



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

名古屋市立大学学位論文

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

平成 29 年度 (2018 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

病態生化学分野

水上 智晴

一. 本論文は 2018 年 3 月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 星野 真一 教授
副査 服部 光治 教授
副査 糸 和彦 教授
副査 田中 正彦 准教授

二. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, and Mitsuharu Hattori
CUB and Sushi multiple domains 3 regulates dendrite development
Neurosci. Res. **110**, 11-17. (2016)

2. Tomoharu Mizukami, Kazutaka Ikeda, Yuta Shimanaka, Katsunari Korogi, Chunyu Zhou,
Hiroshi Takase, Hitomi Tsuiji, Nozomu Kono, Takao Kohno, Hiroyuki Arai, Makoto Arita,
and Mitsuharu Hattori
Reelin deficiency leads to aberrant lipid composition in mouse brain
Biochem. Biophys. Res. Commun., 505, 81-86. (2018)

三. 本論文の基礎となる研究は、服部光治教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

本論文では、以下の略語を用いた。

AP: alkaline phosphatase

ApoE: apolipoprotein E

ApoER2: apolipoprotein E receptor 2

ARA: arachidonic acid

BSA: bovine serum albumin

CA: cornu ammonis

CSDM3: CUB and Sushi multiple domains 3

DHA: docosahexaenoic acid

DIV: days in vitro

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

Elovl5: Elongation of very long chain fatty acids protein 5

Fads1: Fatty acid desaturase 1

Fads2: Fatty acid desaturase 2

FBS: fetal bovine serum

FDR: false discovery rate

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFP: green fluorescent protein

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HDL: high-density lipoprotein

HEK: human embryonic kidney

HRP: horseradish peroxidase

IMS: imaging mass spectrometry

NB: neurobasal medium

P/S: penicillin/streptomycin

PBS: phosphate buffered saline

PBS-T: phosphate buffered saline with 0.05% Tween 20

PC: phosphatidylcholine

PE: phosphatidylethanolamine

PI: phosphatidylinositol

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PS: phosphatidylserine

PVDF: polyvinylidene difluoride

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SCD-1: stearoyl-CoA desaturase 1

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM: standard error of the mean

TBS-T: tris buffered saline with 0.05% Tween 20

VLDLR: very low density lipoprotein receptor

WB: western blotting

目次

第一章 要旨	1
第二章 序論	5
第三章 実験材料と実験方法	9
3-1. 試薬および抗体	10
3-2. 実験動物	10
3-3. 細胞培養	10
3-4. 発現プラスミド	11
3-5. 抗 CSMD3 ポリクローナル抗体作製	15
3-6. 遺伝子導入	16
3-7. ウェスタンブロッティング法	16
3-8. 免疫染色法	17
3-9. 免疫沈降法	19
3-10. 逆転写 PCR 法	19
3-11. 脂質解析	21
3-12. スクロース密度勾配超遠心法	22
3-13. 免疫電子顕微鏡観察	23
3-14. 統計解析	23
第四章 精神疾患関連タンパク質 CSMD3 の神経細胞における機能の解明	25
4-1. 結果	
4-1-1. CSMD3 は N 末端側を細胞外に、C 末端側を細胞内に持つホモオリゴマーの膜貫通タ	

ンパク質である	26
4-1-2. CSMD3 遺伝子は生後マウスの大脳皮質、海馬錐体細胞の apical dendrites、および培養海馬神経細胞の培養後期に発現する	29
4-1-3. CSMD3 は樹状突起の分岐形成を促進する	31
4-2. 考察	34
第五章 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	37
5-1. 結果	
5-1-1. リーラーマウス大脳皮質では、飽和脂肪酸を持つ各リン脂質クラスに含まれる DHA と ARA の含有割合が低下する	38
5-1-2. リーラーマウス大脳皮質ではミード酸の含有量が増加する	44
5-1-3. リーラーマウス大脳皮質では、ミード酸合成酵素の SCD-1 の遺伝子発現が上昇する	53
5-1-4. 脳のリーリンの一部は低密度であり、直径 10 nm 程度の複合体を形成する	56
5-1-5. リコンビナントリーリンも脂質と複合体を形成できる	59
5-2. 考察	61
第六章 総括	65
引用文献	68
謝辞	76

第一章

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否かは不明であった。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否かを解明すること、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 Flotilin-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。

第二章

序論

統合失調症や自閉症は発症頻度 1%程度の精神疾患である。これら精神疾患患者は被害妄想や常同行動などにより、他者とコミュニケーションを図ることが難しく、社会生活に支障をきたすことが多い。現在、いくつかの対症療法が行われているが、根本治療は存在しない。これら精神疾患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。これまでに、神経細胞の移動、樹状突起とシナプスの形成と成熟が精神疾患の発症や増悪化に関わるとの報告もある (Akbarian et al., 1996; Penzes et al., 2011; Kulkarni and Firestein, 2012; Reiner et al., 2016)。しかしながら、精神疾患の詳細な発症メカニズムは不明である。これまで、一塩基多型 (SNPs) やコピー数変異 (CNVs) を調べるゲノムワイド相関解析などにより、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。しかし、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。これら遺伝子の機能と、それに関わる分子メカニズムを解明することは、精神疾患の発症メカニズムの理解や新たな治療法樹立に役立つことが予想される。精神疾患の一端を理解するため、第一部では、私は機能未知の分子である CSMD3 に着目した。また、神経細胞の移動や、樹状突起とシナプス可塑性の制御に関わる分子として、リーリンが知られている。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ため、第二部ではリーリンに着目した。

CUB and Sushi multiple domains 3 (CSMD3) は家族性ミオクローヌステんかんの原因遺伝子の候補として同定された (Shimizu et al., 2003)。続けて、自閉症と統合失調症患者の一部で CSMD3 遺伝子の CNVs が報告された (Magri et al., 2010; Malhotra et al., 2011; Curran et al., 2013)。更に、自閉症患者の一部から CSMD3 遺伝子付近で平衡転座が見つかった (Florin et al., 2008)。これらの報告から、CSMD3 は精神疾患の原因、またはリスク遺伝子の候補であることが示唆される。

CSMD3 のマウスホモログは 3,707 アミノ酸残基から構成される巨大な膜貫通タンパク質であると予測される (Lau and Scholnick, 2003; Shimizu et al., 2003)。CSMD3 mRNA は脳に発現することが報告されているが (Oeschger et al., 2012)、タンパク質レベルでの発現や局在は報告されていない。また、CSMD3 は CUB ドメインと Sushi ドメインを多数持つタンパク質である (Fig. 1)。CUB ドメインや Sushi ドメインを持つタンパク質の多くは、分泌タンパク質と膜タンパク質の間でタンパク質間相互作用を調節することが知られている (Gaboriaud et al., 2011; Nakayama and Hama, 2011)。これらのタンパク質の中には、神経細胞の移動や樹状突起の成長、シナプス形成を制御するものも存在する (Gunnarsen et al., 2007; Chen et al., 2008; Sia et al., 2013)。これらの報告から、CSMD3 は受容体または接着因子として機能し、神経細胞の成熟化において何らかの役割を果たすことが推測される。しかし、これまで

CSMD3 の機能は全くの不明であった。そこで、本研究では CSMD3 の神経細胞における機能解明を目指した。

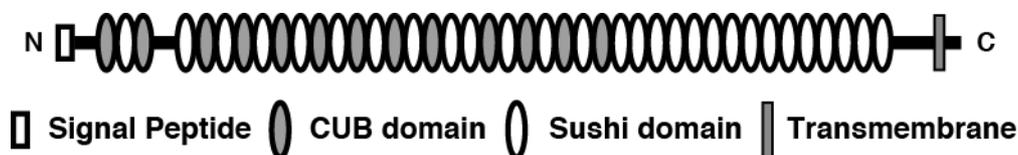


Fig. 1 CSMD3 の構造

CSMD3 は 3,707 アミノ酸残基からなり、N 末端側からシグナルペプチド、14 個の CUB ドメインと 27 個の sushi ドメインの繰り返し配列、膜貫通領域から構成される膜貫通タンパク質であると考えられている。

リーリンは脳皮質神経細胞の配置異常、運動失調を呈する自然発症マウス、リーラーマウスの原因遺伝子として同定された分泌タンパク質である (D'Arcangelo et al., 1995)。リーリン分子は 3,461 アミノ酸残基からなり、N 末端領域、8 回の繰り返し構造のリーリンリピート、および C 末端領域から構成される (Fig. 2)。リーリンは 5 番目、および 6 番目のリーリンリピートを介して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) と結合することで細胞内アダプタータンパク質 Dab1 のリン酸化を誘導し (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Trommsdorff et al., 1999)、細胞内下流シグナルを制御する (Howell et al., 1999; Bock et al., 2003)。このリーリンシグナルが胎生期では脳の層構造形成を司り、生後では樹状突起やシナプス可塑性の制御などを行う (D'Arcangelo et al., 1999; Niu et al., 2004; Beffert et al., 2005; Groc et al., 2007; Nie et al., 2008)。これまでに、統合失調症、自閉症、うつ病、双極性障害、アルツハイマー病患者らの死後脳や血中ではリーリンタンパク質の発現量減少や切断増加が報告されている (Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000; Fatemi et al., 2001; Fatemi et al., 2002; Saez-Valero et al., 2003; Botella-Lopez et al., 2006; Eastwood and Harrison, 2006; Chin et al., 2007)。

他にも、統合失調症、うつ病、アルツハイマー病などの精神神経疾患患者の死後脳解析は数多く行われており、その一端として、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の含有量減少など脂質組成異常が報告されている (McNamara et al., 2007a; McNamara et al., 2007b; McNamara et al., 2008; Cunnane et al., 2009; Hamazaki et al., 2013; Cunnane et al., 2014; Joffre et al., 2014; Müller et al., 2015)。DHA は脳に豊富に存在し (Weiser et al., 2016)、神経細胞の形態や機能に重要であると考えられている (Cao et al., 2009; Kim et al., 2011; Mita et al., 2016)。これらの知見を統合すると、脳の脂質組成異常も精神神経疾患に関与することが示唆される。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ファミリーに属することから (Holtzman et al., 2012)、リーリンの精神神経疾患へ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。しかし、リーリンが実際に神経細胞の脂質組成の制御に影響するか否かは不明であった。そこで、本研究の第二部として、リーリンが神経細胞の脂質組成の制御に関与するか否かを解明すること、そして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。

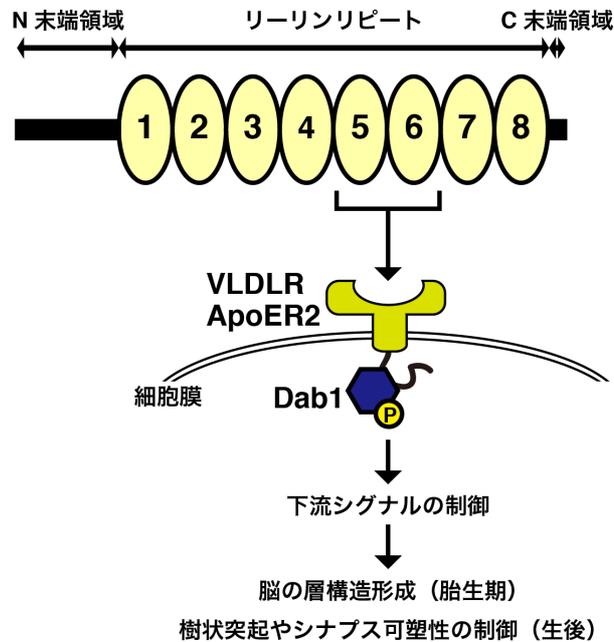


Fig. 2 リーリンの構造とその受容体、および下流シグナル

リーリンは、3,461 アミノ酸残基からなり、N 末端領域、8 回の繰り返し構造からなるリーリンリピート、およびC 末端領域からなる。5 番目と 6 番目のリーリンリピートがその受容体である VLDLR および ApoER2 と結合し、Dab1 のリン酸化を誘導することで下流シグナルを制御する。

第三章

実験材料と実験方法

3-1. 試薬および抗体

試薬は、特に記載のない限り、和光純薬工業から購入し、Milli-Q (Merck) に溶解した。抗 Myc 抗体 (Merck)、抗 GFP 抗体 (MBL)、抗 α -Tubulin 抗体 (Merck)、抗リーリン抗体の G10 (Merck) と AF3820 (R&D Systems)、抗 ApoE 抗体 (Merck)、抗 Flotilin-1 抗体 (BD Bioscience)、抗 Caveolin-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnologies)、HRP 標識二次抗体 (GE Healthcare)、蛍光標識二次抗体 (Thermo Fisher Scientific)、金コロイド (5 nm) 標識二次抗体 (BBI Solutions) を使用した。

3-2. 実験動物

Slc:ICR マウスは日本エスエルシーから購入した。リーリン欠損マウス (B6C3F3-a/a-rl, リーラーマウス) は Jackson Laboratories から購入した。リーリン欠損マウスは Slc:ICR マウスと交配することで backcross を行った。

3-3. 細胞培養

3-3-1. 使用した buffer

Hanks' balanced salt solution (HBSS): 12.6 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.41 mM MgSO₄, 5.37 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.137 mM NaCl, 0.75 mM Na₂HPO₄, 4.17 mM NaHCO₃, 5.55 mM D-Glucose

3-3-2. HEK293T、および COS7 細胞

ヒト小児腎癌由来細胞 HEK293T 細胞、およびアフリカミドリザル腎臓由来細胞 COS7 細胞は、独立行政法人理化学研究所、脳科学総合研究センターの御子柴克彦チームリーダーより御供与頂いた。HEK293T、および COS7 細胞は 10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS, Corning)、50 μ g /mL Penicillin、および 50 U/mL Streptomycin (P/S, Nacalai tesque) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。

3-3-3. マウス培養海馬神経細胞

マウス解剖の前日から 12 well plate (Corning) に 15 mm 丸型ガラス (松浪) を入れ、0.005% Poly-L-Lysine (Merck) で一晩コートした。翌日、滅菌水を用いて well を 4 回洗浄し、乾燥させた。イソフルランで麻酔した妊娠 17 日目 (E17.5) の Slc:ICR 妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、胎児全てを取り出した。胎児を断頭後、DMEM で 4 回洗浄し、クリーンベンチ内で実体顕微鏡下、海馬を摘出した。摘出した海馬は Neurobasal medium (NB, Thermo Fisher Scientific) 15 mL の入った 15 mL tube 中で氷上保存した。全ての胎児から海馬を摘出

後、アスピレーターでNBを除き、ペレットに0.25% Trypsin (Thermo Fisher Scientific) を加え、37 °C、5分間インキュベートした。その後、20% (v/v) FBS 含有NBを10 mL加え、反応を停止した。静置により海馬を沈殿させ、ピペットにより上清を除いた。ペレットに0.1% DNase/HBSS with 12 mM MgSO₄を1 mL加え、5分間、室温でインキュベートした。その後、NBを12 mL加え、静置により海馬を沈殿させ、アスピレーターで上清を除いた。2% (v/v) B27 (Thermo Fisher Scientific)、1% (v/v) P/S、2 mM GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) を含有するNB (NB+) を2 mL加え、先端を丸めたパスツールピペットを用いたピペッティングにより細胞を完全に分散した。その後、NBを12 mL加え、1,000 rpmで3分間遠心した。遠心後、アスピレーターで上清を除き、NB 14 mLを加え、上記と同様の条件で遠心した。遠心後、アスピレーターで上清を除き、ペレットをNB+ 2 mLに懸濁した。生細胞数をTrypan blue stain (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測し、Poly-L-Lysine コートした15 mm 丸ガラス入り well に1.0x10⁴ cells/glass となるように播種した。培養は37 °C、5% CO₂ 存在下で行った。また、72時間ごとに培地の半量を新鮮な培地と交換した。

3-4. 発現プラスミド

以下で作製したプラスミドの塩基配列は全てApplied Biosystems™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により確認した。また、使用した制限酵素はTakara Bio、TOYOBO、およびNew England Biolabsから購入した。

3-4-1. CSMD3 全長発現プラスミド

マウス CSMD3 部分 cDNA (CSMD3 全長のアミノ酸残基 842 から 3,707 番、ただし選択的スプライシングにより 1,799 から 1,868 番目が欠落している、をコードしている) を Kazusa DNA Research Institute より購入した。残りの部分断片は、成体マウス海馬から得た cDNA を鋳型とした PCR 産物 (A, B, および C) として得た。XbaI、AgeI、NheI、HindIII の認識配列を持つリンカーを挿入した pcDNA 3.1/Zeo (+) (改変 pcDNA 3.1, Thermo Fisher Scientific) に購入したマウス CSMD3 部分断片プラスミドの AflIII-XbaI 部位を挿入した。更に、PCR 産物 A、B、および C を AgeI、NheI、HindIII、および AflIII を用いて順次挿入した。作製したプラスミドを CSMD3 全長発現プラスミド (CSMD3 全長のアミノ酸残基 1 から 1,798 番目まで、および 1,869 から 3,707 番目までを持つ) とした。

・ A を作製するためのプライマー

CSMD3-Age86-01 (下線部は AgeI 認識部位を示す)

5' - CGCGACCGGTATGAAAGGGAGCCGCAAAGG - 3'

CSMD3-Nhe1196-02 (下線部は NheI 認識部位を示す)

5' - CAGGTGTGCTAGCAACATCATTAGCACCAG - 3'

・ B を作製するためのプライマー

CSMD3-NheI196-03 (下線部は NheI 認識部位を示す)

5' - GATGTTGCTAGCACACCTGCAGATGTTAC - 3'

CSMD3-Hind1955-14 (下線部は HindIII 認識部位を示す)

5' - GGCACAAAGCTTCCAGTTAGCACCTGAAGC - 3'

・ C を作製するためのプライマー

CSMD3-Hind1955-25 (下線部は HindIII 認識部位を示す)

5' - CTGGAAGCTTTGTGCCAGACCTGATAGTG - 3'

CSMD3-Afl3965-26 (下線部は AflII 認識部位を示す)

5' - AAATCTTAAGAACATCCCCTTGAGCTAAATG - 3'

・ 改変 pcDNA 3.1 を作製するためのリンカー

Xba-Age-Nhe-Hind-91

5' - CTAGAGACCGGTTCAATGCTAGCATATGAA - 3'

Xba-Age-Nhe-Hind-92

5' - AGCTTTCATATGCTAGCATTGAACCGGTCT - 3'

3-4-2. CSMD3-Myc 発現プラスミド

終止コドンを除くため、CSMD3 全長発現プラスミドを鋳型として PCR 産物 D を作製し、HindIII/XbaI を用いて改変 pcDNA 3.1 に挿入した (Δ stop-CSMD3 部分プラスミド)。 Δ stop-CSMD3 部分プラスミドの XbaI 認識部位に Myc タグと終止コドンにコードする塩基配列をリンカーにより挿入した。次に CSMD3 全長発現プラスミドの AgeI-HindIII 部位と HindIII-HindIII 部位を順に挿入した。このプラスミドの AgeI-PmeI 部位を、AgeI、BspEI、EcoRV、EcoRI 認識部位を持つリンカーを挿入した pCAGGS ベクター (改変 pCAGGS) の AgeI-EcoRV 部位に挿入した。作製したプラスミドを CSMD3-Myc 発現プラスミド (CSMD3 全長のアミノ酸残基 1 から 1,798 番目まで、および 1,869 から 3,707 番目までを持つ) とした。なお、pCAGGS ベクターは慶應義塾大学医学部、仲嶋一範教授より御供与頂いた。

・ D を作製するためのプライマー

CSMD3-Hind10000-55 (下線部は HindIII 認識部位を示す)

5' - GGCAAAGCTTTATATATCAGTCTGAGG - 3'

CSMD3-Xba-nonST11206-58 (下線部は XbaI 認識部位を示す)

5' - GTTGCCCTCTAGATACCATTGTG - 3'

・ Myc タグと終止コドンにコードするリンカー

Nhe-Myc-Xba-01 (赤文字は終止コドンを示す)

5' - CTAGCGAGCAGAAGTTGATCAGCGAGGAGGACTTGTGAT -3'

Nhe-Myc-Xba-02 (赤文字は終止コドンを示す)

5' - CTAGATCAACAAGTCCTCCTCGCTGATCAACTTCTGCTCG - 3'

・ 改変 pCAGGS を作製するためのリンカー

SalAgeBspEEcoRVEcoRI-11

5' - TCGACGGACCGGTAGTCCGGACCGATATCCG - 3'

SalAgeBspEEcoRVEcoRI-12

5' - AATTCGGATATCGGTCCGGACTACCGGTCCG - 3'

3-4-3. CSMD3 全長 Venus 発現プラスミド

Venus-pCS2 ベクターを鋳型とし、黄色蛍光タンパク質 Venus をコードする PCR 産物を作製した。この PCR 産物を NheI/XbaI を用いて Δ stop-CSMD3 部分プラスミドの XbaI 認識部位に挿入した。次に CSMD3 全長発現プラスミドの AgeI-HindIII 部位と HindIII-HindIII 部位を順に挿入した。このプラスミドの AgeI-PmeI 部位を改変 pCAGGS の AgeI-EcoRV 部位に挿入した。作製したプラスミドを CSMD3 全長 Venus 発現プラスミド (CSMD3 全長のアミノ酸残基 1 から 1,798 番目まで、および 1,869 から 3,707 番目までを持つ) とした。なお、Venus-pCS2 ベクターは独立行政法人理化学研究所、脳科学総合研究センターの御子柴克彦チームリーダーより御供与頂いた。

・ Venus を作製するためのプライマー

Venus-Nhe-05 (下線部は NheI 認識部位を示す)

5' - GGGCTAGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC - 3'

Venus-Xba-08 (下線部は XbaI 認識配列を、赤文字は終止コドンを示す)

5' - GGTCTAGATTACTTGTACAGGCTCGTC - 3'

3-4-4. CSMD3 Δ C-Venus 発現プラスミド

CSMD3 全長 Venus 発現プラスミドを鋳型として PCR 産物 E を作製し、HindIII/XbaI を用いて改変 pcDNA 3.1 に挿入し、続けて XbaI 認識部位に Venus をコードする PCR 産物を挿入した。次に、CSMD3 全長プラスミドの AgeI-HindIII 部位、HindIII-HindIII 部位を順に挿入した。このプラスミドの AgeI-PmeI 部位を改変 pCAGGS の AgeI-EcoRV 部位に挿入した。作製したプラスミドを CSMD3 Δ C 発現プラスミド (CSMD3 全長のアミノ酸残基 1 から 1,798 番目まで、および 1,869 から 3,651 番目までを持つ) とした。

・ E を作製するためのプライマー

CSMD3-Hind10000-55 (前述)

CSMD3-XbaI-TM10952-30 (下線部は XbaI 認識配列を示す)

5' - CCTTTGCTAGAAAGATAAAAACCCAAATCC - 3'

- ・ Venus を作製するためのプライマー

Venus-Nhe-05 (前述)

Venus-Xba-08 (前述)

3-4-5. CSMD3ΔNC-Venus 発現プラスミド

CSMD3ΔC-Venus 発現プラスミドを鋳型として PCR 産物 F を作製し、pAPtag5 (Flanagan et al., 2000) の BspEI-XbaI 部位に挿入した。このプラスミドの NheI-XbaI 部位を pCAGGS7.5 (当研究室の服部光治が作製したものを使用) に挿入した。作製したプラスミドを CSMD3ΔNC-Venus (CSMD3 全長のアミノ酸残基 3,470 から 3,651 番目までを持つ) とした。

- ・ F を作製するためのプライマー

CSMD3-BspEI-10406-43 (下線部は BspEI 認識配列を示す)

5' - GTGAATCCGGATCCAAAATATTAGTGAAAG - 3'

Venus-Xba-08 (前述)

3-4-6. CSMD3C2S2-His 発現プラスミド

CSMD3 全長発現プラスミドを鋳型として PCR 産物 G を作製し、BglII/EcoRI を用いて pRSET-B ベクター (Thermo Fisher Scientific) に挿入した。作製したプラスミドを CSMD3C2S2-His 発現プラスミド (CSMD3 全長のアミノ酸残基 241 から 545 番目までを持つ) とした。

- ・ G を作製するためのプライマー

CSMD3-721-BglII-77 (下線部は BglII 認識配列を示す)

5' - GAAAGATCTTGTGGGGGAACAATGAGAGG - 3'

CSMD3-1635-stopEcoRI-78 (下線部は EcoRI 認識配列を、赤文字は終止コドンを示す)

5' - GCCGAATTC**T**TACACTTTACATACAGGCC - 3'

3-4-7. PA-Reelin-PD/DK 発現プラスミド

大阪大学蛋白質研究所の高木淳一教授に御供与頂いた。

3-5. 抗 CSMD3 ポリクローナル抗体作製

3-5-1. 使用した buffer

200 mM Sodium Phosphate buffer pH 7.4: 77.4 mM NaH₂PO₄, 122.6 mM Na₂HPO₄

Binding buffer: 20 mM Sodium Phosphate pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 8 M Urea

Elution buffer: 20 mM Sodium Phosphate pH 7.4, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 8 M Urea

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄

3-5-2. 大腸菌を用いたタンパク質発現

CSMD3C2S2-His 発現プラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RP Competent Cells (Agilent Technologies) に形質導入した。得られたシングルコロニーを 0.1 µg/mL の Ampicillin 含有 LB 培地 3 mL に懸濁し、200 rpm、37 °C で一晩震盪培養した。翌日、培養液 2 mL を 0.1 µg/mL の Ampicillin 含有 LB 培地 200 mL に加え、150 rpm、37 °C で震盪培養した。OD₆₀₀ が 0.4~0.6 になったら、Isopropyl β-D-thiogalactoside (終濃度 0.5 mM) を加え、更に 2 時間震盪培養した。その後、培養液を 50 mL tube に回収し、4,000 rpm、4 °C、5 分間遠心し、上清を除くことで CSMD3C2S2-His 含有菌体を回収した。

3-5-3. タンパク質の精製

回収した菌体に 200 mM Sodium Phosphate pH 7.4 を 10 mL 加え、SONIFIER 250 (BRANSON) を用いて超音波処理を行った。その後、4,000 rpm、4 °C、10 分間遠心して得られたペレットに Binding buffer 10 mL を加え、再び超音波処理を行った。4,000 rpm、4 °C、10 分間遠心して得られた上清を 0.22 µm 滅菌フィルター (Merck) で濾過した。室温にて Binding buffer 10 mL を添加し平衡化した HisTrap FF 1 mL (GE Healthcare) にシリンジを用いて濾過済みの上清を添加した。その後、Binding buffer 10 mL で洗浄し、Elution buffer 10 mL で溶出した。溶出して得た CSMD3C2S2-His を Spectra/Por® (Spectrum Laboratories) に移し、冷やした PBS 中で一晩透析した。PBS を交換することで透析を計 4 回行った。

3-5-4. CSMD3C2S2-His の免疫

オペロンバイオテクノロジー株式会社に委託し、日本白色ウサギ 1 羽に CSMD3C2S2-His を抗原として免疫した。11 週間 (計 6 回) 免疫し、全採血することで抗 CSMD3 血清を得た。

3-6. 遺伝子導入

3-6-1. 使用した buffer

2xBES buffer pH 7.05: 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM BES (DOJINDO LABORATORIES)

HEPES buffer pH 7.35: 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucose, 20 mM HEPES (Nacalai tesque)

3-6-2. リポフェクション法

50% コンフルエントの COS7 細胞、または 80~100%コンフルエントの HEK293 T 細胞に DNA 1.25 µg/well (12 well plate の場合)、2.5 µg/well (6 well plate の場合)、または 15 µg/dish (10 cm dish の場合) と DNA 1 µg あたり 2 µL の Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) または Polyethyleneimine "Max" (Polysciences) を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、室温で 20 分間インキュベートした。次に、Opti-MEM に培地交換した COS7、または HEK293T 細胞に添加した。添加から 5 時間後、1% (v/v) P/S を含む DMEM に培地交換し、37 °C、5% CO₂ 存在下で 24 または 72 時間培養した。培養上清はクリーンベンチ内で無菌チューブに回収し、1,500 rpm、5 分遠心後、上清を別の無菌チューブに回収した。

3-6-3. リン酸カルシウム法

培養 7 日 (7 DIV) のマウス培養海馬神経細胞の培地を全量回収し、あらかじめ 37 °C、5% CO₂ 存在下で 1 時間以上平衡化した NB+ を 500 µL 加えた。培地交換 1 時間後、5 µg の DNA を 30 µL の 250 mM CaCl₂ に混合した。更に 30 µL の 2xBES buffer pH 7.05 を加え、よく混合し、速やかに神経細胞へ滴下した。37 °C、5% CO₂ 存在下で 45 分間インキュベートした後、あらかじめ 37 °C、10% CO₂ 存在下で 1 時間以上平衡化した HEPES buffer pH 7.35 を用いて 2 回洗浄した。洗浄後、全量回収した培地と新鮮な NB+ を 3:1 の割合で混合した培地 (37 °C、5% CO₂ 存在下で 1 時間以上平衡化) を 1 mL 加え、更に 3 日間、37 °C、5% CO₂ 存在下で培養した。

3-7. ウェスタンブロッティング (WB) 法

3-7-1. 使用した buffer

4xSDS-PAGE sample beffer: 250 mM Tris-HCl pH 6.8 (Nacalai tesque), 40% (v/v) Glycerol, 0.2% (w/v) Bromo phenol blue, 8% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% (v/v) 2-mercaptoethanol (2-ME)

SDS-PAGE electrode buffer: 2.5 mM Tris, 19.2 mM Glycine, 0.01% (w/v) SDS

Transfer buffer: 47.9 mM Tris, 39.3 mM Glycine, 20% Methanol, 0.001% (w/v) SDS

TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween® 20

3-7-2. 実験方法

解析するサンプルと 4xSDS-PAGE sample buffer を 3:1 で混合し、5 分間加熱処理した。1 レーンあたり 10~20 μ L のサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、セミドライ式転写機 (Trans-blot SD cell, Bio-Rad) を用いて PVDF 膜 (Merck) に転写した。転写後、PVDF 膜を 5%スキムミルク (雪印メグミルク) in TBS-T で 30 分ブロッキングした。その後、PVDF 膜と一次抗体を含む 5%スキムミルク in TBS-T を室温で 2 時間、または 4 °C で一晩反応させた。反応後、TBS-T で 5 分間洗浄することを 4 回繰り返した。次に、PVDF 膜と Horseradish peroxidase (HRP) 標識された二次抗体を含む 5%スキムミルク in TBS-T を室温で 2 時間反応させた。反応後、TBS-T で 5 分間洗浄することを 4 回繰り返し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck) を用いて可視化し、LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて検出した。なお、マウス抗 Myc モノクローナル抗体 (9E10) は 1:3000、ラビット抗 GFP ポリクローナル抗体は 1:3000、マウス抗 α -Tubulin モノクローナル抗体 (DM1A) は 1:6000、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体は 1:3000、マウス抗 リーリンモノクローナル抗体 (G10) は 1:2000、ゴート抗 ApoE ポリクローナル抗体は 1:2000、マウス抗 Flotilin-1 モノクローナル抗体は 1:2000、ラビット抗 Caveolin-1 ポリクローナル抗体は 1:3000、ゴート抗 リーリンポリクローナル抗体 (AF3820) は 1:2000 で使用した。HRP 標識二次抗体は 1:4000 で使用した。

3-8. 免疫染色法

3-8-1. 使用した buffer

10 mM sodium citrate pH 6.0: 10 mM Citric acid monohydrate

PBS-T: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% Tween® 20

3-8-2. 培養細胞免疫染色

遺伝子導入した 15 mm 丸ガラス上の COS7 細胞を、抗 CSMD3 抗体含む 2% BSA in PBS と室温で 1 時間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS で 10 分間固定し、PBS で 2 回洗浄した。PBS-T を加え、室温で 10 分間、膜透過処理した。(膜透過処理なしの場合、PBS-T の代わりに PBS を用いた)。続けて、2% BSA in PBS を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。他の一次抗体含む 2% BSA in PBS と 4 °C、一晩反応させ、PBS-T で 4 回洗浄した。蛍光標識二次抗体および 2 μ g/mL Hoechst 33342 (Thermo Fisher

Scientific) 含む 2% BSA in PBS-T を室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 4 回洗浄した後、Dako Fluorescent Mounting Medium を用いてスライドガラスに封入した。

培養海馬神経細胞の免疫染色では、37 °C に温めた 4% PFA in PBS を用いて 10 分間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、2% BSA in PBS-T を加え、室温で 30 分間ブロッキングした。以降は COS7 細胞と同様の手順でサンプルを作製した。

作製したサンプルは、BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE) または LSM510 Meta 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて観察した。なお、マウス抗 Myc モノクローナル抗体 (9E10) は 1:1000、ラビット抗 GFP ポリクローナル抗体は 1:2000、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体は 1:3000 で使用した。蛍光標識二次抗体は 1:400 で使用した。

神経細胞の解析では、Image J (National Institutes of Health) のプラグインである NeuronJ (Meijering et al., 2004) を用いて樹状突起の数、および長さを定量した。

3-8-3. マウス大脳免疫染色

生後 (P) 7日、14日、および28日のSlc:ICRマウスを氷冷した4% PFA in PBSで灌流固定し、全脳を摘出した。更に4% PFA in PBS中で6時間固定した。続けて、20% Sucrose in PBS、30% Sucrose in PBSの順に固定した全脳を4 °Cで一晩浸漬した。次に、固定した全脳から前脳を切り取り、75% Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) in 30% Sucrose 中に沈め、ドライアイス上で包埋した。包埋した前脳からcryostat (CM 1850, Leica Microsystems) を用いて20 μmの切片を作製し、MASコート付きスライドガラス (松浪) に貼付後、室温で乾燥させた。得られた脳切片をPBSで5分間、2回洗浄し、10 mM Sodium Citrate pH 6.0中で105 °C、5分間加熱処理することで抗原賦活化した。放冷後、PBS-Tで5分間、2回洗浄し、2% BSA in PBS-Tを用いて室温で30分間ブロッキングした。そして、一次抗体含む2% BSA in PBS-Tと4 °C、一晩反応させ、PBS-Tで4回洗浄した。蛍光標識二次抗体および2 μg/mL Hoechst 33342含む2% BSA in PBS-Tを室温で1時間反応させた。PBS-Tで4回洗浄した後、Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako) を用いてスライドガラスに封入した。作製したサンプルは、BIOREVO BZ-9000を用いて観察した。なお、抗CSMD3ポリクローナル抗体は1:3000で使用した。蛍光標識二次抗体は1:400で使用した。

3-9. 免疫沈降 (IP) 法

3-9-1. 使用した buffer

Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100

3-9-2. 実験方法

遺伝子導入から 24 時間後、COS7 細胞の培地をアスピレーターで除き、PBS で 2 回洗浄した。500 μ L/well の Lysis buffer を加え (6 well plate)、氷上で 5 分間、静置した。その後、細胞溶解液を 1.5 mL チューブに集め、14,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心して上清を回収した。回収した上清に 40 μ L の 50% Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) slurry と抗 GFP 抗体 (1:3000) を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。その後、3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、1 分間、遠心し、上清をアスピレーターで除いた。その後、Lysis buffer で 4 回洗浄し、40 μ L の 1.3xSDS-PAGE sample buffer を加えてサンプルとした。

3-10. 逆転写 PCR 法

3-10-1. total RNA 抽出

培養海馬神経細胞から total RNA を抽出するために、PureLink RNA Mini kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。培養海馬神経細胞に 350 μ L/well (12 well plate) の 2-ME 含有 RLT を加え、RNase-free の 1.5 mL チューブへ回収した。次に、350 μ L の 70% Ethanol を加え、よく混合し、RNeasy ミニスピカラムに全量アプライした。10,400 rpm、25 $^{\circ}$ C、15 秒間遠心した後、RW1 を 700 μ L 加え、再度 10,400 rpm、25 $^{\circ}$ C、15 秒間遠心した。更に 500 μ L の RPE を加え、10,400 rpm、25 $^{\circ}$ C、15 秒間遠心することを 2 回繰り返した。RNase-free water を 30 μ L を加え、10,400 rpm、25 $^{\circ}$ C、1 分間遠心したものを回収して total RNA を得た。

E17.5 マウス大脳皮質から total RNA を抽出するために、TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いた。摘出した野生型およびリーラーマウス大脳皮質に 500 μ L の TRIzol を加え、25G (テルモ) ニードルで大脳皮質を破碎した。室温で 5 分間静置した後、100 μ L の Chloroform を加え、15 秒間、激しく転倒混和した。室温で 3 分間静置した後、12,000 g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上層から 250 μ L を回収し、250 μ L の 2-propanol を加え、転倒混和後、室温で 10 分間静置した。次に、12,000 g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、アスピレーターで上清を除いた。ペレットに 75% Ethanol を 1 mL 加え、しっかり混合した後、7,500 g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、アスピレーターで上清を除いた。この操作を 2 回繰り返した。ペレットを風乾した後、30 μ L の Milli Q を加え、55 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理することで total RNA を得た。

3-10-2. cDNA 合成

0.5 または 1 μg の total RNA、1 μL の 50 μM oligo(dT)₁₅ (Takara Bio) または 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Random Primers (Promega)、および 4 μL の 2.5 mM dNTP (Takara Bio) を含む混合液 (Milli Q で計 10 μL に合わせる) を 65 °C、5 分間加熱処理した。その後、氷上で 1 分以上氷冷した。その後、10 μL の cDNA 合成ミックス (4 μL の 5xRT buffer (Thermo Fisher Scientific)、2 μL の 50 mM MgCl₂、2 μL の 0.1 M DTT (Thermo Fisher Scientific)、0.125 μL の 40 U/ μL Recombinant RNase Inhibitor (Takara Bio)、0.5 μL の 200 U/ μL Superscript™ III RT (Thermo Fisher Scientific) を Milli Q で計 10 μL に合わせる) を混合した。50 °C、50 分間、加熱処理を行ったのち、85 °C、5 分間、加熱処理を行うことで cDNA を合成した。

3-10-3. RT-PCR

total RNA から oligo(dT)₁₅ を用いて逆転写して得た培養海馬神経細胞由来 cDNA を鋳型として逆転写 PCR を行った。ExTaq (Takara Bio) と下記プライマーを用いた。CSMD3 を検出するために、94 °C で 1 分を 1 サイクル、94 °C で 20 秒、57 °C で 20 秒、72 °C で 30 秒を 33 サイクル、25 °C で 1 分を 1 サイクルで増幅反応を行った。GAPDH を検出するために、94 °C で 1 分を 1 サイクル、94 °C で 20 秒、57 °C で 20 秒、72 °C で 30 秒を 23 サイクル、25 °C で 1 分を 1 サイクルで増幅反応を行った。CSMD3 を標的とした場合は 385 base pairs (bp) の、GAPDH を標的とした場合は 452 bp の amplicon が得られる。

- ・ CSMD3 を標的としたプライマー

CSMD3rt10258-07

5' - GCAAACGTAGTAGGAATGGACC - 3'

CSMD3rt10623-08

5' - GGCTTTTGTAGACCCCTGAA - 3'

- ・ GAPDH を標的としたプライマー

GAPDHrt559-01

5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'

GAPDHrt1110-02

5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3'

3-10-4. 定量的 PCR

total RNA から Random Primers を用いて逆転写して得たマウス大脳皮質由来 cDNA を鋳型として、KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (日本ジェネティクス) を用いて定量的 PCR を行い、Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により解析した。

・ Fatty acid desaturase 1 (Fads1) を標的としたプライマー

Fads1-742-01

5' - CGACATGGAATCACCTGCTACA - 3'

Fads1-861-02

5' - GGTCCCTTGCGGAAGCAGTTA - 3'

・ Fads2 を標的としたプライマー

Fads2-482-05

5' - CCTGTCCCACATCATCGTC - 3'

Fads2-624-06

5' - GGCCATAGTCATGTTGCAGC - 3'

・ Elongation of very long chain fatty acids protein 5 (Elovl5) を標的としたプライマー

Elovl5-01

5' - GGTGTGTGGGAAGGCAAATAC - 3'

Elovl5-02

5' - TGCGAAGGATGAAGAAAAAGG - 3'

・ Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) を標的としたプライマー

SCD-1-1F

5' - TGGGTTGGCTGCTTGTG - 3'

SCD-1-2R

5' - GCGTGGGCAGGATGAAG - 3'

・ β -actinを標的としたプライマー

B-actin-823-01

5' - GAGCTATGAGCTGCCTGACGG - 3'

B-actin-989-02

5' - AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG - 3'

3-11. 脂質解析

3-11-1. LC-MS/MS 法によるノンターゲット脂質解析

E17.5 野生型およびリーマウス胎児を母親マウスから取り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質を摘出した。両脳の大脳皮質を1本の2 mL Glass Jacket tube (FCR & Bio) に入れ、液体窒素により速やかに凍結した。凍結したマウス大脳皮質を理化学研究所、統合生命医科学研究センターの池田和貴副チームリーダーに送付し、LC-MS/MS を用いたノンターゲット脂質解析を委託した。

3-11-2. Bligh and Dyer 法による脂質抽出

E17.5 野生型およびリーラーマウス胎児を母親マウスから取り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質を摘出した。両脳の大脳皮質を Spitz 管に入れ、液体窒素により速やかに凍結した。そこに 2 mL の Methanol と 1 mL の Chloroform を加え、SONIFIER 250 を用いて超音波処理により大脳皮質を破碎した。更に、800 μ L の Milli Q を加えて、室温で 5 分間、vortex した。続けて 1 mL の Chloroform と 1 mL の 0.9% (w/v) KCl を加え、更に室温で 5 分間 vortex した。この Spitz 管を室温で 2,500 rpm、10 分間遠心した。パスツールピペットを用いて、Spitz 管の下層を回収した。元の Spitz 管に 2 mL の Chloroform を加え、室温で 5 分間 vortex し、室温で 2,500 rpm、10 分間遠心した。再び、パスツールピペットを用いて、Spitz 管の下層を回収した。最後に、Spitz 管に 2 mL の Chloroform と 20 μ L の 1N NaOH を加え、室温で 5 分間 vortex し、室温で 2,500 rpm、10 分間遠心した。パスツールピペットを用いて、同様に Spitz 管の下層を回収した。回収した脂質抽出液を窒素ガスで乾固し、1 mL の Chloroform/Methanol (2:1) で再度溶解した。

3-11-3. GC-MS 法による脂質分析

Bligh and Dyer 法により抽出した脂質抽出液を、東京大学大学院薬学研究科の嶋中雄太助教の御指導のもと、GC-MS を用いて分析した。

3-12. スクロース密度勾配超遠心法

3-12-1. 使用した buffer

TNE buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA (DOJINDO)

10%-65% Sucrose buffer: 10%-65% Sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM Sodium Phosphate, 1 mM EGTA

3-12-2. 実験方法

E17.5 の Slc:ICR 妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、胎児全てを取り出した。胎児を断頭後、大脳を摘出し、氷上で保存した。全ての胎児から大脳を摘出したら TNE buffer を加えた（総液量が 6 mL になるようにした）。そして、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in DMSO を加え（終濃度 2 mM）、速やかに SONIFIER 250 で超音波処理を行った。その後、4 °C、15,000 rpm、15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清を用いて、12.5% Sucrose in サンプルを調製した。遠心管 (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, BECKMAN COULTER®) へ、1 mL の 65% Sucrose buffer、5 mL の 50% Sucrose buffer、5 mL の 12.5% Sucrose in サンプル、2 mL の 10% Sucrose buffer の順に重層した。超遠心機 (Optima XE-90, BECKMAN COULTER®) に遠心管を設置し、12 °C、236,900 g、65 時間超遠心した。ノーブレーキにて

遠心終了後、上層から 1 mL ずつ回収し、各フラクションとした。

3-13. 免疫電子顕微鏡観察

サンプルをのせる Ni-グリッド (日新 EM) に 2%コロジオン溶液 (日本電子) を付け、乾燥させる。Milli Q に約 100 μ L の 2%コロジオン溶液を添加し、作製したコロジオン支持膜の上に Ni-グリッドをのせる。その後、真空装置中で Ni-グリッドにカーボンを吹きかける。続けて、プラズマ放電を当てることで、カーボン支持膜付きの Ni-グリッドを作製した。これらの作業は名古屋市立大学大学院医学研究科共同研究教育センターの高瀬広嗣研究員に御指導頂いた。

スクロース密度勾配超遠心法により得られた低密度画分 ($d = 1.085$) および高密度画分 ($d = 1.219$) を Ni-グリッドに 10 秒間付着させ、PBS で 30 秒間洗浄後、1% BSA in PBS で室温 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS で室温 30 秒間の洗浄を 5 回繰り返した。Ni-グリッドをマウス抗リリーリン抗体 G10 (1:100) in 1% BSA と室温で 2 時間反応させ、PBS で室温 30 秒間の洗浄を 6 回繰り返した。次に Ni-グリッドを 5 nm 金コロイド標識二次抗体 (1:100) in 1% BSA と室温で 2 時間反応させた。PBS で室温 30 秒間の洗浄を 6 回繰り返した後、MQ で室温 30 秒間の洗浄をし、2%リンタンングステン酸 (PTA) pH 7.0 を付着させた。過剰な PTA をろ紙で拭き取り、乾燥させ、試料を得た。この試料を高瀬研究員に委託し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus, 日本電子) で観察した。

3-14. 統計解析

統計データは全て、mean \pm SEM で表記した。異なる 3 群間を検定する場合には Tukey's multiple comparison test を用いた。異なる 2 群間を検定する場合には Welch の t 検定を用いた。また、LC-MS/MS、および GC-MS では、測定項目が多数あったため、Benjamini, Krieger, and Yekutieli 法により FDR が 5%となるように p 値を補正した。統計解析には Microsoft Excel、および Prism (GraphPad software) を用いた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$, N.S., not significant.

第四章

精神疾患関連タンパク質 CSMD3 の神経細胞における機能解明

4-1. 結果

4-1-1. CSMD3 は N 末端側を細胞外に、C 末端側を細胞内に持つホモオリゴマーの膜貫通タンパク質である

これまで 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 (Fig. 1; Lau and Scholnick, 2003)、実験的には検証されていなかった。そこで、本研究ではまず、CSMD3 が膜タンパク質であるか否かを検討した。最初に、CSMD3 の N 末端から 2 番目の CUB ドメインと Sushi ドメイン間を抗原とする (Fig. 3A)、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を作製した。全長 CSMD3 の C 末端に Myc タグまたは黄色蛍光タンパク質 Venus を付加した CSMD3-Myc (Fig. 3A) または CSMD3WT-Venus (Fig. 3B) 発現プラスミドを COS7 細胞に遺伝子導入し、その培養上清、および細胞ライゼートを WB 法により解析した。その結果、抗 Myc 抗体、および抗 GFP 抗体は細胞ライゼート中で CSMD3-Myc と CSMD3WT-Venus をそれぞれ検出した (Fig. 3C and D, lane 4, > 250 kDa)。しかし、培養上清では検出されなかった (Fig. 3C and D, lane 2)。また、作製した抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を用いても、同じ分子量の位置にシグナルを検出した。この結果から、CSMD3 は分泌タンパク質ではないことが示唆された。

CSMD3 の細胞内局在、および、そのトポロジーを明らかにするため、CSMD3-Myc 発現 COS7 細胞を膜透過処理有り無しの条件下で免疫染色を行った。固定前の COS7 細胞に抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を反応させ、その後、膜透過処理有り無しの条件下で抗 Myc 抗体を反応させた。その結果、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体は細胞膜上に存在する CSMD3-Myc のシグナルを検出した (Fig. 3E and H)。抗 Myc 抗体は、膜透過処理無しでは、膜上の CSMD3 のシグナルを検出しなかった (Fig. 3F and G)。一方、膜透過処理有りでは、細胞内小器官からのシグナルが非常に強いものの、抗 Myc 抗体は膜上の CSMD3-Myc のシグナルも検出した (Fig. 3I and J)。これらの結果に加え、transmembrane domain を 1 つしか持たないと考えられる (Lau and Scholnick, 2003) ことから、CSMD3 は N 末端側を細胞外に、C 末端側を細胞内に持つ 1 回膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。

細胞外タンパク質が持つ CUB ドメインの多くはタンパク質間相互作用に関わることや (Gaboriaud et al., 2011)、Sushi ドメインを持つタンパク質の一部はオリゴマーを形成することが知られている (Souri et al., 2008; Sia et al., 2013)。そこで、CSMD3 もオリゴマーを形成するか否かを調べるため、CSMD3-Myc を CSMD3WT-Venus または Venus 発現 COS7 細胞に遺伝子導入し、抗 GFP 抗体を用いて IP した。その結果、CSMD3-Myc は CSMD3WT-Venus と共沈降したが、Venus タンパク質とは共沈降しなかった (Fig. 3K)。この結果から、CSMD3 分子は同じ細胞上でホモオリゴマーを形成することが示唆された。

抗体 (red; F and I) で免疫染色した。対比染色として、核酸を標的とする Hoechst 33342 (blue; G and J) を用いた。固定前に、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体と反応させた (E and H)。その後、膜透過処理無し (F and G)、または有り (I and J) の条件下で抗 Myc 抗体と反応させた。免疫染色像は共焦点顕微鏡で獲得した。抗 CSMD3 ポリクローナル抗体は膜上の CSMD3-Myc のシグナルを検出した (E and H)。膜透過処理無しの条件下では、抗 Myc 抗体は膜上の CSMD3-Myc のシグナルを検出できなかった (F and G)。膜透過処理有りの条件下では、抗 Myc 抗体は細胞内小器官に存在する CSMD3-Myc のシグナルを非常に強く検出したものの、膜上にも CSMD3-Myc のシグナルを検出した (I and J)。Scale bar: 50 μ m.

(K) CSMD3-Myc と CSMD3WT-Venus の免疫沈降物の WB 解析。COS7 細胞に CSMD3-Myc を Venus または CSMD3WT-Venus と共発現した。その後、細胞を溶解し、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、続けて WB 解析を行った。Venus、および CSMD3WT-Venus はともに沈降した (IP のパネルの下段と中段; lane 1 and 2)。CSMD3-Myc は CSMD3WT-Venus とのみ共沈降した (IP のパネルの上段; lane 2)。分子量 (kDa) は WB 結果の右側に示した。

4-1-2. CSMD3 遺伝子は生後マウス的大脑皮質、海馬錐体細胞の apical dendrites、および培養海馬神経細胞の培養後期に発現する

CSMD3 mRNA は胎生期ではサブプレートに高発現し、生後的大脑皮質では全体的に発現している (Oeschger et al., 2012)。しかし、タンパク質レベルでの CSMD3 の局在は不明であった。そこで、脳における CSMD3 タンパク質の発現パターンを免疫染色法により調べた。胎生期のマウス大脳では、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体のシグナルは得られなかった (data not shown)。そのため、胎生期では CSMD3 タンパク質の発現レベルは非常に低いと考えられる。生後のマウス大脳でも CSMD3 タンパク質の発現を調べたところ、生後 28 日 (P28) では大脳皮質と海馬神経細胞が抗 CSMD3 ポリクローナル抗体により標識された (Fig. 4A)。このシグナルは、抗原をあらかじめ吸着させた抗 CSMD3 ポリクローナル抗体ではほとんど消失した (Fig. 4B)。このことから、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体のシグナルは CSMD3 特異的であると考えられる。更に興味深いことに、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体のシグナルは P14 および P28 の海馬 CA1 野の錐体細胞から伸びる apical dendrites からも検出された (Fig. 4D-F)。一方、P7 では抗 CSMD3 ポリクローナル抗体のシグナルは apical dendrites からは検出されなかった (Fig. 4C)。これらの結果は、CSMD3 が生後後期における樹状突起の形成に関与することを示唆する。

次に、培養 1, 3, 5, 7, 10, 14 日 (DIV) の培養海馬神経細胞における CSMD3 の発現を RT-PCR 法により調べた。CSMD3 mRNA は 5 DIV までは検出されなかったが、7 DIV 以降から検出された (Fig. 4G)。培養海馬神経細胞において、7 DIV までに、軸索の極性決定と primary dendrites の安定化は完了しており、それ以降の時期から樹状突起の分岐形成が盛んに行われる (Dotti et al., 1988)。従って、CSMD3 の機能は樹状突起の形態の制御と関連する可能性が考えられる。

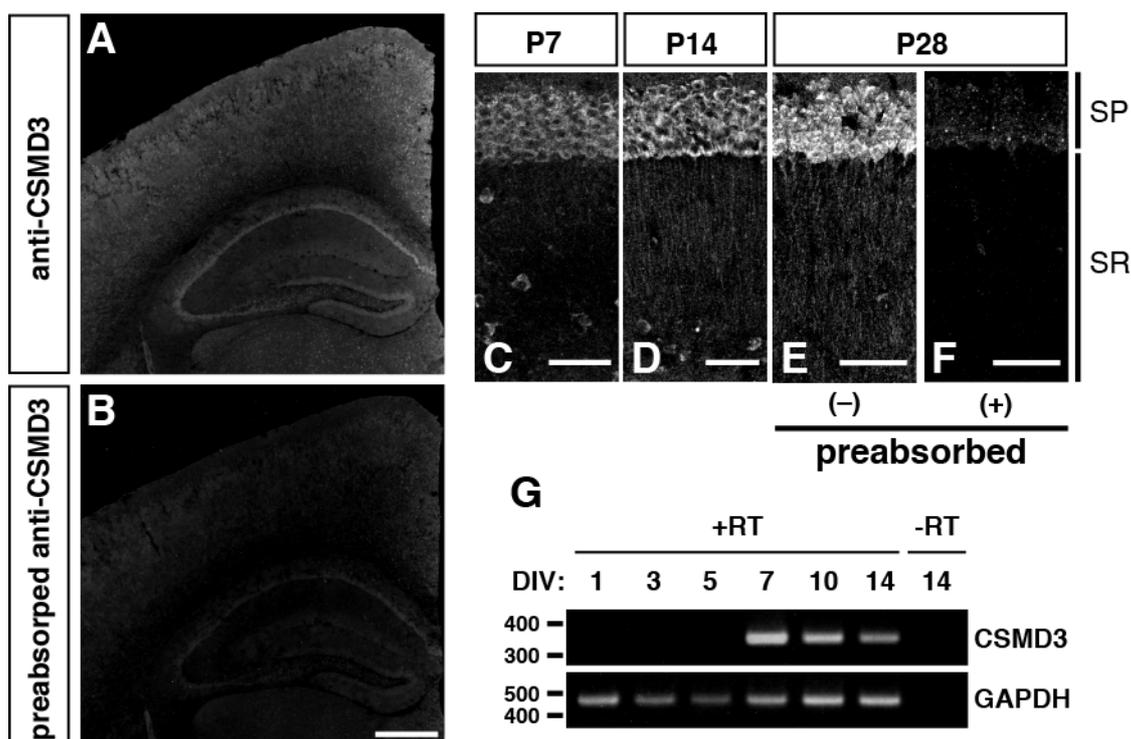


Fig. 4 CSMD3 タンパク質は生後マウスの大脳皮質と海馬 apical dendrites に発現し、CSMD3 mRNA は培養海馬神経細胞の 7 DIV 以降に発現する

(A and B) P28 におけるマウス大脳の抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を用いた免疫染色像。大脳皮質と海馬神経細胞が抗 CSMD3 ポリクローナル抗体により標識された (A)。一方、抗原を吸着させた抗 CSMD3 ポリクローナル抗体では、シグナルはほとんど消失した (B)。Scale bar: 500 μ m

(C-F) P7, 14, および 28 における海馬 CA1 野の抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を用いた免疫染色像。錐体細胞層 (SP) は P7, 14, 28 のいずれも抗 CSMD3 ポリクローナル抗体で標識された (C-E)。P14 および 28 では錐体細胞から伸びる apical dendrites (SR 部分) も抗 CSMD3 ポリクローナル抗体で標識されたが (D and E)、P7 では標識されなかった (C)。抗原を吸着させた抗 CSMD3 ポリクローナル抗体では、シグナルはほとんど消失した (F)。SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum; Scale bar: 50 μ m.

(G) RT-PCR 法を用いた培養海馬神経細胞における CSMD3 の発現解析。CSMD3 mRNA は 7 DIV 以降から検出された。GAPDH mRNA はポジティブコントロールとして用いた。DNA のサイズマーカー (bp) は泳動結果の左側に示した。

4-1-3. CSMD3 は樹状突起の分岐形成を促進する

培養海馬神経細胞において、CSMD3 mRNA が 7 DIV 以降に発現することを見いだした。しかし、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体を用いた WB 法、免疫染色法のどちらも CSMD3 タンパク質を検出できなかった (data not shown)。この理由の 1 つとして、私が用いた培養系では、タンパク質レベルでの CSMD3 の発現が非常に低いことが考えられる。この理由から、CSMD3 が樹状突起の形態にどのような影響を与えるかを調べるため、私は培養海馬神経細胞を用いた gain-of-function 実験を行った。この実験を行うために、3 つの CSMD3 変異体発現プラスミド、CSMD3WT-Venus (Fig. 3B)、CSMD3 Δ NC-Venus (細胞外と細胞内のほぼ全ての領域を欠損し、C 末端に Venus を付加した, Fig. 5A, 上段)、および CSMD3 Δ C-Venus (細胞内領域を欠損し、C 末端に Venus を付加した, Fig. 5A, 下段) を用いた。まず、これら CSMD3 変異体を COS7 細胞に発現し、発現レベル、および細胞内局在を免疫染色法で調べた。その結果、どの CSMD3 変異体も同程度の発現量を示した (Fig. 5B)。また、CSMD3 Δ C-Venus も膜上に発現した。次に、7 DIV の培養海馬神経細胞に CSMD3 変異体を遺伝子導入し、10 DIV における CSMD3 変異体の発現レベルを WB 法により解析した。その結果、CSMD3WT-Venus、および CSMD3 Δ C-Venus のバンドは 2 本検出された (Fig. 5C, 上段, lane 2 and 3)。2 本のうち、上のバンドが糖鎖修飾等を受けた膜上の CSMD3 変異体、下のバンドが細胞内に存在する CSMD3 変異体だと考えられる。また、神経細胞における CSMD3 Δ C-Venus の発現レベルは、CSMD3 Δ NC-Venus (Fig. 5C, 下段, lane 1) と CSMD3WT-Venus よりやや低かった。更に、CSMD3 変異体が CSMD3 全長とホモマルチマーを形成するか否かを、COS7 細胞における CSMD3-Myc との共発現、および免疫沈降法で検討した。その結果、CSMD3-Myc は、細胞外領域を持つ CSMD3WT-Venus、および CSMD3 Δ C-Venus と共沈降した (Fig. 5D, lane 3 and 4)。一方、CSMD3 Δ NC-Venus は CSMD3-Myc とは共沈降しなかった (Fig. 5D, lane 2)。この結果から、CSMD3 Δ NC-Venus は内在性の CSMD3 に対して dominant-negative な影響を与えないと考えられる。従って、CSMD3 Δ NC-Venus をコントロールとして、これら CSMD3 変異体発現プラスミドを 7 DIV の培養海馬神経細胞に遺伝子導入し、10 DIV に抗 GFP 抗体を用いて免疫染色し、形態を観察した。CSMD3WT-Venus、および CSMD3 Δ NC-Venus の過剰発現は、神経細胞の primary dendrites の数や長さに影響を与えなかった (Fig. 5E, F, H and I)。一方、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、および樹状突起の長さの総和が有意に増加した (Fig. 5E, F, J and K)。非常に興味深いことに、細胞内領域を欠損した CSMD3 Δ C-Venus 発現細胞も、CSMD3WT-Venus 発現細胞と同様に、樹状突起の分岐数と樹状突起の長さの総和を有意に増加させた (Fig. 5F, G, J, and K)。以上の結果は CSMD3 が樹状突起の分岐形成を促進すること、そしてその機能には CSMD3 の細胞外領域が必要であり、細胞内領域は必要ないことが示唆される。

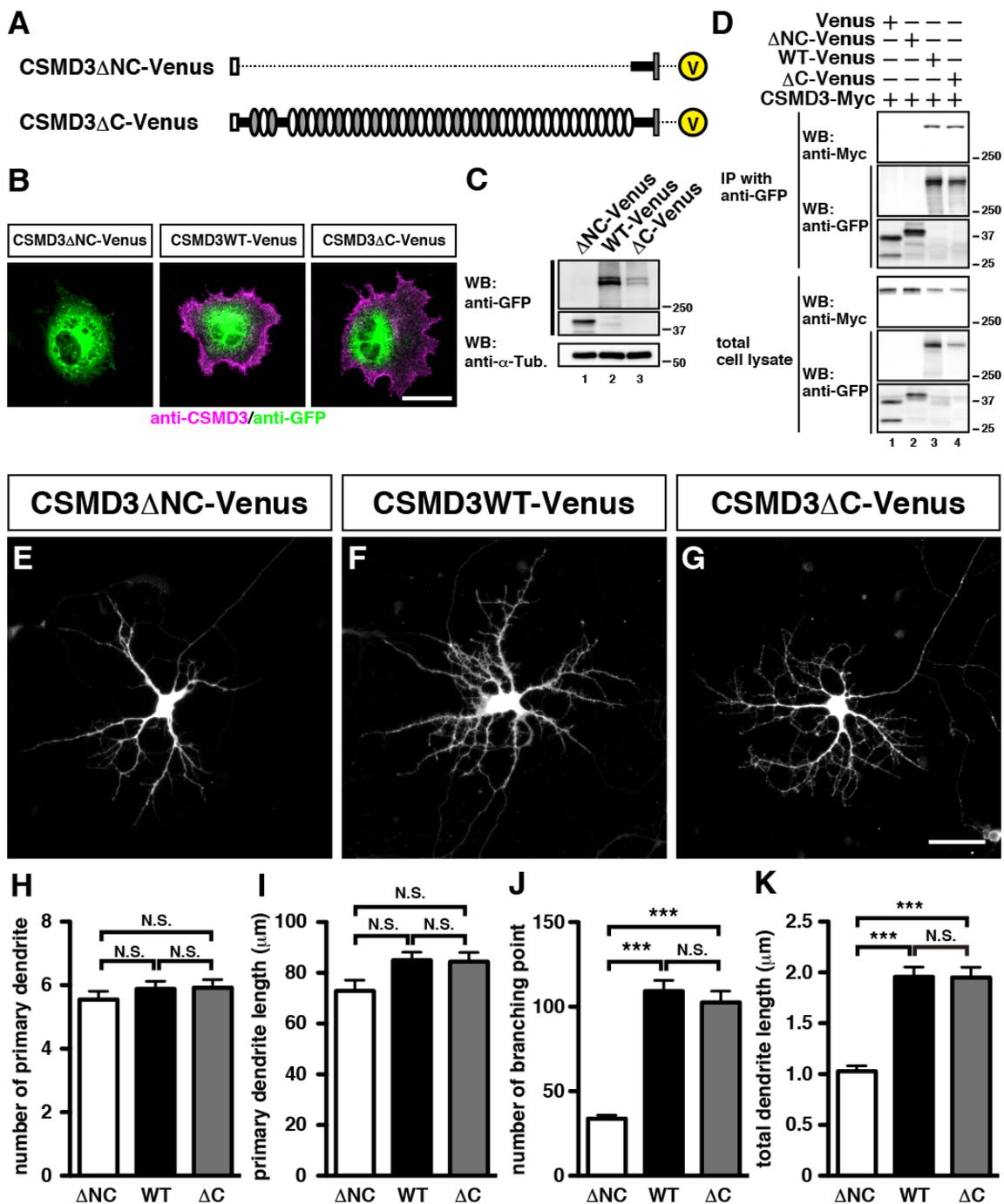


Fig. 5 CSMD3 は樹状突起の分岐形成を促進する。

(A) CSMD3 変異体の模式図。CSMD3 Δ NC-Venus は細胞外領域と細胞内領域のほぼ全てを欠損し、C 末端に Venus を付加した変異体であり (A, top)、CSMD3 Δ C-Venus は細胞内領域を欠損し、C 末端に Venus を付加した変異体 (A, bottom) である。

(B) CSMD3 変異体発現 COS7 細胞の免疫染色像。固定前に、抗 CSMD3 ポリクローナル抗体と反応させた。

固定と膜透過処理をした後、抗 GFP 抗体と反応させた。Scale bar: 50 μ m.(C) CSMD3 変異体の発現解析。各 CSMD3 変異体発現プラスミドを 7 DIV の培養海馬神経細胞に遺伝子導入した。10 DIV の各 CSMD3 変異

体発現神経細胞を溶解し、抗 GFP 抗体を用いて WB で解析した。 α -Tubulin は loading control として用いた。

(D) CSMD3 変異体の免疫沈降法を用いた相互作用解析。示した CSMD3 変異体を COS7 細胞に遺伝子導入し、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降した。その結果、CSMD3 Δ NC-Venus は CSMD3-Myc と相互作用しなかった。

(E-G) CSMD3 変異体発現培養海馬神経細胞の免疫染色像。7 DIV の培養海馬神経細胞に CSMD3 変異体発現プラスミドを遺伝子導入し、10 DIV に固定、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行った。CSMD3WT-Venus、および CSMD3 Δ C-Venus 発現細胞は非常に分岐した樹状突起を持つ。Scale bar: 50 μ m

(H-K) CSMD3 変異体発現細胞の primary dendrites の数 (H)、primary dendrites の長さの平均 (I)、分岐数 (J)、および樹状突起の長さの総和 (K) の定量。本実験は独立 3 回の実験結果より、グラフを mean \pm SEM で表した (Δ NC: n = 69 neurons, WT: n = 85 neurons, Δ C: n = 75 neurons)。統計学的処理は Tukey's test を用いた。

***p < 0.001, N.S., not significant.

4-2. 考察

CSMD3 遺伝子の変異は統合失調症や自閉症の一部の患者で同定されている (Floris et al., 2008; Magri et al., 2010; Malhotra et al., 2011; Curran et al., 2013)。これらの報告は、遺伝子変異による CSMD3 タンパク質の機能異常がこれら精神疾患の発症に関与することを示唆する。しかし、CSMD3 の実際の機能は不明であった。本研究では、私は CSMD3 がホモオリゴマーを形成する膜貫通タンパク質であることを明らかにした。更に、CSMD3 が生後マウス海馬錐体細胞の apical dendrites に存在し、培養海馬神経細胞では CSMD3 が樹状突起の分岐形成を促進することを示した。これらの結果は CSMD3 の生理機能を最初に明らかにしたものである。

これまで、CUB ドメインや Sushi ドメインを持つタンパク質の一部は、受容体、共受容体、およびリガンドなどとして機能することが知られている (He and Tessier-Lavigne, 1997; Tiao et al., 2008, Ng et al., 2009; Kakegawa et al., 2015)。CSMD3 も 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とから受容体として機能するのではないかと考えた。私は CSMD3 の過剰発現が樹状突起の分岐形成を促進すること (Fig. 5F)、そして興味深いことに、この機能に細胞内領域は必要ないこと (Fig. 5G and J) を見いだした。この結果は、CSMD3 単体は受容体としては機能しないことを示唆する。1 つの可能性として、CSMD3 は樹状突起の形成を担うタンパク質のような結合分子を持っており、共受容体として機能することが考えられる。CSMD3 はホモオリゴマーを形成することから、CSMD3 の結合分子は CUB ドメインまたは Sushi ドメインを持つのではないかと考えられる。今後、CSMD3 による樹状突起の分岐形成、ひいては精神疾患発症メカニズムの一端の理解のために、CSMD3 の結合分子の同定が期待される。

CSMD3 の loss-of-function 実験は樹状突起の分岐形成における CSMD3 の重要性を明らかにするために必要である。実際に、shRNA を用いた loss-of-function 実験にも取り組み、樹状突起の分岐形成は減少傾向を示した (data not shown)。しかし、培養海馬神経細胞において、内在性の CSMD3 タンパク質を検出できなかった (data not shown)。そのため、本当に CSMD3 をノックダウンできたか否かが検討できなかった。また、CSMD3 タンパク質を検出できなかったことから、私が用いた系の培養海馬神経細胞では CSMD3 の発現レベルは低いとも考えられる。今後、CSMD3 ノックアウトマウスを用いた解析から、*in vivo* における樹状突起やシナプスの形成における CSMD3 の寄与が明らかになることが期待される。

私は CSMD3 が P14 以降の海馬錐体細胞 apical dendrites に発現すること、培養海馬神経細胞における CSMD3 の過剰発現が樹状突起の分岐形成を促進することを見いだした。これらをまとめると、CSMD3 は apical dendrites に発現し、樹状突起やシナプス形成が生じる時期

にその機能を果たすことが示唆される。死後脳解析により、統合失調症や自閉症患者の一部でシナプスのスパイン密度や樹状突起の分岐数減少が報告されている（Harrison and Eastwood, 2001; Moyer et al., 2015; Phillips and Pozzo-Miller, 2015）。従って、CSMD3 の機能低下は樹状突起の異常を引き起こし、最終的には精神疾患を引き起こす可能性が考えられる。

第五章

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

5-1. 結果

5-1-1. リーラーマウス大脳皮質では、飽和脂肪酸を持つ各リン脂質クラスに含まれる DHA と ARA の含有割合が低下する

リーリンは脂質の細胞内取り込みに重要なリポタンパク質受容体ファミリーに属する VLDLR、および ApoER2 に結合する。しかし、リーリンがこれらの受容体を介して脂質組成を制御するか否かは不明であった。そこで私は、最初にリーリンが神経細胞の脂質組成の制御に関与するか否かを、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）の大脳皮質を用いて検討した。E17.5 では、大脳皮質に含まれる細胞のほとんどは神経細胞であり、また神経細胞種のほとんどが誕生しているため、この時期を使用した。クロロホルム/メタノール中で破碎することで、大脳皮質から総脂質を抽出した。これを LC-MS/MS にインジェクションすることで、総脂質に含まれる様々な脂質分子種を定量的に解析した。その結果、約 1100 種以上の脂質分子種について、定量的なデータを得られた。興味深いことに、必須多価不飽和脂肪酸含有リン脂質へのリーリンの影響が示唆された。他にもリーリンの影響が示唆される脂質分子種はいくつもあったが、その脂質分子種自体の同定には未だ至っていない (m/z と保持時間のみ分かっている)。

そこで、野生型、およびリーラーマウス大脳皮質における DHA 含有リン脂質量を各リン脂質クラスにおける割合として表した (Table 1 and Fig. 6A)。その結果、リーラーマウス大脳皮質ではホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、およびホスファチジルセリン (PS) の多くのリン脂質種で DHA 含有割合が減少傾向を示した。18:1、20:1、22:3 の脂肪酸を持つ DHA 含有リン脂質、DHA 含有ホスファチジルイノシトール (PI) など、一部のリン脂質種では DHA 含有割合が例外的に増加傾向を示した。野生型、およびリーラーマウス大脳皮質におけるアラキドン酸 (ARA) 含有リン脂質についても、各リン脂質クラスにおける割合を表した (Table 2 and Fig. 6B)。その結果、リーラーマウス大脳皮質では飽和脂肪酸を持つ PC、PE、PS、PI の ARA 含有割合が減少傾向を示した。一方、モノ不飽和脂肪酸を持つ PC、PE、PS、PI の ARA 含有割合は増加傾向を示した。これらの結果から、リーリンが必須多価不飽和脂肪酸の制御に関与する可能性が示唆された。

総PC中における各DHA含有PCの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	1.036 ± 0.038	0.964 ± 0.049
18:1	0.601 ± 0.043	0.590 ± 0.045
16:1	0.408 ± 0.033	0.381 ± 0.032
14:0	0.349 ± 0.019	0.315 ± 0.013
18:1e (*2)	0.046 ± 0.002	0.042 ± 0.002
合計	2.440 ± 0.134	2.292 ± 0.142

総PE中における各DHA含有PEの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
16:1e	11.924 ± 0.193	11.541 ± 0.111
16:0	11.032 ± 0.793	9.900 ± 0.726
18:0	9.863 ± 0.246	9.335 ± 0.175
18:1e	5.768 ± 0.180	5.698 ± 0.245
18:1	4.419 ± 0.083	4.594 ± 0.065
18:2e	2.249 ± 0.263	2.223 ± 0.207
14:0	0.240 ± 0.018	0.249 ± 0.032
18:2	0.214 ± 0.014	0.219 ± 0.006
18:3e (*1)	0.135 ± 0.028	0.120 ± 0.011
22:3	0.083 ± 0.006	0.090 ± 0.006
20:1	0.068 ± 0.004	0.071 ± 0.003
14:1e	0.052 ± 0.003	0.050 ± 0.001
16:2e (*1)	0.041 ± 0.004	0.042 ± 0.005
合計	46.088 ± 1.834	44.134 ± 1.592

総PS中における各DHA含有PSの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	54.744 ± 3.327	53.603 ± 2.925
16:0	5.889 ± 0.491	6.022 ± 0.285
22:4	3.206 ± 0.333	2.937 ± 0.299
18:1	2.073 ± 0.283	2.348 ± 0.274
22:3	1.838 ± 0.200	2.274 ± 0.246

(次頁に続く)

(前頁の続き)

総PS中における各DHA含有PSの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
22:6	0.860 ± 0.101	0.769 ± 0.098
24:5	0.807 ± 0.088	0.798 ± 0.096
24:6	0.526 ± 0.049	0.548 ± 0.056
22:5	0.441 ± 0.026	0.356 ± 0.033
20:4	0.284 ± 0.025	0.262 ± 0.026
17:0	0.187 ± 0.015	0.171 ± 0.006
24:3 (*1)	0.150 ± 0.028	0.140 ± 0.021
合計	71.006 ± 4.967	70.228 ± 4.365

総PI中における各DHA含有PIの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
16:0 (*1)	0.443 ± 0.081	0.543 ± 0.165
18:0	0.408 ± 0.024	0.465 ± 0.045
18:1 (*1)	0.177 ± 0.016	0.239 ± 0.027
合計	1.027 ± 0.121	1.248 ± 0.237

Table 1 野生型およびリーラーマウス大脳皮質における DHA 含有リン脂質の解析

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質をクロロホルムとメタノールを用いて総脂質を抽出し、LC-MS/MSを用いてノンターゲット脂質解析を行った。そこで得られた測定値のうち、各 DHA 含有リン脂質の量を総 PC、総 PE、総 PS、および総 PI あたりの割合で表した。データは mean ± SEM で表した (*1, 野生型: n = 4, リーラー: n = 3; *2, 野生型: n = 5, リーラー: n = 5, 無印, 野生型: n = 9, リーラー: n = 8: 実験回によっては同定できなかった脂質分子種も存在するため、n 数が変動している)。e はグリセロール骨格と脂肪酸がビニルエーテル結合している (プラズマローゲン型リン脂質) ことを表す。

総PC中における各ARA含有PCの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
16:0	5.915 ± 0.332	5.527 ± 0.302
18:0	3.010 ± 0.214	2.871 ± 0.154
18:1	2.100 ± 0.138	2.094 ± 0.160
14:0	0.507 ± 0.032	0.471 ± 0.044
18:2	0.121 ± 0.020	0.123 ± 0.018
18:1e	0.064 ± 0.004	0.068 ± 0.006
合計	11.717 ± 0.741	11.154 ± 0.684

総PE中における各ARA含有PEの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	15.333 ± 0.161	14.849 ± 0.206
18:1	3.967 ± 0.169	4.198 ± 0.108
16:0	3.476 ± 0.064	3.386 ± 0.056
16:1e	2.748 ± 0.250	3.157 ± 0.518
18:1e	1.726 ± 0.051	1.743 ± 0.044
18:2e	1.172 ± 0.152	1.469 ± 0.180
16:1	0.130 ± 0.019	0.130 ± 0.025
18:3e	0.078 ± 0.004	0.098 ± 0.007
14:0	0.048 ± 0.004	0.051 ± 0.002
合計	28.678 ± 0.874	29.080 ± 1.145

総PS中における各ARA含有PSの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	7.065 ± 1.047	6.998 ± 0.958
18:1	0.641 ± 0.078	0.648 ± 0.078
16:0	0.533 ± 0.069	0.568 ± 0.048
22:6	0.284 ± 0.025	0.262 ± 0.026
合計	8.524 ± 1.219	8.475 ± 1.109

(次頁に続く)

(前頁の続き)

総PI中における各ARA含有PIの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	63.862 ± 3.406	61.580 ± 2.933
18:1	18.840 ± 2.015	21.310 ± 2.229
16:0	13.558 ± 1.754	12.641 ± 1.162
16:1	0.608 ± 0.102	0.679 ± 0.125
18:2 (*1)	0.376 ± 0.050	0.371 ± 0.045
20:1	0.336 ± 0.032	0.380 ± 0.047
20:4 (*1)	0.329 ± 0.015	0.343 ± 0.020
17:0	0.176 ± 0.005	0.184 ± 0.009
合計	98.085 ± 7.379	97.488 ± 6.570

Table 2 野生型およびリーラーマウス大脳皮質における ARA 含有リン脂質の解析

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質をクロロホルムとメタノールを用いて総脂質を抽出し、LC-MS/MSを用いてノンターゲット脂質解析を行った。そこで得られた測定値のうち、各 ARA 含有リン脂質の量を総 PC、総 PE、総 PS、および総 PI あたりの割合で表した。データは mean ± SEM で表した (*1, 野生型: n = 4, リーラー: n = 3; *2, 野生型: n = 5, リーラー: n = 5, 無印, 野生型: n = 9, リーラー: n = 8: 実験回によっては同定できなかった脂質分子種も存在するため、n 数が変動している)。e はグリセロール骨格と脂肪酸がピニルエーテル結合している (プラズマローゲン型リン脂質) ことを表す。

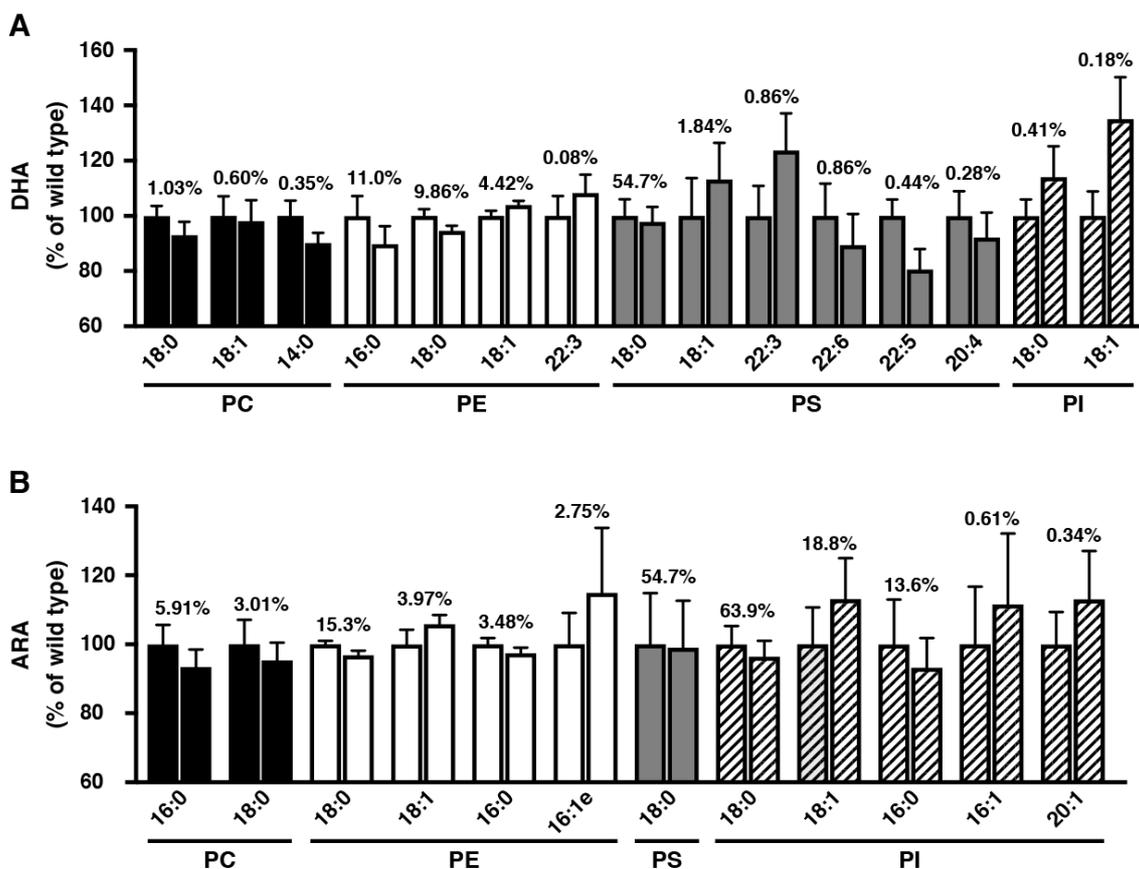


Fig. 6 リーラーマウス大脳皮質では、飽和脂肪酸を持つリン脂質の DHA と ARA 含有割合は減少傾向を示す

(A and B) 野生型、およびリーラーマウス大脳皮質における DHA (A)、および ARA (B) 含有リン脂質量の各リン脂質クラスにおける割合 (得られた結果の中で変化の大きいリン脂質種のみをグラフ化した)。野生型マウスにおける各リン脂質の含有割合を 100 %として示した。各グラフの左側が野生型、右側がリーラーマウスを示す。グラフの上の数字は、野生型における各リン脂質の各リン脂質クラスにおける割合を示す。PC、PE、および PS の多くのリン脂質種において、DHA 含有割合は減少傾向を示した。一部の 18:1, 22:3 を持つ DHA 含有リン脂質、および DHA 含有 PI の DHA 含有割合は、例外的に増加傾向を示した。飽和脂肪酸を持つ ARA 含有リン脂質の ARA 含有割合は減少傾向を示した。一方、モノ不飽和脂肪酸を持つ ARA 含有リン脂質の ARA 含有割合は増加傾向を示した。14:0, ミリスチン酸; 16:0, パルミチン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1, オレイン酸, 20:1, イコセン酸; 20:4, ARA; 22:4, ドコサテトラエン酸; 22:5, エイコサペンタエン酸; 22:6, DHA; 24:6, テトラコサヘキサエン酸。データは mean ± SEM で表した。

5-1-2. リーラーマウス大脳皮質では、ミード酸の含有量が増加する

非常に興味深いことに、リーラーマウス大脳皮質ではどのリン脂質種においても炭素数20、二重結合数3の多価不飽和脂肪酸20:3の含有割合が増加することを見いだした (Table 3 and Fig. 7A)。そこで、次にこの20:3が何かを明らかにしようと試みた。LC-MS/MS法より定量性があり、かつ二重結合の位置も同定できるGC-MSを用いてリーラーマウス大脳皮質の脂肪酸分析を行った。E17.5の大脳皮質から得られる脂質量が少なく、リン脂質のクラス別に測定することが困難であった。そのため、大脳皮質から抽出した総脂質に含まれる全ての脂肪酸を加メタノール分解により遊離脂肪酸メチルに変換し、分析を行った。その結果、リーラーマウス大脳皮質では、大脳皮質全体に含まれるミード酸の総含有量が増加することを見いだした (Table 4 and Fig. 7B)。リーラーマウス大脳皮質において、ミード酸以外の不飽和脂肪酸含有量に大きな差は見られなかった。

ミード酸は通常の生体内にはほとんど存在しない脂肪酸である (Fluco and Mead, 1958; Siguel et al., 1987; Duffin et al., 2000; Delaš et al., 2008)。必須多価不飽和脂肪酸が欠乏すると、ミード酸がその欠乏を補うために、stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) による不飽和化反応、Fatty acid desaturase 2 (Fads2) による不飽和化反応、Elongation of very long chain fatty acids protein 5 (Elov15) による伸長反応、および Fads1 による不飽和化反応によりステアリン酸から生合成される (Fig. 8, Ichi et al., 2014)。従って、ミード酸の増加は体内の必須多価不飽和脂肪酸の欠乏を示す指標となっている (Holman et al., 1979)。GC-MSの結果から、LC-MS/MSで含有量の増加した20:3はミード酸であることが示唆された。また、これらの結果をまとめると、リーラーマウス大脳皮質ではリン脂質に含まれるDHAなどの必須多価不飽和脂肪酸が欠乏している、つまり、リーリンはリン脂質含有必須多価不飽和脂肪酸の含有量を適切に保つために必要であることが示唆された。また、増加傾向を示したDHA含有リン脂質が持つ22:3は、ミード酸が更に伸長反応を受けたジホモミード酸だと考えられる (Fig. 6A) (Walker, 1966; Farquharson et al., 1995)。ミード酸および22:3が増加したため、22:3含有リン脂質の割合が増加傾向を示したと考えられる (Fig. 6A, Table 1, and 5)。

総PC中における各20:3含有PCの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
16:0	0.479 ± 0.013	0.505 ± 0.028
18:0	0.067 ± 0.004	0.083 ± 0.007
合計	0.546 ± 0.018	0.588 ± 0.035

総PE中における各20:3含有PEの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	0.677 ± 0.024	0.890 ± 0.037
16:1e	0.163 ± 0.008	0.207 ± 0.009
18:1e	0.073 ± 0.005	0.095 ± 0.006
16:0	0.054 ± 0.005	0.069 ± 0.007
合計	0.967 ± 0.042	1.260 ± 0.060

総PS中における各20:3含有PSの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	0.975 ± 0.052	1.091 ± 0.053

総PI中における各20:3含有PIの割合の平均 (%)		
ペアの脂肪酸	野生型	リーラー
18:0	1.138 ± 0.133	1.582 ± 0.193
16:0	0.422 ± 0.033	0.532 ± 0.03
合計	1.559 ± 0.166	2.115 ± 0.223

Table 3 野生型およびリーラーマウス大脳皮質における 20:3 含有リン脂質の解析

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質をクロロホルムとメタノールを用いて総脂質を抽出し、LC-MS/MSを用いてノンターゲット脂質解析を行った。そこで得られた測定値のうち、各 20:3 含有リン脂質の量を総 PC、総 PE、総 PS、および総 PI あたりの割合で表した。データは mean ± SEM で表した (野生型: n = 9, リーラー: n = 8)。e はグリセロール骨格と脂肪酸がビニルエーテル結合している (プラズマローゲン型リン脂質) ことを表す。

脂肪酸	野生型			リーラー		
	各脂肪酸量 (ng)	総脂肪酸量あたりの割合 (%)		各脂肪酸量 (ng)	総脂肪酸量あたりの割合 (%)	
12:0	1.411 ± 0.300	0.062 ± 0.010		1.299 ± 0.290	0.061 ± 0.012	
14:0	51.464 ± 4.493	2.350 ± 0.130		51.609 ± 7.160	2.440 ± 0.162	
15:0	6.748 ± 1.609	0.300 ± 0.064		5.911 ± 1.799	0.275 ± 0.078	
16:0	699.519 ± 38.373	32.138 ± 0.411		652.740 ± 63.345	31.669 ± 0.549	
16:1	52.907 ± 1.863	2.450 ± 0.058		51.431 ± 5.851	2.467 ± 0.038	
17:0	1.722 ± 0.353	0.076 ± 0.010		1.459 ± 0.216	0.069 ± 0.006	
18:0	467.459 ± 34.057	21.368 ± 0.580		433.490 ± 45.026	20.935 ± 0.340	
18:1 (n-9)	321.562 ± 9.175	14.927 ± 0.375		324.901 ± 33.345	15.706 ± 0.256	
18:1 (n-7)	87.304 ± 3.187	4.051 ± 0.127		90.826 ± 9.810	4.374 ± 0.090	
18:2 (n-6)	8.669 ± 0.357	0.404 ± 0.018		8.455 ± 1.422	0.391 ± 0.025	
20:3 (n-9)	3.289 ± 0.389	0.150 ± 0.016		4.194 ± 0.412	0.206 ± 0.011	
20:3 (n-6)	1.393 ± 0.139	0.064 ± 0.006		1.554 ± 0.241	0.073 ± 0.004	
20:4 (n-6)	199.771 ± 6.199	9.284 ± 0.289		196.056 ± 24.732	9.326 ± 0.290	
20:5 (n-3)	9.485 ± 0.474	0.440 ± 0.020		9.576 ± 1.202	0.456 ± 0.017	
22:4 (n-6)	26.795 ± 1.341	1.243 ± 0.062		23.558 ± 3.497	1.105 ± 0.060	
22:6 (n-3)	230.428 ± 7.292	10.693 ± 0.299		221.109 ± 30.812	10.447 ± 0.453	

Table 4 野生型およびリーラーマウス大脳皮質における脂質分析結果

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質から Bligh and Dyer 法により総脂質を抽出後、加メタノール分解により含まれる脂肪酸全てを遊離脂肪酸メチルに変換し、GC-MS により分析した。そこで得られた各脂肪酸量と、総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を mean ± SEM で表した(野生型, n = 10, リーラー, n = 8)。12:0, ラウリン酸; 14:0, ミリスチン酸; 16:0, パルミチン酸; 16:1, パルミトレイン酸; 18:0, ステアリン酸; 18:1 (n-9), オレイン酸; 18:1 (n-7), バクセン酸; 18:2 (n-6), リノール酸; 20:3 (n-9), ミード酸; 20:3 (n-6), ジホモ- γ -リノレン酸; 20:4 (n-6), アラキドン酸; 20:5 (n-3), エイコサペンタエン酸; 22:4 (n-6), ドコサテトラエン酸; 22:6 (n-3), ドコサヘキサエン酸。

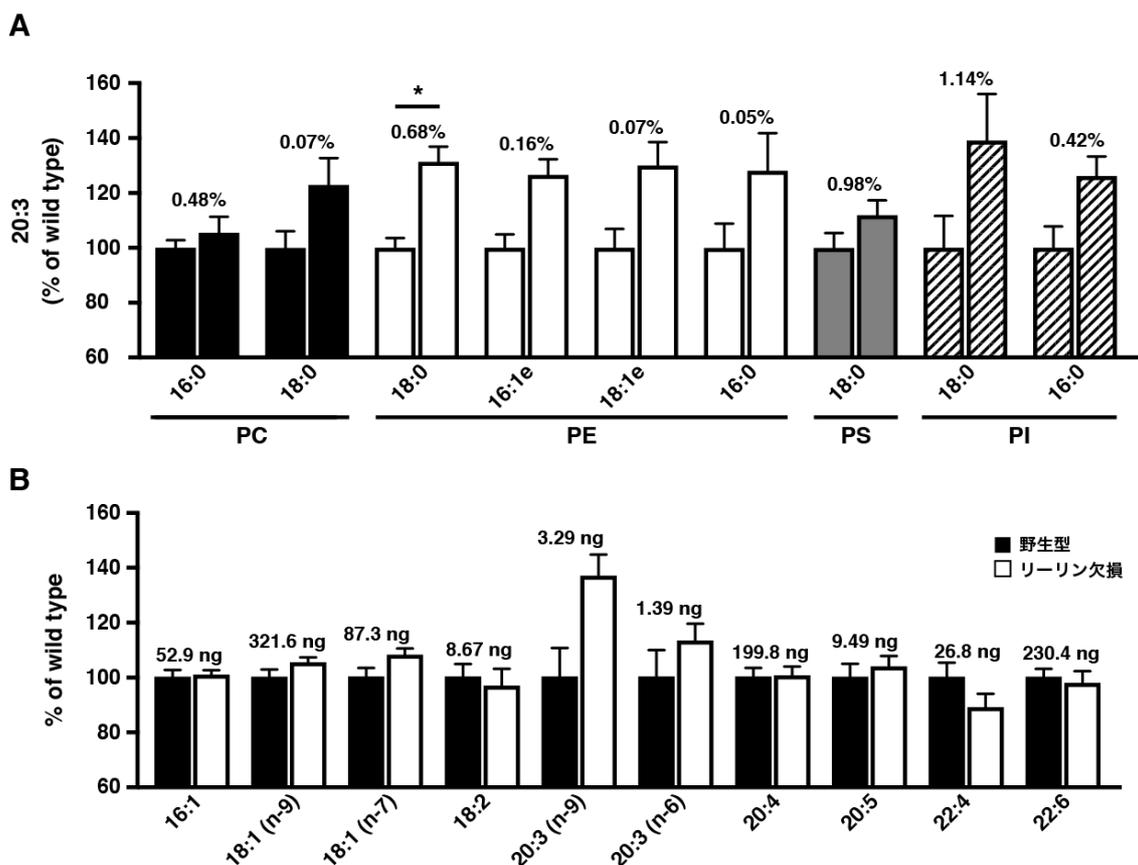


Fig. 7 リーラーマウス大脳皮質において、ミード酸の総量が増加する

(A) 野生型、およびリーラーマウス大脳皮質における 20:3 含有リン脂質量の各リン脂質クラスにおける割合。野生型マウスにおける各リン脂質の含有割合を 100 %として示した。各グラフの左側が野生型、右側がリーラーマウスを示す。グラフの上の数字は、野生型における各リン脂質の各リン脂質クラスにおける割合を示す。リーラーマウス大脳皮質において、どのリン脂質種も 20:3 含有割合は増加した。データは mean ± SEM で表した。Welch の t 検定で得た p 値を Benjamini, Krieger, and Yekutieli 法により FDR が 5% となるように補正して統計学的処理を行った。*p < 0.05。

(B) 野生型、およびリーラーマウス大脳皮質における不飽和脂肪酸量の割合。Bligh and Dyer 法により大脳皮質から抽出した総脂質に含まれる総脂肪酸を全て、加メタノール分解により遊離脂肪酸メチルに変換し、検出した。野生型マウスにおける各不飽和脂肪酸の含有量を 100 %として示した。各グラフの左側が野生型、右側がリーラーマウスを示す。グラフの上の数字は、野生型における不飽和脂肪酸量を示す。リーラーマウス大脳皮質ではミード酸の総量が 1.4 倍ほど増加した。一方、他の不飽和脂肪酸の含有量はほとんど変わらなかった。データは mean ± SEM で表した。

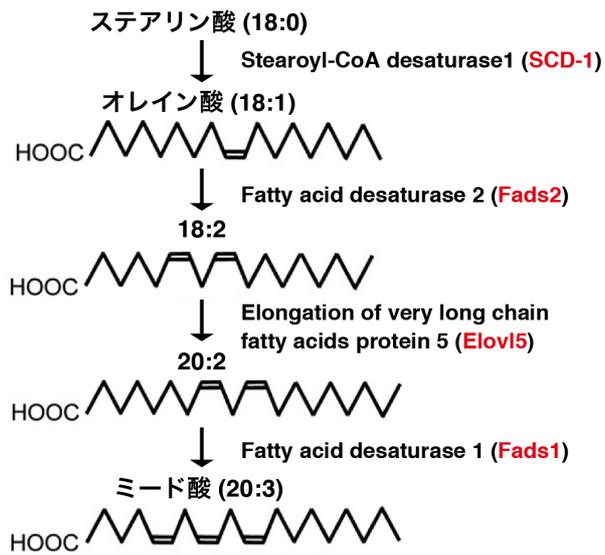


Fig. 8 ミード酸合成経路

ミード酸は SCD-1 による不飽和反応、Fads2 による不飽和反応、Elov15 による伸長反応、および Fads1 による不飽和反応によりステアリン酸から合成される。(Ichi et al., 2014 を改変)

総PC中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PC種の割合の平均 (%)		
脂肪酸種	野生型	リーラー
16:0/18:1	21.215 ± 1.255	20.431 ± 1.529
16:0/16:0	17.264 ± 0.740	16.391 ± 0.792
14:0/16:0	15.485 ± 0.339	15.184 ± 0.422
16:0/16:1 (*2)	13.855 ± 0.386	14.192 ± 0.190
18:0/18:1	5.595 ± 0.159	5.606 ± 0.083
16:0/18:0	3.432 ± 0.042	3.459 ± 0.054
18:1/18:1	2.667 ± 0.114	2.840 ± 0.164
16:1/18:1	2.362 ± 0.169	2.476 ± 0.227
14:0/16:1	1.735 ± 0.055	2.164 ± 0.154
16:0/16:2	1.492 ± 0.043	1.712 ± 0.101
18:1e/16:0	1.147 ± 0.043	1.261 ± 0.052
16:1/16:1	1.115 ± 0.111	1.166 ± 0.121
14:0/14:0	1.049 ± 0.063	1.326 ± 0.085
16:0/22:5	0.350 ± 0.024	0.362 ± 0.024
16:2/18:1	0.303 ± 0.012	0.328 ± 0.009
16:0/16:3	0.281 ± 0.015	0.264 ± 0.020
16:0/24:5	0.253 ± 0.011	0.242 ± 0.007
16:0/17:1	0.243 ± 0.009	0.237 ± 0.006
15:0/16:0	0.213 ± 0.015	0.198 ± 0.018
16:0/22:4	0.202 ± 0.020	0.178 ± 0.020
16:0/22:3	0.171 ± 0.005	0.196 ± 0.007
16:0/24:6	0.156 ± 0.005	0.154 ± 0.004
16:0e/16:0	0.162 ± 0.005	0.159 ± 0.016
18:1e/14:0	0.125 ± 0.002	0.143 ± 0.005
14:0/16:2	0.124 ± 0.006	0.151 ± 0.006
18:0/22:4	0.124 ± 0.005	0.115 ± 0.008
18:0/22:5	0.085 ± 0.002	0.084 ± 0.003
16:0/24:4	0.074 ± 0.001	0.078 ± 0.003
18:1/20:1	0.071 ± 0.002	0.078 ± 0.004
17:0/18:1	0.064 ± 0.004	0.063 ± 0.005
18:0e/16:0	0.061 ± 0.003	0.065 ± 0.003
合計	91.475 ± 3.666	91.304 ± 4.144

(次頁に続く)

(前頁の続き)

総PE中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PE種の割合の平均 (%)		
脂肪酸種	野生型	リーラー
16:0/18:1	4.966 ± 0.055	5.184 ± 0.109
18:0/18:1	3.489 ± 0.230	3.566 ± 0.218
18:2e/16:0	1.831 ± 0.101	1.965 ± 0.074
16:1e/22:4	1.812 ± 0.118	1.842 ± 0.099
18:0/22:4	1.582 ± 0.077	1.492 ± 0.081
16:0/22:4	0.998 ± 0.016	0.939 ± 0.020
18:0/22:5	0.971 ± 0.093	0.985 ± 0.095
18:1e/22:4	0.764 ± 0.075	0.771 ± 0.078
18:1/18:1	0.670 ± 0.031	0.748 ± 0.063
18:1e/16:0	0.581 ± 0.088	0.650 ± 0.097
18:0/24:5	0.527 ± 0.058	0.543 ± 0.066
16:1e/22:5	0.522 ± 0.013	0.525 ± 0.013
16:0/22:5	0.494 ± 0.047	0.486 ± 0.045
16:0/18:0	0.408 ± 0.018	0.436 ± 0.029
18:1e/22:5	0.400 ± 0.046	0.440 ± 0.050
16:1/18:1 (*2)	0.341 ± 0.009	0.367 ± 0.003
16:1e/16:0	0.340 ± 0.027	0.355 ± 0.026
16:0/16:1	0.298 ± 0.021	0.315 ± 0.029
18:1e/24:5	0.262 ± 0.029	0.278 ± 0.031
18:1e/18:1	0.222 ± 0.026	0.271 ± 0.030
16:0/16:0	0.217 ± 0.016	0.215 ± 0.015
16:1e/22:3	0.215 ± 0.021	0.287 ± 0.025
18:1e/24:4	0.213 ± 0.029	0.248 ± 0.039
16:1e/24:4	0.204 ± 0.021	0.249 ± 0.027
18:1/22:5	0.193 ± 0.024	0.204 ± 0.024
18:0/22:3	0.191 ± 0.016	0.244 ± 0.025
18:0e/22:4	0.186 ± 0.019	0.215 ± 0.029
18:1e/22:3	0.181 ± 0.022	0.250 ± 0.032
18:1/18:2 (*1)	0.133 ± 0.019	0.178 ± 0.043
18:2e/18:1	0.127 ± 0.005	0.151 ± 0.012
18:2e/14:0	0.123 ± 0.003	0.138 ± 0.005
18:1e/20:1	0.119 ± 0.007	0.157 ± 0.011

(次頁に続く)

(前頁の続き)

総PE中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PE種の割合の平均 (%)			
18:1e/24:6	0.115 ± 0.012	0.119 ± 0.011	
18:0/24:4	0.110 ± 0.011	0.122 ± 0.015	
18:0e/22:3	0.105 ± 0.004	0.152 ± 0.008	
18:2e/16:1 (*1)	0.103 ± 0.008	0.118 ± 0.021	
18:1/24:5	0.099 ± 0.005	0.106 ± 0.008	
18:0/24:6	0.096 ± 0.003	0.096 ± 0.004	
18:2e/24:5	0.091 ± 0.005	0.104 ± 0.008	
18:0e/24:4 (*2)	0.085 ± 0.006	0.114 ± 0.009	
18:1e/24:3 (*2)	0.081 ± 0.004	0.112 ± 0.008	
18:0e/16:0	0.077 ± 0.009	0.088 ± 0.010	
18:0e/20:1 (*2)	0.064 ± 0.003	0.079 ± 0.006	
14:0/16:0	0.059 ± 0.004	0.059 ± 0.003	
18:0e/24:5 (*2)	0.058 ± 0.002	0.070 ± 0.004	
18:0/20:1	0.057 ± 0.005	0.070 ± 0.008	
18:0/24:3 (*2)	0.054 ± 0.002	0.071 ± 0.005	
18:2e/24:4 (*2)	0.054 ± 0.001	0.063 ± 0.003	
16:1e/20:5 (*2)	0.041 ± 0.003	0.061 ± 0.021	
18:2e/24:6 (*2)	0.040 ± 0.004	0.051 ± 0.006	
合計	24.972 ± 1.470	26.348 ± 1.701	

総PS中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PS種の割合の平均 (%)			
脂肪酸種	野生型	リーラー	
16:0/18:1	4.957 ± 0.417	5.338 ± 0.362	
18:0/22:5	4.948 ± 0.207	5.135 ± 0.311	
18:0/22:4	4.913 ± 0.160	4.905 ± 0.154	
18:0/24:5	2.522 ± 0.302	2.538 ± 0.367	
18:0/24:6	0.702 ± 0.029	0.694 ± 0.021	
16:0/22:4 (*1)	0.556 ± 0.038	0.576 ± 0.052	
18:0/22:3	0.503 ± 0.055	0.625 ± 0.086	
16:0/16:1	0.476 ± 0.036	0.499 ± 0.028	

(次頁に続く)

(前頁の続き)

総PS中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PS種の割合の平均 (%)			
16:0/16:0 (*1)	0.458 ± 0.051	0.513 ± 0.081	
16:0/22:5 (*1)	0.380 ± 0.017	0.417 ± 0.040	
16:1/18:1	0.223 ± 0.027	0.257 ± 0.026	
合計	20.637 ± 1.338	21.497 ± 1.528	

総PI中におけるDHA、ARA、20:3以外の 各PI種の割合の平均 (%)		
脂肪酸種	野生型	リーラー
18:0/22:4 (*1)	0.143 ± 0.016	0.225 ± 0.046

Table 5 野生型およびリーラーマウス大脳皮質における DHA、ARA、およびミード酸以外を含有するリン脂質の解析

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質をクロロホルムとメタノールを用いて総脂質を抽出し、LC-MS/MSを用いてノンターゲット脂質解析を行った。そこで得られた測定値のうち、DHA、ARA、20:3以外を持つリン脂質種の量を総 PC、総 PE、総 PS、および総 PI あたりの割合で表した。データは mean ± SEM で表した (*1, 野生型: n=4, リーラー: n=3; *2, 野生型: n=5, リーラー: n=5, 無印, 野生型: n=9, リーラー: n=8: 実験回によっては同定できなかった脂質分子種も存在するため、n 数が変動している)。e はグリセロール骨格と脂肪酸がビニルエーテル結合している (プラズマローゲン型リン脂質) ことを表す。ミード酸やその代謝中間物の量の増加により、増加したと考えられる 20:1 と 22:3 を青文字で記した。

5-1-3. リーラーマウス大脳皮質では、ミード酸合成酵素の SCD-1 の遺伝子発現が上昇する

リーラーマウス大脳皮質の脂質解析を行ったことで、リーリンがリン脂質含有必須多価不飽和脂肪酸の含有量を適切に保つ可能性を見いだした。そこで、リーリンがどのように必須多価不飽和脂肪酸の量を保つのか明らかにすることを試みた。そのため、まずリーリンが必須多価不飽和脂肪酸の量を保つメカニズムとして、次の 2 つを考えた。仮説 1 は、リーリンの VLDLR および ApoER2 への結合と、それに続く Dab1 リン酸化によるリーリンシグナルが脂質代謝酵素や脂質トランスポーターの遺伝子発現量や活性を変化させるモデルである (Fig. 9A)。仮説 2 は、リーリンが脂質と複合体と形成するアポリポタンパク質として機能し、VLDLR および ApoER2 を介して細胞内に取り込まれることで必須多価不飽和脂肪酸含有リン脂質を細胞に供給するモデルである (Fig. 9B)。

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 法を用いて調べた。その結果、リーラーマウス大脳皮質において、ミード酸合成に関与する SCD-1 遺伝子の発現が上昇することを見いだした (Fig. 10)。SCD-1 はモノ不飽和脂肪酸合成における律速酵素であることが知られている (Ntambi et al., 2004)。リーラー大脳皮質で、SCD-1 遺伝子の発現量が上昇したため、モノ不飽和脂肪酸やその伸長反応物の合成が亢進し、モノ不飽和脂肪酸である 16:1、18:1、および 20:1 を持つリン脂質の割合が増加傾向を示したと考えられる (Fig. 6, Table 1, 2, and 5)。

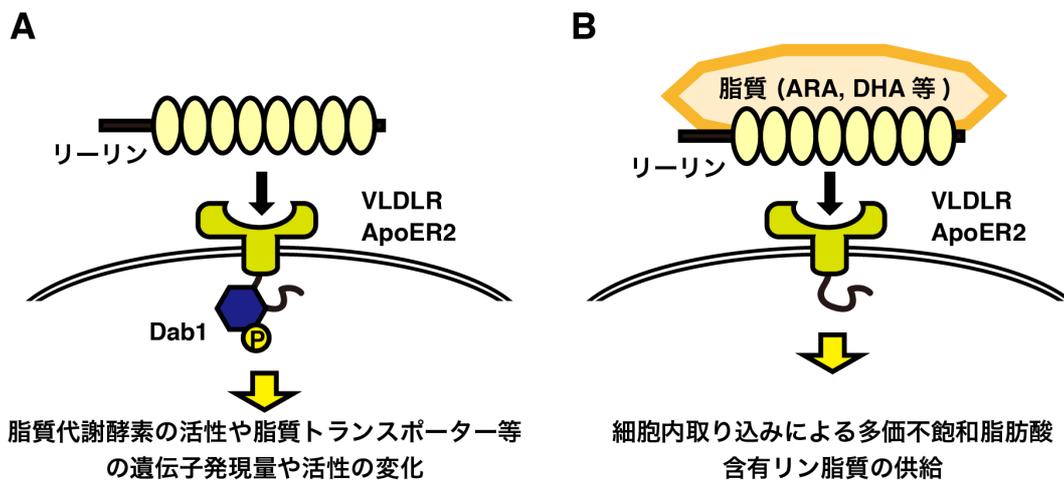


Fig. 9 リーリンが必須多価不飽和脂肪酸の含有量を適切に保つメカニズムの仮説

(A) リーリンの VLDLR および ApoER2 への結合と、それに続く Dab1 リン酸化によるリーリンシグナルが脂質代謝酵素や脂質トランスポーターの遺伝子発現量や活性を変化させるモデル (仮説 1)。

(B) リーリンが脂質と複合体と形成するアポリポタンパク質として機能し、VLDLR および ApoER2 を介して細胞内に取り込まれることで必須多価不飽和脂肪酸含有リン脂質を細胞に供給するモデル (仮説 2)。

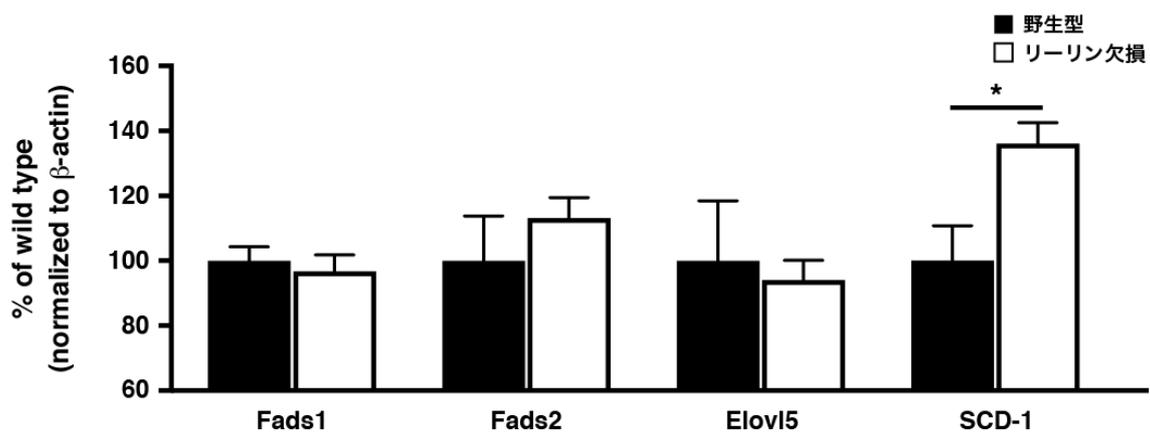


Fig. 10 リーラーマウス大脳皮質におけるミード酸合成酵素遺伝子の発現変化

野生型、およびリーラーマウス大脳皮質から得た cDNA を用いて、いくつかの脂質代謝酵素の遺伝子発現を定量的 PCR 法で調べた。リーラーマウス大脳皮質において、モノ不飽和脂肪酸合成の律速酵素である SCD-1 の遺伝子発現が上昇した。データは mean \pm SEM で表し、検定は Welch の t 検定で行った (野生型: n = 7, リーラー: n = 11)。*p < 0.05.

5-1-4. 脳のリーリンの一部は低密度であり、直径 10 nm 程度の複合体を形成する

仮説2を検討するため、脳のリーリンが脂質と複合体を形成しているか否かを検討した。E17.5 マウス大脳を界面活性剤不含の TNE buffer でホモジナイズ後、その可溶性画分のみをスクロース密度勾配超遠心法により分画した。その後、どのフラクションにリーリンが存在するかを WB 法により解析した。その結果、全長リーリンの多くは高密度画分（今回の結果では、 $d = 1.170$ 以上とする）に存在した (Fig. 11A)。この画分に存在するリーリンはおそらく脂質フリーな状態だと考えられる。一方、全長リーリンの一部は、アポリポタンパク質 E (ApoE)、Flotilin-1、および Caveolin-1 を多く含む低密度画分（今回の結果では、 $d = 1.085 \sim 1.106$ とする）にも存在した。この低密度画分に存在するリーリンは脂質と複合体を形成しているか否かを検討するため、抗リーリン抗体と 5 nm 金コロイド標識二次抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った (Fig. 11 B-E)。黒点のシグナルは金コロイド由来のシグナルであり、リーリンの局在を示す。白いシグナルは金コロイド以外のシグナルであり、タンパク質や脂質など、金コロイド以外の物質を示している。高密度画分の免疫染色像では、金コロイドのシグナルが、他の物質の上に無秩序に局在した。一方、低密度画分の免疫染色像では、興味深いことに、金コロイドのシグナルが巨大な構造物（100 nm 程度）ではなく、直径 10 nm 程度の構造物上に特異的に存在した (Fig. 11B and D)。従って、リーリンは直径 10 nm 程度の複合体を形成していることが示唆された。また、高密度リポタンパク質 (HDL) も直径が約 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 様粒子を形成していると推定される。

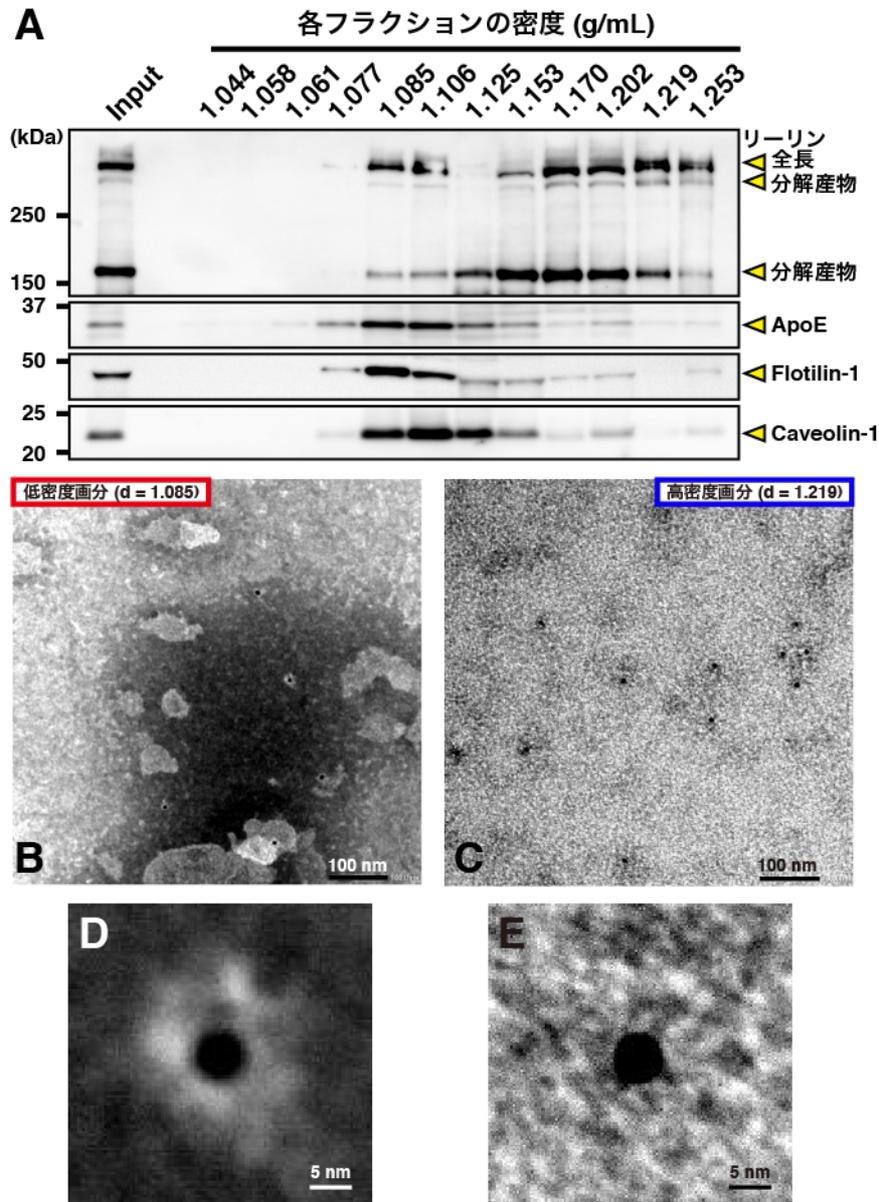


Fig. 11 低密度画分における脳のリーリンは複合体を形成する

(A) E17.5 マウス大脳のスクロース密度勾配超遠心法によるリーリンの分画結果。脳のリーリンの大部分は高密度画分に存在した。これらは脂質フリーな状態だと考えられる。一方、リーリンの一部は低密度画分に存在した。この画分に存在するリーリンは脂質と複合体を形成していると考えられる。

(B-E) 抗リーリン抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察。(A) の低密度画分 (d = 1.085, B) と高密度画分 (d = 1.219, C) をそれぞれ免疫電子顕微鏡法により観察した。黒点のシグナルは 5 nm の金コロイドのシグナルであり、リーリンの局在を示す。白のシグナルは金コロイド以外の物質を表す。(D) および (E) はそれぞれ低密度画分 (B) と高密度画分 (C) のリーリンのシグナルを拡大したものを示す。高密度画分では、金コロイドのシグナルは他の物質の上に無秩序に存在した (C and E)。一方、低密度画分では、金コロイドのシグナルが直径約 10 nm 程度の構造物上に特異的に存在した (B and D)。興味深いことに、金コロイドのシグ

ナルは巨大な構造物 (B, 中央を縦断するように並ぶ小島のようなものや右端の中央に存在するもの) とは共局在しなかった。

5-1-5. リコンビナントリーリンも脂質と複合体を形成できる

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。そこで、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検討した。リコンビナントリーリン単独をスクロース密度勾配超遠心法により分画し、WB法を行った結果、リコンビナントリーリンのほとんどは高密度画分に存在した (Fig. 12A)。しかし、リコンビナントリーリンとウシ胎児血清 (FBS) と混合し、スクロース密度勾配超遠心法により分画すると、リコンビナントリーリンの一部は低密度画分に移行することを見いだした (Fig. 12B)。この結果から、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。脳ライゼートの免疫電子顕微鏡観察の結果から (Fig. 11B-E)、リーリンは HDL 様粒子を形成すると考えているが、脳含有脂質と血清含有脂質の組成は大きく異なると考えられていることから (Mahley et al., 2016)、リーリンが結合する脂質の基質特異性はあまり高くない可能性が示唆される。

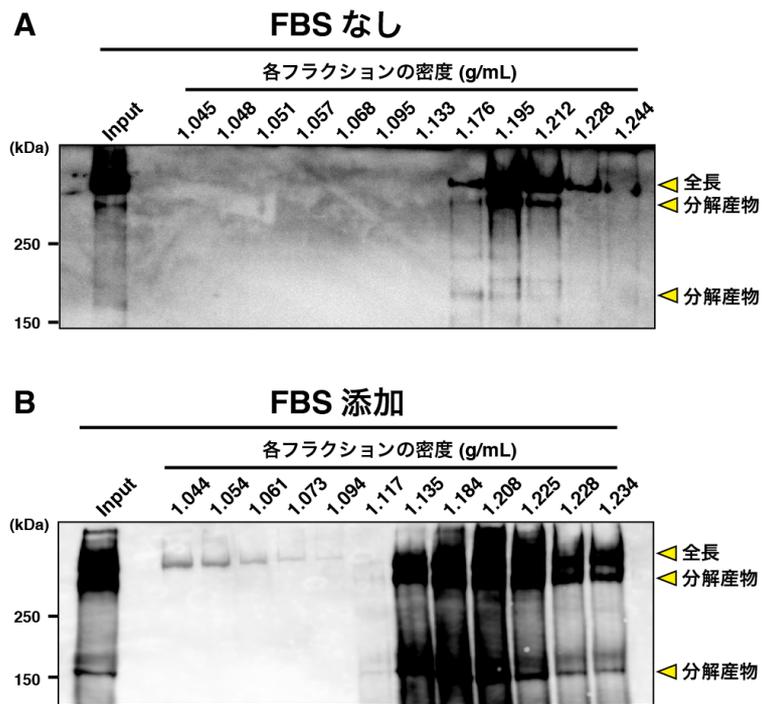


Fig. 12 リコンビナントリーリンは FBS 添加により低密度画分に移行する

(A-B) リコンビナントリーリンに FBS を添加していない状態 (A)、または添加した状態 (B) でスクロース密度勾配超遠心分離法を行った。その結果、FBS を添加するとリコンビナントリーリンの一部は低密度画分に移行した。

5-2. 考察

リーリンは VLDLR および ApoER2 と結合するが、リーリンが脂質組成制御に関与するかは全く報告されていなかった。本研究から、リーラーマウスの大脳皮質では DHA や ARA 含有リン脂質の量が減少傾向であること、ミード酸含有量が有意に増加することを見いだした。また、リーリンの一部は低密度画分に存在し、そこでは脂質と複合体を形成している可能性も見いだした。これらの知見はリーリンの新規機能の一端を提示し (Fig. 13)、リーリンの精神神経疾患へ寄与する分子メカニズム解明の手がかりになる可能性がある。

本研究で最も興味深い点は、リーラーマウス大脳皮質において、ミード酸の含有量が増加したことである (Table 3, 4, and Fig. 7)。ミード酸は必須多価不飽和脂肪酸脂肪酸の欠乏時に、その欠乏を補うために合成される (Fluco and Mead, 1958)。通常の生体内にはほとんど存在しない脂肪酸のため、ミード酸の量を比較すると、必須多価不飽和脂肪酸欠乏時は正常時より何倍も多くなる (Siguel et al., 1987; Duffin et al., 2000; Delaš et al., 2008)。しかし、今回得られた結果では、リーラーマウス大脳皮質全体におけるミード酸の増加率は 1.4 倍程度であり、DHA や ARA の大脳皮質中の含量はほとんど変わらない。この結果を説明する仮説の 1 つとして、リーラーマウス大脳皮質において、ごく一部の細胞のみが必須多価不飽和脂肪酸を欠乏することが考えられる。つまり、ごく一部の細胞しかミード酸合成に関わっていないという仮説である。この仮説が正しければ、(1) GC-MS 法による脂質分析で DHA や ARA の含有量に大きな差が生じなかったこと、(2) ミード酸の増加率が 1.4 倍程度であったことを説明できると考えられる。今後、この仮説を証明するためには、一部の細胞でのみ、本当に必須多価不飽和脂肪酸の欠乏とミード酸の生合成亢進が生じているかを検討する必要がある。今後、切片化した組織から脂肪酸を遊離させ、イオン化し、質量分析器でシグナルを受け取るとともに可視化する、質量イメージング法 (IMS) を用いることで、この問題が解決されることが期待される。また、リーリンの受容体である VLDLR と ApoER2 は、大脳皮質内における局在が異なることから (Uchida et al., 2009; Reddy et al., 2011)、受容体の分布もごく一部の細胞でのみミード酸の生合成が亢進することに寄与する可能性がある。そのため、今後、VLDLR や ApoER2 ノックアウトマウスを用いた脂質組成解析も望まれる。

大脳皮質には DHA が豊富に存在する (Weiser et al., 2016)。GC-MS の結果から、リーラーマウス大脳皮質中に含まれる DHA 含有量に大きな変化がないにも関わらず (Table 4 and Fig. 7B)、LC-MS/MS の結果ではリーラーマウスの大脳皮質で DHA 含有リン脂質の量が減少していた (Fig. 6A)。これを説明する可能性の 1 つとして、リーラーマウス大脳皮質では DHA 含有リン脂質を合成する酵素 (Hishikawa et al., 2014) の活性または発現が低下してい

ることが考えられる。最近、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ 3 (LPAAT3) が網膜の DHA 含有リン脂質の合成とその機能に重要であることが報告された (Shindou et al., 2017)。このファミリーに属し、かつ脳に発現が多いものとして、LPAAT4 がある。LPAAT4 はリゾホスファチジン酸に DHA を挿入し、DHA 含有ホスファチジン酸 (PA-DHA) を合成することが知られている (Eto et al., 2014)。この PA-DHA は DHA 含有リン脂質を合成する材料になる。リーラーマウス大脳皮質における LPAAT4 や他のリン脂質合成酵素の活性や発現を調べることで、リーリンの必須多価不飽和脂肪酸の量を適切に保つメカニズムの更なる理解につながることを期待される。

仮説 1 が脂質組成の制御に寄与するか、いくつかの脂質代謝酵素を調べたことにより、リーラーマウス大脳皮質では SCD-1 の遺伝子発現が上昇することを見いだした。しかし、先行研究には、必須多価不飽和脂肪酸が欠乏すると、それに伴い SCD-1 の遺伝子発現が上昇する報告もあった (Duplus et al., 2000)。そのため、本研究では、リーラーマウス大脳皮質における SCD-1 遺伝子の発現上昇は (i) 通常、SCD-1 の発現を制御しているリーリンシグナルの破綻により見られた、(ii) 必須多価不飽和脂肪酸の欠乏により、代償的に見られた、の 2 つの可能性が共に残った。仮説 1 を更に検討するためには、培養神経細胞を用いて、リーリン以外の環境は等しい条件下で実験を進めていく必要がある。また、SCD-1 のアイソフォームとして SCD-2 が存在する。脳において、SCD-2 mRNA は SCD-1 mRNA よりも高発現している (Zhang et al., 2005)。そのため、今後はミード酸の生合成亢進における、SCD-2 の寄与の検討も必要だと考えられる。

先行研究から、アルツハイマー病患者の死後脳解析により、アルツハイマー病患者のミード酸含有量が mid-frontal cortex で約 1.8 倍、temporal cortex と海馬で約 1.5 倍増加していたこと、海馬における SCD-1 遺伝子の発現が約 2 倍に上昇していたことが報告されている (Astarita et al., 2011; Iuliano et al., 2013)。今回の結果 (リーラーマウス大脳皮質における SCD-1 遺伝子発現量、およびミード酸の量が約 1.4 倍増加) は先行研究ほどの増加は見られなかったが、(I) 用いた時期が胎生であること、(II) 組織部位の違いを考慮すると似た結果が得られたと考えられる。そのため、この結果はリーリンの機能低下がアルツハイマー病の発症・増悪化に関わるメカニズムの一端にミード酸を含む脂質組成制御が関与する可能性を支持すると考えられる。今回、胎生マウスから得られる海馬は微量であるため LC-MS/MS や GC-MS を用いた解析を行えなかった。海馬もリーリンが豊富に発現する部位であるため、今後、複数匹分の海馬をまとめて解析するなどの工夫を行い、海馬におけるリーリンのミード酸に対する影響も見ると必要があると思われる。また、アルツハイマー病モデルマウスでも SCD-1 遺伝子の発現が上昇しており、過剰に合成されたオレイン酸が神経新生を抑制しているとの報告もある (Hamilton et al., 2015)。今後、リーラーマウスの大脳

皮質と海馬のオレイン酸に着目した IMS を行うことも、リーリン機能低下によるアルツハイマー病の発症・増悪化へ寄与するメカニズムに関する新たな発見につながると期待される。

本研究では、脳ライゼートの超遠心分離により、リーリンの一部が低密度画分に存在することを見いだした (Fig. 11)。また、リコンビナントリーリンに FBS を添加することで、その一部は低密度画分に移行することも見いだした (Fig. 12)。結合すると低密度画分へ移行することから、私は、リーリンが複合体を形成する結合分子は脂質（またはリポタンパク質）だと考えている。しかし、その証明までは至っていない。将来的に、低密度画分に存在する脳のリーリンを精製し、LC-MS/MS 法や GC-MS 法を行うことで、リーリンの形成する複合体が脂質であることを証明する必要がある。また、仮説 2 が正しいか否かを検証するため、低密度画分から精製したリーリンを、脂質を除いて培養したリーラーマウス由来神経細胞に添加することで取り込ませ、その神経細胞の脂質組成を解析することも必要である。リーリンは 3 カ所で切断を受けることが知られている (Lambert de Rouvroit et al., 1999; Jossin et al., 2004; Kohno et al., 2015)。今回の結果では、低密度画分に存在したリーリンの大部分が全長リーリンであったことから (Fig. 11A and Fig. 12)、脂質との効率的な結合には全長リーリンが必要である可能性がある。この可能性を詳細に調べるためには、FBS 添加時に、様々なリーリンリピート数を持つリーリン変異体のうち、どれが低密度画分により移行しやすいか検討する必要がある。また、リコンビナントリーリンの多くは高密度画分に存在し (Fig. 12A)、これらがリーリン受容体である VLDLR および ApoER2 に結合することは既知である (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999)。しかし、低密度画分に存在する全長リーリンも VLDLR および ApoER2 に結合できるか、および、結合できた場合に従来と同様、または違う機能を果たすか否かも不明である。この疑問点を解明するために、VLDLR または ApoER2 発現細胞に低密度画分のリーリンを添加する実験、および、リーラーマウス由来培養神経細胞を用いた実験を行う必要がある。加えて、FBS を添加するとリコンビナントリーリンが低密度画分に移行した (Fig. 12B)。この結果は、リーリンは HDL だけでなく、VLDL などを形成し得ることを示唆する。リーリンは脳以外に、肝臓や血中にも存在するが (Smalheiser et al., 2000)、その機能は不明である。今回の結果から、リーリンの脂質運搬は末梢に存在するリーリンの機能でもある可能性がある。

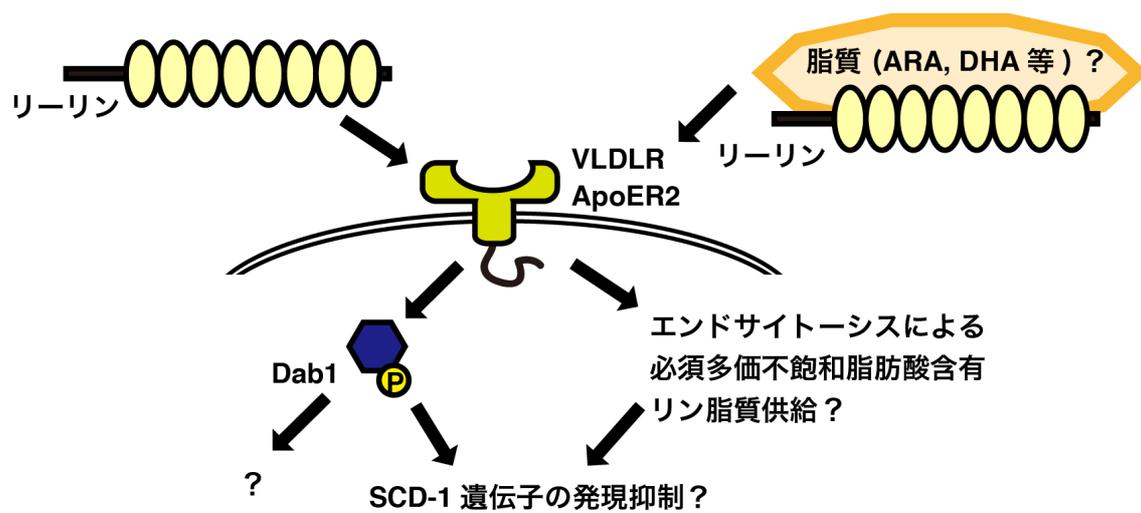


Fig. 13 リーリンの脂質組成制御へ関与するモデル

第六章

総括

本研究では、コードされるタンパク質の一次構造が興味深く、機能未知であった精神疾患関連遺伝子 CSMD3 の神経細胞における機能の解明を目指した。また、脳の機能発現や、精神神経疾患の発症と増悪化に関わる分泌タンパク質リーリンの脂質組成制御機構の解明を目指した。そして、私は以下の知見を得た。

1-1) CSMD3 は N 末端側を細胞外に、C 末端を細胞内に持つ膜タンパク質であることを見いだした。また、CSMD3 は自分自身とホモマルチマーを形成できることも明らかにした。

1-2) 生後のマウス大脳において、CSMD3 は大脳皮質と海馬に発現していることを見いだした。特に生後 14 日以降では、海馬の apical dendrites に発現することも明らかにした。培養海馬神経細胞において、CSMD3 mRNA は 7 DIV 以降に発現することも明らかにした。

1-3) CSMD3 は神経細胞の樹状突起の分岐形成を促進すること、そしてこの機能には CSMD3 の細胞外領域が必要であることを見いだした。樹状突起の分岐形成促進に細胞内領域が必要ではなかったこと、生後 14 日以降の apical dendrites に発現することから、CSMD3 は未知の結合分子の共受容体として機能し、樹状突起やシナプス形成を担うことが示唆される。

2-1) リーリン欠損マウス大脳皮質では、DHA や ARA 含有リン脂質の量が減少傾向であり、ミード酸の含有量が増加していることを見いだした。これは、リーリン欠損により必須多価不飽和脂肪酸の欠乏が生じている、つまり、リーリンは必須多価不飽和脂肪酸の適切な量を保つために必要であることが示唆される。

2-2) リーリンは脂質と複合体を形成することができることを明らかにした。脳に存在するリポタンパク質は主に HDL 様粒子であることから、リーリンも HDL 様の複合体を形成し、神経細胞に脂質を供給することを示唆する。

本研究により、CSMD3 の機能低下が樹状突起の形成やそれに伴うシナプス形成を異常にすることで精神疾患の発症に関与することが示唆された。また、リーリンの機能低下による精神神経疾患の発症・増悪化には、必須多価不飽和脂肪酸の含有量低下も寄与する可能性が示唆された。これらの知見はいずれも精神神経疾患の発症・増悪化の分子メカニズムの一端を解明することに貢献したと考えられる。

今後、CSMD3 の結合分子や in vivo における重要性、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、精神神経疾患の発症・増

悪化のメカニズムがより詳細に理解されることが期待される。

引用文献

- Akbarian, S., Kim, J.J., Potkin, S.G., Hetrick, W.P., Bunney, W.E., Jones, E.G. (1996) Maldistribution of Interstitial Neurons in Prefrontal White Matter of the Brains of Schizophrenic Patients. *Arch Gen Psychiat*, **53**, 425-436.
- Astarita, G., Jung, K., Vasilevko, V., DiPatrizio, N.V., Martin, S.K., Cribbs, D.H., Head, E., Cotman, C.W., Piomelli, D. (2011) Elevated stearyl-CoA desaturase in brains of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One*, **6**, e24777
- Beffert, U., Weeber, E.J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J.D., Li, W., Adelman, G., Frotscher, M., Hammer, R.E., Herz, J. (2005) Modulation of Synaptic Plasticity and Memory by Reelin Involves Differential Splicing of the Lipoprotein Receptor Apoer2. *Neuron*, **47**, 567-579
- Bock, H.H., Herz, J. (2003) Reelin Activates Src Family Tyrosine Kinases in Neurons. *Curr Biol*, **13**, 18-26
- Botella-López, A., Burgaya, F., Gavín, R., García-Ayllón, M.S., Gómez-Tortosa, E., Peña-Casanova, J., Ureña, J.M., Río, J.A.D., Blesa, R., Soriano, E., Sáez-Valero, J. (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc National Acad Sci*, **103**, 5573-5578
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H., Jun, S.B., Lovinger, D., Kim, H. (2009) Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem*, **111**, 510-21
- Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K.Y., Xue, X.J., Zheng, W., Ding, Y.Q., Yuan, X.B. (2008) Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat. Neurosci*, **11**, 36-44.
- Chin, J., Massaro, C.M., Palop, J.J., Thwin, M.T., Yu, G., Bien-Ly, N., Bender, A., Mucke, L. (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **27**, 2727-2733.
- Cunnane, S., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., Barberger-Gateau, P. (2009) Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Prog Lipid Res*, **48**, 239-256
- Cunnane, S.C., Schneider, J.A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D.A., Morris, M.C. (2012) Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **29**, 691-697

- Curran, S., Ahn, J.W., Grayton, H., Collier, D.A., Ogilvie, C.M. (2013) NRXN1 deletions identified by array comparative genome hybridisation in a clinical case series –further understanding of the relevance of NRXN1 to neurodevelopmental dis-orders. *J. Mol. Psychiatry*, **1**, 4.
- D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., Curran, T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, **374**, 719–723
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., Curran, T. (1999) Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron*, **24**, 471-479.
- Delaš, I., Popović, M., Petrović, T., Delaš, F., Ivanković, D. (2008) Changes in the Fatty Acid Composition of Brain and Liver Phospholipids from Rats Fed Fat-Free Diet. *Food Technol. Biotechnol.*, **46**, 278–285
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci*, **8**, 1454–1468.
- Duffin, K., Obukowicz, M., Raz, A., Shieh, J. (2000) Electrospray/tandem mass spectrometry for quantitative analysis of lipid remodeling in essential fatty acid deficient mice. *Anal Biochem*, **279**, 179-188
- Duplus, E., Glorian, M., Forest, C. (2000) Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*, **275**, 30749-30752
- Eastwood, S.L., Harrison, P.J. (2006) Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, **163**, 540-542.
- Eto, M., Shindou, H., Shimizu, T. (2014) A novel lysophosphatidic acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with a possible role for incorporating docosahexaenoic acid into brain glycerophospholipids. *Biochem Biophys Res Commun*, **443**, 718-724
- Farquharson, J., Jamieson, E.C., Abbasi, K.A., Patrick, W.J., Logan, R.W., Cockburn, F. (1995) Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch Dis Child*, **72**, 198-203
- Fatemi, S.H., Kroll, J.L., Stary, J.M. (2001) Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport*, **12**, 3209-3215.
- Fatemi, S.H., Stary, J.M., Egan, E.A. (2002) Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cell Mol Neurobiol*, **22**, 139-152.

- Flanagan, J.G., Cheng, H.J., Feldheim, D.A., Hattori, M., Lu, Q., Vanderhaeghen, P. (2000) Alkaline phosphatase fusions of ligands or receptors as in situ probes for staining of cells, tissues, and embryos. *Methods Enzymol*, **327**, 19-35
- Floris, C., Rattu, S., Boccone, L., Gasperini, D., Cao, A., Crisponi, L. (2008) Two patients with balanced translocations and autistic disorder: CSMD3 as a candidate gene for autism found in their common 8q23 breakpoint area. *Eur. J. Hum. Genet*, **16**, 696–704
- Fulco, A.J., Mead J.F. (1958) Metabolism of essential fatty acids. VIII. Origin of 5,8,11-eicosatrienoic acid in the fat-deficient rat. *J Biol Chem*, **234**, 1411-1416
- Gaboriaud, C., Gregory-Pauron, L., Teillet, F., Thielens, N.M., Bally, I., Arlaud, G.J. (2011) Structure and properties of the Ca²⁺-binding CUB domain, a widespread ligand-recognition unit involved in major biological functions. *Biochem. J*, **439**, 185–193
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F.A., Verrier, D., Manzoni, O.J., Chavis, P. (2007) NMDA Receptor Surface Trafficking and Synaptic Subunit Composition Are Developmentally Regulated by the Extracellular Matrix Protein Reelin. *J Neurosci*, **27**, 10165-10175.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J.M., Gerevini, V.D., Dwivedi, Y., Grayson, D.R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzunov, D., Costa, E. (2000) Decrease in Reelin and Glutamic Acid Decarboxylase 67 (GAD 67) Expression in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Arch Gen Psychiatry*, **57**, 1061–1069.
- Gunnarsen, J.M., Kim, M.H., Fuller, S.J., De Silva, M., Britto, J.M., Hammond, V.E., Davies, P.J., Petrou, S., Faber, E.S., Sah, P., Tan, S.S. (2007) Sez-6 proteins affect dendritic arborization patterns and excitability of cortical pyramidal neurons. *Neuron*, **56**, 621–639.
- Hamazaki, K., Hamazaki, T., Inadera, H. (2013) Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Res*, **210**, 346-350
- Hamilton, L., Dufresne, M., Joppé, S., Petryszyn, S., Aumont, A., Calon, F., Barnabé-Heider, F., Furtos, A., Parent, M., Chaurand, P., Fernandes, K. (2015) Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*, **17**, 397-411
- Harrison, P.J., Eastwood, S.L. (2001) Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus*, **11**, 508–519.

- He, Z., Tessier-Lavigne, M. (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*, **90**, 739–751.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., Herz, J. (1999) Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron*, **24**, 481-489.
- Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., Shindou, H. (2014) Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res*, **55**, 799-807
- Holman, R.T., Smythe, L., Johnson, S. (1979) Effect of sex and age on fatty acid composition of human serum lipids. *Am J Clin Nutr*, **32**, 2390-2399
- Holtzman, D.M., Herz, J., Bu, G. (2012) Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspectives Medicine*, **2**, a006312
- Howell, B.W., Herrick, T.M., Cooper, J.A. (1999) Reelin-induced tyrosine phosphorylation of Disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev*, **13**, 643–648
- Ichi, I., Kono, N., Arita, Y., Haga, S., Arisawa, K., Yamano, M., Nagase, M., Fujiwara, Y., Arai, H. (2014) Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta*, **1841**, 204-213
- Impagnatiello, F., Guidotti, A.R., Pesold, C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M.G., Uzynov, D.P., Smalheiser, N.R., Davis, J.M., Pandey, G.N., Pappas, G.D., Tueting, P., Sharma, R.P., Costa, E. (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15718–23.
- Iuliano, L., Pacelli, A., Ciacciarelli, M., Zerbinati, C., Fagioli, S., Piras, F., Orfei, M.D., Bossù, P., Pazzelli, F., Serviddio, G., Caltagirone, C., Spalletta, G. (2013) Plasma fatty acid lipidomics in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **36**, 545-553
- Joffre, C., Nadjar, A., Lebbadi, M., Calon, F., Laye, S. (2014) n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **91**, 1-20
- Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M. (2004) The Central Fragment of Reelin, Generated by Proteolytic Processing In Vivo, Is Critical to Its Function during Cortical Plate Development. *J Neurosci*, **24**, 514–521.

- Takegawa, W., Mitakidis, N., Miura, E., Abe, M., Matsuda, K., Takeo, Y.H., Kohda, K., Motohashi, J., Takahashi, A., Nagao, S., Muramatsu, S., Watanabe, M., Sakimura, K., Aricescu, A.R., Yuzaki, M. (2015) Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*, **85**, 316–329.
- Kim, H.Y., Moon, H.S., Cao, D., Lee, J., Kevala, K., Jun, S.B., Lovinger, D.M., Akbar, M., Huang, B.X. (2011) N-Docosahexaenoyl ethanolamide promotes development of hippocampal neurons. *Biochem J*, **435**, 327-336
- Kohno, T., Honda, T., Kubo, K., Nakano, Y., Tsuchiya, A., Murakami, T., Banno, H., Nakajima, K., Hattori, M. (2015) Importance of reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. *J Neurosci*, **35**, 4776–4787.
- Kulkarni, V.A., Firestein, B.L. (2012) The dendritic tree and brain disorders. *Mol. Cell. Neurosci*, **50**, 10–20.
- Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., Goffinet, A.M. (1999) Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp Neurol*, **156**, 214–217.
- Lau, W.L., Scholnick, S.B. (2003) Identification of two new members of the CSMD gene family. *Genomics*, **82**, 412-415
- Magri, C., Sacchetti, E., Traversa, M., Valsecchi, P., Gardella, R., Bonvicini, C., Minelli, A., Gennarelli, M., Barlati, S. (2010) New copy number variations in schizophrenia. *PLoS ONE*, **5**, e13422.
- Mahley, R.W. (2016) Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **36**, 1305-1315
- Malhotra, D., McCarthy, S., Michaelson, J.J., Vacic, V., Burdick, K.E., Yoon, S., Cichon, S., Corvin, A., Gary, S., Gershon, E.S., Gill, M., Karayiorgou, M., Kelsoe, J.R., Kras-toshevsky, O., Krause, V., Leibenluft, E., Levy, D.L., Makarov, V., Bhandari, A., Malhotra, A.K., McMahon, F.J., Nothen, M.M., Potash, J.B., Rietschel, M., Schulze, T.G., Sebat, J. (2011) High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron*, **72**, 951–963.
- McNamara, R.K., Hahn, C., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Stanford, K.E., Richtand, N.M. (2007a) Selective Deficits in the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid in the Postmortem Orbitofrontal Cortex of Patients with Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry*, **62**, 17-24

- McNamara, R.K., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Hahn, C., Richtand, N.M., Stanford, K.E. (2007b) Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: Gender differences and partial normalization with antipsychotic medications. *Schizophr Res*, **91**, 37-50
- McNamara, R.K., Jandacek, R., Rider, T., Tso, P., Stanford, K.E., Hahn, C., Richtand, N.M. (2008) Deficits in docosahexaenoic acid and associated elevations in the metabolism of arachidonic acid and saturated fatty acids in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Psychiatry Res*, **160**, 285-299
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H., Unser, M. (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*, **58**, 167-176
- Mita, T., Mayanagi, T., Ichijo, H., Fukumoto, K., Otsuka, K., Sakai, A., Sobue, K. (2016) Docosahexaenoic Acid Promotes Axon Outgrowth by Translational Regulation of Tau and Collapsin Response Mediator Protein 2 Expression. *J Biol Chem*, **291**, 4955-4965
- Moyer, C.E., Shelton, M.A., Sweet, R.A. (2015) Dendritic spine alterations inschizophrenia. *Neurosci. Lett*, **601**, 46-53.
- Müller, C.P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., Kornhuber, J. (2015) Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim Biophys Acta*, **1851**, 1052-1065
- Nakayama, M., Hama, C. (2011) Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neurosci. Res*, **69**, 87-92
- Ng, D., Pitcher, G.M., Szilard, R.K., Sertie, A., Kanisek, M., Clapcote, S.J., Lipina, T., Kalia, L.V., Joo, D., McKerlie, C., Cortez, M., Roder, J.C., Salter, M.W., McInnes, R.R. (2009) Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *PLoS Biol*, **7**, e41.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., D'Arcangelo, G. (2004) Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron*, **41**, 71-84
- Niu, S., Yabut, O., D'Arcangelo, G., (2008) The Reelin Signaling Pathway Promotes Dendritic Spine Development in Hippocampal Neurons. *J Neurosci*, **28**, 10339-10348

- Ntambi, J.M., Miyazaki, M. (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res.* **43**, 91-104
- Oeschger, F.M., Wang, W.Z., Lee, S., Garcia-Moreno, F., Goffinet, A.M., Arbones, M.L., Rakic, S., Molnar, Z. (2012) Gene expression analysis of the embryonic subplate. *Cereb. Cortex*, **22**, 1343–1359.
- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.E., Woolfrey, K.M. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci*, **14**, 285–293.
- Phillips, M., Pozzo-Miller, L. (2015) Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neurosci. Lett*, **601**, 30–40.
- Reddy, S.S., Connor, T.E., Weeber, E.J., Rebeck, W. (2011) Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. *Mol Neurodegener.* **6**, 30
- Reiner, O., Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Kaibuchi, K. (2016) Regulation of neuronal migration, an emerging topic in autism spectrum disorders. *J. Neurochem*, **136**, 440–456
- Sáez-Valero, J., Costell, M., Sjögren, M., Andreasen, N., Blennow, K., Luque, J.M. (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, **72**, 132-136.
- Shimizu, A., Asakawa, S., Sasaki, T., Yamazaki, S., Yamagata, H., Kudoh, J., Minoshima, S., Kondo, I., Shimizu, N. (2003) A novel giant gene CSMD3 encoding a protein with CUB and Sushi multiple domains: a candidate gene for benign adult familial myoclonic epilepsy on human chromosome 8q23.3–q24.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **309**, 143–154.
- Shindou, H., Koso, H., Sasaki, J., Nakanishi, H., Sagara, H., Nakagawa, K.M., Takahashi, Y., Hishikawa, D., Iizuka-Hishikawa, Y., Tokumasu, F., Noguchi, H., Watanabe, S., Sasaki, T., Shimizu, T. (2017) Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem*, **292**, 12054-12064
- Sia, G.M., Clem, R.L., Haganir, R.L. (2013) The human language-associated gene SRPX2 regulates synapse formation and vocalization in mice. *Science*, **342**, 987–991.
- Siguel, E.N., Chee, K.M., Gong, J.X., Schaefer, E.J. (1987) Criteria for essential fatty acid deficiency in plasma as assessed by capillary column gas-liquid chromatography. *Clin Chem*, **33**, 1869-1873.
- Smalheiser, N.R., Costa, E., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Auta, J., Lacor, P., Kriho, V., Pappas, G.D. (2000) Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1281-1286

- Souri, M., Kaetsu, H., Ichinose, A. (2008) Sushi domains in the B subunit of factor XIII responsible for oligomer assembly. *Biochemistry*, **47**, 8656–8664.
- Tiao, J.Y., Bradaia, A., Biermann, B., Kaupmann, K., Metz, M., Haller, C., Rolink, A.G., Pless, E., Barlow, P.N., Gassmann, M., Bettler, B. (2008) The Sushi domains of secreted GABA(B1) isoforms selectively impair GABA(B) heteroreceptor function. *J. Biol. Chem*, **283**, 31005–31011.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Herz, J. (1999) Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell*, **97**, 689-701
- Uchida, T., Baba, A., Pérez-Martínez, F.J., Hibi, T., Miyata, T., Luque, J.M., Nakajima, K., Hattori, M. (2009) Downregulation of functional Reelin receptors in projection neurons implies that primary Reelin action occurs at early/premigratory stages. *J. Neurosci*, **29**, 10653-10662
- Walker, B.L. (1966) Chromatographic evidence for the occurrence of oleic acid metabolites in erythrocytes from essential fatty acid-deficient rats. *Arch Biochem Biophys*, **114**, 465-471
- Weiser, M.J., Butt, C.M., Mohajeri, M.H. (2016) Docosahexaenoic Acid and Cognition throughout the Lifespan. *Nutrients*, **8**, 99
- Zhang, S., Yang, Y., Shi, Y. (2005) Characterization of human SCD2, an oligomeric desaturase with improved stability and enzyme activity by cross-linking in intact cells. *Biochem. J*, **388**, 135-142

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日々厳しくも、温かく丁寧な御指導と御鞭撻を賜り、研究者の在るべき姿を示していただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科、服部光治教授に心より深謝致します。

本論文の作成にあたり、多大な御指導と有益なる御助言を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科、星野真一教授、糸和彦教授、ならびに田中正彦准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験の基礎を一から厳しくも優しく、熱心に御指導して頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科、河野孝夫講師に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、的確な御助言とご協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科、築地仁美講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、LC-MS/MS によるノンターゲット脂質解析で多大なる御尽力を賜りました慶應義塾大学薬学部薬学研究科、有田誠教授、ならびに理化学研究所統合生命医科学研究センター、池田和貴副チームリーダー、妹尾勇弥テクニカルスタッフに心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、GC-MS による脂質分析で御指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科、新井洋由教授、河野望准教授、ならびに嶋中雄太助教に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、電子顕微鏡による観察で御尽力を賜りました名古屋市立大学大学院医学研究科、高瀬広嗣研究員に深く感謝申し上げます。

Venus-pCS2 ベクター、HEK293T 細胞、および COS7 細胞を恵与していただきました理化学研究所脳科学総合研究センター、御子柴克彦チームリーダーに厚く御礼申し上げます。

pCAGGS ベクターを恵与していただきました慶應義塾大学医学部、仲嶋一範教授に深く感謝致します。

PA-リーリンPD/DK発現プラスミドを恵与していただきました大阪大学タンパク質研究所、高木淳一教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験および解析に御尽力いただきました名古屋市立大学大学院医学研究科、周春雨学士に心より深謝致します。

7年間の研究生生活を共に過ごし、苦楽を分かち合いました名古屋市立大学大学院薬学研究科、病態生化学分野の皆様心より御礼申し上げます。

本研究をご支援くださいました、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に感謝致します。

最後に、いつも研究生生活を支え、応援してくださいました母親に心より感謝申し上げます。