

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16269

研究課題名（和文）知的障害と関連する神経分泌リガンドLGI3の受容体の同定および性状解析

研究課題名（英文）Characterization of an intellectual disability-related secretory ligand, LGI3, and identification of its receptor proteins

研究代表者

宮崎 裕理 (MIYAZAKI, Yuri)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・特任助教

研究者番号：70837260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：LGIファミリータンパク質（LGI1-4）の機能不全は種々の神経疾患を引き起こすことが知られている。LGIファミリーの中でもLGI3については生理機能が十分に理解されていなかったが、近年にLGI3遺伝子変異と知的障害発症との関連性が報告され、その重要性が示唆された。本研究では、LGI3の生理的機能を理解し、LGI3の機能不全が脳機能異常を引き起こす機序を解明することを目指した。脳内におけるLGI3の詳細な局在を明らかにするとともに、LGI3の生理機能に重要であると予測される相互作用タンパク質群を網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LGI3遺伝子変異と知的障害発症との関連性から、LGI3タンパク質の生理的な役割を明らかにすることは大変重要である。本研究で得られたLGI3の詳細な脳内局在や結合タンパク質等の情報は、その機能を理解するための有用な知見であり、LGI3の機能不全が引き起こす病態を明らかにするための基礎となる研究成果である。また、ファミリータンパク質LGI1の受容体であるADAM22遺伝子変異と知的障害を含む重度の脳症発症との関連性についても研究を行い、ADAM22遺伝子変異が様々な機序でタンパク質機能不全を引き起こし、疾患発症に寄与する可能性を報告した。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of LGI family proteins (LGI1-4) causes various neurological disorders. However, the physiological functions of LGI3 remain unclear. Recently, the association between human LGI3 gene mutations and intellectual disability was reported, suggesting that LGI3 is essential for normal brain activity. In this study, we investigated the physiological functions of LGI3 and the mechanisms by which LGI3 dysfunction causes brain abnormalities. We determined the widespread localization of LGI3 protein in the brain and also comprehensively identified the LGI3-interacting proteins including its receptor candidates by proteomics analysis. These results provide useful information to understand the (patho-)physiological functions of LGI3 in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：知的障害 脳神経疾患 LGI3 分泌蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

LGI ファミリータンパク質 (LGI1~4) は、主に脳および末梢神経に発現する分泌蛋白質で、遺伝子変異による機能異常がてんかんや末梢神経の髄鞘低形成などの神経疾患を引き起こすことが知られていた。一方で、LGI3 の脳における生理機能は未解明であった。しかし、近年のヒト遺伝学的な研究によって、LGI3 遺伝子変異と知的障害の発症の関連性が報告され、高次脳機能における重要性が示唆された。LGI ファミリーの中でも分子機能解析が進んでいる LGI1 や LGI4 は受容体である ADAM22 との結合を介して機能することから、LGI3 も何らかの受容体分子との結合を介して生理機能を果たすと予想される。従って LGI3 の受容体分子の同定や脳内局在等の性状解析を行うことが、LGI3 の機能を理解する上で重要である。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では LGI3 の受容体分子を含むタンパク質相互作用ネットワークを同定するとともに、LGI3 の脳内における発現領域や細胞内分布等の性状解析を行うことを目的とした。また、LGI3 の機能欠損が示す表現型を解析することで、LGI3 機能不全が引き起こす脳機能異常の機序を解明することを目指した。さらに、LGI1 の受容体である ADAM22 遺伝子に関して、エクソーム解析により知的障害や脳萎縮など重篤な脳症を呈する患者で見出された変異について(海外グループとの共同研究) タンパク質機能への影響を構造学的に予測した。

3. 研究の方法

(1) LGI3 の結合タンパク質ネットワークの網羅的な同定

内在性 LGI3 の生理的な条件における受容体分子を含めた結合タンパク質を同定するために、CRISPR-Cas9 システムを利用してエピトープタグを付加した LGI3 ノックインマウス(LGI3KI マウス)を作製した。この KI マウス脳からエピトープタグを利用したアフィニティ精製により LGI3 と共に結合タンパク質を精製し、ショットガンプロテオミクス解析を行うことで、網羅的に結合タンパク質を同定した。また同定されたタンパク質の中から受容体の候補となる膜タンパク質に対して、培養細胞を用いた結合実験を行った。

(2) LGI3 組織・脳内分布、細胞内局在、発現細胞種の解析

LGI3KI マウスの全身臓器や脳組織を用いて、LGI3 の発現分布を解析した。また KI マウス脳組織切片に対するタグ抗体を利用した組織免疫染色によって、LGI3 の脳内発現分布や細胞内局在を検討した。さらに、in situ hybridization 法によって LGI3 発現細胞種を解析した。

(3) LGI3 欠損マウスの樹立・表現型解析

CRISPR-Cas9 システムによる LGI3KI マウス作製過程で同時に得られた、LGI3 遺伝子の欠失変異マウス系統を樹立した。この LGI3 変異マウスを用いて LGI3 機能欠損による表現型の解析を開始した。

4. 研究成果

(1) マウス脳内の LGI3 結合タンパク質に対するプロテオミクス解析によって、再現性、特異性高く 130 種類のタンパク質が同定された。この中には、13 種類の膜タンパク質が含まれており、LGI3 の受容体候補となる ADAM22 サブファミリー蛋白質も同定されていた。また他の LGI ファミ

リーメンバーも LGI3 の結合タンパク質として同定されていた。さらに、LGI3 の分泌過程に関連すると考えられるタンパク質群も同定されていた。

(2) LGI3KI マウス組織を用いた発現、局在解析によって、LGI3 が主に中枢神経系および末梢神経系組織に発現しており、脳内では様々な領域に発現していることが明らかとなった。また、詳細な局在解析によって、LGI3 は神経軸索上にクラスターを形成して限局した分布を示すことがわかった。さらに、発現細胞種の解析によって LGI3 はマウス脳内で神経細胞だけでなくグリア細胞の一部にも発現していることが明らかとなった。

(3) CRISPR-Cas9 システムによる LGI3KI マウス作製過程で生まれた、LGI3 遺伝子の部分欠失変異マウス系統を樹立した。この欠失変異が LGI3 の分泌を著しく阻害する変異であり、LGI3 の機能欠損変異マウスであることがわかった。LGI3 欠損変異マウスは少なくとも 1 年以上は生存が可能であり、生後 2~3 週間ほどで致死的なてんかんを呈する LGI1 欠損マウスとは表現型が明らかに異なることを見出した。

(4) 進行性の重篤な脳症を発症した患者家系で同定された ADAM22 遺伝子の変異を、タンパク質の立体構造上にマッピングすることで、その影響を予測した。同定されたミスセンス変異の多くが ADAM22 の立体構造を安定化させるアミノ酸残基であり、変異によって構造の不安定化が引き起こされると予測された。実際に、培養細胞に過剰発現した ADAM22 変異体は、細胞膜表面への発現量が減少していた。また、ADAM22 変異の中には LGI1 との結合低下を示すものや、足場タンパク質である PSD-95 との結合低下を示すものがあることを見出し、複数の機能欠損機序が病態形成に寄与する可能性が示された。(van der Knoop, Maroofian, Fukata et al., Brain 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 van der Knoop Marieke M., Maroofian Reza, Fukata Yuko, van Ierland Yvette, Karimiani Ehsan G., Lehesjoki AnnaElina, Muona Mikko, Paetau Anders, Miyazaki Yuri	4. 巻 -
2. 論文標題 Biallelic ADAM22 pathogenic variants cause progressive encephalopathy and infantile-onset refractory epilepsy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awac116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoi Norihiko, Fukata Yuko, Okatsu Kei, Yamagata Atsushi, Liu Yan, Sanbo Makoto, Miyazaki Yuri, Goto Teppei, Abe Manabu, Kassai Hidetoshi, Sakimura Kenji, Meijer Dies, Hirabayashi Masumi, Fukai Shuya, Fukata Masaki	4. 巻 37
2. 論文標題 14-3-3 proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110107 ~ 110107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.110107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukata Yuko, Hirano Yoko, Miyazaki Yuri, Yokoi Norihiko, Fukata Masaki	4. 巻 194
2. 論文標題 Trans-synaptic LGI1-ADAM22-MAGUK in AMPA and NMDA receptor regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108628 ~ 108628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2021.108628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fukata Masaki, Yuri Miyazaki, Yokoi Norihiko, Fukata Yuko
2. 発表標題 Synaptic function regulated by palmitate cycling on PSD-95 and trans-synaptic LGI1 and ADAM22
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平野瑠子、宮崎裕理、深田正紀、深田優子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 9
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://www.nips.ac.jp/fukata/
--

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