

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460059

研究課題名(和文) MDGAファミリー分子群の脳皮質神経回路網形成機構における役割

研究課題名(英文) Functional analysis of MDGA family proteins on neural circuit formation of cerebral cortex.

研究代表者

山本 融 (Yamamoto, Tohru)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10251480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：MDGAファミリータンパク質はMDGA1・MDGA2の2種類からなるイムノグロブリンスーパーファミリーに属するGPIアンカー型の細胞外タンパク質である。脳皮質形成期においてMDGA1は上層の一部に、またMDGA2はほぼすべての神経において発現が認められ、MDGA1は一部の神経の正常な放射状移動に必要であった。しかしながら最終的な皮質構築に顕著な異常はなく、その発現は終生続くことから、その後の神経回路網形成機構における役割の解析を進めた。その結果、ニューロリギンとの相互作用を介してシナプス形成バランスを維持しており、その機能低下は統合失調症・ASD様の行動異常を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mdga1 encodes a GPI-anchored IgSF protein, which we isolated as a gene expressed by a specific subset of neurons. In mouse corticogenesis, Mdga1 is selectively expressed by the upper layer neurons, while the other family member Mdga2 is widely expressed in a brain. We previously showed that Mdga1 is required for proper radial migration of a subset of upper-layer neurons; however, the resultant layer structure becomes apparently normal. We further investigated the function of MDGA family proteins in postnatal brain function since expression of Mdga1/2 persists throughout the life. It was shown that MDGA1/2 directly interact with Neuroligin family molecules to inhibit their binding to Neurexin, and we found that MDGA1 deficient mice showed more inhibitory synapses and MDGA2 +/- mice showed more excitatory synapses in their cortexes to exhibit behavioral abnormality related to schizophrenia or ASD, suggesting that MDGAs play an important role for maintaining proper E/I balance in a brain.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 統合失調症 MDGA1 MDGA2 Neuroligin シナプス形成 E/Iバランス

1. 研究開始当初の背景

我々の知の座である大脳新皮質は層・領野・カラムを基本構造として、140 億個もの神経細胞とその 10 倍ほどのグリア細胞により構築された精緻な組織である。この組織は定まった部位で生まれた神経細胞群が一定の経路を取って移動し、周辺の細胞群とコミュニケーションしながら位置取りをし、樹状突起・軸索を伸長させて標的の細胞とシナプスを形成することで構築されていく。ヒトでは誕生後青年期に至るまで一定のプログラムのもとで構築が進み、高度な認識・思考・推論能力を担う組織へと成熟する。この過程は経験依存的に修飾され得る柔軟性を有しているが、その柔軟性を保障しているメカニズムのバランスが、外的誘因と、これに対応すべき内部システムの乱れにより崩れてしまうことが、種々の精神神経疾患発症の一因と考えられている。

こうした精神神経疾患のひとつである統合失調症は成人の約 1% が発症するコモンディゼーズであり、妄想・幻覚・思考障害を主たる陽性症状とし、認知・実行機能の障害を引き起こす。わが国には約 20 万人の入院患者があり、若年期に好発することから、罹患者の人生の大半を蝕んでしまい、社会にとっても大きな負担を強いる疾病である。その克服は、超高齢化社会の到来による認知性疾患の急増への対処と並んで、社会の健全性を維持していく上において、重要な課題のひとつである。

統合失調症の発症メカニズムは不明であるが、家族集積性が高いことから、遺伝的要因と環境要因の複合により発症すると考えられている。遺伝的要因に関しては、一部に DISC1 などの遺伝子異常によって発症する家系の存在が認められるものの、大規模なメタ解析の結果からは、一般的には個々のゲノム変異の寄与は小さく、多数の関連遺伝子の集積により発症リスクが規定されていることが示唆されている。こうした関連遺伝子の中には、脳の形成・発達に関与するものが多く存在し、なかでも、興奮性・抑制性シナプスの形成制御に関わる因子の役割が注目されている。神経の興奮と抑制のバランスは、脳が正常に機能していく上で重要であることから、その破綻が統合失調症の病理の背景にある、と推測されるからである。

研究代表者は神経回路網の形成と維持の分子機構に関心を持ち、中枢神経系の発達過程で選択的に現れる新規因子群を探索・単離し、その解析を進めてきた(*Brain Res.* [2006] 1101 12; *EMBO J.* [2007] 26, 1475; *J. Biol. Chem.* [2009] 284, 36024; *J. Histochem. Cytochem.* [2011] 59, 202; *Dev. Dyn.* [2011] 240, 96; *PLoS One.* [2012] 7, e43058)。こうして単離した因子の一つ MDGA1 は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する GPI アンカー型の膜タンパク質であり(図 1)大脳新皮質の発生期において、II/III 層

を構成する神経群に選択的に発現される。これまでの研究代表者の解析から、MDGA1 は、未同定の因子と相互作用して機能していること、MDGA1 ノックアウトマウスの作製・解析から、MDGA1 の欠失により、大脳新皮質を構成する特定の興奮性神経群について、その放射状移動に遅れが生じることを明らかにしている。このように、大脳新皮質の形成機構において重要な役割を果たしている MDGA1 であるが、これまでに知られている脳形成に関与する因子群とは異なり、形成終了後も発現が持続している。このことより、研究代表者は、MDGA1 は大脳新皮質形成のみならず、その後の成熟・維持の過程にも関与しているものと推測していた。

こうした中、MDGA1 と統合失調症との関連を示す複数の報告があがり (*Am. J. Med. Genet.* [2008] 147, 1089; *Schizophr. Res.* [2011] 125, 194) MDGA1 はヒトにおいて統合失調症の病理に何らかの形で関わっていることが示唆された。先に述べたように、MDGA1 は未同定の因子と相互作用することにより機能しているが、研究協力者の解析から MDGA1 の相互作用因子の一つが Neuroligin-2 であることが見出され、その後の解析の結果、MDGA ファミリー分子群は Neuroligin ファミリー分子群と協働してシナプス形成を制御していることが示唆された。こうした新たな知見から、MDGA1 の機能不全によるシナプス形成の異常が、統合失調症発症の一因となっていることが考えられた。また、MDGA1 のファミリー分子である MDGA2 は、興味深いことに、自閉症との関連が示唆されており (*PLoS Genet.* [2009] 5, e1000536) さらに、Neuroligin-2 と結合してシナプス形成制御に関わる Neurexin-1/2 は統合失調症と自閉症スペクトラム障害 (ASD) の双方への関連が示唆されている (*Hum. Genet.* [2011] 130, 563)。こうしたことから、MDGA ファミリー分子群は Neuroligin-Neurexin 系により制御されているシナプス形成を、Neuroligin との結合を介して修飾しており、その異常が、これら精神神経疾患発症の一因となり得ることが推測された。そこで、新たに見出された MDGA ファミリー分子群の神経回路網形成機構における役割を探るとともに、これら精神神経疾患における MDGA ファミリー分子群の寄与を明らかにすることとした。

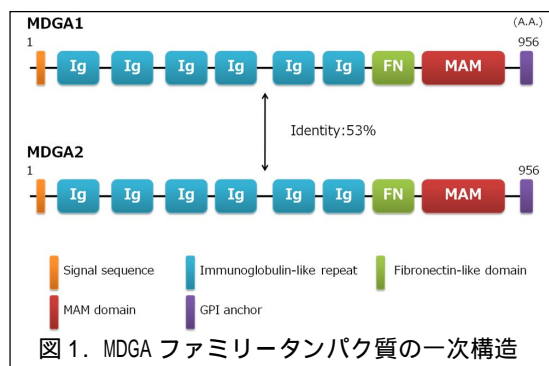


図 1. MDGA ファミリータンパク質の一次構造

## 2. 研究の目的

MDGA ファミリー分子群による、Neuroigin ファミリー分子群との結合を介したシナプス形成制御機構を解析するとともに、MDGA ファミリー分子群ノックアウトマウスの作製・解析から、その統合失調症・ASDへの関与を検証する。これにより、MDGA ファミリー分子群が脳皮質神経回路網の形成と制御にどのように関与しているのかを明らかにし、統合失調症・ASDといった精神神経疾患の克服に向けた一助となりうる知見の提供を期す。

## 3. 研究の方法

MDGA ファミリー分子群が Neuroigin ファミリー分子群の機能制御にどのように関与しているかを解析するとともに、すでに樹立していた MDGA1 欠失マウスを用いて、シナプス形成に変化が認められるか、認められた場合どのような変化かを、神経解剖学的・電気生理学的に検証する。さらに、MDGA1 欠失マウスの行動解析を行うことにより、こうした変化が脳の高次機能にどのような影響を及ぼすか明らかにする。MDGA ファミリー分子群の欠失が脳の高次機能にどのような影響を及ぼし得るか、統合失調症様の表現形が認められるかを検討する。また、MDGA2 欠失マウスを作製し、その解析を上記と同様に進める。

## 4. 研究成果

*in vitro* での結合実験・初代培養細胞を用いた実験などにより MDGA ファミリー分子群は Neuroigin ファミリー分子群と会合することで Neuroigin-Neurexin 相互作用を負に制御すること、そして、これにより、シナプスの過剰形成を抑制する「バッファー」のような役割を果たしていることが推測された(図2)。興味深いことに MDGA1 は抑制性シナプス形成に中心的な役割を果たしている Neuroigin-2 とは会合するが Neuroigin-1 とは相互作用が認められず、このことから、MDGA1 は抑制性シナプスの過剰形成を選択的に抑制していることが推測

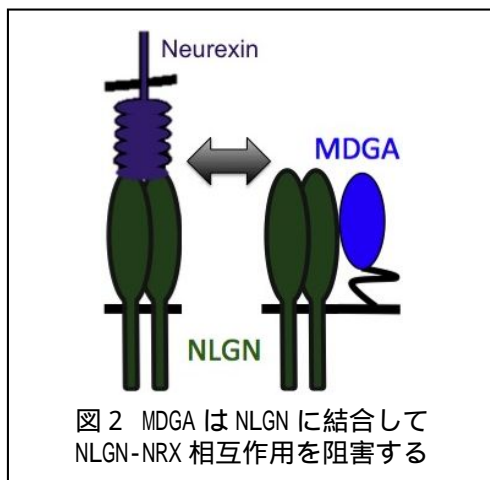


図2 MDGAはNLGNに結合してNLGN-NRX相互作用を阻害する

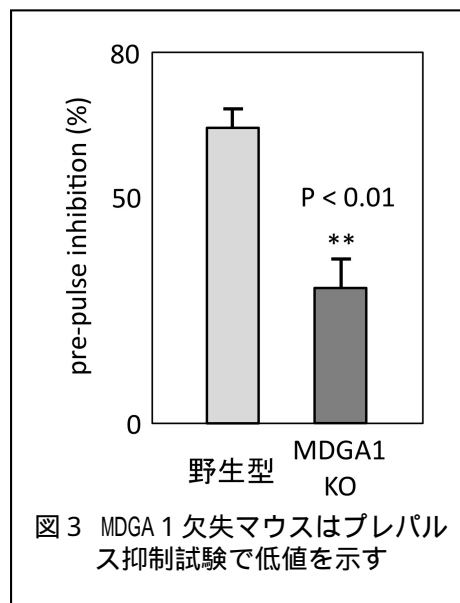


図3 MDGA1 欠失マウスはプレパルス抑制試験で低値を示す

された。そこで、MDGA1 欠失マウスにおける興奮性シナプス・抑制性シナプス数を解析したところ、興奮性シナプス数に変化はないが、抑制性シナプス数が有意に増加していること、さらに、電気生理学的解析から抑制性入力が増進していることが、研究協力者の解析により確認された。これらの解析により、MDGA1 は抑制性シナプス選択的に、その形成制御に関与していることが示唆された。ついで、MDGA1 の欠失によりもたらされた抑制性シナプス形成の過剰が、脳の高次機能にどのような影響を及ぼしているかを明らかにするために、MDGA1 欠失マウスを用いた行動解析をおこなった。基本的な運動・知覚能力に差はないことを確認した後、感覚運動情報制御機能の指標であり、統合失調症患者でその低値が広く認められるプレパルス抑制 (PPI) 試験をおこなったところ、大変興味深いことに、その低値が確認された(図3)。このことは、ヒトのゲノム解析から示唆された MDGA1 と統合失調症との連関が動物実験レベルで、その一部ではあるが、認められたことを意味する。統合失調症で認められる認知・情動機能の障害や、オンレーションについての解析を今後加えていくことにより、MDGA1 の機能低下と統合失調症との連関を検証し、多様な要因で引き起こされる統合失調症の病理の一端を明らかにしていけるものと期待される。

残るファミリー分子である MDGA2 の欠失マウスを作製し、そのバッククロスを進めたところ、ホモ接合体は生後致死となったため、ヘテロ欠失体を用いて解析をおこなうこととした。その結果、驚いたことに MDGA2 ヘテロ欠失マウスにおいては、MDGA1 欠失マウスとは正反対に、抑制性シナプス数に変化はないが、興奮性シナプス数が増加していること、さらに、電気生理学的解析から興奮性入力が増進していることが、研究協力者の解析により明らかとなった。こうした興奮性シナプス形成過剰が脳の高次機能に

及ぼす影響を調べるために、MDGA2 ヘテロ欠失マウスの行動解析をおこなった。基本的な運動・知覚能力に差はないことを確認した後、認知機能・社会性行動などを解析したところ、大変興味深いことに、ヒトにおいてMDGA2 との連鎖が報告された ASD 様の異常が認められることが明らかとなった（図 4）。これらのことから、MDGA2 の減少は興奮性入力の過多を引き起こして脳の高次機能を傷害し、ASD 様の行動異常をもたらすことが示唆された。

これらの研究結果から、MDGA ファミリー分子群は Neuroligin ファミリー分子群との相互作用を介して神経回路網の興奮性・抑制性シナプス形成とその結果である興奮性・抑制性入力のバランス（E/I バランス）の適切な維持に深く関与していること、そして、その減少は E/I バランスのどちらか一方への偏りを招いて統合失調症・ASD といった精神神経疾患発症の要因となり得ることが明らかとなった。特に、MDGA2 に関しては、その生理的にも起こりうるレベルのタンパク質量の減少により、E/I バランスの興奮側へのシフトと顕著な行動異常がもたらされることが示された。このことから、MDGA ファミリー分子群と Neuroligin ファミリー分子群との相互作用を薬剤等により人為的に制御することにより、E/I バランスを任意に制御し、その異常に起因する認知・情動・行動異常を修正し得ることが想定される。さらに研究を進めていくことにより、MDGA ファミリー分子群の、統合失調症・ASD といった精神神経疾患の新規治療薬開発のターゲットとしての有用性を明らかにし、これら難治性精神神経疾患の治療薬開発につなげていくことが期待される。

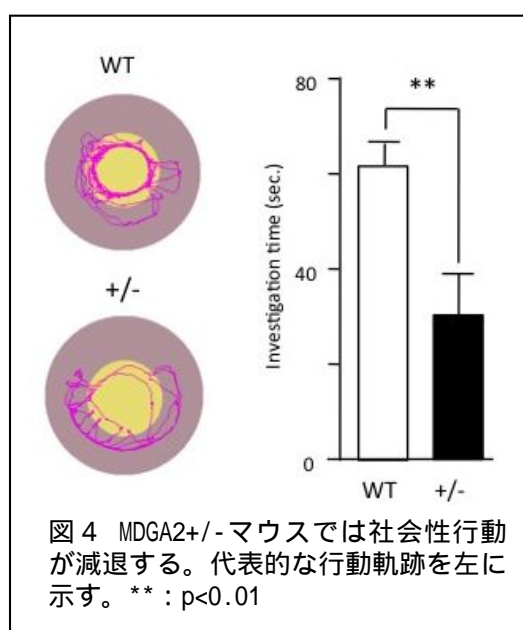


図 4 MDGA2<sup>+/-</sup> マウスでは社会性行動が減退する。代表的な行動軌跡を左に示す。 \*\* : p<0.01

## 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

- 1 . Nakamura-Maruyama E, Miyamoto O, Okabe N, Himi N, Feng L, Narita K, Keep RF, Yamamoto T, Nakamura T. Ryanodine receptors contribute to the induction of ischemic tolerance. *Brain Res. Bull.* 査読有 122, 2016, 45-53.  
doi:10.1016/j.brainresbull.2016.02.018.
- 2 . Takei N, Sobu Y, Kimura A, Urano S, Piao Y, Araki Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Nakaya T, Suzuki T. Cytoplasmic fragment of Alcadein  $\alpha$  generated by regulated intramembrane proteolysis enhances amyloid  $\beta$ -protein precursor (APP) transport into the late secretory pathway and facilitates APP cleavage. *J. Biol. Chem.* 査読有 290, 2015, 987-995.  
doi: 10.1074/jbc.M114.599852.
- 3 . Chiba K, Araseki M, Nozawa K, Furukori K, Araki Y, Matsushima T, Nakaya T, Hata S, Saito Y, Uchida S, Okada Y, Nairn AC, Davis RJ, Yamamoto T, Kinjo M, Taru H, Suzuki T. Quantitative analysis of APP axonal transport in neurons: role of JIP1 in enhanced APP anterograde transport. *Mol. Biol. Cell* 査読有 25, 2014, 3569-3580.  
doi: 10.1091/mbc.E14-06-1111.
- 4 . Omori C, Kaneko M, Nakajima E, Akatsu H, Waragai M, Maeda M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Nakaya T, Taru H, Yamamoto T, Asada T, Hata S, Suzuki T. Increased levels of plasma p3-Alca35, a major fragment of Alcadein  $\alpha$  by  $\gamma$ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 査読有 39, 2014, 861-870.  
doi: 10.3233/JAD-131610.
- 5 . Liu Y, Nakamura T, Toyoshima T, Lu F, Sumitani K, Shinomiya A, Keep RF, Yamamoto T, Tamiya T, Itano T. Ameliorative effects of yokukansan on behavioral deficits in a gerbil model of global cerebral ischemia. *Brain Res.* 査読有 1543, 2014, 300-307.  
doi:10.1016/j.brainres.2013.11.015.
- 6 . Piao Y, Kimura A, Urano S, Saito Y, Taru H, Yamamoto T, Hata S, Suzuki T. Mechanism of Intracellular Cleavage of Alcadeins by  $\gamma$ -Secretases. *PLoS One* 査読有 8, 2013, e62431.  
doi: 10.1371/journal.pone.0062431.

〔学会発表〕(計7件)

1. Connor S , Haploinsufficiency of the neuronal surface protein MDGA2 enhances excitatory synapse development, alters cortical circuit dynamics and yields behavioral phenotypes consistent with autism in mice. Society for Neuroscience annual meeting, Nov.12-16 2016, San Diego Convention Center, San Diego, USA.
2. 尾嶋大喜 , 大脳新皮質形成時における放射状細胞移動の細胞種による多様性, 第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1日-4日, 神戸国際会議場, 兵庫県・神戸市.
3. 山本融 , アルカデインはX11Lと協働して内在性APPのアミロイド産生的代謝を抑制する, 第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月1日-4日, 神戸国際会議場, 兵庫県・神戸市.
4. 加藤優実 , JIP1を介したAPP軸索順行輸送の制御機構解析, 第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月1日-4日, 神戸国際会議場, 兵庫県・神戸市.
5. Connor S , Absence of MDGA1 Enhances Inhibitory Drive and Confers Resistance to Increased Excitation in Mouse Hippocampus. 9th Annual Canadian Neuroscience Meeting, May 24-27, 2015, Westin Bayshore, Vancouver, Canada.
6. Liu A , Ameliorative effects of Yokukansan on behavioral deficits following transient forebrain ischemia in gerbils. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日-13日, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市.
7. 山本融 , アルカデインはキネシンモーターを駆動するカーゴであり、その構成的限定分解はキネシンモーターの細胞内分布維持に必要である, 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日-13日, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 融 (YAMAMOTO TOHRU)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：10251480

### (2)研究協力者

Ann Marie Craig  
The University of British Columbia  
Neurobiology Research Centre  
Professor & Canada Research Chair