

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02809

研究課題名（和文）痙攣性神経疾患関連遺伝子PRRT2のシナプス間隙神経伝達物質濃度調節機構の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological roles of convulsive neurological disease-causing gene PRRT2 in neurotransmitter release

研究代表者

岩田 修永（Iwata, Nobuhisa）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授

研究者番号：70246213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は本課題において発作性運動誘発性ジスキネジア（PKD）の関連分子 proline-rich transmembrane protein 2 (Prprt2) が線条体での神経活動依存的なドーパミン放出の強度と頻度を調節することを明らかにした。また、Prprt2ノックインマウスは、L-ドーパ負荷によりPrprt2変異依存的な運動障害が誘導されるが、このときの線条体ドーパミン放出をL-ドーパ非投与時と比較すると、連続刺激に伴う放出可能回数がPrprt2変異により増大していた。このことから、PKDの運動症状の発現には線条体におけるドーパミンの過放出が高頻度に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PKDの原因遺伝子PRRT2に着目した本研究課題では、黒質線条体ドーパミン作動性シナプスにおいてドーパミン放出の強度と刺激応答性の延長が不随意運動に関連することを明らかにした点に学術的意義がある。また、これまでPKDが小脳の異常に起因する疾患と考えられていた中で、大脳基底核神経回路の活動異常もPKDに関連することを見出したことも、随意運動の調節メカニズムを理解する上で重要な学術的成果となる。このように、PKDの新たな治療戦略としてドーパミン調節薬が使用できる可能性を示され、医療発展への寄与の観点でも社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) is a neurological disorder characterized by motion-triggered attacks of involuntary movements. Mutations in proline-rich transmembrane protein 2 causes PKD in a loss-of-function manner; however, it was unclear which region or molecular mechanism is responsible for PKD. In this study, we elucidated that PKD-related Prprt2 mutation resulted in excessive evoked dopamine release in the mouse striatum. Moreover, L-dopa administration exacerbated motor impairments and increased frequency of the dopamine release in the Prprt2 mutant mice, compared to those in wild-type mice. These results suggested that increasing frequency of the dopamine release by L-dopa injection may be related to development of Prprt2-related motor phenotype. Thus, the nigrostriatal dopaminergic pathway may be partially implicated in PKD pathology.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ジスキネジア PRRT2 大脳基底核 ドーパミン ドーパミントランスポーター マイクロダイアリシス  
ノミフェンシン 線条体

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

Proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2) の遺伝子変異は、発作性運動誘発性ジスキネジア (paroxysmal kinesigenic dyskinesia: PKD) を含む様々な痙攣性神経疾患に関連する (Chen WJ, *et al. Nat Genet.* 2011)。PKD は急激な動作等により不随意運動発作を呈する疾患であり、発症に関わる脳領域・神経回路および分子機序は確定していない。PKD 患者に最も高頻度に見られる PRRT2 変異 (c.649dupC) は、フレームシフトにより早熟の終止コドンを生じる。研究代表者が作製した c.649dupC に相当する変異を導入した Prrt2 ノックイン (KI) マウスでは、変異型 Prrt2 が mRNA およびタンパク質レベルで消失していた。これにより、PKD が PRRT2 の *loss-of-function* により発症し、PRRT2 の生理機能の解明が PKD の発症機序解明につながると考えられた。また、研究代表者は Prrt2 が神経興奮依存的にカルパインにより切断され 12 kDa の C 末端フラグメントを生じることを見出し (Hatta D, *et al. FASEB J.* 2020)、このような PRRT2 の構造変化に伴う生理機能変化が PKD 発作の運動誘発性に関連することを示唆した。さらに、*in vivo* マイクロダイアリシスと高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 電気化学検出 (ECD) システムを用いて、KCl 誘発神経興奮によりマウス線条体でのドーパミン(DA)濃度が野生型に比較して Prrt2-KI マウスで顕著に増加することを観察していた。

これまで PRRT2 が神経伝達物質の放出を制御することが報告されていたが (Coleman J, *et al. Cell Rep.* 2018)、PKD の運動誘発性の特徴を説明するには責任となる神経サブタイプや脳部位あるいは神経回路を明らかにする必要がある。また、PRRT2 の機能解析は小脳や大脳皮質を中心に行われ、小脳を PKD の責任脳部位とする説が提唱されてきた (Tan GH, *et al. Cell Res.* 2018)。一方、研究代表者は PKD の類似疾患である L-ドーパ誘発性ジスキネジアや遅発性ジスキネジアが大脳基底核の DA 作動性伝達の異常に関連することに着目し、Prrt2 の線条体における役割を Prrt2-KI マウスを用いて解明することにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、PRRT2 変異によって大脳基底核における DA 伝達が過剰になり、それにより大脳皮質大脳基底核ループ (運動制御回路) の活動性が増大することが PKD の不随意運動発作に寄与するという仮説を立て、Prrt2 による DA 伝達調節機構及び不随意運動発作との関連を解析することにより、PKD の発症機序解明と新規治療法の基盤構築を目指した。具体的には、Prrt2 変異による間質液 DA 濃度の増加機序を解明するために、DA 再取り込み阻害剤投与後の間質液 DA 濃度の変動を解析した。続いて、脳内 DA 濃度を調節する薬剤を Prrt2-KI マウスに投与し、運動機能と間質液 DA 濃度の変動パターンを解析し、仮説の裏付けを行った。最後に DA 作動性ニューロンの機能への Prrt2 の直接的寄与を明らかにするため、脳内の Prrt2 の局在性を詳細に解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 間質液 DA 濃度の測定

線条体における神経伝達物質濃度の測定は *in vivo* マイクロダイアリシス法とそれに続く HPLC 電気化学検出により実施した。透析プローブは、FX-I-6-01M (802621, Eicom,; 半透膜長 1 mm、半透膜外径 0.22 mm、カットオフ値 50 kDa) を使用し、シリジポンプ (CMA100, Carnegie Medicin,) により、2.0  $\mu$ L/分で人工脳脊髄液 (aCSF) を灌流した。還流液は 10 分ごとに 20  $\mu$ L を回収した。また、回収用チューブには予めサンプル保存液として標準混合希釈液 5  $\mu$ L (回収液と保存液の容量比が 4:1) を入れた。神経脱分極刺激を与えるために 60 mM 塩化カリウム (KCl) を、DA 細胞内取り込みをブロックするために 300  $\mu$ M ノミフェンシンを透析プローブから投与した。脳内 DA 量を増加させた負荷状態を作るために、25 mg/kg カルピドーパ及び 100 mg/kg L-ドーパを腹腔内に投与し、図 2 及び図 3 に示すタイムスケジュールでロータロッド試験と DA 濃度測定を行なった。

### (2) 蛍光免疫組織染色

パラフィン包埋したマウス脳切片を脱パラフィンした後、Tris-EDTA バッファー (pH 9.0) に浸してオートクレーブ (121  $^{\circ}$ C、5 分) による抗原賦活化を行った。その後、0.3% 過酸化水素 in PBS 中で 30 分インキュベートした後、TSA (tyramide signal amplification) kit 付属ブロッキング液で処理した。その後、一次抗体 rabbit anti-PRRT2 antibody (1:800, HPA014447, Sigma-Adrich) で一晩 4  $^{\circ}$ C、二次抗体 EnVision + system-HRP anti rabbit (goat anti rabbit Ig-HRP labelled polymer conjugated) (K4003; Dako,) で 60 分、室温、Tyramide-Cy5 (1:50, SAT705A001EA; Akoya Biosciences) で 10 分、順次室温にてインキュベートした。それぞれの抗体及び蛍光チラミド処理後、TNT バッファー (0.1 M

Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) で洗浄した。その後、HRP の不活化のため 1% 過酸化水素/PBS (pH 7.0) で処理した。三重染色においては、次に示す抗体及び蛍光チラミドを用いて上述の一次抗体以降の操作を繰り返した。rat anti-DAT antibody (1:300, sc-32258; Santa Cruz Biotechnol.), rabbit anti-rat IgG (H+L) biotin conjugated (BA-4001, Mouse Adsorbed, Vector), Streptavidin-HRP (1:100, FP1049; PerkinElmer), mouse anti-VGLUT1 antibody (1:2,000, sc-377425, Santa Cruz Biotechnol.), EnVision + system-HRP anti mouse (goat anti mouse Ig-HRP labelled polymer conjugated) (K4001; Dako)。二重染色においては、mouse anti-VGAT antibody; (1:500, sc-393373, F-2; Santa Cruz Biotechnol.), EnVision + system-HRP anti mouse (同上), Tyramide-FITC (SAT701001EA; Akoya Biosciences) を使用した。その後、切片をマウンティング液 (TA-030-FM, Thermo Fisher Scientific) で封入した。染色画像の撮像は蛍光顕微鏡 (B-9000, Keyence)、共焦点顕微鏡 (LSM710, Carl Zeiss) を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Prrt2 による間質液 DA 濃度の調節機序

Prrt2 による線条体間質液 DA 濃度の調節機序が DA の放出あるいは回収のどちらに依存するか調べるために、DA トランスポーター (Dat) 阻害剤ノミフェンシンを用いて、DA の回収を止めた実験系にて野生型及び *Prrt2*-KI マウスの線条体における DA の放出を比較した。ノミフェンシン処置がない場合には、KCl 誘導性の神経興奮時に限定して、*Prrt2* 変異 (タンパク消失) による間質液 DA 濃度の上昇が見られたが (図 1 上段)、ノミフェンシン処置下では、定常状態においても *Prrt2* 変異により上昇した (図 1 下段)。そのため、*Prrt2* は DA の放出と回収のうち、放出を制御していることが示された。定常状態では、DA の速やかな回収により、*Prrt2* 変異による DA 放出増大の効果がマスクされるが、神経興奮に伴う放出では、DA 回収が追いつかず細胞外 DA 濃度の顕著な上昇が起こると推測された。

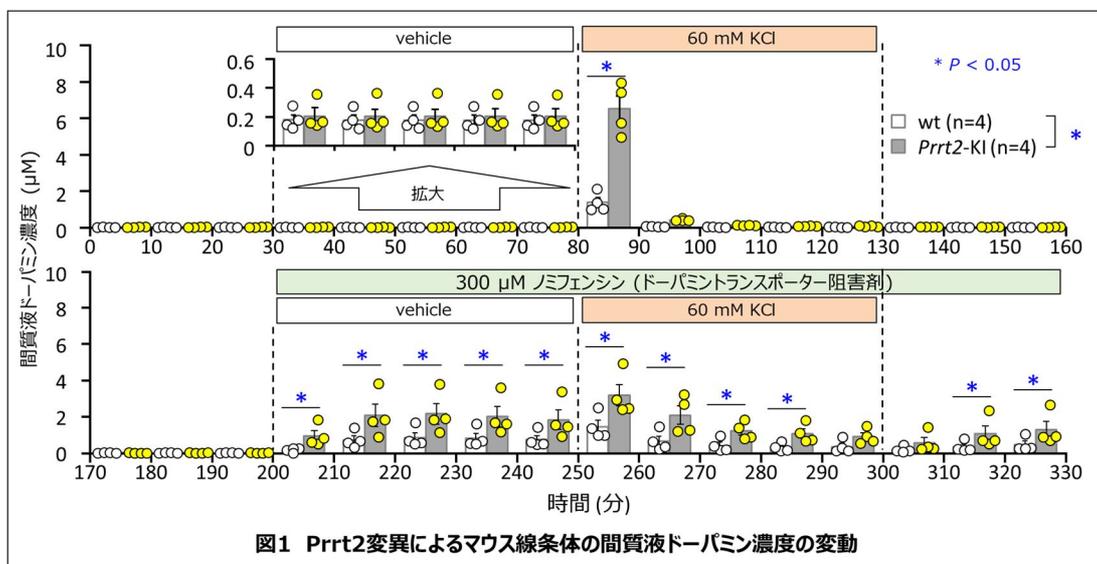


図1 Prrt2変異によるマウス線条体の間質液ドーパミン濃度の変動

##### (2) Prrt2 変異に依存する運動障害と線条体 DA 濃度変動の関連性

このように、*Prrt2* は主に DA の放出に関わることが示唆されたが、この過剰な DA 伝達がジスキネジアの発現に寄与するか調べるために、カルビドーパ投与の 30 分後に、L-ドーパを腹腔内投与し、30 分間隔で 3 回、ロータロッド試験を行ったところ、L-ドーパ誘発性の運動障害 (ジスキネジア発作) が野生型よりも *Prrt2*-KI マウスで増悪する結果となった。(図 2)(Hatta D, et al. *J Biochem.* 2023)。

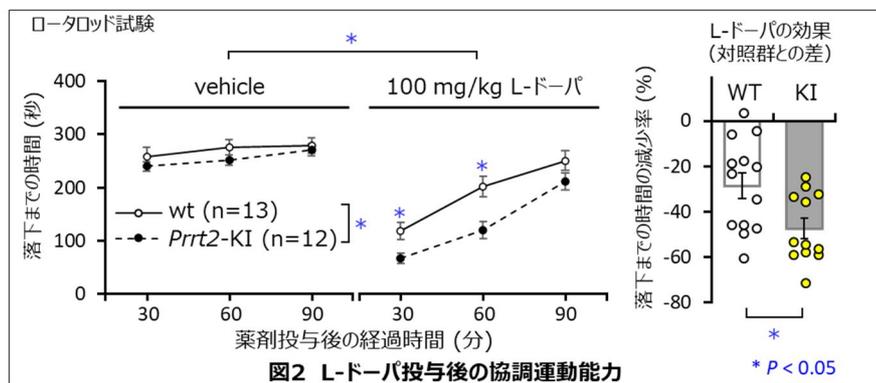
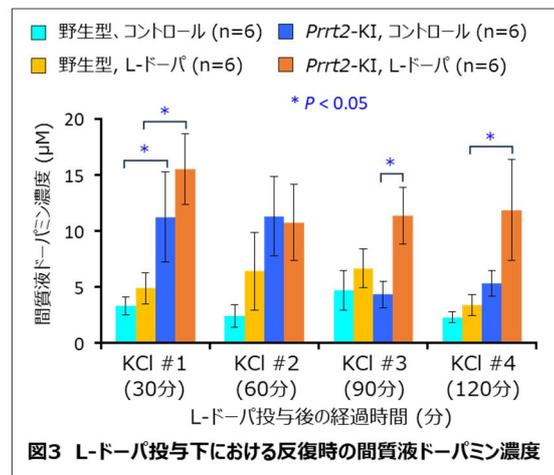


図2 L-ドーパ投与後の協調運動能力

次に、L-ドーパを投与後に線条体間質液 DA 濃度を測定し、運動障害と DA 濃度異常のタイミングの一致性を評価した。随意運動は黒質線条体神経経路の興奮を伴うことが知られているため、ロータロッド試験における走行状態を KCl 刺激で模倣した。L-ドーパ非投与下 (vehicle 投与下) では *Prrt2*-KI マウスにおける過剰な DA 放出は KCl 刺激を繰り返すことによって野生型マウスと同等のレベルまで低下したが、100 mg/kg L-ドーパ投与下では vehicle 投与下よりも DA 放出の応答性が長期間維持された (図 3)。L-ドーパによる DA 放出増強作用は投与後 90 分で出現したが (図 3, KCl #3)、この遅延時間は、腹腔内投与した [<sup>18</sup>F]-FDOPA の線条体で最高濃度に達する時間と合致しており、また、ロータロッド試験において *Prrt2* 変異依存的な L-ドーパ誘発性運動障害が観察された時間 (8 週齢マウスに対する 100-200 mg/kg L-ドーパ投与後 60-90 分) とも概ね一致した。したがって、*Prrt2* 変異による運動障害には黒質線条体 DA 作動性ニューロンの DA 放出の強度及び頻度の増加が関係していると考えられた。



### (3) *Prrt2* が局在するニューロンサブタイプ

*Prrt2* が DA 作動性ニューロンにおいて直接的に DA 放出を調節しうるかを明らかにするために、線条体領域における *Prrt2* の局在を神経サブタイプ別に解析した。ドーパミン作動性ニューロンのマーカーとして *Dat* を、グルタミン酸作動性シナプスのマーカーとして *Vglut1* を、GABA 作動性シナプスのマーカーとして *Vgat* を使用して、*Prrt2* との二重あるいは三重蛍光免疫染色を実施した結果、*Prrt2* は線条体においてドーパミン作動性ニューロンよりも主としてグルタミン酸作動性シナプスに局在し (図 4)、GABA 作動性シナプスにはほとんど局在しなかった (データ未記載)。また、*Prrt2* は DA 作動性ニューロンには僅かな局在、あるいは DA 作動性ニューロンに近接するグルタミン酸作動性シナプス上の位置への局在が観察された。このことから、*Prrt2* による DA 放出調節機能は直接的な DA 作動性シナプスの制御よりもむしろ、グルタミン酸の放出制御を介した間接的な作用であると考えられた。

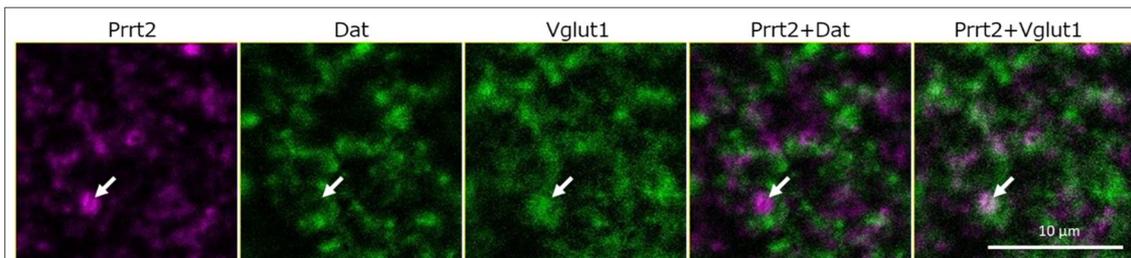


図4 マウス大脳基底核における*Prrt2*の局在

*Prrt2*及び*Dat*、*Vglut1*を三重免疫染色し、共焦点顕微鏡の100倍対物レンズで線条体を撮像した。画像はその一部を拡大している。矢印は、*Prrt2*は*Vglut1*と重なるが、*Dat*とは重ならない部分の一例である。*Dat*、ドーパミントランスポーター (ドーパミン作動性ニューロンマーカー); *Vglut1*、小胞グルタミン酸トランスポーター1 (グルタミン酸作動性シナプスマーカー)

### (4) 考察・結論

*Prrt2*-KI マウスは PKD 患者とは異なり、通常飼育下で運動誘発性の運動症状を頻発しないが、L-ドーパ負荷により *Prrt2* 変異依存的な運動障害が引き出されるため、野生型マウスに比較して神経細胞が易興奮状態に維持されていると考えられる。また、本研究により *Prrt2* 変異による線条体間質液 DA 濃度の上昇が DA 再取り込みの減少よりもむしろ DA の放出増加に起因し、神経興奮時の DA の放出量及び頻度の増加が運動障害に関連することが見出された。*Prrt2* は DA 作動性ニューロンにほとんど局在せずグルタミン酸作動性ニューロンに多く局在したことを考慮すると、*Prrt2* は線条体において主にグルタミン酸ニューロンのシナプス機能を調節することにより、間接的に DA 放出の恒常性を維持し、正常な随意運動の実行に寄与し、その機能の破綻が PKD の不随意運動に関わっていると考えられる。

### < 引用文献 >

Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, Wei W, Ni W, Tan GH, Guo SL, He J, Chen YF, Zhang QJ, Li HF, Lin Y, Murong SX, Xu J, Wang N, Wu ZY. Exome sequencing identifies truncating mutations in *PRRT2* that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet.* 2011; 43(12):1252-1255.

Hatta D, Shirovani K, Hori Y, Kurotani N, Iwata N. Activity-dependent cleavage of dyskinesia-related proline-rich transmembrane protein 2 (PRRT2) by calpain in mouse primary cortical neurons. *FASEB J.* 2020; 34(1):180-191.

Tan GH, Liu YY, Wang L, Li K, Zhang ZQ, Li HF, Yang ZF, Li Y, Li D, Wu MY, Yu CL, Long JJ, Chen RC, Li LX, Yin LP, Liu JW, Cheng XW, Shen Q, Shu YS, Sakimura K, Liao LJ, Wu ZY, Xiong ZQ. *PRRT2* deficiency induces paroxysmal kinesigenic dyskinesia by regulating synaptic transmission in cerebellum. *Cell Res.* 2018; 28(1):90-110.

Hatta D, Kanamoto K, Makiya S, Watanabe K, Kishino T, Kinoshita A, Yoshiura KI, Kurotani N, Shirovani K, Iwata N. Proline-rich transmembrane protein 2 knock-in mice present dopamine-dependent motor deficits. *J Biochem.* 2023; 174(6):561-570.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hatta Daisuke, Kanamoto Kaito, Makiya Shiho, Watanabe Kaori, Kishino Tatsuya, Kinoshita Akira, Yoshiura Koh-Ichiro, Kurotaki Naohiro, Shirotani Keiro, Iwata Nobuhisa	4. 巻 174
2. 論文標題 Proline-rich transmembrane protein 2 knock-in mice present dopamine-dependent motor deficits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 561 ~ 570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad074	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 八田大典、光成晃輝、金本海斗、眞喜屋志穂、淵上由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prرت2によるドーパミン神経伝達の調節を介した運動制御
3. 学会等名 2022年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金本海斗、光成晃輝、眞喜屋志穂、八田大典、淵上由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prرت2による細胞外神経伝達物質の濃度調節
3. 学会等名 2022年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八田 大典、金本海斗、眞喜屋志穂、淵上由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prرت2による線条体ドーパミン神経伝達における役割
3. 学会等名 第4回長崎県薬剤師学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八田大典、光成晃輝、永田健太郎、金本海斗、濱田麻希、西村聖未、淵上由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷圭朗、岩田修永
2. 発表標題 マウス線条体におけるジスキネジア関連分子PRRT2のドーパミン神経伝達における役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 八田大典、金本 海斗、眞喜屋 志穂、永田 健太郎、淵上 由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦 孝一郎、黒滝 直弘、城谷 圭朗、岩田 修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子PRRT2の線条体ドーパミン伝達と運動制御における役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 金本 海斗、眞喜屋 志穂、八田 大典、淵上 由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦 孝一郎、黒滝 直弘、城谷 圭朗、岩田 修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prrt2による間質液DA濃度の調節機構
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 眞喜屋 志穂、金本 海斗、八田 大典、淵上 由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦 孝一郎、黒滝 直弘、城谷 圭朗、岩田 修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prrt2によるドーパミン制御機構の解析
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八田大典、金本海斗、眞喜屋志穂、淵上由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦孝一郎、黒滝直弘、城谷 圭朗、岩田修永
2. 発表標題 発作性運動誘発性ジスキネジアの原因分子PRRT2の線条体ドーパミン伝達と運動制御における役割
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 眞喜屋 志穂、金本 海斗、八田 大典、木住野 達也、淵上 由貴、川上 茂、木下 晃、吉浦 孝一郎、黒滝 直弘、城谷 圭朗、岩田 修永
2. 発表標題 ジスキネジア関連分子Prrt2によるマウス線条体ドーパミン放出制御機構の解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hatta D, Kanamoto K, Makiya S, Watanabe K, Kishino T, Fuchigami Y, Kawakami S, Kinoshita A, Yoshiura K, Kurotaki N, Shirofani K, Iwata N
2. 発表標題 Proline-rich transmembrane protein 2 knock-in mice present nigrostriatal dopaminergic hyperactivity and increased susceptibility to L-dopa-induced motor deficits.
3. 学会等名 The 35th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

様々な神経疾患に関わる重要分子PRRT2によるシナプス調節機構の解析  
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biotech/research.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
研究協力者	八田 大典  (Hatta Daisuke)		
研究協力者	眞喜屋 志穂  (Makiya Shiho)		
研究協力者	金本 海斗  (Kanamoto Kaito)		

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