

# ABC タンパク質による脳内脂質輸送の生理的役割

中塔 充宏

2021



## 略語

$\alpha$ 2M	$\alpha$ 2-macroglobulin
AA	arachidonic acid
ABC	ATP-binding cassette
Apo E	apolipoprotein E
D4	$\theta$ toxin domain 4
DHA	docosahexaenoic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EPA	eicosapentaenoic acid
GAP-43	growth-associated protein 43
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LDL	low density lipoproteins
LpE	apolipoprotein E-containing lipoprotein
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
M $\beta$ CD	methyl-beta-cyclodextrin
NBD	nucleotide binding domains
OA	oleic acid
PI	propidium iodide
PUFA	polyunsaturated fatty acids
RAP	receptor-associated protein
SA	stearic acid
sgRNA	single guide RNA
TMD	transmembrane domains



## 目次

序論	1
第一章	
多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の神経突起伸長作用	3
第二章	
ABCA13 による脂質輸送および精神疾患との関連	25
結論	49
参考文献	51
文献リスト	59
謝辞	61



## 序論

脳は非常に脂質の豊富な組織であり、神経突起やシナプスの形成、神経伝達などの神経系の機能には脳内の脂質恒常性維持が重要である<sup>1,2</sup>。神経系細胞における脂質恒常性の破綻は、統合失調症やアルツハイマー病などの精神神経疾患の発症や増悪につながることが報告されている<sup>3,4</sup>。

ATP-binding cassette (ABC)タンパク質ファミリーは、細菌からヒトに至る全ての生物に存在する膜輸送体タンパク質ファミリーである<sup>5,6</sup>。ABCタンパク質は、ATPの結合と加水分解に伴う構造変化により、脂質やペプチドなど様々な基質を脂質二重膜の内外に能動的に輸送しており、その異常は多くの疾患に関与する。真核生物のABCタンパク質の多くは、6つの膜貫通ヘリックスから構成される膜貫通領域 (transmembrane domains; TMD)とヌクレオチド結合領域 (nucleotide binding domains; NBD)が交互に2回繰り返された構造で機能する。NBDにはWalker Aモチーフ (GxxGxGKS/T)やWalker Bモチーフ (h h h h D、hは疎水性アミノ酸)のような保存されたアミノ酸配列が存在する。ヒトでは48種のABCタンパク質が同定されており、ATP結合ドメインのアミノ酸配列の相同性に基づいてAからGまでの7つのサブファミリーに分類されている。

脳では様々なABCタンパク質が発現しており、その中の一部は脂質輸送を担うことが知られている<sup>7</sup>。たとえば、アストロサイトに発現するABCA1やABCG1は脳内の主要なリポタンパク質の産生に関与し<sup>8-12</sup>、神経細胞にコレステロールやリン脂質などの脂質を供給することが知られている。しかし、その生理的役割については不明な点が多い。また、2009年にABCA13遺伝子の変異が統合失調症、双極性障害、うつ病などの精神疾患の発症リスクとなる可能性が報告されたが<sup>13</sup>、その分子機能や生理的役割は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、ABCタンパク質による脳内脂質輸送の生理的役割に着目し、解析を行った。





## 第一章

# 多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の 神経突起伸長作用



## 第一章

### 多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の神経突起伸長作用

多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids; PUFA)は、ヒトの脳組織の脂肪酸の 25-30% を占めており<sup>14</sup>、神経突起伸長、神経伝達、シナプス可塑性、遺伝子発現など神経系細胞の様々な機能に影響を及ぼす<sup>15-17</sup>。そのため、PUFA は認知、学習、記憶といった脳の高次機能に必要であり、PUFA の欠乏とアルツハイマー病や統合失調との関連が指摘されている<sup>18</sup>。PUFA は主に n-6 PUFA や n-3 PUFA に分類することができ、n-6 PUFA としてアラキドン酸 (arachidonic acid; AA (20:4n-6))などが、n-3 PUFA としてドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA (22:6n-3))やエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA (20:5n-3))などが知られている。ヒトでは n-6 および n-3 PUFA の合成酵素をコードする遺伝子が欠損しているため、これらの脂肪酸は食餌成分として直接吸収する必要がある<sup>17</sup>。PUFA の中でも DHA は神経細胞において最も量が多く、*in vitro* で DHA を遊離脂肪酸として直接神経細胞に添加すると神経突起伸長作用を示すことが報告されている<sup>19-21</sup>。しかし、食餌成分として吸収された PUFA が脳内で神経細胞までどのように運ばれて作用しているかは未だ明らかとなっていない。

血液脳関門により血漿中のリポタンパク質の脳内移行は制限されているため、グリア細胞の一種であるアストロサイトが産生するアポリポタンパク質 E (apolipoprotein E; apo E) が脳内における主要なアポリポタンパク質となっている<sup>22</sup>。Apo E はコレステロールやリン脂質と会合して、高密度リポタンパク質に相当する密度の apo E 含有リポタンパク質 (apolipoprotein E-containing lipoproteins; LpE)を形成する<sup>23</sup>。アストロサイトに発現する ABCA1 は LpE の形成において重要な役割を果たすことが知られており<sup>8</sup>、ABCA1 KO マウスのアストロサイトが分泌する LpE のコレステロール含量は減少し、LpE のサイズが小さくなることが報告されている<sup>9</sup>。また、ABCG1 も LpE 形成への関与が報告されており<sup>10-12</sup>、これらの脂質輸送体が apo E にコレステロールやリン脂質を輸送することで LpE が形成されると考えられている。LpE は神経細胞の low density lipoprotein (LDL)受容体ファミリーに属する受容体に結合すると、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる<sup>24,25</sup>。このようにしてアストロサイトは神経細胞にコレステロールやリン脂質などの脂質を供給し、神経細胞の成長や修復、シナプス形成に関与している<sup>23,26,27</sup> (Fig. 1)。

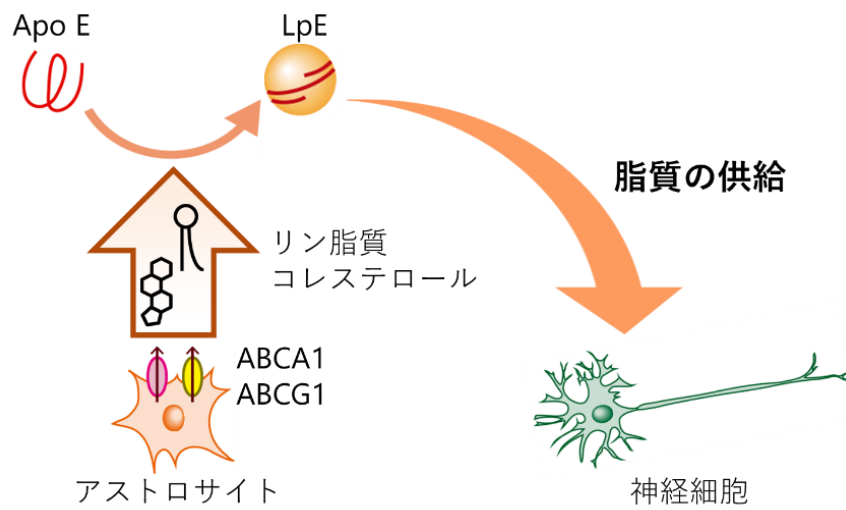


Fig. 1 LpE を介したアストロサイトから神経細胞への脂質の供給

神経細胞への脂質の供給は、アストロサイトの ABCA1 や ABCG1 によって産生される LpE を介していることから、食餌成分中の多価不飽和脂肪酸は、まずアストロサイトの膜リン脂質として取り込まれた後に LpE の構成脂質として分泌され、神経細胞に作用して神経突起伸長作用を示すのではないかと仮説を立て、本章ではこれを検証することにした。

## 材料と方法

### 材料

リコンビナント receptor-associated protein (RAP)は PROGEN (Heidelberg, Germany)より購入した。ヤギ抗ヒト低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1; LRP1)ポリクローナル抗体 (#sc-16166)、正常ヤギ抗体 (#sc-2028)は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)より購入した。 $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ M)、cytochalasin D は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)より購入した。ステアリン酸 (stearic acid; SA (18:0))、オレイン酸 (oleic acid, OA (18:1n-9))、AA、EPA、DHA は Nu-Chek-Prep (Elysian, MN)より購入した。

### 細胞培養

大脳皮質グリア細胞は生後 2 日目の Sprague-Dawley ラットより単離した<sup>28</sup>。まず、大脳皮質をラット脳から単離し、0.25%トリプシン (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含む PBS 中で 37°C、20 分間静置した。パストゥールピペットを用いて細胞を分散後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて培養した。

海馬神経細胞は生後 2 日目の Sprague-Dawley ラットより単離した<sup>29</sup>。まず、海馬をラット脳から単離し、0.25%トリプシンを含む PBS 中で 37°C、20 分間静置した。パストゥールピペットを用いて細胞を分散し、B-27 supplement (Invitrogen)、GlutaMAX (Invitrogen)を含む Neurobasal medium (Invitrogen)で細胞を懸濁後、poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) コート済みのカバーガラスに  $1.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 2 時間培養後、N2 supplement (Invitrogen)、GlutaMAX を含む Neurobasal medium (N2 培地)に培地交換し、必要に応じて LpE、RAP、抗 LRP1 抗体、 $\alpha_2$ M を添加し、3 日間培養して解析に供した。なお、 $\alpha_2$ M は 100 mM メチルアミン中で室温 1 時間静置して活性化させて使用した<sup>30</sup>。LpE の取り込み抑制の実験においては、神経細胞の播種 18 時間後に 20  $\mu$ M cytochalasin D を含む N2 培地に交換して 1 時間培養し、そこに LpE を添加して 24 時間培養した。その後、cytochalasin D を含まない N2 培地に交換してさらに 28 時間培養し、解析に供した。

### グリア細胞条件培地からの LpE の単離

2.5 mg/mL の BSA (Sigma-Aldrich)を含む DMEM でグリア細胞を洗浄し、50  $\mu$ M の脂肪酸、2.5 mg/mL の BSA を含む DMEM に培地交換して 24 時間培養した。その後、脂肪酸を含まない DMEM に培地交換してさらに 3 日間培養し、この培養上清をグリア細胞条件培地として回収した。LpE は、グリア細胞条件培地からスクロース密度勾配超遠心によって単離した<sup>24, 31</sup>。遠心用チューブに、底から 1.3 g/mL のスクロース溶液を 6 mL、1.2 g/mL に調製したグリア細胞条件培地 (1.3 g/mL のスクロース溶液 6 mL とグリア細胞条件培地 3 mL を混合した溶液)を 9 mL、1.1 g/mL に調製したグリア細胞条件培地 (1.3 g/mL のスクロース溶液 3 mL とグリア細胞条件培地 6 mL を混合した溶液)を 9 mL、グリア細胞条件培地 12 mL を重

層し、SW42-Ti (Beckmann Coulter, Brea, CA)を用いて 4°C、160,000 × g、48 時間で遠心した。チューブの上から 3 mL ずつ分取して 12 のフラクションを取得し、ドットブロットで apo E を含む画分を検出した。Apo E が検出された画分を一つにまとめ、Amicon Ultra-100K (Merck Millipore, Burlington, MA)を用いて濃縮し、バッファーを PBS に置換してこれを LpE とした。LpE を神経細胞に添加する際は、タンパク濃度換算で最終 10 µg/mL とした。Alexa Fluor 488 標識 LpE は、Alexa Fluor 488 NHS Ester (Invitrogen)を用いてメーカーのプロトコルに従って調製した。

### 免疫ブロッティング

ドットブロッティングにおいては、超遠心によって得られた各フラクションをニトロセルロースメンブレンに滴下し、ヤギ抗ヒト apo E 抗体 (Academy Bio-Medical, Houston, TX)を用いて検出した。ウエスタンブロッティングにおいては、等量のタンパク質を SDS-PAGE に供して分離し、PVDF メンブレンに転写してヤギ抗ヒト apo E 抗体を用いて検出した。バンドの強度は MultiGauge (富士フイルム)を用いて定量した。

### 脂質解析

クロロホルム/メタノール溶液 (2:1)を用いて LpE の脂質を抽出し、イソプロパノールに溶解した。その後、コレステロール量は遊離コレステロール E-テストワークキット (富士フイルム和光純薬)により、コリンリン脂質量はリン脂質 C-テストワークキット (富士フイルム和光純薬)により定量した。

### 液体クロマトグラフィー質量分析 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS)

LC-MS/MS 解析は Shimadzu Nexera ultra high performance liquid chromatography system (島津)と QTRAP 4500 hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA)を用いて実施した。クロマトグラフィーによる分離は、Acquity UPLC HSS T3 column, 100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm (Waters, Milford, MA)、移動相 A (水/メタノール 50:50 (v/v)、10 mM 酢酸アンモニウム、0.2% 酢酸)、移動相 B (イソプロパノール/アセトン 50:50 (v/v))を用いて、グラジエントプログラム (0–20 min: 30% B→70% B; 20–24 min: 90% B; 24–28 min: 30% B)で実施した。

### 細胞免疫染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温 30 分間静置して固定し、0.4% Triton-X100 溶液中で室温 5 分間静置した。その後、10%ヤギ血清中で室温 1 時間静置してブロッキングし、抗 βIII-tubulin 抗体 (Merck Millipore)を反応させた。その後、Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen)を室温、1 時間で反応させた。

### 神経突起の観察と定量

免疫染色した細胞を共焦点顕微鏡 LSM 700、対物レンズ Plan-Apochromat 20×/0.8 NA (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)で観察し、画像を取得した。神経突起の合計の長さ、最も長い神経突起の長さ、神経突起の数、神経突起の枝分かれの数は、ImageJを用いて画像の神経突起をトレースすることで定量した。

### 定量的 RT-PCR

RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて細胞から抽出した。抽出した RNA を鋳型として High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて cDNA を合成した。PCR 反応は Step One Plus Real-Time PCR System と Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて実施し、解析した。標的遺伝子の発現は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase で補正した。用いたプライマーの配列は以下の通りである (growth-associated protein 43 (GAP-43) : フォワード 5'-TGATGCAGTCATCTTGGGAAAT -3'、リバーズ 5'-CCACACGCACCAGATCAAAA -3'、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase : フォワード 5'-GAGACAGCCGCATCTTCTTGT -3'、リバーズ 5'-CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA -3')。

### 統計解析

ANOVA 実施後に Tukey's test を実施した。

## 結果

### グリア細胞に与えた PUFA は LpE のリン脂質に取り込まれる

まず、アストロサイトに与えた PUFA が LpE の構成リン脂質として分泌されるかを、ラット大脳皮質グリア細胞の初代培養により検証を行った。この培養法ではアストロサイトがグリア細胞の 90%以上を占める<sup>32</sup>。ラット初代培養大脳皮質グリア細胞を、50  $\mu$ M の AA、EPA、あるいは DHA を含む培地で 24 時間培養した。その後、培地を交換して取り込まれていない脂肪酸を除去し、さらに 3 日間培養してグリア細胞条件培地を回収した。スクロース密度勾配超遠心によりグリア細胞条件培地を 12 のフラクションにわけて、ドットブロッキングを実施し、apo E が主にフラクション 5~8 (密度は約 1.07~1.12 g/mL で、LpE の密度に相当) に検出されることを確かめた (Fig. 2A)。これらのフラクションを混合して LpE とし、タンパク質量で合わせて各サンプルのコレステロールとコリンリン脂質量を測定した (Table 1)。LpE サンプル間で脂質量に有意な差は認められなかったため、グリア細胞に添加した脂肪酸は LpE のコレステロールとコリンリン脂質量に影響は与えないことがわかった。また、ウエスタンブロッティングにより、LpE サンプル間の apo E 量に差がないことを確かめた (Fig. 2B, C)。

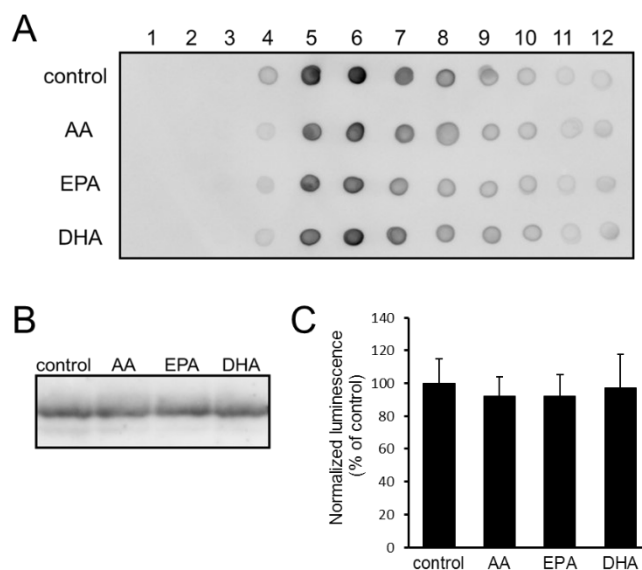


Fig. 2 LpE の単離

(A) グリア細胞条件培地をスクロース密度勾配超遠心に供し、12 のフラクションを得た (1 が最上層で 12 が最下層)。ドットブロッキングで apo E を検出した。(B) 等タンパク質量の LpE サンプルを SDS-PAGE で泳動後、ウエスタンブロッティングで apo E を検出した。(C) B のバンドの濃さを定量し、値をコントロールに対する平均値+標準偏差として示した (n=3)。



Table 1 LpE のコレステロール、コリンリン脂質量の比較

	LpE (control)	LpE (AA)	LpE (EPA)	LpE (DHA)
タンパク質量 ( $\mu\text{g}$ )	10	10	10	10
コレステロール量 ( $\mu\text{g}$ )	1.03 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.08	1.24 $\pm$ 0.24	0.87 $\pm$ 0.13
コリンリン脂質量 ( $\mu\text{g}$ )	1.81 $\pm$ 0.21	1.60 $\pm$ 0.20	1.96 $\pm$ 0.08	1.60 $\pm$ 0.19

LpE のコレステロールとコリンリン脂質量を比色法により定量した。値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した ( $n = 3$ )。

次に、PUFA が LpE のリン脂質の脂肪酸鎖に組み込まれていることを調べるため、LpE の脂質組成を LC-MS/MS で解析した (Fig. 3)。LpE を構成するリン脂質としてはホスファチジルコリンが最も多く、スフィンゴミエリンも LpE に含まれていた。リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸の量は少なかった (Data not shown)。LpE (control) と比較すると、LpE (DHA) には 38:6 (16:0/22:6)、40:6 (18:0/22:6、16:0/24:6) の脂肪酸鎖を含むホスファチジルコリンの量が多かった。LpE (AA) には 36:4 (16:0/20:4)、38:4 (16:0/22:4)、40:4 (16:0/24:4)、40:5 (18:0/22:5、18:1/22:4) が多かった。LpE (EPA) には 38:5 (16:0/22:5)、40:5 (18:0/22:5) が多かった。また、ホスファチジルエタノールアミンにおいては、LpE (control) と比較すると LpE (DHA) には 38:6、40:6 が多く、LpE (AA) には 38:4、40:4 が多く、LpE (EPA) には 38:5、40:5 が多かった (Data not shown)。また、ガスクロマトグラフィー質量分析法により LpE リン脂質中の PUFA の定量的解析を実施したところ、DHA、AA、EPA およびそれらの代謝物は、それぞれの LpE で 5.5、2.1、18 倍増加していた (Data not shown)。以上の結果から、培地に添加した PUFA やその代謝物はグリア細胞から分泌される LpE のリン脂質に取り込まれていることが示唆された。

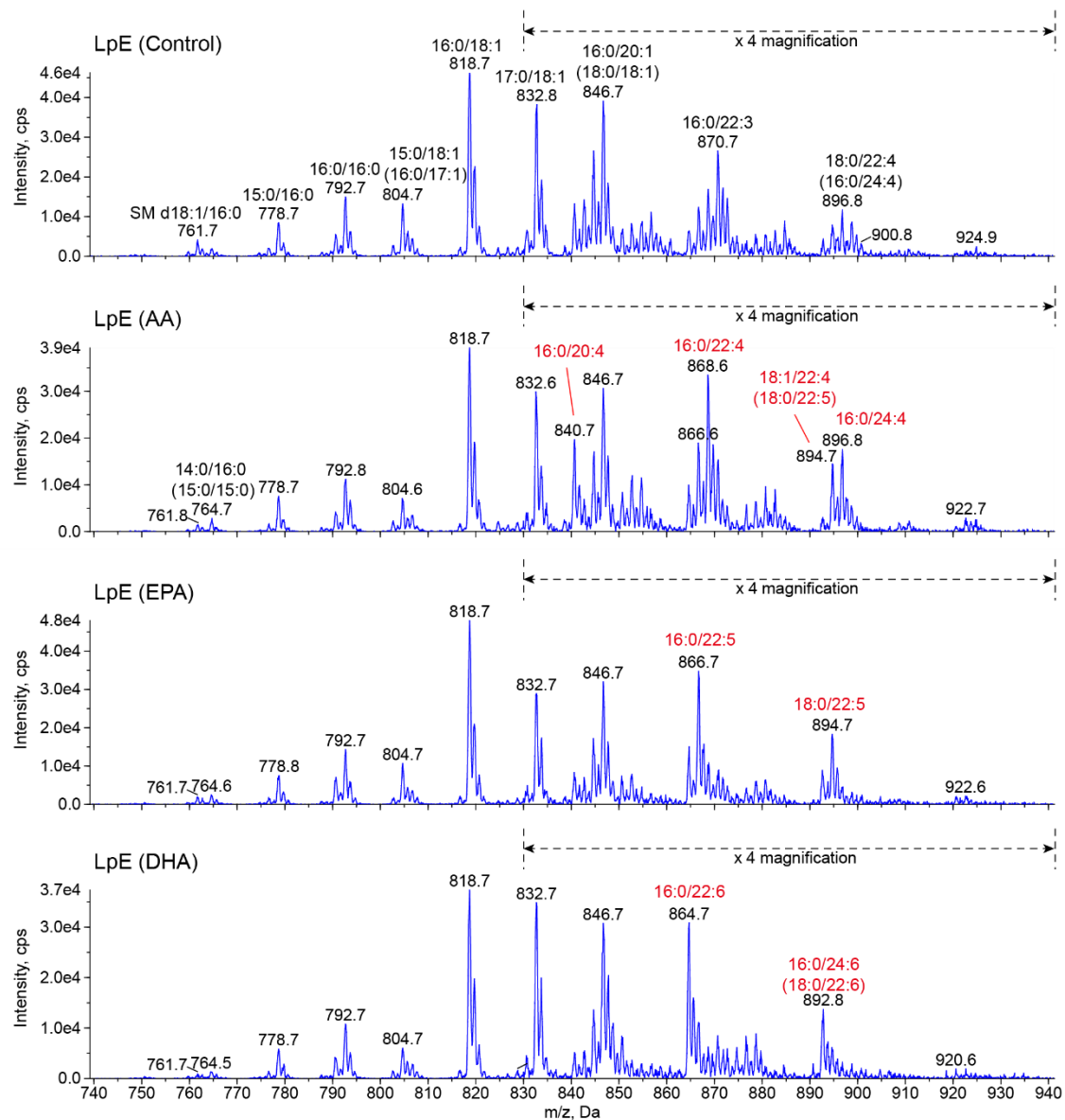


Fig. 3 LpE の脂質分析

LpE の脂質抽出物 (総リン脂質 0.7 nmol) を LC-MS/MS に供し、ホスファチジルコリンの脂質分析を実施した。

### PUFA 含有 LpE は高い神経突起伸長作用を示す

次に、PUFA を含有する LpE の神経突起伸長作用を検証するため、ラット初代培養海馬神経細胞に LpE を添加して 3 日間培養し、抗  $\beta$  III-tubulin 抗体を用いた免疫染色により神経突起を染色して神経細胞あたりの総神経突起長を解析した (Fig. 4A, B)。その結果、N2 培地と比較して LpE (control) で神経突起伸長作用が認められた。また、LpE (control) と比較して、LpE (AA)、LpE (EPA)、LpE (DHA) には高い神経突起伸長作用が認められた。神経細胞あたりの総神経突起長が増える理由として、神経突起の長さの増加や神経突起の数の増加が考えられる。そこで、これらのパラメータについて解析した。最も長い神経突起の長さに関しては、N2 培地と比較して LpE で伸長作用が認められたが、LpE 間での差は認められなかった (Fig. 4C)。神経突起の数や神経突起の枝分かれの数を計測したところ、N2 培地と比較して LpE (control) でそれらの数が増加しており、LpE (AA)、LpE (EPA)、LpE (DHA) ではその作用が増強していることがわかった (Fig. 4D, E)。以上の結果から、PUFA を含有する LpE は神経突起の枝分かれ数を増加させることで高い神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。

また、飽和脂肪酸である SA や一価不飽和脂肪酸である OA をグリア細胞に添加して調製した LpE (SA)、LpE (OA) は、LpE (control) と同程度の神経突起伸長作用を示した (Fig. 5)。この結果から、PUFA で認められた神経突起伸長作用は飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸では認められないことがわかった。

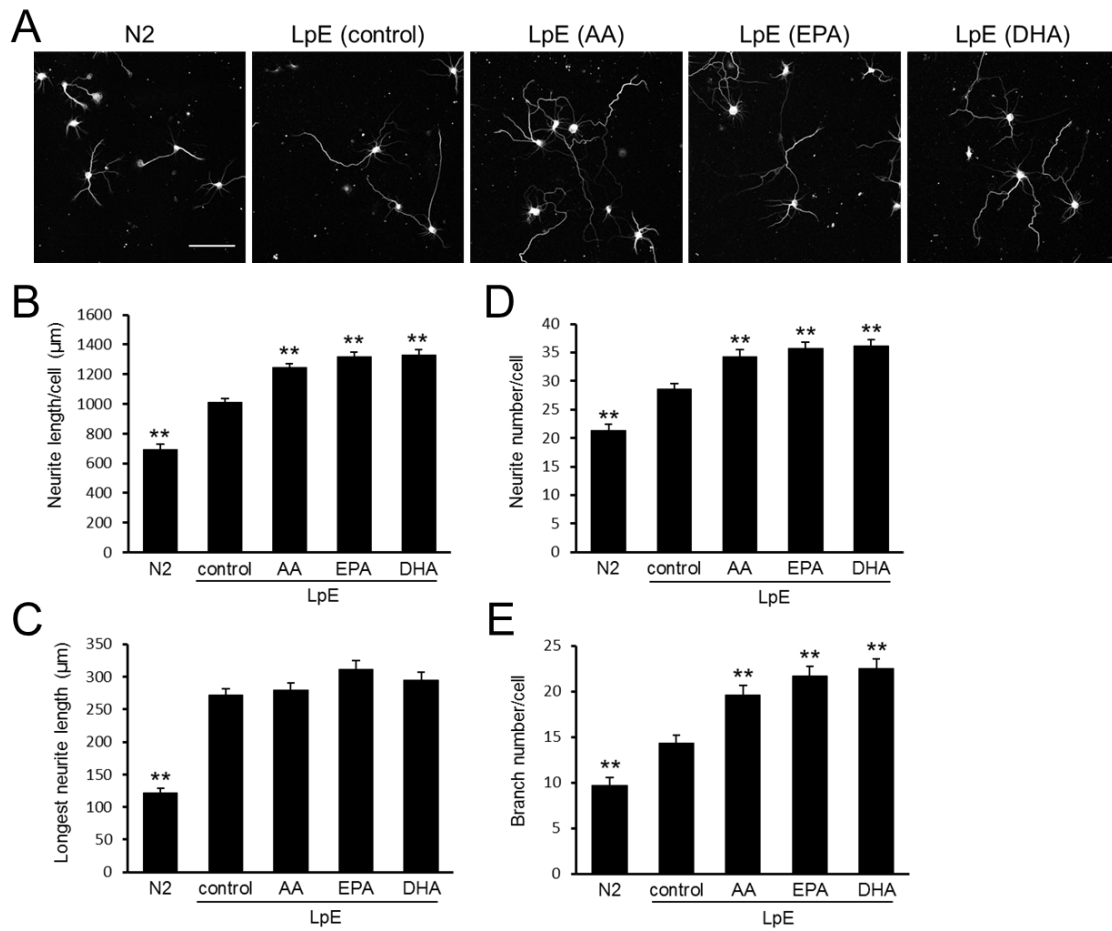


Fig. 4 PUFA を与えたグリア細胞が分泌する LpE の神経突起伸長作用

(A) 10 μg/mL LpE を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、抗 βIII-tubulin 抗体で免疫染色した。スケールバーは 100 μm。(B-E) ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の数、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した (n = 60)。 \*\*, P < 0.01 (LpE (control) と比較)。

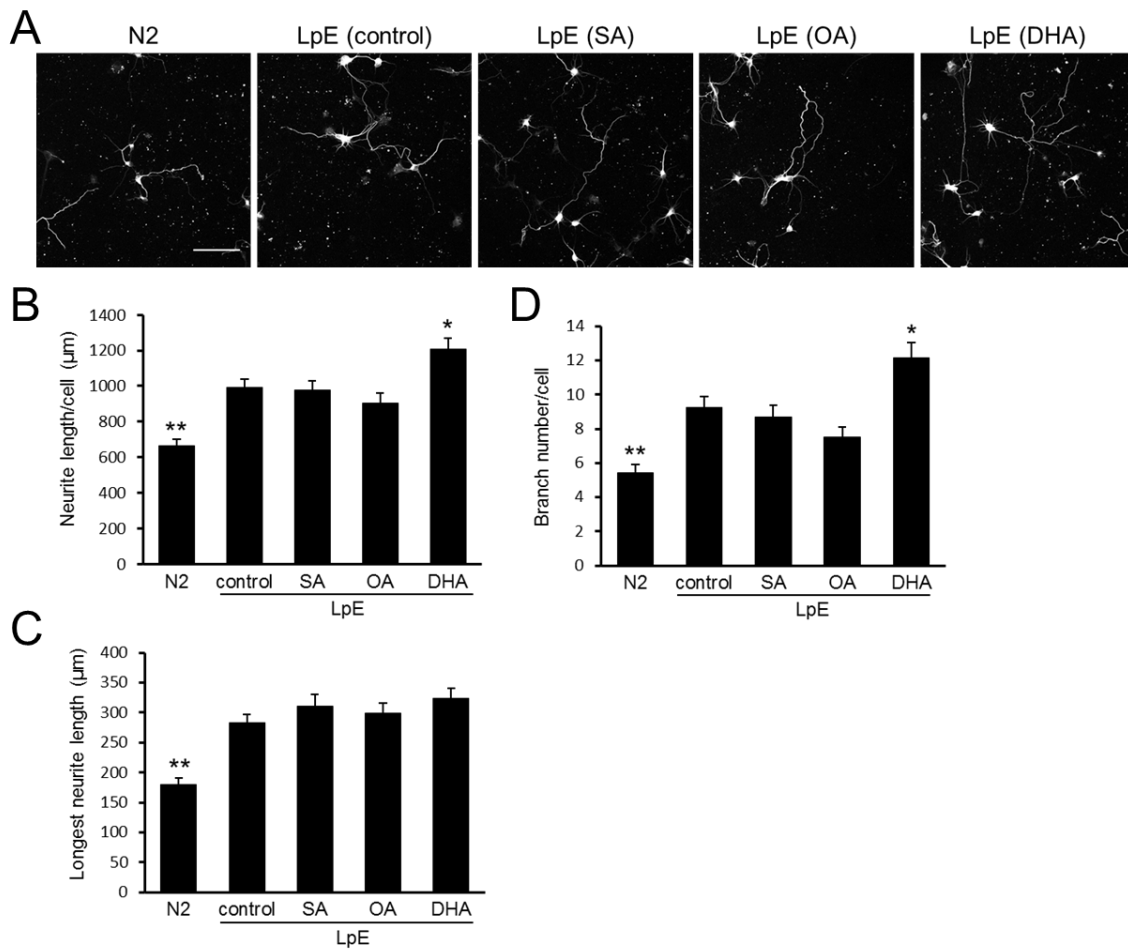


Fig. 5 SA、OA を与えたグリア細胞が分泌する LpE の神経突起伸長作用

(A) 10 μg/mL LpE を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、抗 βIII-tubulin 抗体で免疫染色した。スケールバーは 100 μm。(B-D) ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した (N2 は n = 60、他は n = 45)。\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 (LpE (control)と比較)。

## LpE の神経突起伸長作用は LRP1 を介する

LpE は LDL 受容体や LRP などの LDL 受容体ファミリーに結合することが報告されている<sup>25,33</sup>。そこで LpE の神経突起伸長作用に LDL 受容体ファミリーが介しているかを検討するため、これらの受容体へのリガンド結合を阻害する RAP を添加して LpE の神経突起伸長作用を評価した (Fig. 6)。RAP の添加自体は神経突起伸長に影響を与えなかったが、LpE (control) と LpE (DHA) の神経突起伸長作用を消失させた。以上の結果から、LDL 受容体ファミリーの受容体が LpE の神経突起伸長作用に関与していることが示唆された。

LDL 受容体ファミリーに属する LRP1 は神経細胞における発現が高く<sup>34,35</sup>、LpE は LRP1 を介して神経細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>36</sup>。LRP1 が LpE の神経突起伸長作用にも関与しているかを調べるため、LRP1 のリガンド結合を阻害することが報告されている抗 LRP1 細胞外ドメイン抗体を LpE とともに培地に添加して神経突起伸長を解析した (Fig. 7)。その結果、抗 LRP1 抗体の添加により LpE の神経突起伸長への効果は消失した。以上の結果から、LpE は LRP1 を介して神経突起伸長を促進することが示唆された。

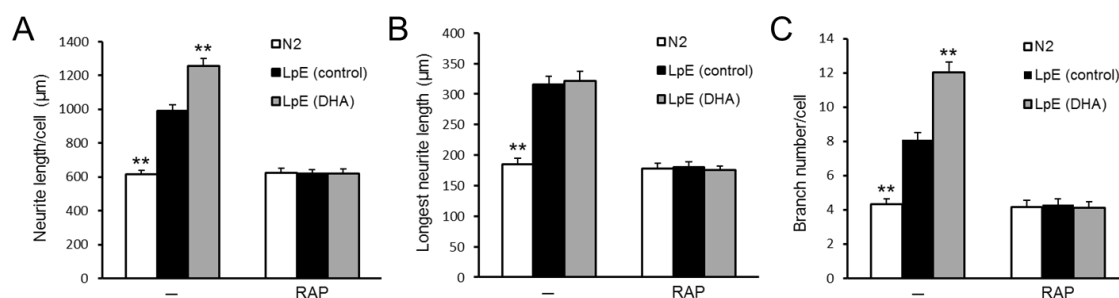


Fig. 6 LpE の神経突起伸長作用に対する RAP の効果

(A-C) 10 μg/mL LpE と 300 nM RAP を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、抗 βIII-tubulin 抗体で免疫染色した。ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した (n = 45)。\*\*, P < 0.01 (LpE (control) と比較)。

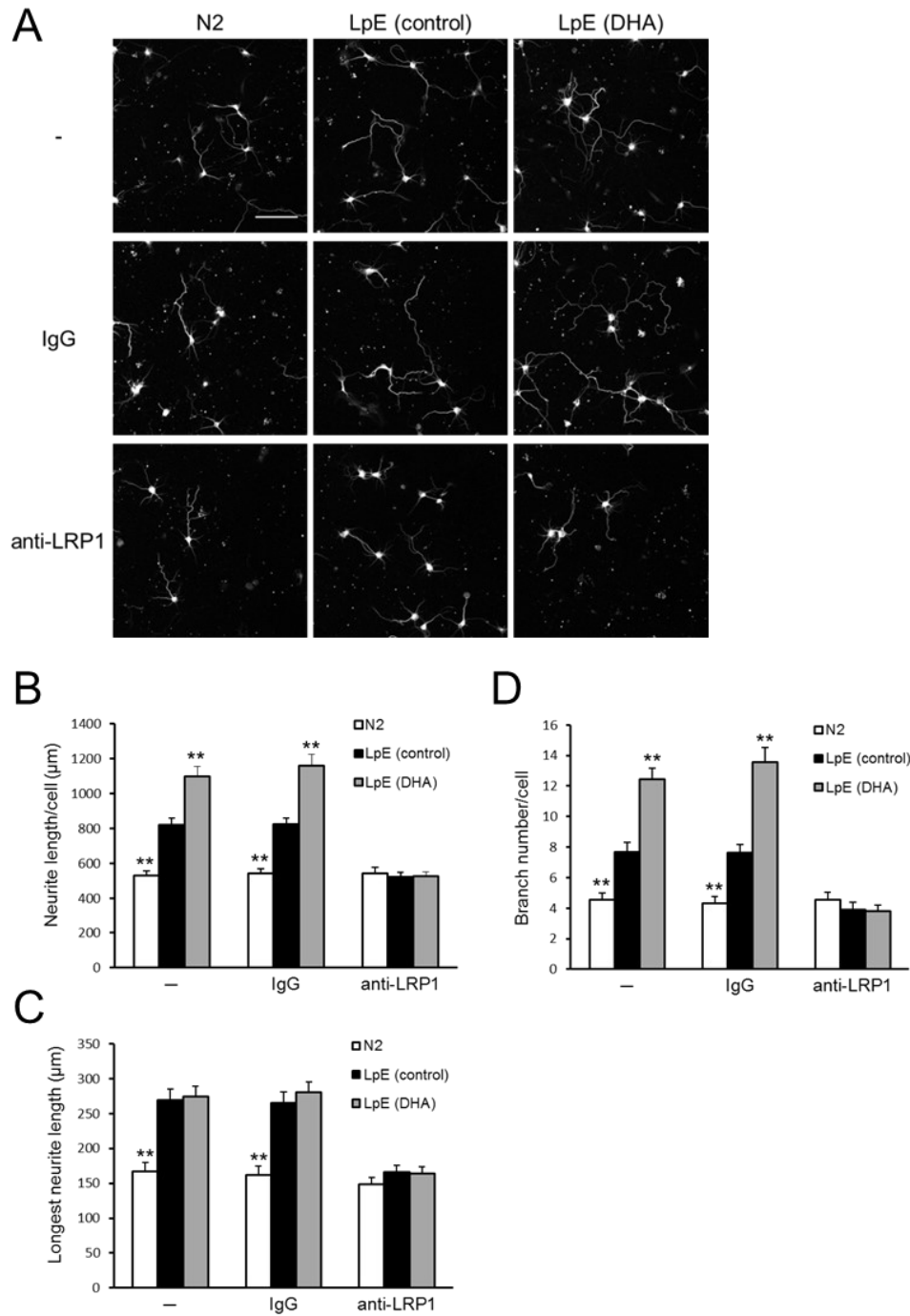


Fig. 7 LpE の神経突起伸長作用に対する抗 LRP1 抗体の効果

(A) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LpE と 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗 LRP1 抗体あるいはコントロールの IgG を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、抗  $\beta\text{III-tubulin}$  抗体で免疫染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。(B-D) ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した ( $n = 45$ )。\*\*,  $P < 0.01$  (LpE (control)と比較)。

### エンドサイトーシスによる LpE の取り込みが神経突起伸長作用に重要である

LpE は、LRP1 を介したシグナル経路により神経細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>24</sup>。また、LpE は LRP1 を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる<sup>37,38</sup>。そこで、LpE の神経突起伸長作用には LRP1 を介したシグナル経路が重要なのか、あるいは LpE の取り込みが重要なのかを検討した。LRP1 のリガンドの 1 つに  $\alpha 2M$  がある。メチルアミンで活性化した  $\alpha 2M$  は LRP1 を介したシグナル経路を活性化することが知られており、LpE と  $\alpha 2M$  は LRP1 を介したシグナル経路で神経細胞のアポトーシスを抑制する<sup>24,36</sup>。そこで、LpE の神経突起伸長作用に LRP1 を介したシグナル経路が関与するかを調べるため、メチルアミンで活性化した  $\alpha 2M$  を添加して神経突起伸長を定量した (Fig. 8)。その結果、 $\alpha 2M$  は神経突起伸長を促進しないということがわかった。また、 $\alpha 2M$  が活性化状態であることを確かめるため、 $\alpha 2M$  が神経細胞のアポトーシスを抑制するかを MTT assay で調べたところ、アポトーシスの抑制作用が認められた (Data not shown)。以上の結果から、LRP1 シグナル経路を活性化する  $\alpha 2M$  は神経突起の伸長に影響を及ぼさないことが示唆された。

次に、LRP1 を介した LpE の取り込みが神経突起伸長作用に重要かどうかを調べるため、LpE のエンドサイトーシスを阻害することが報告されているアクチン重合阻害剤 cytochalasin D を用いて神経突起伸長への影響を調べた<sup>24</sup>。まず cytochalasin D 処理で LpE のエンドサイトーシスが阻害されることを確認するため、Alexa Fluor 488 で蛍光標識した LpE と cytochalasin D を神経細胞に添加して蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 9A)。その結果、cytochalasin D 処理により LpE のエンドサイトーシスの阻害が認められた。そこで、LpE と cytochalasin D を添加して神経突起伸長への影響を調べたところ (Fig. 9B-E)、cytochalasin D により LpE の神経突起伸長作用は消失することがわかった。以上の結果より、LpE による神経突起伸長の促進にはエンドサイトーシスを介した LpE の取り込みが重要であることが示唆された。



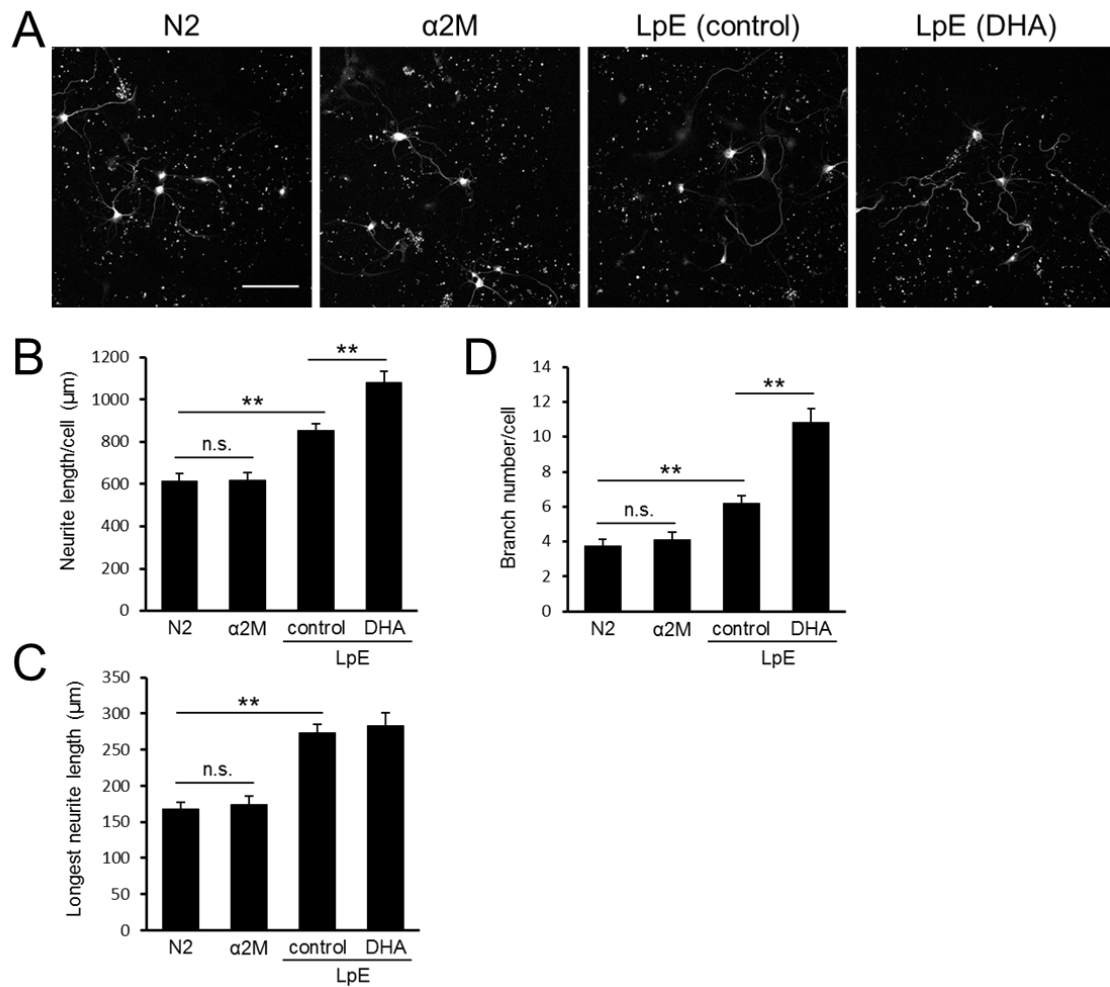


Fig. 8 LpE の神経突起伸長作用に対する  $\alpha 2M$  の効果

(A) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LpE あるいは 100 nM  $\alpha 2M$  を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、抗  $\beta\text{III-tubulin}$  抗体で免疫染色した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。(B-D) ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した ( $n = 45$ )。\*\*,  $P < 0.01$ 。

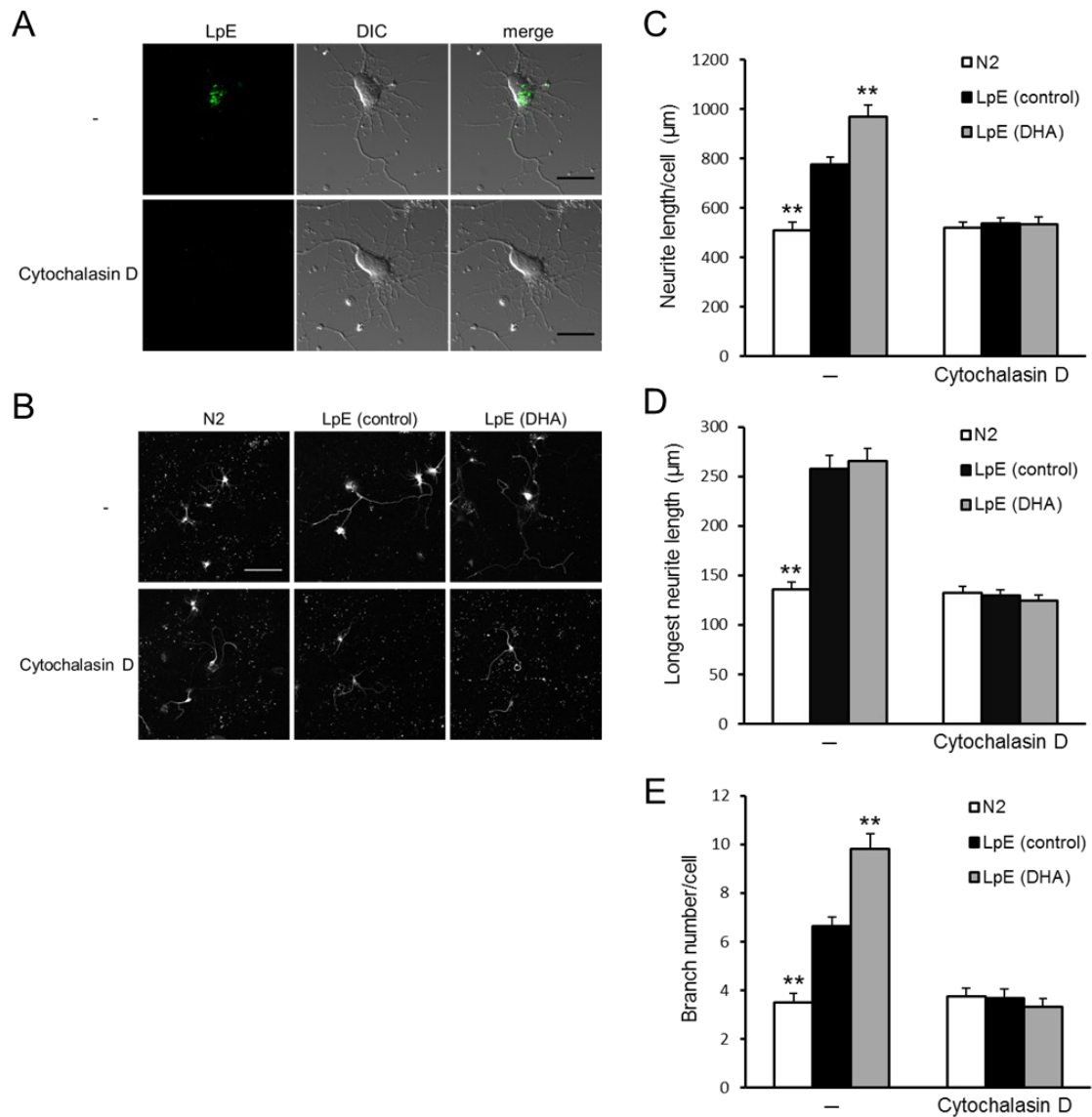


Fig. 9 LpE の神経突起伸長作用に対する cytochalasin D の効果

(A) ラット初代培養海馬神経細胞を 20  $\mu$ M の cytochalasin D 存在下で 2 時間培養した。その後、10  $\mu$ g/mL Alexa Fluor 488 標識 LpE + 20  $\mu$ M cytochalasin D を含む培地に交換して 3 時間培養し、蛍光を観察した。スケールバーは 20  $\mu$ m。 (B) ラット初代培養海馬神経細胞を NB + B27 + GlutaMAX で播種して 18 時間培養し、NB + N2 + GlutaMAX  $\pm$  20  $\mu$ M cytochalasin D に培地交換して 1 時間培養した。その後、NB + N2 + GlutaMAX  $\pm$  LpE  $\pm$  cytochalasin D に培地交換して 24 時間培養した。その後、NB + N2 + GlutaMAX に培地交換して 28 時間培養し、抗  $\beta$ III-tubulin 抗体で免疫染色した。スケールバーは 100  $\mu$ m。 (C-E) ImageJ で一細胞あたりの総神経突起長、最も長い神経突起長、一細胞あたりの神経突起の枝分かれの数を解析した。値は平均値+標準誤差として示した (n = 45)。\*\*, P < 0.01 (LpE (control)と比較)。

### PUFA 含有 LpE は神経突起伸長に関与する遺伝子発現に影響する

GAP-43 は主に神経突起に局在し、神経突起伸長を促進する<sup>39,40</sup>。遊離脂肪酸の EPA や DHA をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に直接添加すると GAP-43 の mRNA 発現を促進することが報告されているため<sup>41</sup>、PUFA 含有 LpE を神経細胞に添加して定量的 RT-PCR で GAP-43 mRNA 量を調べた (Fig. 10)。その結果、LpE (AA)、LpE (EPA)、LpE (DHA)は有意に GAP-43 mRNA 量を増加させることがわかった。

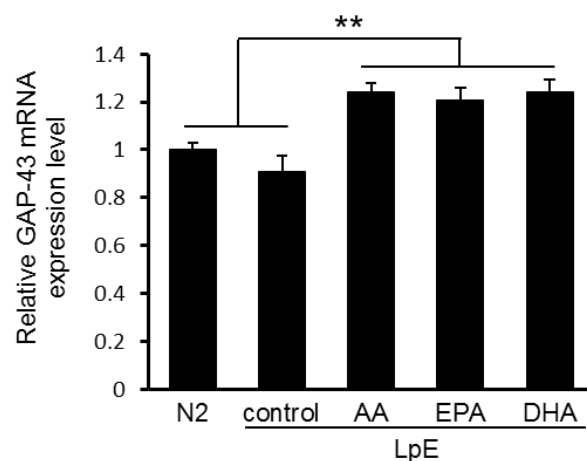


Fig. 10 PUFA 含有 LpE が GAP-43 発現に与える影響

10  $\mu\text{g/mL}$  LpE を含む培地でラット初代培養海馬神経細胞を 3 日間培養し、RNA を回収して GAP-43 の mRNA 量を定量的 RT-PCR により定量した。値は平均値+標準偏差として示した (n=3)。\*\*, P<0.01。

## 考察

PUFA はヒトの脳の脂肪酸の 25-30%を占めており、正常な脳の発達や機能に重要である<sup>14, 18</sup>。しかし、PUFA がどのように神経細胞に運ばれて作用するかは明らかとなっていなかった。本研究により、PUFA はグリア細胞の ABCA1 や ABCG1 によって産生される LpE のリン脂質の脂肪酸鎖に組み込まれて分泌され、LRP1 によるエンドサイトーシスにより神経細胞内に取り込まれて神経突起の枝分かれを増やし、神経突起伸長作用を示すことが示唆された (Fig. 11)。

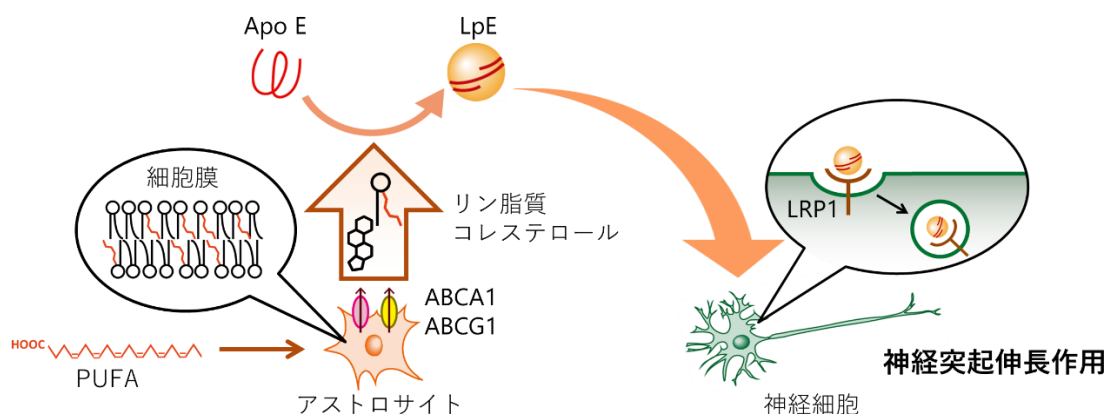


Fig. 11 PUFA 含有 LpE の作用経路

脳における主要なリポタンパク質である LpE は、アポトーシスの抑制やシナプス形成促進など神経細胞に様々な影響を及ぼす<sup>36, 42</sup>。本研究では、LpE が海馬神経細胞の神経突起伸長を促進することを明らかにした。LpE や  $\alpha 2M$  は LRP1 を介したシグナル経路で神経細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている<sup>24, 36</sup>。本研究により LpE による神経突起伸長作用も LRP1 を介していることが示されたが、 $\alpha 2M$  は神経突起伸長作用を示さなかった。さらに、LpE の抗アポトーシス作用はエンドサイトーシスを阻害する cytochalasin D で抑制されないことが報告されているが、本研究において LpE の神経突起伸長作用は cytochalasin D 処理で消失した。以上の結果から、抗アポトーシス作用と異なり、LpE の神経突起伸長作用には LRP1 を介したシグナル経路ではなく、LRP1 を介したエンドサイトーシスが重要であることが示唆された。

LC-MS/MS 解析により、グリア細胞に与えた PUFA が分泌された LpE のリン脂質脂肪酸鎖に取り込まれていることが示された。また、LpE (EPA) のリン脂質脂肪酸鎖には EPA (20:5n-3) そのものよりもドコサペンタエン酸 (22:5n-3) が多く取り込まれていた。この結果は、脳内では EPA は素早くドコサペンタエン酸に代謝されるという報告と一致していると考えられる<sup>43, 44</sup>。さらに、神経細胞ではなくアストロサイトが主に n-3 および n-6 PUFA の鎖長延長や不飽和化に関与するという報告があり<sup>45, 46</sup>、本研究においてもグリア細胞に与えた PUFA の代謝物が LpE リン脂質の脂肪酸鎖に認められた。これらのことから、グリア細胞、特に

アストロサイトは様々な種類の n-3 および n-6 PUFA を代謝して LpE リン脂質に組み込み、神経細胞に供給していることが考えられる。

AA や EPA が神経突起伸長作用を持つかどうかは長年議論されてきた。DHA に加えて AA や EPA も同様に神経突起伸長作用を示すという報告がある一方で<sup>47,48</sup>、DHA のみはその作用を示すという報告もある<sup>20</sup>。本研究において、DHA と同様に AA や EPA も LpE リン脂質脂肪酸鎖に組み込まれ、高い神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。ガスクロマトグラフィー質量分析法により LpE に結合している遊離脂肪酸としての PUFA を定量したところ、DHA は 0.08  $\mu\text{M}$ 、AA は 0.09  $\mu\text{M}$ 、EPA は 0.003  $\mu\text{M}$  であった。遊離の PUFA が神経突起伸長作用を示す濃度は 1.5-100  $\mu\text{M}$  と報告されており<sup>20,47,48</sup>、本研究で LpE に結合している濃度よりもはるかに高い濃度がその作用に必要であることから、本研究では LpE に結合している遊離脂肪酸ではなくリン脂質に組み込まれた PUFA が神経突起伸長作用を発揮したと考えられる。また、LpE 添加後の海馬神経細胞の膜リン脂質の脂肪酸鎖を解析したところ、LpE 間で差は認められなかった (Data not shown)。遊離の脂肪酸は細胞膜に効率的に取り込まれることが報告されているが<sup>21</sup>、LpE リン脂質に組み込まれている脂肪酸は異なる代謝を受けるのかもしれない。

PUFA は神経細胞の様々な遺伝子の発現に影響する。GAP-43 は神経細胞で高発現しており、遊離の EPA や DHA は神経芽細胞腫の GAP-43 の発現を増加させて神経突起伸長を促進する<sup>39-41</sup>。LpE (AA)、LpE (EPA)、LpE (DHA) は GAP-43 mRNA 量を増加させたことから、LpE に組み込まれた PUFA は神経突起伸長に関与する遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられる。しかし、より詳細な分子メカニズムを解明するためには網羅的な遺伝子解析が必要である。また、リン脂質に組み込まれた PUFA は膜の流動性を増加させ、神経突起伸長に重要な膜タンパク質の機能や小胞融合などにも影響を与える<sup>49</sup>。そのため、神経突起伸長を促進するメカニズムは一つではない可能性もある。

アストロサイトや内皮細胞は血液脳関門の構成要素であり、神経細胞への PUFA の供給に重要な役割を持つと考えられている<sup>46,50</sup>。血液脳関門の内皮細胞に特異的に発現する膜タンパク質 Mfsd2a は DHA をリゾホスファチジルコリンに組み込んで輸送すると報告されている<sup>51</sup>。本研究では、PUFA がグリア細胞に取り込まれて LpE リン脂質の脂肪酸鎖として分泌されることを示した。さらに、PUFA 含有 LpE は海馬神経細胞の突起の枝分かれを促進し、神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。本研究により、脳の発達や機能に重要な PUFA の新たな作用経路が明らかになった。



## 第二章

### ABCA13 による脂質輸送および精神疾患との関連





## 第二章

### ABCA13 による脂質輸送および精神疾患との関連

ABCA13 は 2 つの NBD と 2 つの TMD を持つフルサイズの ABC タンパク質である<sup>52</sup>。ABCA13 は特徴的な長い N 末端を持ち、ABC タンパク質ファミリーの中で最もサイズが大きく、ヒトでは 5,058 アミノ酸 (約 570 kDa) のサイズが報告されている。また、N 末端が欠損した 2,323 アミノ酸 (約 260kDa) のバリエーションも報告されている<sup>53, 54</sup>。ABCA13 の mRNA の発現量は、ヒトでは気管、精巣、骨髄で高く、マウスでは顎下腺、精巣上体、卵巣、胸腺で高い<sup>52, 54</sup>。また、マウス脳で ABCA13 のタンパク質レベルでの発現が認められている<sup>13, 55</sup>。がん化細胞においては、ABCA13 は白血病、前立腺がん、神経膠芽腫の細胞株で高発現する。

ABCA13 は ABCA サブファミリーに属しており、ABCA サブファミリーの多くは脂質を輸送することが報告されている<sup>56, 57</sup>。たとえば、ABCA1 はコレステロールやホスファチジルコリン<sup>58, 59</sup>、ABCA3 は肺サーファクタントに含まれるリン脂質<sup>60-63</sup>、ABCA4 は N-レチニリデン-ホスファチジルエタノールアミン<sup>64</sup>、ABCA7 はホスファチジルコリンやリゾホスファチジルコリン<sup>65, 66</sup>、ABCA12 はグルコシルセラミドを輸送する<sup>67</sup>。このことから、ABCA13 も脂質を輸送する可能性が考えられるが、その分子機能は未だにわかっていない。

興味深いことに、2009 年に ABCA13 遺伝子の変異が統合失調症、双極性障害、うつ病などの精神疾患の発症リスクとなる可能性が報告された<sup>13</sup> (Fig. 12)。大規模な解析の結果、双極性障害の患者に H3609P、T4031A、T4550A の 3 つの変異が、統合失調症の患者に R4843C の変異が統計学的に有意な差をもって見出された。しかし、別の患者グループでの研究結果ではその遺伝子変異と精神疾患の関連性を見出せておらず<sup>68</sup>、ABCA13 と精神疾患の関係性については結論が出ていない。また、ABCA13 ヘテロ欠失サル個体において、自閉症スペクトラム障害に特徴的な社会性の障害や限局的な行動が報告されている<sup>69, 70</sup>。ただし、この個体はセロトニン 2C 受容体にナンセンス変異を持っており、セロトニン 2C 受容体の機能低下と自閉症スペクトラム障害との関連がすでに報告されているため、ABCA13 の変異が自閉症様の行動を引き起こしているかはわからない。さらに、ABCA13 遺伝子と相同性の高いホモログ CG1718 をノックダウンしたショウジョウバエにおいて他個体との距離の増加や概日性リズムの異常が報告されているが、CG1718 のアミノ酸配列やタンパク質のサイズは ABCA3 に最も近い<sup>71</sup>。そのため、これらの研究からは ABCA13 と精神疾患の直接的な関係は証明されていない。

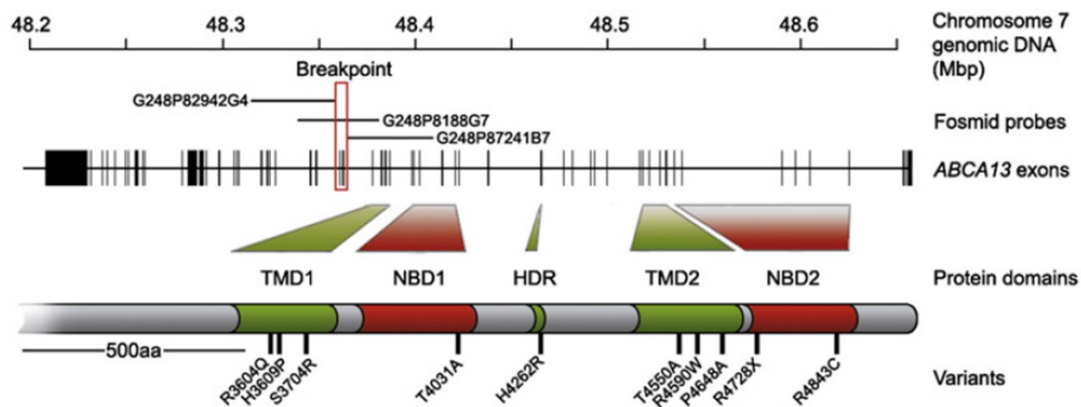


Fig. 12 精神疾患患者で見つかった ABCA13 遺伝子の変異 (Am J Hum Genet. 2009 Dec;85(6):833-46.より引用)

本研究では、ABCA13 の分子機能や生理的役割を解明し、精神疾患の病態生理との関連を明らかにすることを目的とした。ABCA13 は膜脂質を輸送する ABCA サブファミリーに属することから、ABCA13 も脂質輸送体として機能するのではないかと仮説を立て、検証を行った。

## 材料と方法

### 材料

マウス ABCA13 の免疫染色には、マウス ABCA13 C 末端ペプチドを抗原として作製したラビット抗 ABCA13 ポリクローナル抗体を使用した<sup>55</sup>。ヒト ABCA13 の免疫染色には、ラビット抗 ABCA13 抗体 (#HPA063601)を Sigma-Aldrich より購入して使用した。ABCA13 のウエスタンブロッティングには、ラビット抗 ABCA13 抗体 (#LS-C373172)を LifeSpan BioSciences (Seattle, WA)より購入して使用した。マウス抗  $\beta$ -tubulin 抗体、methyl-beta-cyclodextrin (M $\beta$ CD)、フィリピンは Sigma-Aldrich より購入した。マウス抗  $\beta$ -actin 抗体は Abcam (Cambridge, UK)より購入した。マウス抗  $\beta$ III-tubulin 抗体は Merck Millipore より購入した。Alexa Fluor 555 標識コレラトキシンサブユニット B、FM 4-64、propidium iodide (PI)、TOTO-3 は Invitrogen より購入した。ATTO-594 標識 GM1、GM3 は岐阜大学の安藤弘宗博士、河村奈緒子博士よりご供与いただいた<sup>72</sup>。

### クローニングおよびプラスミドの構築

マウス腎臓の cDNA をテンプレートとして、ABCA13 遺伝子 (NCBI accession No. NM\_178259)のオープンリーディングフレームをコードする配列を PCR で増幅し、pcDNA3.1/Hygro (+)に挿入した。EGFP は ABCA13 遺伝子の C 末端に挿入した。PCR により ABCA13 の N 末端 2891 アミノ酸を欠失した  $\Delta$ N 末端変異体を作製した。他の ABCA13 変異体は In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA)を用いて作製した。Cas9 と ABCA13 に対する single guide RNA (sgRNA)を発現するプラスミドは、オリゴ (5'-AGGGCTGGCACGTGCAGCGA-3')を pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 プラスミドの BbsI 部位に挿入して作製した<sup>73</sup>。

### 細胞培養とトランスフェクション

HEK293 細胞は 10% FBS を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞は、poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) コート済みのカバーグラスに  $6.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。播種 24 時間後、Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent (Invitrogen)を用いてプラスミドをトランスフェクションし、さらに 48 時間培養した。U2OS 細胞は 10% FBS を含む McCoy's 5A medium を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞は、フィブロネクチン (Sigma-Aldrich) コート済みのカバーグラスに  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。播種 24 時間後、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen)を用いて ABCA13 に対する stealth RNAi siRNA (5'-GGAGTACTTGCTGGCACCATCTGAA-3')あるいは stealth RNAi siRNA negative control (Invitrogen)をトランスフェクションし、さらに 48 時間培養した。初代培養神経細胞は、神経細胞用分散液 (富士フィルム和光純薬)を用いてマウス新生仔 (生後 0 日)の大脳皮質から調製した。分散した神経細胞は、B-27 supplement、GlutaMAX を含む

Neurobasal medium に懸濁し、poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) コート済みのカバーガラスに  $2.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 14 日間培養した。

### 細胞免疫染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温 15 分間静置して固定し、0.25% Triton-X100 溶液中で室温 5 分間静置した。その後、10%ヤギ血清中で室温 1 時間静置してブロッキングし、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。その後、Alexa Fluor 標識二次抗体と PI あるいは TOTO-3 を室温 1 時間で反応させた。観察には、共焦点顕微鏡 LSM 700、油浸対物レンズ alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 NA、あるいは倒立顕微鏡 IX83、油浸対物レンズ Plan Apo 60×/1.40 NA (オリンパス)を用いた。

### フィリピン染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温 15 分間静置して固定し、0.25% Triton-X100 溶液中で氷上 5 分間静置した。その後、0.05 mg/mL filipin 溶液中で室温 30 分間静置した。観察には倒立顕微鏡 IX83、油浸対物レンズ Plan Apo 60×/1.40 NA を用いた。

### EGFP-D4 の精製

EGFP- $\theta$  toxin domain 4 (D4)の発現プラスミドはストラスブール大学の小林俊秀博士よりご供与いただいた<sup>74</sup>。EGFP-D4 発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)株に導入した。IPTG で発現を誘導した後、大腸菌を回収し、PBS で再懸濁した。細胞懸濁液を超音波処理し、遠心して得られた上清から EGFP-D4 を Profinity IMAC Ni-Charged Resin (BIO-RAD)を用いて精製した。精製した EGFP-D4 は Amicon Ultra-3K (Merck Millipore)を用いて濃縮した。

### EGFP-D4 による細胞膜の染色

細胞を 0.02% BSA を含む 5 mM M $\beta$ CD/DMEM で 37°C、10 分間処置した。その後、細胞を HBSS で洗浄し、0.1% BSA を含む 5  $\mu$ g/mL EGFP-D4/HBSS で 37°C、30 分間処置した。その後、細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温 15 分間静置して固定した。観察には共焦点顕微鏡 LSM 700、油浸対物レンズ alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 NA を用いた。

### EGFP-D4 による細胞内コレステロールの染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液中で室温 10 分間静置して固定し、0.25% Triton-X100 溶液中で氷上 5 分間静置した。細胞を 0.1% BSA を含む 5  $\mu$ g/mL EGFP-D4/HBSS 中で室温 30 分間静置し、その後 4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて再度固定した。共焦点顕微鏡 LSM 700、油浸対物レンズ alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 NA を用いて細胞を観察し、取得した画像の各細胞の EGFP 蛍光強度を ImageJ により定量した。

## 生細胞イメージング

細胞に 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Alexa Fluor 555 標識コレラトキシンサブユニット B、1  $\mu\text{M}$  ATTO594 標識 GM1、あるいは ATTO594 標識 GM3 を添加して 37°C、30 分間静置した。その後、0.02% BSA/DMEM に培地交換してさらに 30 分間静置し、共焦点顕微鏡 LSM 700、油浸対物レンズ alpha Plan-Apochromat 100 $\times$ /1.46 NA を用いて細胞を観察した。HEK293 細胞を用いた FM 4-64 の実験では、細胞を 0.02% BSA を含む 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FM 4-64/HBSS で 37°C、30 分間静置し、洗浄後に細胞を観察した。初代培養神経細胞を用いた FM 4-64 の実験では、細胞を 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FM 4-64/high K<sup>+</sup> buffer (60 mM KCl、67 mM NaCl、30 mM glucose、2 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、25 mM HEPES、pH 7.4)中で 37°C、3 分間静置した。その後、細胞を Ca<sup>2+</sup>-free buffer (2 mM KCl、125 mM NaCl、30 mM glucose、2 mM MgCl<sub>2</sub>、25 mM HEPES、pH 7.4)で 10 分間洗浄し、共焦点顕微鏡 LSM 700、油浸対物レンズ alpha Plan-Apochromat 100 $\times$ /1.46 NA を用いて細胞を観察した。各細胞の蛍光強度は ImageJ により定量した。

## 脂質解析

クロロホルム/メタノール溶液 (2:1)を用いて HEK293 細胞から脂質を抽出し、イソプロパノールに溶解した。その後、コレステロール量は遊離コレステロール E-テストワコーキット (富士フイルム和光純薬)により、コリンリン脂質量はリン脂質 C-テストワコーキット (富士フイルム和光純薬)により定量した。

## ウエスタンブロッティング

培養細胞あるいは組織を RIPA lysis buffer により溶解し、等量のタンパク質を SDS-PAGE に供して分離した。その後、PVDF メンブレンに転写し、抗体を用いてバンドを検出した。

## ABCA13 KO マウスの作製と維持

ABCA13 KO マウスは CRISPR/Cas システムにより作製し<sup>73</sup>、ABCA13 に対する sgRNA のデザインには CRISPRdirect を用いた<sup>75</sup>。Cas9 と sgRNA を発現するプラスミドを C57BL/6N マウスの受精卵にインジェクションし、誕生したマウスの ABCA13 遺伝子の変異を DNA シーケンスによって確認した。マウスは生後 2 週齢で遺伝子型判別を実施し、ABCA13 ヘテロ KO マウス同士を交配させて同腹仔の野生型と ABCA13 KO マウスを実験に用いた。

## ジェノタイプング

マウスの遺伝子型はゲノム DNA を用いた PCR により判別した。PCR には KOD FX Neo (東洋紡)と以下のプライマー (フォワード: 5'-AACTAGCAACTGGGCTCTGG-3'、リバーズ: 5'-CATCTGACAGCAAAGGCTGC-3')を用いた。PCR 条件は、① 94°C 2 分間、② (98°C 10 秒間、68°C 60 秒間)×30 サイクルで実施した。

### マウス組織の採取

マウスを安楽死させ、腎臓、脳、骨髄を採取し、液体窒素を用いて迅速に凍結した。組織はタンパク抽出まで-80°Cで保存した。

### 驚愕反応、プレパルスインヒビション試験

驚愕反応実験装置 (小原医科産業)を用いて驚愕反応とプレパルスインヒビションを測定した。マウスをプラスチック製シリンダーの中に入れて10分間馴化した。40 msecの音刺激を呈示して加速度計によりマウスの体動を140 msec記録し、その時間の中の最大反応強度を驚愕反応の指標とした。驚愕反応測定時の音刺激は120 dBに設定し、プレパルス音刺激は70、75、80、85 dBとした。プレパルス音刺激は、驚愕反応測定時の音刺激の100 msec前に設定した。

### 統計解析

蛍光強度、コレステロール量の統計解析には、対応のない Student's t-test あるいは one-way ANOVA 後に Dunnett's test を実施した。驚愕反応、プレパルスインヒビションの統計解析には、対応のない Student's t-test あるいは two-way repeated measures ANOVA を実施した。

## 結果

### 570 kDa の ABCA13 は細胞内小胞に局在する

マウスで主に発現している ABCA13 のサイズを検討するため、マウス腎臓を用いて ABCA13 のウエスタンブロッティングを実施したところ、>460 kDa のサイズにバンドが認められた (Fig. 13A)。長い N 末端領域を持ったフルサイズの ABCA13 の予想サイズは 570 kDa であることから、マウスではフルサイズの ABCA13 が主に発現していることが示唆された。次に、ABCA13 の分子機能を検討するため、フルサイズの ABCA13 (5,034 アミノ酸) をマウス腎臓からクローニングし、HEK293 細胞にトランスフェクションした。ABCA13 のウエスタンブロッティングを実施したところ、ABCA13 の発現を確認できた (Fig. 13B)。免疫染色により細胞内局在を調べたところ、ABCA13 は細胞内小胞に局在することが明らかになった (Fig. 13C)。

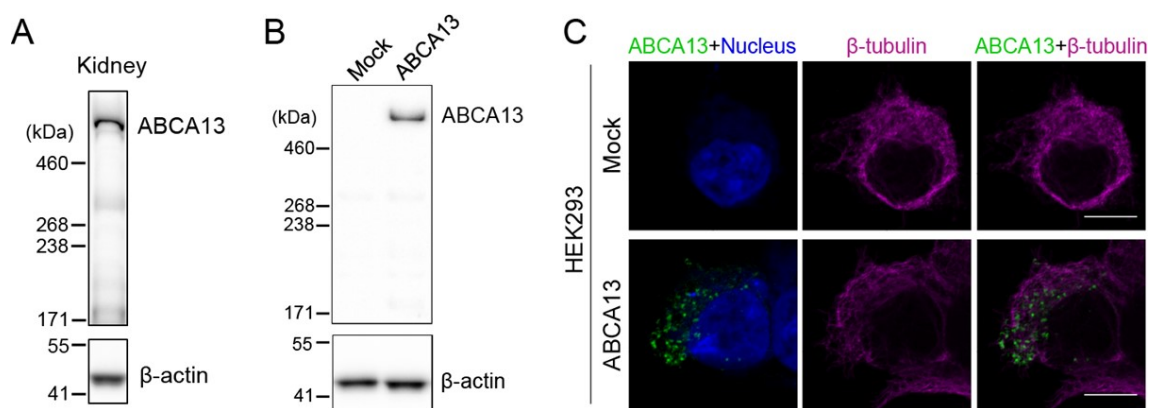


Fig. 13 フルサイズの ABCA13 は細胞内小胞に局在する

(A) 野生型マウスの腎臓を採取し、ウエスタンブロッティングで ABCA13 を検出した。 $\beta$ -actin はローディングコントロールとして用いた。(B) HEK293 細胞にマウス ABCA13 を一過性発現させ、ウエスタンブロッティングで ABCA13 を検出した。 $\beta$ -actin はローディングコントロールとして用いた。(C) ABCA13 を一過的に発現させた HEK293 細胞を固定、透過処理をした後に、抗 ABCA13 抗体、抗  $\beta$ -tubulin 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

### ABCA13 は細胞内小胞にコレステロールを蓄積させる

ABCA サブファミリーの多くは脂質輸送に関与する<sup>56,58-67</sup>。そこで、ABCA13 も脂質輸送に関与するのではないかと仮説を立て、コレステロール結合性蛍光プローブであるフィリピンを用いて、細胞内コレステロールの分布を評価した (Fig. 14A)。その結果、ABCA13 が局在する小胞にフィリピンの強い蛍光が認められた。一方で、コントロールの細胞では小胞にそのような強い蛍光は認められなかった。この結果から ABCA13 は細胞内小胞にコレステロールを蓄積させるのではないかと考え、コレステロールの豊富な膜ドメインにのみ結合する蛍光プローブである EGFP-D4 を用いて<sup>74,76</sup>、細胞内のコレステロールを染色した (Fig. 14B)。その結果、EGFP-D4 の強いシグナルは ABCA13 発現細胞にのみ認められ、そのシグナルは ABCA13 と共局在した。EGFP-D4 蛍光の定量的解析を実施したところ、コントロールの細胞と比較して ABCA13 発現細胞で有意に強い蛍光が認められた (Fig. 14C)。以上の結果から、一過的に発現させた ABCA13 は細胞内小胞にコレステロールを蓄積させることが示唆された。

ヒト内在性 ABCA13 も同様に細胞内小胞に局在しコレステロールを蓄積させるかを検証するため、ヒト骨肉腫細胞株である U2OS 細胞を用いて ABCA13 の免疫染色を実施したところ、ヒト内在性 ABCA13 の細胞内小胞への局在が認められた (Fig. 14D)。また、ABCA13 が局在する小胞にフィリピンの強いシグナルが検出された (Fig. 14E)。以上の結果から、マウス ABCA13 と同様にヒト内在性 ABCA13 も細胞内小胞にコレステロールを蓄積させることが示唆された。



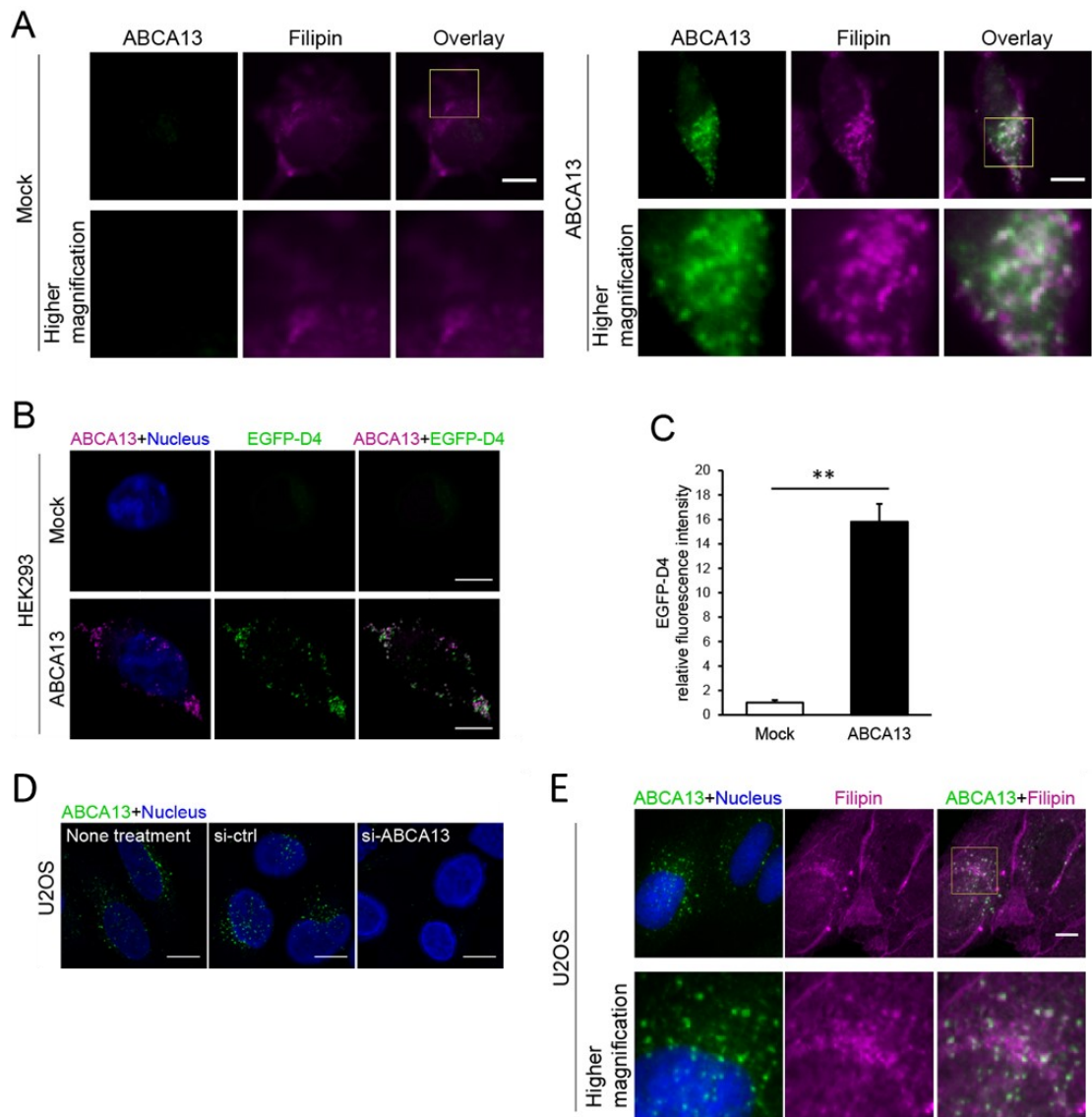


Fig. 14 ABCA13 は細胞内小胞にコレステロール蓄積を引き起こす

(A) ABCA13 を一過性発現させた HEK293 細胞を固定、透過処理をした後に、フィリピンを反応させ、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(B) ABCA13 を一過性発現させた HEK293 細胞を固定、透過処理をした後に、EGFP-D4 を反応させ、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(C) 一細胞あたりの EGFP-D4 蛍光強度を ImageJ で定量し、相対値で示した。値は平均値 + 標準誤差で示した (Mock, n = 8; ABCA13, n = 10)。\*\*,  $P < 0.01$ 。(D) U2OS 細胞に ABCA13 を標的とした siRNA あるいはネガティブコントロール siRNA をトランスフェクションし、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。(E) U2OS 細胞を固定、透過処理をした後に、フィリピンを反応させ、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は PI で染色した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### ABCA13 は逆行性輸送によりコレステロールやガングリオシドを細胞内小胞に取り込む

細胞内コレステロールの 40-90%は細胞膜に存在し、脂質は細胞膜と細胞内小器官間で輸送されていることから<sup>77-79</sup>、ABCA13 は細胞膜由来のコレステロールを小胞に蓄積させるのではないかと考えた。そこで、細胞膜非透過性プローブである EGFP-D4 を生細胞に反応させて細胞膜外層のコレステロールのみを標識し<sup>80</sup>、37°Cで培養して細胞膜由来のコレステロールのトラッキングを行った (Fig. 15A)。その結果、EGFP-D4 は ABCA13 発現細胞内に取り込まれ、ABCA13 との共局在が認められた。また、細胞膜のコレステロールを引き抜く M $\beta$ CD を前処置しておく<sup>81</sup>、EGFP-D4 の細胞内取り込みは消失した。以上の結果から、ABCA13 は細胞膜のコレステロールを細胞内小胞に輸送することが示唆された。

ガングリオシドは細胞膜でコレステロールとともにマイクロドメインを形成することが知られている<sup>72, 82, 83</sup>。そこで、GM1 や GM3 のようなガングリオシドが ABCA13 の局在する小胞に取り込まれるかを検証した。C 末端に EGFP を融合した ABCA13 を HEK293 細胞にトランスフェクションし、ATTO594 標識 GM1 あるいは GM3 を細胞に添加して 37°C で静置したところ、ABCA13 が局在する小胞への GM1 と GM3 の蓄積が認められた (Fig. 15B)。このような小胞へのガングリオシドの蓄積はコントロール細胞では認められなかった。さらに、ガングリオシドに結合することが報告されている Alexa Fluor 555 標識コレラトキシンサブユニット B を細胞に添加して培養したところ<sup>84</sup>、コレラトキシンサブユニット B は ABCA13 の局在する小胞と共局在した (Fig. 15C)。これらの結果から、ABCA13 は細胞内ガングリオシドの分布にも影響を与えることが示唆された。

FM 4-64 は、細胞膜非透過性であり細胞膜に挿入されると強い蛍光を発する脂質プローブであるため、エンドサイトーシス小胞や脂質のトラッキングなどによく使用される<sup>85, 86</sup>。そこで、FM 4-64 を細胞に添加したところ、ABCA13 の局在する小胞に取り込まれることがわかった (Fig. 15D)。また、HEK293 細胞のコレステロールとコリンリン脂質の比は ABCA13 発現によって変化しなかったため (Fig. 16)、ABCA13 は細胞の総コレステロール量には影響を及ぼさないことが示唆された。以上の結果から、ABCA13 は逆行性輸送により細胞膜の脂質を小胞に取り込んでいることが示唆された。

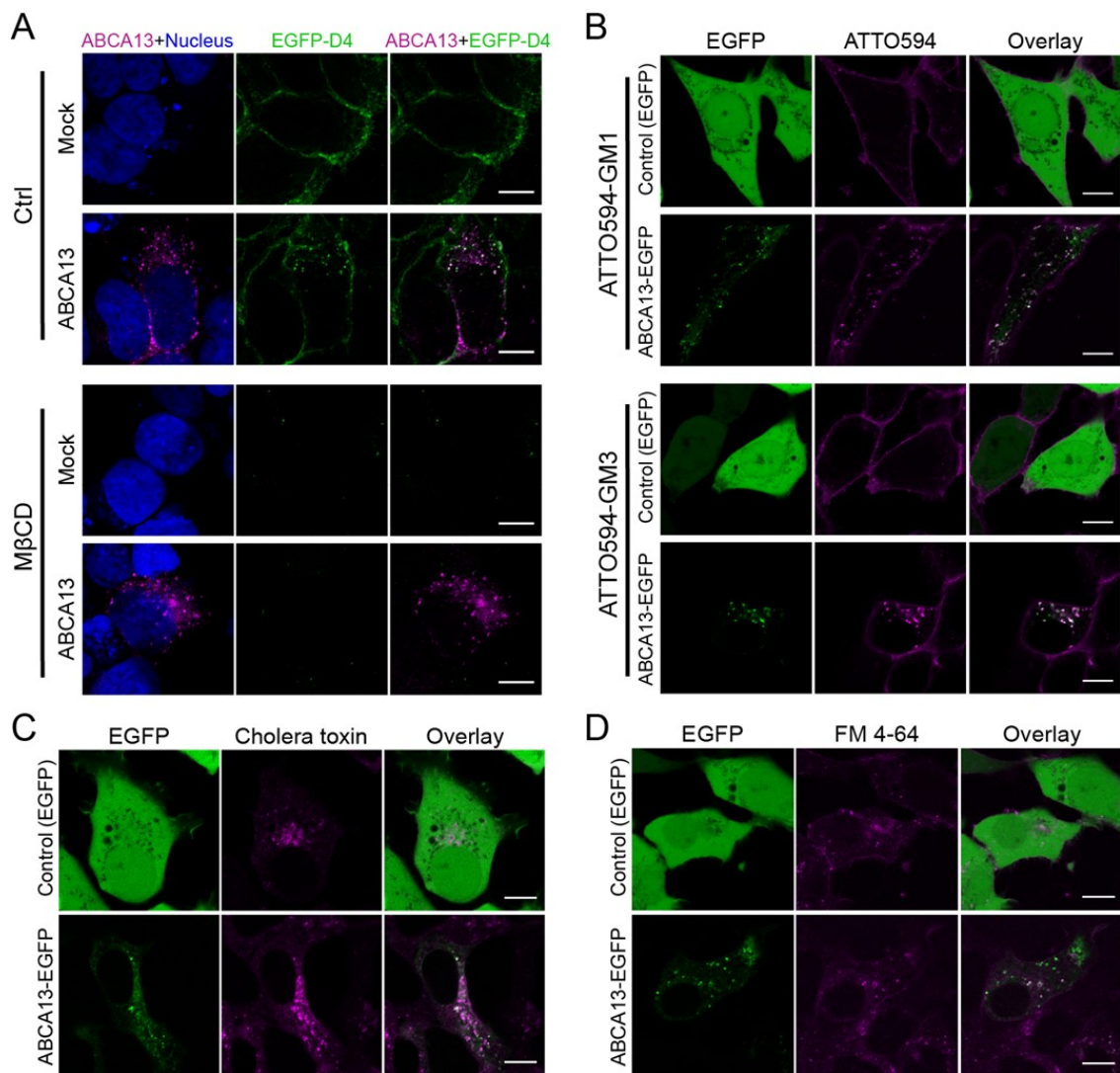


Fig. 15 ABCA13 は細胞膜から細胞内小胞への脂質輸送を引き起こす

(A) ABCA13 を一過性発現させた HEK293 細胞に M $\beta$ CD を添加して 37°C、10 分間静置した。その後、EGFP-D4 を 37°C、30 分間反応させ、細胞を固定、透過処理をした後に抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。(B, C) ABCA13-EGFP あるいは EGFP を一過性発現させた HEK293 細胞に ATTO594 標識 GM あるいは Alexa Fluor 555 標識コレラトキシンサブユニット B を添加して 37°C、30 分間静置した。その後、プローブの無い培地に交換してさらに 37°C、30 分間静置し、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。(D) ABCA13-EGFP あるいは EGFP を一過性発現させた HEK293 細胞に FM 4-64 を添加して 37°C、30 分間静置した。その後、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 10  $\mu$ m。

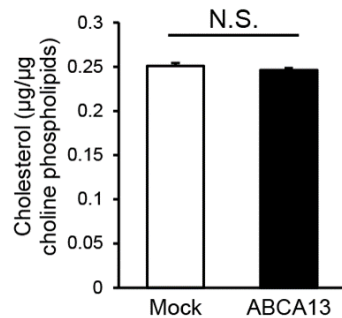


Fig. 16 ABCA13 は細胞のコレステロール量に影響を与えない

ABCA13を一過性発現させた HEK293 細胞から脂質を抽出し、コレステロールとコリンリン脂質量を比色法により定量した。結果はコリンリン脂質に対するコレステロールの比を平均値+標準誤差として示した (n = 4)。

#### ABCA13 によるコレステロール輸送には N 末端領域と ATP 加水分解活性が必要である

ABCA13 には N 末端側の 2,891 アミノ酸を欠失したバリエーションの存在も報告されている<sup>53, 54</sup>。そこで、ABCA13 の機能に N 末端領域が必要かどうかを検証することにした。まず、N 末端領域を欠失した ΔN 末端変異体を作製し (Fig. 17A)、HEK293 細胞にトランスフェクションしてウエスタンブロッティングで発現を確認した (Fig. 17B)。ABCA13 の免疫染色を実施したところ ΔN 末端変異体は小胞体様の局在を示し、さらに細胞内には EGFP-D4 のシグナルは認められなかった (Fig. 17C)。以上の結果から、N 末端領域は ABCA13 の細胞内小胞への局在や機能に必要であることがわかった。

ABC タンパク質は ATP の結合と加水分解のエネルギーを利用して機能することが知られている<sup>87</sup>。そこで、ABCA13 のコレステロールの取り込みに ATP の加水分解が必要かを検証することにした。NBD の Walker A モチーフのリジンは ABC タンパク質の ATP 加水分解活性に必要であり、メチオニンに置換したものは活性が失われることが知られている<sup>88, 89</sup>。そこで、NBD1 にその変異を持つ K3849M 変異体、NBD2 に変異を持つ K4735M 変異体、NBD1 と NBD2 の両者に変異を持つ MM 変異体を作製した (Fig. 17A)。HEK293 細胞にトランスフェクションしてウエスタンブロッティングで発現を確認したところ、野生型の ABCA13 と同程度の発現が認められた (Fig. 17B)。これらの変異体は、野生型と同様に細胞内小胞に局在したが、その小胞には EGFP-D4 のシグナルは認められなかった (Fig. 17C)。以上の結果から、ABCA13 のコレステロールの取り込みには ATP の加水分解が必要であることがわかった。

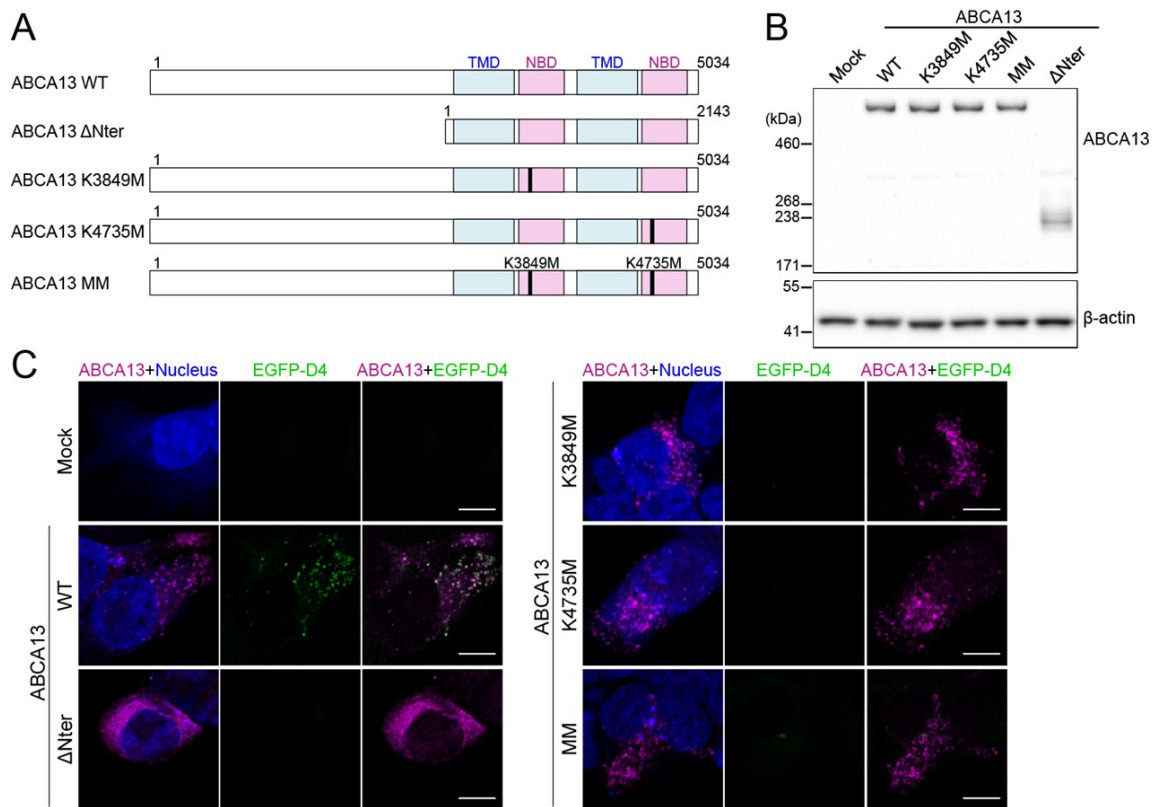


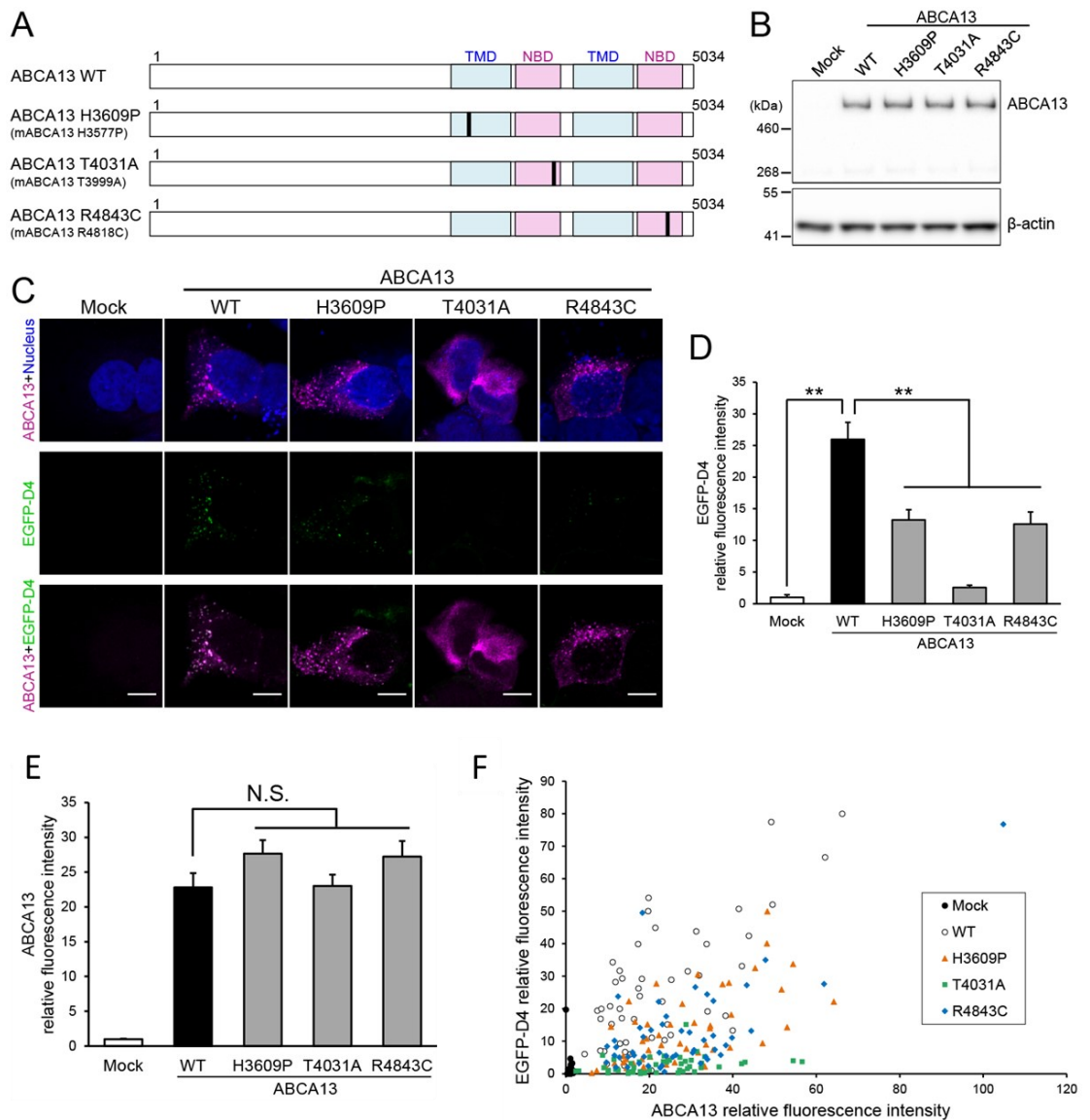
Fig. 17 ABCA13 の機能には N 末端領域と ATP 加水分解が必要である

(A) 本実験で使用した ABCA13 変異体を図で示した。TMD と NBD はそれぞれ青色と赤色で示した。アミノ酸変異は黒色太線で示した。数字はアミノ酸番号を示している。(B) HEK293 細胞にマウス ABCA13 あるいは変異体を一過性発現させ、ウエスタンブロッティングで ABCA13 を検出した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。(C) ABCA13 あるいは変異体を一過性発現させた HEK293 細胞を固定、透過処理をした後に、EGFP-D4 を反応させ、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。スケールバーは 10 μm。

### 精神疾患発症リスクと関連する遺伝子変異により ABCA13 の局在や機能が障害される

ABCA13 遺伝子の変異は精神疾患の発症リスクとなる可能性が報告されており、H3609P、T4031A、T4550A の 3 つの変異が双極性障害の患者に、R4843C の変異が統合失調症の患者に頻度高く認められた<sup>13</sup>。そこで、これらの変異が ABCA13 に与える影響を調べるため、H3609P、T4031A、R4843C の変異をマウス ABCA13 の対応する部位 (H3577P、T3999A、R4818C) に導入した (Fig. 18A)。なお、ヒト ABCA13 の T4550 はマウスでは保存されていないため、本研究では T4550A に相当する変異体は作製しなかった。HEK293 細胞に野生型の ABCA13 と変異体をトランスフェクションし、ウエスタンブロッティングで発現を確認したところ、野生型と変異体で同程度の発現が認められた (Fig. 18B)。免疫染色により ABCA13 の細胞内局在を確認したところ、T4031A 変異体は細胞内小胞ではなく小胞体様の局在を示した (Fig. 18C)。さらに、EGFP-D4 により細胞内のコレステロールを染色したところ、いずれの変異体においても細胞内小胞へのコレステロール蓄積が低下していたが (Fig. 18C, D)、ABCA13 のシグナル強度は野生型と変異体で変化がなかった (Fig. 18E)。また、一細胞ごとに ABCA13 と EGFP-D4 の相対蛍光強度をプロットしたところ、ABCA13 変異による EGFP-D4 シグナルへの影響が顕著に認められた (Fig. 18F)。これらの結果から、精神疾患の発症リスク変異により ABCA13 の細胞内局在やコレステロール輸送に障害が認められることが示唆された。





**Fig. 18** 精神疾患と関連する変異により ABCA13 の細胞内局在や機能が障害される  
 (A) 本実験で使用した ABCA13 変異体を図で示した。TMD と NBD はそれぞれ青色と赤色で示した。アミノ酸変異は黒色太線で示した。数字はアミノ酸番号を示している。(B) HEK293 細胞にマウス ABCA13 あるいは変異体を一過性発現させ、ウエスタンブロッティングで ABCA13 を検出した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。(C) ABCA13 あるいは変異体を一過性発現させた HEK293 細胞を固定、透過処理をした後に、EGFP-D4 を反応させ、抗 ABCA13 抗体で免疫染色した。核は TOTO-3 で染色した。スケールバーは 10 μm。(D) 一細胞あたりの EGFP-D4 の蛍光強度を ImageJ で定量し、相対値で示した。値は平均値+標準誤差で示した (n=50)。\*\*, P<0.01。(E) 一細胞あたりの ABCA13 の蛍光強度を ImageJ で定量し、相対値で示した。値は平均値+標準誤差で示した (n=50)。(F) 細胞ごとに EGFP-D4 と ABCA13 の相対蛍光強度をプロットした。

### ABCA13 KO マウスはプレパルスインヒビションの障害を示す

次に、ABCA13 の生理的役割を解明するため、CRISPR/Cas システムを用いて ABCA13 KO マウスを作製した<sup>73,90</sup>。フルサイズ (5,034 アミノ酸) と N 末端欠損サイズ (2,143 アミノ酸) の両者を欠失させるため、両者のオープンリーディングフレームを含む exon 21 を標的として sgRNA を設計した (Fig. 19A)。C57BL/6N 系統のマウス受精卵に Cas9 と sgRNA を発現するプラスミドをインジェクションして誕生したマウスの遺伝子配列を解析し、ABCA13 の exon21 に 83 bp の欠失変異を持ち、exon22 に未成熟終止コドンを持つ KO マウスラインを作製することができた。ジェノタイピング PCR を実施したところ、野生型マウスは 576 bp に、ABCA13 KO マウスは 493 bp に PCR 産物を確認できた (Fig. 19B)。また、マウス腎臓、脳、骨髄のウエスタンブロットティングにより、ABCA13 KO マウスにおいて 570 kDa の ABCA13 の欠失を確認できた (Fig. 19C)。一方で、N 末端欠損 ABCA13 の想定サイズである 240 kDa 付近に認められるバンドは野生型と KO マウスの両方で認められたため、これらは非特異的バンドであると考えられた。以上の結果から、マウスでは 570 kDa の ABCA13 が主に発現しており、作製した KO マウスラインにおいて ABCA13 が欠失していることを確認できた。

ABCA13 KO マウスは問題なく誕生し、正常な見た目と寿命を有していた。このマウスが精神神経学的異常を示すか検討するため、網羅的行動テストバッテリーを実施した。その結果、体重、オープンフィールド試験、明暗遷移試験、高架式十字迷路試験、ホットプレート試験、社会的相互作用試験、強制水泳試験、ローターロッド試験、Y 字型迷路試験、バーンズ迷路試験、恐怖条件付け試験、尾懸垂試験では異常は認められなかったが (Data not shown)、驚愕反応/プレパルスインヒビション試験で異常が認められた。プレパルスインヒビションとは、驚愕刺激 (パルス) の直前に微弱な刺激 (プレパルス) が先行することで驚愕反応が抑制される現象であり、ヒトと動物に共通した感覚運動フィルター機構の一種である<sup>91</sup>。プレパルスインヒビションの障害は統合失調症や双極性障害の患者、統合失調症の動物モデルなどで認められることがよく知られている<sup>91-93</sup>。ABCA13 KO マウスの驚愕反応は野生型マウスと差はなかったが、ABCA13 KO マウスではプレパルスインヒビションの低下が認められた (Fig. 19D)。以上の結果から、ABCA13 KO マウスは感覚運動フィルター機構に障害を持つことが示唆された。



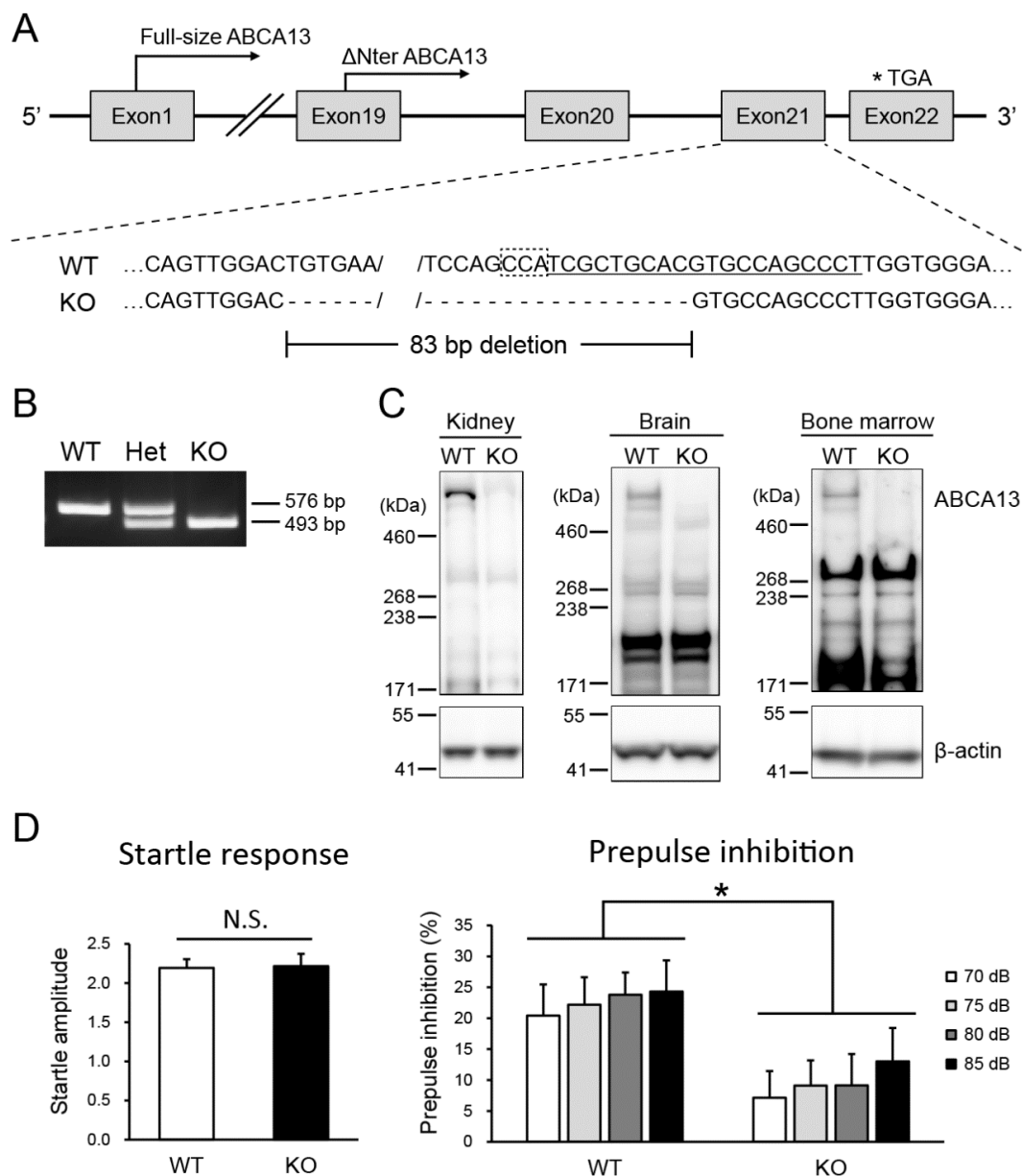


Fig. 19 ABCA13 KO マウスはプレパルスインヒビションの障害を示す

(A) CRISPR/Cas システムによって引き起こした変異を図で示した。ABCA13 遺伝子座を示しており、上側が野生型、下側が KO マウスのゲノム配列である。sgRNA 配列は下線、PAM 配列は点線四角で示した。アスタリスクは 83 bp の欠失によって生じた未成熟終始コドンを示している。翻訳開始部位は矢印で示した。

(B) ゲノム DNA を用いたジェノタイピング PCR の結果を示した。(C) マウス腎臓、脳、骨髄を採取し、ウエスタンブロッティングで ABCA13 を検出した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。(D) 左図は 120 dB の刺激音に対する驚愕反応を示している。右図は 70-120、75-120、80-120、85-120 dB のプレパルスインヒビションを示している。値は平均値+標準誤差で示した (WT, n=16; KO, n=15)。\*, P<0.05。

### ABCA13 KO マウスの神経細胞ではシナプス小胞のエンドサイトーシスが抑制される

ABCA13 KO マウスの神経細胞における細胞内コレステロール分布を評価するため、14日間培養した初代培養大脳皮質神経細胞に M $\beta$ CD を処置して細胞膜のコレステロールを引き抜き、細胞を固定、透過処理した後に EGFP-D4 により細胞内のコレステロールを染色した (Fig. 20A)。その結果、野生型マウスと比較して ABCA13 KO マウスで EGFP-D4 のシグナル強度が有意に低下していた (Fig. 20B)。この結果から、ABCA13 の機能障害により、神経細胞において細胞内小胞へのコレステロール蓄積の低下が引き起こされることが示唆された。

シナプス小胞のエンドサイトーシスには小胞内に高濃度のコレステロールが存在することが重要である<sup>94</sup>。そこで、ABCA13 の欠失がシナプス小胞のエンドサイトーシスに影響を与えるかどうかを評価した。脱分極刺激によりシナプス小胞のエンドサイトーシスが活性化されるため、脱分極刺激と蛍光脂質プローブ FM 4-64 を組み合わせることでエンドサイトーシスされたシナプス小胞のみを標識することが可能となる<sup>95</sup>。14日間培養した初代培養大脳皮質神経細胞を high K<sup>+</sup> buffer に浸して FM 4-64 を添加したところ、FM 4-64 の神経細胞内への取り込みが観察された (Fig. 20C)。この蛍光シグナルは ABCA13 KO マウスで低下しており、画像解析により ABCA13 KO マウスの神経細胞において FM 4-64 の細胞内取り込みが有意に減少していることが示された (Fig. 20D)。以上の結果から、ABCA13 の機能不全により大脳皮質神経細胞でシナプス小胞のエンドサイトーシスが抑制されることが示唆された。

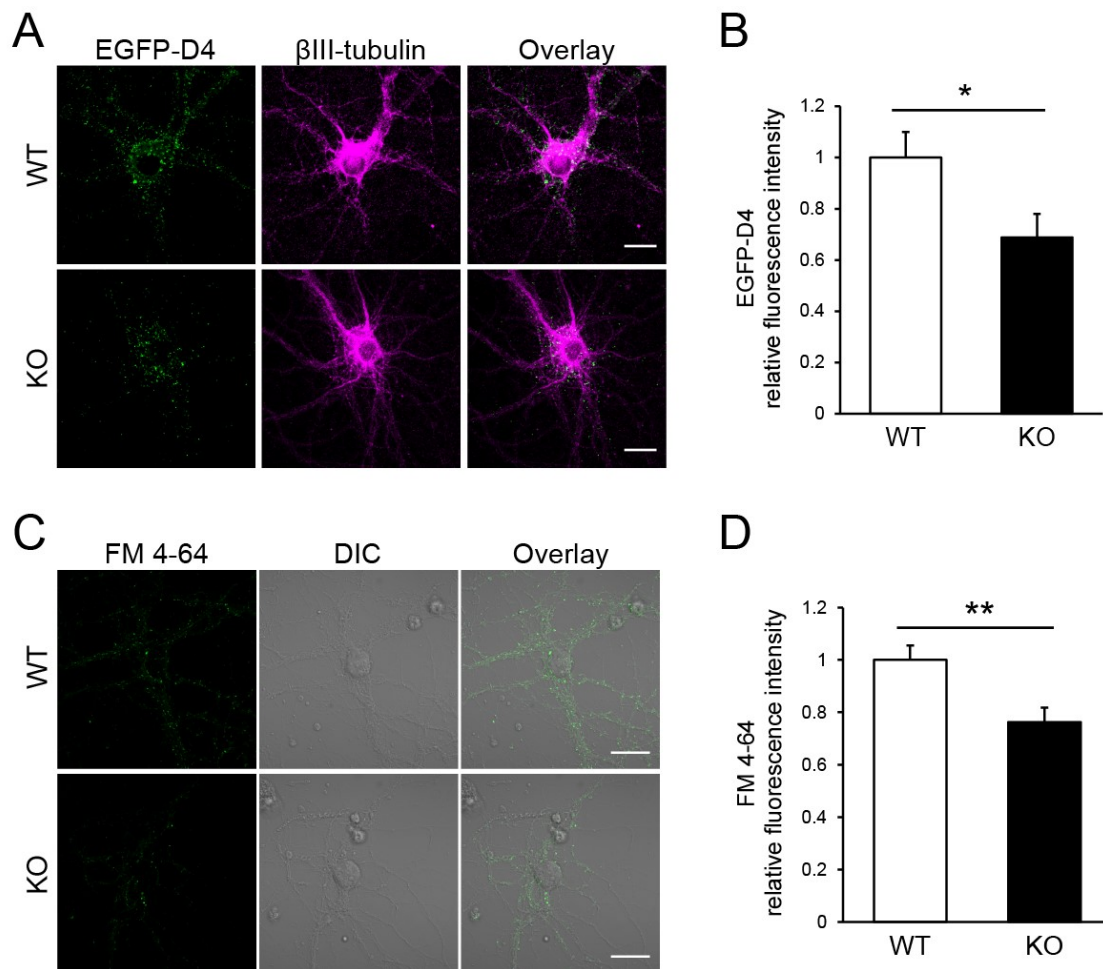


Fig. 20 ABCA13 KO マウスの神経細胞では小胞内コレステロール蓄積やシナプス小胞のエンドサイトーシスが抑制される

(A) マウス初代培養大脳皮質神経細胞に 5mM M $\beta$ CD を添加して 37°C、5 分間静置した。細胞を固定、透過処理した後に EGFP-D4 を反応させ、抗  $\beta$ III-tubulin 抗体で免疫染色した。(B) 一細胞あたりの EGFP-D4 の蛍光強度を ImageJ で定量し、相対値で示した。値は平均値+標準誤差で示した (n=30)。(C) high K<sup>+</sup> buffer 中でマウス初代培養大脳皮質神経細胞に FM 4-64 を添加し、3 分間静置した。その後細胞を Ca<sup>2+</sup>-free buffer で 10 分間洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。(D) 一細胞あたりの FM 4-64 の蛍光強度を ImageJ で定量し、相対値で示した。値は平均値+標準誤差で示した (n=30)。スケールバーは 20  $\mu$ m。\*, P<0.05, \*\*, P<0.01。

## 考察

脂質はシグナル経路、遊走、分化などの様々な生理学的応答に関与しており、細胞や組織の形態や機能を維持するため脂質の細胞内分布は厳密に制御されている<sup>78, 96-98</sup>。ABCA1の主な機能としては、細胞内の過剰なコレステロールを細胞外に排出することが知られているが、コレステロールを細胞膜から小胞体に輸送することでコレステロール合成経路を制御することも報告されている<sup>99</sup>。本研究では、コレステロールやガングリオシドの細胞膜から細胞内小胞への輸送に ABCA13 が関与することを見出した。この結果は、ABCA13 が脂質の逆行性輸送を介して細胞内脂質の恒常性維持に寄与していることを示唆している。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明なままである。興味深いことに、主に細胞膜に局在している ABCA1 は初期エンドソームを介して細胞膜と細胞内区画の間を輸送されており、この輸送がコレステロールの細胞内分布に重要であることを示した報告がある<sup>100, 101</sup>。これらの知見をふまえると、ABCA13 は細胞膜にも局在しており、コレステロールやガングリオシドの豊富なエンドサイトーシス小胞の形成に関与する可能性が考えられる。

ABCA13 のサイズについてはこれまで複数の報告があり、ある研究では ABCA13 遺伝子は 450 kb 以上でタンパク質は 5,058 アミノ酸から構成されていることが示されたが<sup>52</sup>、他の研究では ABCA13 は 2,323 アミノ酸以下であると報告されていた<sup>53</sup>。本研究の結果から、マウスでは主に巨大な N 末端領域を持つ ABCA13 が発現しており、脂質の輸送に関与することが示唆された。N 末端領域は他のタンパクやドメインに相同性は認められず、どのような機能を持つかは不明であるが、他のタンパク質と相互作用して ABCA13 の細胞内小胞への局在やコレステロール輸送に寄与しているのかもしれない。

精神疾患との関連が報告されている ABCA13 遺伝子の 3 つの変異 (H3609P、T4031A、R4843C) は、いずれも ABCA13 の機能を障害することが本研究で明らかとなった。H3609 は膜貫通ヘリックスに近い部位に位置しているため<sup>52</sup>、H3609P は TMD の構造に影響している可能性がある。T4031 と R4843 は NBD に位置している。T4031 は NBD1 の Walker B モチーフの下流に位置しており、ABCA サブファミリーで保存されている<sup>55</sup>。ABCA1 で対応するアミノ酸をアラニンに置換すると、細胞内局在や機能に影響が出ることが報告されている<sup>55</sup>。本研究においても、T4031A 変異体は ABCA13 の細胞内局在や機能に大きく影響したことから、このアミノ酸は NBD1 のフォールディングに重要と考えられる。R4843 は NBD2 の Walker A と Walker B モチーフの間に位置している。T4031A と異なり、R4843C は ABCA13 の局在に影響を与えず、コレステロール輸送に影響を与えた。ABCA1 で対応するアミノ酸置換を行っても細胞内局在や機能に影響が出ないことから<sup>55</sup>、この変異による影響は ABCA13 に特有であると考えられる。

プレパルスインヒビションの障害は統合失調症などの様々な精神疾患の患者やモデル動物で報告されており、ヒトと動物で共通して認められるエンドフェノタイプとされている<sup>102</sup>。そのため、ABCA13 KO マウスで認められるプレパルスインヒビションの障害は、

ABCA13の機能不全と精神疾患病態との関連を示唆するものと考えられる。ABCA13 KO マウスは正常な驚愕反応を示すため、聴覚の異常がプレパルスインヒビションの障害を引き起こしているわけではない。さらに、その他の行動表現型に異常は認められなかったため、プレパルスインヒビションの障害に運動機能、活動量、不安レベルなどの異常が関与しているわけではない。これらの結果から、ABCA13の機能は感覚運動フィルター機構を制御する脳機能に特異的に影響することが考えられる。

本研究では、大脳皮質神経細胞において ABCA13 が細胞内小胞にコレステロールを蓄積させること、シナプス小胞のエンドサイトーシスを促進することを見出した。シナプス小胞にはコレステロールが豊富に存在しており<sup>103</sup>、シナプス小胞のコレステロールはシナプス小胞形成やエキソサイトーシスなどに影響を与える<sup>104</sup>。また、小胞内の高濃度のコレステロールはシナプス小胞のエンドサイトーシスやリサイクリングに必要であるという報告があり<sup>94</sup>、これは本研究の結果と一致するものと考えられる。シナプス小胞輸送に関わる複数の遺伝子の変異と統合失調症や双極性障害との関連が報告されているため<sup>105, 106</sup>、ABCA13の機能不全によるシナプス小胞の輸送異常が精神疾患の病態生理に関係している可能性が考えられる。これを解明するためには、脳における ABCA13 の局在や ABCA13 KO マウスの神経活動や神経伝達物質の異常を調べる必要がある。

以上をまとめると、ABCA13の分子機能や精神疾患との関係性はこれまで解明されていなかったが、本研究により、ABCA13が逆行性輸送によりコレステロールやガングリオシドを細胞内小胞に取り込むこと、精神疾患発症リスクとして報告された遺伝子変異により ABCA13 の局在や機能に障害が認められることが明らかになった。また、ABCA13 KO マウスで統合失調症に特徴的なプレパルスインヒビションの障害が認められること、神経細胞シナプス小胞のエンドサイトーシスに異常が生じることを見出した。以上の結果から、ABCA13の分子機能の一端が明らかになるとともに、ABCA13の機能不全と精神疾患の病態生理との関連が示唆された。ABCA13の研究のさらなる発展により、精神疾患の新たな治療戦略を見出せる可能性がある。



## 結論

脳の正常な発達や機能には脳内の脂質恒常性維持が重要であり、神経系細胞における脂質恒常性の破綻は、統合失調症やアルツハイマー病などの精神神経疾患の発症や増悪につながることが報告されている。ABC タンパク質は脂質輸送に関与し、脂質恒常性の維持に重要な役割を担うことが明らかになりつつあるが、脳内での役割については不明な点が多い。そこで本研究では、ABC タンパク質による脳内脂質輸送の生理的役割に着目し、解析を行った。本研究で明らかになったことを各章ごとに要約する。

### 第一章 多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の神経突起伸長作用

PUFA はグリア細胞のリン脂質に組み込まれ、ABCA1 や ABCG1 によって形成される LpE の構成脂質として分泌されることを明らかにした。さらに、PUFA を含有する LpE は、LRP1 を介して神経細胞内に取り込まれて神経突起伸長に関与する遺伝子発現に影響を与えること、神経突起の枝分かれを増やすことで高い神経突起伸長作用を示すことを見出した。以上の結果は、脳の発達や機能に重要な PUFA の新たな作用経路を示唆するものである。

### 第二章 ABCA13 による脂質輸送および精神疾患との関連

フルサイズ (5,034 アミノ酸) のマウス ABCA13 が ATP 加水分解依存的に逆行性輸送によってコレステロールやガングリオシドを細胞内小胞に取り込むこと、精神疾患発症リスクとして報告された遺伝子変異により ABCA13 の局在や機能に障害が認められることを見出した。また、ABCA13 KO マウスを作製し、統合失調症に特徴的なプレパルスインヒビションの障害が認められること、神経細胞でシナプス小胞のエンドサイトーシスに異常が生じることを明らかにした。以上の結果は、ABCA13 の分子機能の一端を明らかにするとともに、ABCA13 の機能不全が精神疾患の病態生理に関与することを示唆するものである。

以上の研究結果から、ABC タンパク質が脳内の脂質輸送を担い、生理的に重要な役割を果たすことが明らかになった。





## 参考文献

1. Hussain, G. *et al.* Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis* **18**, 26 (2019).
2. Wainwright, P.E. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* **61**, 61-69 (2002).
3. Mesa-Herrera, F., Taoro-González, L., Valdés-Baizabal, C., Diaz, M. & Marín, R. Lipid and Lipid Raft Alteration in Aging and Neurodegenerative Diseases: A Window for the Development of New Biomarkers. *Int J Mol Sci* **20** (2019).
4. Schneider, M. *et al.* Lipids in psychiatric disorders and preventive medicine. *Neurosci Biobehav Rev* **76**, 336-362 (2017).
5. Ueda, K. ABC Proteins Protect the Human Body and Maintain Optimal Health. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **75**, 401-409 (2011).
6. Schneider, E. & Hunke, S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1-20 (1998).
7. Kim, W.S., Weickert, C.S. & Garner, B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *Journal of Neurochemistry* **104**, 1145-1166 (2008).
8. Krimbou, L. *et al.* Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *Journal of Lipid Research* **45**, 839-848 (2004).
9. Wahrle, S.E. *et al.* ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 40987-40993 (2004).
10. Tarr, P.T. & Edwards, P.A. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *Journal of Lipid Research* **49**, 169-182 (2008).
11. Kim, W.S. *et al.* Role of ABCG1 and ABCA1 in regulation of neuronal cholesterol efflux to apolipoprotein E discs and suppression of amyloid-beta peptide generation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 2851-2861 (2007).
12. Karten, B., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4049-4057 (2006).
13. Knight, H.M. *et al.* A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Hum Genet* **85**, 833-846 (2009).
14. Martin, D.D., Robbins, M.E., Spector, A.A., Wen, B.C. & Hussey, D.H. The fatty acid composition of human gliomas differs from that found in nonmalignant brain tissue. *Lipids* **31**, 1283-1288 (1996).

15. Aveldaño, M.I. & Bazán, N.G. Fatty acid composition and level of diacylglycerols and phosphoglycerides in brain and retina. *Biochim Biophys Acta* **296**, 1-9 (1973).
16. Treen, M., Uauy, R.D., Jameson, D.M., Thomas, V.L. & Hoffman, D.R. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* **294**, 564-570 (1992).
17. Horrocks, L.A. & Farooqui, A.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **70**, 361-372 (2004).
18. Bazinet, R.P. & Layé, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 771-785 (2014).
19. Poirazi, P. & Mel, B.W. Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron* **29**, 779-796 (2001).
20. Calderon, F. & Kim, H.Y. Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* **90**, 979-988 (2004).
21. Cao, D.H., Xue, R.H., Xu, J. & Liu, Z.L. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**, 538-546 (2005).
22. Koch, S. *et al.* Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *J Lipid Res* **42**, 1143-1151 (2001).
23. Vance, J.E. & Hayashi, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 806-818 (2010).
24. Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Protection of neurons from apoptosis by apolipoprotein E-containing lipoproteins does not require lipoprotein uptake and involves activation of phospholipase C $\gamma$ 1 and inhibition of calcineurin. *J Biol Chem* **284**, 29605-29613 (2009).
25. Innerarity, T.L., Pitas, R.E. & Mahley, R.W. Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. *J Biol Chem* **254**, 4186-4190 (1979).
26. Mauch, D.H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-1357 (2001).
27. Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D. & Mahley, R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **917**, 148-161 (1987).
28. Gong, J.S. *et al.* Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J Biol Chem* **277**, 29919-29926 (2002).

29. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**, 2406-2415 (2006).
30. Bacskai, B.J., Xia, M.Q., Strickland, D.K., Rebeck, G.W. & Hyman, B.T. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11551-11556 (2000).
31. Matsuo, M., Campenot, R.B., Vance, D.E., Ueda, K. & Vance, J.E. Involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein and ABCG1 in stimulation of axonal extension by apoE-containing lipoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1811**, 31-38 (2011).
32. Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14009-14015 (2004).
33. Ruiz, J. *et al.* The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res* **46**, 1721-1731 (2005).
34. Tooyama, I. *et al.* Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain. *Brain Res* **691**, 235-238 (1995).
35. Bu, G., Maksymovitch, E.A., Nerbonne, J.M. & Schwartz, A.L. Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* **269**, 18521-18528 (1994).
36. Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E. & Vance, J.E. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Neurosci* **27**, 1933-1941 (2007).
37. Herz, J. & Strickland, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784 (2001).
38. Herz, J., Clouthier, D.E. & Hammer, R.E. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421 (1992).
39. Aigner, L. *et al.* Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* **83**, 269-278 (1995).
40. Teo, J.L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C. & Kahn, M. Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12171-12176 (2005).
41. Wu, H. *et al.* Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuritogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 8-16 (2009).
42. Mauch, D.H. *et al.* CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **294**, 1354-1357 (2001).
43. Chen, C.T. *et al.* The low levels of eicosapentaenoic acid in rat brain phospholipids are maintained

- via multiple redundant mechanisms. *J Lipid Res* **54**, 2410-2422 (2013).
44. Chen, C.T. & Bazinet, R.P.  $\beta$ -oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2014).
  45. Moore, S.A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G.R. & Spector, A.A. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem* **56**, 518-524 (1991).
  46. Moore, S.A. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci* **16**, 195-200; discussion 215-121 (2001).
  47. Darios, F. & Davletov, B. Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* **440**, 813-817 (2006).
  48. Robson, L.G., Dyllal, S., Sidloff, D. & Michael-Titus, A.T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging* **31**, 678-687 (2010).
  49. Schmitz, G. & Ecker, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* **47**, 147-155 (2008).
  50. Zhang, W. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 2653-2670 (2011).
  51. Nguyen, L.N. *et al.* Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* **509**, 503-506 (2014).
  52. Prades, C. *et al.* The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. *Cytogenet Genome Res* **98**, 160-168 (2002).
  53. Maeß, M.B., Stolle, K., Cullen, P. & Lorkowski, S. Evidence for an alternative genomic structure, mRNA and protein sequence of human ABCA13. *Gene* **515**, 298-307 (2013).
  54. Barros, S.A., Tennant, R.W. & Cannon, R.E. Molecular structure and characterization of a novel murine ABC transporter, Abca13. *Gene* **307**, 191-200 (2003).
  55. Tomioka, M. *et al.* The effects of neurological disorder-related codon variations of ABCA13 on the function of the ABC protein. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 2289-2293 (2012).
  56. Albrecht, C. & Viturro, E. The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch* **453**, 581-589 (2007).
  57. Piehler, A.P., Ozcürümez, M. & Kaminski, W.E. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front Psychiatry* **3**, 17 (2012).
  58. Tanaka, A.R. *et al.* Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem* **278**, 8815-8819 (2003).
  59. Wang, N., Silver, D.L., Costet, P. & Tall, A.R. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* **275**,

- 33053-33058 (2000).
60. Ban, N. *et al.* ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem* **282**, 9628-9634 (2007).
  61. Cheong, N. *et al.* Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *J Biol Chem* **281**, 9791-9800 (2006).
  62. Weichert, N. *et al.* Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respir Res* **12**, 4 (2011).
  63. Yamano, G. *et al.* ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* **508**, 221-225 (2001).
  64. Beharry, S., Zhong, M. & Molday, R.S. N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). *J Biol Chem* **279**, 53972-53979 (2004).
  65. Tomioka, M. *et al.* Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1862**, 658-665 (2017).
  66. Wang, N. *et al.* ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) binds apolipoprotein A-I and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux. *J Biol Chem* **278**, 42906-42912 (2003).
  67. Akiyama, M. *et al.* Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *J Clin Invest* **115**, 1777-1784 (2005).
  68. Dwyer, S. *et al.* Investigation of rare non-synonymous variants at ABCA13 in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* **16**, 790-791 (2011).
  69. Iritani, S. *et al.* The neuropathological investigation of the brain in a monkey model of autism spectrum disorder with ABCA13 deletion. *Int J Dev Neurosci* **71**, 130-139 (2018).
  70. Yoshida, K. *et al.* Single-neuron and genetic correlates of autistic behavior in macaque. *Sci Adv* **2**, e1600558 (2016).
  71. Ueoka, I. *et al.* Novel Drosophila model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A. *Exp Neurol* **300**, 51-59 (2018).
  72. Komura, N. *et al.* Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nat Chem Biol* **12**, 402-410 (2016).
  73. Mashiko, D. *et al.* Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* **3**, 3355 (2013).
  74. Ishitsuka, R., Saito, T., Osada, H., Ohno-Iwashita, Y. & Kobayashi, T. Fluorescence image screening for chemical compounds modifying cholesterol metabolism and distribution. *J Lipid Res* **52**, 2084-2094 (2011).
  75. Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120-1123 (2015).
  76. Liu, S.L. *et al.* Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane

- cholesterol. *Nat Chem Biol* **13**, 268-274 (2017).
77. Litvinov, D.Y., Savushkin, E.V. & Dergunov, A.D. Intracellular and Plasma Membrane Events in Cholesterol Transport and Homeostasis. *J Lipids* **2018**, 3965054 (2018).
  78. Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125-138 (2008).
  79. Jackson, C.L., Walch, L. & Verbavatz, J.M. Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization. *Dev Cell* **39**, 139-153 (2016).
  80. Maekawa, M. & Fairn, G.D. Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J Cell Sci* **128**, 1422-1433 (2015).
  81. Zidovetzki, R. & Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1311-1324 (2007).
  82. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).
  83. Fujita, A. *et al.* Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell* **18**, 2112-2122 (2007).
  84. Cho, J.A. *et al.* Insights on the trafficking and retro-translocation of glycosphingolipid-binding bacterial toxins. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 51 (2012).
  85. Bandmann, V. *et al.* Membrane capacitance recordings resolve dynamics and complexity of receptor-mediated endocytosis in Wnt signalling. *Sci Rep* **9**, 12999 (2019).
  86. Wei, Z., Su, W., Lou, H., Duan, S. & Chen, G. Trafficking pathway between plasma membrane and mitochondria via clathrin-mediated endocytosis. *J Mol Cell Biol* **10**, 539-548 (2018).
  87. Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 317-364, table of contents (2008).
  88. Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M. & Ueda, K. Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem* **281**, 10760-10768 (2006).
  89. Futamata, R. *et al.* FRET analyses reveal a role of ATP hydrolysis-associated conformational changes in human P-glycoprotein. *J Biol Chem* **295**, 5002-5011 (2020).
  90. Mashiko, D. *et al.* Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ* **56**, 122-129 (2014).
  91. Kohl, S., Heekeren, K., Klosterkötter, J. & Kuhn, J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders-- apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res* **47**, 445-452 (2013).
  92. Perry, W., Minassian, A., Feifel, D. & Braff, D.L. Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder patients with acute psychotic mania. *Biol Psychiatry* **50**, 418-424 (2001).
  93. Powell, S.B., Zhou, X. & Geyer, M.A. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res* **204**, 282-294 (2009).

94. Dason, J.S., Smith, A.J., Marin, L. & Charlton, M.P. Vesicular sterols are essential for synaptic vesicle cycling. *J Neurosci* **30**, 15856-15865 (2010).
95. Iwabuchi, S., Kakazu, Y., Koh, J.Y., Goodman, K.M. & Harata, N.C. Examination of synaptic vesicle recycling using FM dyes during evoked, spontaneous, and miniature synaptic activities. *J Vis Exp* (2014).
96. Daniotti, J.L. & Iglesias-Bartolomé, R. Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. *IUBMB Life* **63**, 513-520 (2011).
97. Ito, S., Kioka, N. & Ueda, K. Cell migration is negatively modulated by ABCA1. *Biosci Biotechnol Biochem* **83**, 463-471 (2019).
98. Frechin, M. *et al.* Cell-intrinsic adaptation of lipid composition to local crowding drives social behaviour. *Nature* **523**, 88-91 (2015).
99. Yamauchi, Y. *et al.* Deficiency in the Lipid Exporter ABCA1 Impairs Retrograde Sterol Movement and Disrupts Sterol Sensing at the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **290**, 23464-23477 (2015).
100. Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B. & Brewer, H.B. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* **42**, 1339-1345 (2001).
101. Azuma, Y. *et al.* Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells* **14**, 191-204 (2009).
102. Shimamoto-Mitsuyama, C. *et al.* Evaluation of the role of fatty acid-binding protein 7 in controlling schizophrenia-relevant phenotypes using newly established knockout mice. *Schizophr Res* (2019).
103. Takamori, S. *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-846 (2006).
104. Rosa, P. & Fratangeli, A. Cholesterol and synaptic vesicle exocytosis. *Commun Integr Biol* **3**, 352-353 (2010).
105. Egbujo, C.N., Sinclair, D. & Hahn, C.G. Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep* **18**, 77 (2016).
106. Li, Y.C. & Kavalali, E.T. Synaptic Vesicle-Recycling Machinery Components as Potential Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* **69**, 141-160 (2017).





## 文献リスト

**A. Mitsuhiro Nakato, Michinori Matsuo, Nozomu Kono, Makoto Arita, Hiroyuki Arai, Jun Ogawa, Noriyuki Kioka, and Kazumitsu Ueda**

Neurite outgrowth stimulation by n-3 and n-6 PUFAs of phospholipids in apoE-containing lipoproteins secreted from glial cells

*J Lipid Res.* 2015 Oct;56(10):1880-90.

**B. Mitsuhiro Nakato, Naoko Shiranaga, Maiko Tomioka, Hitomi Watanabe, Junko Kurisu, Mineko Kengaku, Naoko Komura, Hiromune Ando, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, and Kazumitsu Ueda**

ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking

*J Biol Chem.* in press



## 謝辞

本研究を進めるにあたって、博士課程 2 年目まで指導教官を務めてくださった京都大学物質-細胞統合システム拠点 特定教授 植田和光先生には、社会人博士課程の学生として温かく迎え入れ、研究を遂行できる環境を与えていただきましたこと、研究方針や手法に関する的確なご指導を賜りましたことを、心より感謝申し上げます。植田先生の並々ならぬご尽力のおかげで本研究を進めることができました。

博士課程 3 年目から指導教官を務めてくださった京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室 教授 木岡紀幸先生には、多くの重要なご助言やご指導を賜りました。また、准教授 木村泰久先生、特任助教 永田紅先生、京都大学物質-細胞統合システム拠点 拠点助教 小段篤史先生には、研究方針や実験手法に関するご助言をいただきました。富岡麻衣子博士には、研究に関するご助言をいただき、活発な議論をしていただきました。技術補佐員の白永直子さんには、実験面で多大なご助力、ご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

京都女子大学家政学部食物栄養学科 准教授 松尾道憲先生には、研究方針や手法、その他多くの面においてご指導、ご助言をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室 名誉教授 新井洋由先生、准教授 河野望先生、慶應義塾大学薬学部代謝生理化学講座 教授 有田誠先生には、LpE の脂質解析で大変お世話になり、多くのご助言を賜りました。京都大学ウイルス・再生医科学研究所統合生体プロセス分野 教授 近藤玄先生、助教 渡邊仁美先生には、ABCA13 KO マウスの作製でご指導いただき、大変お世話になりました。京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授 見学美根子先生、栗栖純子さんには、ABCA13 KO マウスの実験や繁殖維持など多くの面でご指導やご助力をいただき、大変お世話になりました。京都大学大学院医学研究科実験動物学分野研究室 特定助教 吉原亨先生には、ABCA13 KO マウスの行動解析で大変お世話になり、重要なご助言を賜りました。岐阜大学生命の鎖統合研究センター 教授 安藤弘宗先生、特任助教 河村奈緒子先生には、蛍光標識 GM1、GM3 をご供与いただき、大変お世話になりました。ストラスブール大学 小林俊秀先生には、EGFP-D4 の発現プラスミドをご供与いただき、大変お世話になりました。多くの先生方のおかげで本研究を進めることができ、心より感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室の伊藤志帆博士、小笠原史彦博士、岡本雄介博士、二股良太さんおよび他のメンバーの皆様には日頃から暖かいご助言と激励をいただきましたこと、活発かつ有益で楽しい議論をしていただきましたことを

心より感謝申し上げます。

最後に、離れた地から見守り応援して下さった家族、私の進路に理解を示し、温かい言葉で励ましてくれた方々に、心より感謝申し上げます。

2021年1月

中塔 充宏