

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	富岡 麻衣子
論文題目	Expression of ABCA13 in the brain and the effect of neurological disorder-related SNPs on the function (ABCA13の脳における発現および神経疾患に関連する一塩基多型の機能への影響)		
(論文内容の要旨)			
<p>精神疾患患者数の増加は日本における社会問題の一つであり、その病因解明および診断法・治療法の早期開発が望まれている。その中でも、統合失調症や双極性障害は症状が重篤で、患者は社会的な生活における困難を余儀なくされることが多い。これらの疾患の遺伝率は約80%以上と非常に高いことから、発症に遺伝的な因子が関与している可能性が高いと考えられてきた。全ゲノム関連研究によりABCA13がこれらの疾患の発症リスクとなることが2009年に発表された。</p> <p>ABCA13は、ATP加水分解に依存してトランスポーター機能を発揮する膜タンパク質であるABCタンパク質ファミリーに属する。さらにその中でも、膜脂質を基質として輸送するABCA1やABCA12と高いアミノ酸配列相同性をもつことから、ABCA13は膜脂質を基質とするトランスポーターである可能性が考えられる。しかし、その生理的役割および基質は全く分かっていない。また、脳のさまざまな部位での発現が報告されているが、詳細は不明で、その機能との関連性も未解明である。</p> <p>ゲノム解析により報告された神経疾患と関連するABCA13の一塩基多型(SNP)の機能への影響やABCA13の脳における詳細な局在を調べることは、統合失調症および双極性障害の病因および発症メカニズムの解明、ひいてはその診断法・治療法の確立につながると考え、本研究ではそれら二つの観点からABCA13の解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第一章では、神経疾患との関連性が報告されたABCA13のSNPがその機能に与える影響を調べた。そのために、ABCA13と高い相同性を持ち機能解析が進んでいるABCA1をモデル分子として用いた。ABCA1は細胞膜に局在し、細胞内の過剰コレステロールとリン脂質を血中のアクセプターであるapoA-IにATP加水分解依存的に受け渡すことにより、善玉コレステロールとして知られるhigh density lipoprotein (HDL)を産生する。ABCA1はHDL産生の鍵をにぎっており、ABCA1の遺伝子変異は血中のHDLが大幅に減少するタンジール病を引き起こすことが知られている。野生型ABCA1発現細胞にapoA-Iを添加すると、細胞膜上のABCA1とapoA-Iの相互作用を観察することができ、さらに培地中のコレステロール含量を測定することによりABCA1のコレステロール排出活性を測定することができる。本研究では、ABCAサブファミリー間で高度に保存されているヌクレオチド結合領域(NBD)に存在する2つのSNPに注目し、それらのSNPがABCA1の局在および機能に与える影響を検討した。その結果、双極性障害との関連が示唆されたSNP-T4031Aを相同部位に導入したABCA1の1アミノ酸変異体T1088Aでは</p>			

コレステロール排出機能が大幅に減少していることが明らかになった。変異体の局在を検討した結果、T1088A変異体は細胞膜への局在効率が減少していることがわかった。しかし、それだけでは活性の大幅な減少を説明するには不十分であった。そこで、既に結晶構造の解かれているマウスABCB1の構造を参考にしたモデリングを行った。その結果、T1088は2つのNBDの接触面に存在することが予想され、そのアミノ酸置換が機能に大きな影響を与える可能性が示唆された。これらの結果は、ABCA13のT4031A変異はABCA13の機能を損なわせ、その機能不全が神経疾患に繋がる可能性を示している。一方、統合失調症と関連するアミノ酸変異R4843CをABCA1の相同部位に導入した変異体K2031Cでは、野生型と比較してその局在および機能に顕著な影響は見られなかった。これらのことは、R4843C変異がABCA13とABCA13特異的制御タンパク質との相互作用など、ABCA13に特異的な影響を与える可能性を示唆した。

第二章では、ABCA13の脳における局在について詳細に検討した。マウスABCA13のC末端13アミノ酸をエピトープとするポリクローナル抗体を作製し、それを用いた組織および細胞の免疫染色によりABCA13の局在解析を行った。その結果、マウスの脳組織切片において大脳皮質、海馬および小脳の神経細胞に染色が観察された。さらに、ラット海馬由来の初代神経培養細胞を用いた免疫染色により、ABCA13が神経細胞の軸索初節(axon initial segment, AIS)に特異的に発現していることが明らかになった。AISは細胞接着分子、細胞骨格分子およびイオンチャネルが集積し、活動電位の開始点および細胞体と軸索を隔てる拡散バリアとして重要な役割を果たしている。電位依存性Na⁺チャネルおよびCa²⁺チャネルはアンキリン結合配列をもち、その配列を介して細胞膜裏打ちタンパク質AnkyrinG (AnkG)と相互作用することによりAISに局在することが知られている。そこで、ABCA13がAnkG依存的にAISに局在する可能性を調べるため、初代神経培養細胞を用いてAnkGとABCA13の発現を継時的に観察した。その結果、AnkGのAISへの凝集が培養開始2日目(Days *in vitro* 2, DIV2)に確認されたのに対して、ABCA13はDIV7以降にAISへの凝集が観察された。このことから、ABCA13はAnkGがAISに凝集するのに伴いAISにリクルートされるのではなく、それとは異なるメカニズムでAISに集積する可能性が示唆された。また、AnkGの発現をsiRNAを用いて抑制することによりAISを破壊すると、ABCA13がAISから消失することが観察された。以上の結果は、ABCA13が神経細胞の重要な機能部位である軸索初節の構成分子であることを示している。

本研究は、ABCA13の変異が神経疾患発症へ関与するメカニズムを、その変異が機能および局在に与える影響の解析とABCA13の発現部位の特定により、初めて示した研究である。双極性障害との関連が示唆されたABCA13の一塩基置換によって引き起こされるアミノ酸置換が、タンパク質の機能、折り畳みおよび細胞内輸送に大きな影響を与える可能性を、機能解析の進んでいるABCA1をモデル分子として用いて解析することで明らかにした。また、ABCA13が脳において大脳皮質、小脳、海馬の神経細胞に発現していること、さらに神経細胞における活動電位の開始点である軸索初節に特異的に発現していることを明らかにした。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

重篤な神経疾患である統合失調症および双極性障害の発症のメカニズムは、これまで詳細がわかっておらず、根治するための治療法も存在しない。脂質トランスポーターとして機能するABCタンパク質のAサブファミリーに属するABCA13の一塩基多型は、これらの神経疾患のリスクとなることが全ゲノム関連研究から明らかになった。しかし、その脳内における局在および生理機能はほとんど解明されていない。リスクとなる一塩基多型が機能へ与える影響およびABCA13の脳における詳細な局在を明らかにすることは、統合失調症および双極性障害の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発に繋がると期待される。本論文は、ABCA13の変異が神経疾患発症に関与するメカニズムを解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 双極性障害と関連するアミノ酸置換T4031Aを相同部位に導入したABCA1は、タンパク質の細胞内輸送が異常になり、細胞膜への発現が減少することを明らかにした。
2. 上記のT4031がABCA13の二つのヌクレオチド結合領域の接触面に存在することを構造モデルから示唆し、その変異が機能にも大きな影響を与えることを示した。
3. 統合失調症と関連するアミノ酸置換R4843Cは、相同部位に導入したABCA1の機能および局在には影響を与えないことを示し、ABCA13特異的相互作用分子との結合など、ABCA13に特有な影響を与えることを示唆した。
4. ABCA13が、大脳皮質、小脳、海馬などの神経細胞に発現していることを明らかにした。
5. ABCA13が、神経細胞における活動電位の開始点である軸索初節(AIS)に特異的に発現していることを明らかにした。

以上のとおり、本論文は統合失調症および双極性障害の発症とABCA13の関連性を、一塩基多型によるアミノ酸置換がABCタンパク質の機能に与える影響を解析すること、および脳における局在を解析することから明らかにしたものであり、ABCタンパク質が脳機能の維持に重要な役割を果たしていることを示す研究である。この研究は、分子細胞生物学、細胞生化学、基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。