

統合失調症の患者死後脳では LINE-1 配列が増加している

文東美紀*1 ぶんとう みき

加藤忠史*2 かとう ただふみ

岩本和也*1 いわもと かずや

*1 東京大学大学院・医学系研究科・分子精神医学講座

*2 理化学研究所・脳科学総合研究センター・精神疾患動態研究チーム

トランスポゾンとは

トウモロコシの一種で、ハロウィンなどで飾りに使われるインディアンコーンには、黄、紫、白といった、さまざまな色の実がモザイク状に存在している。この現象はそれまでのメンデル遺伝学では説明がつかなかったが、1950年 Barbara McClintock によって、ゲノムの中をある場所から別の場所に動く因子によって、実の色素の遺伝子が破壊されるためである、と報告された¹。当時はこの“トランスポゾン”(転移因子)という考えに懐疑的な科学者が多かったが、細菌や大腸菌においても同様の現象が確認されるようになり、報告から約30年後、彼女は1983年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。

時代は下り、2001年にヒトゲノムプロジェクトにより発表されたドラフトによると、ヒトゲノムの約45%はこのトランスポゾンで占められていることが示された²。しかしこれらの因子は、その多くが遺伝子-遺伝子間に存在していることもあって、生物学的に何ら意味を持たない、ただゲノムを埋めるがらくたのような配列と考えられてきた。このように、トランスポゾンは長い間研

究者の興味を惹くことは少なく、不遇の扱いを受けてきた。しかし近年になって、トランスポゾンが持つ新たな役割が注目を集めるようになる。

増殖する LINE-1

トランスポゾンの中でも、RNAを介して転移を行うレトロトランスポゾンと呼ばれる一群は、ゲノム内で自らの配列を増やすことができる。特に Long interspersed element-1 (L1 または LINE-1 と略される)は、自らの配列がコードしているタンパク質で自律的に増えることが可能な唯一のレトロトランスポゾンである。約6000塩基対の配列中に、RNAから相補DNAを合成する逆転写酵素、ゲノムDNAを切断するエンドヌクレアーゼをコードしている。ゲノム内に存在する LINE-1 はまず RNA に転写された後、細胞質内で自らにコードされているタンパク質を合成し、核内に戻って元の場所とは異なるゲノム領域を切断し、相補鎖DNAを合成・挿入するという、“コピーアンドペースト”方式で増幅を行っている(図1)。

LINE-1 はヒトゲノム中に60万コピーほど存在しており、単独の配列では17%と最大の割合を占める配列であるが、その大部分はちぎれた LINE-1 配列であり、自らを増幅させる機能は失っている。その中でも数十コピーほどは転移活性を保っているのだが、通常ではこのような転移が起きないように、細胞の中でさまざまな制御機構が働いているため、主に生殖細胞や発生初期において、数十世代に1回という低頻度でしか転移は起きないと考えられてきた。しかし2009年米国ソーック研究所の Fred Gage らによって、LINE-1 はヒト成体内の神経前駆細胞において転移活性

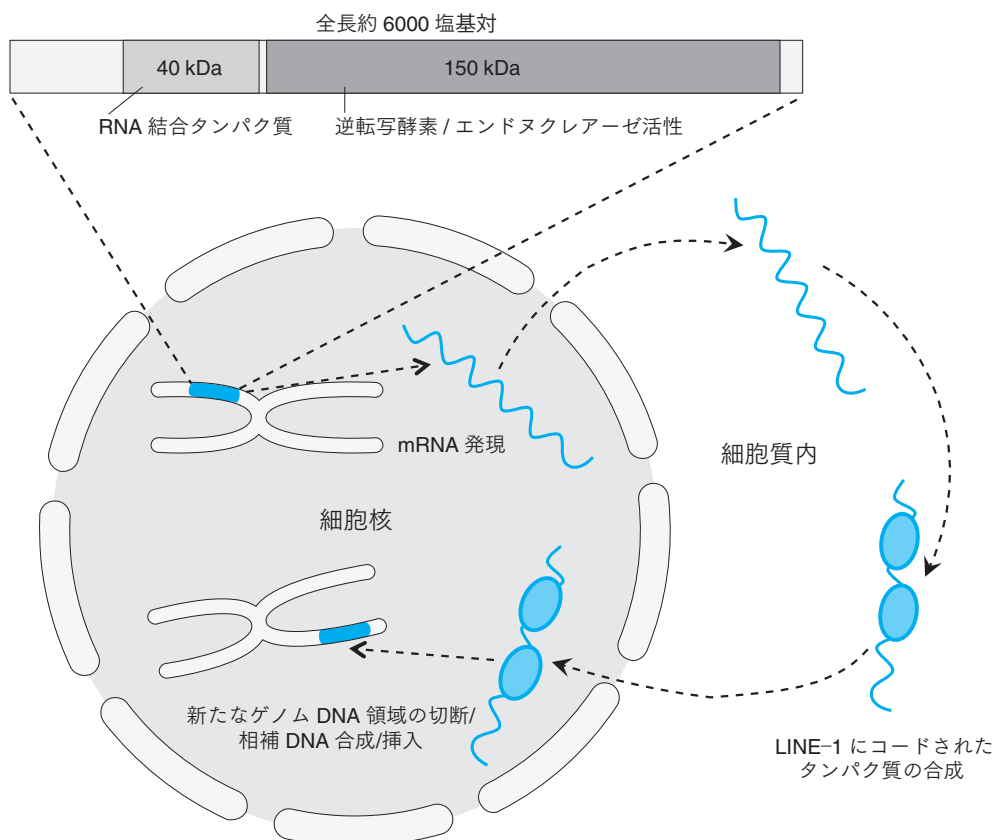


図 1—LINE-1 の転移・増幅メカニズム

図の上部は、ゲノム中の LINE-1 相当部分が読み出されたとき (mRNA) の内容を表す。逆転写酵素/エンドヌクレアーゼ活性は、この領域をもとにつくられるタンパク質が、RNA に相補的な DNA を合成するはたらき (逆転写酵素) と、DNA を切断するはたらき (エンドヌクレアーゼ活性) を持つことを表す。

を持ち、コピー数を増幅していることが示された³。彼らの解析では 80 回/1 細胞の割合で LINE-1 の新規挿入が起きていると推定されている。そのため同一人物の肝臓や心臓などの脳以外の組織と、脳組織を比較すると、脳のゲノムにおいて LINE-1 が増幅していた。

このような脳における LINE-1 の増幅は、神経疾患の病因に関わる可能性もある。自閉症の一種であるレット症候群⁴、あるいは毛細血管拡張性運動失調症⁵の患者死後脳において、LINE-1 のコピー数増大が報告されている。

精神疾患患者で LINE-1 は増えているか ——死後脳を用いたコピー数定量

われわれは精神疾患の病因にも LINE-1 の増幅

が関わる可能性を検討するために、患者死後脳を用いた研究を行った⁶。米国の脳バンクであるスタンレー財団の死後脳サンプルセット (健康者、統合失調症、双極性障害、大うつ病、それぞれ 12~13 サンプル) の肝臓と前頭葉の DNA を用いて、LINE-1 コピー数の定量を行った。同一人物の肝臓に対する前頭葉の LINE-1 コピー数という形で比較を行った結果、精神疾患の患者群で LINE-1 のコピー数の増幅を検出した (図 2A)。

特に大きな変化が認められた統合失調症において、独立したサンプルセットにおける再現性を確認するため、同じくスタンレー財団の第 2 の死後脳サンプルセット (健康者と統合失調症、それぞれ 34~35 サンプル) を用いて定量を行った。このサンプルセットにおいては、神経細胞の細胞核のみに特異的に発現している NeuN というタンパク質に対

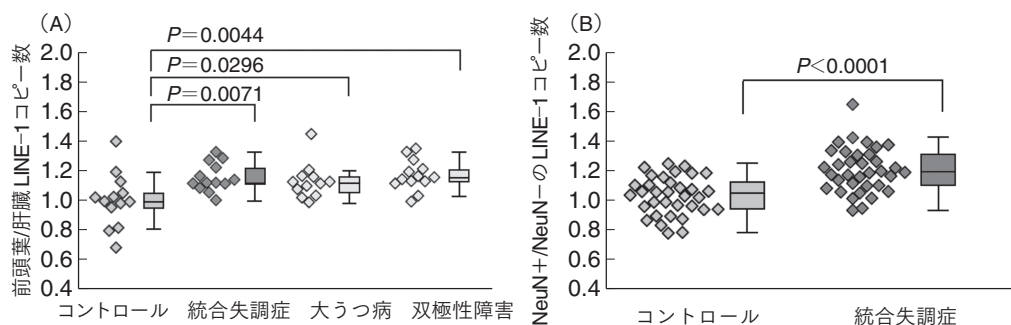


図2—精神疾患患者死後脳における LINE-1 のコピー数増幅

する抗体を用いて、前頭葉組織を NeuN 陽性(図中+)と陰性(図中-)の細胞核にセルソーターを用いて分画し、それぞれの DNA を用いて LINE-1 コピー数定量を行った。同一人物の非神経細胞に対する神経細胞の LINE-1 コピー数という形で比較を行った結果、統合失調症患者の神経細胞において、LINE-1 コピー数が増幅していることが示された(図 2B)。

動物モデルでも LINE-1 コピー数は増幅していた

このような LINE-1 の増幅がどのような要因で起きるのかを検討するにあたり、環境要因と遺伝要因という二つの要因を考えた。まず環境要因として、統合失調症の発症モデルとされる神経発達障害モデル動物を検討した。これは神経発達上の臨界期において、ウイルス感染などにより神経細胞の障害が起きるために発症するというモデルである。疫学調査により、胎児期における母体のインフルエンザなどのウイルス感染は、統合失調症の罹患リスクをあげることが知られている⁷。

今回は 2 種類のモデル動物を使用した。一つ目は polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (poly I:C) を投与したマウスである。poly I:C は合成 2 本鎖 RNA であり、投与によってウイルス感染に類似した免疫反応を誘導することができる。胎生期に poly I:C を投与されたマウスは、統合失調症様の症状(プレパルス抑制の低下など)を示すことが知られている⁸。われわれは poly I:C を投与したマウスを

使用して LINE-1 コピー数定量を行ったところ、前頭葉において有意な LINE-1 コピー数増幅を見出した。

また第 2 の動物モデルとして、新生児期に上皮成長因子(EGF)を投与したマカクを使用した。EGF は感染によって誘導される炎症性サイトカインの一つで、ドーパミンニューロンの発達阻害などを引き起こすことが知られている。新生児期に EGF を投与されたマウスやラットは、統合失調症様の症状を示すことが報告されている⁹。われわれは新生児期に EGF を投与されたマカク前頭葉において、LINE-1 コピー数の増幅を検出した。

統合失調症患者由来 iPS 細胞においても LINE-1 コピー数が増大

さらにわれわれは遺伝要因を検討するため、統合失調症の遺伝的リスクとして知られる、22 番染色体の長腕の一部(22q11.2)に欠失を持つ統合失調症患者の解析を行った。22q11.2 欠失症候群は出生率が 1/4000~1/5000 であり、先天性心疾患や免疫低下などを主症状とするが、同時に統合失調症に罹患するリスクが 8 倍高まることが報告されている¹⁰。統合失調症を発症した 22q11.2 欠失症候群患者 2 名から iPS 細胞の樹立を行い、神経細胞に分化させたのち LINE-1 コピー数を定量したところ、患者群において LINE-1 のコピー数増大が確認された。

このように、環境要因・遺伝要因のいずれも

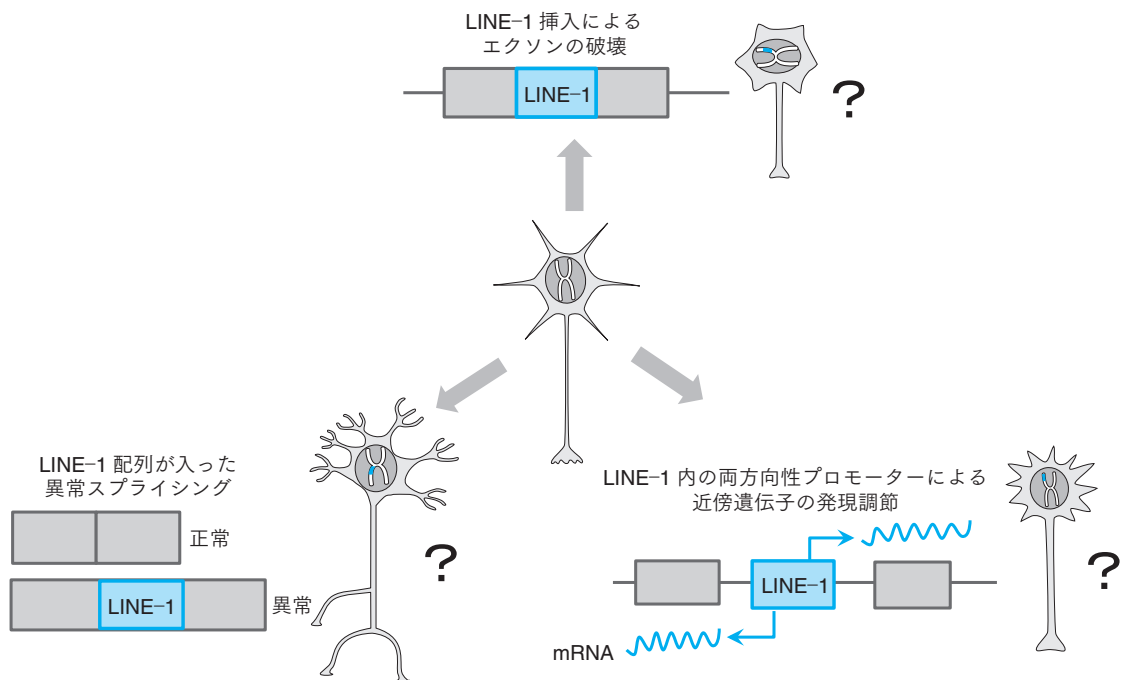


図3—LINE-1 挿入部位により神経細胞の形態・機能が変化する可能性がある

LINE-1 の増幅に関わる可能性があることが示された。

患者ゲノムにおける LINE-1 挿入部位の決定

ここまで精神疾患患者死後脳や、モデル動物における LINE-1 コピー数増幅を示してきたが、実際に LINE-1 が挿入されているゲノム領域の決定を行った。スタンレー財団の肝臓・前頭葉 DNA (健常者、統合失調症患者3名ずつ) の全ゲノムシーケンシングを行い、肝臓ゲノムにはなく前頭葉ゲノムのみに挿入されていた LINE-1 を同定した。その結果、疾患関連解析において、患者 DNA では統合失調症に関連する遺伝子の近傍に多くの LINE-1 が挿入されていた。また遺伝子オントロジー解析によって、患者群ではシナプス関連遺伝子の近傍に、より多くの LINE-1 が挿入されていることが示された。

LINE-1 挿入が引き起こす変化

このような LINE-1 の挿入がおこることにより、

近傍の遺伝子にさまざまな影響を及ぼすことが知られている(図3)。たとえばある遺伝子のエクソン部分に LINE-1 挿入がおこれば、その遺伝子の機能破壊につながる。またイントロンに挿入されたとしても、LINE-1 にはプロモーター活性を持つ配列が2カ所、両方向にあるため、上流、下流いずれに位置する遺伝子も RNA への転写量が変動する可能性がある。このような質的、量的な変化が重要な遺伝子(統合失調症であれば、神経機能に関わる遺伝子)におきてしまうことで、疾患の発症につながる可能性が考えられる。

それでは神経細胞における LINE-1 の挿入は、生体に対して疾患のような負の影響しか及ぼさないのだろうか？ 近年では、LINE-1 を含むトランスポゾンの転移が、神経細胞の多様性を生む原因となるのではないかとする仮説が報告されている¹⁾。一般的にゲノム DNA の配列は、受精後から成体にいたるまですべての体細胞において不変であり、どの細胞も同じ配列からなる DNA セットを持つ、と考えられてきた。しかし神経前駆細胞において、細胞によって異なる場所にトランスポゾン挿入がおこると、細胞一つ一つが固有の

ゲノム配列を持つことになる。LINE-1 の挿入部位によって遺伝子発現が変化するために、細胞ごとに形態や機能が変化することが、神経細胞の多様性につながっている可能性がある。実際にヒトの海馬や尾状核の一部の細胞において、LINE-1 を含む複数のレトロトランスポゾンが遺伝子のイントロンやエクソンに挿入されていることが示されている¹²。

多様性を生み出す原動力？

体細胞におけるゲノムの多様性という点と最近のトピックのように感じられるが、1987年にノーベル生理学・医学賞を受賞した、利根川進博士が見出したB細胞の免疫グロブリン遺伝子の再編成¹³というよく知られた現象は、40年ほど前に報告されたものである。実はこの遺伝子再編成でDNAの切り出しを行うRAG1という遺伝子も、もとはトランスポゾン由来の配列であるということがわかっている¹⁴。トランスポゾンがなければ、抗体の多様性も生まれなかったかもしれない。このように安定だと考えられてきたゲノムDNAは、個人の中で大きく配列が変動していることがわかってきた。トランスポゾンは個体内の細胞のゲノムに多様性を生み出す原動力として、改めてその役割が見直される時代になるだろう。

謝辞 poly I:C 動物モデルは奈良県立医科大学の岸本年史、鳥塚通弘、井川大輔の各先生、EGF 投与マカクモデルは新潟大学的那波宏之、柿田明美の各先生、22q11 欠失患者iPS細胞における解析では、理化学研究所の吉川武男、豊島学、豊田倫子の各先生、慶應大学の岡野栄之、加藤元一郎、岡田洋平、赤松和土の各先生と、非常に多くの先生方から貴重な試料のご提供を受けており、ここに感謝申し上げます。

文献

- 1—B. McClintock: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **36**, 344(1950)
- 2—E. S. Lander et al.: Nature, **409**, 860(2001) doi:10.1038/35057062
- 3—N. G. Coufal et al.: Nature, **460**, 1127(2009) doi:10.1038/nature08248
- 4—A. R. Muotri et al.: Nature, **468**, 443(2010) doi:10.1038/nature09544

- 5—N. G. Coufal et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 20382(2011) doi:10.1073/pnas.1100273108
- 6—M. Bundo et al.: Neuron(2013) doi:10.1016/j.neuron.2013.10.053
- 7—A. S. Brown et al.: Archives of General Psychiatry, **61**, 774(2004) doi:10.1001/archpsyc.61.8.774
- 8—U. Meyer & J. Feldon: Neuropharmacology, **62**, 1308(2012) doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.009
- 9—H. Nawa et al.: Molecular Psychiatry, **5**, 594(2000)
- 10—B. Xu et al.: Nature Genetics, **40**, 880(2008) doi:10.1038/ng.162
- 11—A. R. Muotri et al.: Nature, **435**, 903(2005) doi:10.1038/nature03663
- 12—J. K. Baillie et al.: Nature, **479**, 534(2011) doi:10.1038/nature10531
- 13—S. Tonegawa et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 4027(1974)
- 14—J. Jurka et al.: Annual Review of Genomics and Human Genetics, **8**, 241(2007) doi:10.1146/annurev.genom.8.080706.092416