



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1664号
学位記番号	第338号
氏名	水上 智晴
授与年月日	平成30年3月31日
学位論文の題名	精神神経疾患の発症・増悪化に関与するタンパク質の機能解明
論文審査担当者	主査： 星野 真一 副査： 服部 光治， 桑 和彦， 田中 正彦

氏 名	みずかみ ともはる 水上 智晴
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 338 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 31 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	精神神経疾患の発症・増悪化に関与するタンパク質の機能解明
論文審査委員	（主査）教授 星野 真一 （副査）教授 服部 光治・教授 糸 和彦・准教授 田中 正彦

論文内容の要旨

統合失調症や自閉症は発症頻度の高い精神疾患であり、社会生活に支障をきたすことが多い。統合失調症や自閉症の発症には遺伝的要因が大きく関与すると考えられている。これまで、神経細胞の移動、樹状突起とシナプスの形成が精神疾患の発症や増悪化に関わるとの報告もある。しかし、精神疾患の詳細な発症メカニズムは未だ不明であり、効果的な治療法も限られる。近年、これらの患者のゲノムワイド相関解析により原因遺伝子やリスク遺伝子の新規候補が多数報告された。これらの遺伝子の中には機能未知のものや、精神疾患へ寄与するメカニズムが不明のものも多い。

第一部では、これまで変異が報告された遺伝子の中で、CUB and Sushi multiple domains 3 (CSMD3) に着目した。この遺伝子にコードされるタンパク質は、タンパク質間相互作用に関わる CUB ドメインと Sushi ドメインを多数持つ膜貫通タンパク質である。これらのドメインを持つタンパク質の中には、神経細胞の樹状突起の成長やシナプス形成を制御するものも存在する。これらの知見から、CSMD3 は受容体または接着因子として機能し、神経細胞において何らかの機能を果たすことが推測される。しかし、CSMD3 の機能は未解明であった。そこで、CSMD3 の神経細胞における機能解明を目指した。

神経細胞の移動や、樹状突起とシナプス可塑性に関わる分子の 1 つとして分泌タンパク質リーリンが知られている。リーリンは超低密度リポタンパク質受容体 (VLDLR)、およびアポリポタンパク質 E 受容体 2 (ApoER2) と結合し、その機能を発揮する。リーリンの機能低下は精神神経疾患の発症や増悪化の一因であると考えられている。それにも関わらず、リーリンの精神神経疾患に寄与する分子メカニズムは未だ不明である。多数の疫学的研究から、精神神経疾患にはドコサヘキサエン酸 (DHA) の減少など脂質組成異常も関与することが示唆されている。リーリン受容体である VLDLR および ApoER2 はリポタンパク質受容体に属することから、リーリンの精神神経疾患に寄与する分子メカニズムの一端には、脂質組成の制御も関与している可能性があると考えた。しかし、リーリンが実際に神経細胞の脂質組成の制御に関与するかどうかは不明であった。そこで、第二部ではリーリンが神経細胞の脂質組成の制御に関与するかどうかを解明すること、および、リーリンが脂質組成の制御に関与する場合はそのメカニズムを解明することを目指した。

第一部：CSMD3 の神経細胞における機能解明

CSMD3 はその一次構造から膜貫通タンパク質であると予測されていたが、実験的には確認されていなかった。そこで、まず CSMD3 のトポロジーを明らかにすることを目指した。CSMD3 の N 末端領域を認識する抗体を作製した。CSMD3 の C 末

端に myc タグを付加した CSMD3 発現プラスミド (CSMD3-Myc) を COS7 細胞に導入し、作製した抗 CSMD3 抗体と抗 myc 抗体を用いて膜透過処理有／無の条件下で免疫染色を行った。その結果、CSMD3 は N 末端側を細胞外に、C 末端側を細胞内に持つ膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。また、CUB ドメインと Sushi ドメインはタンパク質間相互作用に関わる。そこで、CSMD3 がホモオリゴマーを形成するかを検討した。CSMD3-Myc を黄色蛍光タンパク質 Venus、または CSMD3 の C 末端に Venus を付加した CSMD3WT-Venus と COS7 細胞に共発現し、抗 GFP 抗体で免疫沈降した。CSMD3-Myc は CSMD3WT-Venus とのみ共沈降したことから、CSMD3 はホモオリゴマーを形成することが示唆された。

これまで、mRNA レベルで CSMD3 が脳に発現することは報告されていたが、CSMD3 のタンパク質レベルでの局在は不明であった。そこで、大脳における CSMD3 のタンパク質レベルでの局在を明らかにするため、作製した抗 CSMD3 抗体を用いてマウス大脳の免疫染色を行った。その結果、生後のマウス大脳皮質と海馬錐体細胞層に CSMD3 が発現することが明らかとなった。更に、生後 14 日と 28 日の海馬では錐体細胞層から伸びる apical dendrites にも CSMD3 が発現することを見いだした。

CSMD3 が樹状突起の発達やシナプス形成に関与するか否かを検討するため、培養海馬神経細胞を用いて CSMD3 の発現を検討した。培養 1, 3, 5, 7, 10, 14 日目 (DIV) の培養海馬神経細胞から total RNA を抽出し、逆転写 PCR 法により CSMD3 mRNA を検出した。その結果、CSMD3 の mRNA は 7 DIV 以降に検出された。続けて、神経細胞における CSMD3 の機能解明を試みた。CSMD3 の細胞外領域と細胞内領域のほとんど全てを欠損し、C 末端に Venus を付加した CSMD3 Δ NC-Venus および CSMD3WT-Venus を 7 DIV の培養海馬神経細胞に導入し、その細胞形態を免疫染色により観察した。その結果、CSMD3 Δ NC-Venus 発現細胞と比較して、CSMD3WT-Venus 発現細胞では樹状突起の分岐数が著しく増加した。CSMD3 による樹状突起の分岐数増加に細胞内領域が必要か否かを検討するため、細胞内領域を欠損した CSMD3 Δ C-Venus を用いて同様の実験を行った。その結果、CSMD3 Δ C-Venus 発現細胞も CSMD3WT-Venus 発現細胞同様に樹状突起の分岐数が著しく増加した。以上の結果から、CSMD3 は樹状突起の分岐形成を促進し、その機能には CSMD3 の細胞外領域が必要であることが明らかとなった。

第二部：脳の層構造形成と機能に重要な分泌タンパク質リーリンの脂質組成制御機構の解明

リーリンが脳内の脂質組成を制御するか否かを検討するため、胎生 17.5 日目 (E17.5) の野生型およびリーリン欠損マウス (リーラーマウス) 大脳皮質から総脂質を抽出し、LC-MS/MS 法によるノンターゲット脂質解析を行った。その結果、リーラーマウス大脳皮質では多くのリン脂質種で sn-2 位に結合する必須不飽和脂肪酸 (EPUFA) のアラキドン酸 (ARA) と DHA の含有割合が低下していた。また、リン脂質の sn-2 位に結合する C20:3 の含有割合が増加した。リーラーマウス大脳皮質から抽出した総脂質を加メチル化分解し、GC/MS 法によっても解析した結果、ミード酸の含有量増加が見られた。以上の結果から、LC-MS/MS 法で含有割合の増加が見られた C20:3 はミード酸であり、リーリンは脳内の EPUFA 量を適切に保つために必要である可能性が示唆された。

リーリンが脂質含有量を適切に保つメカニズムとして次の 2 つの仮説、(1) リーリンによる下流シグナルが脂質代謝酵素の発現や活性を制御する、(2) リーリンがアポリポタンパク質様の性質を持ち、脂質を運搬する、をたてた。

仮説 (1) が脂質組成の制御に寄与するか否かを、いくつかの脂質代謝酵素の遺伝子発現に着目し、定量的 PCR 法により調べた。その結果、ミード酸合成酵素に関与する stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) の発現が上昇することを見いだした。

仮説 (2) を検討するため、E17.5 野生型マウス大脳を破碎後、スクロース密度勾配超遠心法によりタンパク質を分画し、どの画分にリーリンが存在するかをウェスタンブロッティング (WB) 法により解析した。その結果、全長リーリンの大部分は高密度フラクションに存在したが、一部はアポリポタンパク質 E (ApoE) や脂質ラフト構成タンパク質の Flotillin-1 を含む低密度画分で検出された。この低密度画分に存在するリーリンが何らかの複合体を形成しているか否かを解明するため、抗リーリン抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、低密度画分に存在するリーリンは直径約 10 nm の構造物と共局在することを見いだした。体循環系に存在する高密度リポタンパク質 (HDL) の直径も約 10 nm であることから、低密度画分に存在するリーリンは HDL 様粒子を形成することが示唆された。

脳のリーリンが脂質と複合体を形成している可能性を見いだしたことから、リコンビナントリーリンも脂質と複合体を形成できるか否かを検討した。リコンビナントリーリン単独、またはウシ胎児血清 (FBS) と混合したリコンビナントリ

リーリンをスクロース密度勾配超遠心法により分画し、WB 法により解析した。その結果、リコンビナントリーリン単独では、そのほとんど全てが高密度画分に存在した。その一方、FBS を混合したリコンビナントリーリンでは、その一部が低密度画分に移行することを見いだした。以上の結果から、リコンビナントリーリンも脂質と複合体を形成することが示唆された。

本研究をまとめると、第一部では機能未知の CSMD3 の神経細胞における機能を *in vitro* で解明し、第二部では分泌タンパク質リーリンの新規機能の可能性を見いだした。これらの知見は精神神経疾患の発症や増悪化の分子メカニズムの一端を解明することに貢献すると考えられる。今後、CSMD3 の *in vivo* における重要性や、リーリンの精神神経疾患へ寄与する分子メカニズムと脂質組成の制御の関係を明らかにすることで、精神神経疾患の理解が更に深まることが期待される。

論文審査の結果の要旨

CSMD3 とリーリンという、脳形成に重要な機能を担う分子についての研究である。CSMD3 については、突起形成に関与することを初めて示した。リーリンについては、その下流に脂質代謝経路が存在することを初めて示した。これらの知見は、脳の構造形成および機能発現の分子機構を理解する上で重要であり、価値ある業績であると認める。また、博士学位論文の精査、論文発表会における口頭発表ならびに論文内容・関連事項についての質疑応答の結果、最終試験に合格した。よって本研究者は博士（薬学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。