

Title	Dysbindin Regulates the Transcriptional Level of Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate via the Interaction with NF-YB in Mice Brain
Author(s)	栞原, 隆亮
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54200
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【30】

氏 名	くわ はら りゅう げ 葉 原 隆 亮
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 5 9 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 医学系研究科生体生理医学専攻
学 位 論 文 名	Dysbindin Regulates the Transcriptional Level of Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate via the Interaction with NF-YB in Mice Brain (Dysbindinはマウス脳内でNF-YBとの相互作用を介して、Marcksの発現を転写レベルで制御する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 遠 山 正 彌 (副査) 教 授 祖 父 江 憲 治 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

統合失調症は生涯発症率1%と頻度の高い精神疾患であるが、未だ病態の解明には至って

いない。しかしながら、近年の活発な研究報告により統合失調症関連遺伝子が次々と報告されてきた。その中でも、Dysbindinは最も有力な統合失調症関連遺伝子で注目がされている。さらに、統合失調症患者の脳でDysbindinの発現低下がみられるという報告がある。我々はDysbindinが精神疾患に関与する発症分子メカニズムを解明するために、Yeast Two Hybrid法を用いてDysbindinと相互作用する因子を網羅的に解析した。そこで、候補因子として転写因子NF-YBがDysbindinと相互作用する因子として浮かびあがってきた。その後、NF-YBとDysbindinの結合を確認した。そこで、Dysbindinの減少がNF-YBを介して、転写にどのような影響を与えるか検討を行った。

[方法ならびに成績]

Yeast Two Hybrid法によりDysbindinと相互作用する候補因子としてNF-YBが陽性の反応を示した。そこで、免疫沈降法によりDysbindinとNF-YBとの結合を確認した。次に、転写因子は主に核内で作用することから、Dysbindinの細胞内局在を検討したところ、核内にも存在することがわかった。さらに、Dysbindinの減少がNF-YBを介して、転写にどのような影響を与えるか検討するために、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、Dysbindin遺伝子の発現と特異的に低下させたノックダウン細胞を作製した。また、Dysbindinノックアウトマウスを用いて生体内でDysbindinの減少がNF-YBを介して変動する因子を網羅的に解析したところ、シナプス形成に重要な役割を果たすことが報告されているMarcksの発現に影響を与えていることが確認できた。

そこで、Marcksの発現がNF-YBによってどのように発現制御を受けているか確認する目的で、ルシフェラーゼアッセイを行った。転写因子NF-YBが特異的に結合するDNA配列はCCAAT配列であることが知られており、Marcks遺伝子の発現調節を誘導するDNA配列はMarcks遺伝子の5'上流に2カ所ある。この2カ所のよりMarcks遺伝子に近い部分をCCAAT-2、その他の部分をCCAAT-1とした。この2カ所の内、どちらにNF-YBが結合してMarcks遺伝子の発現調節を行っているか検討するために、それぞれの欠損配列を作製してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、CCAAT-1の配列の欠損したものでは発現量の大きな変化は見られなかったが、CCAAT-2の配列を欠くものでMarcks遺伝子の発現上昇が見られました。また、欠損による影響を考えるために、CCAAT-2領域の変異配列を作製したところ、同様にMarcks遺伝子の発現上昇が見られました。この結果から、CCAAT-2にNF-YBが結合してMarcks遺伝子の発現調節を行っていることが確認できました。

次に、統合失調症の発症は思春期以降に頻度の高いことから、加齢に伴ってMarcksの発現量が変化するかどうかを検討するために、WTマウスの海馬サンプルを用いて、Western blot法にて検討したところ、加齢に伴いMarcksの発現量が変化していることが確認できた。マウスでのP25からP45にかけて急激にMarcksの発現量が減少していることが観察できる。この時期はマウスの思春期にあたり、この時期のシナプス形成にMarcksの発現低下が重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

そこで、Dysbindin KOマウスで同様の実験を行ったところ、Dysbindinの欠損によりMarcks

の発現量が亢進している状態のため、WTマウスで見られた加齢に伴うMarcksの発現量の減少が見られなかった。この結果から、Dysbindin KOマウスでは、Marcksの発現量の亢進にシナプス形成の影響が考えられる。

[総括]

我々はDysbindinが統合失調症の発症に関与する病態発症メカニズムを検討した結果、2つの新事実を見いだしました。

まず、Dysbindinは転写因子NF-YBと相互作用すること。

結果、Dysbindinが転写活性に関与することを示唆しました。

次に、DysbindinとNF-YBの相互作用がシナプス形成に関与する因子として広く知られているMarcks遺伝子の発現調節に関与していることを見いだしました。Marcksは、シナプス形成に関与していることが既に報告されており、また、双極性障害の患者に対して使用される気分安定薬リチウムにより、発現低下が見られることが報告されております。また、ドーパミンを含むシナプス小胞の輸送にMarcksは重要な役割を果たすことが報告されております。このことから、Dysbindinの発現によりシナプス形成不全を引き起こす可能性を示唆することがわかります。

論文審査の結果の要旨

統合失調症は生涯発症率1%と頻度の高い精神疾患であるが、未だ病態の解明には至っていない。

しかしながら、近年の活発な研究報告により統合失調症関連遺伝子が次々と報告されてきた。

その中でも、Dysbindinは最も有力な統合失調症関連遺伝子で注目がされている。さらに、統合失調症患者の脳でDysbindinの発現低下がみられるという報告がある。

我々はDysbindinが精神疾患に関与する発症分子メカニズムを解明するために、Yeast Two Hybrid法を用いてDysbindinと相互作用する因子を網羅的に解析した。そこで、候補因子として転写因子NF-YBがDysbindinと相互作用する因子として浮かびあがってきた。その後、NF-YBとDysbindinの結合を確認した。そこで、Dysbindinの減少がNF-YBを介して、転写にどのような影響を与えるか検討するために、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、Dysbindin遺伝子の発現と特異的に低下させたノックダウン細胞を作製した。さらに、Dysbindinノックアウトマウスを用いて生体内でDysbindinの減少がNF-YBを介して変動する因子を網羅的に解析したところ、シナプス形成に重要な役割を果たすことが報告されているMarcksの発現に影響を与えていることが確認できた。

結果、Dysbindinの減少はシナプス形成に重要な影響を与えることが示唆された。

学位に値すると認める。