

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 文昭

統合失調症は、生涯罹患率約 1% という極めて一般的な病気である。妄想、幻覚、思考障害、感情の平板化、意欲の減退といった精神機能の異常が数カ月から数年の単位で繰り返され、次第に悪性化していく慢性型の精神疾患である。発症機構の詳細は不明であるが、病態生理の背景として、神経伝達の異常、脳神経系の発達障害、遺伝的要因の関与等が指摘されている。統合失調症は家系集積性があることから、発症には遺伝的脆弱性が存在すると考えられ、現在では候補原因遺伝子を対象とした解析から病態機構の解明を目指す試みがなされ始めている。既に報告されている候補遺伝子の中でも、均衡型染色体転座と精神疾患が連鎖するイギリススコットランドのある大家系で、その転座点に存在する遺伝子として単離された *DISC1* (*Disrupted In Schizophrenia-1*) 遺伝子は、統合失調症への関与が強く示唆される遺伝子であり、病態の分子機構と候補遺伝子産物の機能的関連性を検討することが可能であると考えられ、特に注目を集めている。

本論文は、有力な統合失調症候補遺伝子産物 *DISC1* が神経伝達物質開口放出の制御因子である *syntaxin1* と複合体を形成することで、開口放出の制御機構に関与していることを示し、統合失調症の病態分子機構の解明に新たな知見をもたらしたものである。

第 1 章では *DISC1* を特異的に認識する抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現をウェスタンブロット法により解析した。ヒト全脳、海馬体、及び様々なヒト組織由来の培養細胞で発現が確認され、*DISC1* は組織普遍的に発現していることが示された。また、ヒト海馬体凍結切片を用いた免疫組織化学的解析から、*DISC1* の発現は特に歯状回で強いことが明らかになった。*DISC1* は coiled-coil 構造を有することから、多量体形成能の有無を、免疫沈降実験、*in vitro* 結合実験、及び細胞免疫染色により検討した。その結果、*DISC1* は多量体を形成することが判明した。さらに、転座を持つキャリアーで発現していると考えられているカルボキシル末端側 257a. a. を欠失した *DISC1* Δ C 変異体は野生型 *DISC1* と結合可能であること、培養細胞に野生型 *DISC1* と *DISC1* Δ C 変異体を共発現させると野生型 *DISC1* は本来の局在と異なり、*DISC1* Δ C 変異体と同じ局在を示すことから、*DISC1* Δ C 変異体は野生型 *DISC1* の機能を阻害する可能性が示唆された。

第 2 章では yeast two-hybrid 法により、*DISC1* に結合する因子として神経伝達物質開口放出機構の制御因子である *syntaxin1A* を同定した。*In vitro* 結合実験の結果、*DISC1* と *syntaxin1A* との結合は直接的なものであると確認された。ヒト *DISC1* と相同性の低いマウス *DISC1* も *syntaxin1A* に結合可能であることから、*DISC1* と *syntaxin1A* の結合は種間で保存されていると考えられ、両者の結

合の重要性が示唆された。DISC1 が結合する syntaxin1A の SNARE motif は、SNAP-25、VAMP2 との SNARE 複合体形成に必須であるばかりでなく、様々な開口放出制御タンパク質の結合領域としても知られていることから、DISC1 も開口放出制御因子である可能性が示唆された。次に、DISC1 と syntaxin1A を共発現させた HEK293T 細胞を用いた免疫沈降実験より、DISC1 と syntaxin1A は細胞内においても複合体を形成していることが確認された。マウス海馬神経初代培養細胞の免疫二重染色より、DISC1 と syntaxin1 は神経突起の膨大部、末端部で部分的に共局在することが明らかになった。また、ヒト海馬体凍結切片を用いた免疫二重染色より、歯状回顆粒細胞で両者の部分的な共局在が確認された。以上の結果より、DISC1 と syntaxin1 は生体内において複合体を形成していると考えられた。

第3章では DISC1 と syntaxin1A の結合がいかなる生理的機能を持つのか、神経伝達物質の開口放出機構に焦点を当て解析をしている。DISC1 は SNAP-25、及び VAMP2 と syntaxin1A の結合領域が重複することから、結合の競合性が見られるかどうかを検討した。その結果、予想通りの競合活性が確認され、さらに *in vitro* において DISC1 は SNARE 複合体の形成を阻害することが示された。次に、syntaxin1A 単独に比べ DISC1 が結合した syntaxin1A は他の制御因子に対していかなる結合活性を示すのか、マウス脳組織溶解液を用いた共沈実験により検討したところ、SNAP-25、VAMP2 のみならず、Munc-18 の結合量も減少していることが明らかになった。つまり、DISC1 は SNARE 複合体の形成を阻害するだけでなく、syntaxin1A の構造を変化させる活性を有するのではないかと考えられた。最後にラット副腎随質クロム親和性細胞腫由来の PC12 細胞に、神経伝達物質と同様な過程で放出されるヒト成長ホルモンを DISC1 と共に発現させ、DISC1 がヒト成長ホルモンの分泌にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果、DISC1 はヒト成長ホルモンの分泌を抑制することが明らかになった。ゆえに、DISC1 は syntaxin1 と結合することで開口放出を制御する因子であると考えられた。

以上、本論文は、統合失調症候補遺伝子産物 DISC1 が syntaxin1 に結合し、神経伝達物質の開口放出を制御していることを新たに示したものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。