

令和元年6月10日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04666

研究課題名(和文) 神経発達障害の中核機構としてのシナプスオーガナイザーと代謝型受容体の相互作用

研究課題名(英文) Altered molecular interaction between LRR synapse organizer and metabotropic receptors as a core mechanism for neurodevelopmental disorders

研究代表者

有賀 純 (ARUGA, Jun)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：10232076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠陥多動性障害を始めとする神経発達障害の病態を理解することを目的とした。これら疾患への関与が考えられるシナプス膜タンパク質グループ「LRRシナプスオーガナイザー」とこれらと結合する代謝型受容体を対象として、これらを欠損するマウスに表れた脳の機能、構造、分子レベルでの異常を多角的に解析した。その結果、発達障害様の行動異常を示すマウスでは、シナプスの構造・機能の異常、神経系の機能を統合するように働いているモノアミン系の異常が病態に関わることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- ・研究の対象とした分子機構は申請者らが見いだしたものであり、今回の研究で実験動物を用いて、その生理的意義が明らかになったので、分子レベルでの脳の働きを理解に貢献すると考えられる。
- ・明らかになった事実は神経発達障害の発症の仕組みの理解、より良い診断法や治療薬の開発に貢献すると予測される。
- ・解析に用いた遺伝子変異マウスは疾患モデル動物として、さまざまな治療薬の妥当性を評価することに用いられると予測される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed a better understanding of the disease core mechanism underlying neurodevelopmental disorders including attention-deficit hyperactivity disorder. For this purpose, we focused on the molecular interaction between LRR synapse organizer and metabotropic receptors. Abnormalities appeared in the mice lacking these proteins were analyzed through multidisciplinary approach. As a result, altered synaptic structure and function as well as altered monoaminergic systems that control overall neuronal activities are found to be critically involved in the pathophysiology.

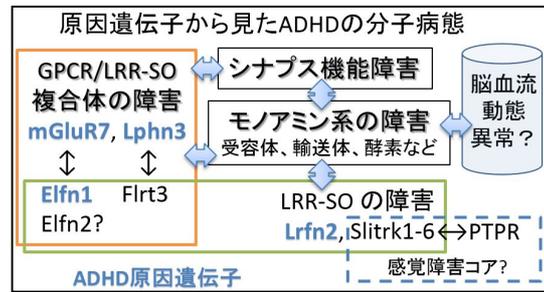
研究分野：神経生物学

キーワード：神経発達障害 多動症 シナプス伝達 疾患モデル動物 膜タンパク質 タンパク質間結合 遺伝子変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、神経発達障害の1つである注意欠陥多動性障害 (ADHD) の遺伝子研究のメタ解析が報告された¹。その報告によると、複数の研究で ADHD への有意な関与が示された 37 遺伝子のうち、機能でグループ化できるものは、ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンなどのモノアミン系関連タンパク質 (受容体、輸送体、代謝酵素など 25 遺伝子)、シナプスタンパク質 (SNAP25 等 4 遺伝子)、G タンパク質共役型受容体 (GPCR、モノアミン受容体を除く) (mGluR7, Lphn3, 2 遺伝子) の 3 グループだけであった。この結果はこれらグループの分子群が ADHD の病態の中核にあることを示唆する (右図)。このうち mGluR7 については、このタンパク質と細胞質内で結合する足場タンパク質 PICK1 も ADHD の発症に関与することが示されており²、ADHD の病態への関与は非常に確からしい。「mGluR7 がどのように ADHD の病態に関わるのか」、「mGluR7 の異常が何らかのモノアミン代謝異常を引き起こし、統合的な疾患コア機構を形づくるのか」に答えることが、ADHD の統合的な病態概念確立のため、重要であると考えられた。



申請者らは mGluR7 がシナプス後部のロイシンリッチリピートを含む (LRR 型) 1 回膜貫通タンパク質 Elfn1 との結合によって、海馬の抑制性ニューロン (OLM 細胞) 上に作られる興奮性シナプスのシナプス前部に集積することを発見した³。また、ヒト ELFN1 はてんかんまたは ADHD 患者群でのみ認められるミスセンス変異が集積している領域があり、これらの変異は mGluR7 集積能を低下させること、mGluR7 欠損マウス、Elfn1 欠損マウスは共に感覚刺激で誘発される晩発性てんかん発作と ADHD に関連した行動異常を示すこと^{3,4}も明らかになっている。このことは Elfn1/mGluR7 複合体が ADHD の疾患コアに含まれることを示唆している。さらに Elfn1 と同じく ADHD に関連する GPCR である Lphn3 もシナプス前部に存在しており、Flrt3 という LRR 型 1 回膜貫通タンパク質 とトランスシナプス結合することも知られている⁵。これらの例から、「シナプス前部 GPCR とシナプス後部 LRR 型膜タンパク質のトランスシナプス結合が ADHD の疾患コアで重要な役割を果たすのではないか」という仮説が導かれる。この仮説の妥当性を検討することは神経生物学的にも重要な課題であると考えられた。

一方、申請者らは代謝型受容体の 1 つである受容体型チロシンホスファターゼ (Ptprd) を Slitrk ファミリータンパク質が制御すること⁶、Slitrk ファミリータンパク質の変異による構造変化が感覚障害の発症と関係する可能性が高いこと⁷も報告した。Ptprd の変異が restless leg (むずむず足) 症候群 (感覚障害の一種) の原因となることを示すゲノムワイド関連解析 (GWAS) および家系解析のデータが複数のグループにより報告されていること⁸も併せて、Slitrk ファミリー遺伝子産物と代謝型受容体との複合体が感覚障害の病態と何らかの関係を持つことを示唆する。

Elfn, Slitrk ファミリータンパク質をはじめとする多数のシナプス LRR 型膜タンパク質は主にシナプス後部に存在し、シナプス形成・機能に関わることが明らかとなり、LRR シナプスオーガナイザー (LRR-SO) と呼ばれている。申請者らは LRR-SO 欠損動物群ではすべての系統に行動異常が観察され、発生発達障害のモデルを含んでいる^{3,6,7,9-11}。この動物群で解析した複数の系統において、モノアミンの代謝異常があることを見出した。また、モノアミン標的薬に対する反応性についても、解析した系統全てで変化していることを見出した。これらの結果から、「LRR-SO によるシナプス機能制御はモノアミン系のような脳の広汎調節系に影響を及ぼし、また逆に影響を受け、それが神経発達障害の病態と関わるのではないか」という仮説が導かれた。

2. 研究の目的

- (1) Elfn ファミリー、Slitrk ファミリーの新たな分子機能を明らかにする。これらの LRR-SO について分子動態、リン酸化などの修飾、結合タンパク質の系統的な探索解析を進め、それらの性状と意義を理解する。
- (2) LRR-SO 欠損動物における脳の構造・機能の異常、広汎調節系の異常を明らかにする。シナプス機能異常に起因する病態の実態 (行動、脳波、広範囲調節系) を解明する。
- (3) LRR-SO と代謝型受容体の分子間相互作用の意義の解明に資する実験系を開発する。

3. 研究の方法

(1) Elfn1 C 末端の分子機能解析。
ヒト ELFN1 の C 末には変異がてんかん・多動症患者でのみ認められるミスセンスが集積した領域があり、変異が入ることにより、mGluR7 の集積に障害が出るということが明らかになっている。現在、これらの変異により、ELFN1 の細胞内分布に異常が出る場合があることがわかっている。この現象を説明するために、変異体シリーズを作製して、C 末端に結合する分子を同定し、どの細胞内情報伝達経路と関係を持つかが明らかにする。

(2) Eln2 の分子機能解析。

Eln2 は Eln1 とアミノ酸配列の相同性が高いが、マウス海馬での分布は抑制ニューロンに限局した Eln1 より広い領域で発現する。Eln2 欠損マウスでは、認知機能異常が認められている(未発表)。免疫沈降用の Eln1 と交差しない抗体の作製に成功している。これを用いて、脳の Eln2 の部分精製と質量分析により、結合分子解析を行う。

(3) Slitrk ファミリー変異マウスのシナプス解析。

Slitrk ファミリー遺伝子欠損マウスについても、生体脳標本の免疫染色とスライス標本を用いた電気生理により、シナプスの形成不全と関係した異常があるか検討する。

(4) Eln 欠損動物に表れた広汎調節系の異常探索。

Slitrk 欠損動物群と Eln 欠損動物群の未解析のものを対象として、急速凍結法による脳内モノアミン定量を行う。解析は特に前頭前野、側坐核、線条体に注目して、できるだけ多くの発達段階について行う。

(5) ウイルスベクターを用いた LRR-SO 分子機能解析系を確立。

本研究では Slitrk 変異マウスで動態変化の認められたノルアドレナリン系とセロトニン系を Chemogenetics の手法で実験的に活性化・不活化する実験系を導入する。

4. 研究成果

(1) ELFN ファミリータンパク質の分子機能解析

ELFN ファミリータンパク質の結合タンパク質および、タンパク質修飾に関する生化学的解析を行った。その結果、生理的意義があると予測される、新たな結合タンパク質、および、タンパク質修飾を見いだすことができた。これらの結果を受けて、ELFN ファミリーの変異マウスにおいて、これらの結合タンパク質の動態がどのように変化するかについての解析が行われた。

(2) LRR-SO 関連発達障害モデル動物の作製と解析

既存の Eln 欠損マウス群および Slitrk 欠損マウス群について、脳内モノアミン含量の定量解析、モノアミン動態に関連した分子マーカーの定量解析が行われた。

新たに発達障害患者由来の ELFN1 変異と同等な一塩基置換変異をもつ変異マウスを CRISPR/Cas9 法により作製して、遺伝的背景を整えるための近交系マウスへの戻し交配を 5 世代以上行った。得られた個体群を用いて行動解析を行った。その結果、Eln1 欠損マウスと類似の行動異常、Eln1 欠損マウスとは異なる行動異常が認められた。これらの結果は ELFN1 遺伝子変異が発達障害の一因となるという仮説を支持した。

Slitrk ファミリーについても、発達障害患者に特有な変異を同定し、これらの変異を持つマウスを新たに作製し、行動解析の準備が進められた。

ELFN1 と似た構造を持つ ELFN2 について、欠損マウスの中枢神経系および末梢系にあらわれる症状を系統的に解析した。その結果、予測された分子機能についての生化学的な実験をすすめた。

(3) Lrnf2 変異と神経発達障害の関連についての解析 (Morimura et al., 2017)

ヒトで学習障害への関与が報告された LRR-SO の一つ、Lrnf2 を欠損するマウスを作製して、その表現型を検討した。その結果、Lrnf2 欠損マウスは単独で飼っていると正常マウスと同じ体重を示したが、集団で飼っていると正常マウスよりも体重が低くなった(図 1)。このことから、我々はこのマウスの社会

性に問題があるのではないかと考え、社会性行動を調べるいくつかの実験を行った。居住者侵入者試験では Lrnf2 欠損マウスは床敷の下にもぐって逃避し、他者との接触を避ける様子が観察された。また、かごに入れられた初見マウスに近づく回数も減っていた。超音波発生の頻度も Lrnf2 欠損マウスでは減っており、音声によるコミュニケーションにも異常が生じていると思われた。以上の社会性行動に関係した異常の他に固執性の増強や感覚情報処理の異常も観察された。

Lrnf2 欠損マウスでは記憶力が良くなっていることがわかった。それは、周囲の風景と迷路のゴールの位置との関係を覚える「空間記憶」と、ある場所に行くと嫌な刺激(電気刺激)が

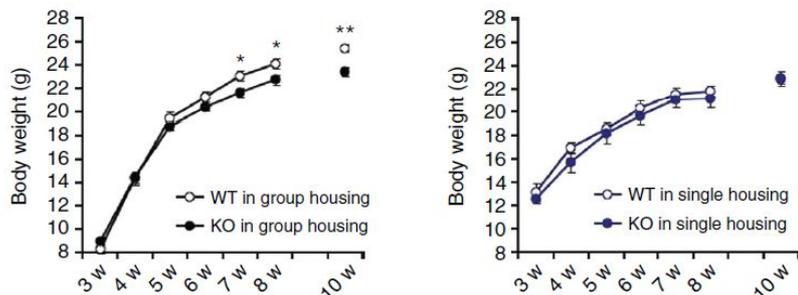


図 1 Lrnf2 欠損(KO)と野生型(WT)オスマウスの生後体重変化。左図、集団飼育；右図、単独飼育。各点は平均値、エラーバーは標準誤差。n=10 マウス(各遺伝子型)。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, t-test. Morimura et al., 2017 より引用。

くるということを覚える「恐怖記憶」の両者に当てはまる。これらの記憶は、体験したことをその場所や自分の状況と結び付けて覚えておくことが必要なので、「エピソード記憶」と呼ばれる。エピソード記憶を形成や想起には、海馬が重要な役割を果たすことが知られている。我々は正常マウス脳での *Lrfn2* タンパク質の分布を調べたところ、海馬や大脳皮質のシナプスに多く分布し、特に海馬の生後発達の過程で *Lrfn2* タンパク質の量が増加することを見いだした。そこで、*Lrfn2* 欠損マウスの海馬のシナプスの性質を調べてみたところ、興奮性シナプス後部の足場タンパク質 PSD-95 の量が減っており、興奮性シナプス後部がある突起が細長くなっていることがわかった（図 2）。この突起はスパイン（棘突起）と呼ばれ、正常マウスでは脳が発達していく過程で太く、短くなっていき、マッシュルームの様な形のものが増える。

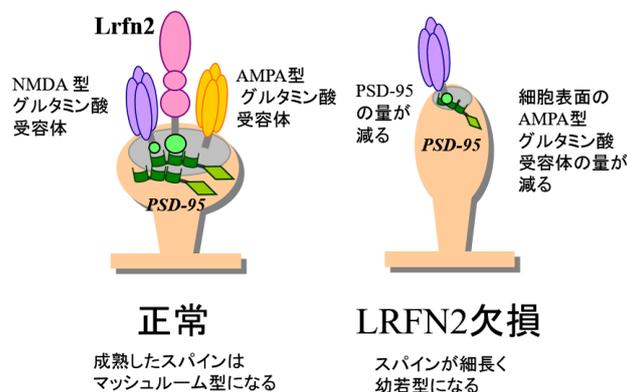


図 2 *Lrfn2* 欠損マウスのシナプス異常

次にシナプス可塑性がどのように変化するかを調べた。海馬のシナプスに頻度の高い電気刺激を与えてやるとシナプスの伝達効率が上がった状態が長く続くことが知られている。この性質はシナプス伝達の長期増強と呼ばれ、記憶の基礎になるものと考えられている。*Lrfn2* 欠損マウスのシナプス伝達の長期増強は正常マウスよりも上がっており、可塑性が高いと考えられた。

最近の研究では海馬の CA1 と呼ばれる領域のシナプス伝達の長期増強には、AMPA 型のグルタミン酸受容体がシナプス後部の細胞表面に出てくることが関係していることが示されている。そこで、*Lrfn2* 欠損マウスのシナプス後部で PSD-95 と同じ場所に存在している AMPA 型グルタミン酸受容体タンパク質の量を測ってみたところ、減少していた（図 2）。逆に培養した神経細胞に *Lrfn2* を過剰に産生させてやると、細胞表面にでてくる AMPA 型グルタミン酸受容体タンパク質の量が増え、この働きには *Lrfn2* と PSD-95 の結合が必要なが示された。これらの結果から、海馬が発達する過程で *Lrfn2* がシナプスを成熟させるものと考えられた。

Lrfn2 欠損マウスに現れた行動の異常は自閉スペクトラム症や統合失調症の患者の症状と一部類似すると考え、自閉症および統合失調症患者および健常人由来伝子材料を用いて *LRFN2* の遺伝子変異探索を行った。その結果、患者群にのみ認められるミスセンス変異（タンパク質の構造に影響がでる遺伝子変異）があることがわかった。細胞培養した海馬の神経細胞に正常な *LRFN2* タンパク質、ミスセンス変異を持つ *LRFN2* タンパク質を産生させて比較したところ、患者由来のミスセンス変異を持つ *LRFN2* は細胞内での分布が異常になり、PSD-95 と結合する能力が下がることがわかった。

(4) ウイルスベクターを用いた LRR-SO の分子機能解析

AAV ベクターを用いた発現系を導入し、マウス脳において、LRR-SO の一つを異所的に発現させ、シナプス構成タンパク質の分布の変化を検討した。その結果、この LRR-SO にはタンパク質輸送を制御する活性があることが明らかになった。また、人為的に特定の代謝型受容体シグナルを増強ないし減弱させる実験系（DREADD）の導入を行った。

< 引用文献 >

- Li Z et al. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res.* 2014;219(1):10-24. doi:10.1016/j.psychres.2014.05.005.
- Yang L et al. Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013;162B(5):419-430. doi:10.1002/ajmg.b.32169.
- Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, et al. *Elfn1* recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun.* 2014;5:4501. doi: 10.1038/ncomms5501.
- Sansig G et al. Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci.* 2001;21(22):8734-45.
- O'Sullivan ML et al. FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron.* 2012;73(5):903-10. doi:10.1016/j.neuron.2012.01.018.;
- Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, et al. Selective control of inhibitory synapse development by *Slitrk3*-PTPdelta trans-synaptic interaction. *Nat Neurosci.* 2012;15(3):389-98, S1-2. doi: 10.1038/nn.3040.
- Tekin M, Chioza BA, Matsumoto Y, Diaz-Horta O, Cross HE, Duman D, et al. *SLITRK6* mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J Clin Invest.* 2013;123(5):2094-102. doi: 10.1172/JCI65853.

Schormair B et al. PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome. *Nat Genet.* 2008;40(8):946-8. doi: 10.1038/ng.190.

Takashima N, Odaka YS, Sakoori K, Akagi T, Hashikawa T, Morimura N, et al. Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking *Lrrtm1*, a gene associated with schizophrenia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22716. doi: 10.1371/journal.pone.0022716.

Matsumoto Y, Katayama K, Okamoto T, Yamada K, Takashima N, Nagao S, et al. Impaired auditory-vestibular functions and behavioral abnormalities of *Slitrk6*-deficient mice. *PLoS One.* 2011;6(1):e16497. doi: 10.1371/journal.pone.0016497.

Katayama K, Yamada K, Ornathanalai VG, Inoue T, Ota M, Murphy NP, et al. *Slitrk1*-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. *Mol Psychiatry.* 2010;15(2):177-84. doi: 10.1038/mp.2008.97.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Tohmonda T, Kamiya A, Ishiguro A, Iwaki T, Fujimi TJ, Hatayama M, Aruga J. Identification and characterization of novel conserved domains in metazoan Zic proteins. *Mol Biol Evol.* 査読有2018; doi: 10.1093/molbev/msy122.

Odaka YS, Tohmonda T, Toyoda A, Aruga J. An Evolutionarily conserved mesodermal enhancer in vertebrate *Zic3*. *Sci Rep.* 査読有 2018; 8: 14954. doi: 10.1038/s41598-018-33235-y.

Aruga J. Zic Family Proteins in Emerging Biomedical Studies. *Adv Exp Med Biol* 査読無 2018; 1046:233-248. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_12.

Aruga J, Millen KJ. ZIC1 Function in Normal Cerebellar Development and Human Developmental Pathology. *Adv Exp Med Biol* 査読無 2018; 1046:249-268. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_13.

Hatayama M, Aruga J. Role of Zic Family Proteins in Transcriptional Regulation and Chromatin Remodeling. *Adv Exp Med Biol* 査読無 2018; 1046:353-380. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_18.

Aruga J, Hatayama M. Comparative Genomics of the Zic Family Genes. *Adv Exp Med Biol* 査読無 2018; 1046:3-26. doi: 10.1007/978-981-10-7311-3_1.

Ishiguro A, Hatayama M, Otsuka MI, Aruga J. Link between the causative genes of holoprosencephaly: *Zic2* directly regulates *Tgif1* expression. *Sci Rep* 査読有 2018; 8:2140. doi: 10.1038/s41598-018-20242-2.

有賀純、 LRRシナプスオーガナイザーと神経発達障害、*BIO INDUSTRY*、 査読無 35:24-33. 2018

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, Aruga J. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfrn2/SALM1*-deficient mice. *Nat Commun* 査読有 2017; 8:15800. doi: 10.1038/ncomms15800.

〔学会発表〕(計 10 件)

Aruga J. LRR transmembrane proteins control the localization of glutamate receptors. 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, (Jul 26-29, 2018)

Nakamura M, Hatayama M, Nakagawa S, Aruga J. Role of *Lrrn3*, a brain-enriched transmembrane protein in neural development. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Jun 1-6, 2018)

Ichise M, Katayama K, Sakoori K, Morimura N, Hatayama M, Aruga J. Altered monoamine dynamics and abnormal behaviors in *Lrfrn2*-deficient mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Jun 1-6, 2018)

Morimura N, Yasuda H, Katayama K, Hatayama M, Yoshikawa T, Aruga J. Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfrn2/SALM1*-deficient mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Jun 1-6, 2018)

Nakagawa S, Aruga J. Roles of sphingosine-1 phosphate in blood-brain barrier using in vitro and in vivo ischemia reperfusion injury model. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Jun 1-6, 2018)

他

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

該当無し

取得状況（計 0 件）

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安田 浩樹

ローマ字氏名：YASUDA, Hiroki

研究協力者氏名：中川 慎介

ローマ字氏名：NAKAGAWA, Shinsuke

研究協力者氏名：畑山 実

ローマ字氏名：HATAYAMA, Minoru

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。