に発現している細胞、矢頭: GFP-サイクリン D1 が核に発現している細胞。

### (5) 今後の展望

これまでの解析により、dysbindin-1 とサイクリン D1 の結合の性状は明らかとなったが、生理学的意義の直接的な解明には至っていない。サイクリン D1 は、主要な細胞周期調節因子であり、細胞周期依存的な dysbindin-1 とサイクリン D1 の共局在が見られることなどから、dysbindin-1 が細胞周期の進行に何らかの役割を果たしていると考えられる。今後、dysbindin-1 の発現抑制、あるいは過剰発現により哺乳動物細胞の細胞周期の進行が影響されるか検討する必要があると考えている。また、サイクリン D1 には、細胞運動や細胞死の制御などの機能も知られていることから、これらの機能に対する dysbindin-1 の影響についても解析を進めていく必要があると考えている。

### 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 14 件)

- Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata KI. (2015) Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci Res.* 92:21-28. (査読有)

- DOI: 10.1016/j.neures.2014.10.017.
- ② Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, Momoi MY, Tabata H, Yamagata T, Nagata KI. (2015) Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *J Neurochem*. 132:61-69. (査読有)  
DOI: 10.1111/jnc.12943.
- ③ Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K. (2014) Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*. 24:1449-1457. (査読有)  
DOI: 10.1002/hipo.22325.
- ④ Joliot V, Ait-Mohamed O, Battistl V, Pontis J, Philipot O, Robin P, Ito H, Ait-Si-Ali S. (2014) The SWI/SNF subunit/tumor suppressor BAF47/INI1 is essential in cell cycle arrest upon skeletal muscle terminal differentiation. *PLoS One*. 9:e108858. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0108858.
- ⑤ Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata K. (2014) SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med*. 6:414-429. (査読有)  
DOI: 10.1002/emmm.201303069.
- ⑥ Ito H, Morishita R, Tabata H, Nagata K. (2014) Roles of Rho small GTPases in the tangentially migrating neurons. *Histol Histopathol*. 29:871-879. (査読有)  
DOI: なし
- ⑦ Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Kawamoto S, Tabata H, Nagata K. (2013) Biochemical and morphological characterization of A2BP1 in neuronal tissue. *J Neurosci Res*. 91:1303-1311. (査読有)  
DOI: 10.1002/jnr.23266.
- ⑧ Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Mizuno M, Nagata K. (2013) MAGI-1 acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1833:2302-2310. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bbamer.2013.06.005.
- ⑨ Yamauchi M, Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Murai T, Kajita K, Ishizuka T, Nagata K. (2013) Localization of multidomain adaptor proteins, p140Cap and vinexin, in the pancreatic islet of a spontaneous diabetes mellitus model, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Med Mol Morphol*. 46:41-48. (査読有)  
DOI: 10.1007/s00795-013-0008-1.
- ⑩ Mizutani Y, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Kanoh H, Seishima M, Nagata KI. (2013) Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol Chem*. 394:281-290. (査読有)  
DOI: 10.1515/hsz-2012-0258.
- ⑪ Ito H, Morishita R, Sudo K, Nishimura YV, Inaguma Y, Iwamoto I, Nagata KI. (2012) Biochemical and morphological characterization of MAGI-1 in neuronal tissue. *J Neurosci Res*. 90:1776-1781. (査読有)  
DOI: 10.1002/jnr.23074.
- ⑫ Murase K, Ito H, Kanoh H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Soubeyran P, Seishima M, Nagata K. (2012) Cell biological characterization of a multidomain adaptor protein, ArgBP2, in epithelial NMuMG cells, and identification of a novel short isoform. *Med Mol Morphol*. 45:22-28. (査読有)  
DOI: 10.1007/s00795-010-0537-9
- ⑬ 平林智樹、大塚健三、永田浩一、伊東秀記. (2012) 統合失調症と dysbindin. 中部大学生物機能開発研究所紀要 12, 7-14. (査読無)  
DOI: なし
- ⑭ 伊東秀記. (2012) 統合失調症脆弱性因子 dysbindin-1 の生理機能. 神経化学 51, 3-9. (査読無)  
DOI: なし
- [学会発表] (計 27 件)
- ① 永田浩一, 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子: 発達期におけるマウス海馬神経細胞のイメージング技術開発. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2014. 10. 17. (TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター, 東京都新宿区)
- ② 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: 生後発達期のマウス海馬歯状回における神経新生の分子機構. 日本生化学会大会. 2014. 10. 16. (国立京都国際会館, 京都府京都市)
- ③ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: エレクトロポレーション法による生後マウス海馬歯状回における神経新生の解析. 日本神経化学会大会. 2014. 10. 1. (奈良県文化会館, 奈良県奈良市)
- ④ 永田浩一, 浜田奈々子, 伊東秀記, 田畑秀典: 自閉症原因遺伝子 A2BP1 の大脳皮質形成における機能解析. 日本神経化学会大会. 2014. 10. 1. (奈良県文化会館, 奈良県奈良市)
- ⑤ 伊東秀記: 神経発達障害関連分子の機能解析. 日本薬学会東海支部特別講演会. 2013. 12. 17. (金城学院大学, 愛知県名古屋)

- ⑥ Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Tabata H: Biochemical and morphological characterization of an autism-related molecule, A2BP1, in developing cerebral cortex. 米国細胞生物学会. 2013. 12. 15. (ニューオリンズ, 米国)
- ⑦ Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Tabata H: Biochemical and morphological characterization of A2BP1 in the neuronal tissue. 米国神経科学会. 2013. 11. 12. (サンフランシスコ, 米国)
- ⑧ 永田浩一, 稲熊 裕, 浜田奈々子, 水野 誠, 伊東秀記, 田畑秀典: 共焦点ライブイメージングによる大脳皮質形成障害の分子病態解析. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2013. 9. 12. (アクロス福岡, 福岡県福岡市)
- ⑨ 伊東秀記, 森下理香, 田畑秀典, 岩本郁子, 永田浩一: 生後マウス脳における神経新生の形態学的解析. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2013. 9. 12. (アクロス福岡, 福岡県福岡市)
- ⑩ 浜田奈々子, 稲熊 裕, 田畑秀典, 伊東秀記, 水野 誠, 永田浩一: ライブイメージングを用いた大脳皮質形成障害の病態メカニズム解析. 日本生化学会大会. 2013. 9. 11. (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)
- ⑪ 伊東秀記, 森下理香, 田畑秀典, 岩本郁子, 永田浩一: 低分子量Gタンパク質による生後脳における神経新生の制御. 日本生化学会大会. 2013. 9. 11. (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)
- ⑫ 永田浩一, 稲熊 裕, 浜田奈々子, 田畑秀典, 西村嘉晃, 伊東秀記, 水野 誠, 岩本郁子, 森下理香, 鈴木基正, 熊谷俊幸: マリネスコ・シェーグレン症候群における大脳皮質形成障害の分子病態機構. Neuro2013. 2013. 6. 22. (国立京都国際会館, 京都府京都市)
- ⑬ 浜田奈々子, 伊東秀記, 岩本郁子, 水野誠, 森下理香, 稲熊裕, Sachiyo Kawamoto, 田畑秀典, 永田浩一: 神経組織におけるA2BP1の生化学的、形態学的な特性評価. Neuro2013. 2013. 6. 21. (国立京都国際会館, 京都府京都市)
- ⑭ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: 嗅球における神経新生を制御する分子機構の解析-in vivo エレクトロポレーション法の応用. Neuro2013. 2013. 6. 21. 国立京都国際会館, 京都府京都市)
- ⑮ Nagata K, Inaguma Y, Nishimura YV, Ito H, Suzuki, M, Hamada N, Mizuno N, Iwamoto I, Morishita M, Kumagai T: SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. 米国細胞生物学会. 2012. 12. 17. (サンフランシスコ, 米国)
- ⑯ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: Dysbindin-1 と結合する分子の探索と性状機能解析. 日本生化学会. 2012. 12. 15. (福岡国際会議場, 福岡県福岡市)
- ⑰ Nagata K, Inaguma Y, Nishimura YV, Taguchi A, Ito H, Suzuki, M, Hosokawa M, Kumagai T: Essential role of SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, in the neuronal migration during corticogenesis. 米国神経科学会. 2012. 10. 17. (ニューオリンズ, 米国)
- ⑱ Ito H, Nagata K: Dysbindin-1 regulates the dendritic spine formation: Evidence supporting the neurodevelopmental hypothesis. アジアー太平洋神経化学会. 2012. 10. 2. (神戸国際会議場, 兵庫県神戸市)
- ⑲ Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K: MAGI-1 controls the NGF-activated signal pathway and regulates neurite extension. アジアー太平洋神経化学会 2012. 9. 30. (神戸国際会議場, 兵庫県神戸市)
- ⑳ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: 神経系組織におけるMAGI-1の性状機能解析. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2012. 9. 29. (高知市文化プラザかるぼーと, 高知県高知市)
- ㉑ 永田浩一, 水谷陽子, 伊東秀記, 岩本郁子, 森下理香, 加納宏行, 清島真理子: セプチンSEPT1は有棘細胞癌DJM-1細胞の接着に関与する. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2012. 9. 28. (高知市文化プラザかるぼーと, 高知県高知市)
- ㉒ Nagata K, Nishimura YV, Ito H, Taguchi A, Suzuki M, Iwamoto I, Morishita, R, Hosokawa M, Kumagai T, Inaguma Y: SIL1, a causative gene for Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. 欧州神経科学連合フォーラム. 2012. 7. 16. (バルセロナ, スペイン)
- ㉓ 西村嘉晃, 稲熊裕, 田口紋子, 伊東秀記, 永田浩一: Angiogenesis in the developmental cortex. 日本血管生物医学学会学術集会. 2011. 12. 11. (東京ステーションコンファレンス, 東京都千代田区)
- ㉔ Ito H, Morishita R, Nishimura YV, Shinoda T, Iwamoto I, Nagata K: Functional analysis of Dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine. 米国細胞生物学会. 2011. 12. 6. (デンバー, 米国)
- ㉕ 伊東秀記, 森下理香, 西村嘉晃, 篠田友靖, 岩本郁子, 須藤香織, 永田浩一: 神経突起伸長におけるMAGI-1の機能解析. 日本生化学会大会. 2011. 9. 23. (国立京都国際会館, 京都府京都市)

- ②⑥ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Nagata K: A Novel function of Dysbindin-1, a schizophrenia risk factor, supporting neurodevelopmental hypothesis. 国際神経化学会学術集会サテライトシンポジウム “The Glutamatergic Synapse” 2011. 9. 3. (イラクリオン, ギリシャ)
- ②⑦ Nagata K, Shinoda T, Nishimura YV, Ito H: Role of the septin in neural cell migration during brain development. 国際神経化学会学術会議シンポジウム “Septin Research and Neuronal Disease” 2011. 8. 31. (アテネ, ギリシャ)

[その他]

発達障害研究所ホームページ

<http://www.inst-hsc.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 秀記 (ITO HIDENORI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所  
神経制御学部・主任研究員

研究者番号：40311443