

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	中塔 充宏
論文題目	ABCタンパク質による脳内脂質輸送の生理的役割		
(論文内容の要旨)			
<p>脳は非常に脂質の豊富な組織であり、神経突起の形成や神経伝達などの脳機能には脳内の脂質恒常性維持が重要である。そのため、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。ATP-binding cassette (ABC) タンパク質ファミリーのメンバーの多くは膜輸送体として機能し、ATPの結合と加水分解に伴う構造変化により、様々な基質を脂質二重膜の内外に能動的に輸送する。ABCタンパク質はAからGの7つのサブファミリーに分類されており、ABCA1やABCG1は脂質輸送に関与することが報告されているが、脳内における生理的役割はわかっていない。また、脂質輸送体であるABCAサブファミリーに属するABCA13の遺伝子変異は精神疾患発症リスクと関連する可能性が報告されているが、その分子機能は解明されていない。そこで本研究では、ABCタンパク質による脳内脂質輸送に着目して解析し、その機能や生理的役割を明らかにした。</p> <p>1. 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</p> <p>魚に多く含まれるドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸は神経突起伸長作用を持ち、正常な脳の発達に必須である。多価不飽和脂肪酸は、栄養成分として摂取され脳に運ばれて神経突起伸長作用を示すと考えられているが、脳内でどのように神経細胞まで輸送されて機能するのかは解明されていない。脳内において神経細胞への脂質の供給は、グリア細胞のABCA1やABCG1によって形成されるアポE含有リポタンパク質 (LpE) を介して行われる。そこで、多価不飽和脂肪酸はグリア細胞のリン脂質に取り込まれた後にABCA1やABCG1によって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を促進するとの仮説を立て、検証を行った。ラット初代培養大脳皮質グリア細胞を、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸、エイコサペンタエン酸、あるいはドコサヘキサエン酸を含む培地で培養し、分泌されたLpEを単離した。液体クロマトグラフィー質量分析法によりLpEのリン脂質の脂肪酸鎖を分析したところ、培地に添加した多価不飽和脂肪酸はLpEのリン脂質に取り込まれることが明らかとなった。次に、ラット初代培養海馬神経細胞に多価不飽和脂肪酸を含有するLpEを添加して培養し、免疫染色により神経突起を染色してその突起長を解析した。その結果、脂肪酸非添加のグリア細胞から調製したLpEと比較して、多価不飽和脂肪酸含有LpEには高い神経突起伸長作用が認められた。LpEは、神経細胞に発現する受容体 low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) に結合することから、LpEの作用はLRP1を介しているのではないかと考えた。そこで、LRP1へのリガンド結合を阻害する抗LRP1抗体をLpEとともに培地に加えて神経細胞を培養し、神経突起長を評価したところ、抗LRP1抗体によりLpEの神経突起伸長作用は消失した。さらに、LpEのエンドサイトーシスを阻害するアクチン重合阻害剤サイトカラシンDを培地に添加して神経細胞を培養した結果、LpEによる神経突起伸長作用は抑制された。以上の結</p>			

果より、多価不飽和脂肪酸はまずグリア細胞のリン脂質に組み込まれた後、ABCA1やABCG1によってLpEの構成リン脂質として分泌され、LRP1を介して神経細胞内に取り込まれることにより、高い神経突起伸長作用を示すことが示唆された。

2. ABCA13による脂質輸送および精神疾患との関連

ABCA13は長いN末端領域を持つ約570 kDaのABCタンパク質であり、この遺伝子の変異は統合失調症や双極性障害などの精神疾患発症リスクとなる可能性が報告されている。しかし、ABCA13の分子機能や生理的役割は解明されておらず、精神疾患の病態生理との関連は不明である。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、本章では、ABCA13は神経系で脂質輸送体として機能するとの仮説を立て、検証を行った。マウスABCA13遺伝子をクローニングし、HEK293細胞に一過性発現させて免疫染色で細胞内局在を検討したところ、ABCA13は細胞内小胞に局在することがわかった。次に、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EGFP-D4と透過処理をした細胞を用いて細胞内コレステロールを染色したところ、ABCA13は細胞内小胞へのコレステロールの蓄積を引き起こすことが明らかとなった。そのメカニズムとして、ABCA13は細胞膜コレステロールの小胞への取り込みを促進しているのではないかと考え、EGFP-D4を透過処理していない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、細胞膜由来のコレステロールのトラッキングを行った。その結果、ABCA13は細胞膜コレステロールの細胞内小胞への輸送を促進することが示された。コレステロール輸送と精神疾患の関連を調べるため、精神疾患の発症リスクとして報告されているABCA13のアミノ酸変異を導入したところ、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の低下が認められた。この結果から、精神疾患の発症リスクに関連する変異がABCA13のコレステロール輸送に障害を起こすことが示唆された。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、精神神経機能を評価する網羅的行動評価を実施した。その結果、ABCA13 KOマウスは、統合失調症の患者やモデルマウスに特徴的な症状であるプレパルスインヒビションの障害を示した。さらに、ABCA13 KOマウスの初代培養大脳皮質神経細胞の細胞内コレステロールをEGFP-D4で染色したところ、細胞内小胞へのコレステロール蓄積の低下が認められた。コレステロールはシナプス小胞のエンドサイトーシスに重要であることから、細胞膜を一過的に標識するFM蛍光色素を用いてエンドサイトーシスされるシナプス小胞を染色したところ、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ていることを見出した。以上の結果から、ABCA13が逆行性輸送により細胞内小胞にコレステロールを取り込むこと、ABCA13はシナプス小胞のエンドサイトーシスに関与し、ABCA13の機能不全が精神疾患の病態生理に関与することが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

脳内の脂質恒常性維持は神経突起の形成や神経伝達などの脳機能に重要であり、神経系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。膜輸送体であるABCA1やABCG1などのABCタンパク質は脂質輸送に関与することが報告されていたが、脳内における生理的意義は不明であった。また、ABCA13の遺伝子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いたが、その詳細は不明であった。本論文は、ABCA1とABCG1によって産生される脳内のリポタンパク質LpEに焦点を当て、多価不飽和脂肪酸の作用経路としての生理的意義の解明を行い、さらにABCA13の分子機能や神経系における生理的役割の解析を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 多価不飽和脂肪酸はグリア細胞のリン脂質に組み込まれ、ABCA1やABCG1によってつくられるLpEの構成脂質として分泌されることを示した。
2. 多価不飽和脂肪酸を含有するLpEは、LRP1を介したエンドサイトーシスにより神経細胞内に取り込まれ、高い神経突起伸長作用を示すことを明らかにした。
3. ABCA13は、逆行性輸送により細胞内小胞にコレステロールを取り込むことを明らかにした。さらに、統合失調症や双極性障害などの精神疾患の発症リスクとして報告されているABCA13のアミノ酸変異により、ABCA13のコレステロール輸送に障害が認められることを示した。
4. 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を示すことを明らかにした。
5. ABCA13 KOマウスの神経細胞において、細胞内小胞へのコレステロール蓄積が低下し、シナプス小胞のエンドサイトーシスが抑制されていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、多価不飽和脂肪酸がABCA1やABCG1によって形成されるLpEのリン脂質に組み込まれて神経突起の伸長を促進すること、および、精神疾患病態と関連するABCA13の機能不全がコレステロール輸送障害を引き起こすことを明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および精神神経科学の発展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、令和 3年 2月10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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）