

令和元年6月12日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07078

研究課題名(和文)興奮性シナプスの分子修飾異常に伴うてんかん発作の発症機構

研究課題名(英文)The roles of synaptic palmitoylation in epilepsy

研究代表者

林 崇 (HAYASHI, Takashi)

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・室長

研究者番号：80547472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんは、長年の研究にも関わらず、その発症機構に未解明の点が多い。本研究は、哺乳類の脳における主要な興奮性シナプス伝達を担うAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体) の制御機構に注目し、てんかん発作の発症過程で興奮性/抑制性シナプスのバランス崩壊がいかんにかん生じるか、そのメカニズムの一端を解明した。特に、可逆的な翻訳後修飾機構の一種であるパルミトイル化による制御の解析を通じて、AMPA受容体のパルミトイル化修飾異常と脳の過剰な興奮時のシナプスの機能的破綻メカニズムとの因果関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、興奮性シナプスにおける興奮性神経伝達物質受容体の修飾異常と、てんかん発症時のシナプス機能調節の破綻メカニズムとの因果関係は、十分に検討されてこなかった。本研究において、てんかんの発症にAMPA受容体の分子修飾が関わっている可能性を示したことで、新たな創薬標的が明らかになった。今後、パルミトイル化の様な、AMPA受容体の特定の分子修飾状態だけを調節する化合物が同定されれば、てんかん発作に関わる過剰興奮シナプスに選択的に作用し、より副作用の少ない新たな抗てんかん薬開発への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Excess synaptic AMPA receptors leads to epilepsy in response to seizure-inducible stimulation. Although proper regulation of AMPA receptors plays crucial roles in the maintenance of the excitatory/inhibitory (E/I) synaptic balance, detailed mechanisms of epilepsy still remains unclear. Our previous studies revealed that a key modification of AMPA receptors expression is the reversible post-translational palmitoylation. GluA1 palmitoylation-deficient mice showed elevated seizure susceptibility and neuronal activity. Disruption of the palmitoylation site was accompanied with up-regulation of GluA1 phosphorylation in the hippocampus and increase of GluA1 protein in the cortex. Furthermore, GluA1 palmitoylation functioned to suppress excessive spine enlargement in chemical LTP. Our findings indicate that abnormality in GluA1 palmitoylation is liable to lead hyperexcitability in the cerebrum that makes it difficult to maintain network stability, resulting in epileptic seizure.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学 脳神経疾患 脂質 シグナル伝達 薬理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは長年の研究にも関わらず、その発症機構に未解明の点が多く残されている。大脳皮質や海馬の焦点部分において、何らかの原因により興奮性の異常亢進が生じると、それが、てんかん発作の起点となって拡がり、場合によっては、興奮が脳内全体に伝播して痙攣や失神等の症状を引き起こす。しかしながら、てんかん発作が起こる過程で、焦点に局在し、機能するタンパク質群の機能を制御する機構が、どのような変調を起こすのか、また、興奮性/抑制性シナプスのバランスが保たずに、てんかん発作に至る過程はいかなるものか、といった点に関する詳細は、不明なままである。特に、シナプスにおける神経伝達物質受容体の制御異常と、てんかん発作におけるシナプスの機能的破綻メカニズムとの因果関係は、これまで十分に明らかにされていなかった。

てんかん発作の分子機構を考える時、重要になるのは、ヒトを含む哺乳類の脳中枢神経系において、主要な興奮性シナプス伝達と可塑性を担う、神経伝達物質グルタミン酸とその受容体である。研究代表者は、これまで、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体のシナプス発現と、膜輸送、シナプス形成・維持の制御機構、および、その破綻から起こる一部の精神疾患の発症機構を明らかにしてきた (Hayashi *et al.* Nature 1999; Narisawa-Saito *et al.* PNAS 1999; Hayashi *et al.* J. Neuroscience 2004; Hayashi *et al.* Neuron 2005; Wu *et al.* PNAS 2007; Lin *et al.* Nature Neuroscience 2009; Hayashi *et al.* Neuron 2009; Hu *et al.* Neuron 2010; Thomas *et al.* Neuron 2012; Thomas *et al.* J. Neuroscience 2013; 他)。この研究過程で、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) 自体が、直接的なパルミトイル化修飾を受けることを同定した。パルミトイル化は、タンパク質翻訳後修飾の一機構であり、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の、タンパク質細胞内領域システイン残基に対する可逆的な付加反応である。このパルミトイル化に伴って、AMPA 受容体がシナプスの膜表面において激しく出入りを繰り返しており、この分子修飾による制御が、興奮性シナプス機能に重要な役割を果たすことを、培養神経細胞や脳急性スライスを用いた実験から、既に明らかにした。AMPA 受容体は、脳内全体で興奮性シナプス機能を担う主要な構成因子であり、その制御異常に伴う過剰な応答は、興奮性の異常亢進であるてんかん発作の始まりに深く関与すると考えられている。

2. 研究の目的

てんかん発作の分子発症過程における、神経伝達物質受容体の制御異常とシナプス機能的破綻の関係は、その詳細が依然として未解明である。この問題に関し、まず、興奮性シナプス/抑制性シナプス間の正常なバランス維持過程での、AMPA 受容体パルミトイル化による制御機構を明らかにし、更に、その異常に起因する生体の脳シナプスの過剰興奮が生じる過程、および、てんかん発作につながる分子発症機構の解明が必要と考えられた。本研究では、AMPA 受容体パルミトイル化の異常に伴う神経機能の破綻を、遺伝子改変マウスを用いた個体の脳レベルで解析し、シナプスにおける神経伝達物質受容体の分子修飾に伴う発現調節機構と、その破綻の解明を目指した。そのため、シナプスにおける膜局在制御機構の解析を行なった。シナプス膜上での AMPA 受容体の局在変化の異常を、詳細に明らかにすることにより、異常な興奮性の亢進を生じるてんかん発症機構の一端が、解明できるものと期待された。

3. 研究の方法

これまでの研究成果を基に、*in vivo* において、AMPA 受容体のパルミトイル化修飾異常がいかなる脳疾患に結び付くかを明らかにするため、薬理学的手法、生化学的手法、電気生理学的手法、イメージング等の解析方法を併用し、個体レベルでの機能解析を行なった。

まず、生体における AMPA 受容体パルミトイル化修飾の意義付けを行なうための動物モデルとして、発生工学的手法を用いて、脳全体で AMPA 受容体を非パルミトイル化修飾型にした遺伝子改変マウスを作製した。AMPA 受容体は、4 種のサブユニット (GluA1-4) からなるヘテロテトラマーとして構成され、中でも、AMPA 受容体のシナプス組み込みには、GluA1 サブユニットが重要な役割を果たす。この非修飾型遺伝子改変マウスは、GluA1 サブユニットのパルミトイル化修飾部位であるシステイン残基を、アミノ酸側鎖構造は似ているが、パルミトイル基の結合が起こり得ないセリン残基に置換した非修飾型マウス (GluA1 Cys811Ser) として作出した。

野生型マウスと比較して、この AMPA 受容体非パルミトイル化修飾型マウスは、外見上の特徴、健康状態と交配妊娠能力、寿命には異常がなく、また、組織染色レベルの観察では、巨視的な脳の構造変化も示さなかった。

4. 研究成果

病態との関連について、より詳細な解析を進めるにあたり、以前の実験結果から、AMPA 受容体非修飾型マウスの脳では、AMPA 受容体がパルミトイル化され得ないことにより、AMPA 受容体のシナプス発現が増加 (安定化) し、それに伴って興奮性シナプス機能が亢進することが予想された。実際、マウス個体を用いた一連の実験によって、以下に記す通り、興奮性の上

昇に基づくてんかん発作の誘発増加を見出した。

第一に、AMPA 受容体非修飾型マウスは、薬理的に、ペンチレンテトラゾール等のてんかん誘発薬による、てんかん発作の誘発頻度と持続時間の増大、てんかんモデルの一つであり、弱い反復刺激により痙攣発作の上昇が起こるキンドリング反応の成立強化、神経活動に応じて発現する最初期遺伝子産物 c-Fos と Arc の発現量増加を示した。加えて、臨床でも使用される各種の抗てんかん薬の内、これまでに試験したバルプロ酸、バルピツール酸系のフェノバルビタール、ベンゾジアゼピン系のジアゼパムのいずれに関しても、AMPA 受容体非修飾型マウスに対する薬の効きは悪く、発作抑制効果の低下が観察された。

また、てんかん発作の誘発増加に対応して、生化学的には、海馬における AMPA 受容体リン酸化 (GluA1 pSer831) の上昇と、大脳皮質における AMPA 受容体発現量の増加が見られた。これらは、いずれも、興奮性の上昇を説明する分子レベルの実験結果である。

さらに、同マウスの海馬 CA1 領域錐体細胞で電気生理学的な解析を行なうと、通常のシナプス伝達、および、生理的条件下での可塑性誘導条件では、パルミトイル化修飾部位の変異導入による有意な変化が見られなかった。この結果は、通常の飼育環境下での AMPA 受容体非修飾型マウスの行動には、特に顕著な異常が見られないことに対応しているものと考えられた。AMPA 受容体のシナプス発現量の増加と減少は、興奮性シナプスを構成しているスパイン構造 (樹状突起上の微小な棘状構造) の膨張と縮退に対応することが、既に構造生理学的な研究から明らかにされている。イメージング法を用い、スパイン構造を蛍光タンパク質の発現により可視化して観察すると、過剰興奮の誘発を想定した強い刺激に応じて、AMPA 受容体非修飾型マウスでは、ある一定以上の大きさのスパインの過剰膨張が観察された。

以上の実験結果から、AMPA 受容体のパルミトイル化修飾不全が、マウス個体レベルで、てんかん発作誘発の閾値低下を起こすことが結論付けられた。すなわち、健常な脳内では、AMPA 受容体のパルミトイル化修飾機構が正常に機能することにより、大脳の過剰興奮が抑制され、てんかん発作の誘発を防いでいるものと考えられる。さらに、「AMPA 受容体のパルミトイル化状態を適切に調節することで、てんかん発症を抑えられる可能性」が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Adachi T, [Hayashi T](#).
Evolutionarily conserved phosphorylation and palmitoylation-dependent regulation of dopamine D1-like receptors in vertebrates.
Neurotransmitter. 3, e1434 (2016) 査読有
doi: 10.14800/nt.1434.
2. Itoh M, Kaizuka T, [Hayashi T](#).
Evolutionary acquisition and divergence of vertebrate HCN2 palmitoylation.
Neurotransmitter. 4, e1603 (2017) 査読有
doi: 10.14800/nt.1603.
3. [Hayashi T](#).
Conservation and phylogenetic stepwise changes of aquaporin (AQP) 4 palmitoylation in vertebrate evolution.
Neurotransmitter. 4, e1608 (2017) 査読有
doi: 10.14800/nt.1608.
4. Kaizuka T, [Hayashi T](#).
Comparative analysis of palmitoylation sites of serotonin (5-HT) receptors in vertebrates.
Neuropsychopharmacology Reports. 38, 75-85 (2018) 査読有
doi: 10.1002/npr2.12011.
5. Itoh M, Yamashita M, Kaneko M, Okuno H, Abe M, Yamazaki M, Natsume R, Yamada D, Kaizuka T, Suwa R, Sakimura K, Sekiguchi M, Wada K, Hoshino M, Mishina M, [Hayashi T](#).
Deficiency of AMPA receptor-palmitoylation aggravates seizure susceptibility.
Journal of Neuroscience. 38, 10220-10235 (2018) 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.1590-18.2018.
6. Itoh M, Okuno H, Yamada D, Yamashita M, Abe M, Natsume R, Kaizuka T, Sakimura K, Hoshino M, Mishina M, Wada K, Sekiguchi M, [Hayashi T](#).
Perturbed expression pattern of the immediate early gene *Arc* in the dentate gyrus of GluA1 C-terminal palmitoylation deficient mice.
Neuropsychopharmacology Reports. 39, 61-66 (2019) 査読有
doi: 10.1002/npr2.12044.

[学会発表](計15件)

1. [林 崇](#)、[山下真梨子](#)、[奥野浩行](#)、[阿部学](#)、[山崎真弥](#)、[夏目里恵](#)、[崎村建司](#)、[星野幹雄](#)、[三品昌美](#)

- グルタミン酸受容体パルミトイル化による興奮性/抑制性神経活動のバランス制御と抗てんかん薬の作用
第46回日本神経精神薬理学会年会、2016年7月3日、ソウル COEX (韓国ソウル市)
2. Mariko Yamashita, Hiroyuki Okuno, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Rie Natsume, Kenji Sakimura, Mikio Hoshino, Masayoshi Mishina, Takashi Hayashi
Maintenance of excitatory-inhibitory balance in brain by AMPA receptor palmitoylation
第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 3. 伊藤政之、山下真梨子、奥野浩行、阿部学、山崎真弥、夏目里恵、崎村建司、星野幹雄、三品昌美、林 崇
AMPA 受容体パルミトイル化による興奮性シナプスの機能維持とその異常に伴うてんかん発作
第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
 4. 伊藤政之、山下真梨子、奥野浩行、阿部学、山崎真弥、夏目里恵、貝塚利恵、崎村建司、星野幹雄、三品昌美、林 崇
パルミトイル化による AMPA 型グルタミン受容体の制御とその異常に伴うてんかん発作
第90回日本薬理学会年会 一般口頭発表、2017年3月16日、長崎新聞文化ホール (長崎県長崎市)
 5. Masayuki Itoh, Mariko Yamashita, Daisuke Yamada, Hiroyuki Okuno, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Rie Natsume, Masaki Kaneko, Toshie Kaizuka, Kenji Sakimura, Masayuki Sekiguchi, Keiji Wada, Mikio Hoshino, Masayoshi Mishina, Takashi Hayashi
Disruption of AMPA receptor-palmitoylation leads excitatory/inhibitory imbalance and elevated seizure susceptibility
第40回日本神経科学大会、2017年7月21日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
 6. 金子雅規、伊藤政之、山下真梨子、奥野浩行、阿部学、山崎真弥、夏目里恵、貝塚利恵、崎村建司、星野幹雄、三品昌美、林 崇
大脳異常興奮の抑制に関わる AMPA 受容体パルミトイル化依存的なシナプス機能制御
第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会、2017年9月29日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
 7. 伊藤政之、山下真梨子、山田大輔、奥野浩行、阿部学、山崎真弥、夏目里恵、金子雅規、貝塚利恵、崎村建司、関口正幸、和田圭司、星野幹雄、三品昌美、林 崇
興奮性 / 抑制性バランスの維持におけるパルミトイル化による AMPA 型グルタミン酸受容体制御の役割
第137回日本薬理学会関東部会 一般口頭発表、2017年10月28日、日本医科大学教育棟 (東京都文京区)
 8. Masayuki Itoh, Mariko Yamashita, Daisuke Yamada, Hiroyuki Okuno, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Rie Natsume, Masaki Kaneko, Toshie Kaizuka, Kenji Sakimura, Masayuki Sekiguchi, Keiji Wada, Mikio Hoshino, Masayoshi Mishina, Takashi Hayashi
Disruption of AMPA receptor-palmitoylation leads excitatory/inhibitory imbalance and elevated seizure susceptibility
2017年度「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム、2017年12月21日、一橋大学 一橋講堂 学術総合センター (東京都千代田区)
 9. Takashi Hayashi
Evolution of palmitoylation sites of 5-HT (serotonin) receptors in vertebrates
Federation of European Neurosciences Societies, 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018年7月10日、シテイクューブ・ベルリン (ドイツ連邦共和国ベルリン市)
 10. 竹内絵理、山田大輔、斎藤顕宜、伊藤政之、林 崇、山田光彦、和田圭司、関口正幸
高 ω3 多価不飽和脂肪酸食摂取の抗うつ様効果には側坐核のドーパミン神経系が関与する
第41回日本神経科学大会、2018年7月28日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)
 11. 竹内絵理、山田大輔、斎藤顕宜、伊藤政之、林 崇、山田光彦、和田圭司、関口正幸
ω3 多価不飽和脂肪酸高含有餌摂取マウスにおける強制水泳試験無動時間の減少：腹側被蓋野 - 側坐核ドーパミン神経系の関与
日本脂質栄養学会第27回大会、2018年8月31日、サンラポーむらくも (島根県松江市)
 12. 林 崇
興奮性シナプスにおける神経伝達物質受容体のパルミトイル化による膜局在制御
第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会 合同年会 シンポジウム発表、2018年9月8日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
 13. 伊藤政之、金子雅規、阿部学、山崎真弥、夏目里恵、山田大輔、崎村建司、関口正幸、和田圭司、三品昌美、林 崇
パルミトイル化による AMPA 受容体制御の異常は発作感受性を上昇させる
第139回日本薬理学会関東部会 一般口頭発表、2018年10月20日、東京慈恵会医科大学 (東京都港区)
 14. Masayuki Itoh, Mariko Yamashita, Masaki Kaneko, Hiroyuki Okuno, Manabu Abe, Maya Yamazaki,

- Rie Natsume, Daisuke Yamada, Toshie Kaizuka, Reiko Suwa, Kenji Sakimura, Masayuki Sekiguchi, Keiji Wada, Mikio Hoshino, Masayoshi Mishina, Takashi Hayashi
Deficiency of AMPA receptor-palmitoylation aggravates the seizure susceptibility
第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 28 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
15. Masayuki Itoh, Hiroyuki Okuno, Daisuke Yamada, Mariko Yamashita, Manabu Abe, Rie Natsume, Toshie Kaizuka, Kenji Sakimura, Mikio Hoshino, Masayoshi Mishina, Keiji Wada, Masayuki Sekiguchi, Takashi Hayashi
Perturbed expression pattern of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus of GluA1 C-terminal palmitoylation deficient mice
2018 年度「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム、2018 年 12 月 13 日、一橋大学 一橋講堂 学術総合センター（東京都千代田区）

〔図書〕(計 1 件)

1. 林 崇
神経受容体のミクロイメージング
脳内環境辞典 56-57 頁、メディカルドゥ社、2017 年 3 月
高橋良輔、山中宏二、樋口真人、漆谷 真、編集

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/cnsfaust/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。