

セロトニン 2C 受容体の RNA 編集と精神疾患

岩本和也,* 加藤忠史

RNA Editing of Serotonin 2C Receptor and Major Mental Disorders

Kazuya IWAMOTO* and Tadafumi KATO

*Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, RIKEN Brain Science Institute,
2-1 Hirosawa, Wako City 351-0198, Japan*

(Received November 15, 2007)

A-to-I RNA editing has mainly been found in various receptors and ion channels in the central nervous system, including the serotonin 2C receptor, glutamate receptor, GABA receptor, and potassium channel. Interestingly, most of them are suggested to be involved in the pathophysiology of major mental disorders such as schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. Here we review studies examining the relationship between the serotonin 2C receptor and major mental disorders.

Key words—5-hydroxytryptamine receptor 2C (HTR2C); pyrosequencing; adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)

1. RNA 編集と精神疾患

RNA 編集とは、転写後修飾により塩基の挿入、欠失、置換などが起こる現象であり、本来のゲノム配列とは異なる配列が RNA 上に顕れる。A-to-I RNA 編集と呼ばれるタイプの RNA 編集では、mRNA 配列中のアデノシン (Adenosine) がイノシン (Inosine) へと変換される。イノシンは翻訳時にグアノシンとして認識されるため、遺伝子のコーディング領域に編集部位があればアミノ酸置換が、非翻訳領域にあれば mRNA の安定性などの制御に、また編集部位の位置によっては alternative splicing のパターンを制御したりと、様々な方法で遺伝子の機能調節に関与する。興味深いことに、A-to-I RNA 編集はセロトニン受容体やグルタミン酸受容体、gamma-aminobutyric acid (GABA) 受容体、カリウムチャンネルといった中枢神経系の精神神経機能に深く関与する受容体やイオンチャンネルにおいて主に見い出されており、統合失調症、双極性障害、大うつ病といった精神疾患との係わりが注目

されている。本稿では特にセロトニン 2C 受容体の RNA 編集と精神疾患研究についてわれわれの研究結果を交えて概説したい。

2. セロトニン 2C 受容体と精神疾患研究

セロトニン 2C 受容体は古くから精神疾患との係わりが指摘されてきた遺伝子である。薬理学的研究からは、抗うつ薬がセロトニン神経伝達を促進すること、クロザピンをはじめとして、多くの抗精神病薬がセロトニン 2C 受容体阻害作用を有することが知られている。セロトニン 2C 受容体のノックアウトマウスでは、過食による肥満がみられ、痙攣により死に易い傾向があり、摂食障害やてんかんに関与している可能性が指摘されている。¹⁾

精神疾患患者死後脳を用いた遺伝子発現解析では、双極性障害²⁾及び統合失調症³⁾でのセロトニン 2C 受容体の遺伝子発現量低下が DNA マイクロアレイ法あるいは定量的 RT-PCR 法により報告されている。

遺伝子多型の頻度を疾患群と対照群とで比較する関連研究からは、セロトニン 2C 受容体遺伝子内の Cystein (Cys) 23Serin (Ser) 多型と双極性障害との関連が報告されている。特に女性において双極性障害と関連しているとの報告が多い。⁴⁻⁶⁾ また、アルツハイマー病における精神疾患用症状の 1 つである

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 (〒351-0198 和光市広沢 2-1)

*e-mail: kaziwamoto@brain.riken.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

visual hallucination との関連が報告されている。⁷⁾ 最近では, Caucasian 集団において双極性障害の発症年齢と Cys23Ser 多型との関連が報告されている。⁸⁾ 健常者集団における Ser タイプのアリル頻度は Caucasian 集団では約 14% (日本人集団では 2-3%) だが, 双極性障害若年性発症群では約 24% と, 有意な上昇が観察されている。Cys23Ser 多型はセロトニン 2C 受容体の活性を変化させる機能的多型であることが *in vitro* の実験において示されている。⁹⁾ Ser タイプのセロトニン 2C 受容体では, セロトニン自身やアゴニストである *meta*-chlorophenyl-piperazine (*m*-CPP) に対する結合活性が低下していることが明らかにされている。

クロザピンなどの抗精神病薬の投与により, 副作用として患者での体重増加 (drug-induced weight gain) が認められる場合があり, 患者の治療効果の低下と死亡率の上昇につながる事が知られている。この現象とセロトニン 2C 受容体遺伝子プロモーター領域の -759 C/T 多型との関連が報告されている。-759 C/T 多型は, セロトニン 2C 受容体発現量に影響を与える機能的多型であることが *in vitro* の実験において確認されている。^{10,11)}

3. セロトニン 2C 受容体の RNA 編集とその意義

セロトニン 2C 受容体は 7 回膜貫通型, G タンパク質共役型の受容体である。セロトニンなどのアゴニスト刺激に際し, G タンパク質を介してフォスフォリパーゼ C を活性化し細胞内のシグナル伝達を行う。RNA 編集は, 第 2 細胞内ループをコードする 5 ヲ所 (A-E 部位) で起こり, いずれもアミノ酸配列が変化し多数のアイソフォームが作られる (Fig. 1)。¹²⁾ アイソフォームは理論上, 最大 24 種類産生され得るが, 脳領域によって各アイソフォーム

の分布が異なっている。¹³⁾ 機能的には, RNA 編集部位が多くなるにつれ, セロトニン potency の減少, G タンパクの結合効率が減少, アゴニストの結合効率が減少というような形で, 様々なレベルで受容体のセロトニンに対する効果が減弱する。*In vitro* の実験では, 細胞内カルシウム反応を引き起こすセロトニン濃度 (EC50) が RNA 編集を全く受けていない INI 型アイソフォームでは 2.2 nM, すべて RNA 編集を受けた VGV 型アイソフォームでは 49 nM と, 約 20 倍もの違いが見られている。¹⁴⁾

また, RNA 編集を受ける部位はエクソン-イントロン境界付近のエクソン部位にあり, 直後のイントロンはエクソンと相補性の高い配列 (exon complementary sequence, ECS) を示す。pre-mRNA 配列が転写されたのち, ECS 配列部位と exon 配列部位が二本鎖 RNA を形成し, RNA 編集酵素 ADAR (Adenosine deaminase acting on RNA) による認識と A-to-I RNA 編集が行われる。ADAR は 3 種類同定されており (ADAR1-3), 二本鎖 RNA 結合ドメインと編集触媒ドメインを有する。*In vitro* の実験からは, A, B, E 部位の編集には ADAR1 が, E, C, D 部位の編集には ADAR2 が主要な役割を果たすとされている。現在までのところ, ADAR3 については実際に RNA 編集活性があるかどうかの報告はない。RNA 編集は, pre-mRNA 内の 2 重鎖 RNA の相補性に影響を与え, その後のイベントであるスプライシングの効率にも影響を与える。¹⁵⁾ RNA 編集とスプライシングの coupling はセロトニン 2C 受容体に限らず, グルタミン酸受容体など他の RNA 編集を受ける遺伝子でも一般的に見い出されている。

4. セロトニン 2C 受容体の RNA 編集と精神疾患研究

それでは精神疾患患者では, セロトニン 2C 受容体の RNA 編集状態は変化しているのだろうか。2007 年までに患者死後脳前頭葉部位を用いた研究が 6 報, 報告されている。Niswender ら¹⁶⁾ は, 統合失調症, うつ病患者死後脳で編集状態を測定したが, 疾患毎には有意な差を認めなかった。しかし, 疾患に係わらず自殺例に注目すると, A 部位の編集増加を認めている。Sodhi ら¹⁷⁾ は統合失調症患者において, 5 ヲ所すべてが未編集型である INI 型アイソフォームの増加を報告している。一方で,

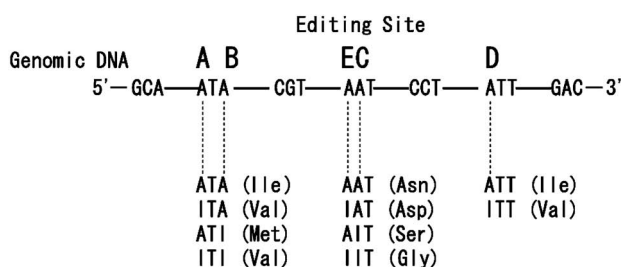


Fig. 1. RNA Editing Sites of Serotonin 2C Receptor

Dracheva ら¹⁸⁾は統合失調症患者では有意な変化を認めていない。Gurevich ら¹⁹⁾は、うつ病自殺患者において E 部位及び C 部位の編集増加、D 部位の編集減少を認めている。われわれの研究では、²⁰⁾ 統合失調症、双極性障害、うつ病で、A 部位及び D 部位における編集状態を測定したところ、うつ病で D 部位の増加を認めた。また、自殺例に注目すると Niswender らの結果と同じく A 部位の編集増加を認めた。最近では、Dracheva ら²¹⁾が異なる死後脳サンプルセットで統合失調症、双極性障害の自殺例に注目して測定を行い A, C, D 部位の編集増加、それに伴う VSV 型アイソフォームの増加を報告している。

死後脳研究はサンプル数の少なさ、性差、年齢、サンプルの品質、投薬影響など様々な交絡因子の影響を受け、統一的な解釈は困難である場合が多い。特に投薬はあとで述べるようにセロトニン 2C 受容体 RNA 編集状態を実際に変動させるので、結果の解釈には注意を要する。現在までに、複数の研究で共通している結果は、自殺・うつ病における RNA 編集状態の変化、特に増加傾向があるということであろう。

5. 動物モデルにおけるセロトニン 2C 受容体の RNA 編集

異なるマウスの系統間で、セロトニン 2C 受容体の RNA 編集が大きく変動することが報告されている。²²⁾ マウス Balb/c 系統の前頭葉では、セロトニン 2C 受容体 RNA はほとんど編集されておらず、未編集型である INI 型アイソフォームが全体の 80% 程度を占める。これに対し、129Sv や C57/B16 系統では、INI 型のアイソフォームは全体の 10% 未満であり、逆に VNV 型や VDV 型が主要なアイソフォームとなっている。Balb/c 系統は他の系統と比べて不安行動やストレス反応性が強く、脳内のセロトニン含量が半分ほどしかないことが報告されている。これは、Balb/c 系統における、Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) 遺伝子上の変異によりセロトニン合成が低下しているためとされている。²³⁾ また、うつ病の治療薬であるフルオキセチンの投与により、未編集型である INI 型アイソフォームが顕著に減少することが報告されている。²²⁾ フルオキセチンは選択的セロトニン再取り込み阻害薬であり、シナプスでのセロトニン濃度を上昇させ

る。加えて、セロトニン 2A/2C 受容体アゴニストである (+/-)-1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane (DOI) 投与が E 部位の編集を増加させ、para-chlorophenylalanine (PCPA) によりセロトニンを欠乏させると E 部位及び C 部位の RNA 編集が低下したことから、セロトニン 2C 受容体の RNA 編集は脳内のセロトニン濃度や代謝と密接に関連していることが示唆されている。²⁴⁾ 一方で、Sodhi らは、抗精神病薬であり、主にドーパミン D2 受容体阻害剤として知られているハロペリドールやリスペリドンは、ラットにおいて、D 部位の編集を低下又は増加させるが、クロザピンは影響しないことを報告している。²⁵⁾ また、われわれはシナプス間隙でのセロトニン濃度を変化させる作用のある、コカイン、レセルピンのいずれも、ラットにおけるセロトニン 2C 受容体の RNA 編集に影響しないことを示した。²⁶⁾ また、われわれはうつ病の動物モデルである、学習性無力ラット (learned helplessness rat) において、E 部位の編集増加とフルオキセチン投与による編集低下を認めている。²⁷⁾

したがって、セロトニン 2C 受容体の RNA 編集の増減は単純な脳内のセロトニン濃度の増減だけで決まるのではなく、薬剤によって異なった影響を示す可能性があること、また、全体的な RNA 編集の増減よりも特定部位の RNA 編集の変化が重要である可能性がある。

6. RNA 編集状態の測定方法

RNA 編集の評価には、RT-PCR 反応後、放射性同位体を用いた primer extension 反応や、制限酵素切断を行う方法、RT-PCR 産物をサブクローニングして多数のコロニーをピックアップしてシーケンスを行うなどの方法が取られている。臨床研究や様々な薬剤応答性を検討するには、多くの検体の RNA 編集を迅速に測定できるハイスループットな方法の開発が必要である。われわれは、変性高速液体クロマトグラフィーを用いた non-RI による primer extension 法、²⁶⁾ 及び pyrosequencing を用いた方法²⁸⁾ を確立し研究に用いている。特に後者の方法は、従来、クローニング-シーケンス法でしか得られなかった、セロトニン 2C 受容体の 5' 側の RNA 編集部位の測定を一度にできるように実験系を設定しており (Fig. 2)、多数サンプルでの測定に極めて有効であることが期待される。

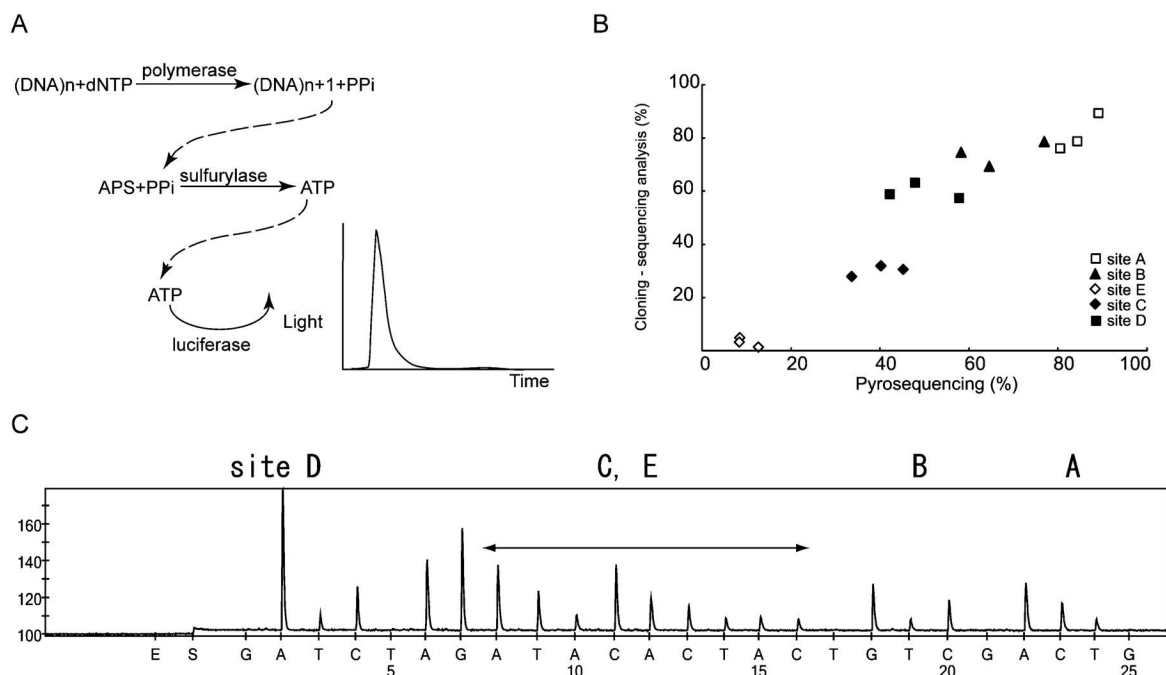


Fig. 2. Pyrosequencing Analysis of the Serotonin 2C RNA Editing Sites

A: Principle of pyrosequencing. After each dNTP is dispensed, DNA polymerase incorporates it into the sequencing primer that was pre-annealed to the single-stranded template DNA, and pyrophosphate (PPi) is released. ATP sulfurylase converts adenosine-5'-phosphosulfate (APS) to ATP with PPi. Luciferase then produces light by using ATP. The light is detected by a charge coupled device camera, and presented as a peak in a pyrogram. Each peak height is proportional to the number of dNTP incorporated, allowing quantitative measurements. After the apyrase degrades unincorporated dNTPs and excess ATP, the next dNTP is added. By optimizing the dispensation order, RNA editing efficiency of all five RNA editing sites including consecutively ordered sites was obtained in our method. B: Comparison of cloning-sequencing analysis and pyrosequencing. C: Representative pyrogram using RT-PCR product as a template.

REFERENCES

- 1) Tecott L. H., Sun L. M., Akana S. F., Strack A. M., Lowenstein D. H., Dallman M. F., Julius D., *Nature*, **374**, 542–546 (1995).
- 2) Iwamoto K., Kakiuchi C., Bundo M., Ikeda K., Kato T., *Mol. Psychiatry*, **9**, 406–416 (2004).
- 3) Castensson A., Emilsson L., Sundberg R., Jazin E., *Biol. Psychiatry*, **54**, 1212–1221 (2003).
- 4) Gutierrez B., Arias B., Papiol S., Rosa A., Fananas L., *Neurosci. Lett.*, **309**, 135–137 (2001).
- 5) Lerer B., Macciardi F., Segman R. H., Adolfsson R., Blackwood D., Blairy S., Del Favero J., Dikeos D. G., Kaneva R., Lilli R., Massat I., Milanova V., Muir W., Nothen M., Oruc L., Petrova T., Papadimitriou G. N., Rietchel M., Serretti A., Souery D., Van Gestel S., Van Broeckhoven C., Mendlewicz J., *Mol Psychiatry*, **5**, 579–585 (2001).
- 6) Oruc L., Verheyen G. R., Furac I., Jakovljević M., Ivezić S., Raeymaekers P., Van Broeckhoven C., *Am. J. Med. Genet.*, **74**, 504–506 (1997).
- 7) Holmes C., Arranz M. J., Powell J. F., Collier D. A., Lovestone S., *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1507–1509 (1998).
- 8) Massat I., Lerer B., Souery D., Blackwood D., Muir W., Kaneva R., Nothen M. M., Oruc L., Papadimitriou G. N., Dikeos D., Serretti A., Bellivier F., Golmard J. L., Milanova V., Del-Favero J., Van Broeckhoven C., Mendlewicz J., *Mol. Psychiatry*, **9**, 797–798 (2007).
- 9) Okada M., Northup J. K., Ozaki N., Russell J. T., Linnoila M., Goldman D., *Mol. Psychiatry*, **9**, 55–64 (2004).
- 10) Miller D. D., Ellingrod V. L., Holman T. L., Buckley P. F., Arndt S., *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)*, **133**, 97–100 (2005).
- 11) Reynolds G. P., Zhang Z.-J., Zhang X.-B., *Lancet*, **359**, 2086–2087 (2002).
- 12) Burns C. M., Chu H., Rueter S. M., Hutchinson L. K., Canton H., Sanders-Bush E., Na-

- ture, **387**, 303–308 (1997).
- 13) Wang Q., O'Brien P. J., Chen C. X., Cho D. S., Murray J. M., Nishikura K., *J. Neurochem.*, **4**(3), 1290–1300 (2000).
 - 14) Price R. D., Sanders-Bush E., *Mol. Pharmacol.*, **58**, 859–862 (2000).
 - 15) Flomen R., Knight J., Sham P., Kerwin R., Makoff A., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2113–2122 (2004).
 - 16) Niswender C. M., Herrick-Davis K., Dilley G. E., Meltzer H. Y., Overholser J. C., Stockmeier C. A., Emeson R. B., Sanders-Bush E., *Neuropsychopharmacology*, **24**, 478–491 (2001).
 - 17) Sodhi M. S., Burnet P. W., Makoff A. J., Kerwin R. W., Harrison P. J., *Mol. Psychiatry*, **6**, 373–379 (2001).
 - 18) Dracheva S., Elhakem S. L., Marcus S. M., Siever L. J., McGurk S. R., Haroutunian V., *J. Neurochem.*, **87**, 1402–1412 (2003).
 - 19) Gurevich I., Tamir H., Arango V., Dwork A. J., Mann J. J., Schmauss C., *Neuron*, **34**, 349–356 (2002).
 - 20) Iwamoto K., Kato T., *Neurosci. Lett.*, **346**, 169–172 (2003).
 - 21) Dracheva S., Patel N., Woo D. A., Marcus S. M., Siever L. J., Haroutunian V., *Mol. Psychiatry* (in press).
 - 22) Englander M. T., Dulawa S. C., Bhansali P., Schmauss C., *J. Neurosci.*, **25**, 648–651 (2005).
 - 23) Zhang X., Beaulieu J. M., Sotnikova T. D., Gainetdinov R. R., Caron M. G., *Science*, **305**, 217 (2004).
 - 24) Gurevich I., Englander M. T., Adlersberg M., Siegal N. B., Schmauss C., *J. Neurosci.*, **22**, 10529–10532 (2002).
 - 25) Sodhi M. S., Airey D. C., Lambert W., Burnet P. W., Harrison P. J., Sanders-Bush E. A., *Mol. Pharmacol.*, **68**, 711–719 (2005).
 - 26) Iwamoto K., Kato T., *Pharmacogenomics J.*, **2**, 335–340 (2002).
 - 27) Iwamoto K., Bundo M., Nakatani N., Yoshikawa T., Kato T., *Neurosci. Res.*, **53**, 69–76 (2005).
 - 28) Iwamoto K., Bundo M., Kato T., *RNA*, **11**, 1596–1603 (2005).