

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15920

研究課題名（和文）細胞間相互作用によるmTORシグナルの新規制御機構の解明

研究課題名（英文）Novel regulatory mechanism of mTOR signaling by cell-cell interactions

研究代表者

橋詰 晃一 (Hashizume, Koichi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・リサーチフェロー

研究者番号：20842272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞接着分子DSCAML1が、細胞の成長・代謝を制御するmTORシグナルの抑制因子であることを明らかにした。この抑制機構の分子メカニズムとして、DSCAML1の細胞内ドメインの切断と、それに伴う核内輸送が関与していることが明らかとなった。また、DSCAML1の細胞内ドメインとSTAT3の相互作用がmTORシグナル制御に関与している結果が得られた。DSCAML1欠損マウスでは、生後4週齢以降における海馬でのmTORシグナル亢進と組織サイズの増加が観察され、DSCAML1が生後の適切な脳発生に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、神経細胞が接着という文脈に依存して成長・代謝に関わるシグナルを柔軟に変化させる機序が明らかになる。この知見は、神経科学や細胞生物学の分野において、細胞間相互作用によるシグナル伝達の理解を深める上で重要な貢献となる。また、接着依存的mTORシグナル制御の破綻が神経系に及ぼす影響と疾患との関連性を調査することにより、神経変性疾患や精神疾患の病態メカニズムに新たな視点を提供し、治療・予防に向けた新たな展望が期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed that cell adhesion molecule DSCAML1 is an inhibitory factor of the mTOR signaling pathway, which regulates cell growth and metabolism. The molecular mechanism of this inhibition involves the cleavage of the intracellular domain of DSCAML1 and its subsequent nuclear translocation. Furthermore, our results demonstrated that the interaction between the intracellular domain of DSCAML1 and STAT3 is implicated in the regulation of mTOR signaling. In Dscaml1-deficient mice, we observed enhanced mTOR signaling and an increase in tissue size in the hippocampus after four weeks of age, indicating that DSCAML1 regulates proper postnatal brain development.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞接着 mTORシグナル 神経細胞 てんかん

1. 研究開始当初の背景

セリン/スレオニンキナーゼの mTOR (mechanical target of rapamycin) は、栄養やストレス応答などのシグナル伝達系を統制する細胞内センサーとして働き、タンパク質合成やオートファジーなどを介して細胞の成長や代謝を制御する。mTOR シグナルは細胞内外から精巧に制御され、その破綻は様々な疾患の原因となる。特に脳においては、mTOR シグナルの異常亢進が mTORopathy と総称される一連の疾患を引き起こし、てんかんなどの病態に関与するとされている。しかし、神経系での mTOR シグナルの制御機構とその生理学的意義については未解明の点が多く残されている。近年、がん細胞において細胞接着分子が mTOR シグナル活性に影響を与えることが報告されており (Scheidenhelm et al., 2005; Wang et al., 2018)、接着を介した成長・代謝制御の重要性が示唆されている。しかし、神経細胞における両者の関係については多くがわかっていない。

イハラてんかんラット (IER) は自発的にてんかん発作を生じる突然変異ラットである。我々は、連鎖解析により IER の原因遺伝子が細胞接着分子をコードする *Dscaml1* であることを明らかにした (Hayase et al., 2020)。さらに、てんかん患者から同定された DSCAML1 のミスセンス変異をマウスに導入したところ、てんかん特有の異常脳波が観察された。これらの結果に加えて、IER では肥大化した海馬と扁桃体が観察された。脳での mTOR シグナル抑制因子の欠損は脳肥大化を伴うてんかんを引き起こすため、DSCAML1 は mTOR シグナルと何らかの関わりがあることが予想された。

2. 研究の目的

上記背景より DSCAML1 と mTOR シグナルの関係を調べたところ、実際に IER および *Dscaml1* 発現欠損マウスの海馬で、mTOR シグナルが活性化していることが確認された。

そこで、本研究では DSCAML1 による mTOR シグナル制御機構の詳細な分子機序とその生理的意義を明らかにし、接着という細胞間相互作用によって神経細胞の成長・代謝がどのように制御されているのか理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DSCAML1 による mTOR シグナル制御の分子機序の解明

Dscaml1 ノックダウンベクターを DIV7 の海馬初代神経細胞に導入し、mTOR シグナル活性の指標であるリン酸化 S6 タンパク質を定量する。また、DSCAML1 発現ベクターをマウス線維芽細胞由来の L929 細胞に導入し、同様に mTOR シグナル活性を評価する。

DSCAML1 の mTOR シグナル制御が細胞接着依存性であるか調べるために、DSCAML1 を安定発現する L929 細胞を作製し、接着の有無で mTOR シグナル活性が変化するか調べる。また、DSCAML1 の接着機能に必要な領域を認識・阻害する抗体を作製し、海馬初代神経細胞の培養液に添加する。神経細胞での DSCAML1 の接着阻害が、mTOR シグナル活性に及ぼす影響を明らかにする。

(2) DSCAML1 による mTOR シグナル制御の生理的意義の解明

発生に伴う脳サイズの変化を DSCAML1 発現欠損マウス (*Dscaml1*^{GT2}マウス) と野生型マウスで比較し、加えてリン酸化 S6 タンパク質を定量する。また、海馬初代神経細胞で *Dscaml1* をノックダウンし、樹状突起形態を調べる。

(3) 他の免疫グロブリンスーパーファミリーによる mTOR シグナル制御の検討

DSCAML1 のパラログである DSCAM は、DSCAML1 とよく似たアミノ酸配列を有する。そこで、*Dscam* ノックダウンベクターを海馬初代神経細胞に導入し、DSCAML1 と同様に mTOR シグナル活性を変化させるか検証する。この結果を裏付けるため、L929 細胞でも DSCAM を強制発現し、mTOR シグナル活性を評価する。

4. 研究成果

(1) DSCAML1 による mTOR シグナル制御の分子機序の解明

海馬初代神経細胞で *Dscaml1* をノックダウンした結果、mTOR シグナルの上昇が認められた。一方で、*Dscaml1* の過剰発現によって mTOR シグナルは減少した。また、L929 細胞での *Dscaml1* 強制発現によっても、mTOR シグナルは減少した。すなわち、DSCAML1 は mTOR シグナルの抑制因子であることが示され、この作用は神経細胞のみならず他の細胞種でも顕在することが明らかとなった。さらに、海馬初代神経細胞に *Dscaml1* ノックダウンベクターと DSCAML1 細胞内ドメイン発現ベクターを同時に導入すると、mTOR シグナル亢進がレスキューされることが示された (図 1)。しかし、DSCAML1 の細胞内ドメインから核移行シグナルを除去すると、この効果は見られなくなった (図 1)。この結果は、DSCAML1 は細胞内ドメ

インの核移行を介して mTOR シグナルを制御することを示唆する。

DSCAM は mTOR シグナルを抑制しないことが明らかにされた (以下 (3) を参照)。そこで、DSCAM と DSCAML1 の細胞内ドメインの配列比較を行ったところ、DSCAML1 に特異的な STAT3 結合モチーフが存在することが明らかになった。そのモチーフのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体 (DSCAML1Y1937F) は、mTOR シグナル制御能力を失うことが明らかになった。すなわち、DSCAML1 と STAT3 との相互作用が mTOR シグナル制御において重要であることが示唆された。この結果と一致して、STAT3 のノックダウンや STAT3 阻害剤によって DSCAML1 による mTOR シグナル抑制作用は阻害されることが示された。DSCAML1 の細胞内ドメインは核内に輸送され、遺伝子発現制御を行うことが報告されている。上記の結果と合わせて、DSCAML1 の細胞内ドメインは核内で STAT3 と協働的に遺伝子発現を変化させ、mTOR シグナルを抑制している可能性が考えられる。

続いて、DSCAML1 の mTOR シグナル制御が細胞接着依存的であるか検証した。DSCAML1 安定発現 L929 細胞を用いた解析により、DSCAML1 を発現した細胞同士の接着によって mTOR シグナル制御が誘導されることが明らかとなった (図 2)。また、DSCAML1 変異体を安定発現する L929 細胞を用いて、DSCAML1 同士のホモフィリックな結合が mTOR シグナル制御に必要であることが示された。また、DSCAML1 同士の接着を阻害する抗体は、初代海馬神経細胞において mTOR シグナルを亢進させることが明らかとなった。すなわち、神経細胞において DSCAML1 を介した接着によって、成長・代謝シグナルが制御されることが示唆される。

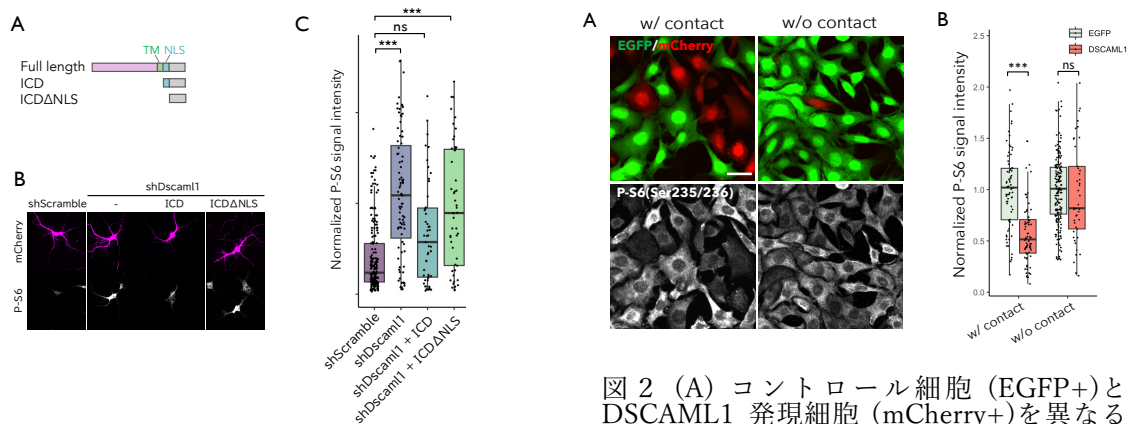


図 1 (A) DSCAML1 分子の概略図。(B) 初代海馬神経細胞に *Dscaml1* ノックダウンベクターと同時に DSCAML1 細胞内ドメイン(ICD)または核移行シグナルを欠失した細胞内ドメイン (ICDΔNLS)を導入した結果。(C) リン酸化 S6 タンパク質の定量結果。

図 2 (A) コントロール細胞 (EGFP+)と DSCAML1 発現細胞 (mCherry+)を異なる混合比で共培養し、DSCAML1 発現細胞同士の接着の有無を区別した。(B) 異なる接着様式でのリン酸化 S6 タンパク質の定量結果。

(2) DSCAML1 による mTOR シグナル制御の生理的意義の解明

Dscaml1^{GT2} マウスの海馬サイズは生後 2 週齢までは野生型と変わらないが、それ以降で有意に重量と大きさが増加することが明らかになった。これに対応して、生後 4 週齢の海馬における mTOR シグナルの亢進が確認された。また、この海馬サイズ上昇と mTOR シグナル亢進は、成体まで続くことも明らかになった。

初代海馬神経細胞での *Dscaml1* ノックダウンは樹状突起形態に異常をもたらすことが示された。そこで、*Dscaml1* ノックダウンと同時にラパマイシンを投与したところ、樹状突起形態への異常は回復した。この結果は、DSCAML1 の mTOR シグナル制御が神経細胞の樹状突起形成に寄与することを示唆する。

(3) 他の免疫グロブリンスーパーファミリーによる mTOR シグナル制御の検討

Dscaml1 のパラログである *Dscam* を初代海馬神経細胞でノックダウンした結果、*Dscaml1* ノックダウンで見られた mTOR シグナル上昇は生じなかった。また、L929 細胞に DSCAM を強制発現しても mTOR シグナルに変化は見られなかった。以上の結果から、全ての免疫グロブリンスーパーファミリーが mTOR シグナルを制御するわけではないことが明らかとなった。

<引用文献>

1. Scheidenhelm, Danielle K., Jennifer Cresswell, Carrie A. Haipek, Timothy P. Fleming, Robert W. Mercer, and David H. Gutmann. 2005. "Akt-Dependent Cell Size Regulation by the Adhesion Molecule on Glia Occurs Independently of

Phosphatidylinositol 3-Kinase and Rheb Signaling.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (8): 3151–62.

2. Wang, Meng-He, Rui Sun, Xiao-Min Zhou, Mei-Yin Zhang, Jia-Bin Lu, Yang Yang, Li-Si Zeng, et al. 2018. “Epithelial Cell Adhesion Molecule Overexpression Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition, Stemness and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells via the PTEN/AKT/mTOR Pathway.” *Cell Death & Disease* 9 (1): 2.
3. Hayase, Yoneko, Shigeru Amano, Koichi Hashizume, Takashi Tominaga, Hiroyuki Miyamoto, Yukie Kanno, Yukiko Ueno-Inoue, et al. 2020. “Down Syndrome Cell Adhesion Molecule like-1 (DSCAML1) Links the GABA System and Seizure Susceptibility.” *Acta Neuropathologica Communications* 8 (1): 206.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayase Yoneko, Amano Shigeru, Hashizume Koichi, Tominaga Takashi, Miyamoto Hiroyuki, Kanno Yukie, Ueno-Inoue Yukiko, Inoue Takayoshi, Yamada Mayumi, Ogata Shigehiro, Balan Shabeesh, Hayashi Ken, Miura Yoshiki, Tokudome Kentaro, Ohno Yukihiro, Nishijo Takuma, Momiyama Toshihiko, Yanagawa Yuchio, Takizawa Akiko, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	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） 10.1186/s40478-020-01082-6	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 Ogata Shigehiro, Hashizume Koichi, Hayase Yoneko, Kanno Yukie, Hori Kei, Balan Shabeesh, Yoshikawa Takeo, Takahashi Hidehiko, Taya Shinichiro, Hoshino Mikio	4. 巻 26
2. 論文標題 Potential involvement of DSCAML1 mutations in neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 136～151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12831	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koichi Hashizume, Kyoka Suyama, Shinichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Epileptogenesis Caused by Deficiency of the Cell Adhesion Molecule DSCAML1
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichi Hashizume, Yoneko Hayase, Yukiko Ueno-Inoue, Takayoshi Inoue, Shinichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Epileptogenesis Caused by Deficiency of the Cell Adhesion Molecule DSCAML1
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichi Hashizume, Yoneko Hayase, Shigehiro Ogata, Yukiko Ueno-Inoue, Takayoshi Inoue, Yu-ichi Goto, Shinichiro Taya, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Mechanisms of mTOR signaling regulation dependent on neuronal cell adhesion and its association with diseases
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

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