OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and characterization of a novel splice variant of disrupted in schizophrenia 1 (Disc1)
Author(s)	宮武, 祐樹
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52076
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（宮武　祐樹）	
論文題名	Identification and characterization of a novel splice variant of *disrupted in schizophrenia 1 (Disc1)* （*disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)* の新規スプライス変異体の同定とその特徴に関する解析）

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

精神疾患リスク分子Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) は2000年、スコットランドの精神疾患多発家系で確認された染色体の転座によって分断された遺伝子として同定された。DISC1はDisc1 biding zinc finger protein (DBZ) やkendrin、fasciculation and elongation protein zeta 1 (FEZ1) など多数の因子との結合を介し、神経細胞の増殖・移動・突起伸展・分化などの神経細胞の基本的な機能を担っている。

一方、DNAからmRNAを介しタンパク質が産生される過程において、選択するエクソン、除去するイントロンのパターンを変える事で1種類の前駆体mRNAから複数種の成熟mRNAを産生する選択的スプライシング機構が知られている。また、本機構の結果、1種類の遺伝子から配列の異なる複数種のタンパク質、選択的スプライシング変異体が産生される事が知られている。

DISC1には多数のスプライシング変異体が存在する可能性が示唆されている。また、DISC1選択的スプライシング変異体の一部は統合失調症患者群で健常者群よりmRNA発現量が亢進していたとの報告もあり、選択的スプライシング変異体と発症機序には何らかの関係がある事が想定される。その機序解明のために、未同定のDisc1選択的スプライシング変異体の特徴・機能を調べる重要性が指摘されている。しかし、それらについての知見は乏しい。

本研究では、①マウスDisc1の新規選択的スプライシング変異体を同定し、②同定した変異体が存在する事を証明した上で、③発現時期や局在などの生理的特徴を明らかとする、以上3点を目的として研究を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

本研究では上記①～③の課題について取組み、下記のような結果を得た。

①マウスDisc1の新規選択的スプライシング変異体の同定

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法を用いてマウスDisc1新規選択的スプライシング変異体の同定を試みた。その結果、exon2が欠失したDisc1 (ΔE2) を同定した。本来Disc1は94kDaの大きさであるところ、ΔE2はexon2欠失に由来したフレームシフトによって10kDaのタンパク質となる事がわかった。

②同定した変異体が存在する事の証明

RT-PCRではしばし増幅エラーによる人工産物を誤検出する可能性があり、RT-PCRのみの結果でΔE2の存在を証明する事は困難である。そこで、核酸を増幅せずに直接mRNAの状態で検出可能であるnorthern blot法を用いてΔE2 mRNAの存在を調べた。その結果、ΔE2 mRNAの検出に成功し、ΔE2 mRNAが存在する事、またΔE2 mRNAが分解されずに存在する事を確認した。さらに、ΔE2タンパク質を発現する発現ベクターを構築し、HEK293T細胞にΔE2を強制発現させwestern blotでΔE2タンパク質の存在を調べた。その結果ΔE2はタンパク質として存在する事が明らかとなり、ΔE2 mRNAはタンパク質に翻訳されうる事を確認した。

③発現時期や局在などの生理的特徴の解明

ΔE2の生理的特徴について、Disc1の主要な変異体であり完全長のタイプのDisc1(FL; Full Length)とどのように異なるのか検討した。

まず、発現時期についてnorthern blot法を用いて検討したところ、ΔE2 mRNAは大脳皮質・海馬ともに幼若期である3週齢において周産期よりも発現量が亢進する事がわかった。一方、FL mRNAは過去の複数の報告により周産期で高い発現を示す事が既に知られている。従って、ΔE2 mRNAはFL mRNAと発現時期が異なる事が明らかとなった。

次に、脳内における発現局在について*in situ* hybridizationを用いて検討した。ΔE2 mRNAとFL mRNAの脳内での局在について差異は認められなかった。しかし、ΔE2 mRNAはubiquitousな発現でありながら、大脳皮質・海馬・嗅球・小脳で相対的に高い発現を示す事が明らかとなった。

さらに、細胞内局在をimmunocytochemistryにより検討した。FLタンパク質は顆粒状様であるのに対しΔE2タンパク質は核優位かつ細胞質では繊維状に局在している事がわかり、両者の細胞内局在は大きく異なる事がわかった。また、ΔE2タンパク質が細胞骨格と共局在するか調べたところ、F-actinおよびα-tubulinと共局在する事がわかった。

〔 総　　括 〕

今回、マウスDisc1にexon2が欠失した選択的スプライシング変異体としてΔE2を新たに同定し、その存在を証明した。また、ΔE2とFLとの生理的特徴について、mRNA発現時期および細胞内局在が大きく異なる事が明らかになった。

本研究により、Disc1がどのように精神疾患発症への関与について今後さらに理解が深まる事が期待される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　（　宮武　祐樹　）		
	（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査　教授	松崎　秀夫
	副　査　教授	堀　　修
	副　査　教授	清水　栄司

論文審査の結果の要旨

精神疾患リスク遺伝子*disrupted in schizophrenia1* (ヒト：*DISC1*、マウス：*Disc1*)は精神疾患および発達障害の分子基盤を理解する中で精力的に研究されている遺伝子の一つである。最近、DISC1のスプライスバリアントが何らかの分子メカニズムによって病態に関与している可能性が指摘されている。例えば、DISC1には54種類のスプライスバリアントが存在し、そのうちの一部は統合失調症患者群で健常者群に対し、mRNA発現量が高かったとの報告がある。しかし、DISC1スプライスバリアントと完全長タイプのDISC1(FL; Full Length、以下FL)との間でその特徴がどのように異なるのかはよくわかっておらず、その病態への関与は未だ不明である。

本論文ではマウスを研究対象に選び、①Disc1の新規スプライスバリアントの同定、②その存在の証明、③その特徴に関する解析、の3点を目的として研究がなされた。

まず、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法によってexon2が欠失したDisc1(ΔE2;deletion exon 2、以下ΔE2)をDisc1新規スプライスバリアントとして同定した。FLの分子量が94kDaであるのに対し、ΔE2の分子量はexon2欠失に由来したフレームシフトによって10kDaとなっていた。次に、1塩基の違いも感度よく検出できる人工合成核酸Locked Nucleic Acid (LNA)を用いてΔE2特異的プローブを作製し、Northern blot法でマウス組織中のΔE2mRNAの存在を調べた。その結果、ΔE2mRNAが分解されずに存在する事を確認した。さらに、ΔE2mRNAの発現時期・脳組織内局在、およびΔE2タンパク質の細胞内局在について検討した。Northern blot法を行いΔE2 mRNAの発現時期を調べると大脳皮質・海馬ともに幼若期である3週齢において発現量が高くなっていた。一方、FL mRNAは周産期で高い発現が既に知られていることから、ΔE2mRNAとFL mRNAの両者は発現時期に相違があると判明した。続いて、マウス脳内におけるΔE2mRNAの発現局在について検討するために*in situ* hybridization法を行った。ΔE2 mRNAはFL mRNAと同様に、脳全体でubiquitousな発現、かつ大脳皮質・海馬・嗅球・小脳で相対的に高い発現を示した。最後にΔE2タンパク質の細胞内局在について免疫細胞化学法で調べたところ、FLタンパク質は細胞質内に顆粒状様に局在するのに対し、ΔE2タンパク質は核優位かつ細胞質では線維状様に局在しており、両者の細胞内局在は大きく異なっていた。また、この線維状染色像はF-actinやα-tubulinなどの細胞骨格系タンパク質と共局在を認めた。

上記のとおり、本論文はマウスでのDisc1新規スプライスバリアント、ΔE2を同定し、その組織中の存在をmRNAレベルで証明した。加えて、ΔE2とFLとの間で、mRNAの発現時期、タンパク質の細胞内局在に関する特徴が異なる事を明らかにした。以上の成果は、DISC1スプライスバリアントのヒト病態への関与について新たな示唆を与えるものであり、学位の授与に値すると考えられる。