

令和元年6月9日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06789

研究課題名(和文) シナプス接着分子SALM/Lrfnの分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular function of a synaptic adhesion molecule, SALM/Lrfn in the brain.

研究代表者

守村 直子 (Morimura, Naoko)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：00349044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型分子をコードするシナプス接着分子Lrfn/SALM1は、足場タンパク質PSD-95と会合してNMDA受容体およびAMPA受容体のポストシナプスへの集積および細胞表面発現を制御することを見出した。Lrfn2ノックアウトマウスを用いた解析から、Lrfn2が海馬のシナプス構造や可塑性さらに海馬依存的な記憶・学習に関与することを明らかにした。興味深いことに、ノックアウトマウスは社会的ひきこもりやプレパルス抑制に異常がみられた。アジア人を対象とした全ゲノム関連解析(GWAS)から、自閉症患者でLRFN2一塩基変異型LRFN2_R274Hが、統合失調症患者でLRFN2_E462Dを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞と神経細胞との繋ぎ目であるシナプスは、記憶・学習、認知、感情、実行機能といった高次脳機能の要所であり、シナプス形成や維持機構を分子レベルで理解することは、高次脳機能を反映する『こころ』の解明につながると思われる。近年シナプス異常と脳発達障害との関連性にも注目されており、更なる高次脳機能における分子機序解明が求められている。本研究で明らかとなったLrfn2の興奮性シナプスの分子メカニズムは、シナプス接着分子の脳機能における生理的役割を明らかにしただけでなく、『シナプス異常と発達障害』とを結びつける知見の一つとなり脳発達障害発症のメカニズム解明および新規治療法につながる成果となった。

研究成果の概要(英文)：Lrfn2/SALM1 is a PSD-95-interacting synapse adhesion molecule, and human LRFN2 is associated with learning disabilities. We demonstrated that Lrfn2 knockout mice exhibit autism-like behavioural abnormalities, including social withdrawal, decreased vocal communications, increased stereotyped activities and prepulse inhibition deficits, together with enhanced learning and memory. In the hippocampus, the levels of synaptic PSD-95 and GluA1 were decreased. And the synapses were structurally and functionally immature with spindle shaped spines, smaller postsynaptic densities, reduced AMPA/NMDA ratio, and enhanced LTP. In vitro experiments revealed that synaptic surface expression of AMPAR depends on the direct interaction between Lrfn2 and PSD-95. We also detected functionally defective LRFN2 missense mutations in autism and schizophrenia patients. Together, our research indicate that Lrfn2 serves as a core synaptic components of excitatory neurons, associating with psychiatric disorders,

研究分野：脳神経科学

キーワード：シナプス接着分子 興奮性シナプス 可塑性 自閉症 統合失調症

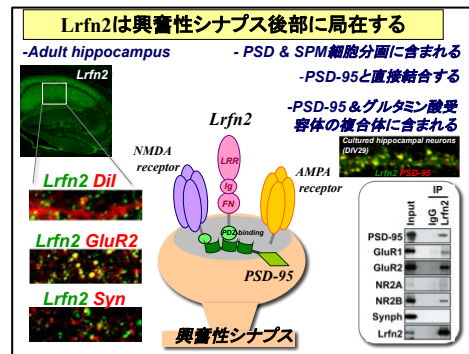
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳神経組織の発生・分化および神経回路形成において、Leucine-rich repeats (LRR) 構造を持つ分子は重要な機能を有するものが多い。Lrfn/SALM (Leucine-rich repeat containing/Synapse adhesion-like molecule) は Lrfn/SALM 1-5 のファミリーメンバーで構成され、遺伝子発現の特徴および分子のドメイン構成から脳神経組織特異的膜貫通型 LRR スーパーファミリーの一つと考えられる。また Lrfn/SALM ファミリーは、シナプス接着に関わるポストシナプスオーガナイザーに分類され、本研究の対象となる Lrfn2 は細胞内 C 末端の PDZ-binding 配列が足場タンパク質 PSD-95 と直接結合して興奮性シナプスの後肥厚サイズを規定し、NMDA/AMPA 受容体の発現制御に関わることが *in vitro* 研究で示唆されていた (右図)。しかしながら、Lrfn/SALM の *in vivo* における役割は不明であった。

ファミリーメンバーそれぞれの機能的特性を予測するために、各々に対する特異抗体を作製して経時的な脳内発現プロファイルを調べた。Lrfn1, 3, 4, 5 は生前から発現が確認され、Lrfn1, 3, 5 は生後から成体までの発達期に発現ピークがみられた。Lrfn2 のみが生前での発現が極めて低く、成体にむけて成長とともに発現上昇がみられ、特に海馬でその傾向が顕著であった。

記憶・学習、認知、思考、感情、実行機能といった高次脳のはたらきは、神経細胞同士のつながりで構築された緻密な神経回路網によって生み出される。神経細胞と神経細胞との繋ぎ目であるシナプスは高次脳機能の要所であり、シナプス形成や維持機構を分子レベルで理解することは、高次脳機能を反映する『こころ』そのものの解明につながると考えられる。近年、シナプス形成や機能の異常は、脳機能障害だけでなく精神発達障害・精神神経疾患との関連性にも注目されており、更なる高次脳機能における分子機序解明が求められており、作製した Lrfn2 ノックアウトマウスに生じた分子、細胞、脳、個体レベルの変化を網羅的に解析することは、シナプス接着分子の生理的役割の解明につながる。



2. 研究の目的

ポストシナプスオーガナイザーは、スパイン形成とグルタミン酸受容体の局在を精密にコントロールする興奮性シナプス伝達経路の根幹を担っている。ポストシナプスオーガナイザーの欠失や変異はシナプス伝達系に直接的な影響を及ぼすため、シナプス可塑性や記憶・学習の異常を引き起こすだけでなく、最近では脳発達障害などの精神神経疾患発症の主要因の一つに考えられている。

本研究は、ポストシナプスオーガナイザーLrfn/SALMの分子メカニズム解明と生理的役割を明らかにして、記憶学習や発達障害発症のLrfn/SALMを介する新しいメカニズムを見出す。

3. 研究の方法

(1) Lrfn2 ノックアウトマウスの行動学的解析

Lrfn2 ノックアウトマウスに対して一連の行動テストバッテリーを行った。

(2) Lrfn2 ノックアウトマウスの海馬 CA1 シナプス解析

Lrfn2 欠損による異常が観察されると予想された海馬について、シナプス形態解析 (ゴルジ染色および電子顕微鏡解析)、シナプスマーカーの変化 (免疫組織学的解析およびウエスタンブロットティング)、電気生理学的解析 (佐賀大・安田浩樹先生による研究協力) を行った。

(3) LRFN2 の SNP (single nucleotide polymorphisms) の機能異常解析

ヒト LRFN2 ゲノム上の一塩基変異多型 LRFN2^{R274H} が自閉症患者で、LRFN2^{E462D} が統合失調症患者で有意であることが示唆されたことから (理研・吉川武男先生による研究協力)、それぞれの変異型発現ベクターを構築して PSD-95 との結合変化と膜移行を調べた。

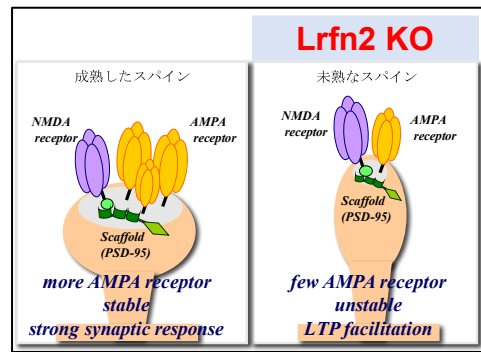
4. 研究成果

(1) Lrfn2 ノックアウトマウスの行動学的解析

Lrfn2 の脳高次機能における生理的役割を解明するために Lrfn2 ノックアウトマウスを用いた行動解析を行ない、Lrfn2 の記憶・学習行動に果たす役割や Lrfn2 遺伝子欠損によって引き起こされた行動異常について検討した。その結果、海馬依存的な記憶学習課題である空間に対する恐怖条件付けテスト (fear conditioning contextual test) においてすみ反応の亢進がみられ、モリス水迷路テストでの空間記憶の上昇が認められた。興味深いことに、社会性行動テストにおいて『引きこもり行動』が観察された。また、音刺激驚愕反応のプレパルス阻害の障害や輪回し行動の執拗な過活動、および超音波発声回数の減少が認められた。以上の結果から、自閉症スペクトラムや統合失調症で見られる行動と極めて近似した表現型であることがわかった。

(2) Lrfn2 ノックアウトマウスの海馬 CA1 シナプス解析

Lrfn2 ノックアウトマウスの海馬 CA1 神経細胞のスパインはスパインヘッドが小さくひよろ長い形態が多いことがゴルジ染色で観察され、電子顕微鏡による微細構造の形態解析から PSD の幅が有意に小さいことがわかった。加えて、免疫組織学的解析から PSD-95 の斑点状染色の斑点数および蛍光強度がノックアウトマウスで低下していた。また TritonX-100 不溶分画の GluA1 が減少していることがわかった。さらに、ノックアウトマウスの海馬 CA1 野シナプス伝達の長期増強 (LTP) が有意に亢進していること、AMPA/NMDAR の低下およびサイレントシナプス数の増加が電気生理学的解析で示された。このことから、Lrfn2 はシナプスの成熟化や可塑性に重要であることがわかった。



(3) LRFN2 の疾患由来 SNP 機能異常解析

LRFN2^{R274H} (自閉症) または LRFN2^{E462D} (統合失調症) と PSD-95 を HEK293T 細胞に共発現し、PD-95 の免疫沈降による LRFN2^{R274H} または LRFN2^{E462D} の結合量を調べた。その結果、正常 LRFN2 の結合量と比較して約 30% 低下を示した。また、同様の HEK293T 細胞共発現時の免疫細胞染色の結果、SNP 変異型との共発現では正常 LRFN2 の共発現でみられた PSD-95 の膜への集積が顕著に低下して細胞質に拡散していた。以上の結果から、LRFN2 の SNP 変異部位は PSD-95 と直接結合領域にはないものの、LRFN2 と PSD-95 を介する興奮性シナプスの機能異常が障害発症の要因になっているものと示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kato T, Yamada A, Sasa K, Yoshimura K, Morimura N, Ogata H, Sakashita A and Kamijo R. Nephronectin Expression is Inhibited by Inorganic Phosphate in Osteoblasts. *Calcified tissue international* 2019 104(2) pp201-206. doi:10.1007/s00223-018-0484-3. 査読有.
- ② Kato T, Yamada A, Ikehata M, Yoshida Y, Sasa K, Morimura N, Sakashita A, Iijima T, Chikazu D, Ogata H and Kamijo R. FGF-2 suppresses expression of nephronectin via JNK and PI3K pathways. *FEBS open bio* 2018 8(5) pp836-842. doi:10.1002/2211-5463.12421. 査読有.
- ③ Iezumi Y, Yamada A, Minami E, Ikehata M, Yoshida Y, Kato T, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Iijima T, Chikazu D and Kamijo R. IL-1 β suppresses nephronectin expression in osteoblasts via ERK1/2 and JNK. *Biochemical and biophysical research communications* 2017 493(1) pp773-775. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.104. 査読有.
- ④ Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama KI, Hatayama M, Tomioka NH, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T and Aruga J. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfn2/SALM1-deficient mice. *Nature communications* 2017 8 15800. doi:10.1038/ncomms15800. 査読有.
- ⑤ Ikehata M, Yamada A, Morimura N, Itose M, Suzawa T, Shirota T, Chikazu D and Kamijo R. Wnt/ β -catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 2017 484(2) pp231-234. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.053. 査読有.
- ⑥ Hiranuma K, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Nagahama R, Ikehata M, Tsukasaki M, Morimura N, Chikazu D, Maki K, Shirota T, Takami M, Yamamoto M, Iijima T and Kamijo R. Expression of nephronectin is enhanced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *FEBS open bio* 2016 6(9) pp914-918. doi:10.1002/2211-5463.12085. 査読有.
- ⑦ Kurosawa T, Yamada A, Suzuki D, Morimura N, Sasagane Y, Itabe H and Kamijo R. Nephronectin Expression Is Up-Regulated by BMP-2. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2016 39(7) pp1211-1215. doi:10.1248/bpb.b15-00941. 査読有.
- ⑧ Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T, Shirota T, Itabe H and Kamijo R. Expression of nephronectin is inhibited by oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. *FEBS open bio* 2015 5 pp303-307. doi:10.1016/j.fob.2015.04.001. 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 守村直子 他 10 名. Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic

- plasticity in Lrfn2/SALM1-deficient mice. 第60回日本神経化学大会 2017. 仙台
- ② 横川匠, 守村直子, 他9名. 加齢マウスにおける不安行動の増大および海馬のシナプス分子の減少. 日本分子生物学会・日本生化学会(ConBio2017) 2017. 神戸

講演発表

- ③ 守村直子. 第4回立命館大学生命科学医科学コロキウム 講演 2016. 滋賀
- ④ 守村直子, 他6名. 第13回成体脳のニューロン新生懇談会 講演 2017. 福岡
- ⑤ 守村直子. 東京理科大学生命科学研究科ミニシンポジウム 講演 2017. 東京
- ⑥ 守村直子. 第19回運動器科学研究会 若手招待講演 2018. 岐阜

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmchl/recent6.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

- ① 研究協力者氏名：有賀 純
ローマ字氏名：Aruga Jun
- ② 研究協力者氏名：三品 昌美
ローマ字氏名：Mishina Masami
- ③ 研究協力者氏名：等 誠司
ローマ字氏名：Hitoshi Seiji
- ④ 研究協力者氏名：安田浩樹
ローマ字氏名：Yasuda Hiroki
- ⑤ 研究協力者氏名：吉川武男
ローマ字氏名：Yoshikawa Takeo
- ⑥ 研究協力者氏名：彌永亜季
ローマ字氏名：Yanaga Aki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。