

氏 名 (本 籍) 尾 關 祐 二 (大阪府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 1 6 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1) : Mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth

(変異により切断された Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1) は NudE-like (NUDEL) と結合できず、神経突起の伸長を阻害する)

審 査 委 員 主 査 教 授 工 藤 基

副 査 教 授 松 田 昌 之

副 査 教 授 可 児 一 孝

論文内容要旨

※整理番号	319	氏 <small>(ふりがな)</small> 名	あせき ゆう い 尾崎 祐二
学位論文題目	Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1) : Mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth (変異により切断された Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1) は NudE-like (NUDEL) と結合できず、神経突起の伸長を阻害する)		
<p>目的：</p> <p>スコットランドにおける精神疾患多発単一家系を対象とした遺伝学的研究より、精神疾患とt(1;11)(q42.1;q14.3)の転座との関係が LOD スコア 7.1 であることが明らかになった。(転座を保有する 29 人中 21 例が精神疾患を呈し、うち 7 名は統合失調症であった。転座を持たない例では精神疾患は見られなかった)。その後の研究により、この転座は新規に発見された <i>disc-1</i> (Disrupted-In-Schizophrenia-1) 遺伝子の C 末端側にある 257 個のアミノ酸情報を欠失させていることが明らかになった(この C 末端アミノ酸を欠失した DISC-1 を以後 truncated DISC-1 とする)。こうした報告より、<i>disc-1</i> は精神疾患と関連していると考え、この遺伝子より転写、翻訳されるタンパクの機能解析を目的として研究を開始した。具体的には以下の通り。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 今後の DISC-1 タンパクの機能検索のために、実験対象としてマウス、ラットが使用できるかを検討する目的で、マウス、ラットで、相同遺伝子の存在確認をし、その配列を決定する。 2. ラットにおける DISC-1 の全身での発現の確認、今後の研究の素地とするための培養細胞での発現を確認する。 3. DISC-1 タンパクの機能を推定する目的で、DISC-1 タンパクと相互作用をするタンパクを検索する。 4. 培養細胞に DISC-1 タンパクを強制発現させることで、タンパクの機能を推測する。 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2 千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

方法:

1. ヒト DISC-1 の遺伝子配列を元に、インターネット上のマウス遺伝子データベースと比較し、相同と考えられる遺伝子配列をみいだす。データベース上にないものに関しては、cDNA ライブラリーより PCR 法にて目的部分を増幅し、シークエンスを行い遺伝子配列を決定した。また、マウスの遺伝情報を元に、PCR 法を用いてラットでの DISC-1 シークエンスを決定した。
2. 3 種の DISC-1 タンパク断片より、ウサギを用いて抗 DISC-1 抗体を作成した。こうして作成した抗体を用いてラット臓器及び培養細胞を対象にウエスタンブロッティングを行った。
3. DISC-1 タンパクと相互作用するタンパクの検索には、イースト 2-ハイブリッド法を用いた。DISC-1 の遺伝子配列を pDBBlue 内にライゲーションし、cDNA ライブラリーがライゲーションされている pPC86 とともに酵母内にトランスフォーメーションした。特殊な培地を用いて相互作用をする可能性のある遺伝情報を含む酵母をセレクションし、その遺伝情報を検出した。
4. 神経成長因子を加えることで神経突起様の突起を伸長させる、副腎髄質由来の培養細胞 PC12 を用いた。PC12 に正常の DISC-1 及び truncated DISC-1 を強制発現させ、神経成長因子を付加したときの変化を比べた。DISC-1 タンパクが発現している細胞では、同時に GFP タンパクを発現するようにし、蛍光顕微鏡下で細胞の形態観察を可能とした。対象群では、GFP のみを発現させた。

結果:

1. ラット及びマウスで、*disc-1* と相同な遺伝子の存在が証明された。ヒトとラットやマウスとの相同性は70%程度であった。
2. ラット臓器を用いたウエスタンブロッティングでは、遺伝子配列より予測された100kDa 程度のものと75kDa 程度の2種類のタンパクが見られ、DISC-1 の一部が何らかの修飾を受けているなどの可能性が考えられた。
いずれにせよ、DISC-1 は中枢神経系に発現しており、特に胎生 20 週で強い発現が見られた。培養細胞では HeLa に強い発現が見られた。
3. イースト 2-ハイブリッド法で DISC-1 と相互作用をする可能性のあるタンパクが複数見出された。これらのうち多くは細胞骨格と関連するものであった。イースト 2-ハイブリッド法を用い、DISC-1 と NUDEL (NudE-like) が確かに結合すること、結合には DISC-1 の C 末端と NUDEL の後半部分が必要であることを見出した。(NUDEL は神経細胞の移動に関連する)
4. PC12 細胞に DISC-1 を強制発現させる実験では、truncated DISC-1 は突起伸長を妨げることが見出された。

考察：

以上の結果より、*disc-1* はマウスやラットにも相同遺伝子が存在し、中枢神経系に発現していることが証明された。また、DISC-1 は神経発達に関係しており、truncated DISC-1 は神経発達を阻害する可能性があることを見出した。神経病理学的研究や画像研究などより、統合失調症の原因は胎生期の神経発達障害に起因するという説が提出されているが、DISC-1 はこの仮説を説明する可能性がある。

結論：

DISC-1 は神経発達に関連しており、DISC-1 の障害による神経発達障害が統合失調症の原因の一因である可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	319	氏名	尾關 祐二
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究では、精神疾患多発家系より異常が見出された DISC-1 タンパクの生物学的意味合いを PCR、ウエスタンブロットティング、イースト 2-ハイブリッド法などを用い、分子生物学的に解析した。</p> <p>解析の結果、ラット及びマウスで、<i>disc-1</i> と相同な遺伝子が存在することが証明された。また、DISC-1 は中枢神経系に発現しており、特に胎生 20 週で強く発現していること、培養細胞では HeLa に強い発現が見られることがわかった。</p> <p>さらには、DISC-1 と相互作用をする可能性のあるタンパクの多くが細胞骨格と関連するものであること、DISC-1 は神経細胞の移動に関連するタンパクである NUDEL と結合すること、本来は刺激により神経細胞突起様の突起を伸長する PC12 細胞に異常 DISC-1 タンパクを発現させると、突起伸長が妨げられることを見出した。</p> <p>こうした結果は、神経発達の障害が統合失調症の原因であるとする仮説と矛盾せず、妥当な結果と考えられた。</p> <p>以上の結果、本発表は博士 (医学) の学位に値すると認められた。</p>			
(平成 16 年 2 月 4 日)			