

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06893

研究課題名(和文) てんかん関連リガンド受容体による脳の興奮抑制バランス制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of the antiepileptic ligand-receptor level to control excitation-inhibition balance in the brain

研究代表者

横井 紀彦 (Yokoi, Norihiko)

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)：我々はこれまでに、分泌蛋白質LG11と膜蛋白質ADAM22の複合体の減少が、てんかんの原因になることを報告してきた。本研究では、マウス脳内でのADAM22のリン酸化によって、LG11-ADAM22複合体が安定化されることを明らかにした。さらに、様々なマウス系統群の解析により、てんかん発症を抑制するADAM22とLG11の量を見出した。以上のことから、脳内のLG11-ADAM22複合体の増加が抗てんかん作用に繋がると考えられ、ADAM22のリン酸化制御がそのための有用な戦略になると期待される(Yokoi et al. Cell. Rep. 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんはおよそ1%の人が罹患する脳神経疾患で、その主な原因は脳の異常興奮にあると考えられている。いまだ30%近くのとてんかんは難治性てんかんと言われており、従来とは異なる作用機序を有する抗てんかん薬の開発が求められている。てんかん関連遺伝子産物の大部分がチャネル蛋白質である一方、LG11とADAM22はリガンドと受容体であり、この複合体の解析が新たなてんかん治療戦略に繋がると期待されている。本研究ではADAM22のリン酸化がLG11-ADAM22複合体を安定化させて、抗てんかん作用を発揮することを見いだした。このリン酸化を標的とした新たなてんかん治療戦略の開発が期待されることになった。

研究成果の概要(英文)：Decreased transsynaptic LG11-ADAM22 protein complexes, because of their mutations, cause epilepsy. However, it remains unclear how LG11-ADAM22 levels are regulated and how much LG11-ADAM22 function is required. Here, we found that ADAM22 is stoichiometrically phosphorylated in the mouse brain. Without the phosphorylation, the amounts of the ADAM22 and LG11 proteins were significantly decreased in the mouse brain. We demonstrated that quantitative phosphorylation of ADAM22 by protein kinase A (PKA) mediates high-affinity binding of ADAM22 to 14-3-3 and the binding prevents AP2-mediated endocytosis of ADAM22. Leveraging a series of ADAM22 and LG11 hypomorphic mice, we found the LG11 and ADAM22 levels to prevent lethal epilepsy. Furthermore, ADAM22 function is required in excitatory and inhibitory neurons. These results suggest strategies to increase LG11-ADAM22 complexes over the required levels by targeting PKA or 14-3-3 for epilepsy treatment.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん LG11 ADAM22 リン酸化 蛋白質複合体 神経回路 蛋白質分解 シナプス

1. 研究開始当初の背景

脳の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いる。そのバランスの破綻はてんかん、自閉スペクトラム症、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基礎・応用研究の両面で重要な課題といえる。2006年に研究代表者の所属研究室の深田らにより、分泌蛋白質 LGI1 と膜蛋白質 ADAM22 が複合体を形成し、シナプス足場蛋白質 PSD-95 を介してシナプス伝達を制御することが独自に見出された(図A)。重要なことに、LGI1 は、その変異が家族性側頭葉てんかんの患者で多数報告されている。また、LGI1 は記憶障害やけいれんを主な症状とする辺縁系脳炎を引き起こす自己抗体の主要な標的でもある。さらに ADAM22 もその変異がヒトでけいれんを引き起こす。つまり、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。さらに我々は2018年にLGI1-ADAM22複合体のX線結晶構造を同定し、この複合体がシナプス前後部を橋渡しすることを示した(図A; Yamagata, Miyazaki, Yokoi et al. Nat. Commun. 2018, 1546)。一方、未だ30%近くのとんかんは抗てんかん薬が効かない難治性てんかんであり、新たなてんかん治療戦略が求められている。そこで、我々はLGI1-ADAM22複合体の解析を通して、新たなてんかん治療戦略の開発を目指した。これまでに、てんかん原因LGI1変異体を発現するマウスを作製し、LGI1-ADAM22複合体の減少がてんかんの原因になることを明らかにしてきた(図B; Yokoi et al. Nat. Med. 2015, 21, 19)。以上の結果から、LGI1-ADAM22複合体の量が脳の興奮性を制御する鍵であることが推測された。

2. 研究の目的

てんかん発症を抑制するために必要なLGI1-ADAM22複合体の量、そしてその量を制御する分子機構を明らかにし、さらに、複合体が機能する神経回路を明らかにすることで、新たなてんかん治療戦略の手がかりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

様々な膜蛋白質の輸送や局在が翻訳後修飾によって制御されることから、マウス脳内のADAM22のリン酸化状態をPhos-Tag SDS-PAGE法を用いて調べた。そして、見出したリン酸化の欠損変異ノックインマウスを作製し、解析することで、そのリン酸化の生理的意義の解明を試みた。また、てんかん発症を抑えるLGI1とADAM22の発現量を調べるために、様々な量のLGI1とADAM22を発現するマウス系統群を作製し、それらマウスのてんかん表現型を調べた。また、LGI1とADAM22が機能する神経細胞種を明らかにするために、細胞腫特異的なADAM22のコンディショナルノックアウトマウスやLGI1のセミノックインマウスを作製し、そのてんかん表現型を調べた。

4. 研究成果

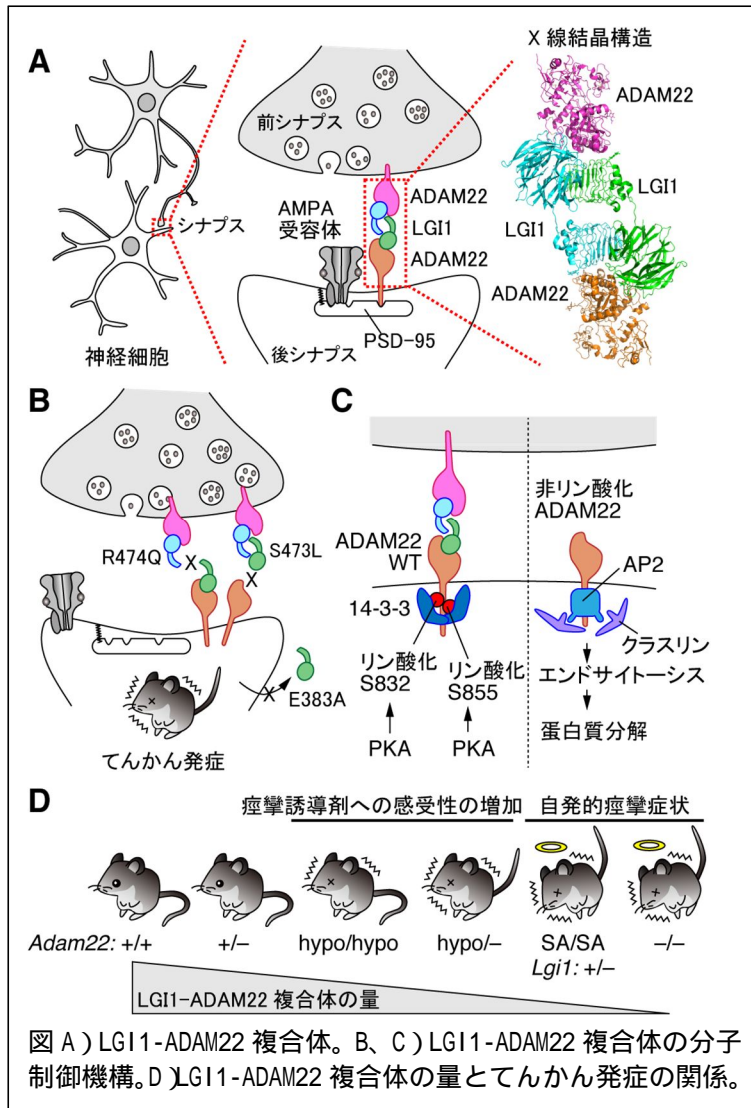
Phos-Tag SDS-PAGE法を用いて、マウス脳内のADAM22がほぼ全てリン酸化されていることを明らかにした。そして、このADAM22のリン酸化サイトをマウス脳内からの免疫沈降産物の質量分析等によって、Ser832と同定した。このセリンリン酸化の生理的意義を明らかにするために、アラニンに置換した変異体(S832A)のノックインマウスを作製した。興味深いことに、マウス脳内のADAM22の発現量が野生型マウスと比べて、ノックインマウスで約40%まで減少し、さらに、LGI1の発現量も同様に約55%まで減少していることを見出した。この結果から、ADAM22 S832のリン酸化が、LGI1-ADAM22複合体の安定性に重要であることが示された。次にこのリン酸化欠損によるADAM22の局在への影響について、脳組織切片の染色を用いて調べた。その結果、野生型マウス脳とノックインマウス脳で同様な染色パターンが認められ、このリン酸化欠損変異がADAM22の細胞体からの輸送に影響を与えないことが明らかになった。次に、神経細胞におけるADAM22の安定性を調べるために、マウス培養神経細胞に蛋白質合成阻害剤、シクロヘキシミドを加えて、ADAM22の発現量を追跡した。その結果、野生型ADAM22は半減期77時間で減少した一方、ADAM22 S832Aの半減期は23時間と短くなり、このリン酸化欠損変異によって、ADAM22の分解が促進されていることが明らかになった。この時、リソソーム阻害剤を培養液に添加した際にADAM22 S832Aの分解が抑制されたことから、リン酸化欠損によって、リソソーム由来でのADAM22の分解が促進されていることを明らかにした。このADAM22の安定性に影響を与える、ADAM22へのリン酸化依存的な結合蛋白質を調べるために、マウス脳からADAM22の免疫沈降を行った。その結果、リン酸化欠損変異によって、ADAM22と14-3-3の結合量が減少することを見出

した。14-3-3 は神経細胞を含む様々な細胞内に広範に発現し、様々なリン酸化蛋白質と様々な様式で結合することで、蛋白質の構造や機能、複合体形成を制御することが知られている。そこで、14-3-3 と ADAM22 の結合の意義を明らかにするため、COS 細胞に ADAM22 と 14-3-3 を共発現させて、細胞表面ビオチン化法により、細胞表面の ADAM22 の量を比較した。その結果、リン酸化 ADAM22 と 14-3-3 との結合によって、細胞表面の ADAM22 が安定化されることを見出した。ADAM22 のリン酸化によって、細胞表面の ADAM22 が安定化され、リン酸化欠損によって、リソソーム由来の分解が促進していたことから、このリン酸化とエンドサイトーシスの関連が推測された。よく知られているように、クラスリン依存性のエンドサイトーシスはエイドサイトーシスをうける蛋白質の細胞内の Yxxφ というモチーフと AP2 との結合によって開始される。そして、実際に、ADAM22 の細胞内領域にこのモチーフが種を超えて保存されていることに着目した。そして、マウス脳内において、野生型 ADAM22 と比べて、ADAM22 S832A と AP2 との結合が明らかに増加することを見出した。このことから ADAM22 S832 のリン酸化欠損によって、ADAM22 のエンドサイトーシスが促進されていることを見出した。つまり、ADAM22 のリン酸化を介した 14-3-3 との結合によって、LGI1-ADAM22 複合体が安定化されていることが明らかになった(図 C)。

次に、てんかんの発症を抑える LGI1 や ADAM22 の発現量について調べるため、ADAM22 の hypomorphic マウスとヘテロノックアウトマウスを交配させて、ADAM22 の脳内発現量が段階的に減ったマウス系統群を作製した。この *Adam22* hypo/hypo マウスにおいて、ADAM22 の発現量が約 30%まで減少し、hypo/-マウスではさらに約 10%まで減少することを見出した。そして、これらマウスのけいれん誘発剤 pentylene tetrazole (PTZ) に対する感受性が、ADAM22 の量が減るほど上昇し、hypo/hypo マウスから有意に上昇することを見出した。一方、ADAM22 ノックアウトマウスで見られる自発的な致死性痙攣が引き起こされなかったことから、10%の ADAM22 でもてんかん症状が抑えられることが明らかとなった。この時の LGI1 の発現量は約 50%であった。さらに、*Adam22* リン酸化欠損変異ノックインマウスと *Lgi1* ヘテロノックアウトマウスを交配させることで、LGI1 の脳内発現量を 30%まで減らした結果、マウスは自発性痙攣を起こし P114 前後に死亡することを見出した。つまり、ADAM22 が 30%以下になると痙攣感受性が上昇すること、10%の ADAM22 と 50%の LGI1 によって致死性痙攣が抑制される一方、LGI1 が 30%まで減少すると致死性痙攣が引き起こされることを見出した(図 D)。このように数%の LGI1 と ADAM22 の違いで脳の興奮性が大きく影響を受けることが明らかになった。

次に、LGI1-ADAM22 複合体の減少によって引き起こされるてんかん発症機構を理解するために、LGI1-ADAM22 複合体が機能している神経細胞種、神経回路を明らかにすることを試みた。そこで、興奮性神経細胞、又は抑制性神経細胞特異的な ADAM22 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、どちらのマウスもてんかん症状により死亡することを見出した。また、LGI1 を神経細胞種特異的に LGI1 ノックアウトマウスに発現させることで、LGI1 も興奮性と抑制性神経細胞とともに機能を果たすことを見出した。つまり LGI1 と ADAM22 が興奮性神経だけでなく抑制性神経細胞にとっても必須であることを明らかにした。抑制性神経細胞で LGI1-ADAM22 複合体が減少した際には、抑制性神経細胞の興奮性シナプスの AMPA 受容体機能が低下し、抑制性神経細胞の機能が低下するためにてんかんが引き起こされることが推測される。一方、興奮性神経細胞で LGI1-ADAM22 が減少した際には、この複合体が PSD-95 を介して Kv チャネルにも相互作用していることから、興奮性神経細胞における Kv チャネル機能が低下するためにてんかんが引き起こされることが推測される。このように LGI1-ADAM22 複合体は興奮性と抑制性神経細胞それぞれにおいて別々のシステムによって脳の異常興奮を防ぐ鍵になっていると考えられる。

以上の結果から、脳内の LGI1-ADAM22 複合体を増加させることが脳の興奮安定性の増強/抗てんかん作用に繋がると考えられる。そのために例えば、ADAM22-14-3-3 結合の安定化させる小分子の探索や、ADAM22 のリン酸化の亢進によって、ADAM22-14-3-3 複合体を増加させることが今後検討される。以上のように、本研究成果によって、新たなてんかん治療戦略や脳の興奮制御法の提案に繋がることが期待される。以上の成果は Yokoi et al. Cell Rep. 2021, 37, 110107 に発表した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 深田正紀、横井紀彦、深田優子	4. 巻 65
2. 論文標題 APEGS法によるタンパク質パルミトイル化修飾の定量	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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 Kanadome Takashi, Yokoi Norihiko, Fukata Yuko, Fukata Masaki	4. 巻 2009
2. 論文標題 Systematic Screening of Depalmitoylating Enzymes and Evaluation of Their Activities by the Acyl-PEGyl Exchange Gel-Shift (APEGS) Assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 83～98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9532-5_7	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 Hasegawa Daisuke, Ohnishi Yumi, Koyama Eiji, Matsunaga Satoru, Ohtani Shouhei, Nakanishi Akio, Shiga Takanori, Chambers James K., Uchida Kazuyuki, Yokoi Norihiko, Fukata Yuko, Fukata Masaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Deleted in colorectal cancer (netrin 1 receptor) antibodies and limbic encephalitis in a cat with hippocampal necrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1440～1445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jvim.15492	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 Yokoi Norihiko, Fukata Yuko, Okatsu Kei, Yamagata Atsushi, Liu Yan, Sanbo Makoto, Miyazaki Yuri, Goto Teppei, Abe Manabu, Kassai Hidetoshi, Sakimura Kenji, Meijer Dies, Hirabayashi Masumi, Fukai Shuya, Fukata Masaki	4. 巻 37
2. 論文標題 14-3-3 proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110107～110107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.110107	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 該当する

1. 著者名 Fukata Yuko, Hirano Yoko, Miyazaki Yuri, Yokoi Norihiko, Fukata Masaki	4. 巻 194
2. 論文標題 Trans-synaptic LGI1-ADAM22-MAGUK in AMPA and NMDA receptor regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108628 ~ 108628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108628	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 横井紀彦
2. 発表標題 脳内蛋白質複合体の研究を通して、生物無機化学の未来について考えること
3. 学会等名 分子研研究会「錯体化学から始まる学術展開の可能性」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norihiko Yokoi, Yuko Fukata, Makoto Sanbo, Teppei Goto, Masumi Hirabayashi, Masaki Fukata
2. 発表標題 ADAM22 biosynthetic analysis reveals the seizure threshold in a mouse model
3. 学会等名 第2回CIBoGリトリート (第13回NAGOYAグローバルリトリート) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norihiko Yokoi, Yuko Fukata, Makoto Sanbo, Teppei Goto, Masumi Hirabayashi, Masaki Fukata
2. 発表標題 Effective expression level of the anti-epileptic complex, LGI1-ADAM22, is maintained by ADAM22 phosphorylation
3. 学会等名 第10回 生理研-霊長研-新潟脳研合同シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横井紀彦
2. 発表標題 シナプス蛋白質複合体LG11-ADAM22のリン酸化による抗てんかん機構の解明
3. 学会等名 自然科学研究機構「ネットワーク型研究加速事業（国際ネットワーク）」生理研プロジェクト年度末成果報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokoi N, Fukata Y, Sanbo M, Goto T, Hirabayashi M, Fukata M
2. 発表標題 Phosphorylation of ADAM22 regulates the amount of the anti-epileptic LG11-ADAM22 complex in the brain
3. 学会等名 The 40th annual meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井紀彦, 深田優子, 三宝誠, 後藤哲平, 平林真澄, 深田正紀
2. 発表標題 Phosphorylation of ADAM22 stabilizes the anti-epileptic LG11-ADAM22 complex in the brain
3. 学会等名 第9回 名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井紀彦, 関谷敦志, 平田哲也, 深田優子, 深田正紀
2. 発表標題 S-アシル化修飾ゾーンと神経シナプス機能：S-アシル化修飾の化学量論的解析
3. 学会等名 第2回オルガネラゾーン 若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井紀彦, 深田優子, 三宝誠, 後藤哲平, 平林真澄, 深田正紀
2. 発表標題 ADAM22 phosphorylation stabilizes the antiepileptic LGI1-ADAM22 complex in the brain
3. 学会等名 第1回 CIBoG リトリート (第12回 NAGOYAグローバルリトリート) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井紀彦, 深田正紀, 深田優子
2. 発表標題 LGI1-ADAM22抗てんかん蛋白質複合体の量的制御機構の解明
3. 学会等名 生理研研究会「機能的神経回路の構築と動作を支える分子細胞基盤」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yokoi N, Fukata Y, Sanbo M, Goto T, Hirabayashi M, Fukata M.
2. 発表標題 LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure threshold in mice
3. 学会等名 第3回CIBoGリトリート (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yokoi N, Fukata Y, Sanbo M, Goto T, Hirabayashi M, Fukata M
2. 発表標題 Regulatory mechanisms of the LGI1-ADAM22 level to prevent epilepsy in mice
3. 学会等名 第11回 生理研-霊長研-新潟脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横井紀彦, 深田優子, 三宝誠, 後藤哲平, 平林真澄, 深田正紀
2. 発表標題 抗てんかん作用を発揮するLGI1-ADAM22複合体の量とその制御機構の解明
3. 学会等名 第11回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 深田正紀, 横井紀彦, 平田哲也, 深田優子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 316-323
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック zDHHC パルミトイル化酵素と ABHD17 脱パルミトイル化酵素	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://www.nips.ac.jp/fukata/
--

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
---------	---------

英国	エジンバラ大学			
----	---------	--	--	--