

博士論文（要約）

統合失調症関連タンパク質 dysbindin-1 と
ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 の相互作用の解析

相馬 ミカ

目次

1. 序論	2
2. 方法	14
3. 結果	22
4. 考察	44
5. 参考文献	52
謝辞	62

1. 序論

1-1. 統合失調症

統合失調症は慢性的な精神疾患の 1 つであり、その症状には妄想や幻覚、統制を欠いた行動や興奮などの陽性症状と、会話や思考内容の貧困化、感情の鈍麻、意欲の減退、目的志向的な行動の低下などの陰性症状、記憶や学習などの認知機能障害がある。統合失調症の生涯罹患率は約 1%と高く (1)、患者の多くは思春期や青年期など、人生の早い段階で発症し、その後の社会生活が困難になるため、効果的な治療法が求められているが、発症のメカニズムには不明な点が多く、その解明は重要な課題となっている。

1-2. 統合失調症の病因

統合失調症は、複数の遺伝的要因と環境的要因が組み合わさり発症に至る、複雑な疾患であると考えられている。生化学的な手がかりが少なく、症状はヒト固有のものが多いため真のモデル動物がないなど、研究が困難であり、病因・病態は不明であった。しかし、近年の精神薬理学的研究や画像研究、分子遺伝学的解析研究などの発展により、統合失調症の病因・病態は次第に明らかになってきている。以下に、現在までの統合失調症の病因・病態に関する研究を簡単に紹介する。

1-2-1. 神経伝達障害仮説

統合失調症の分子病態として、現在、最も一般的に受け入れられているのは、本症の治療薬や統合失調症様異常発現薬に関する薬理学的研究に基づいた、脳内のドーパミンおよびグルタミン酸伝達系の障害の可能性である。

アンフェタミン類 (覚せい剤)、コカイン、L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) などのドーパミン作動薬は統合失調症ではない健常者にしばしば本症と区別が難しい幻覚・妄想状態を引き起こすことが知られている (2)。さらに、症状が目立たなくなった状態の統合失調症患者に健常者には明らかな精神変調を惹起しない少量のドーパミン作動薬を投与すると、幻想妄想状態が再燃することが知られている。これらのことから、ドーパミン伝達系の異常が統合失調症の病態と関係していると考えられている (3)。しかし、ドーパミン D₂ 受容体を遮断する抗精神病薬は統合失調症の陰性症状にはほとんど効果を示さないことから、ドーパミン伝達の亢進は主に陽性症状の発現と関係していると考えられている。

一方、フェンサイクリジン、ケタミンなどの NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体遮

断薬は統合失調症の陽性症状・陰性症状を引き起こし (4)、統合失調症患者は健常者より、NMDA 受容体遮断薬に感受性が高く精神障害が生じやすいことが知られている。また、統合失調症患者において、グリシンや D-セリン、D-サイクロセリン、D-アラニン、グリシントランスポーター阻害薬などの NMDA 受容体の機能を促進する本受容体グリシン調節部位の作動薬を既存の抗精神病薬と併用すると、抗精神病薬抵抗性の陰性症状や認知機能障害が改善される。これらのことからグルタミン酸伝達系の異常が統合失調症の陰性症状に関与していると考えられている (3)。

NMDA 受容体遮断薬を急性投与した動物の脳では大脳皮質を中心にドーパミン伝達が亢進し、NMDA 受容体遮断薬を反復投与するとアンフェタミンによるドーパミンの遊離が前頭葉皮質と線条体で増強する (5)。また、NMDA 受容体サブユニットの発現低下マウスでは、ドーパミン作動薬への感受性が上昇するという報告もある (6)。これらのことから、NMDA 受容体の機能が低下した状態では、ドーパミン伝達が高まることが推測され、統合失調症では、NMDA 受容体を介するグルタミン酸伝達低下し、ドーパミン伝達亢進した結果、陽性症状が出現する可能性も考えられている。

1-2-2. 神経発達障害仮説

PET や functional MRI による研究から、統合失調症患者の安静時または課題遂行時に、背外側前頭前野、内側前頭葉皮質、前部帯状回、左側頭葉、視床、海馬、小脳などにおける活動性の変化が報告されている。また、前頭葉皮質各領域、視床、海馬などの体積は、統合失調症では有意に減少しているという報告がある (7,8)。これらのことから、以上の脳部位を含む、特定の神経回路が障害されている可能性が考えられる。

統合失調症の神経回路異常は、神経発達障害によってもたらされる可能性がある。疫学的研究により、胎生期または周産期の栄養障害、薬物使用、ウイルス感染、神経発生過程の障害などと統合失調症の関連が指摘され、特定の発達段階における何らかの侵襲、あるいは神経発達に重要な分子の異常が、正常な神経回路形成を阻害することが示唆された。分子遺伝学的解析から統合失調症との関連が示唆されている候補遺伝子群が、発達期を通じてシナプスの構造や機能に影響することも神経発達障害仮説を支持している。

1-2-3. 分子遺伝学的解析

統合失調症は孤発性だけでなく、家族性に発症することがあり、遺伝子を多く共有するほど一致して発症する確率が高くなることが知られている。また、養子研究では、環境要因よりも遺伝的背景の方が統合失調症の発症に影響することが報告され、本症の遺伝的要因の関与は確実視されており、分子遺伝学的解析が盛んに行われている。

これまでに、1q21-q22、6p24-p22、6q21-q25、8p22-p21、10p15-p11、10q25-q26、13q32-q34、17p11-q25、22q11-q22 の領域で統合失調症と有意な関連が認められており、

これらのゲノム領域から統合失調症の感受性遺伝子の候補が多数同定されている。それら中で、多くの研究で追認され、最も有力と言えるのが *DTNBP1* [dystrobrevin binding-protein 1 (dysbindin)] および *NRG1* (neuregulin 1) である。

DTNBP1 は 6p22.3 に存在する遺伝子で、Straub らによって複数の一塩基多型 (SNPs) と統合失調症との関連が報告された (9)。その後も複数のグループによって追試が行われ、多くが有意な関連を認めている。統合失調症患者の死後脳研究において、dysbindin-1 タンパク質と mRNA の減少が確認されている (10)。*DTNBP1* については後に詳細に述べる。

NRG1 は 8p22-p21 に存在する遺伝子で、アイスランドの統合失調症家系の調査により同定された (11)。*NRG1* およびその受容体である *ErbB4* 変異マウスでは統合失調症様行動が見られ、*NRG1* 変異マウスでは機能的な NMDA 受容体が少ないことが報告され、*NRG1* のグルタミン酸伝達への関連が示唆された。その後も *NRG1* と *ErbB4* がグルタミン酸ニューロンのシナプスの成熟と可塑性を制御する (12) など *NRG1* と神経発達に関する報告が続いている。

染色体異常を手がかりとした探索も行われ、スコットランドの家系解析から統合失調症と関連する 1q42.1 と 11q14.3 の相互転座が発見され、転座箇所から *DISC1* (disrupted in schizophrenia 1) と *DISC2* (disrupted in schizophrenia 2) が同定された (13)。*DISC2* はタンパク質をコードせず、*DISC1* のアンチセンス RNA として *DISC1* の発現を調節する。*DISC1* の機能は長く不明であったが、最近では、*DISC1* 変異マウスは NMDA 受容体の神経伝達が低下し、行動異常が見られるという報告 (14) や *DISC1* が NMDA 受容体およびグルタミン酸シナプスのスパインを制御するなどの報告があり、統合失調症との関連が考えられている (15, 16)。

以上に示したように、近年の分子遺伝学的研究によって、統合失調症の感受性遺伝子候補が複数挙げられている。アルツハイマー病やパーキンソン病が家族性の原因遺伝子から病態の解明につながったように、これらの候補遺伝子の相互作用などの機能解析は、統合失調症の病態の解明につながると考えられる。

石浦研究室では、これらの候補遺伝子の中でも、最も統合失調症との関連が認められている *DTNBP1* (*dysbindin-1*) に注目し、その生理機能を解析することで、統合失調症発症の分子メカニズムを解明しようと研究が行われてきた。

1-3. dysbindin-1

1-3-1. dysbindin-1 の発見

dysbindin-1 (dystrobrevin binding protein 1) は初め筋ジストロフィーに関係するタンパク質として発見された。dysbindin-1 は、筋肉の正常機能を維持するのに働くジストロフ

イン結合タンパク質[DPC (dystrophin-associated protein complex)]の構成要素である α -ならびに β -ジストロブレビンに結合するタンパク質として、酵母 two-hybrid 法によって同定され、筋肉と脳において α -および β -ジストロブレビンと結合するのが報告された(17)。それ以前に、DPC が筋肉の維持の他に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の認知機能の低下に関わり(18)、脳で DPC と結合する dysbindin-1 も認知機能の低下に関わっている可能性が考えられた。

脳内における dysbindin-1 の発現は広範囲に及んでおり、前頭皮質、側頭皮質、海馬、尾状核、被殻、側坐核、扁桃核、視床、中脳といった統合失調症との関連が強い脳領域の神経細胞に発現していることが知られている(10)。

dysbindin-1 はジストロブレビンの結合タンパク質として発見されたことから、ジストロブレビンや DPC が豊富に存在するシナプス後部で機能すると考えられていたが、海馬の神経細胞の免疫染色により、dysbindin-1 は海馬においてシナプス前部に局在し、 β -ジストロブレビンと共局在しないことが明らかになった(19)。このことから、dysbindin-1 は少なくとも海馬においては、ジストロブレビンや DPC とは独立した機能をもつと考えられるようになった。

1-3-2. dysbindin-1 とヘルマンスキー・パドラック症候群

dysbindin-1 は統合失調症以外に眼皮膚白皮症の一種であるヘルマンスキー・パドラック症候群(HPS)と関連することが知られている(20)。HPS は、メラノソームと血小板の密顆粒と他のリソソーム関連小器官の生合成の異常によって起こり、出血症状、眼・皮膚色素低下症、網膜系細胞へのセロイド様物質の沈着を特徴とする稀な遺伝病である(21, 22)。HPS の原因遺伝子としては *pallidin* と *muted* が知られており、これらのタンパク質は BLOC-1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex 1) の構成要素である(23, 24)。BLOC-1 の他の構成要素が探索され、cappuccino (CNO) (25) と dysbindin-1 が同定され、dysbindin-1 は腎臓や肝臓などの組織において BLOC-1 の安定な構成要素として存在し、dysbindin-1 の変異により HPS の一種が起こることが示された(20)。HPS 様症状を示す自然突然変異 sandy マウスが dysbindin-1 をコードする *Dtnbp1* 遺伝子を欠失しており、dysbindin-1 をもたないことが発見された(20)。

1-4. dysbindin-1 と統合失調症

1-4-1. *DTNBP1* の SNPs と統合失調症の関連

dysbindin-1 をコードする *DTNBP1* と統合失調症の関連を最初に報告したのは Straub らである。彼らは、アイルランドの統合失調症を多発する家系を対象として、以前から統合失調症に関連するとされていた領域、6p24-21 の解析を行い、6p22.3 の *DTNBP1* 遺伝子内の一塩基多型(SNPs)が統合失調症と強く関連することを発見した(9)。続いて、Schwab

らが **Straub** らの研究で最も関連性の高かった 6 個の SNPs を独立した 203 家族について調べ、**Straub** らの結果を支持する報告をした (26)。その後もヨーロッパや日本を含むアジアを対象に解析が行われ、一部には関連は認められないという報告もあるが、大多数においては *DTNBP1* と統合失調症の関連を支持する結果が出ている (27-38)。

以上のような分子遺伝学的研究により、*DTNBP1* の SNPs と統合失調症の関連は強いと考えられているが、それらの多くはタンパク質をコードしないイントロン部分に存在するため、*dysbindin-1* タンパク質のアミノ酸配列に影響はなく、遺伝子の発現調節に関連すると考えられている (図 1-1)。*DTNBP1* ではアレルによる発現量の違いが 50% を越えることという報告もある (39)。

1-4-2. 統合失調症患者の脳における *dysbindin-1* の発現量の低下

統合失調症の患者の死後脳研究では、実際に海馬や前頭皮質、中脳において、*dysbindin-1* の mRNA レベル、タンパク質量とも健常者より低いことが報告されている (10,19,40)。しかし、これらの研究では、*dysbindin-1* のアイソフォームの違いは考えられていなかった。現在、NCBI データベースにヒトの *dysbindin-1* には -1A、-1B、-1C、-1D、-1E の 5 つのアイソフォームが登録されている。このうち -1A、-1B、-1C については統合失調症患者の死後脳での発現が調べられており、*dysbindin-1A* は上側頭回の後部において減少し、*dysbindin-1B*、-1C は海馬において減少していることが報告されている (41)。また、神経細胞内での局在も調べられており、*dysbindin-1A* はシナプス後肥厚、-1B はシナプス小胞、-1C は主にシナプス後肥厚に存在することが報告されている (41)。このように *dysbindin-1* はアイソフォームごとに脳における発現部位、細胞内局在に違いがある。さらに、ラットの脳を用いた研究では、アイソフォームごとに発生過程における発現時期が異なるという報告もある (42)。

1-4-3. *dysbindin-1* 欠損 *sandy* マウスの統合失調症様行動

以上のことから、統合失調症患者の脳では *dysbindin-1* の発現が弱く、*dysbindin-1* の機能が十分に果たされないために本症の症状が生じると考えられる。そこで、HPS 研究の中で発見された *Dtnbp1* 欠損で *dysbindin-1* を発現しない *sandy* マウスが統合失調症様行動を示すかに関心が集まり、多くの研究が行われている (43-47)。*sandy* マウスは、野生型マウスと比べて、形態や知覚、運動機能などに違いは見られないが、活動性や新奇探求性が低く、不安様行動が見られ、社会的相互作用が欠如しているなど統合失調症の陰性症状様行動が見られた (43,44,46)。また、*sandy* マウスでは、学習能力の低下やワーキングメモリーの障害、長期記憶保持の困難などの認知機能障害も見られた (44-47)。こうして *dysbindin-1* は統合失調症における陰性症状と認知機能障害に主に関連していると考えられる。*dysbindin-1* は主に統合失調症の陰性症状と認知機能障害に影響すると考えられているが、*sandy* マウスがドーパミンに関連する行動の変化も示すことも報告されている (48)。

1-5. dysbindin-1 の分子機能

dysbindin-1 の果たす機能が統合失調症の陰性症状や認知機能障害に関連があると考えられ、盛んに研究されている。これまでに明らかにされた dysbindin-1 の機能の代表的なものを簡単に紹介する。

1-5-1. 神経伝達における機能

初代培養神経細胞において dysbindin-1 をノックダウンすると、シナプス小胞と細胞膜を融合させるトランス SNARE 複合体の構成要素である SNAP25 (synaptosomal-associated protein 25) と、シナプス小胞の小胞膜に存在する synapsin I のタンパク質レベルが低下し、グルタミン酸放出が抑制されることが報告された (29)。一方で、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC-12 細胞では dysbindin-1 をノックダウンすると SNAP25 のタンパク質レベルが上昇し、ドーパミンの分泌が増加することが報告された (49)。SNAP25 の増減に関しての矛盾した結果の原因はまだ明らかではないが、dysbindin-1 がシナプス小胞に関係し、神経伝達に影響する可能性が考えられる。

ラット大脳皮質神経細胞とヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞において dysbindin-1 をノックダウンすると、細胞表面のドーパミン D₂ 受容体の増加が見られるが、ドーパミン D₁ 受容体の増加は見られないことが報告された (50)。この細胞表面でのドーパミン D₂ 受容体の相対的な増加は、エンドサイトーシスの異常によるものではなく、エンドソームからリソソームへの輸送が減少し、その結果として細胞膜への受容体の再利用が促進されていることが示された (51)。

1-5-2. 神経発達における機能

dysbindin-1 をノックダウンした SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸を作用させて細胞分化を誘導すると、神経突起先端におけるアクチン細胞骨格の異常が見られ、神経突起の伸長が短くなることが示された (52)。この細胞では JNK (c-Jun N-terminal kinase) のリン酸化状態が変化しており、JNK シグナルを介したアクチン細胞骨格の制御がうまく機能せず、神経突起の伸長が抑制されると考えられている。

dysbindin-1 をノックダウンしたラット海馬神経細胞において、未成熟なスパインが増加していることが発見され、アクチン細胞骨格を制御する WAVE2 が dysbindin-1 の結合タンパク質として同定された (42)。さらに、dysbindin-1 は WAVE2 の活性化に関与する Abi-1 と結合し、WAVE2/Abi-1 複合体形成を促進することも明らかにされ、dysbindin-1 は WAVE2/Abi-1 複合体と協調して、後シナプスにおけるスパイン形成を制御していると考えられた。

dysbindin-1 は核内で p53 と結合している necdin を細胞質へリクルートし、p53 の転写活性を活性化して、神経突起伸長に必要な分子である coronin 1b と rab 13 を発現させる。dysbindin-1 をノックダウンした細胞に p53 を過剰発現させると神経突起伸長が回復する

ことが報告され (53)、dysbindin-1 が神経突起の伸長に先行する p53 の転写活性の制御において重要な役割を果たすと考えられている。

これらの他にも多くの報告があり、dysbindin-1 の果たす分子的機能については次第に明らかにされつつあるが、さらなる解明には、dysbindin-1 と結合するタンパク質の同定が有効であると考えられる。

1-6. dysbindin-1 と DNA-PK 複合体、HDAC3

1-6-1. dysbindin-1 と DNA-PK 複合体の結合

小山らは dysbindin-1 と結合するタンパク質の探索を行い、新たに DNA-PK (DNA dependent protein kinase) 複合体が同定された (54)。DNA-PK 複合体は DNA 二本鎖切断の修復や転写、DNA 組み換えなどに関与することが知られており、主に核内で機能するタンパク質複合体である。小山らは、dysbindin-1A と -1B が核内において DNA-PK 複合体と結合し、DNA-PK 複合体によりリン酸化されることを明らかにした (54)。一方 Jeyakumar らは、DNA-PK 複合体は、NCoR、SMRT、TBL1、HDAC3 などから成る TR・RXR (thyroid hormone receptor・retinoid X receptor) と結合して、TR・RXR コリプレッサーホロ複合体を形成し、その複合体の中で DNA-PK 複合体が HDAC3 をリン酸化し、HDAC3 の活性を上昇させることを報告した (55)。dysbindin-1 と HDAC3 がともに DNA-PK 複合体によりリン酸化を受けるという事実から、私は dysbindin-1 と HDAC3 の関係に関心をもつに至った。

1-6-2. HDAC3

HDAC3 (ヒストン脱アセチル化酵素 3) は、ヒストン脱アセチル化酵素の 1 つで、相同性などから HDAC1、2、8 とともにクラス I に分類される。クラス I の HDAC は核局在シグナルをもち、核外移行シグナルをもたないが、HDAC3 だけは核外移行シグナルをもち、核だけでなく細胞質にも存在する (56)。HDAC3 は全身の組織でよく発現しており、脳ではクラス I HDAC 中最も多く発現している。特に海馬、大脳皮質、小脳でよく発現している (57)。

一般に HDAC は核内でヒストンを脱アセチル化して、遺伝子の転写を抑制するのが主な機能であるが、HDAC3 はコリプレッサーである NCoR (nuclear receptor corepressor) と SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) と安定な複合体を形成して脱アセチル化を行うことが知られている (58, 59) (図 1-2)。さらに、HDAC3 はヒストン以外のタンパク質も脱アセチル化し、その活性や局在を制御することも知られている。その代表的なものが、NF- κ B (nuclear factor-kappaB) 構成因子の RelA タンパク質である。NF- κ B は長期記憶の形成に必要な遺伝子の誘導にはたらく転写因子で (60, 61)、HDAC3 が RelA タンパク質を脱アセチル化すると NF- κ B が核外に移行し、NF- κ B

の下流シグナルが止まることが報告された (57, 62) (図 1-3)。

HDAC3 と記憶との関連について NF- κ B 以外にも報告がある。海馬で HDAC3 をノックアウトしたマウス、HDAC3 の脱アセチル化ドメインにミスセンス変異をもち HDAC3 と NCoR の結合が阻害されたマウス、HDAC3 選択的阻害剤を投与したマウスでは長期記憶の増強が見られ (63)、HDAC3 には記憶の形成を阻害する働きがあることが示唆されている。

また、統合失調症患者においてヒストンのアセチル化が低下していて (64, 65)、HDAC 阻害剤が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 (66-72)。最近では、HDAC3 に関するある SNPs が統合失調症の発症リスクに関わるという報告もなされている (73, 74)。

1-6-3. dysbindin-1 と HDAC3 の結合

統合失調症の特に陰性症状と認知機能障害に関連する dysbindin-1 と、記憶の形成に関わり、その阻害剤が統合失調症の治療薬となる可能性のある HDAC3 が、ともに DNA-PK 複合体によりリン酸化を受けるというのは興味深い事実であり、石浦研究室では dysbindin-1 と HDAC3 に着目して研究が進められた。

石浦研究室の先行研究で、dysbindin-1 と HDAC3 が結合するかということが調べられ、マウスの前脳のライセートと SH-SY5Y 細胞のライセートを用いた共免疫沈降法により、dysbindin-1 と HDAC3 が結合することが示された (図 1-4)。

1-7. 本研究の目的

これまでの研究では、dysbindin-1 の細胞質における機能のみが調べられ、その結果は統合失調症発症のメカニズムの一部を説明するに止まってきた。先行研究では、dysbindin-1 の発現低下によりシナプス関連タンパク質の synapsin I や SNAP25 などの発現が低下することが報告されているが (23)、そのメカニズムは明らかになっていない。今回新たに dysbindin-1 の相互作用パートナーと同定された HDAC3 は主に核内で機能し、また転写の制御を通じて多くの遺伝子の発現に関わっており、統合失調症の多様な症状を説明できる可能性がある。

そこで、私は、これまで調べられていなかった dysbindin-1 の核内での機能に着目し、dysbindin-1 が相互作用により HDAC3 の機能に影響を与え、その下流の転写などが変化するという仮説を立てた。本研究では、dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用の詳細を解析することで、dysbindin-1 の減少によるシナプス関連タンパク質の発現低下のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

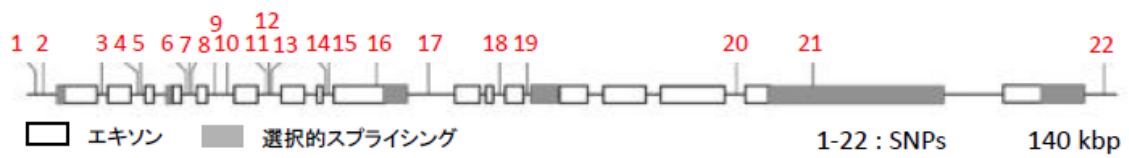


図 1-1. *DTNBP1* 遺伝子の統合失調症の発症リスクに関わるとされる SNPs
 統合失調症の発症リスクに関わるとされる SNPs の多くはイントロン部分にあり、アミノ酸配列には影響しない。

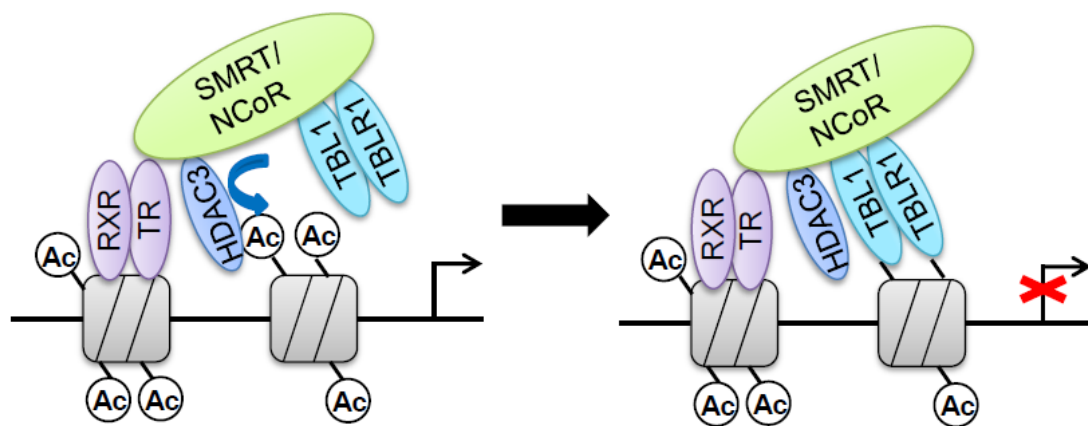


図 1-2. HDAC3 によるヒストンの脱アセチル化

HDAC3はコリプレッサーである NCoR (nuclear receptor corepressor) と SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) と安定な複合体を形成してヒストンの脱アセチル化を行い、転写を抑制する。TBL1;transducin beta like 1.TBLR1; TBL1-related protein.

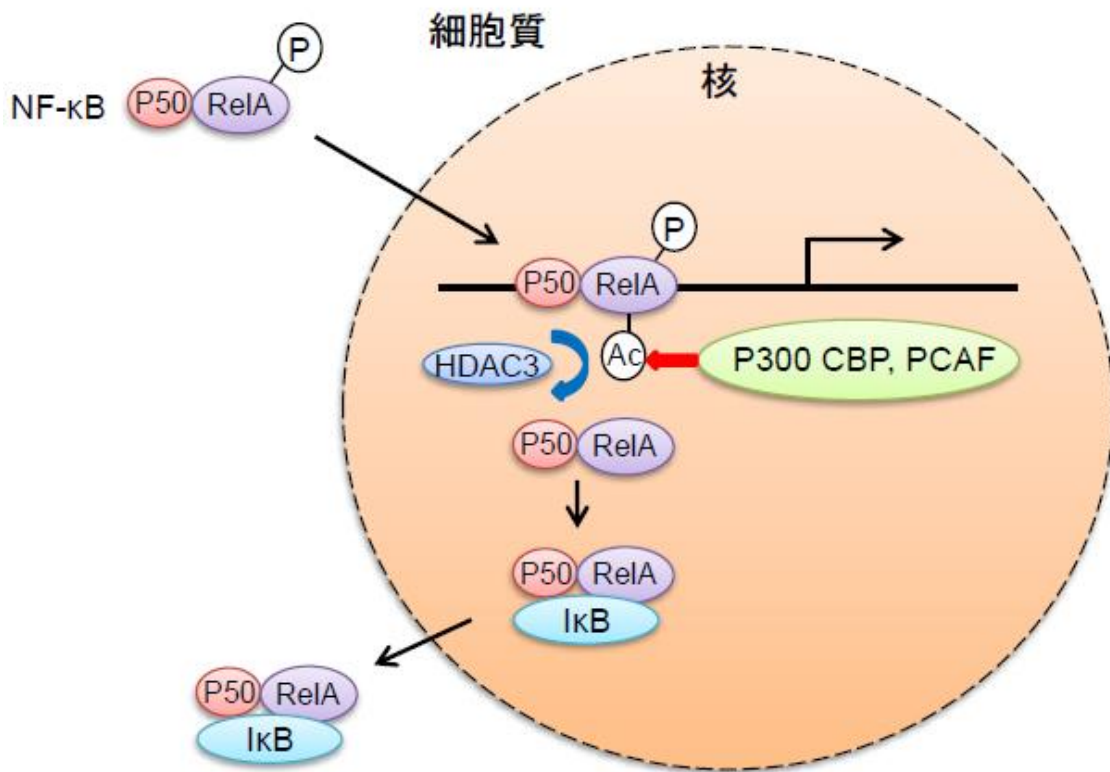


図 1-3. HDAC3 の NF- κ B の脱アセチル化

HDAC3 は転写因子 NF- κ B の構成因子の RelA を脱アセチル化することで、NF- κ B の核外輸送を促進し、NF- κ B 依存的な転写を抑制する。

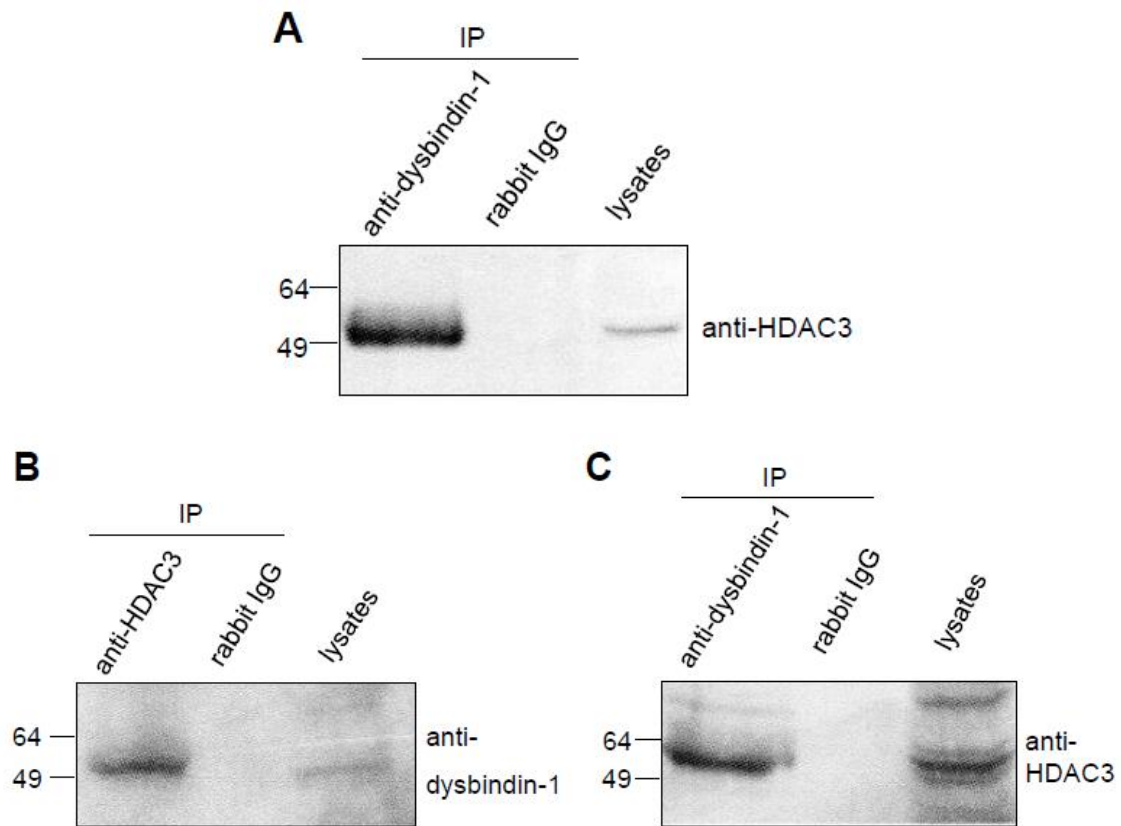


図 1-4. dysbindin-1 と HDAC3 の結合

(A)マウス前脳のライセートを抗 dysbindin-1 抗体で免疫沈降 (IP) し、抗 HDAC3 抗体を用いてイムノブロットをおこなった。(B)SH-SY5Y 細胞のライセートを抗 HDAC3 抗体で免疫沈降 (IP) し、抗 dysbindin-1 抗体を用いてイムノブロットをおこなった。(C) SH-SY5Y 細胞のライセートを抗 dysbindin-1 抗体で免疫沈降 (IP) し、抗 HDAC3 抗体を用いてイムノブロットをおこなった。Rabbit IgG は正常ウサギ IgG で IP をおこなったネガティブコントロールである。

2. 材料と方法

2.1. コンストラクション

2-1-1. プラスミド

大腸菌に GST-dysbindin-1 を発現させる際には、以前に石浦研究室で小山が作成した、pGEX 5X-1 (Amersham Pharmacia 社) の EcoR I と Xho I サイトにヒト dysbindin-1A、-1B、-1C をクローニングしたものを使用した(54)。

動物細胞に myc-dysbindin-1、V5-HDAC3、V5-dysbindin-1 を発現させる際には、以前に石浦研究室で小山が作成した、pcDNA3.1 (Invitrogen 社) の Not I と Xho I サイトに myc タグ x6 を挿入し、Xho I と Xba I サイトにヒト dysbindin-1A、B、C をクローニングしたものと、pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen 社) の BamH I と Xho I サイトにヒト HDAC3 と dysbindin-1 をそれぞれクローニングしたものを使用した(図 2) (54)。

2-1-2. ヒト HDAC1、HDAC2 のクローニング

ヒト HDAC1、HDAC2 の cDNA を pcDNA3.1/V5-His の BamH I と Xho I サイトにクローニングした(図 2)。

表 2-1 に記載したプライマーを用いて、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーを由来として PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片を GenElute Agarose Spin Column (SIGMA) により抽出した。その後、DNA Ligation Kit (TaKaRa) を用いてライゲーションを行い、XL-10 Gold コンピテントセルに形質転換した。培養した大腸菌から抽出したプラスミド DNA の配列は DNA シーケンサーにより確認した。

2.2. 細胞培養とトランスフェクション

ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞は 10%ウシ胎児血清(FBS)を含む DMEM 中で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。継代の際には、0.05%のトリプシンと 0.02%の EDTA を含む PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.47 mM KH₂PO₄) を用いて細胞の接着を剥がし、適宜希釈して培地に蒔き直した。

HEK293 細胞に対して遺伝子導入を行う際には、トランスフェクション試薬の Lipofectamine 2000 (Life Technologies) と PlusTM Reagent (Life Technologies)、無血清培地の Opti-MEM (Life Technologies) を用いた。トランスフェクションは細胞密度が 60%程度のときに行い、35 mm ディッシュに対してプラスミド DNA2.5 μg、Lipofectamine

2000 μL 、PlusTM Reagent 2.5 μL 、Opti-MEM I 250 μL を用いた。

2.3. 細胞ライセートの調製

トランスフェクションから 48 時間後の細胞をトリプシンで剥がして回収し、35 mm ディッシュの細胞に対して Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を含んだ Nonidet-P40 Buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 50 mM Tris-HCl [pH8.0]) 200 μL を加えて懸濁し、氷上に 30 分静置後、4°C で 13000 rpm で 15 分遠心し、上清を細胞ライセートとして回収した。DC Protein assay (Bio-Rad) によりライセートのタンパク質濃度を測定した。

2.4. 細胞分画—細胞質画分と核画分

10 cm ディッシュから細胞を回収し、PBS で洗浄後、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えた 1 mL の低張バッファー (10 mM Tris-HCl [pH7.2], 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA) で懸濁し、27G の注射針を数回通して細胞を破碎した。氷上で 15 分間静置し、4°C、1,000 x g で 10 分間遠心し、上清を細胞質画分として回収した。

沈殿を PBS で洗浄した後、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えたリスバッファー (50 mM HEPES [pH7.5], 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% TritonX-100) 400 μL を加えて懸濁し、4°C、13,000rpm で 1 時間遠心した。沈殿を PBS で洗浄し、核画分を回収した。核画分の共免疫沈降を行う場合は Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えた Nonidet-P40 バッファーを 500 μL 加えてソニケーションを行い、4°C、13,000rpm で 10 分間遠心を行い、上清を核画分として用いた。SDS-PAGE を行う場合は 1x サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 10% Glycerol, 6% 2-mercaptoethanol) を 500 μL 加えてソニケーションを行い、100°C で 5 分間ボイルし、サンプル化した。

得られた画分についてウェスタンブロッティングを行い、細胞質マーカーとして α -tubulin、核マーカーとして lamin B を用いて、分画できていることを確認した。

2.5. GST 融合タンパク質の精製

GST 融合タンパク質発現用のプラスミドを大腸菌 BL-21 株に導入し、アンピシリンを加えた LB 培地 10 mL に植え、37°C で一晩振盪培養した。翌日、その培養液 5 mL を新しいアンピシリン入り LB 培地 45 mL に加え、37°C で振盪培養し、OD₆₀₀ の吸光度が 0.7 にな

ったところで IPTG を終濃度 0.2 mM になるように加え、28°C で 2 時間振盪培養した。

菌体を 4°C で 8,000 x g、10 分の遠心で回収し、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えた Cold Buffer (50 mM Tris-HCl [pH7.5]、150 mM NaCl、1 mM EDTA) 10 mL に懸濁し、フレンチプレスで破碎した。破碎液に TritonX-100 を終濃度 1% になるように加え、4°C で 1 時間転倒混和した。4°C で 12,000 x g、20 分遠心して不溶性画分を除き、可溶性画分と平衡化しておいた Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) 1 mL を合わせて、4°C で一晩転倒混和した。翌日、軽く遠心してビーズを集め、PBS で 3 回洗浄してグルタチオンセファロースビーズと GST 融合タンパク質の複合体を得た。

2.6. GST pull down assay

精製したグルタチオンセファロースビーズと GST 融合タンパク質の複合体の一部を取り、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングをし、GST 融合タンパク質の濃度を測定した。

1.5 mL チューブにグルタチオンセファロースビーズと GST 融合タンパク質の複合体と HEK293 細胞のライセート 500 µg を加え、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えた PBS で反応液が 1 mL になるようにメスアップし、チューブを室温で 1 時間転倒混和した。軽く遠心してビーズを集め、PBS で 3 回洗浄し、2x サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl [pH6.8]、4% SDS、20% Glycerol、12% 2-mercaptoethanol、0.01% BPB) を 50 µL 加えて 100°C で 5 分ボイルし、サンプルを調製した。SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。

2.7. 共免疫沈降法

myc-dysbindin-1 と V5-HDAC3 の共免疫沈降実験では、抗 V5 抗体 1 µg と Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) 25 µL を、ヒストン H3 と HDAC3 の共免疫沈降実験では、抗ヒストン H3 抗体または正常ウサギ IgG 1 µg と Protein A Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) 25 µL をあらかじめ 4°C で 4 時間または一晩反応させた。それに細胞ライセート 500 µg を入れ、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF を加えた Nonidet-P40 Buffer で 500 µL にメスアップし、4°C で 4 時間または一晩転倒混和して反応させた。軽く遠心してビーズを集め、Nonidet-P40 Buffer で 3 回洗浄した。2x サンプルバッファーを 30 µL 加え、100°C で 5 分ボイルし、サンプル化した。SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。

2.8. HDAC3 のリン酸化状態の測定

60 mm ディッシュに HEK293 細胞を蒔き、細胞密度が 50%程度になったときに、myc-dysbindin-1 のコンストラクト 1.5 μg と V5-HDAC3 のコンストラクト 0.5 μg を Lipofectamine 2000 12 μL と PlusTM Reagent 8 μL を用いてトランスフェクションした。48 時間後にトリプシンを用いて細胞を回収し、Protease Inhibitor Cocktail と PMSF、phosphatase inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology 社) の入った NP-40 Buffer 400 μL を加えて懸濁し、4°C で 180,000 x g、30 分遠心して、細胞のライセートを調製した。DC Protein assay によりタンパク質の濃度を測定し、1.5 mL チューブに、あらかじめ抗 V5 抗体と 4°C で 4 時間反応させた Protein G セファロースビーズ 25 μL とライセート 500 μg 分相当を入れ、NP-40 Buffer で 500 μL にメスアップし、4°C で一晩転倒混和して反応させた。翌日、Nonidet-P40 Buffer で 2 回、CIAP Buffer (50 mM Tris-HCl [pH9.0]、100 mM NaCl、1 mM MgCl₂) で 2 回ビーズを洗浄し、V5-HDAC3 を精製した。精製した V5-HDAC3 を 2 つに分け、CIAP Buffer 30 μL を加えて、片方にのみ Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (TaKaRa) 1 μL を加え、37°C で一晩インキュベートした。翌日、軽く遠心してビーズを集め、2x サンプルバッファ 30 μL を加えて、100°C で 5 分ボイルしてサンプル化した。SDS-PAGE 後にウェスタンブロッティングをして、抗リン酸化 HDAC3 ポリクローナル抗体と抗 V5 ポリクローナル抗体で検出を行い、HDAC3 のリン酸化状態を調べた。

2.9. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後のゲルをトランスファーバッファ (50 mM Boric Acid、5 mM EDTA、pH 8.9) に浸し、ニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に 400 V、300 mA で 90 分間ブロッティングをした。メンブレンを 5% スキムミルク溶液に室温で 1 時間浸し、ブロッキングをした。一次抗体溶液を 4°C で一晩反応させ、翌日、TBST (100 mM Tris-HCl [pH7.5]、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で 5 分の洗浄を 3 回してから、二次抗体溶液を室温で 1 時間反応させた。TBST で 5 分の洗浄を 3 回繰り返し、化学発光用試薬 ECL select (GE Healthcare)、ECL prime (GE Healthcare) または LuminataTM Western HRP Chemiluminescence Substrates (Millipore) によって処理をして、LAS3000 (富士フィルム) により検出、撮影、記録を行った。

ウェスタンブロッティングに使用した抗体と希釈倍率は表 2-2 に記載した。

2.10. 免疫染色

HEK293細胞はトランスフェクションから24時間後にポリリジンコートをしたカバーガラス上に蒔き直した。トランスフェクションから48時間後にカバーガラスをPBSで洗浄し、固定液（4% Paraformaldehyde、2mM NaOH / PBS）を加えて37℃で15分間静置して細胞を固定した。PBSで洗浄した後、0.2%の TritonX-100を含むPBSを加えて室温で10分間静置して、膜透過処理を行った。PBSで洗浄して、ブロッキング液（1%BSA / PBS）を加えて室温で1時間ブロッキングし、その後ブロッキング液で500倍に希釈した一次抗体を加えて、室温で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、ブロッキング液で1000倍に希釈した二次抗体と核染色のためのHoechstを加えて、1時間暗所で反応させた。その後、PBSで洗浄して、80% glycerol、1% n-propyl gallateを用いてスライドガラス上にマウントし、マニキュアで封入した。蛍光顕微鏡を用いて観察し、画像を取得した。^[F]_[SEP]

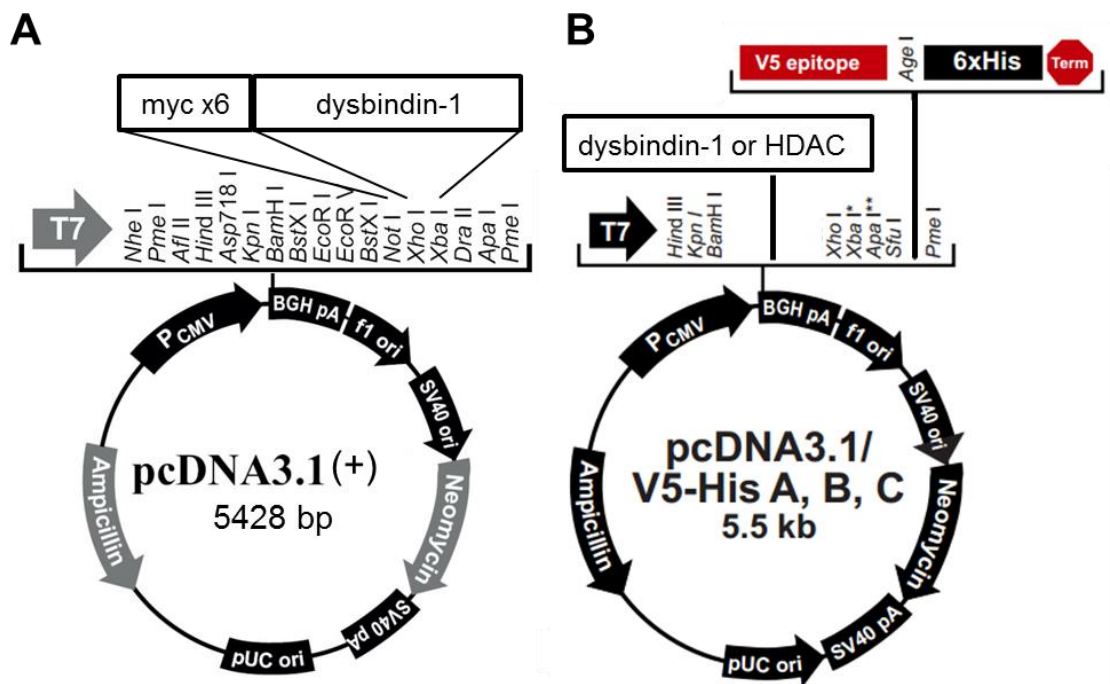


図 2. プラスミド

(A) myc-dysbindin-1 のプラスミド。pcDNA3.1 (Invitrogen 社) の Not I と Xho I サイトに myc タグ x6 を挿入し、Xho I と Xba I サイトにヒト dysbindin-1A、B、C をクローニングしてある。(B) V5-HDAC と V5-dysbindin-1 のプラスミド。pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen 社) の BamH I と Xho I サイトにヒト HDAC と dysbindin-1 をそれぞれクローニングしてある。

表 2-1. ヒト HDAC1、HDAC2 のクローニングに用いたプライマー

遺伝子名	向き	プライマー配列 (5'→3')
HDAC1	FW	aaaggatccagatggcgcagacgcagggc
	RV	aaactcgagggccaacttgacctcctctt
HDAC2	FW	aaaggatcccatggcgtacagtcaaggag
	RV	aaactcgagggggttgctgagctgttctga

表 2.2. ウェスタンブロッティングに使用した抗体

		メーカー	希釈倍率	
一次抗体	rabbit anti-dysbindin-1 antibody	石浦研究室で作成	1:1000	
	rabbit anti-HDAC3 antibody	Abcam	1:1000	
	goat anti-GST antibody	Amersgam	1:2000	
	rabbit anti-V5 antibody	Millipore	1:10000	
	mouse anti-V5 antibody	Invitrogen	1:5000	
	rabbit anti-myc antibody	Cell Signaling	1:1000	
	mouse anti-myc antibody	Invitrogen	1:5000	
	rabbit anti-phospho-HDAC3 antibody	Cell Signaling	1:1000	
	rabbit anti- α -tubulin antibody	Cell Signaling	1:1000	
	mouse anti-laminB antibody	Invitrogen	1:1000	
	rabbit anti-Histone H3 antibody	Abcam	1:5000	
	rabbit anti-acetyl Histone H3 antibody	Millipore	1:5000	
	rabbit anti-NF- κ B antibody	Abcam	1:2000	
	二次抗体	anti-rabbit IgG antibody (HRP-linked)	Cell Signaling	1:5000
		anti-mouse IgG antibody (HRP-linked)	Cell Signaling	1:5000
anti-goat IgG antibody (HRP-linked)		Santa Cruz	1:5000	

3. 結果

3-1. HDAC3 と相互作用する dysbindin-1 のアイソフォームの特定

3-1-1. GST pull down assay

統合失調症の患者の脳での減少が報告されている dysbindin-1A、-1B、-1C の 3 つのアイソフォームについて (図 3-1)、どのアイソフォームが HDAC3 とタンパク質間相互作用をするのかを GST pull down assay により調べた。

GST-dysbindin-1A、-1B、-1C のコンストラクトをそれぞれ大腸菌 BL-21 株に導入し、対応するタンパク質を発現させた後、グルタチオンセファロースビーズとの複合体として回収した。一方、HEK293 細胞に V5-HDAC3 をトランスフェクションし、ライセートを得た。GST-dysbindin-1A、-1B、-1C タンパク質とグルタチオンセファロースビーズの複合体と、V5-HDAC3 を発現したライセートを反応させて GST pull down assay を行った (図 3-2)。GST-dysbindin-1A と B では V5-HDAC3 が共沈降したが、GST-dysbindin-1C では共沈降しなかった。この結果から dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームのうち-1A と-1B のみが V5-HDAC3 と結合することが分かった。

3-1-2. 共免疫沈降法

さらに、dysbindin-1 いずれのアイソフォームが HDAC3 と相互作用をするのかをより生体内に近い条件下で調べるため、ヒト培養細胞を用いた共免疫沈降法により検討を行った。

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させ、そのライセートを抗 V5 抗体で免疫沈降した (図 3-3)。myc-dysbindin-1A と-1B では共沈降が確認され、-1C では共沈降しなかった。この結果からも dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームのうち-1A と-1B のみが HDAC3 と結合することが分かった。

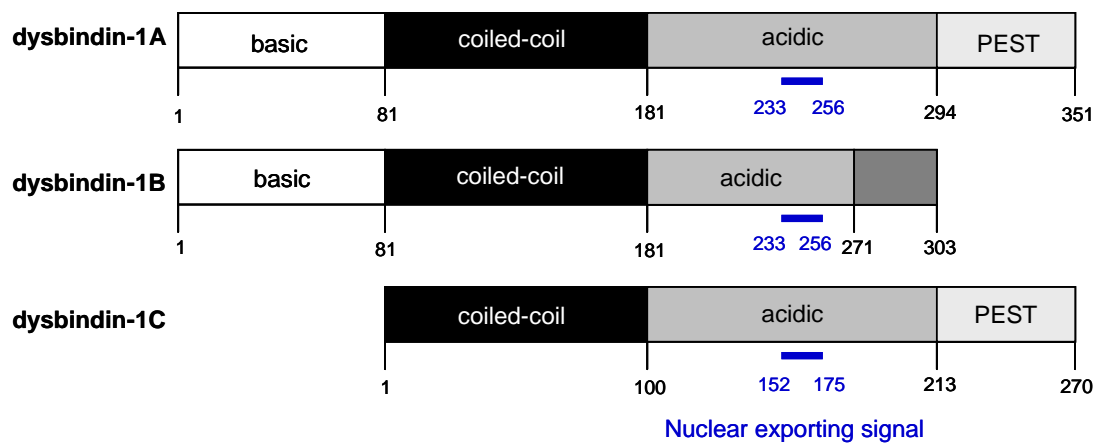


図 3-1. dysbindin-1 の 3つのアイソフォーム

dysbindin-1A が 351 アミノ酸で最も大きく、-1B は C 末端が-1A と異なり短く、-1C は-1A の N 末端の 81 アミノ酸を欠いた構造をしている。dysbindin-1 は古典的な核局在シグナルはもたないが、-1A でアミノ酸配列の 1-217 に相当する N 末端側が核への局在に重要であることが実験的に示されている。また、3つのアイソフォームに共通の、-1A ではアミノ酸配列の 233-256 の部分が核外輸送に必要であることが報告されている (75)。

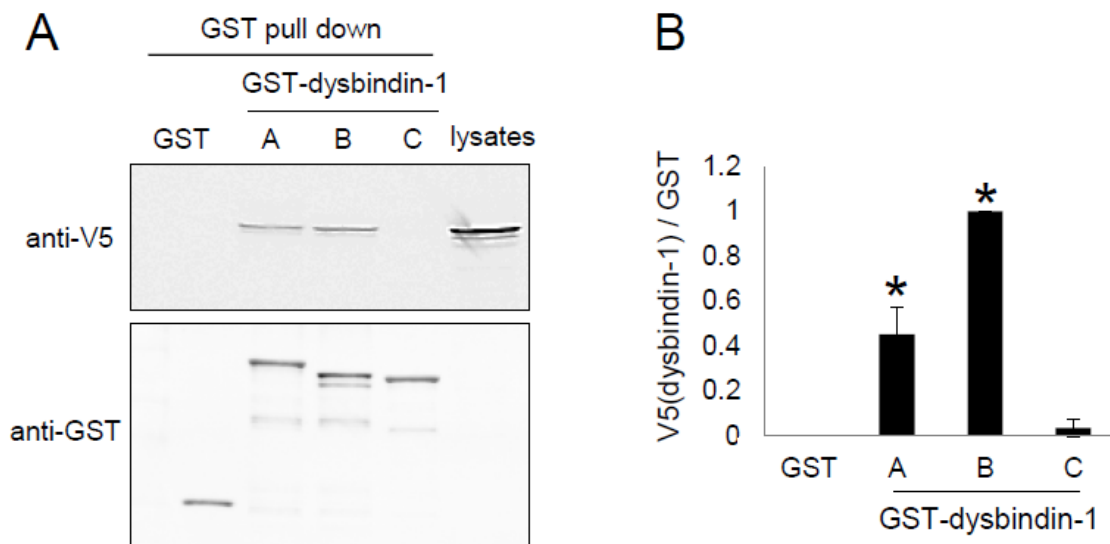


図 3-2. GST pull down assay による HDAC3 と相互作用する dysbindin-1 のアイソフォームの特定

(A) 精製した GST-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 発現 HEK293 細胞のライセートを用いて GST pull down assay を行った。上のパネルは抗 V5 抗体による共沈降した V5-HDAC3 の検出、下のパネルは抗 GST 抗体による GST 融合タンパク質の検出を示す。

(B) (A)で得られた結果を定量化し、V5-HDAC3 を GST (dysbindin-1) で標準化した値を計算し、dysbindin-1B を過剰発現させたときの値を 1 としてグラフに示した。Dunnett's multiple comparison test を用いて有意差を検定した (* $p < 0.05$) (n=3)。

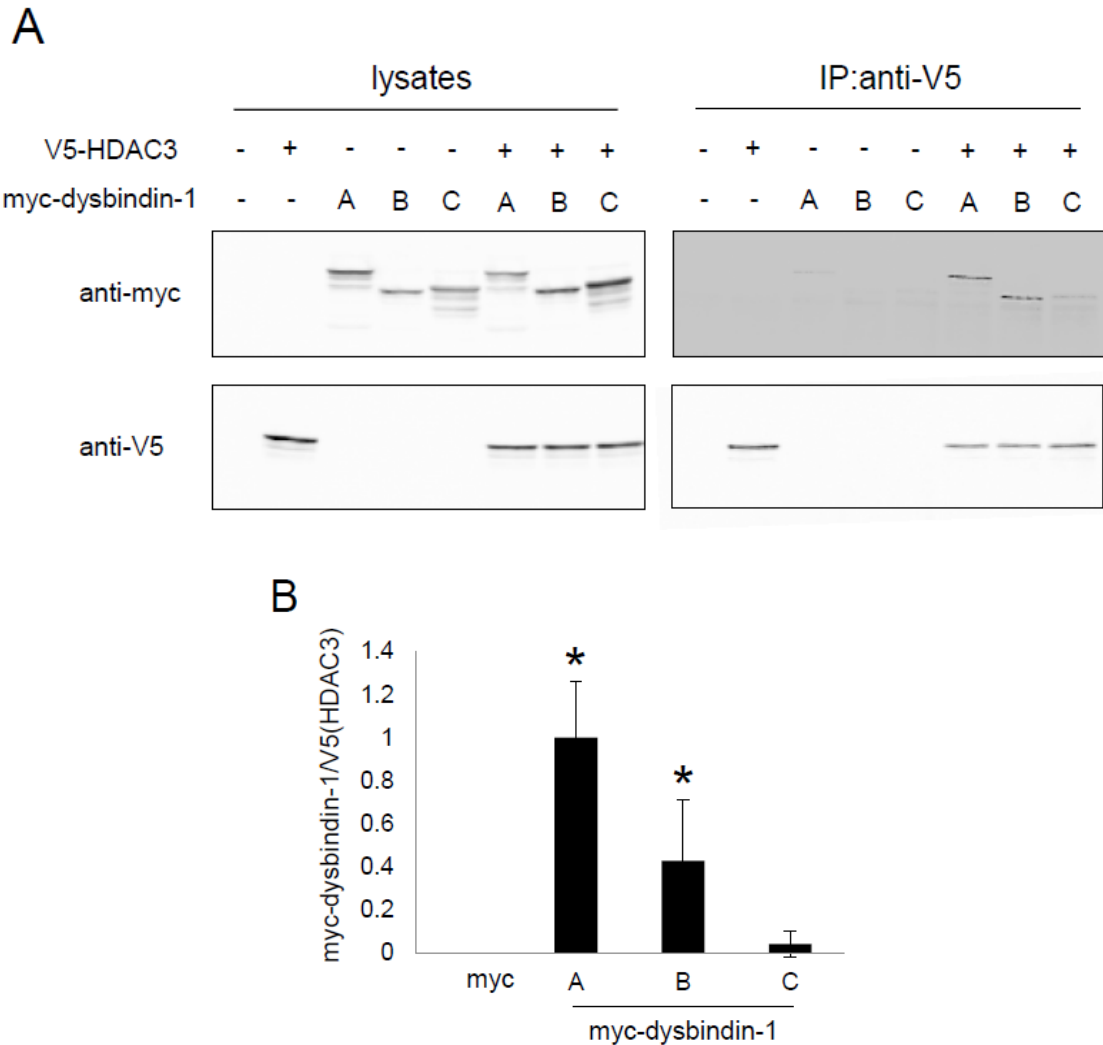


図 3-3. 共免疫沈降法による HDAC3 と相互作用する dysbindin-1 のアイソフォームの特定

(A) myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させ、抗 V5 抗体で免疫沈降した。左がライゼートで右が免疫沈降 (IP) したサンプルをそれぞれ抗 myc 抗体、抗 V5 抗体でウェスタンブロットした結果である。(B) (A) で得られた結果を定量化し、myc-dysbindin-1 を V5 (HDAC3) で標準化した値を計算し、dysbindin-1A を過剰発現させたときの値を 1 としてグラフに示した。Dunnett's multiple comparison test を用いて有意差を検定した (* $p < 0.05$) (n=4)。

3-2. dysbindin-1 による HDAC3 のリン酸化状態の変化

石浦研究室の先行研究により、dysbindin-1 は DNA-PK 複合体によりリン酸化されることが明らかになっている (54)。一方で DNA-PK 複合体は HDAC3 をリン酸化し、その活性を上昇させることが報告されている (55)。そこで dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用が HDAC3 のリン酸化状態に影響する可能性を検討した。HDAC3 では 424 番のセリンがリン酸化されることが分かっている (76)。抗リン酸化 HDAC3 抗体を用いて、3 種の dysbindin-1 のアイソフォーム過剰発現下での HDAC3 のリン酸化状態を調べた。

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させ、抗 V5 抗体で免疫沈降を行った。その産物を 2 群に分け、アルカリフォスファターゼ処理群 (+) と無処理群 (-) とした (図 3-4A)。アルカリフォスファターゼ処理群では V5-HDAC3 は検出されたが、リン酸化 HDAC3 は検出されず、Cell Signaling 社の抗 HDAC3 抗体がリン酸化 HDAC3 とのみ反応し、脱リン酸化された HDAC3 とは反応しないことが確認された。無処理群で検出されたリン酸化 HDAC3 は myc-dysbindin-1B 過剰発現下で最も多く検出された。

得られた結果を定量化するために、リン酸化 HDAC3 のシグナル強度を V5-HDAC3 のシグナル強度で標準化した値を計算し、dysbindin-1 を過剰発現していないときの値を 1 としてグラフに示した (図 3-4B)。myc-dysbindin-1B 過剰発現下では有意にリン酸化 HDAC3 が増加し、myc-dysbindin-1A と-1C については過剰発現による影響は認められなかった。この結果から dysbindin-1 のアイソフォーム-1B のみが HDAC3 の 424 番のセリンのリン酸化を促進し、アイソフォーム-1A と-1C を過剰発現させても HDAC3 のリン酸化状態に影響がないことが分かった。

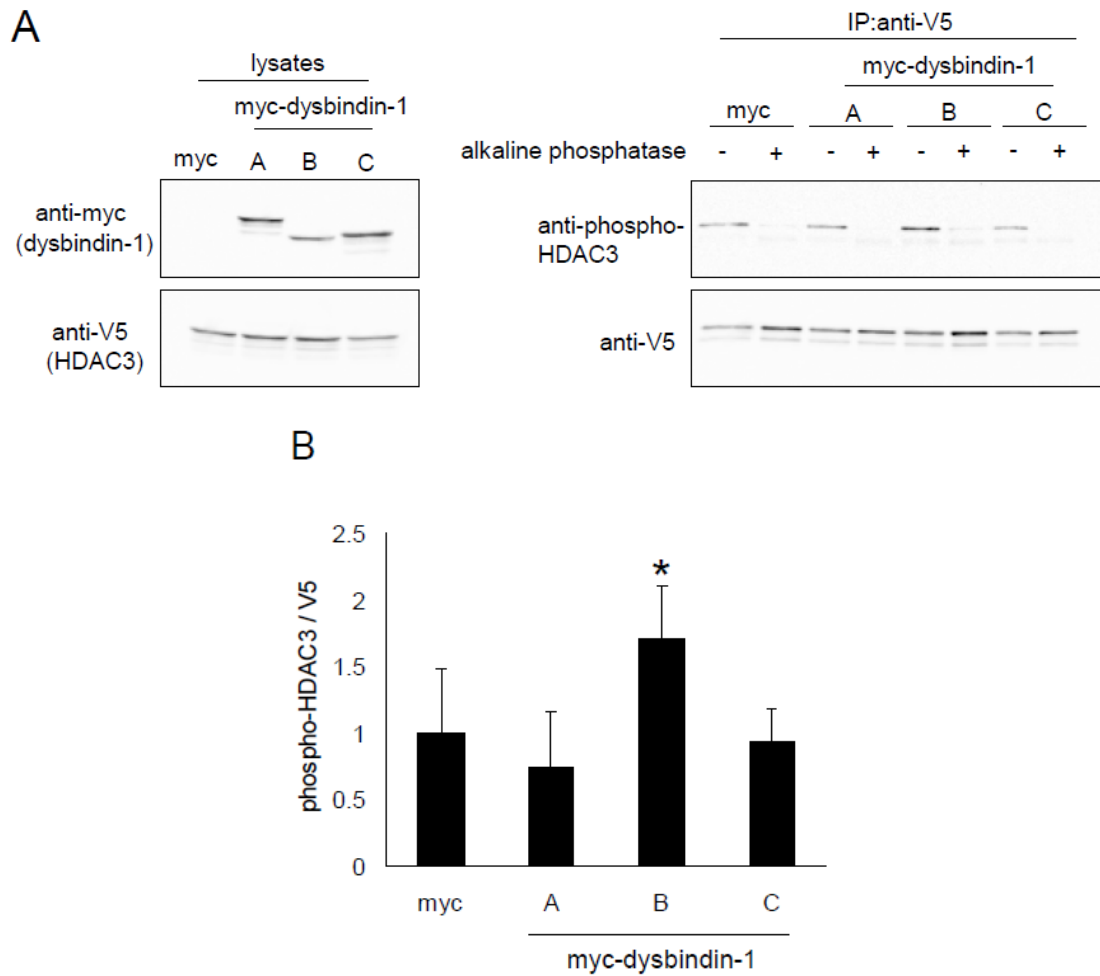


図 3-4. dysbindin-1 による HDAC3 のリン酸化状態の変化

(A) myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させ、抗 V5 抗体で免疫沈降 (IP) した産物を、アルカリフォスファターゼ処理群と無処理群に分け、抗リン酸化 HDAC3 と V5-HDAC3 を検出した。左がライセートで右が免疫沈降 (IP) したサンプルである。(B) (A)で得られた結果を定量化し、リン酸化 HDAC3 を V5-HDAC3 で標準化した値を計算し、dysbindin-1 が過剰発現していないときの値を 1 としてグラフに示した。Dunnett's multiple comparison test を用いて有意差を検定した (* $p < 0.05$) (n=6)。myc はベクターのみをトランスフェクションしたコントロールである。

3-3. HDAC3 の共発現による dysbindin-1 の細胞内局在の変化

3-3-1. dysbindin-1 と HDAC3 の細胞内局在

dysbindin-1 と HDAC3 がタンパク質間で相互作用することにより、細胞内における局在が変化する可能性が考えられた。まず最初に dysbindin-1A、-1B、-1C そして HDAC3 の細胞内における局在を検討した。

まず myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 それぞれを HEK293 細胞に過剰発現させた。得られた細胞について細胞質と核とに分画し、それぞれの myc-dysbindin-1 と V5-HDAC3 の量を調べた (図 3-5)。myc-dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームとも細胞質画分に多く検出され、核画分ではわずかにしか検出されなかった。V5-HDAC3 は細胞質画分と核画分の両方に局在が認められた。

3-3-2. HDAC3 の共発現による dysbindin-1 の細胞内局在への影響

次に dysbindin-1 と HDAC3 が共存することで、細胞内における局在が変化するのかを検討した。

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 のコンストラクトを HEK293 細胞に過剰発現させ、細胞分画を行い、細胞質画分と核画分における myc-dysbindin-1 の各アイソフォームの存在量を調べた (図 3-6)。細胞質画分では myc-dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームとも V5-HDAC3 を共発現させたことによる存在量の変化は見られなかった。核画分では V5-HDAC3 の発現下で myc-dysbindin-1B の量が有意に増加し、myc-dysbindin-1A でも量が増加する傾向が見られた。myc-dysbindin-1C については共発現による量の変化は見られなかった。

HDAC3 の過剰発現による核内の dysbindin-1 の量の変化を免疫染色でも調べた (図 3-7)。dysbindin-1A、-1B、-1C とも、HDAC3 を過剰発現させても、主に細胞質に局在し、核にはわずかに局在するのみであり、HDAC3 により、dysbindin-1A と-1B の核における存在量が増加する様子は観察できなかった。

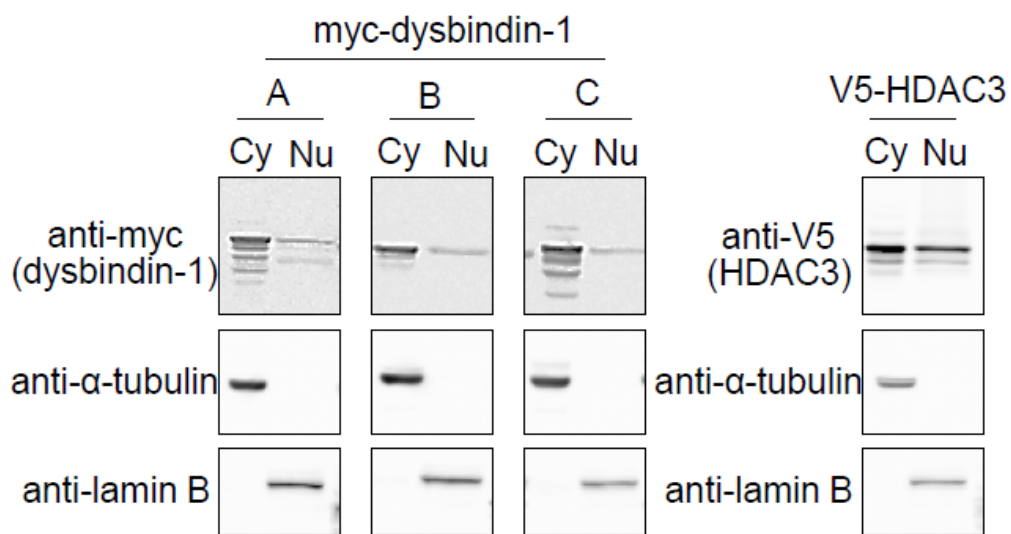


図 3-5. myc-dysbindin-1 と V5-HDAC3 の局在

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C それぞれと V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させたのち 48 時間後に細胞分画を行い、細胞質画分と核画分中の myc-dysbindin-1 と V5-HDAC3 を検出した。Cy は細胞質画分、Nu は核画分を表す。細胞質マーカーとして α -tubulin、核マーカーとして lamin B を用いた。

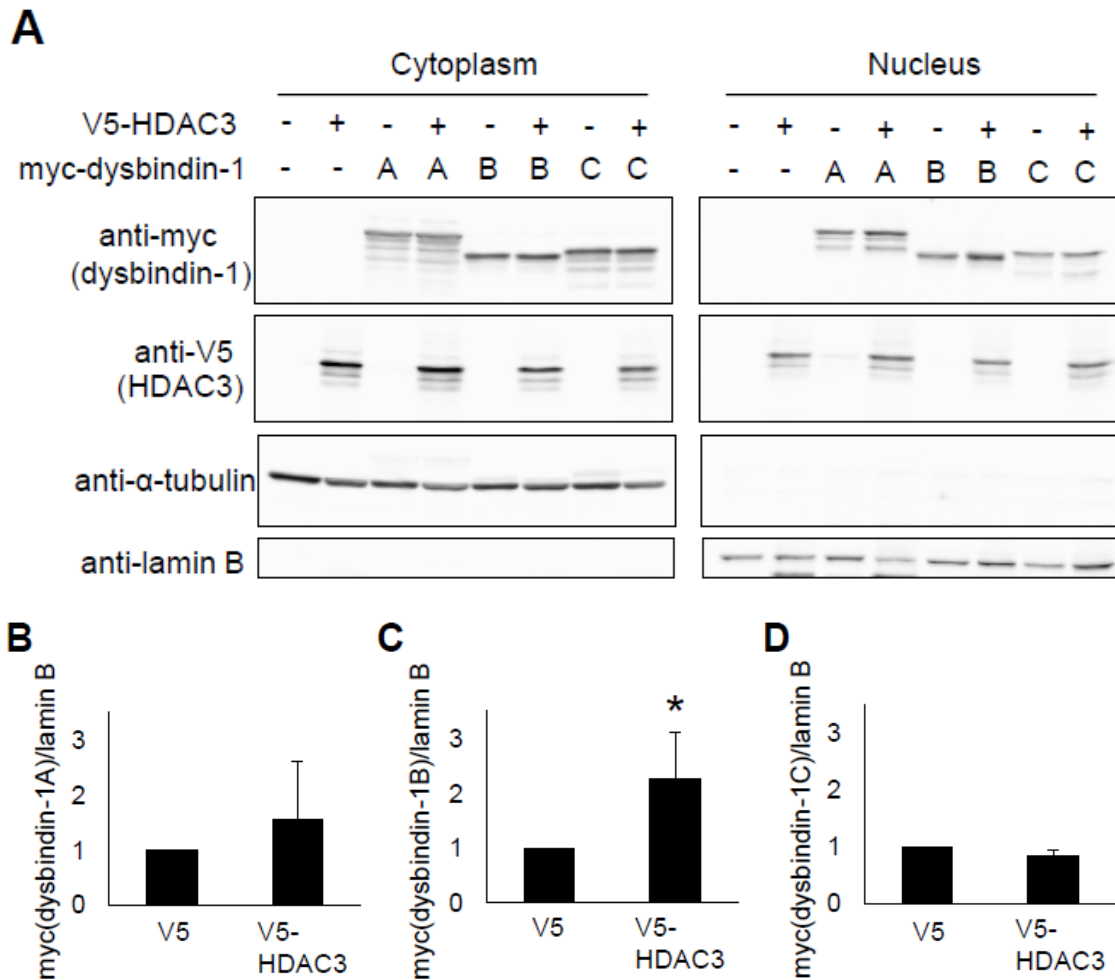


図 3-6. V5-HDAC3 との共存による myc-dysbindin-1 の局在の変化

(A) myc-dysbindin-1A、B、C と V5-HDAC3 を過剰発現させた HEK293 細胞を分画し、細胞質画分と核画分中の myc-dysbindin-1 と V5-HDAC3 を検出した。細胞質マーカーとして α -tubulin、核マーカーとして laminB を用いた。(B, C, D) (A)の核画分の myc-dysbindin-1 の定量化を行った。laminB も同時に定量化して、laminB で標準化した値を計算し、さらに V5-HDAC3 を過剰発現させていないときの値を 1 としてグラフに示した。Student's *t*test を用いて有意差を検定した (* $P < 0.05$) (n=5)。V5 はベクターのみをトランスフェクションしたコントロールである。

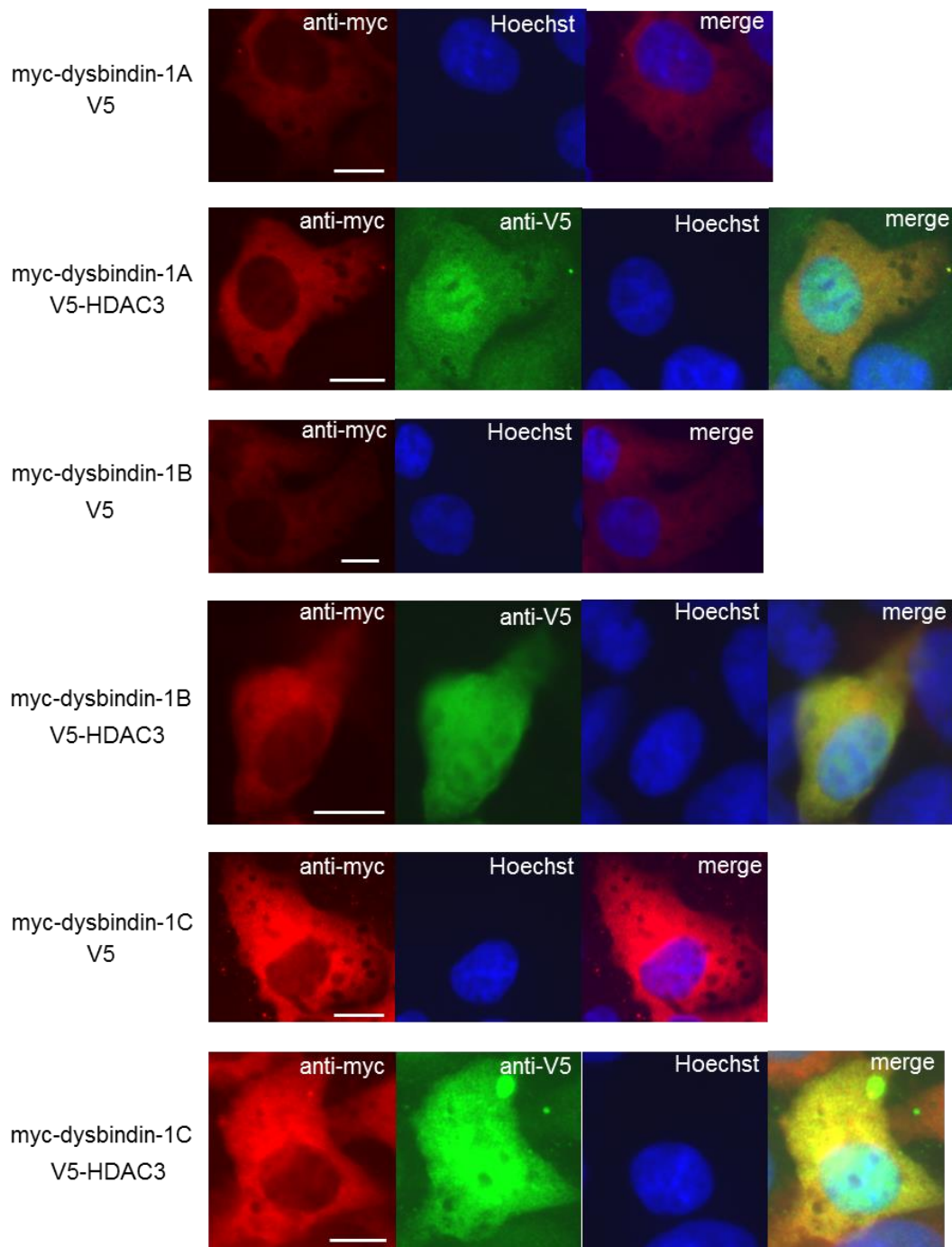


図 3-7. 免疫染色による dysbindin-1 の細胞内局在の観察

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を過剰発現させた HEK293 細胞を抗 myc 抗体と抗 V5 抗体を用いて免疫染色した。Hoechst で核を検出した。スケールバーは 10 μ m である。

3-4. dysbindin-1 と HDAC3 の複合体の細胞内局在

HDAC3 の過剰発現により、HDAC3 と相互作用する dysbindin-1A と-1B の核での量が増加したことから、dysbindin-1A と-1B は HDAC3 と核内で相互作用すると推測された。そこで dysbindin-1 と HDAC3 が核内で相互作用するのかを調べた。

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC3 を HEK293 細胞に過剰発現させ、細胞分画を行い、核画分を抗 V5 抗体で免疫沈降した (図 3-8)。3-1-2 の細胞ライセートでの共免疫沈降と同様、myc-dysbindin-1A と-1B では共沈降が確認され、-1C では共沈降しなかった。この結果から、dysbindin-1A と-1B は核内で HDAC3 と複合体を形成していることが分かった。

図 3-8. 核での dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用
2 年以内に刊行予定

3-5. dysbindin-1 による HDAC3 の局在と核内でのリン酸化の変化

3-4 で dysbindin-1 と HDAC3 は核で相互作用することが分かった。また HDAC3 が主に機能するのは核内であるため、dysbindin-1 の過剰発現の際の HDAC3 の核内における量とリン酸化状態を調べた。

HEK293 細胞に myc-dysbindin-1A、-1B、-1C をそれぞれ発現させ、細胞分画を行い、核画分の HDAC3 の量とリン酸化状態を調べた (図 3-9)。HDAC3 の核での量については、dysbindin-1 による影響は認められなかった。一方で、HDAC3 の核内でのリン酸化状態については、HDAC3 と相互作用する dysbindin-1B の過剰発現で有意に減少しており、dysbindin-1A でも減少する傾向が見られた。

図 3-9. **dysbindin-1** による核での HDAC3 の量とリン酸化状態の変化
2 年以内に刊行予定

3-6. dysbindin-1 のヒストンアセチル化への影響

3-6-1. dysbindin-1 のヒストン H3 のアセチル化への影響

dysbindin-1A と-1B は核内の HDAC3 のリン酸化を抑制しており、それにより HDAC3 の活性が下がり、ヒストンのアセチル化が上昇することが考えられた。そこで、dysbindin-1 のヒストンアセチル化への影響を検証した。HDAC3 はヒストン H3 やヒストン H4 を基質として脱アセチル化することが知られており (57)、ヒストン H3 のアセチル化に抗ヒストン H3 アセチル化抗体を用いて調べた。

HEK293 細胞に myc-dysbindin-1A、-1B、-1C をそれぞれ発現させ、細胞分画を行い、核画分を用いてウェスタンブロットを行った (図 3-10)。HDAC3 と結合する dysbindin-1A と-1B でヒストン H3 のアセチル化が上昇する傾向が見られた。

3-6-2. dysbindin-1 による HDAC3 のヒストン H3 への結合への影響

HDAC3 は SMRT/NCOR と複合体を形成することでヒストンを脱アセチル化することが知られている (図 1-2)。核内で dysbindin-1A と-1B が HDAC3 と相互作用することで、HDAC3 が SMRT/NCOR と複合体を形成できなくなり、ヒストンに結合できなくなる可能性が考えられ、これを検証した。

HEK293 細胞に myc-dysbindin-1A、-1B、-1C をそれぞれ発現させ、細胞分画を行い、核画分を抗ヒストン H3 抗体で免疫沈降した (図 3-11)。すべての dysbindin-1 のアイソフォームで V5-HDAC3 の共沈降が起こり、共沈降した V5-HDAC3 の量に dysbindin-1 による影響は認められなかった。また、HDAC3 と相互作用する dysbindin-1A と-1B は抗ヒストン H3 抗体で共沈降し、-1C では共沈降は起こらなかった。

図 3-10. **dysbindin-1** のヒストン H3 アセチル化への影響
2 年以内に刊行予定

図 3-11. **dysbindin-1** による **HDAC3** のヒストン **H3** への結合への影響
2 年以内に刊行予定

3-7. dysbindin-1 の NF- κ B シグナルへの影響

先行研究により、HDAC3 は核内の NF- κ B を脱アセチル化し、NF- κ B の核外輸送を促進することで、NF- κ B 依存的なシグナルを抑制することが知られている (61, 62)。dysbindin-1A、-1B は HDAC3 との相互作用を通じて、NF- κ B シグナルに影響を与える可能性が考えられ、これを検証した。

HEK293 細胞に V5-dysbindin-1A、-1B、-1C をそれぞれ発現させて、細胞分画を行い、核画分についてウェスタンブロットを行った (図 3-12)。dysbindin-1A、-1B、-1C すべてアイソフォームの過剰発現で、核での NF- κ B の量が減少していた。

図 3-12. **dysbindin-1** による核内 NF- κ B の量の変化
2 年以内に刊行予定

3-8. dysbindin-1 と HDAC1、HDAC2 との相互作用

3-8-1. GST pull down assay による dysbindin-1 と HDAC1、HDAC2 の相互作用

HDAC はその相同性からクラス I、クラス II、クラス III、クラス IV の 4 つのクラスに分けられ、HDAC3 は HDAC1、HDAC2、HDAC8 とともにクラス I に分類される。HDAC3 との相同性は HDAC1 と HDAC2 は約 60%、HDAC8 が約 40% である。dysbindin-1 は HDAC3 だけでなく、相同性の高い他のクラス I HDAC とも相互作用する可能性が考えられ、HDAC3 と特に相同性が高い HDAC1 と HDAC2 に関して、dysbindin-1 との相互作用の有無を調べた。

GST-dysbindin-1A、-1B、-1C のコンストラクトをそれぞれ大腸菌に BL-21 株に導入し、対応するタンパク質を発現させた後、グルタチオンセファロースビーズとの複合体として回収した。一方、HEK293 細胞に V5-HDAC1、V5-HDAC2 をそれぞれトランスフェクションし、ライセートを得た。GST-dysbindin-1A、-1B、-1C タンパク質とグルタチオンセファロースビーズの複合体と、V5-HDAC1、V5-HDAC2 を発現したライセートを反応させて GST pull down assay を行った (図 3-8A、B)。HDAC2 については、HDAC3 と同様、GST-dysbindin-1A と -1B で共沈降が見られたが、-1C では共沈降は起こらなかった。HDAC1 については、GST-dysbindin-1A、-1B、-1C のすべてで共沈降が見られ、-1C のバンドは -1A、-1B に比べて薄かった。これらの結果から、dysbindin-1 は HDAC1、HDAC2 と相互作用することが示唆された。

3-8-2. 共免疫沈降による dysbindin-1 と HDAC1 の相互作用

GST pull down assay では HDAC2 は HDAC3 と同様、dysbindin-1A と -1B のみと相互作用するという結果が得られたが、HDAC1 では dysbindin-1A、-1B、-1C のすべてと相互作用が見られた。dysbindin-1 と HDAC1 の相互作用が dysbindin-1 のアイソフォームによるかをさらにヒト培養細胞を用いた共免疫沈降法により検討した。

myc-dysbindin-1A、-1B、-1C と V5-HDAC1 を HEK293 細胞に過剰発現させ、そのライセートを抗 V5 抗体で免疫沈降した (図 3-8C)。myc-dysbindin-1A と -1B では共沈降が確認されたが、-1C では共沈降しなかった。これらの結果から HDAC3 と同様、dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームうち -1A と -1B のみが HDAC1 と HDAC2 と相互作用することが分かった。

図 3-13. **dysbindin-1** と **HDAC1**、**HDAC2** との相互作用
2 年以内に刊行予定

図 3-14. 共免疫沈降法による HDAC1 と相互作用する **dysbindin-1** のアイソフォームの特定
2 年以内に刊行予定

4. 考察

4-1. HDAC3 と結合するアイソフォーム

石浦研究室での先行研究により、生体内において *dysbindin-1* と HDAC3 が結合することが明らかにされた (図 1-4)。現在、NCBI データベースにヒトの *dysbindin-1* には-1A、-1B、-1C、-1D、-1E の 5 つのスプライシングアイソフォームが登録されており、これらのうち-1A、-1B、-1C については統合失調症患者の死後脳で減少していることが確認されている (10, 19, 40, 41)。そこで本研究で、*dysbindin-1A*、-1B、-1C の 3 つのアイソフォームのうち、どのアイソフォームが HDAC3 と結合するのかを GST pull down assay と過剰発現系における共免疫沈降法により検討したところ、-1A と-1B は HDAC3 と結合し、-1C は結合しないことが示された (図 3-2、図 3-3)。*dysbindin-1A* は 351 アミノ酸で 3 つのアイソフォームのうち最も長く、-1B は 303 アミノ酸で 271 番目以降のアミノ酸が-1A と異なる。-1C は 270 アミノ酸で、-1A の N 末端の 81 アミノ酸を欠いたものである (図 3-1)。*-1A*、*-1B*、*-1C* が共通にもつ、-1A では 82 番目から 181 番目のアミノ酸に当たる領域はコイルドコイル (coiled-coil) 構造を取ることが知られており、それより N 末端側は弱塩基性で、C 末端側は酸性であるとされている。*-1A* と-1C が共通にもつ C 末端の 56 アミノ酸はタンパク質の安定性に関与する PEST ドメインであるとされている。*-1A* と-1B は HDAC3 と結合し、-1C は結合しないという結果から、HDAC3 との結合に必要な *dysbindin-1* の領域は、-1A と-1B が共通にもつ、コイルドコイル構造より前の、弱塩基性の N 末端側領域であることが示唆された。コイルドコイル構造は、同構造をもつ同種または他のタンパク質との結合に寄与することが知られているが、*dysbindin-1* と HDAC3 の結合はコイルドコイル構造を介したものではないことが分かった。

4-2. HDAC3 との結合による *dysbindin-1* の局在の変化

dysbindin-1A と-1B が HDAC3 と結合することが明らかになり、この結合が *dysbindin-1* の細胞内での局在に影響するのかを HEK293 細胞における過剰発現系を用いて検討した。*dysbindin-1* の局在については、先行研究で、SH-SY5Y 細胞における内在性のものと、COS-7 細胞において過剰発現させたものが調べられており、*dysbindin-1A* と-1B は核にも存在するが、-1C は核には存在しないという報告がなされている (54)。本研究では HEK293 細胞に過剰発現させたが、-1A、-1B、-1C の 3 つのアイソフォームとも核での存在が見られた (図 3-5)。アイソフォーム-1C で見られた矛盾は、細胞の種類による可能性が考えられる。先行研究と今回の結果とを合わせて、*dysbindin-1* は主に細胞質に存在するが、核に

も存在するとしてよいと考えられる。HDAC3 に関しては、核、細胞質ともによく存在していることが知られており、本研究でも同様の結果が見られた (図 3-5)。

dysbindin-1 と HDAC3 を HEK293 細胞に共発現させたところ、細胞分画とウェスタンブロットィングでは HDAC3 の過剰発現で核内の dysbindin-1B の存在量が有意に増加し、-1A についても増加する傾向が見られた (図 3-6)。しかし、免疫染色では、HDAC3 を過剰発現させても dysbindin-1A、-1B とともに主に細胞質に存在するために、核への局在を蛍光で有意に認めることができなかった (図 3-7)。したがって、本法では目標とした核内における存在の増加は見られなかった。これはもともと dysbindin-1 の核への局在はわずかであり、HDAC3 の過剰発現によりその局在が増加しても、免疫染色法では観察できなかったと考えられる。ウェスタンブロットィングでは、HDAC3 による核内での存在量の増加が HDAC3 と結合する-1A と-1B のみで見られたことから、HDAC3 との結合により、dysbindin-1A と-1B は核での存在が増加したと考えることができる。dysbindin-1 は主に細胞質に局在するが、これは dysbindin-1 が核外移行シグナル (nuclear exporting signal) をもつからである (図 3-1)。dysbindin-1 はこの核外移行シグナルにより、CRM1 と結合し、エクスポートイン-1 と CRM1 により核外へ輸送され、核外移行シグナルを除去したり、シグナルに変異を入れたりすると dysbindin-1 は核にもよく局在することが知られている (75)。この報告を基に考えると、dysbindin-1A と-1B は核内で HDAC3 と結合し、HDAC3 と結合したことでエクスポートイン-1 による核外への輸送を受けなくなり、核内での存在量が増加したと考えることができ、dysbindin-1A または-1B と HDAC3 の複合体は核内に存在すると推測された。

4-3. 核内での dysbindin-1 と HDAC3 の結合

dysbindin-1 と HDAC3 の複合体は核に存在すると推測され、これを HEK293 細胞における過剰発現系の核抽出物で共免疫沈降を行い検討した。その結果、dysbindin-1A と-1B は核内で HDAC3 と結合することが示された (図 3-8)。HDAC3 は細胞質にも存在するが、主に働くのは核内であることが知られており、dysbindin-1A、-1B との結合により、HDAC3 の働きが変化し、下流シグナルに影響する可能性が考えられた。

4-4. dysbindin-1 による核内 HDAC3 のリン酸化レベルの低下と ヒストンアセチル化の低下

dysbindin-1A と-1B は HDAC3 と核内において相互作用し、HDAC3 が主に働くのは核内であるため、核内における dysbindin-1 の HDAC3 への影響を検討した。その結果、

dysbindin-1 により HDAC3 の核での存在量に変化は見られなかった。一方で、dysbindin-1A と-1B は核内の HDAC3 のリン酸化レベルを低下させることが分かった (図 3-9)。HDAC3 はリン酸化により活性が上昇することが知られており (55, 76)、HDAC3 の下流シグナルへの影響が考えられた。

HDAC3 はヒストン H3 やヒストン H4 を基質とすることが知られており (57)、dysbindin-1 のヒストン H3 のアセチル化への影響を調べた。その結果、dysbindin-1A と-1B の過剰発現でヒストン H3 のアセチル化は上昇する傾向が見られた (図 3-10)。

HDAC3 はコリプレッサーである SMRT/NCoR と複合体を作り、ヒストンを脱アセチル化し、転写を抑制することが知られている (図 1-2) (58, 59)。dysbindin-1A、-1B との結合により、SMRT/NCoR と複合体を形成できず、ヒストンに結合できなくなる可能性が考えられ、これを検討した。dysbindin-1 の 3 つのアイソフォームをそれぞれ過剰発現させた核抽出物を用いて抗ヒストン H3 抗体で共免疫沈降を行ったところ、共沈降する HDAC3 の量に違いは見られなかった。一方で、dysbindin-1A と-1B は抗ヒストン H3 抗体で共沈降し、-1C は共沈降しなかった (図 3-11)。dysbindin-1A と-1B は共沈降し、-1C はしないというアイソフォームの選択性は HDAC3 との相互作用と一致しており、dysbindin-1A と-1B は HDAC3 との相互作用により、ヒストン H3 に結合すると考えられる。

4-5. dysbindin-1 の HDAC3 のリン酸化への影響

dysbindin-1 の各アイソフォームの HDAC3 のリン酸化への影響を調べたところ、細胞ライセートでは、dysbindin-1B によりリン酸化 HDAC3 が増加したが (図 3-4)、核画分には、dysbindin-1B によりリン酸化 HDAC3 は減少した (図 3-9)。HEK293 細胞について細胞分画を行うと、回収できる細胞質のタンパク質量は核のタンパク質量のおよそ 2~2.5 倍である。また、細胞分画で核タンパク質を抽出するときにはソニケーションを行うが、細胞ライセートを抽出するときにはソニケーションをしておらず、細胞ライセートのタンパク質中に含まれる核タンパク質の量は 25%以下と考えられる。したがって、細胞ライセートは主に細胞質のタンパク質であると考えられ、細胞質では dysbindin-1B はリン酸化 HDAC3 を増加させ、核では減少させると考えられる。

核内でのリン酸化 HDAC3 の減少は、DNA-PK 複合体が dysbindin-1 と HDAC3 をともにリン酸化するため、基質として競合した可能性が考えられる。DNA-PK 複合体は細胞質にも存在するが、核とは違う因子と相互作用するなどして、HDAC3 のリン酸化への影響が核とは異なった可能性がある。

ちなみに細胞質で HDAC3 をリン酸化するキナーゼにはパーキンソン病に関連する PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) がある (77) が、PINK1 と dysbindin-1 の関連はこれまでに報告されていない。がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼである Src は HDAC3 をリン酸化することが知られており (78)、dysbindin-1 欠損マウスでは Src の

活性が低下することが知られている (79)。本研究では、HDAC3 の 424 番目のセリンのリン酸化を調べたため、チロシンキナーゼである Src で説明することはできないが、Src のように、dysbindin-1 により活性が上昇し、HDAC3 をリン酸化するセリン・スレオニンキナーゼが存在する可能性も考えられる。

4-6. dysbindin-1 による核内 NF- κ B の減少

HDAC3 は核内において NF- κ B の構成因子である RelA を脱アセチル化することで、NF- κ B の核外輸送を促進し、NF- κ B 依存的シグナルを抑制することが知られている (図 1-3) (57, 62)。dysbindin-1A と -1B により、核内における HDAC3 のリン酸化は低下することが分かり、HDAC3 の活性が低下し、NF- κ B の脱アセチル化が低下し、NF- κ B の核外輸送が起こらず、核内における NF- κ B が増加する可能性が考えられ、検討した。その結果、dysbindin-1A、-1B、-1C すべてのアイソフォームの過剰発現で、核内の NF- κ B の量は減少することが分かった (図 3-12)。これは dysbindin-1A と -1B により核内 HDAC3 のリン酸化が減少していることから推測せられた仮説と反対の結果であった。また、NF- κ B に対する dysbindin-1 の影響はアイソフォーム選択的でないため、3-7 で見られた dysbindin-1 による核内 NF- κ B の減少は dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用とは異なるメカニズムで起こると推測される。

4-7. dysbindin-1 と HDAC1、HDAC2 の相互作用

HDAC はその相同性からクラス I、クラス II、クラス III、クラス IV の 4 つのクラスに分けられ、HDAC3 は HDAC1、HDAC2、HDAC8 とともにクラス I に分類される。HDAC3 との相同性は HDAC1 と HDAC2 は約 60%、HDAC8 が約 40% である。dysbindin-1 は HDAC3 だけでなく、相同性の高い他のクラス I HDAC とも相互作用する可能性が考えられ、dysbindin-1 と HDAC1、HDAC2 との相互作用の有無を GST pull down assay と共免疫沈降法で検討した。その結果、HDAC3 と同様、dysbindin-1A と -1B は HDAC1、HDAC2 と相互作用し、-1C はしないことが分かった (図 3-13、図 3-14)。したがって、dysbindin-1 は -1A と -1B に共通する弱塩基性の N 末端領域でクラス I HDAC の HDAC1、HDAC2、HDAC3 と相互作用すると考えられる (図 3-1)。

HDAC1、HDAC2、HDAC3 は HDAC1 と HDAC2 の相同性が 83% と最も高く、HDAC3 と HDAC1、HDAC3 と HDAC2 の相同性はそれぞれ 58% と 56% である。3 つの HDAC で最も相同性の高い領域は HDAC3 でアミノ酸残基 128 から 196 に当たる部分であり、この部分で dysbindin-1 と結合している可能性がある (図 4-1)。HDAC3 の deletion mutant

を作成して GST pull down assay や共免疫沈降を行うことで、HDAC の dysbindin-1 との結合領域を同定することができると考えられる。dysbindin-1 と HDAC の相互作用のより詳細なメカニズムを知ることは、新しい創薬ターゲットの発見につながる可能性がある。

4-8. 本研究による統合失調症発症のメカニズムのモデル

本研究により、dysbindin-1A と-1B は核内で HDAC3 と相互作用し、その複合体はヒストンに結合することが示唆された。また、dysbindin-1A と-1B は核内の HDAC3 のリン酸化を低下させることで、HDAC3 の活性を低下させ、ヒストンのアセチル化が上昇することが示唆された。以上のことから、dysbindin-1A、-1B は核内で HDAC3 と複合体を形成し、ヒストンに結合する。dysbindin-1A、-1B と結合した HDAC3 はリン酸化レベルが低く、ヒストンの脱アセチル化が保たれ、転写が正常に起こる。一方で、統合失調症患者では dysbindin-1 の発現が低下しており、HDAC3 は dysbindin-1A、-1B と結合せず、リン酸化レベルが高く、活性が高い状態でヒストンに結合し、ヒストンの脱アセチル化が過剰に起こり、必要な遺伝子の転写が起こらず、統合失調症の症状が発現するというモデルが立てられる (図 4-2)。

dysbindin-1 は HDAC3 と直接相互作用するのか、それとも NCoR/SMRT または DNA-PK 複合体などを介して相互作用するのかは不明である。NCoR や DNA-PK 複合体をノックダウンした条件下で dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用を検討することにより、複合体を形成する因子が特定できると考えられる。

本研究から立てられたモデルにより制御される遺伝子の候補としてシナプス小胞結合タンパク質である synapsin I が考えられる。先行研究により、dysbindin-1 を過剰発現させると synapsin I の発現が増加することが知られており (29)、また、dysbindin-1 の核外輸送を止め、核への局在を増加させることでも synapsin I の発現が増加することが報告された (75)。一方で、HDAC3 は synapsin I のプロモーター領域に結合し、転写を制御することが報告されており (80)、dysbindin-1A、-1B が HDAC3 と相互作用し、ヒストンのアセチル化を保つことで、synapsin I の転写が起こると考えられる。これを検証するためにはクロマチン免疫沈降法が有効であると考えられる。

synapsin I の他にも synapsin II や syntaxin-1、synaptotagmin-1、AP3 などのシナプス関連タンパク質やカルシウム結合タンパク質である parvalbumin が dysbindin-1 欠損マウスでの減少することが報告されており (81)、これらのタンパク質の減少にも dysbindin-1 と HDAC3 の相互作用が関わる可能性が考えられる。これらのタンパク質以外にも、統合失調症患者では受容体や神経伝達物質の合成酵素など多くのタンパク質の発現が変化しており (82, 83, 84, 85)、これまで dysbindin-1 との関連が考えられていなかったタンパク質の発現にも HDAC3 を介して dysbindin-1 が関わる可能性が考えられる。

本研究により立てられたモデルをより発展させることにより、統合失調症発症のメカニズムがより明確になり、HDAC 阻害剤の統合失調症治療薬の可能性が示唆されるのではないかと考えられる。

```

HDAC1 1 -MAQTQGTTRKVCYYYDGDVGNYYYYGQGHMPPHRIRMTNLLLNYGLYRKMEIYRPHKA
HDAC2 1 MAYSQGGGKKKVCYYYDGDIGNYYYYGQGHMPPHRIRMTNLLLNYGLYRKMEIYRPHKA
HDAC3 1 -----MAKTVAYFYDPDVGNFHYGAGHPMKPHRLALHSLVLHYGLYKKMIYFKPYQA
      :.*:** **:**:** *****: **.*:**:**:** **:**:**

HDAC1 60 NAEEMTKYHSDDYIKFLRSIRPDNMSEYSKQMQRFNVGEDCPVFDGLFEFCQLSTGGSVA
HDAC2 61 TAEEMTKYHSDEYIKFLRSIRPDNMSEYSKQMQRFNVGEDCPVFDGLFEFCQLSTGGSVA
HDAC3 54 SQHDMCRFHSEYIDFLQRYSPNTMGGFTKSLNAFNVGDCCPVFPGLFEFCRYTGASLQ
      . .* **:**:**.** : * **. :*. :. *****:**** . **.*

HDAC1 120 SAYKLNKQQTDAVNWAGGLHHAHKKSEASGFCYNDIVLAILELLKYHQRVLYIDIDIHH
HDAC2 121 GAYKLNKQQTDAVNWAGGLHHAHKKSEASGFCYNDIVLAILELLKYHQRVLYIDIDIHH
HDAC3 114 GATQLNKKICDIAINWAGGLHHAHKKFEASGFCYNDIVIGILELLKYHPRVLYIDIDIHH
      .*:**. : **:**:**** *****:**** *****

HDAC1 180 GDGVEEAFYTTDRVMTVSFHKYG-EYFPGTGLDRDIGAGKGYAVNYPLRDGIDDESYE
HDAC2 181 GDGVEEAFYTTDRVMTVSFHKYG-EYFPGTGLDRDIGAGKGYAVNFPMRDGIIDDESYG
HDAC3 174 GDGVQEAFFYLTDRVMTVSFHKYGNVFFPGTGMVEVGAESGRYYCLNVPLRDGIDDSYK
      *****:** ***** :*****: :** .*:**.* **:**:**

HDAC1 239 AIFKPYMSKVMEMFQPSAYVLQCGSDSLSGDRLGCFNLTIKGHAKCVEFYKSFNLPMLML
HDAC2 240 QIFKPIISKVMEYQPSAYVLQCGADSLSGDRLGCFNLTYKGHAKCVEYVYKTFNLPMLML
HDAC3 234 HLFQPYINQVYDFYQPTCIVLQCGADSLGCDRLGCFNLSIRGHGECVEYVYKSFNIPLLVL
      :**:**. :**:**:**. *****:**. *****:**** **:**:**

HDAC1 299 GGGGYTIRNVARCWTYETAVALDTEIPNELPYNDYFEYFGPDFKLHISPSN-MTNQNTNE
HDAC2 300 GGGGYTIRNVARCWTYETAVALDCEIPNELPYNDYFEYFGPDFKLHISPSN-MTNQNTPE
HDAC3 294 GGGGYTVRNVARCWTYETSLLVEEAISEELPYSEYFEYFAPDFLHPDVSTRIENQNSRQ
      *****:*******: :. :**:**:**. *****:**** . * . : ** :

HDAC1 358 YLEKIKQRLFENLRMLPHAPGVQMQAIPEDAIPESGDEDEDDPDKRISICSSDKRIACE
HDAC2 359 YMEKIKQRLFENLRMLPHAPGVQMQAIPEDAVHEDSGDEDEDGEDPDKRISIRASDKRIACD
HDAC3 354 YLDQIRQTIFFENLKMNLHAPSVQIHDVPAADLLTYDRTDEADAE-----
      **:**:** **:**:** **.*:**: * * : : ** :

HDAC1 418 EEFSDSEEEGEGGRKNSSNFKKAKRYKTEDEKEKDPEEKKEYTEEEKTKEEKPEAKGVKE
HDAC2 419 EEFSDSEDEGEGGRRNVADHKKGAKKARIEEDKKETEDKKTDYKEDKSKDNSGEKTDTK
HDAC3 397 -----ERGPENYSRPEAPNEFYDGDHNDKES
      :. * : : . : : .

HDAC1 478 EVKLA-----
HDAC2 479 GTKSEQLSNP
HDAC3 425 DVEI-----

```

図 4-1. HDAC1、HDAC2、HDAC3 のアミノ酸配列の比較

ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)を用いてアラインメントを行った。

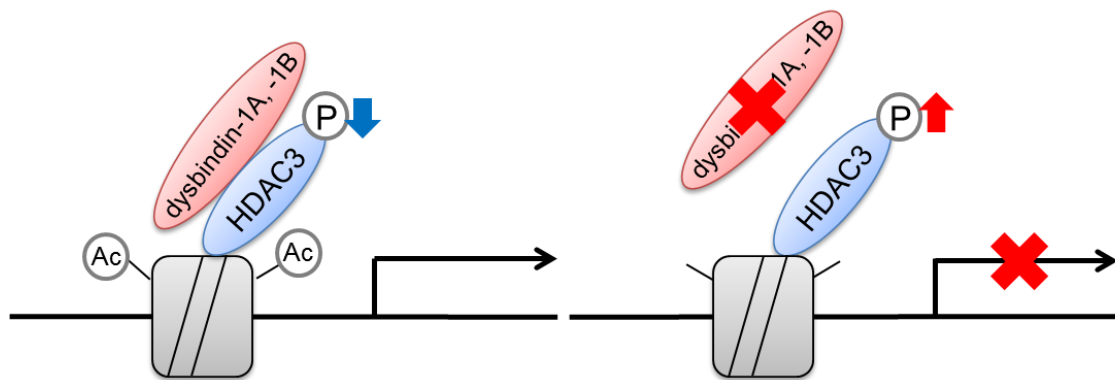


図 4-2. 統合失調症発症メカニズムのモデル

(左) 健常者の脳では dysbindin-1A、-1B が十分に発現しているため、dysbindin-1A と-1B が HDAC3 と結合し、HDAC3 の活性が下がり、ヒストンの脱アセチル化が抑制され、記憶や学習に必要な遺伝子の転写が起こる。(右) 統合失調症患者の脳では、dysbindin-1A、-1B が減少しているため、dysbindin-1A と-1B と HDAC3 の結合が起こらず、HDAC3 のリン酸化状態が上昇し、活性が高く、脱アセチル化が進み、遺伝子の転写が起こらない。

5. 参考文献

1. Warner R, Taylor D, Wright J, Sloat A, Springett G, Arnold S, Weinberg H (1994) Substance use among the mentally ill: prevalence, reasons for use, and effects on illness. *Am J Orthopsychiatry*. 64, 30-39.
2. Hollister LE (1986) Drug-induced psychiatric disorders and their management. *Med Toxicol*. 1, 428-448.
3. Howes O, McCutcheon R, Stone J (2015) Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol*. 29, 97-115.
4. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*. 51, 199-214
5. Balla A, Hashim A, Burch S, Javitt DC, Lajtha A, Sershen H (2001) Phencyclidine-induced dysregulation of dopamine response to amphetamine in prefrontal cortex and striatum. *Neurochem Res* 26, 1001-1006.
6. Moy SS, Perez A, Koller BH, Duncan GE (2006) Amphetamine-induced disruption of prepulse inhibition in mice with reduced NMDA receptor function. *Brain Res* 1089, 186-194.
7. Bogerts B (1984) [Neuropathology of schizophrenias]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 52, 428-437.
8. Koukolík F (1992) [Structural changes in the brain in schizophrenia and affective psychoses]. *Cesk Psychiatr*. 88, 307-315.
9. Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum*

Genet 71, 337-348.

10. Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, Matsumoto M, Hashimoto R, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2004) Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch Gen Psychiatry* 61, 544-555.

11. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71, 877-892.

12. Bo Li, Ran-Sook Woo, Lin Mei, Roberto Malinow (2007) ErbB4, a receptor of the schizophrenia-linked protein neuregulin-1, controls glutamatergic synapse maturation and plasticity *Neuron* 54, 583-597.

13. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9, 1415-1423.

14. Ma TM, Abazyan S, Abazyan B, Nomura J, Yang C, Seshadri S, Sawa A, Snyder SH, Pletnikov MV (2013) Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. *Mol Psychiatry* 18, 557-567.

15. Wei J, Graziane NM, Wang H, Zhong P, Wang Q, Liu W, Hayashi-Takagi A, Korth C, Sawa A, Brandon NJ, Yan Z (2013) Regulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Disrupted-in-Schizophrenia-1. *Biol Psychiatry* S0006-3223, 580-585.

16. Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, Makino Y, Seshadri AJ, Ishizuka K, Srivastava DP, Xie Z, Baraban JM, Houslay MD, Tomoda T, Brandon NJ, Kamiya A, Yan Z, Penzes P, Sawa A (2010)

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci* 13, 327-332.

17. Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ (2001) Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* 276, 24232-24241.

18. Blake DJ, Kröger S (2000) The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23, 92-99.

19. Talbot K, Eidem WL, Tinsley CL, Benson MA, Thompson EW, Smith RJ, Hahn CG, Siegel SJ, Trojanowski JQ, Gur RE, Blake DJ, Arnold SE (2004) Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia. *J Clin Invest* 113, 1255-1257.

20. Li W, Zhang Q, Oiso N, Novak EK, Gautam R, O'Brien EP, Tinsley CL, Blake DJ, Spritz RA, Copeland NG, Jenkins NA, Amato D, Roe BA, Starcevic M, Dell'Angelica EC, Elliott RW, Mishra V, Kingsmore SF, Paylor RE, Swank RT (2003) Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet* 35, 84-89.

21. Huizing M, Boissy RE, Gahl WA (2002) Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man. *Pigment Cell Res* 15, 405-419.

22. Starcevic M, Nazarian R, Dell'Angelica EC (2002) The molecular machinery for the biogenesis of lysosome-related organelles: lessons from Hermansky-Pudlak syndrome. *Semin Cell Dev Biol* 13, 271-278.

23. Falcón-Pérez JM, Starcevic M, Gautam R, Dell'Angelica EC (2002) BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet-dense granules. *J Biol Chem* 277, 28191-28199.

24. Moriyama K, Bonifacino JS (2002) Pallidin is a component of a multi-protein complex involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *Traffic* 3, 666-677.

25. Ciciotte SL, Gwynn B, Moriyama K, Huizing M, Gahl WA, Bonifacino JS, Peters LL

(2003) Cappuccino, a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome, encodes a novel protein that is part of the pallidin-muted complex (BLOC-1). *Blood* 101, 4402-4407.

26. Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72, 185-190.

27. Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jönsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S (2003) The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *Am J Hum Genet* 73, 1438-1443.

28. Tang JX, Zhou J, Fan JB, Li XW, Shi YY, Gu NF, Feng GY, Xing YL, Shi JG, He L (2003) Family-based association study of DTNBP1 in 6p22.3 and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8, 717-718.

29. Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R (2004) Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 13, 2699-2708.

30. Li T, Zhang F, Liu X, Sun X, Sham PC, Crombie C, Ma X, Wang Q, Meng H, Deng W, Yates P, Hu X, Walker N, Murray RM, St Clair D, Collier DA (2005) Identifying potential risk haplotypes for schizophrenia at the DTNBP1 locus in Han Chinese and Scottish populations. *Mol Psychiatry* 10, 1037-1044.

31. Li D, He L (2007) Association study between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 96, 112-118.

32. Datta SR, McQuillin A, Puri V, Choudhury K, Thirumalai S, Lawrence J, Pimm J, Bass N, Lamb G, Moorey H, Morgan J, Pudukollu B, Kandasami G, Kirwin S, Sule A, Queded D, Curtis D, Gurling HM (2007) Failure to confirm allelic and haplotypic association between markers at the chromosome 6p22.3 dystrobrevin-binding protein 1

(DTNBP1) locus and schizophrenia. *Behav Brain Funct* 3:50.

33. Vilella E, Costas J, Sanjuan J, Guitart M, De Diego Y, Carracedo A, Martorell L, Valero J, Labad A, De Frutos R, Nájera C, Moltó MD, Toirac I, Guillamat R, Brunet A, Vallès V, Pérez L, Leon M, de Fonseca FR, Phillips C, Torres M (2008) Association of schizophrenia with DTNBP1 but not with DAO, DAOA, NRG1 and RGS4 nor their genetic interaction. *J Psychiatr Res* 42, 278-288

34. Wirgenes KV, Djurovic S, Agartz I, Jonsson EG, Werge T, Melle I, Andreassen OA (2009) Dysbindin and d-amino-acid-oxidase gene polymorphisms associated with positive and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 60, 31-36.

35. Maher BS, Reimers MA, Riley BP, Kendler KS (2010) Allelic heterogeneity in genetic association meta-analysis: an application to DTNBP1 and schizophrenia. *Hum Hered* 69, 71-79.

36. Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Connor JP, Lawford BR, Young RM, Morris CP (2010) A polymorphism in the dysbindin gene (DTNBP1) associated with multiple psychiatric disorders including schizophrenia. *Behav Brain Funct* 6:41.

37. Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Lawford BR, Young RM, Morris CP (2010) Analysis of HapMap tag-SNPs in dysbindin (DTNBP1) reveals evidence of consistent association with schizophrenia. *Eur Psychiatry* 25314-319.

38. Sacchetti E, Scassellati C, Minelli A, Valsecchi P, Bonvicini C, Pasqualetti P, Galluzzo A, Pioli R, Gennarelli M (2013) Schizophrenia susceptibility and NMDA-receptor mediated signalling: an association study involving 32 tagSNPs of DAO, DAOA, PPP3CC, and DTNBP1 genes. *BMC Med Genet* 14:33.

39. Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC (2003) Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Hum Genet* 113, 149-153.

40. Weickert CS, Rothmond DA, Hyde TM, Kleinman JE, Straub RE (2008) Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients. *Schizophr Res* 98, 105-110.

41. Talbot K, Louneva N, Cohen JW, Kazi H, Blake DJ, Arnold SE (2011) Synaptic dysbindin-1 reductions in schizophrenia occur in an isoform-specific manner indicating their subsynaptic location. *PLoS One* 6, e16886.
42. Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata K (2010) Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Mol Psychiatry* 15, 976-986.
43. Hattori S, Murotani T, Matsuzaki S, Ishizuka T, Kumamoto N, Takeda M, Tohyama M, Yamatodani A, Kunugi H, Hashimoto R (2008) Behavioral abnormalities and dopamine reductions in sdy mutant mice with a deletion in Dtnbp1, a susceptibility gene for schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 298-302.
44. Feng YQ, Zhou ZY, He X, Wang H, Guo XL, Hao CJ, Guo Y, Zhen XC, Li W (2008) Dysbindin deficiency in sandy mice causes reduction of snapin and displays behaviors related to schizophrenia. *Schizophr Res* 106, 218-228.
45. Takao K, Toyama K, Nakanishi K, Hattori S, Takamura H, Takeda M, Miyakawa T, Hashimoto R (2008) Impaired long-term memory retention and working memory in sdy mutant mice with a deletion in Dtnbp1, a susceptibility gene for schizophrenia. *Mol Brain* 1:11.
46. Bhardwaj SK, Baharnoori M, Sharif-Askari B, Kamath A, Williams S, Srivastava LK (2009) Behavioral characterization of dysbindin-1 deficient sandy mice. *Behav Brain Res* 197, 435-441.
47. Cox MM, Tucker AM, Tang J, Talbot K, Richer DC, Yeh L, Arnold SE (2009) Neurobehavioral abnormalities in the dysbindin-1 mutant, sandy, on a C57BL/6J genetic background. *Genes Brain Behav* 8, 390-397.
48. Papaleo F, Yang F, Garcia S, Chen J, Lu B, Crawley JN, Weinberger DR (2012) Dysbindin-1 modulates prefrontal cortical activity and schizophrenia-like behaviors via dopamine/D2 pathways. *Mol Psychiatry* 17, 85-98.
49. Kumamoto N, Matsuzaki S, Inoue K, Hattori T, Shimizu S, Hashimoto R, Yamatodani A, Katayama T, Tohyama M (2006) Hyperactivation of midbrain

dopaminergic system in schizophrenia could be attributed to the down-regulation of dysbindin. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 904-909.

50. Iizuka Y, Sei Y, Weinberger DR, Straub RE (2007) Evidence that the BLOC-1 protein dysbindin modulates dopamine D2 receptor internalization and signaling but not D1 internalization. *J Neurosci* 27, 12390-12395.

51. Ji Y, Yang F, Papaleo F, Wang HX, Gao WJ, Weinberger DR, Lu B (2009) Role of dysbindin in dopamine receptor trafficking and cortical GABA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19593-19598.

52. Kubota K, Kumamoto N, Matsuzaki S, Hashimoto R, Hattori T, Okuda H, Takamura H, Takeda M, Katayama T, Tohyama M. (2009) Dysbindin engages in c-Jun N-terminal kinase activity and cytoskeletal organization. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 191-195.

53. Ma X, Fei E, Fu C, Ren H, Wang G (2011) Dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, facilitates neurite outgrowth by promoting the transcriptional activity of p53. *Mol Psychiatry* 16, 1105-1116.

54. Oyama S, Yamakawa H, Sasagawa N, Hosoi Y, Futai E, Ishiura S (2009) Dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, functionally interacts with the DNA-dependent protein kinase complex in an isoform-dependent manner. *PLoS One* 4, e4199.

55. Jeyakumar M, Liu XF, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bagchi MK (2007) Phosphorylation of thyroid hormone receptor-associated nuclear receptor corepressor holocomplex by the DNA-dependent protein kinase enhances its histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 282, 9312-9322.

56. Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338, 17-31.

57. McQuown SC, Wood MA (2011) HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. *Neurobiol Learn Mem* 96, 27-34.

58. Karagianni P, Wong J (2007) HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene* 26, 5439-5449.
59. Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 392-401.
60. Freudenthal R, Romano A (2000) Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res* 855, 274-281.
61. Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A (2005) Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12, 23-29.
62. Chen LF, Greene WC. (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 392-401.
63. McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, Mullican SE, Jones S, Rusche JR, Lazar MA, Wood MA (2011) HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 31, 764-774.
64. Gavin DP, Kartan S, Chase K, Grayson DR, Sharma RP (2008) Reduced baseline acetylated histone 3 levels, and a blunted response to HDAC inhibition in lymphocyte cultures from schizophrenia subjects. *Schizophr Res* 103, 330-332.
65. Tang B, Dean B, Thomas EA (2011) Disease- and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 1:e64.
66. Abel T, Zukin RS (2008) Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 8, 57-64.
67. Grayson DR, Kundakovic M, Sharma RP (2010) Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders? *Mol Pharmacol* 77, 126-135.
68. Narayan P, Dragunow M (2010) Pharmacology of epigenetics in brain disorders. *Br J Pharmacol* 159, 285-303.

69. Eren Koçak E, Ertuğrul A (2012) Psychiatric disorders and epigenetics. *Turk Psikiyatri Derg* 23, 130-140.
70. Hasan A, Mitchell A, Schneider A, Halene T, Akbarian S (2013) Epigenetic dysregulation in schizophrenia: molecular and clinical aspects of histone deacetylase inhibitors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263, 273-284.
71. Schmitt A, Falkai P (2013) Innovative potential treatment strategies for schizophrenia and biomarkers for Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263, 271-272.
72. Cha DS, Kudlow PA, Baskaran A, Mansur RB, McIntyre RS (2013) Implications of epigenetic modulation for novel treatment approaches in patients with schizophrenia. *Neuropharmacology* 77, 481-486.
73. Kebir O, Chaumette B, Fatjó-Vilas M, Ambalavanan A, Ramoz N, Xiong L, Mouaffak F, Millet B, Jaafari N, DeLisi LE, Levinson D, Joobar R, Fañanás L, Rouleau G, Dubertret C, Krebs MO (2014) Family-based association study of common variants, rare mutation study and epistatic interaction detection in HDAC genes in schizophrenia. *Schizophr Res*. 160, 97-103.
74. Jia X, Zhang T, Li L, Fu D, Lin H, Chen G, Liu X, Guan F (2016) Two-stage additional evidence support association of common variants in the HDAC3 with the increasing risk of schizophrenia susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 171, 1105-1111
75. Fei E, Ma X, Zhu C, Xue T, Yan J, Xu Y, Zhou J, Wang G (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, regulates synapsin I expression. *J Biol Chem* 285, 38630-38640.
76. Zhang X, Ozawa Y, Lee H, Wen YD, Tan TH, Wadzinski BE, Seto E (2005) Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes Dev* 9, 827-839.
77. Choi HK, Choi Y, Kang H, Lim EJ, Park SY, Lee HS, Park JM, Moon J, Kim YJ, Choi I, Joe EH, Choi KC, Yoon HG (2015) PINK1 positively regulates HDAC3 to suppress

dopaminergic neuronal cell death. *Hum Mol Genet.* 24, 1127-1141.

78. Longworth MS, Laimins LA (2006) Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. *Oncogene.* 25, 4495-4500.

79. Banerjee A, Wang HY, Borgmann-Winter KE, MacDonald ML, Kaprielian H, Stucky A, Kvasic J, Egbujo C, Ray R, Talbot K, Hemby SE, Siegel SJ, Arnold SE, Sleiman P, Chang X, Hakonarson H, Gur RE, Hahn CG (2015) Src kinase as a mediator of convergent molecular abnormalities leading to NMDAR hypoactivity in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 20, 1091-1100.

80. Formisano L, Guida N, Laudati G, Mascolo L, Di Renzo G, Canzoniero LM (2015) MS-275 inhibits aroclor 1254-induced SH-SY5Y neuronal cell toxicity by preventing the formation of the HDAC3/REST complex on the synapsin-1 promoter. *J Pharmacol Exp Ther.* 352, 236-243.

81. Saggi S, Cannon TD, Jentsch JD, Lavin A. (2013) Potential molecular mechanisms for decreased synaptic glutamate release in dysbindin-1 mutant mice. *Schizophr Res.* 146, 254-263.

82. Costa E, Davis J, Grayson DR, Guidotti A, Pappas GD, Pesold C (2001) Dendritic spine hypoplasticity and downregulation of reelin and GABAergic tone in schizophrenia vulnerability. *Neurobiol Dis.* 8, 723-742.

82. Mirnics K, Levitt P, Lewis DA (2006) Critical appraisal of DNA microarrays in psychiatric genomics. *Biol Psychiatry.* 60, 163-176.

83. Akbarian S, Huang HS (2006) Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders. *Brain Res Rev.* 52, 293-304.

84. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Sharma RP, Smith RC, Tueting P, Zhubi A (2014) Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. *J Neurogenet.* 28, 41-52.

謝辞

本研究の遂行にあたり、数多くの方々にご協力やご助言を頂きました。太田邦史教授からは抗 HDAC 抗体と抗ヒストンアセチル化抗体をご供与頂きました。坪井貴司准教授からはシナプス関連タンパク質の抗体をご供与頂きました。深く御礼申し上げます。

また、免疫染色では大杉美穂准教授はじめ大杉研究室の方に大変お世話になりました。深く感謝いたします。

指導教員であった石浦章一教授には、長い間ご指導賜りました。心より感謝申し上げます。石浦研究室の OB の方々にも数多の協力や助言を頂きました。重ねて御礼申し上げます。

そして、指導教員である渡邊雄一郎教授には、植物と動物の違いがありながらも丁寧なご指導賜りました。心より感謝申し上げます。また、分野が異なる私の研究に興味をもって、温かく受け入れてくれた渡邊研究室の皆さん、心より感謝申し上げます。