

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 18日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680029

研究課題名（和文） 新規シナプス修飾分子LGIファミリーの生理機能の解明

研究課題名（英文） Physiological role of the novel neuromodulator “LGI family”

研究代表者

深田 優子 (FUKATA YUKO)

生理学研究所・細胞器研究系・准教授

研究者番号：40416186

研究成果の概要（和文）：

シナプス伝達の制御機構を解明することはてんかんや認知症などの病態を理解する上で極めて重要である。これまでに、申請者はヒトてんかん関連遺伝子として推測されていた分泌蛋白質LGI1についてその受容体ADAM22を発見し、このリガンド・受容体がAMPA受容体機能を促進することを明らかにした。本研究では、LGI1遺伝子欠損マウスが激しいけいれん発作を示すこと、このてんかん表現型はLGI1を神経細胞に発現させることにより救済（レスキュー）できること、LGI1の脳内の主要な受容体がADAM22とADAM23であることを報告した。さらに、LGIファミリーの他のメンバーであるLGI3はADAM22とは結合せず、このてんかん表現型をレスキューできないが、LGI4は脳内でADAM22と結合し、LGI1 KOマウスをレスキューすることを見出した。一方、共同研究によりLGI2がADAM22, 23を受容体とすること、およびLGI2の変異がイヌの良性焦点てんかん発症と関連することを見出した。このように、LGIファミリーの生理機能、病態機構を個体レベルで明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Regulatory mechanisms for synaptic transmission should lead to understanding the etiology of brain disorders, such as epilepsy and dementia. So far, we have identified epilepsy-related LGI1 and ADAM22 as the novel ligand/receptor, and showed LGI1 enhances AMPA receptor-mediated synaptic transmission through ADAM22 (Fukata et al, Science 2010). To clarify the physiological role of LGI family proteins especially in brain functions, we generated LGI1 knockout (KO) mice and found that LGI1 KO mice showed lethal epileptic phenotype (Fukata et al, PNAS 2010). We found that LGI3 did not bind to ADAM22 and could not rescue LGI1 KO mice, under the condition in which neuronal LGI1 expression could rescue it. Interestingly, LGI4 bound to ADAM22 and partly rescued the epilepsy of LGI1 KO mice. In addition, LGI2 truncation causes a remitting focal epilepsy in dogs (Seppala et al, PLoS Genet 2011). Thus, we found that LGI1, 2, and 4 share their receptors ADAM22 and 23 and regulate the neuronal excitability in different brain regions, while LGI3 may differently function in the brain through the unidentified receptor. Thus, we have made steady and continual progress on clarifying the patho-physiological roles of LGI family in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	21,000,000	6,300,000	27,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経科学、リガンド・受容体、シナプス伝達、シナプス、グルタミン酸受容体、AMPA 受容体、LGI1、生化学

1. 研究開始当初の背景

私共は脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司る AMPA 型グルタミン酸受容体に関連したシナプス膜蛋白質複合体をラット脳から精製し、PSD-95、Stargazin、ADAM22 および LGI1 を主要構成分子として同定した。興味深いことに、Stargazin、ADAM22 および LGI1 は遺伝学的解析から各変異がてんかんを引き起こすことが別々に報告されていた。とりわけ LGI1 は単一遺伝子の変異でヒトの側頭葉てんかんを引き起こす機能不明な蛋白質であった。私共は LGI1 が ADAM22 を受容体として機能する分泌蛋白質であり、AMPA 受容体機能を促進する新規シナプス修飾リガンドであることを明らかにしていた (深田ら Science 2006)。しかし、新規シナプス修飾分子としての LGI1 の生理機能、LGI ファミリー分子 (LGI2, 3, 4) の機能多様性に関しては殆ど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、LGI1 とそのファミリー分子に着目し、LGI ファミリー分子群の振舞いがどのようにしてシナプス伝達を調節し、その機構の破綻がどのようにしててんかんを引き起こすのかという学術的にも医学的にも極めて重要な疑問の解明を目指した。具体的には 1) LGI1 の個体レベルでの生理機能、および 2) LGI ファミリーの機能多様性に関して解析を行った。

3. 研究の方法

LGI1 の個体レベルでの生理機能、病態機構を解明するために、LGI1 のノックアウト (KO) マウスの解析を 1) 生化学的解析、2) 組織化学的解析、3) 電子顕微鏡解析、4) 電気生理学的解析さらには 5) 行動学的解析を交えて統合的に行う。

一方、LGI ファミリーの機能多様性を明らかにするために、LGI ファミリーと ADAM22, 23 の結合特異性を明らかにする。また、LGI ファミリーの各メンバーが LGI1 KO マウスで見られるてんかん表現型を救済 (レスキュー) できるか否かで LGI ファミリーを機能的に分類する。

LGI2 に関しては国際共同研究によりイヌの良性焦点てんかん発症との関連を遺伝学的、生化学的解析により明らかにする。

4. 研究成果

私共は LGI1 KO マウスが生後 2-3 週間で必ず致死性にてんかん発作を引き起こすことを発見した。また、LGI1 の脳内の主な作用点 (受容体) として、てんかん関連蛋白質 ADAM22 に加えて、てんかん関連蛋白質 ADAM23 を見出した。LGI1 は ADAM22 と ADAM23 と蛋白質複合体を形成するが、LGI1 KO マウスではシナプスにおけるこの複合体形成が阻害され、てんかんがおこると考えられた。さらに、この LGI1 KO マウスでは、AMPA 受容体を介したシナプス伝達の低下が認められた。LGI1 は細胞外から脳の興奮性を制御する重要な分泌蛋白質であると考えられた。LGI1 の変異が多くの家畜性てんかん患者で認められることから、LGI1 KO マウスはヒトのてんかんモデルマウスとしても有用であると考えられた (以上、深田ら PNAS 2010)。

次に LGI2, LGI3, LGI4 の機能多様性について、LGI1 KO マウスのてんかん表現型をレスキューできるか否かという観点と ADAM22, ADAM23 受容体との結合特異性という観点から解析した。LGI1, LGI3, および LGI4 を LGI1 KO マウスの脳神経細胞に特異的に発現させたところ、LGI1 ではてんかん発作をレスキューしたのに対し、LGI3 ではレスキューできないことを見出した。興味深いことに、LGI3 は ADAM22 とは結合しない LGI ファミリーであった。一方、LGI4 は脳内で ADAM22 と結合し、かつ LGI1 KO マウスを部分的にレスキューした (投稿準備中)。これらの結果から、LGI ファミリーは ADAM22 受容体と結合するか否かによって 2 つのグループに分類でき、ADAM22 と結合する LGI ファミリーは脳の神経細胞の興奮性を制御する機能を有することを見出した。

一方、ヘルシンキ大学の Lohi 博士との国際共同研究により LGI2 の変異がイヌの良性焦点てんかん発症を引き起こすことを見出した (Seppala et al, PLoS Genet, 2011)。また、本論文で私共は LGI2 が脳内で ADAM22, および ADAM23 に結合していることを初めて示した。これらのことから LGI ファミリーと ADAM 受容体の結合が何らかの理由で破綻すると種を越えて、てんかんが発症することが強く示唆された。このように、LGI ファミリーの病態機構を明らかにしたと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

1) Kusuzawa S, Honda H, Fukata Y, Masaki Fukata M, Kanatani S, Tanaka DH, Nakajima K: Leucine-rich glioma inactivated 1 (Lgi1), an epilepsy-related secreted protein, has a nuclear localization signal and localizes both to the cytoplasm and nucleus of the caudal ganglionic eminence neurons. **Eur J Neurosci** in press 査読有

2) Yokoi N, Fukata M, Fukata Y: Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications. **International Review of Cell & Molecular Biology**, in press 査読無

3) Oku S, Fukata Y, Fukata M: DHHC proteins. **Encyclopedia of Signaling Molecules** 1st Edition, Springer, in press 査読無

4) Seppala EH, Jokinen TS, Fukata M, Fukata Y, Webster MT, Karlsson EK, Kilpinen SK, Steffen F, Dietschi E, Leeb T, Eklund R, Zhao X, Rilstone JJ, Lindblad-Toh K, Minassian BA, Lohi H: LGI2 Truncation Causes a Remitting Focal Epilepsy in Dogs. **PLoS Genetics** 7:e1002194, 2011 査読有

5) Levy AD, Devignot V, Fukata Y, Fukata M, Sobel A, Chauvin S: Subcellular Golgi localization of Stathmin family proteins is promoted by a specific set of DHHC palmitoyl transferases. **Mol Biol Cell** 22:1930-1942, 2011 査読有

6) Fukata Y, Fukata M: Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci** 11:161-175, 2010

査読有

7) Shmueli A, Segal M, Sapir T, Tsutsumi R, Noritake J, Bar A, Sapoznik S, Fukata Y, Orr I, Fukata M, Reiner O: Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. **EMBO J** 29:107-119, 2010 査読有

8) Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M: Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107:3799-3804, 2010 査読有

9) Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Bredt DS, Hamakubo T, Fukata M: Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. **J Cell Biol** 186:147-160, 2009 査読有

10) Tsutsumi R, Fukata Y, Noritake J, Iwanaga T, Perez F, Fukata M: Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme. **Mol Cell Biol** 29:435-447, 2009 査読有

11) Mill P, Lee AWS, Fukata Y, Tsutsumi R, Fukata M, Keighren M, Porter RM, McKie L, Smyth I, Jackson IJ: Palmitoylation Regulates Epidermal Homeostasis and Hair Follicle Differentiation. **PLoS Genetics** 11:e1000748, 2009 査読有

12) Greaves J, Prescott GR, Fukata Y, Fukata M, Salaun C, Chamberlain LH: The Hydrophobic cysteine-rich domain of SNAP25

couples with downstream residues to mediated membrane interactions and recognitions by DHHC palmitoyl transferases. **Mol Biol Cell** 20:1845-1854, 2009 査読有

13) Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, Nemoto T, Fukata M, Poo MM: Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. **J Neurosci** 29:14185-14198, 2009 査読有

14) Iwanaga T, Tsutsumi R, Noritake J, Fukata Y, Fukata M: Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling. **Prog Lipid Res** 48:117-127, 2009 査読有

[学会発表] (筆頭発表のみ示す 計5件)

1) Fukata Y, Yokoi N, Ohkawa T, Fukata M (2011/12/3-12/7) Molecular dissection of epilepsy-related neuronal secreted protein, LGI1. 51st Annual Meeting of American Society for Cell Biology (Denver, U.S.A)

2) Fukata Y, Dimitrov A, Noritake J, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M (2011/11/12-11/16) Visualization of endogenous palmitoylated PSD-95 reveals local palmitoyltransferase-induced nucleation of postsynaptic assembly. 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, U.S.A)

3) Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Yokoi N, Nicoll RA, Fukata M (2010/6/27-7/2) Possible involvement of epilepsy-related ligand/receptors, LGI1/ADAM22/ADAM23 in trans-synaptic interaction. Gordon Research Conferences "Cell Biology of the Neuron"

(Waterville Valley, U.S.A)

4) Fukata Y (2009/11/11-11/12) Invited Role of the novel epilepsy-related protein network in synaptic transmission. Japan-Taiwan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation (Kobe, Japan)

5) Fukata Y, Watanabe A, Iwanaga T, Fukata M (2009/7/27-8/1) In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1. 36th International Congress of Physiological Sciences (Kyoto, Japan)

[図書] (計2件)

1) 岩永剛、深田正紀、深田優子 (2010) LGI1 が仲介するタンパク質複合体の破綻はシナプス伝達異常とてんかんを引き起こす, 細胞工学 vol29 (6)594-595, 学研メディカル秀潤社

2) 横井紀彦、深田正紀、深田優子 (2010) シナプス伝達修飾分子 LGI1 の機能異常による“てんかん”発症, Medical Bio, vol17, 40-47 オーム社

[その他]
ホームページ
<http://www.nips.ac.jp/fukata/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
深田 優子 (FUKATA YUKO)
生理学研究所・細胞器官研究系・准教授
研究者番号: 40416186