

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06568

研究課題名(和文) シナプス膜タンパク質ELFNによる代謝型グルタミン酸受容体の局在と機能の制御機構

研究課題名(英文) Mechanisms of localisation and function of metabotropic glutamate receptors regulated by the synaptic membrane protein ELFN

研究代表者

松永 隼人 (MATSUNAGA, Hayato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：20437833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経膜タンパク質Elfnによる7回膜貫通型受容体である代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の制御機構を明らかにすることを目的とした。Elfn1と2は、それぞれ特異的なmGluRの局在を制御し、グルタミン酸神経の機能を調節すると考えられる。てんかんやADHD患者ではElfn1のミスセンス変異が認められており、ミスセンス変異によりElfn1の膜動態(再利用・分解)が異常になることが明らかとなった。Elfn1、2のKOマウスは、いずれもADHD様の異常を示す。Elfn2 KOマウスは、恐怖条件づけ学習試験で低い成績を示し、mGluR標的薬の応答性が野生型と異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数のゲノムワイド関連解析、家系解析、ミスセンス変異探索解析から、ロイシンリッチリピート型膜タンパク質は神経発達障害の遺伝的リスク要因となることが示されており、膜タンパク質群の機能変化に伴う神経回路網形成やシナプス成熟の不全が病態の中核の1つであると想定される。Elfnにより制御されるグルタミン酸神経系の調節異常とADHD様行動発症の機構を解明することは病態の理解につながるるとともに、これまでの脳のドーパミン量を増加させるADHD治療薬に加え、mGluRを標的とした新規治療薬の開発の有用な情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the neuronal interrelationship between the Elfn of leucine-rich repeat transmembrane protein and the metabotropic glutamate receptor (mGluR) of class C GPCR. Elfn1 and 2 each interacts with specific mGluR. Elfn1 missense mutations found in patients with epilepsy and ADHD are in close proximity to multiple tyrosine phosphorylation sites. These phosphorylation sites are the target of two receptor tyrosine kinases, which induce Elfn1 internalization. Various missense and phosphorylation site mutants show different endosome localization compared to wild-type Elfn1 and may be involved in determining the fate of Elfn1 for recycling to the plasma membrane or degradation. In the fear-conditioned memory and learning test, Elfn2 KO mice showed lower memory acquisition compared to the wild type. mGluR positive allosteric modulator administrated Elfn2 KO mice showed reduced recall of fear learning, whereas there was no significant effect in wild-type mice.

研究分野：機能生物化学

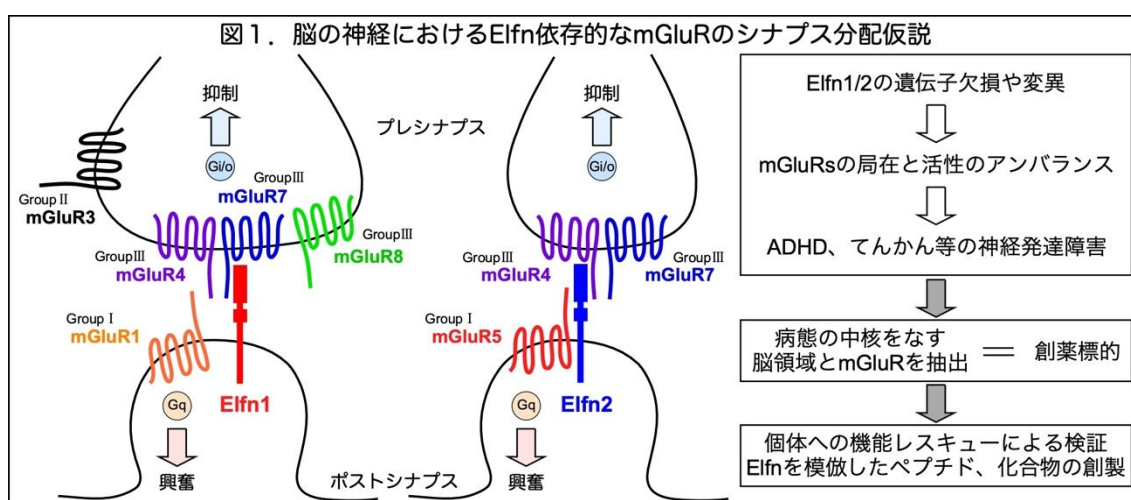
キーワード：シナプス 膜タンパク質 GPCR 代謝型グルタミン酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 「なぜ、シナプス構築には多くの細胞接着分子が必要なのか？」シナプスの構築は2段階からなり、細胞間コンタクトの形成とそれに続くシナプス前・後部へのマシナリー動員による興奮・抑制といった機能的成熟である。ロイシンリッチリピート型膜タンパク質 (LRR-TM) は、主に神経のシナプスの後膜に存在し、自身が存在する後膜のみならずトランス結合を介した前膜のシナプス膜タンパク質の動態制御にも関わっており、シナプス形成・機能維持に必要な両方向性の制御を担う膜タンパク質として位置づけられる。シナプスの構築・再編は、神経回路の形成や記憶学習の重要なステップであり、その調節機構の破綻は神経発達障害の発症と関連することが示唆されている。シナプス膜タンパク質とそれにより制御される神経細胞のタイプ、神経系、脳領域、関連する認知機能と病態といった包括的な解析が望まれている。
- (2) ヒト遺伝学解析から、*ELFN1* はてんかんや ADHD に関連しており、*GRM1-8* (mGluR1-8) は、神経発達障害、不安障害、気分障害、統合失調症に関連することが知られている。mGluRs は有望な創薬標的として認知されており、いくつかの臨床研究が進行している。近年、*Elfn1* と mGluR の機能的なつながりに関する報告が相次いでいる。研究代表者の所属研究室では、*Elfn1* と mGluR7 のトランスシナプス結合と *Elfn1* KO マウスのスパインにおける mGluR1 の減少を報告した (Tomioka et al., *Nat Commun* 2014)。また、夜盲症の原因遺伝子 mGluR6 が網膜において *Elfn1* とトランスシナプス結合することが示された (Cao et al., *Neuron* 2015)。
- (3) 本研究は、LRR-TM である *Elfn* family (2種類) と7回膜貫通型受容体 (GPCR) の Class C に分類される mGluR family (8種類) の神経細胞での相互関係を明らかにし、*Elfn* は、シナプスにおける mGluR 存在量とプレ/ポストシナプス両方向性の受容体活性を制御するパラランサーであるとの仮説の検証を行った。

## 2. 研究の目的

研究代表者らによる *Elfn1* と *Elfn2* について系統的な解析により、ポストシナプスに存在する *Elfn* が mGluR1, 5 (Group I: 主に  $G_{q/11}$  シグナル) とシス結合をし、mGluR2, 3 (Group II:  $G_{i/o}$  シグナル) 並びに mGluR4, 6, 7, 8 (Group III:  $G_{i/o}$  シグナル) とトランス結合する可能性を見いだした (未発表)。これらの結果から、「*Elfn*s は mGluRs の局在を総合的に制御するのではないか」 (図1) と考えられた。そこで、本研究は、両者の関係性を分子レベル、個体レベルで検討して、*Elfn*s-mGluRs 結合の生理的意義、病態生理学的意義を明らかにすることを目的とした。



## 3. 研究の方法

- (1) *Elfn*s と mGluRs との相互作用: 組み換えタンパク質による Pull-Down assay と生体脳膜分画を用いた免疫沈降法、並びに細胞レベルの再構成実験により、*Elfn1* と *Elfn2* 間における相互作用 mGluR 間における相互作用 mGluR 種の相同・相違点を明らかとした。*Elfn*s と mGluRs の組み換えタンパク質はそれぞれの細胞外ドメインに Fc タンパク質と His タグの融合タンパク質として HEK293T 細胞に発現させ、Pull-Down assay を行った。免疫沈降法は、

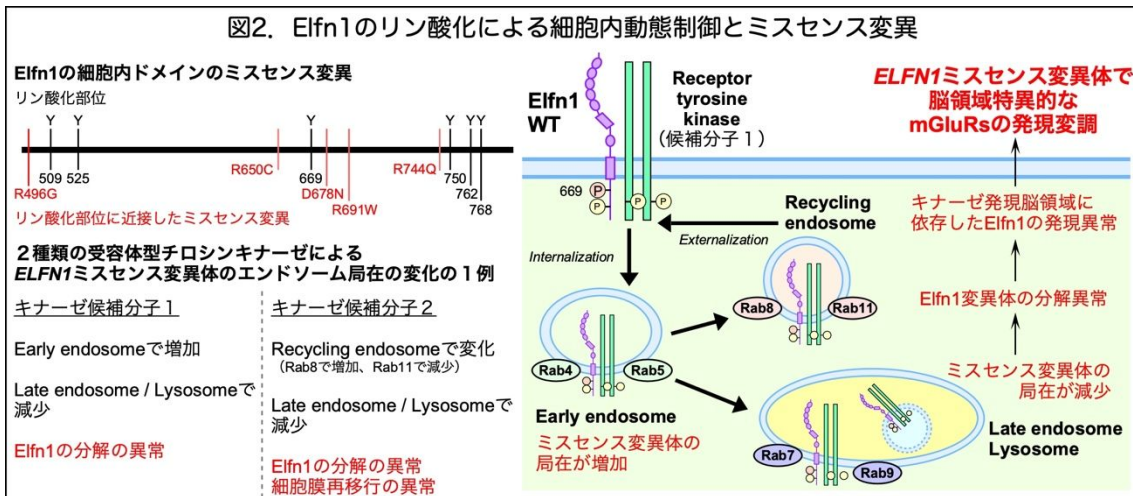
超遠心法により調整したマウス脳シナプス膜画分を材料に行った。ラット海馬初代培養神経細胞のシナプス誘導解析により、Elfn1 と Elfn2 がそれぞれ誘導する mGluR の同定を行った。

- (2) Elfn2 欠損による mGluRs の発現と局在：野生型と Elfn2 KO マウスの脳海馬より、膜画分(小胞体、ゴルジ体、輸送小胞、シナプス膜、プレシナプスの膜小胞)を超遠心法にて分画し、Elfn2 欠損による mGluRs の発現・局在解析を行った。
- (3) Elfn1 ミスセンス変異による mGluRs の発現異常：てんかんや ADHD 患者で認められた Elfn1 のミスセンス変異(R650C)のノックインマウスの脳部位における Elfn1 と mGluR7 の発現量の解析を行った。脳部位は、嗅球、皮質、海馬、線条体、扁桃体、視床、視床下部、中脳、小脳、橋、延髄、脊髄。雌雄それぞれについて、野生型(WT/WT)、ヘテロ変異体(R650C/WT)、ホモ変異体(R650C/R650C)の比較を行った。
- (4) Elfn1 ミスセンス変異による Elfn1 のリン酸化と膜動態変化：Elfn は細胞内ドメインにリン酸化部位を複数有しており、それらの近傍に ADHD やてんかんで認められたミスセンス変異がある。Elfn1 をリン酸化する受容体型チロシンキナーゼ(RTK) 2種類を同定済みである。COS-7 細胞にそれぞれのキナーゼと種々の Elfn1 ミスセンス変異体(R496G, R650C, D678N, R691W, R744Q)の共発現によりミスセンス変異体のエンドソーム局在(Rab GTPase を指標に early, late, Recycling を区別)が変化するか解析した。
- (5) オペラント行動実験による ADHD 様行動の解析：Elfn1、Elfn2 の KO マウスは、いずれも ADHD 様の異常を示しており、mGluR 制御の破綻によるグルタミン酸神経系の調節異常が、ADHD 様症状発症の原因の1つであると仮説をたてている。本研究では、ADHD 様症状である多動(衝動性)、注意力の欠如、ワーキングメモリー障害、恐怖処理の異常のうち、Elfn2 KO マウスのワーキングメモリー障害と恐怖処理の異常が mGluR の選択的ポジティブアロステリックモジュレーター(PAM)によって影響されるか検討した。試験法は、電気刺激(負の強化子)による恐怖条件づけ Fear conditioning 記憶・学習試験を用いた。1日目に恐怖条件づけを行い、2日目に音刺激による想起試験と PAM 投与、音刺激誘発恐怖記憶の消去を行った。3日目に再度、音刺激による恐怖想起試験を行い、mGluR の PAM の効果について検討した。

#### 4. 研究成果

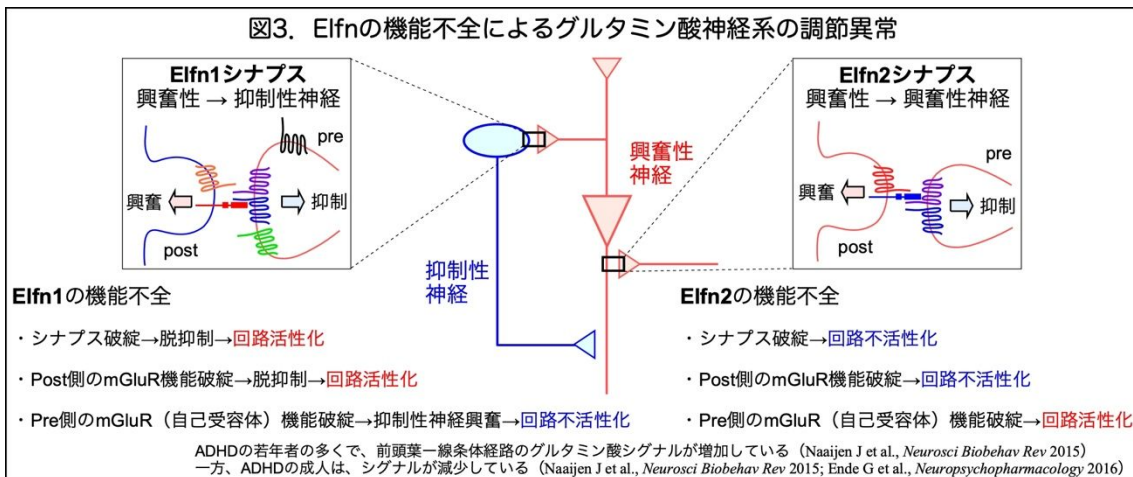
- (1) Elfn1 と mGluRs との相互作用：*in vitro* 解析として、組み換えタンパク質を用いた Pull-Down assay、生体試料を材料とする免疫沈降法を行い、細胞レベル解析として、海馬初代培養神経細胞のシナプス誘導解析を行った。これらの結果より、図1の Elfn 依存的な mGluR のシナプス分配仮説を構築した。現在、これらの分配が、脳領域や興奮神経、抑制性神経といった神経細胞腫に依存した Elfn と mGluR の発現量の違いによって、より細やかに制御されていると予想している。
- (2) Elfn2 欠損による mGluRs の発現と局在：Elfn2 の欠損により、複数の mGluR の発現量が有意に減少していた。また、特徴的であったのは、プレシナプスの膜小胞で Elfn1 と mGluR の発現量が有意に増加したことである。このことは、Elfn2 の欠損によるシナプスの構築異常と、Elfn1 によって局在誘導される mGluR が正しいシナプス膜局在をしていないことを意味している。
- (3) Elfn1 ミスセンス変異による mGluRs の発現異常：Elfn1 R650C 変異による Elfn1 と mGluR7 の発現変調は、脳領域特異的であり、さらには性差があることが明らかとなった。統計学的に有意な変化を示した海馬、線条体、扁桃体、中脳、橋について着目し、てんかん、ADHD の病態像と Elfn1 R650C ノックインマウスの表現型解析との繋がりを解析する予定である。
- (4) Elfn1 ミスセンス変異による Elfn1 のリン酸化と膜動態変化：Elfn1 ミスセンス変異体のエンドソーム局在解析から、細胞内に移行した Elfn1 の再利用・分解といった運命が、Elfn1 のリン酸化状態によって制御されていることが予想された(図2)。変異体の結果の一例を挙げると、RTK 候補分子1による Elfn1 のリン酸化状態が変化するとエンドサイトーシス以降、特に Lysosome での分解異常が示唆され、RTK 候補分子2では、リサイクリング異常と Lysosome での分解異常が示唆された。これらの結果は、脳領域ごとに発現バランスが異なる2種の RTK が Elfn1 のシナプス膜量を制御していることを意味している。また、この制御が、Elfn1 R650C 変異ノックインマウスで観察された脳領域特異的な Elfn1 と mGluR7 の発現変調を説明できる分子機構だと想定している。

図2. Eln1のリン酸化による細胞内動態制御とミスセンス変異



(5) オペラント行動実験による ADHD 様行動の解析: Fear conditioning 記憶・学習試験において、Eln2 KO マウスは野生型と比較して、1 日目の恐怖条件づけから低い成績を示した。2 日目の音依存試験でも Eln2 KO マウスは音に反応した無動時間の減少がみられた。mGluR の選択的 PAM を投与後に、音刺激文脈の恐怖記憶の消去を行った。消去の間、常に Eln2 KO マウスは低い反応性を示した。3 日目の音刺激による恐怖試験では、野生型、Eln2 KO マウスともに記憶の消去が観察され、野生型と KO 間に差は認められなかった。しかしながら、PAM 投与野生型群では音刺激による無動時間が Vehicle 投与野生型群より増加する傾向があり、PAM 投与 Eln2 KO マウス群では音刺激前、刺激後ともに PAM 投与野生型群より無動時間が減少した。Eln2 欠損により PAM の応答性が異なっており mGluR の機能に異常があることが個体レベルで確認された。さらには、Eln2 の脳海馬スライスでの電気生理学解析により mGluR の機能に異常があることも確認している (共同研究)。今後、脳のいずれの領域のグルタミン酸神経系の調節異常が神経発達障害の症状発症に関わるかを明らかにすることで、神経疾患の分子病態の理解に貢献できる。さらには、mGluR の PAM やアクチベーターの効果を検証することで、新たな創薬標的の導出がなされる可能性がある。

図3. Elnの機能不全によるグルタミン酸神経系の調節異常



本研究の細胞内ドメインのリン酸化による Eln の局在制御の解明は、グルタミン酸神経系の形成の理解に新たな視点を与えるものであり、Eln の機能不全は、グルタミン酸神経系の調節異常を誘発すると考えられる (図 3)。一方、ADHD 様症状におけるグルタミン酸神経系の重要性も注目度が高い。ADHD 患者において、mGluR のシグナル伝達に関連する遺伝子の変異頻度が非 ADHD 患者よりも高いことが明らかとなっており (Elia, J et al., *Nat Genet* 2011)、最近、小規模の臨床研究ではあるが mGluR 系アクチベーターが青年期の ADHD 患者に有効であることも示された (Elia, J et al., *Nat Commun* 2018)。グルタミン酸神経系の調節異常と ADHD 様行動発症の機構を解明することは病態の理解につながるとともに、これまでの脳のドーパミン量を増加させる ADHD 治療薬に加え、mGluR を標的とした新規治療薬の開発の有用な情報となることが期待される。

< 引用文献 >

Cao Y, et al. Mechanism for Selective Synaptic Wiring of Rod Photoreceptors into the Retinal Circuitry and Its Role in Vision. *Neuron*. 2015 Sep 23;87(6):1248-1260. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.002.

Elia J, et al. Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):78-84. doi: 10.1038/ng.1013.

Elia J, et al. Fasoracetam in adolescents with ADHD and glutamatergic gene network variants disrupting mGluR neurotransmitter signaling. *Nat Commun*. 2018 Jan 16;9(1):4. doi: 10.1038/s41467-017-02244-2.

Ende G, et al. Impulsivity and Aggression in Female BPD and ADHD Patients: Association with ACC Glutamate and GABA Concentrations. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jan;41(2):410-8. doi: 10.1038/npp.2015.153.

Naaijen J, et al. Fronto-striatal glutamatergic compounds in compulsive and impulsive syndromes: a review of magnetic resonance spectroscopy studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 May;52:74-88. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.02.009.

Tomioka NH, et al. Efn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun*. 2014 Jul 22;5:4501. doi: 10.1038/ncomms5501.

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 Matsunaga, H. and Aruga, J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Trans-Synaptic Regulation of Metabotropic Glutamate Receptors by Elfn Proteins in Health and Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 634875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2021.634875	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野まどか、富岡直子、松永隼人、有賀純
2. 発表標題 神経膜タンパク質Elfn2による消化管機能運動
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光田智佳、佐々木直子、松永隼人、有賀純
2. 発表標題 多動症患者由来Elfn1変異ノックインマウスの行動特性
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学 長崎大学生命医科学域 医科薬理学 HP  
<https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/index.html>  
 ORCID  
<https://orcid.org/0000-0002-4614-4240>  
 Research Map  
<https://researchmap.jp/hayato8810>  
 長崎大学 研究者総覧データベース  
<https://researchers.ir.nagasaki-u.ac.jp/researchdetail.php?id=dTg3YjI2TgPsdXpoNXJuUzExZEZLc0REMMVVRTk5seWdiNG4reHc9PQ==>  
 長崎大学 医科薬理学 研究内容  
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/research.html>  
 長崎大学 医科薬理学 最近の研究成果  
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/recent.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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------