

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 相馬ミカ

統合失調症はヒト精神疾患の 1 つで、その症状には妄想や幻覚などの陽性症状、思考の貧困化や感情の平板化などの陰性症状、記憶力や学習能力の低下などの認知機能障害がある。生涯罹患率は約 1% と高く、高齢化社会へと突入している現在、社会的にも根本的な治療法が求められている。薬理的研究から、陽性症状にはドーパミン伝達の亢進、陰性症状には NMDA 受容体を介したグルタミン酸伝達の低下の関連が示唆されているが、根本的な発症のメカニズムについてはまだ不明な点が多い。

dystrobrevin-binding protein 1 (*DTNBPI*) は統合失調症の感受性遺伝子の有力な候補の 1 つで、この遺伝子がコードするタンパク質が *dysbindin-1* である。*dysbindin-1* タンパク質は、統合失調症患者の脳において減少していることが報告されている。*Dtnbp1* 欠損マウスは新規探求性の低下や社会的相互作用の欠如、不安様行動などの統合失調症の陰性症状様行動や、記憶力や学習能力の低下という認知機能障害を示すため、*dysbindin-1* は統合失調症の中でも特に陰性症状や認知機能障害に関わっていると考えられている。

Histone deacetylase 3 (*HDAC3*) は、ヒストン脱アセチル化酵素の 1 つであり、遺伝子の転写を抑制する働きをもつ。精神疾患の発症にはエピジェネティックな要因が関わっており、*HDAC* 阻害剤は統合失調症を含む精神疾患の治療薬になる可能性が示唆されている。また最近では *HDAC3* が記憶の形成を抑制する働きをもつことが報告された。

論文提出者所属の研究室の先行研究により、*dysbindin-1* と *HDAC3* がタンパク質同士で相互作用することが確認されていた。論文提出者は *dysbindin-1* で報告されていたスプライシングバリエント-1A、-1B、-1C という 3 つのアイソフォームの存在に着目し、それぞれの *HDAC3* との相互作用の有無、特異性や局在などを検討した。*dysbindin-1* と *HDAC3* の相互作用から、*HDAC* 阻害剤が、統合失調症発症を含む精神疾患の治療薬となりうる分子基盤を以下のように探った。

*HDAC3* と相互作用する *dysbindin-1* のアイソフォームとして、大腸菌から精製した GST-*dysbindin-1A*、-1B、-1C を、V5 エピトープを付加した *HDAC3* を発現させた HEK293 細胞ライセートを混ぜた後に GST pull down assay を行い、*HDAC3* と相互作用する愛想フォームを調べた。さらに HEK293 細胞で myc エピトープを付加した *dysbindin-1A*、-1B、あるいは-1C と V5-*HDAC3* を共発現させ、そのライセートを用いて共免疫沈降を行った。いずれの結果からも、*dysbindin-1A* と-1B は *HDAC3* と結合すること、-1C は結合できないことが明らかとなった。

次に、HEK293 細胞に V5-*HDAC3* と、myc-*dysbindin-1A*、-1B、あるいは-1C を共発現させたのち、*in vivo* での核と細胞質への局在を検出するために細胞分画を行った。この系

での HDAC3 の過剰発現により、HDAC3 と結合する性質を持つ dysbindin-1A と-1B は核への局在が増加すること、HDAC3 とは結合しない dysbindin-1C では核への局在増加は起こらないことが分かった。この結果は dysbindin-1A と-1B が核で HDAC3 と相互作用するためと解釈され、dysbindin-1 との相互作用によって HDAC3 の核内での機能に影響を与える可能性が考えられた。

dysbindin-1 と HDAC3 で見られた相互作用が、同じクラス I の HDAC1 と HDAC2 でも見られるのかを検討するためにそれぞれ同様のコンストラクトを作成し、dysbindin-1 との相互作用の有無を GST pull down assay で確認した。その結果、HDAC1 と HDAC2 も dysbindin-1 と相互作用するという結果が得られた。さらに共免疫沈降法で HDAC1、HDAC2 と結合する dysbindin-1 のアイソフォームを検証したところ、HDAC3 と同様、dysbindin-1A と-1B のみが HDAC1、HDAC2 と相互作用し、-1C はしないという結果が得られた。これらのことから、dysbindin-1 は-1A と-1B が共通して持つ N 末側部分でクラス I の HDAC1/2/3 いずれとも相互作用することが示唆された。

dysbindin-1 による核内の HDAC3 に対する影響を見るために、HEK293 細胞に myc-dysbindin-1A、-1B、-1C をそれぞれ発現させて、細胞分画を行い、HDAC3 の核内存在量をウェスタンブロッティングで調べた。その結果いずれの dysbindin-1 アイソフォームも HDAC3 の核での存在量には影響を与えないことが分かった。また、抗リン酸化 HDAC3 抗体を用いたウェスタンブロット解析から、HDAC3 と結合する dysbindin-1A と-1B は核内の HDAC3 のリン酸化を抑制することが分かった。HDAC3 はリン酸化されることで活性が上昇することが報告されているので、この結果は dysbindin-1A と-1B が HDAC3 の働きを抑制することを強く示唆した。

以上の結果とこれまでの知見を合わせて、統合失調症患者の脳では dysbindin-1 が減少しているために HDAC3 の働きが強まる変化が起こり、そのために記憶や学習などに必要な遺伝子の発現が低下し、それによって症状が生じる、という一連のタンパク質分子の相互作用から、エピジェネティックな要因が関与し、精神疾患に関係する遺伝子の発現が変化し発症につながるという形のメカニズムを説明する構図が見えてきた。

本研究は、このように統合失調症の感受性遺伝子の発現変化が、精神疾患関連の遺伝子の発現変化を引き起こす過程を示唆する新たな知見を含む内容で、統合失調症治療のために HDAC 阻害剤を検討することが大きな意義を持つことを示したものである。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。