

主論文の要約

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

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、ポリシアル酸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、ポリシアル酸の神経機能制御メカニズムに新しい概念が導入された。ポリシアル酸修飾された 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、そのポリシアル酸鎖はポリシアル酸転移酵素によって生合成される。これまでにポリシアル酸転移酵素および NCAM の欠損マウスの研究がなされ、ポリシアル酸転移酵素の一つである ST8SIA2/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ポリシアル酸の発現解析やポリシアル酸転移酵素遺伝子のゲノムワイドな解析から、ポリシアル酸と重篤な精神疾患である統合失調症、自閉症、双極性障害との関連性も報告されている。このように、ポリシアル酸は、その時・空間特異的な発現、NCAM 及びポリシアル酸転移酵素の欠損マウスの研究、精神疾患患者の死後脳及びゲノムワイドな研究と、脳機能や精神疾患に関与する状況証拠が蓄積されてきている。しかし、ポリシアル酸がどのように脳機能や精神疾患の発症に関わるのか、その分子機構は未解明である。ゲノムワイドな解析から見出された SNP が、実際に分子レベルでどのように病態と関わるのか、ポリシアル酸の構造と機能はどの様に変化しているのか生化学的に解析なされていない。また、精神疾患はヒトの高次脳機能の不全症であることから、ヒト型のポリシアル酸の構造や機能の比較を行うことはヒトの精神疾患の発症機構を明らかにしていく上で重要であると考えている。これまで、解剖学的見地からの解析は行われているが、ポリシアル酸構造の詳細な解析および、その構造に対する機能の解析は全くなされていない。そこで本研究では、ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2/STX 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/STX 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ポリシアル酸の構造と機能レベルで解析すること、ヒト特異的なポリシアル酸構造の解析を行うことで、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/STX が生合成するポリシアル酸の構造と神経機能の関係性を解析した。第 1 に、統合失調症患者に見出されたアミノ酸置換を伴う ST8SIA2/STX 変異体である ST8SIA2/STX(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ポリシアル酸化 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、ポリシアル酸の量および長さ(重合度)がともに減少することである。そしてこれらのポリシアル酸化 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/STX の cSNP は、酵素活性の低下によるポリシアル酸構造の不全をもたらし、その結果ポリシアル酸のリザーバー機能が損なわれることが判明した。第 2 に、統合失調症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/STX(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が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 3 に、自閉症(ASD)および双極性障害(BD)患者に見出された ST8SIA2/STX のイントロン領域に存在する intronic SNP (iSNP) 変異体 iSNP(ASD)と iSNP (BD)の解析を行った。細胞レベルでの解析結果から、双極性障害患者由来 iSNP(BD) については、ST8SIA2/STX の遺伝子とタンパク質の発現量を亢進させ、酵素反応産物ポリシアル酸の過剰発現を引き起こすことが明らかになった。第 4 に、統合失調症患者の ST8SIA2/STX プロモーター領域の特定の 5 カ所に存在する regulatory SNP (rSNP)について解析した。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、統合失調症で 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、ある特定の SNP と転写調節因子の関わりが明らかになった。統合失調症では Risk haplotype のプロモーター活性が高くなるため、ST8SIA2/STX の発現上昇が統合失調症発症につながると推定される。そこで統合失調症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/STX 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/STX 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。以

上のことより、本研究で検証した精神疾患患者 *ST8SIA2/STX* の SNP 全てにおいて、*ST8SIA2/STX* 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、反応産物であるポリシアル酸の質と量、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/STX* 遺伝子がポリシアル酸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可能性が考えられるため、ヒト特有の脳における構造や機能の存在が示唆される。上述のようにポリシアル酸はヒトの高次脳機能を支える分子であり、その詳細な解析はヒトがいかに高次脳機能を獲得したのかを明らかにする可能性を秘めている。そこでヒトのポリシアル酸機能の関係性を解析した。その結果、ヒト型ポリシアル酸化 NCAM は特にポリシアル酸のリザーバー機能を高機能化していることがわかった。ポリシアル酸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、ポリシアル酸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。従ってヒトに特徴的なポリシアル酸構造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/STX* の精神疾患に関わる SNP の詳細な解析やヒト型ポリシアル酸の構造と機能の解析から、ポリシアル酸構造は遺伝子レベルでも厳密に調節されており、その構造の変化は機能を大きく変化させることが明らかになった。ポリシアル酸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ということが報告されている。例えば、BDNF や proBDNF は記憶や情動行動に関与する分子であるが、精神疾患型ではいずれもその結合は劇的に減少しており、ドーパミンの結合に関しても疾患型はその結合性が失われる。また、FGF2 は脳発生に非常に重要な分子であり、細胞増殖や生存、移動に関与し、その発現異常が脳の形態異常を起こすことや、海馬における神経新生を制御しているとの報告がされているが、FGF2 に対しても結合性が減少した。一方、本研究で示したように、ポリシアル酸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、ポリシアル酸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、ポリシアル酸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。後口動物に起源を持ち、脊椎動物に共通する遺伝子のなかで、*ST8SIA2* のヒト特異的な変異が、脳の変化や社会性の変化に伴ってヒトとしての特徴を更に生み出す一因となってきた可能性がある。