

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790291

研究課題名（和文）

Dysbindinによる神経伝達物質受容体輸送メカニズムの解析

研究課題名（英文）

Analysis for mechanisms of neurotransmitter transport via Dysbindin

研究代表者

飯塚 幸彦 (IIZUKA YUKIHIKO)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：00365404

研究成果の概要（和文）：

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の一つである DISC1 に焦点を当て、その生理機能や分子間ネットワークを解明することにより、統合失調症の原因および病態の解明を試みた。まず、網羅的な DISC1 の新規結合分子の同定を LC-MS/MS の手法を用いて行った。その結果、V-ATPase 複合体を同定し、さらなる解析の結果、DISC1 と V-ATPase 複合体構成タンパクの直接結合を示した。そして、我々が作製した DISC1 ノックアウトマウスを用いた解析により、シナプス小胞上に存在する V-ATPase 複合体構成タンパクの減少が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Although the etiological mechanisms of psychiatric disorders, such as schizophrenia, remain largely esoteric, multiple hypotheses (e.g. dysfunction of dopamine, glutamate or serotonin, neurodevelopmental disorders, stress during pregnancy and viral infection) have been proposed. The dissection of molecular pathways centered on promising risk factors, such as Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1), may help us achieve a better understanding of the pathogenesis of these disorders. In this study, I identified a novel interacting protein complex, V-ATPase, as a partner of DISC1. I found significant protein reduction of a couple of V-ATPase subunits in synaptic vesicle fractions isolated from the DISC1-deficient mice compare to proteins isolated from the wildtype mice.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：精神神経疾患、統合失調症、脆弱性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約1%が罹患する重篤な精神神経疾患であり、その多くが思春期から青年期にかけて発症することは知られているが、発症原因、発症機序、またその分子病態に関してはいまだ不明な点が多い。発症要因としては、環境因子の関与や神経発達期の異常も考えられているが、双生児研究により、発症には何らかの遺伝的因子が働くことが知られており、連鎖解析や関連解析、近年の大規模な Genome-wide association 解析などの遺伝学的解析から、Neureglin や Dysbindin、ZNF804A などとともに有力な発症脆弱性因子の一つとして DISC1 遺伝子が同定されている。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、その後の研究で神経細胞の遊走、軸索形成、シナプス形成に関与が示されている。また、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。近年、DISC1 は足場タンパク質としての機能が着目され、生理機能の解明にあたり新たな相互作用分子の模索もされている。

統合失調症の分子病態の仮説として、ドーパミン仮説やグルタミン酸仮説といったものが挙げられるが、これらはシナプス小胞から放出される神経伝達物質であり、それらの異常は、シナプス小胞に関連する分子の異常によるものである可能性も考えられる。また、神経発達障害仮説においても、神経栄養因子などの放出異常により、正常な神経発達、脳形成を阻害している可能性も予想される。近年、DISC1 がシナプス小胞の輸送や、神経伝達物質の放出制御に関わることも示唆さ

れているが、これらの分子メカニズムに関しては解明されていない。小胞の生理的な形成や輸送、放出などの解析が、統合失調症の分子病態の解明に繋がることが期待される。

## 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の一つである DISC1 に焦点を当て、その生理機能や分子間ネットワークを解明することにより、統合失調症の原因および病態の解明を目指す。最近の研究により我々は、DISC1 の新たな結合分子として液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) 複合体を同定しており、これらが DISC1 の新規の生理機能に関わる可能性を見出した。この知見をもとに、生化学的、細胞生物学的手法により解析を進め、また近年我々が作製した DISC1 ノックアウトマウスを用いることで、*in vivo* の脳内での液胞型プロトン ATPase に関連する分子動態の解明を行い、統合失調症の分子病態解明に努める。

V-ATPase はこれまでの研究により、シナプス小胞および有芯小胞の膜上に存在し、ATP の加水分解によるエネルギーで H<sup>+</sup>を小胞内に輸送し pH を制御する機能が明らかにされており、この機能は、小胞内に神経伝達物質や神経栄養因子を取り込む上で必須であることが知られている。上記の通り、神経細胞内において DISC1/V-ATPase の相互作用が存在し、DISC1 が V-ATPase の機能を制御していると仮定すると、シナプス小胞ならびに有芯小胞への影響が考えられる。そこで、pH 感受性蛍光タンパク質を用い、各小胞の酸性化の解析を行う。DISC1 は、発生期の神

経細胞でのみ強く発現する分子であることが示されているので、神経特異的な機能を有すると仮定すると、リソソームやエンドソームに対する V-ATPase を介した影響においては少ないと考え、対照とすることも考えている。また、DISC1 はこれまでの報告により、足場タンパク質として、微小管とキネシンを介したタンパク質の軸索輸送にも関わっていることが示されているので、シナプス小胞および有芯小胞の細胞内での輸送に関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。さらに、培養神経細胞からのグルタミン酸やドーパミンなどの神経伝達物質ならびに、BDNF などの神経栄養因子の放出を生化学的な手法により解析する。

### 3. 研究の方法

有力な統合失調症発症脆弱性因子の一つである DISC1 に焦点を当て、その生理機能や分子間ネットワークを解明する。まず、網羅的な分子間ネットワーク解析のために、高精度かつ高感度な LC-MS/MS 装置を用い、DISC1 結合分子を同定する。

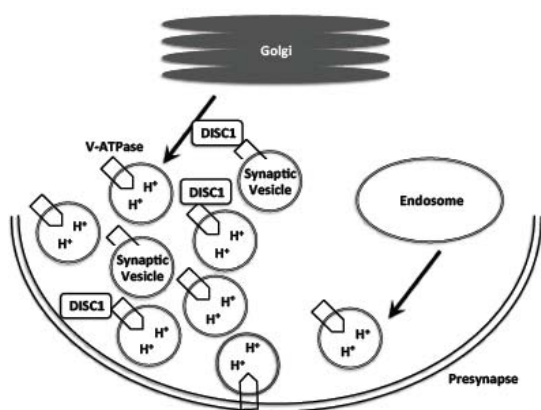
DISC1 と同定した分子の相互作用を、強制発現系における生化学的な解析においても確認する。また、マウス初代培養神経細胞を用い、生化学的な手法により神経細胞内での相互作用を確認するとともに、共焦点レーザー顕微鏡や経時的解析の手法を用いて DISC1/V-ATPase の相互作用の局在を特定する。さらに、その局在が細胞内のどの組織にあるかを各種オルガネラマーカーを用いて解析していく。さらに、DISC1 のノックダウンや DISC1 ノックアウトマウス由来の神経細胞を用いて、V-ATPase の局在を解析し、DISC1 による V-ATPase の制御について検討する。

### 4. 研究成果

網羅的な相互作用分子の探索を行ったところ、DISC1 の新たな結合分子として液胞型プロトン ATPase 複合体 (V-ATPase) の構成分子を同定した。V-ATPase は、エンドソーム、リソソーム、ゴルジ体、シナプス小胞、有芯小胞などの各種小胞体に存在し、ATP の加水分解によるエネルギーを使ってプロトン ( $H^+$ ) を小胞内に輸送し pH を調節する働きを有する分子複合体として知られている。とりわけ、神経細胞において V-ATPase は、シナプス小胞および有芯小胞膜上に存在し、それら小胞を酸性化することにより、グルタミン酸、ドーパミン、GABA などの神経伝達物質や神経ペプチド、神経ホルモンの小胞内への取り込みを制御するという重要な役割を果たしている。

In vitro での解析において、DISC1 と直接結合をする V-ATPase サブユニット同定を行ったところ、小胞膜表面上で  $V_0$  セクターと  $V_1$  セクターを結びつける軸として働く、ATP6V1D が強く結合することが示された。

当研究室で作製した DISC1 ノックアウトマウスを用いて、V-ATPase 複合体のそれぞれのサブユニットの神経細胞内での局在をイムノプロット法を用いて検討したところ、野生型マウスと比較し、膜画分である P2 画分では違いが認められなかったが、粗シナプス小胞画分において、野生型と比較し DISC1 ノックアウトマウスでは、ATP6V1D の局在が減少していることが示された。このことは、DISC1 欠損による V-ATPase を介した神経伝達物質放出機構への影響を示唆し、新たな統合失調症の分子病態を説明する機序である可能性が示された。



## 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1件)

- (1) 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, and Kaibuchi K: Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the DISC1 gene in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 2011, 20(23), 4666-4683 査読:有 DOI: 10.1093/hmg/ddr400

[学会発表] (計2件)

- (1) Iizuka Y, Sharmin A, Tsuboi D, Mori D, Kuroda K, Nishioka T, and Kaibuchi K: Comprehensive proteomic analysis reveals novel binding partners of DISC1, a candidate risk gene of Schizophrenia. 第44回日本神経学会大会, 名古屋, 2012/9/26-29
- (2) Iizuka Y, Kinoshita T, Tsuboi D, Mori

D, Kuroda K, and Kaibuchi K: Proteomic analysis reveals novel binding partner of DISC1, a candidate risk gene of Schizophrenia. 第43回日本神経学会大会, 横浜, 2011/9/18-21

[図書] (計1件)

- (1) 黒田啓介, 飯塚幸彦, 貝淵弘三: 統合失調症の動物モデル. 羊土社, 実験医学増刊号 in vivo 実験医学によるサイエンスと疾患解明, 2012, 30(2), 231-235.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯塚 幸彦 (IIZUKA YUKIHIKO)  
名古屋大学・医学系研究科・研究員  
研究者番号: 00365404

### (2) 研究分担者なし

### (3) 連携研究者なし