

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890021

研究課題名(和文) 神経修飾リガンド/受容体を起点とする興奮性シナプス伝達の制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on excitatory synaptic transmission regulated by neuronal ligand/receptor interactions

研究代表者

横井 紀彦 (Norihiko, Yokoi)

生理学研究所・細胞器官研究系・特任助教

研究者番号：50710969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんは難治性の脳疾患の1つである。神経分泌蛋白質LGI1の変異は家族性常染色体優性外側側頭葉てんかんを引き起こす。その分子病態機構を明らかにするため、変異LGI1蛋白質を発現するてんかんモデルマウスを作製し、解析を行った。その結果、変異によるLGI1の構造異常がてんかんの原因であることを明らかにした。さらに、タンパク質構造異常を回復するケミカルシャペロンをてんかんモデルマウスへ投与することで、変異蛋白質の分泌及びADAM22受容体への結合が回復し、マウスの痙攣が緩和された。この結果から脳機能におけるLGI1-ADAM22複合体の重要性と、ヒトてんかんの新たな治療戦略を示した。

研究成果の概要(英文)：LGI1 is a neuronal secreted protein, and its mutations cause an inherited form of human epilepsy, autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE). However, the patho-physiological functions of LGI1 still remain unclear. Here, we classified 22 reported LGI1 missense ADLTE mutations as either secretion defective or secretion competent, and we generated and analyzed two mouse models of ADLTE expressing the mutant protein representative of the two groups. Both mutations reduced synaptic LGI1-ADAM22 interaction by protein conformational defects in the mouse brain. A chemical chaperone, 4-phenylbutyrate, restored the folding of the secretion-deficient LGI1 mutant and its binding to ADAM22 and ameliorated the increased seizure susceptibility of the LGI1 mutant mice. This study establishes an essential role of the LGI1-ADAM22 interaction to regulate the brain excitability (Yokoi et al. Nat. Med. 2015, 21,19-26).

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん 治療薬 ケミカルシャペロン 辺縁系脳炎 シナプス伝達 タンパク質構造病 タンパク質複合体 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

脳内での興奮性と抑制性のシナプス伝達のバランスは精密に制御されているが、一旦そのバランスが崩れると、統合失調症や自閉症、てんかんを始めとする神経精神疾患が引き起こされると考えられている。てんかんは罹患率 1%程度の頻度の高い神経疾患であり、激しいけいれんや意識消失、時には幻覚・幻聴などを伴うが、その病態、病因は不明な点も多く、難治性のこともある。LGI1 は 30 種類以上の変異が家族性のてんかん患者で見出されていること、てんかんの原因遺伝子産物のほとんどがチャネルタンパク質であることに対し、LGI1 は分泌タンパク質であることから、その生理機能の解明は新しい作用点を有する抗てんかん薬の創出に繋がると考えられる。

我々は脳内の速い興奮性シナプス伝達を担う AMPA 受容体のシナプス足場タンパク質 PSD-95 を含む脳内タンパク質複合体の一部として、LGI1-ADAM22 複合体を独自に同定し、引き続き LGI1 の分子機能を調査している。そして、LGI1 がシナプス膜タンパク質 ADAM22、23 のリガンドとして機能し、AMPA 受容体機能を促進させること、*Lgi1* ノックアウト (KO) マウスが生後三週間以内にてんかん発作の重積により全て死亡する顕著な表現型を示すことを報告してきた。以上より、神経修飾リガンド/受容体、LGI1/ADAM22 の結合が脳の興奮性を決定する鍵である可能性を示してきた。

2. 研究の目的

- (1) 今回、未だ不明である LGI1 の主要な生理機能を明らかにするため、ヒトでてんかんを引き起こす LGI1 変異体の機能欠損を解明する。
- (2) LGI1 と ADAM22 の複合体形成によるシナプス伝達制御機構を明らかとするため、複合体形成による ADAM22 の翻訳後修飾とその機能を明らかにする。
- (3) LGI1 機能欠損による、てんかん発症機構を明らかにするために、LGI1 が機能する細胞種、及び神経回路を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) LGI1 変異体によって引き起こされるてんかんの分子病態機構を明らかにするため、LGI1 変異体を発現するトランスジェニック (Tg) マウスの作製、及び解析を行った。
- (2) ADAM22 のリン酸化状態を SDS-PAGE でリン酸化タンパク質を高分子量ヘシフトさせる Phos-Tag 法を用いて、解析した。
- (3) LGI1 が機能する細胞種を明らかにするために、Tg マウスを用いたレスキュー実験を試みる。具体的には、ある神経細胞特異的に蛋白質を発現させるプロモーターを用いて Tg マウスを作成し、LGI1 KO マウスと交配させ、

ある神経細胞種のみで LGI1 を発現するマウスを作成し、そのマウスのてんかん表現型からの救済を評価する。

4. 研究成果

(1) 申請前の段階で、マウス脳内において、分泌不全型 LGI1^{E383A} 変異体は構造異常により小胞体に留まり、分解されやすいこと、分泌型 LGI1^{S473L} 変異タンパク質は ADAM22 との結合能を特異的に欠損していることを明らかにしてきた。本申請において、分泌不全型 LGI1^{E383A} 変異体によって引き起こされるてんかんがタンパク質の構造異常を原因とすることから、LGI1^{E383A} の構造の回復によって分泌を回復させることが新たなてんかん治療戦略に繋がると考え、検討を行った。そして、代表的なタンパク質構造病である嚢胞性線維症 (cystic fibrosis) の治療戦略として着目されているケミカルシャペロン、4-phenyl butyric acid (4PBA) の利用を試みた。LGI1^{E383A} と同様に cystic fibrosis ではチャネルタンパク質 CFTR がアミノ酸変異によって構造異常を起こし、小胞体に留まるが、4PBA によってその構造異常が改善され、CFTR が膜表面へ輸送されることが報告されている。我々は 4PBA を含む複数種のケミカルシャペロンを用いて、HEK 細胞からの LGI1^{E383A} の分泌が回復するかを比較検討した。その結果、4PBA が最も効果が高いことを見出した。また、4PBA により分泌誘導された LGI1^{E383A} が ADAM22 との結合能を維持していることも確認した。

次に LGI1 変異マウスに対する 4PBA の効果の検討を行った。LGI1 変異によるてんかんは常染色体優性遺伝疾患であることから、*Lgi1*^{+/-}; *Lgi1*-Tg^{E383A} マウスの PTZ に対する痙攣感受性の評価を行った。このてんかんモデルマウスに 4PBA、もしくは生理食塩水を腹腔内に 10 日間投与した後の PTZ に対する痙攣感受性を評価した。*Lgi1*^{+/+} マウスに比べ、*Lgi1*^{+/-}; *Lgi1*-Tg^{E383A} マウスは *Lgi1*^{+/-} マウスと同様に PTZ に対する高い痙攣感受性を示したが、4PBA の投与によって、*Lgi1*^{+/-}; *Lgi1*-Tg^{E383A} マウスの痙攣感受性が有意に低下することを見出した。この 4PBA の効果が *Lgi1*^{+/-} マウスや *Lgi1*^{+/-}; *Lgi1*-Tg^{S473L} マウスでは確認されなかったことから、痙攣症状の回復は 4PBA の LGI1^{E383A} への効果のためと考えられる。実際に、4PBA 投与後のマウス脳内において、LGI1^{E383A} のタンパク質の成熟度 (小胞体からゴルジ以降への輸送) が上昇していること、LGI1^{E383A} と ADAM22 の複合体量が増加していることを生化学的手法により明らかにした。

Lgi1^{+/-}; *Lgi1*-Tg^{E383A} マウスは自発的痙攣により生後 3 週間程度で死亡してしまうが、4PBA の投与によって、このマウスの自発的痙

攣が回避されるかを検討した。その結果、数日ではあるが、生理食塩水を投与した対照群に比べ、4PBAを投与されたマウスは自発的攣の発症時期が遅れ、寿命が有意に延びることを見出した。また、LGI1^{E383A}は小胞体に留まるため、海馬歯状回では顆粒細胞層に濃縮するが、4PBAの投与によって、LGI1^{E383A}の分子層における局在、およびADAM22との共局在が増加することを見出した。以上の結果からケミカルシャペロンである4PBAによって、分泌不全型LGI1^{E383A}の構造異常を改善し、分泌を回復させ、ADAM22との複合体量を回復させることで、てんかんモデルマウスの攣症状が緩和されることが強く示唆された。ケミカルシャペロンの4PBAはこれまでも、囊胞性線維症やライソゾーム病といったタンパク質の構造異常を原因とする遺伝性疾患に対し試みられてきたが、本研究により、一部のてんかんもタンパク質構造異常を原因としていることが明らかになり、ケミカルシャペロンの投与がてんかんの治療戦略になりうることを示した。これまでのてんかんの治療薬の多くはチャンネルタンパク質の機能制御を目的としており、今回の知見は新たなてんかん治療法の提案となる。本研究結果を医薬系研究誌の最高峰の一つであるNature Medicine誌に発表し、本研究結果の高い重要性和発展性を全世界に発信した。

(2) マウス脳のPSD画分において、ADAM22が複数のリン酸化を受けていることを見出した。今後、リン酸化部位の同定、LGI1依存紙を検討していく予定である。

(3) 様々なプロモーターを用いて、海馬顆粒細胞、CA3錐体細胞、歯状回門苔状細胞、抑制性神経細胞にLGI1を発現させるTgマウス群を樹立した。現在、LGI1 KOマウスと交配を行い、LGI1の発現効果を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, Takahashi N, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, Fukata M.

Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy.

Nat Med. 査読有、Vol.21、No.1、2015、pp. 19-26、doi:10.1038/nm.3759

Fukata M, Sekiya A, Murakami T, Yokoi N, Fukata Y.

Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles.

Biochem Soc Trans. 査読有、Vol.43、No.2、

2015、pp.199-204、doi: 10.1042/BST20140238

Ohkawa T, Satake S, Yokoi N, Miyazaki Y, Ohshita T, Sobue G, Takashima H, Watanabe O, Fukata Y, Fukata M.

Identification and characterization of GABA(A) receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis.

J Neurosci. 査読有、Vol.34、No.24、2014、pp.8151-63、doi: 10.1523/JNEUROSCI.4415-13.2014.

Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, Watanabe M, Watanabe O, Fukata M.

Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors.

J Neurosci. 査読有、Vol. 33、No.46、2013、pp.18161-74、doi: 10.1523/JNEUROSCI.3506-13.2013.

[学会発表](計8件)

横井紀彦

A chemical chaperone corrects an LGI1 mutant protein and ameliorates seizure phenotypes in a mouse model of human epilepsy

ポスター発表

第7回NAGOYAグローバルリトリート 2015年2月13日、あいち健康プラザ、愛知県知多郡

横井紀彦、深田優子、加勢大輔、宮崎太

輔、Martine Jaegle、井本敬二、Dies Meijer、渡辺雅彦、深田正紀

Chemical Correction of Missense LGI1 Functions Ameliorates Seizure Phenotype in a Mouse Model of Human Epilepsy

ポスター発表

第3回NINS colloquium、2014年12月1日、ザプリンス箱根、神奈川県足柄下郡

横井紀彦、深田優子、加勢大輔、宮崎太

輔、Martine Jaegle、井本敬二、Dies Meijer、渡辺雅彦、深田正紀

Chemical Correction of Missense LGI1 Functions Ameliorates Seizure Phenotype in a Mouse Model of Human Epilepsy

ポスター発表

第4回生理研・名大合同シンポジウム、2014年11月22日、名古屋大学、愛知県名古屋市

Norihiko Yokoi、Yuko Fukata、Daisuke

Kase、Taisuke Miyazaki、Martine Jaegle、Keiji Imoto、Dies Meijer、Masahiko Watanabe、Masaki Fukata

Molecular mechanisms for LGI1 mutation-related epilepsy and new strategy for human epilepsy

口頭発表(英語)

第37回日本神経科学大会 2014年9月12日、

パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
Norihiko Yokoi, Yuko Fukata, Daisuke
Kase, Taisuke Miyazaki, Martine Jaegle,
Keiji Imoto, Dies Meijer, Masahiko
Watanabe, Masaki Fukata

Molecular pathogenic mechanisms of
epilepsy caused by LGI1 mutations
ポスター発表(英語)

43rd annual meeting of the Society for
Neuroscience 2013年11月11日 San Diego,
CA, USA

Norihiko Yokoi, Yuko Fukata, Daisuke
Kase, Taisuke Miyazaki, Martine Jaegle,
Toshika Ohkawa, Keiji Imoto, Dies Meijer,
Masahiko Watanabe, Masaki Fukata

Pathogenic mechanism of epilepsy-related
LGI1 mutations in vivo.

ポスター発表(英語)

The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium 2013年
10月10日 生理学研究所、愛知県岡崎市

横井 紀彦、深田正紀、深田優子

神経分泌蛋白質LGI1の変異を原因とする“て
んかん”の分子病態機構の解明と治療法の開
拓

招待講演

平成 25 年度 生理学研究所 研究会 「シナ
プス恒常性維持の分子基盤とその破綻」
2013年6月6日 生理学研究所、愛知県岡崎
市

横井紀彦

生理的なシナプス蛋白質複合体の変異体マ
ウスを用いた機能解析

招待講演

「生物無機化学の新潮流と展望」研究会
2013年5月25日 名古屋大学、愛知県名古屋
市

〔図書〕(計0件)

〔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

横井紀彦、深田優子、深田正紀

ライフサイエンス新着論文レビュー First
Authors

ケミカルシャペロンによるタンパク質の構
造異常の修復はてんかんモデルマウスにお
いてけいれん感受性を軽減する。

[http://first.lifesciencedb.jp/archives/
9607](http://first.lifesciencedb.jp/archives/9607)

生理学研究所プレスリリース

タンパク質の異常構造を修復することによ
りてんかんを軽減

[http://www.nips.ac.jp/release/2014/12/p
ost_285.html](http://www.nips.ac.jp/release/2014/12/post_285.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 紀彦(Norihiko, Yokoi)

生理学研究所・細胞器官研究系・特任助教

研究者番号: 50710969