

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目   ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2/STX が関わる精神疾患  
                  発症機構の解析  
氏名       羽根 正弥

## 論文内容の要旨

脊椎動物において、シアル酸が 8~400 残基縮重合した酸性多糖であるポリシアル酸 (polySia) は、主に神経細胞接着分子 (NCAM) を修飾する。これまで自身のもつ物理化学的性質によって、細胞-細胞間の接着を阻害する反接着機能を持ち、細胞移動や神経突起の伸長、軸索ガイダンス、シナプス可塑性等に関与して、正常な神経回路の形成や脳機能を調節することが考えられてきた。しかし近年、polySia が反接着分子として機能するだけでなく、脳機能に深く関わる生理活性因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF)、カテコールアミン系神経伝達物質 (ドーパミン、ノルエピネフリン、エピネフリン)、および塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) と直接結合して、それらと受容体との結合を調節するリザーバーとして機能すること、また、それらを細胞外プロテアーゼから保護する機能をもつことが明らかにされ、polySia の神経機能制御メカニズムに新しい概念が導入された。polySia 修飾された NCAM (polySia-NCAM) は、胎児脳では一過的に、成体脳では神経の再構築が行われている部位にのみ限局して発現しており、その polySia 鎖はポリシアル酸転移酵素 (polyST) によって生合成される。これまでに polyST および NCAM の欠損マウスの研究がなされ、polyST の一つである ST8SIA2 (または STX) 欠損マウスが統合失調症の表現型を示すことが明らかにされている。また近年、精神疾患患者の死後脳の polySia の発現解析や polyST 遺伝子のゲノムワイドな解析から、polySia と重篤な精神疾患である統合失調症 (SZ)、自閉症 (ASD)、双極性障害 (BD) との関連性も報告されている。これらの精神疾患は、遺伝的要因と環境的要因が複雑に絡み合って発症すると言われているが、その発症機構は未だに明らかにされていない。とりわけ polySia の存在がどのように高次脳機能に繋がるのか、精神疾患の発症にどのように関わるのかなどその分子レベルの解析は行われていない。そこで本研究では、ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2/STX (以下、ST8SIA2) の一塩基多型 (SNP) に着目し、精神疾患との関連性が報告されている SNP がもたら

す影響を、ST8SIA2 の遺伝子発現レベル、酵素発現および活性変化レベル、酵素反応産物である polySia の構造と機能レベルで解析することによって、精神疾患の発症機構の一端を明らかにすることを目的としている。

まず、ヒト ST8SIA2 が生合成する polySia の構造と神経機能の関係性を解析した(第 2 章)。第 1 に、SZ 患者に見出されたアミノ酸置換を伴う ST8SIA2 変異体である ST8SIA2(G421A)について解析した。この変異体酵素はアミノ酸変異 E141K をもつ coding SNP (cSNP)変異体であり、以下の特徴が明らかになった。まず、この酵素遺伝子を CHO 細胞に発現させて細胞レベルで酵素活性を測定すると顕著に低い活性を示すこと、また、この酵素が生合成する polySia-NCAM の構造を免疫化学的および化学的に詳細に解析すると、正常の酵素に比べて、polySia の量および長さ(重合度)がともに減少することである。そしてこれらの polySia-NCAM と生理活性因子との結合を表面プラズモン共鳴法によって解析すると、BDNF に対して、解離定数は上昇し、結合量は 70 % に低下すること、FGF2 に対しては、解離定数に差は見られず、結合量が 75 % に低下することである。つまり、ST8SIA2 の cSNP は、酵素活性の低下による polySia 構造の不全をもたらし、その結果 polySia のリザーバー機能が損なわれることが判明した(第 1 節)。第 2 に、SZ 患者で報告されたアミノ酸置換を伴わない silent SNP (sSNP) 変異体 ST8SIA2(C621G) の解析を行った。その結果、この変異体酵素の細胞レベルの活性は低下することが判明し、アミノ酸変異を伴わなくてもコドン使用頻度に変化する変異は活性変化をもたらす可能性が示された(第 2 節)。第 3 に、ASD および BD 患者に見出された ST8SIA2 のイントロン領域に存在する intronic SNP (iSNP) 変異体 rs3784730(ASD)と rs2168351 (intron4BD)の解析を行った。細胞レベルでの解析結果から、BD 患者由来 rs2168351 については、ST8SIA2 の遺伝子とタンパク質の発現量を亢進させ、酵素反応産物 polySia の過剰発現を引き起こすことが明らかになった(第 3 節)。第 4 に、SZ 患者の ST8SIA2 プロモーター領域に存在する regulatory SNP (rSNP)について解析した。世界規模では rSNP の組合せとして 4 種類の haplotype が存在する。まず、それらのプロモーター活性をヒトの神経系および非神経系培養細胞を用いて解析したところ、SZ で risk haplotype と呼ばれるプロモーターの活性が既報通りに亢進する細胞は特定の神経細胞のみであった。また、risk haplotype の SNP 領域に関わる転写調節因子について網羅的な探索と発現解析を行った結果、SNP3 (rs3759914) と転写調節因子 GATA-2 の関わりが明らかになった。SZ では risk haplotype のプロモーター活性が高くなるため、ST8SIA2 の発現上昇が SZ 発症につながると推定される。そこで SZ 発症メカニズムを探るために、マウス胎児脳における脳室内の神経細胞に対して、子宮内エレクトロポレーション法により ST8SIA2 遺伝子を導入して過剰発現させてその効果を解析した。その結果、マウス胎児前頭前皮質において、ST8SIA2 が過剰発現した神経細胞の移動が変化することによって神経細胞集団に異常な偏りが生じて、大脳皮質の正常な層構造形成を損ねることが示唆された(第 4 節)。以上、本研究で検証した精神疾患患者 ST8SIA2 の SNP 全てにおいて、ST8SIA2 の遺伝子量、酵素発現量や活性が正常型に比べて変化して、反応

産物である polySia の質と量、そしてその生理活性因子結合機能が異常化することが判明した。このことから、*ST8SIA2* 遺伝子が polySia の構造と機能を厳密に調節しており、その破綻が疾患発症に繋がるメカニズムの一端が明らかにされた。

ヒトは高度な社会性とそれを支える高次脳機能を有しており、その破綻が精神疾患に関与する。上述のように *ST8SIA2* とその酵素反応産物の polySia はヒトの高次脳機能を支える分子であり、*ST8SIA2* のヒトに特異的な遺伝子変異は高次脳機能の獲得機構として興味深い。そこで次に *ST8SIA2* のヒト特異的変異と polySia 機能の関係性を解析した(第 3 章)。まず、polyST 遺伝子およびタンパク質配列の脊椎動物間での比較解析を行った。その結果、ヒトと近縁の霊長類 *ST8SIA2* にアミノ酸変異 N308K を伴う一塩基変異が存在し、それがヒト特異的変異であることを見出した。一方、*ST8SIA4* (または PST) にはそのような変異は存在しなかった(第 1 節)。次に、*ST8SIA2* のヒト特異的変異体の生化学的性質を解析するために、ヒト野生型、チンパンジー型、マウス野生型およびヒト型の変異をマウス野生型に導入したマウス-ヒト型の *ST8SIA2* を発現させて、細胞レベルでのこれらの酵素の活性およびその反応産物である polySia の構造と機能を解析した。その結果、このヒト特異的変異は *ST8SIA2* の細胞内局在と発現量に影響すること、polySia の量および重合度を増加させることがわかった。また、*ST8SIA2* によって生合成された polySia-NCAM の生理活性因子結合性は、チンパンジー型酵素で生合成されたものでは、ヒト野生型酵素由来のものに比して劇的に低いことが判明した(第 2 節)。以上のことから、*ST8SIA2* がヒト型に変異することによって、酵素の機能変化を通じて反応産物である polySia のリザーバー機能の高度化が実現したと考えられる。polySia に結合する生理活性因子群は記憶や情動などの精神活動を担う分子であることが知られており、polySia のリザーバー機能の高度化は、巨大化したヒトの脳における生理活性因子の局所的濃度調節と効率的な機能発現を可能にするものである。したがって、*ST8SIA2* のヒト特異的な変異がヒトとしての特徴を生み出す一因となってきた可能性がある。

以上の結果から、*ST8SIA2* の精神疾患に関わる SNP や霊長類内の比較から見出されたヒト特異的一塩基変異は、その遺伝子発現量、酵素タンパク質量やその活性、そして最終的に polySia の量と質に変化を及ぼし、その結果として polySia の機能を変化させることが明らかになった。polySia 鎖が特異的に結合する栄養因子、増殖因子、神経伝達物質はいずれも、脳内の環境を精緻に調節してヒトの精神活動に深く関与しており、個々の因子の不全は精神疾患に繋がることが報告されている。一方、本研究で示したように、polySia はリザーバー機能を通じてこれらの因子の機能を一括して制御することができ、神経機能を統合的に制御するマスター分子と位置づけられる。したがって、polySia 構造と機能の不全は多面的な効果をもち、その蓄積が一方では病気へ、一方ではヒトに特徴的な高次脳機能の獲得へと繋がっているのかも知れない。今後、遺伝的要因だけでなく、環境的要因も加味した詳細な解析を行うことで、polySia が関わる精神疾患の発症機構が明らかになると考えられる。