

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03327

研究課題名(和文) LRR膜タンパク質による拡散性伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying the regulation of diffuse transmission by LRR transmembrane proteins

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症、双極性障害、ADHD、強迫性障害、不安障害治療薬の多くはドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなどの神経伝達物質を利用するモノアミン作動性神経系(モノアミン系)を標的としていることから、各疾患の病態とモノアミン作動性神経系とは密接な関連を持つものと考えられる。我々はロイシンリッチリピート(LRR)を含む膜貫通タンパク質(以下、LRR膜タンパク質)がモノアミン神経系の制御に重要な役割を持つ可能性を見だし、LRR欠損マウスを用いて、いくつかのLRR膜タンパク質がどのようにモノアミン系の発達と機能を調節するのかについて、研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種神経疾患に関連する遺伝性因子のメタ解析が行われ、ADHD、双極性障害、統合失調症、不安障害、トゥレット障害、強迫障害には共通の遺伝因子が存在することが報告された。この結果はこれらの疾患には部分的に重なる疾患中核機構が存在することを示唆しており、その中にLRR膜タンパク質遺伝子が含まれる可能性もある。この研究はこれらの神経疾患の病態のより良い理解、治療方法の改善につながる知見を提供することができる。また、シナプス性伝達に比べて、十分に理解が進んでいない拡散性伝達(容量性伝達)の分子機構が理解できることは神経生物学の進展に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Many therapeutics for schizophrenia, bipolar disorder, attention-deficit hyperactivity disorder, obsessive-compulsive disorder, and anxiety disorder target monoaminergic neurotransmission such as dopamine, noradrenaline, and serotonin. The pathophysiology of these neuropsychiatric disorders may be closely related to the monoaminergic nervous system. We hypothesized roles of a family of Leucine-rich repeat (LRR)-containing transmembrane proteins in the regulation of the monoaminergic transmission. Based on the hypothesis, we carried out a study to reveal how the LRR transmembrane proteins control the development and function of monoaminergic nervous system.

研究分野：神経生物学

キーワード：拡散性伝達 シナプス接着分子 モノアミン 発達障害 精神神経疾患 疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

近年、各種神経疾患に関連する遺伝性因子のメタ解析が行われ、ADHD、双極性障害、うつ病、統合失調症、不安障害、トゥレット障害、強迫障害には共通の遺伝因子が存在することが報告された (Brain Storm Consortium, Science, 360, 8757, 2018)。これらの疾患のうち、統合失調症、双極性障害、ADHD、強迫性障害、不安障害治療薬の多くはドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなどの神経伝達物質を利用するモノアミン作動性神経系(モノアミン系)を標的としていることから、各疾患の病態とモノアミン作動性神経系とは密接な関連を持つものと考えられる。

一方、我々はモノアミン系とロイシンリッチリピート(LRR)を含む膜貫通タンパク質(以下、LRR膜タンパク質)の機能変化の関心に注目した研究を進めてきた。LRR膜タンパク質は中枢神経系のシナプス形成および機能調節において、重要な役割を果たし、シナプスオーガナイザーとも呼ばれる(図1)。研究代表者らは Slitrk ファミリータンパク質が代謝型受容体の1つである受容体型チロシンホスファターゼ δ (Ptp δ)を制御すること[1]や Eln1 が mGluR7 をシナプス前部に集積させること[2]、Lrln2 がグルタミン酸受容体の量を調節すること[3]などを報告した。このように「シナプス性伝達」における LRR 膜タンパク質の役割については、理解が進みつつある。一方で、モノアミン系のような神経伝達物質が軸索瘤から放出され、広範囲の標的に作用する「拡散性伝達」における LRR 膜タンパク質の役割については未だ不明の点が多い。

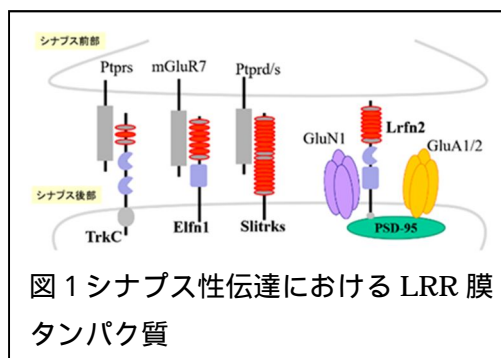


図1 シナプス性伝達における LRR 膜タンパク質

LRR 膜タンパク質と神経疾患の関連についても、近年重要な発見が相次いでいる。ヒト遺伝学の結果及び変異マウスの症状から、LRR 膜タンパク質(遺伝子)の異常が統合失調症、双極性障害、ADHD、強迫性障害、不安障害、自閉スペクトラム症、学習障害などの神経疾患に密接に関係することが明らかになってきた。また、我々が LRR 膜タンパク質欠損動物について、脳のモノアミン含有量の解析を行ったところ、複数の系統で異常があることを見出した[4]。また、モノアミン標的薬の効果も LRR 遺伝子欠損により変化することを見いだした[4, 5]。これらの結果から、「LRR 膜タンパク質はモノアミン系の成り立ちに重要な役割を持つのではないか」という作業仮説が得られた。

1. Takahashi, H., et al.: Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPdelta trans-synaptic interaction: *Nat Neurosci*: 2012; 15: p. 389-98, S1-2.
2. Tomioka, N.H., et al.: Eln1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures: *Nat Commun*: 2014; 5: p. 4501.
3. Morimura, N., et al.: Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrln2/SALM1-deficient mice: *Nat Commun*: 2017; 8: p. 15800.
4. Katayama, K., et al.: Slitrk1-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities: *Mol Psychiatry*: 2010; 15: p. 177-84.
5. Takashima, N., et al.: Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking Lrrtml1, a gene associated with schizophrenia: *PLoS One*: 2011; 6: p. e22716.

2. 研究の目的

本研究では「LRR 膜タンパク質によるモノアミン系の制御の分子的な実体は何なのか、それがどのように各神経疾患の病態と関わるのか」という問いに答えることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LRR 欠損動物のモノアミン含量の系統的な検討。

成獣脳におけるモノアミン含量を新鮮凍結切片からのパンチバイオプシーを用いて解析した。対象とした領域は前頭前野、側坐核、海馬、扁桃核、縫線核などで、その欠損動物に現れた症状を基に決定した。また、幼若個体で行動異常の出現する系統においては、幼若個体における解析を行った。近年、樹立された生物学的プローブ(GRAB など)を用いた解析システムを導入し、より高い時空間解像度での解析ができるように改善した。

(2) LRR 欠損動物のモノアミン性神経系の分子マーカー解析。

拡散性伝達への関与の様式としては直接に LRR 膜タンパク質が拡散性伝達を行う神経線維の発達・機能維持に影響をおよぼす場合と局所回路のシナプス性伝達において持つ役割が間接的に現れる場合があり得る。直接に関与する場合にはモノアミン性神経の発生発達に関与する場合と完成後の機能のみに影響する場合があり得る。線維の解析は成獣を対象にして、輸送体(NET, SERT, DAT, CHAT) に対する定量的免疫染色を中心に行った。

(3) 過剰発現および変異体の発現による、LRR 膜タンパク質の役割についての仮説の検証。

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて野生型もしくは変異型 LRR 膜タンパク質を、当該 LRR 膜タンパク質欠損マウスに発現させて、各種分子マーカーの分布におよぼす影響を検討した。

(4) LRR 膜タンパク質を含む新たな分子装置の解明。

結合タンパク質の探索は免疫沈降と質量分析により行った。結合強度の定量解析には水晶発振子マイクロバランス法(QCM)を用いた。

4. 研究成果

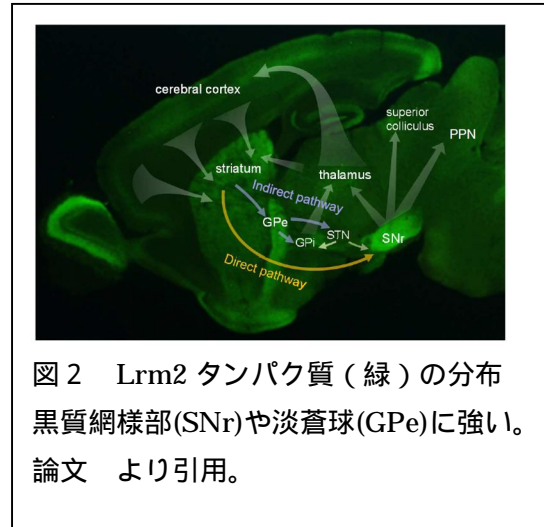
これまでに報告していた Slitrk1 欠損マウスに加え、Slitrk2、Slitrk5、Elfn1、Lrtm2 欠損マウス成獣脳を対象にしたモノアミン含量の定量解析を行った。また、Slitrk1 欠損マウスについては幼若個体を対象として解析を行った。その結果、解析の対象とした全ての系統において、モノアミン系神経伝達物質の含量変化を認めた。更にモノアミン神経系の神経回路の働きを評価するための複数の遺伝子改変マウスを導入した。これらと AAV ベクターを利用して、特定のモノアミン神経系の活動状況をリアルタイムで観察するための実験系を構築した。

LRR 膜タンパク質欠損マウス及び発達障害者由来の LRR 膜タンパク質遺伝子変異を持つマウスのモノアミン系を含む神経回路の状態を明らかにするために成獣を対象として、定量的な蛍光免疫染色解析を行った。更に各発生段階に特有な分子マーカーを用いて、どの段階から異常が生じるのかを検討した。その結果、LRR 膜タンパク質の機能とモノアミン系神経線維の発達制御機構の間に重要な接点を見いだすことができた (Katayama et al., 2022; 投稿中論文)。野生型もしくは変異型 LRR 膜タンパク質を、AAV ベクターを用いて、当該 LRR 膜タンパク質欠損マウスまたは野生型マウスに発現させて、新たな分子機能を明らかにすることができた (Ichise et al., 2022)。

生化学的な解析により、特定の LRR 膜タンパク質と結合する候補タンパク質を同定して、結合の特性を定量的に解析した。神経疾患患者由来の LRR 膜タンパク質遺伝子ミスセンス変異がこれら候補タンパク質と LRR 膜タンパク質との結合性にどのような影響を及ぼすのかを検討した (投稿中論文)。

双極性障害関連遺伝子 Slitrk2 がセロトニン性神経系の発生に重要な役割を持ち、Slitrk2 欠損マウスが抗うつ薬投与時に見られるような行動異常、海馬シナプスのセロトニン感受性変化を示すこと、双極性障害の治療薬として用いられる炭酸リチウムの効果が Slitrk2 欠損マウスと正常(野生型)マウスとで異なっていることを明らかにした(Katayama et al., 2022)。また、黒質網様部、淡蒼球、線条体に強く分布する Lrm2 (図2) を欠損するマウスでは、線条体でのドパミンおよびセロトニンの代謝産物量に異常が認められ、Lrm2 が線条体の神経細胞の神経突起内でのタンパク質輸送に関与する可能性を示した (Ichise et al., 2022)。

以上の解析を基に LRR 膜タンパク質によるモノアミン線維の発生及び機能制御についての仮説を立てることができた。これらはモノアミン系の変化を伴う神経疾患の病態のより良い理解、治療方法の改善につながる知見となる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsunaga H, Aruga J	4. 巻 15
2. 論文標題 Trans-Synaptic Regulation of Metabotropic Glutamate Receptors by Elfn Proteins in Health and Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 634875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2021.634875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maekawa R, Muto H, Hatayama M, Aruga J	4. 巻 16
2. 論文標題 Dysregulation of erythropoiesis and altered erythroblastic NMDA receptor-mediated calcium influx in Lrln2-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0245624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa S, Aruga J.	4. 巻 57
2. 論文標題 Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 1594-1606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-019-01844-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 D. Watanabe, S. Nakagawa, Y. Morofuji, A. E. Toth, M. Vastag, J. Aruga, M. Niwa, M. A. Deli	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of a Primate Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Prepared from Primary Brain Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13091484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichise Misato, Sakoori Kazuto, Katayama Kei-ichi, Morimura Naoko, Yamada Kazuyuki, Ozawa Hiroki, Matsunaga Hayato, Hatayama Minoru, Aruga Jun	4. 巻 15
2. 論文標題 Leucine-Rich Repeats and Transmembrane Domain 2 Controls Protein Sorting in the Striatal Projection System and Its Deficiency Causes Disturbances in Motor Responses and Monoamine Dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 856315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2022.856315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K. Katayama, N. Morimura, K. Kobayashi, D. Corbett, T. Okamoto, V. G. Ornthanalai, H. Matsunaga, W. Fujita, Y. Matsumoto, T. Akagi, T. Hashikawa, K. Yamada, N. P. Murphy, S. Nagao, J. Aruga	4. 巻 25
2. 論文標題 Slitrk2 deficiency causes hyperactivity with altered vestibular function and serotonergic dysregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Fujita W, Aruga J
2. 発表標題 Regulation of receptor chaperone molecule RTP4 in neuronal cells by opioid receptor activation
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ichise M, Hatayama M, Aruga J
2. 発表標題 Role of Lrtn2 in striatal medium spiny neurons
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatayama M, Katayama K, Aruga J
2. 発表標題 Slitrk1 regulates endocytosis in PC12 cells
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morimura N, Yasuda H, Katayama K, Hatayama M, Yoshikawa T, Aruga J.
2. 発表標題 Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrln2/SALM1-deficient mice.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「シナプス接着分子」の赤血球を産み出す細胞における役割 https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/recent12.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------