

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06490

研究課題名(和文) GABAA受容体新規結合因子GARLHを介した抑制性シナプスの新しい制御機構

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms to regulate inhibitory synapse functions through GABAA Receptor Regulatory Lhfp1 (GARLH)

研究代表者

山崎 世和 (Yamasaki, Tokiwa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60581402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者が世界で初めて発見したGABAA受容体新規結合因子GARLHに焦点を当て、抑制性シナプスを制御する新たな分子機構を明らかにすることを目的として研究を遂行した。その結果、GARLHが、抑制性接着因子NL2だけでなく、興奮性接着因子NL1とも結合し、NL1を抑制性シナプスへ局在化することを明らかにした。加えて、GARLHと結合することが明らかになったNL1について、HAノックインマウスを用いたプロテオーム解析を行い、NL1の結合分子を網羅的に同定した。また、近接依存性ビオチン化標識酵素とGARLHの融合タンパク質をマウスの脳に発現させ、未知の結合因子を探索する系を立ち上げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳が正常に機能するためには興奮性と抑制性のバランスが重要であり、このバランス破綻が様々な精神疾患の原因となることが近年になって明らかにされてきた。また精神疾患の原因として、シナプス接着因子NLの変異が複数報告されている。本研究では、抑制性シナプス制御因子GARLHが、興奮性のNL1に結合し、これを抑制性シナプスに局在化させることを明らかにした。これはGARLHがNLを介して興奮性・抑制性のバランスを制御する可能性を示し、精神疾患の発症に深く関わることを示唆している。よって本研究成果は、近年社会問題となっている精神疾患の発症機序解明に繋がらうという点で、学術的・社会的に意義のあるものと言える。

研究成果の概要(英文)：Previously we identified GARLH as a novel GABAA receptor binding protein. In this study, we investigated the molecular mechanisms which regulate inhibitory synapses through GARLH. We found that GARLH binds not only inhibitory adhesion NL2, but also excitatory adhesion NL1, and that GARLH localizes NL1 from excitatory to inhibitory synapses. Additionally, we performed proteome analysis of NL1 using HA-NL1 knock-in mice and revealed NL1-interacting proteins. We also designed fusion proteins of GARLH and proximity labeling enzyme, TurboID, and expressed in mouse brain. We are now investigating to identify novel GARLH binding proteins using this GARLH-TurboID system.

研究分野：神経シナプス科学

キーワード：抑制性シナプス GABAA受容体 GARLH

1. 研究開始当初の背景

脳機能を司る神経細胞はシナプスを介して互いに結合し、細胞間の情報伝達を行なっている。シナプスでは、シナプス前部とシナプス後部の細胞膜が隣接して存在し、シナプス前部から放出された神経伝達物質はシナプス後部に局在した受容体により受け取られる。シナプスには興奮性(グルタミン酸)と抑制性(GABA)が存在し、興奮と抑制がバランスを取ることで正常な脳機能が維持されている。自閉スペクトラム症や統合失調症など多くの発達障害や精神疾患では興奮と抑制のバランスの破綻が見られることが近年明らかとなってきた。しかし、興奮性シナプスでの知見に比べ、抑制性シナプスが形成・維持あるいは改変される分子機構については未解明な点が多い。

脳における抑制性シナプス後部には、GABAA 受容体が特異的に集積する。これまでに Gephyrin と呼ばれるタンパク質がシナプス後部で格子状に重合し GABAA 受容体の足場となり集積を制御するモデルが提唱されてきた。しかし Gephyrin を欠損してもシナプス後部の GABAA 受容体はごく一部しか減少しない。また一方で、シナプス接着分子 Neuroligin-2 (NL2) は特異的に抑制性シナプス後部に局在し、NL2 の欠損により GABAA 受容体の局在や抑制性シナプス伝達が低下する。しかし NL2 がどのように GABAA 受容体をシナプス後部に動員するのかが分かっていない。

申請者は先行研究において、脳内の GABAA 受容体複合体を生化学的に精製し、GABAA 受容体の新規結合因子 GARLH を同定した。さらに申請者は、GARLH が GABAA 受容体と同時に、抑制性シナプスに特異的なシナプス接着分子 NL2 とも結合し、GABAAR/GARLH/NL2 の三者複合体を形成することを明らかにするとともに、GARLH が GABAA 受容体のシナプス局在と抑制性シナプス伝達に必須であることを明らかにした。

NL2 の属するシナプス接着分子 Neuroligin (NL) ファミリーは、他に NL1, NL3, NL4 のアイソフォームを持つ。これらはシナプス接着分子 Neurexin (Nrxn) の結合因子として同定された分子で、ポストシナプスに局在する。NL は Nrxn と互いの細胞外領域でシナプスの前部と後部を架橋するように結合し、シナプスの形成や維持、機能的な成熟を制御していると言われている。また自閉症などの精神疾患に関連した変異が報告されており、変異を導入したマウスが行動異常を示すことから、精神疾患の発症メカニズムへの関与が注目されていた。

申請者の先行研究で GABAA 受容体が GARLH を介して NL2 と複合体を形成し、GABAA 受容体を抑制性シナプスに局在化することで抑制性シナプス伝達が制御されることが明らかとなった。しかし GARLH によって形成される GABAA 受容体-GARLH-NL2 の三者複合体の生理的意義については未だ不明な点が残されていた。さらに GARLH が、NL2 のファミリー分子である他の NL1 や NL3 などとも三者複合体を形成するのか、また GABAA 受容体と類似の受容体である Glycine 受容体や GABAC 受容体などとも結合するのか、など、GARLH の普遍性についても明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、GABAA 受容体-GARLH-NL2 の三者複合体による抑制性シナプス制御メカニズムについて次の3つの学術的問いを明らかにすることを目的に遂行した。

(1) GABAA 受容体-GARLH-NL2 三者複合体形成の生理的意義は何か？

GABAA 受容体の抑制性シナプスへの局在化に GARLH と NL2 がそれぞれ必須であるが、それぞれの分子の関連性は不明である。三者複合体の形成は、GABAA 受容体のシナプス局在化に必須なのか？

(2) GARLH による抑制性シナプス制御メカニズムは普遍的か？

GARLH は NL2 のファミリー分子である NL1, NL3, NL4 とも結合し三者複合体を形成するのか？ また GARLH は GABAA 受容体と同じ Cys-loop 型の受容体である Glycine 受容体や GABAC 受容体とも結合し、その局在を制御するのか？

(3) どのように三者複合体は抑制性シナプスに局在するのか？

GABAA 受容体-GARLH-NL2 三者複合体はどのようにして抑制性シナプス前部に対峙するシナプス後部に局在化するのか？ この三者複合体はシナプス前部分子によってどのように制御されるのか？

3. 研究の方法

(1) GABAA 受容体-GARLH-NL2 の三者複合体形成の生理的意義の解明

三者複合体の生理的意義を検討するため、まず GARLH が GABAA 受容体、または NL2 と結合するドメインを決定し、その領域に変異を入れることで三者複合体を形成しない GARLH を作成、神経細胞においてこの GARLH がどのように挙動するのか検討する計画を立てた。

GARLH における GABAA 受容体/NL2 結合ドメインの決定

結合ドメインを決定するため、GARLH の属する Lhfp1 ファミリー分子で GABAA 受容体・NL2 と結合しないことが明らかとなっている Lhfp12 に着目し、GARLH と Lhfp12 の swapping mutants を作成した。これらを用いて in vitro 発現系による三者複合体の再構成実験を行い、GABAA 受

容体、NL2 との結合を評価した。

(2) GARLH による抑制性シナプス制御メカニズムの普遍性解明

NL ファミリー分子における GARLH の普遍性解明

GARLH が NL2 以外の NL ファミリー分子である NL1, NL3, NL4 と結合し三者複合体を形成するのか、脳からの免疫沈降法による内在分子の相互作用解析と、*in vitro* 発現系を用いた三者複合体の再構成実験によって解析した

免疫沈降では、GABAA 受容体の $\alpha 1$ subunit を特異的に認識する抗体を用い、内在の GABAA 受容体のタンパク質複合体

GARLH 結合による NL1 局在の解明

先の実験で GARLH が興奮性特異的とこれまで報告されていた NL1 を含むすべての NL と結合することが確認された。この時、抑制性シナプス特異的な GARLH の結合によって興奮性の NL1 は興奮/抑制、どちらのシナプスに局在するのか、まったく不明であった。よってこの点を検討するために、HA-NL1 を発現させた神経細胞へ GARLH を過剰発現、または NL1 と融合した形で発現させることで、HA-NL1 の局在が変化するか、免疫染色によって検討した。

プロテオーム解析による NL1 結合因子の網羅的解析

先の実験で GARLH の結合で NL1 が興奮性/抑制性の両シナプスに局在することができることが明らかとなったが、NL1 が他にどのような分子と相互作用しているのかはよく分かっていない。これは、内在の NL1 を特異的・効率的に免疫沈降可能な抗体が入手困難であることがその原因の一つである。申請者はユニークな局在特性を持つ NL1 の結合因子を探索する目的で、入手可能な NL1 抗体の免疫沈降による NL1 の精製を試みて、免疫沈降に使用できる抗体の探索を行った。また一方で、所属する研究室で独自に作出された、内在 NL1 に HA タグを導入した knock-in マウスから HA 抗体を用いて内在 NL1 を精製し、その結合因子を網羅的に同定した。

他の神経伝達物質受容体における GARLH の普遍性解明と新規 GARLH 結合因子の探索

GARLH は GABAA 受容体と結合する新規制御因子としてごく最近研究代表者によって同定され、GABAA 受容体・NL2 と強く結合することが明らかとなっているが、その他にどのような分子と結合するのかは不明である。一方で GABA 受容体は 5 量体を形成する Cys ループ型受容体のスーパーファミリーに所属し、類似の受容体として Glycine 受容体や GABAC 受容体、nACh 受容体など、複数の受容体が存在する。よって、これらの受容体と GARLH が結合するのか、また他に GARLH の結合因子が存在するのかを検討するため、近接依存性ビオチン化酵素 TurboID を GARLH と融合したタンパク質を設計、作成した。これを血液脳関門透過型のアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いてマウスの神経系に広く発現させ、Biotin 化されるタンパク質を同定する系の立ち上げを行なった。

4. 研究成果

(1) GABAA 受容体-GARLH-NL2 の三者複合体形成の生理的意義の解明

GARLH における GABAA 受容体/NL2 結合ドメインの決定

GARLH と Lhfp12 の swapping mutants を複数作成し、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系に導入したところ、どの分子もそもそも発現を確認することができず、GABAA 受容体/NL2 との結合を検討することができなかった。

(2) GARLH による抑制性シナプス制御メカニズムの普遍性解明

NL ファミリー分子における GARLH の普遍性解明

アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた GABAA 受容体複合体の再構成系において、NL2 だけでなく NL1, 3, 4 が、GABAA 受容体・NL2 と結合し三者複合体を形成することを明らかにした。さらに内在の GABAA 受容体複合体を免疫沈降し、NL1, NL3 の特異的な抗体で Western blot したところ、NL2 と比べて効率は落ちるものの、内在レベルの NL1, NL3 が GABAA 受容体と共沈降されることが明らかとなった。これらの結果から、脳においても GARLH は、GABAA 受容体と NL1/NL3 からなる三者複合体を形成していることが示された。

GARLH 結合に NL1 局在の解明

抑制性シナプス性の GARLH が興奮性シナプス性の NL1 に結合することで NL1 のシナプス局在がどのように変化するのか、神経初代培養における免疫染色法で検討した。内在レベルの NL1 を特異的に染色できる抗体が入手できないため、局在解析のために HA タグを付与した NL1 をアデノ随伴ウイルス (AAV) によって海馬神経初代培養細胞に発現させ、HA 抗体による染色を行なったところ、HA-NL1 単独では興奮性シナプスにドミナントに局在するのに対し、GARLH をこようジュゲートしたものは抑制性シナプスに局在化することが明らかとなった。これらの結果により、抑

制性シナプス性の GARLH は GABAA 受容体や NL2 だけでなく、興奮性シナプスの分子である NL1 も抑制的なプスヘリクルートする能力があることが示された。

プロテオーム解析による NL1 結合因子の網羅的解析

本研究によって、GARLH の結合に依存して興奮性シナプスと抑制性シナプスの両方に局在するというユニークな特性を示す NL1 について、その結合因子を探索するために、市販抗体・共同研究先から提供された抗体を含む 5 種類の抗 NL1 抗体について、免疫沈降における有効性を検討した。その結果、特異的に NL1 を免疫沈降することができる抗体が 2 種類同定されたが、免疫沈降の効率が十分ではなく、精製・プロテオーム解析に使用することを断念した。

一方で、研究代表者の所属する研究室ではこれまで、NL1 の局在を詳細に解析するため、NL1 に HA を導入した knock-in マウスを作出していた。よってこの HA-NL1 ノックインマウスから抗 HA 抗体を用いて内在性 NL1 の形成するタンパク質複合体を精製した。この方法では内在性の HA-NL1 を効率よく、ほぼ全て免疫沈降・精製できていることが確認できたため、精製産物を質量分析によって解析し、NL1 と共沈降される分子を網羅的に同定した。

他の神経伝達物質受容体における GARLH の普遍性解明と新規 GARLH 結合因子の探索

GARLH の C 末に Flexible linker (3xGGS リンカー) を挟んで近接依存性ビオチン化酵素 TurboID を融合した GARLH-TurboID 人工遺伝子を作成し、これを AAV のベクターに導入した。さらに内在性の GARLH を効率的に GARLH-TurboID に置き換えるため、同じベクターに GARLH を Knockdown する shRNA を挿入、GARLH-TurboID にはこの shRNA の抵抗性変異を導入した。また、感染細胞を可視化するために GARLH-TurboID の C 末にはさらに P2A 配列を挟んで mVenus を導入した。この AAV ベクターを用いて血液脳関門透過性の AAV (PHP.eB 型) を作成し、マウスの眼窩静脈から投与した。その結果、期待通り脳全体に mVenus の蛍光が確認され、GARLH-TurboID が脳全体の神経細胞に発現していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamasaki, T.
2. 発表標題 Regulation of synaptic adhesion molecules by GABAA receptor-binding molecule GARLH4
3. 学会等名 第18会 生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamasaki, T.
2. 発表標題 Non-membranous organelles underlying learning and memory
3. 学会等名 2nd Japanese-American-German Frontiers of Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------