

氏名(本籍)	藤井久彌子(兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第336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18年3月24日
学位論文題目	Serine racemase binds to PICK1: potential relevance to schizophrenia (セリンラセマーゼは、PICK1に結合し、統合失調症に関連している可能性がある)
審査委員	主査 教授 堀池 喜八郎 副査 教授 岡村 富夫 副査 教授 遠山 育夫

論文内容要旨

※整理番号	340	(ふりがな) 氏名	ふじい くみこ 藤井 久彌子
学位論文題目	Serine Racemase Binds to PICK1: Potential Relevance to Schizophrenia. (セリンラセマーゼはPICK1に結合し統合失調症に関連している可能性がある)		
<p>目的</p> <p>近年 D-セリンが NMDA 受容体の内在性アゴニストであり、統合失調症 (SZ) の病態生理への関与が示唆されるようになってきた。D-セリンを抗精神病薬と共に SZ 患者に投与すると症状が改善するという報告や、SZ 患者の血清 D-セリン濃度が低値であるという報告がある。最近 D-セリンの分解酵素 : D-amino acid oxidase が SZ の候補遺伝子のひとつである G72 と結合し、その機能を調節している可能性が報告された。そこで今回 D-セリンの合成酵素 : serine racemase (SR) を介しての SZ の病態への関与の可能性を考えた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. SR タンパクの調節機能を調べる目的で、SR タンパクと相互作用するタンパクを探索する。 2. 1.により SR の結合タンパクのひとつとして、Protein interacting with C- kinase (PICK1) が同定されたため、両タンパクの結合を、培養細胞に強制発現させた SR タンパクやグリア細胞の内因性 SR タンパクを用いて確認する。 3. <i>pick1</i> 遺伝子は、SZ と関連が指摘される 22q11-13 上に存在するため、<i>pick1</i> 遺伝子多型を SZ 患者で調べる。 <p>方法</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. SR 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-ハイブリット法を用いた。SR 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、相互作用する可能性のある酵母を選び、その遺伝子情報を検出した。 2. ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞に SR タンパクを強制発現させ、精製した GST フュージョン PICK1 タンパクと混合することで、インビトロバインディングアッセイを行った。また初代培養したマウスのグリア細胞を用いて免疫沈降法を行った。SR 及び PICK1 タンパクを強制発現した HEK293 細胞及び初代培養したグリア細胞を用いて、蛍光抗体を用いて蛍光顕微鏡下で観察した。 3. <i>pick1</i> 遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) と日本人 SZ との関連を検討するため健常被験者 200 名と SZ 患者 200 名を対象とした。まず各 5 サンプルずつ選び、<i>pick1</i> 遺伝子のすべての exon と exon 隣接部の intron 配列を増幅する目的で作成したプライマーを用いて PCR 法で増幅後、ダイレクトシーケンシングを行った。 			

(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。

(続 紙)

た。この結果と過去の報告から 3SNP を選び、残りのサンプルで Taqman 法により SNP 解析し相関研究を行った。

結果

1. イースト 2-ハイブリット法により SR と相互作用する可能性のあるタンパクが複数見出された。そのうち *pick1* 遺伝子は SZ 関連部位として指摘されている染色体 22q11-13 に存在するため、このタンパクに注目した。イースト 2-ハイブリット法にて、その結合には SR の C 末端、PICK1 の PDZ ドメインと coiled-coil ドメインが必要であることを見出した。
2. インビトロバインディングアッセイと免疫沈降法によって、SR と PICK1 の結合を検証した。培養細胞にタンパクを強制発現させ、免疫染色法でタンパクの局在を確認すると、SR または PICK1 を単独で強制発現させた場合には、細胞内に一様にタンパクが存在していたが、両タンパクを同時に強制発現させた場合には顆粒状に局在するようになったため、両タンパクが結合し何らかの機能を発現していることが示唆された。初代培養したグリア細胞でも両タンパクの存在部位は重なっていた。
3. *pick1* 遺伝子の SNP 解析において、過去に報告されている intron3 にある SNP(rs3952) を含めた 3SNP のうち、intron4 に存在する SNP(rs2076369) と SZ との弱い相関を認めた。さらに SZ を解体型とそれ以外で分けた解析では、rs3952 と rs2076369 が解体型と有意に相関した。さらに全 3 個の多型を対象としたハプロタイプ解析で、SZ で有意な相関を認めるハプロタイプを認め、それは解体型 SZ でも有意な相関を認めた。

考察

D-セリンの合成酵素である SR は、SZ との関連が指摘される染色体 22q11-13 上に位置する PICK1 と結合し機能が調節されている可能性がある。また、SZ を対象とした *pick1* 遺伝子の相関解析は、解体型 SZ の病態に PICK1 が関係する可能性を示していると考えた。最近、脳ではニューロンのみならずグリアによる神経伝達物質の調節が重要であると考えられているが、今回はグリアに存在する SR 及び PICK1 と SZ の関連を示唆したことで、グリアによる神経伝達物質の調節が SZ の病態生理に関連している可能性を示した。

結論

グリアに存在する D-セリンの合成酵素である SR は PICK1 と結合し、それらは SZ、特に解体型 SZ に関連している可能性がある。そしてニューロンのみならずグリアによる神経伝達物質の調節が、ある一群の SZ の病態生理に関連している可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	040	氏名	藤井久彌子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、統合失調症の病態を分子生物学的に解明するために、本症との関連がいわれている NMDA 受容体の内在性アゴニスト (D-セリン) の合成酵素 (セリンラセマーゼ) に注目し、その酵素と相互作用するタンパク質について検討したものである。</p> <p>その結果、次のことを明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 統合失調症との関連が指摘されている染色体22q11-13に遺伝子が存在する、タンパク質 PICK1 がセリンラセマーゼに結合する。2) 統合失調症を対象とした <i>pick1</i> 遺伝子の多型解析から、解体型統合失調症の病態に PICK1 が関係している可能性がある。3) セリンラセマーゼと PICK1 の両タンパク質はともにグリア細胞に存在するので、ある一群の統合失調症の病態には、グリアによる神経伝達の調節異常が関連していることが示唆される。 <p>このように本論文は、グリアが統合失調症の病態生理に関与する可能性を示したものであり、博士 (医学) の学位論文に値する。</p>			
(平成18年2月6日)			