

令和元年5月30日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14969

研究課題名(和文) てんかん原因リガンド/受容体が担うシナプス伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of synaptic transmission by an epilepsy-causative ligand-receptor complex

研究代表者

横井 紀彦 (Norihiro, Yokoi)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教

研究者番号：50710969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達のバランスの破綻はてんかん、統合失調症等の脳神経疾患を誘引すると考えられており、脳の興奮性を決定する分子機構の解明は重要な課題といえる。これまでに我々は家族性てんかん患者で見られるLG11変異の網羅的解析により、LG11の変異による分泌不全や、ADAM22との結合不全がてんかん発症の分子病態であることを報告してきた(Yokoi et al. Nat Med 2015)。本研究では、R474Q変異によるLG11のホモ2量体結合の破綻がてんかんの原因になることを新たに見出した(Yamagata, Miyazaki, Yokoi et al, Nat Commun 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんはけいれんや記憶喪失、幻聴などが伴う頻度の高い脳疾患である。現在用いられている抗てんかん薬の多くが、興奮性シナプス伝達の抑制、または抑制性シナプス伝達の亢進を戦略とするが、非特異的な作用による副作用の可能性が問題になっており、特異的な作用点を持つ、副作用の少ない抗てんかん薬への社会的な要求は非常に高い。一方、遺伝学的、免疫学的知見からLG11が脳の興奮性を制御する鍵であることが強く示唆されている。本研究ではLG11の変異を原因とする、新たなてんかんの分子病態を明らかにした。この成果は新たなてんかん治療法の開発に向けて、重要な知見を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：Balance between excitation and inhibition in neural circuits is finely tuned, and upsetting this delicate balance can cause epilepsy. Mutations in the human gene LG11, encoding a neuronal secreted protein, cause a familial epilepsy. Previously we reported that a secretion-defective LG11 mutant does not fold correctly and prematurely degrade, and a secretable mutant is selectively defective in binding to one of its receptors, ADAM22 (Yokoi et al. Nat Med 2015). Here we found that another secretable LG11 R474Q mutant binds to ADAM22, but the mutation disrupts the LG11-LG11 homomeric dimerization in the mouse brain. This result revealed the novel pathogenic molecular mechanisms to cause epilepsy (Yamagata, Miyazaki, Yokoi et al, Nat Commun 2018).

研究分野：神経分子科学

キーワード：てんかん シナプス伝達 蛋白質複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳の活動度(興奮性)は興奮性シナプス伝達と抑制性シナプス伝達の適切なバランスで保たれており、このバランスの破綻がてんかん等の様々な脳疾患の重要な要因と考えられている。このことから、脳の興奮性の制御機構を分子レベルで解明することは脳機能の理解、並びに脳神経疾患の治療/予防に極めて重要になる。このことから脳内の速い興奮性シナプス伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の制御機構の解明は脳科学の主要課題の一つとなっている。一方、研究代表者が所属する研究室において、AMPA 受容体のシナプス足場蛋白質 PSD-95 に神経分泌蛋白質 LGI1 が ADAM22 を介して結合することが独自に見出された(図)。重要なことに、遺伝学的、免疫学的知見から LGI1 と ADAM22 が脳の興奮性を制御する鍵であることが強く示唆されている。我々はこれまでに、LGI1 と ADAM22 の結合が AMPA 受容体機能を向上させること、LGI1 ノックアウト (KO) マウスが重度のてんかん発作により生後 3 週間程度で全て死亡すること、そのマウスの海馬で AMPA 受容体機能が低下していることを報告した。さらに、我々は LGI1 変異体がヒトでてんかんを引き起こす分子病態機構の解明に取り組んだ。まず、ヒトてんかん患者から報告されたミスセンス変異体を分泌不全型と分泌型に分類し、それぞれ一種類ずつの変異体を発現するてんかんモデルマウスを作製した。そして、マウス脳内で分泌不全型変異体 E383A が蛋白質の構造異常によって分泌されないこと、分泌型変異体 S473L が ADAM22 に対して特異的に結合能を欠失していることを見出した(図)。つまり、LGI1-ADAM22 結合が脳機能に必須であることを見出した (Yokoi et al. Nat Med 2015)。

## 2. 研究の目的

上述のように、LGI1-ADAM22 結合が脳機能に必須であることが明らかになってきたが、その結合がどのような生理機能を果たしているのか、また、LGI1/ADAM22 複合体に他の役割がないか不明であった。そこで、ヒトてんかん患者でみられる LGI1 変異体の性状解析を進め、その機能欠損から LGI1-ADAM22 の生理機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

これまでに報告した分泌型の LGI1 S473L 変異体は ADAM22 との結合能を欠失していたが、他の分泌型変異体 R407C、R474Q 変異体も同様に ADAM22 との結合能を欠失しているかを *in vitro* で評価した。そして、これら変異体を発現するマウスを作製し、これら LGI1 変異体マウスのでんかんに関する表現型、およびマウス脳内の LGI1 変異体の性状解析を進め、LGI1 変異体によるてんかんの分子病態を明らかにすることを試みた。

## 4. 研究成果

*In vitro* において、分泌型変異体 R407C、R474Q 変異体はこれまでに報告した S473L 変異体と異なり、ADAM22 と結合した。一方、R407C 変異体を発現するマウスはてんかん発作を示さず、R474Q 変異体を発現するマウスは生後 3 週間程度でてんかん発作によって死亡した。これらの結果から、R407C 変異は偽陽性であること、R474Q 変異体によるてんかんは未知の分子病態を原因とすることが示された。そこで、マウス脳内における LGI1 R474Q への結合蛋白質と野生型 LGI1 への結合蛋白質を生化学的に比較した。その結果、それら結合蛋白質群に大きな違いは確認されなかった。一方、東京大学 深井周也博士のグループにより、LGI1/ADAM22 複合体が LGI1 同士の間で結合 (2 量体形成) を介して 4 量体構造をとっていることを見出された(図)。そして、その LGI1-LGI1 結合に R474 が関与することが結晶構造によって示された。以上のことから我々はマウス脳内での LGI1-LGI1 結合について生化学的手法を用いて解析した。そして、実際に LGI1-LGI1 結合が R474Q 変異によって欠損することを見出した(図)。以上の結果から、R474Q 変異による LGI1-LGI1 結合の欠損がてんかんの原因になることが分かった。また、この

LG11-LG11 結合による前シナプスと後シナプスをつなぐトランスシナプス型の LG11/ADAM22 複合体の形成が脳機能に重要であることが示された (Yamagata, Miyazaki, Yokoi et al. Nat. Commun. 2018)。これらの成果は脳の興奮性制御機構の解明、および新たなてんかん治療薬の開発において、重要な知見を与えるものと考えられる。

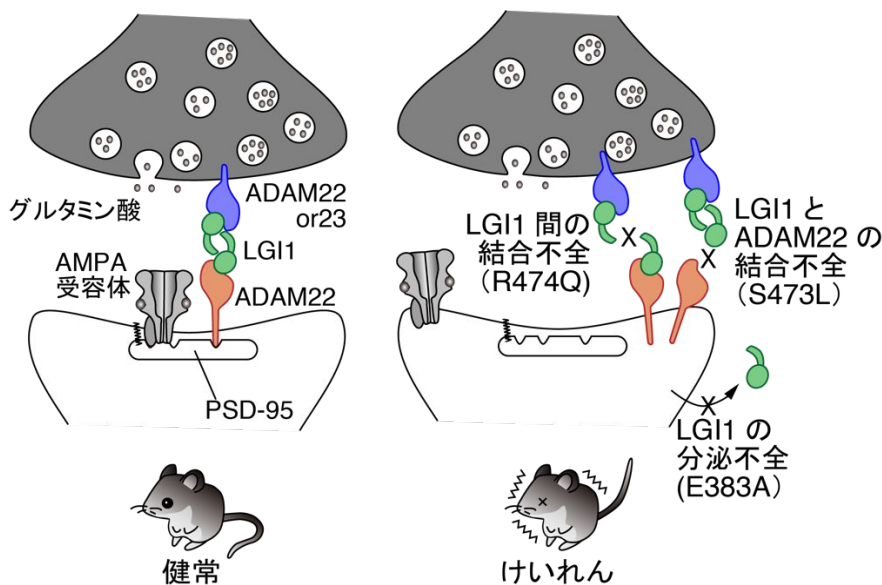


図 シナプスにおける LG11/ADAM22 複合体とてんかん原因変異による LG11/ADAM22 複合体の形成不全

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計6件)

1. Kanadome T, Yokoi N, Fukata Y, Fukata M  
Systematic screening of depalmitoylating enzymes and evaluation of their activities by the acyl-PEGyl exchange gel-shift (APEGS) assay.  
*Methods Mol. Biol.* In Press 査読有 10.1007/978-1-4939-9532-5\_7
2. Hasegawa D, Ohnishi Y, Koyama E, Matsunaga S, Ohtani S, Nakanishi A, Shiga T, Chambers JK, Uchida K, Yokoi N, Fukata Y, Fukata M  
Deleted in colorectal cancer (netrin-1 receptor) antibodies and limbic encephalitis in a cat with hippocampal necrosis  
*J. Vet. Intern. Med.* In Press 査読有 10.1111/jvim.15492
3. Yamagata A\*, Miyazaki Y\*, Yokoi N, Shigematsu H, Sato Y, Goto-Ito S, Maeda A, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Shirouzu M, Fukata Y, Fukata M\*\*, Fukai S\*\* (\*共同第一著者; \*\*共同責任著者)  
Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LG11-ADAM22.  
*Nat. Commun.* 1546, 2018 査読有 10.1038/s41467-018-03947-w
4. Yoshikura N, Kimura A, Fukata M, Fukata Y, Yokoi N, Harada N, Hayashi Y, Inuzuka T, Shimohata T.  
Long-term clinical follow-up of a patient with non-paraneoplastic cerebellar ataxia associated with anti-mGluR1 autoantibodies.  
*J. Neuroimmunol.* 319, 63-67, 2018 査読有 10.1016/j.jneuroim.2018.04.001
5. Fukata M, Yokoi N, Fukata Y.  
Neurobiology of autoimmune encephalitis.  
*Curr. Opin. Neurobiol.* 48, 1-8, 2018 査読有 10.1016/j.conb.2017.07.012
6. Fukata Y, Yokoi N, Miyazaki Y, Fukata M.  
The LG11-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders.  
*Neurosci. Res.* 39-45, 2017 査読有 10.1016/j.neures.2016.09.011.

### [学会発表](計3件)

1. Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M (2017)

Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes and profiling of the palmitoylation stoichiometry of synaptic proteins. (ポスター発表)

The 40th annual meeting of the Japan Neuroscience Society

2. Yokoi N, Fukata Y, Fukata M (2017)  
Molecular Mechanisms of a Familial Epilepsy Caused by Mutations of a Neuronal Secreted Protein, LGI1. (口頭発表)  
Yonsei-Korea-NIPS Symposium 2017
3. 横井紀彦 (2017)  
PSD-95脱パルミトイル化酵素の同定、及び蛋白質パルミトイル化の定量的解析法の開発.  
(ポスター発表)  
第6回 生理研-霊長研-脳研 合同シンポジウム

〔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

1. 生理学研究所 深田研究室  
<http://www.nips.ac.jp/fukata/>
2. プレスリリース：てんかんの原因タンパク質が神経細胞間の橋渡しをする仕組みを解明  
[http://www.nips.ac.jp/release/2018/04/post\\_363.html](http://www.nips.ac.jp/release/2018/04/post_363.html)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

該当無し

(2)研究協力者

該当無し

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。