

てんかん発症を抑制するためのLGI1-ADAM22タンパク質複合体の量的制御機構

横井 紀彦^{1,2}, 深田 優子^{1,2}, 深田 正紀^{1,2,3}

1. はじめに

多くの遺伝性疾患において、原因タンパク質の発現量や機能がある閾値を下回ると臨床症状が出現する。したがって、原因タンパク質の発現量と症状出現との関連性を定量的に明らかにし、そのタンパク質の量的制御機構を解明することは疾患治療において重要になる(図1)。この視点から嚢胞性線維症(cystic fibrosis: CF)の研究が精力的に進められている。CFは常染色体潜性遺伝疾患で、クロライドチャネルであるcystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の変異による機能不全を原因とする。CFTRの機能不全とCFの疾患症状の出現は0から100%の間の線形関係ではなく、症状出現の閾値の存在が示唆されている。実際、約5%の野生型CFTRのmRNAの発現でCFの症状が緩和されるという報告もある¹⁾。CFの原因となるCFTRの変異の約70%はF508の欠損変異(F508del)で、その変異タンパク質は構造異常を起こし、小胞体以降への輸送が抑制される。重要なことに、F508del変異タンパク質の細胞表面の発現量は減少するが、チャネル機能は完全に失われていない。そこで、変異タン

パク質の細胞表面への輸送の回復がCFの治療につながると期待されている。実際、変異タンパク質の構造異常を修復するケミカルシャペロンの利用²⁾や、変異タンパク質と14-3-3タンパク質の結合の安定化³⁾等によって、変異タンパク質の膜輸送の改善が示されてきた。一方、このような疾患発症と原因タンパク質の発現量を関連づけた報告は、自閉スペクトラム症とその関連タンパク質CHD8の報告⁴⁾もあるが、ごく限られたものになっている。

2. LGI1-ADAM22タンパク質複合体の形成不全がてんかんを誘引し、その回復はてんかん症状を緩和する

脳内のシナプス伝達の制御機構の破綻はてんかん等の脳神経疾患を誘因すると考えられている。我々は脳内の速い興奮性シナプス伝達の大部分をつかさどる α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)の制御機構の解明を目指して、シナプスにおけるAMPA受容体の足場タンパク質PSD-95の結合タンパク質を探索した。その結果、PSD-95の主要な結合タンパク質として膜タンパク質ADAM22とそのリガンドタンパク質LGI1を見いだした⁵⁾(図2A)。重要なことにLGI1の変異が常染色体顕性遺伝型の家族性てんかん患者において報告されていた⁶⁾。その後、Kvチャネルに関連し、痙攣や記憶障害を伴う辺縁系脳炎を引き起こ

¹自然科学研究機構生理学研究所分子細胞生理研究領域生体膜研究部門(〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1)

²総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻(〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1)

³名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学講座(〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65)

Regulatory mechanisms of the LGI1-ADAM22 protein levels to prevent epilepsy

Norihiko Yokoi^{1,2}, Yuko Fukata^{1,2} and Masaki Fukata^{1,2,3} (Division of Membrane Physiology, Department of Molecular and Cellular Physiology, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan, ²Department of Physiological Sciences, School of Life Science, SOKENDAI (The Graduate University for Advanced Studies), 5-1 Higashiyama, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan, ³Department of Cell Pharmacology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950384

© 2023 公益社団法人日本生化学会

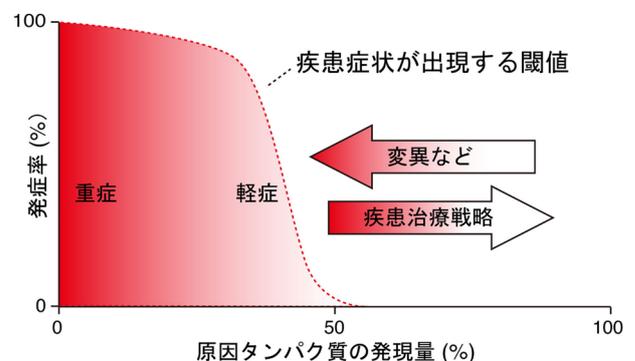


図1 タンパク質の発現量と疾患発症の関係
タンパク質の発現量と疾患の発症率は0から100%の間の線形関係ではなく、ある原因タンパク質の発現量を閾値として疾患が発症する場合がある。その場合、原因タンパク質の発現量を増やすことが疾患の治療戦略として期待される。

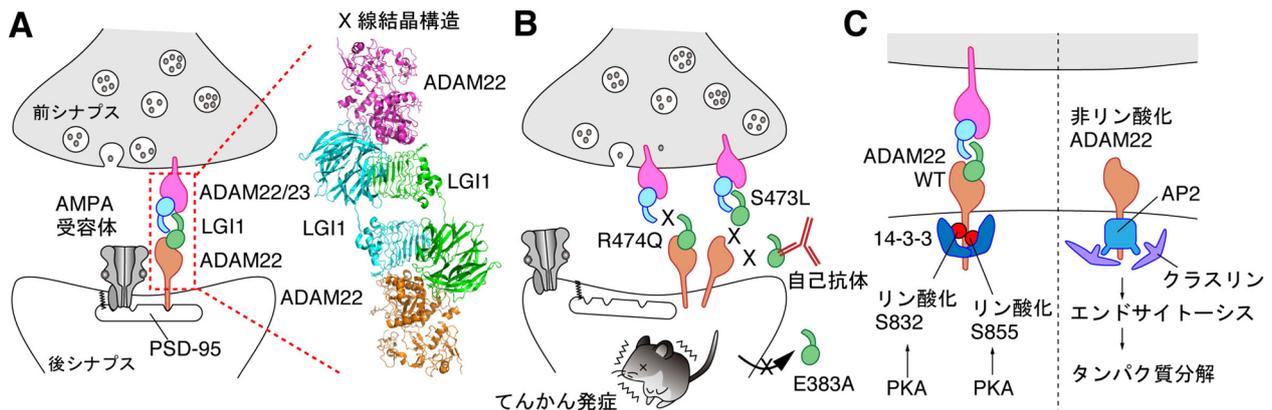


図2 シナプスタンパク質複合体LGI1-ADAM22とその形成制御機構

(A) LGI1-ADAM22複合体とその結晶構造¹²⁾ (PDB ID: 5Y31). ADAM22はC末端のPDZ結合領域でシナプス足場タンパク質PSD-95に結合する. LGI1はホモ二量体構造を形成し, その両端にADAM22 (またはADAM23) が結合したヘテロ四量体構造が形成される. その長軸の長さはシナプス間隙の幅に対応しており, この複合体が前シナプスと後シナプスのタンパク質を橋渡しすると考えられる. (B) LGI1のてんかん原因E383A変異による分泌不全¹⁴⁾, S473L変異によるLGI1とADAM22の結合の阻害¹⁴⁾, R474Q変異によるLGI1の二量体形成の阻害¹²⁾によって, LGI1-ADAM22複合体の形成が阻害される. 辺縁系脳炎を引き起こす抗LGI1自己抗体はLGI1とADAM22の結合を阻害する⁹⁾. (C) PKAによるADAM22のS832とS855のリン酸化によって, ADAM22は14-3-3と安定な複合体を形成する. その結果, ADAM22とAP2の結合が阻害され, LGI1-ADAM22複合体が安定に細胞表面に存在できる¹⁵⁾.

す自己抗体の大部分がLGI1を標的抗原とすることが我々や複数のグループから報告された⁷⁻⁹⁾. ADAM22の変異もヒトにおいて常染色体潜性遺伝型の痙攣を伴う脳障害を引き起こすことが近年報告された¹⁰⁾. このように, LGI1とADAM22は脳機能に必須の役割を果たす重要なタンパク質である.

我々はこれらタンパク質の解析を進め, LGI1の欠損によって, マウスが激しいてんかん症状を示し, 幼若期に死亡すること, 海馬におけるAMPA受容体を介したシナプス伝達が減少することを見いだした¹¹⁾. 京都大学の深井博士との共同研究でLGI1-ADAM22複合体のX線結晶構造解析を進め, LGI1がホモ二量体を形成し, その両端にADAM22が結合するヘテロ四量体構造を同定した (図2A)¹²⁾. さらに, LGI1-ADAM22複合体とPSD-95の結合が前シナプスタンパク質と後シナプスタンパク質の対面配列に必須の役割を果たし, シナプス伝達を制御することを見いだした¹³⁾.

我々はLGI1の変異によるてんかん発症の原因を調べるため, ヒトの家族性てんかん患者から報告されているLGI1ミスセンス変異を有するてんかんモデルマウスを作製し, マウス脳内のLGI1-ADAM22複合体の形成が変異によって阻害されることを見いだした (図2B)^{12, 14)}. さらに我々は辺縁系脳炎を引き起こすLGI1の自己抗体がLGI1とADAM22の結合を阻害することを見いだした⁹⁾. これらの結果から, LGI1-ADAM22複合体の形成不全がてんかんや辺縁系脳炎の原因であることを明らかにした. この過程で我々は分泌不全を引き起こすE383A変異によって, LGI1タンパク質が

異常な構造をとり, その結果, 細胞体の小胞体にとどまることに着目した. この変異タンパク質の性質は先に示したCFTR F508delに似ていた. そこで, CFTR F508delを参考にして²⁾, ケミカルシャペロン, 4-phenylbutyric acid (4PBA)によるLGI1 E383A変異タンパク質の構造異常の修復を試みた. 興味深いことに, E383A変異マウスへ4PBAを投与した結果, LGI1とADAM22のタンパク質発現量が海馬歯状回分子層で増加し, マウスの痙攣症状が緩和されることを見いだした¹⁴⁾. つまり, 減少したLGI1-ADAM22複合体の量の回復がてんかんの治療につながることを示された.

3. LGI1-ADAM22複合体の量を制御する分子機構

我々はLGI1-ADAM22複合体の量的制御機構の解明が新たなてんかん治療戦略につながると考えた¹⁵⁾. さまざまな膜タンパク質の輸送や局在は翻訳後修飾により制御されることから, ADAM22のリン酸化状態をPhos-Tag SDS-PAGE法と質量分析等を用いて調べ, マウス脳内のADAM22のS832残基がほぼ100%リン酸化されていることを見いだした. このリン酸化部位をアラニンに置換した変異 (S832A, SA)のノックイン (KI) マウスを作製した結果, 興味深いことに, KIマウス脳内でADAM22 SA変異タンパク質の発現量が野生型マウス内のADAM22と比べて約40%まで減少し, 同時にLGI1の発現量も約55%まで減少していることを見いだした. さらに, 野生型マウスとKIマウス由来の初代培養神経細胞を用いてADAM22の分解過程を比較した結果, リン酸化欠損によってADAM22のリソソームを介し

た分解が促進することを見いだした。つまり、ADAM22 S832のリン酸化が、ADAM22およびLGI1-ADAM22複合体の安定化に重要であることが明らかになった。次にマウス脳からのADAM22の免疫沈降実験によって、S832リン酸化依存的にADAM22へ14-3-3タンパク質が結合することを見いだした。14-3-3はリン酸化部位と結合することで、タンパク質の構造や機能、安定性を制御する。実際に、細胞表面ビオチン化法を用いて、リン酸化ADAM22と14-3-3の結合が細胞表面のADAM22を安定化することを明らかにした。次にADAM22の細胞内領域に種を超えて保存されているYxx ϕ モチーフ (ϕ は疎水性アミノ酸残基)に着目した。膜タンパク質細胞内領域のYxx ϕ モチーフはAP2と結合し、クラスリン依存性のエンドサイトーシスを誘導する。興味深いことに、野生型マウス脳からのADAM22の免疫沈降産物中でADAM22とAP2の結合がほとんど認められない一方、KIマウス脳ではADAM22 SA変異タンパク質とAP2の結合が認められた。つまり、ADAM22 S832のリン酸化欠損によって、14-3-3との結合が破綻し、AP2を介したエンドサイトーシスが促進され、ADAM22の分解が進むことが示された(図2C)。

以上の結果より、我々はADAM22と14-3-3との結合を強化することにより、LGI1-ADAM22複合体の量を増やすことが新たなてんかん治療戦略につながると考えた。我々はADAM22 S832がプロテインキナーゼA (PKA)によってリン酸化されること、S855もPKAによってリン酸化されて14-3-3に認識されることを見いだした(図2C)。よって、PKAの活性化がLGI1-ADAM22複合体の安定化につながると考えた。実際に、培養細胞にforskolinを作用させて、PKAの活性を上げたところ、LGI1-ADAM22複合体の形成が促進されることを見いだした。さらに、CFTRで検討されたように³⁾、小分子(fusicoccin等)によるADAM22と14-3-3の結合の安定化についても検討を進めている。

4. LGI1とADAM22の必要な発現量と機能する神経回路

LGI1とADAM22の発現量とてんかん発症を関連づけるため、ADAM22のhypomorphicマウスとヘテロノックアウト(KO)マウス、リン酸化欠損変異KIマウス、Lgi1ヘテロKOマウスを交配し、さまざまな量のLGI1とADAM22を発現するマウス系統群を樹立した(図3)。野生型マウスの約30%までADAM22の発現量が減少したマウスでは、痙攣誘発剤pentylentetrazoleに対する痙攣感受性が増加したが、ADAM22 KOマウスが示す自発的痙攣はADAM22を野生型マウスの約10%のレベルで発現するマウスでは認められなかった(図3)。一方、LGI1の発現量が野生型の50%程度の減少ではマウスは自発的痙攣を引き起こさなかったが、30%まで減少したマウスは自発的痙攣を起こし、死亡することを見いだした¹⁵⁾(図3)。つまり、約50%のLGI1と約10%のADAM22が発現していれば、自発てんかんが抑制されることを見いだした。

一方、我々は神経回路レベルでのLGI1とADAM22の役割を明らかにするため、LGI1の細胞種特異的なレスキューマウスやADAM22のコンディショナルKOマウスの解析を進めた。その結果、LGI1とADAM22はともに興奮性と抑制性の両方の神経細胞種で必須の役割を果たすことを見いだした¹⁵⁾。たとえば、ADAM22は興奮性と抑制性の神経細胞のいずれでKOしても、致死性てんかんが必発した。海馬での神経回路では、抑制性神経細胞によるfeedforward inhibitionやfeedback inhibitionによって、興奮性神経細胞の活動が直接的、間接的に抑制されており、どの神経細胞のシナプス伝達の異常によっても興奮-抑制のバランスがくずれ、てんかんが起りやすくなると考えられる。これまでの知見から、LGI1-ADAM22複合体の減少に伴って、抑制性神経細胞への興奮性シナプス伝達のためのAMPA受容体機能の低下、または興奮性神経細胞に

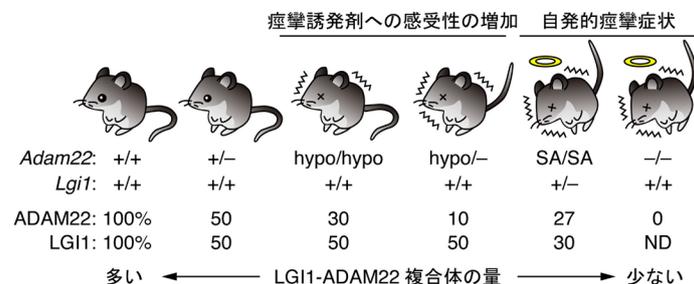


図3 てんかんの抑制に必要なLGI1とADAM22のタンパク質発現量

LGI1とADAM22の遺伝子改変マウス群を交配させることで、さまざまな量のLGI1とADAM22を発現するマウス系統群を樹立した。ADAM22の発現量が野生型マウスと比べて30%まで減少するとGABA_A受容体のアンタゴニストで痙攣誘発剤であるpentylentetrazoleに対する感受性が増加した。10%のADAM22を発現するマウスではADAM22 KOマウスが示す自発的痙攣は認められなかった。一方、LGI1の発現量が50%から30%まで減少すると自発的痙攣が起り、マウスは死亡した¹⁵⁾。Hypo: hypomorphicマウス, SA: ADAM22 S832A KIマウス, ND: Not Determined.

おけるKvチャネル機能の低下などが引き起こされ、神経回路の異常興奮につながると考えられる。つまり、LGII-ADAM22複合体は興奮性と抑制性神経細胞で異なる分子機構を用いて、脳の異常興奮を防ぐ鍵になっていると考えられる。

5. おわりに

以上のように、我々はLGII-ADAM22複合体の安定化機構と、てんかんの抑制に必要な各タンパク質の発現量を明らかにし、この安定化機構の亢進による複合体の増量を新たなてんかん治療戦略として提案した¹⁵⁾。LGII-ADAM22複合体は脳の興奮性制御に必須であり、てんかん以外にも脳の興奮性バランスの破綻を原因とするさまざまな疾患に関連することが推測され、今回の知見の意義は今後高まっていくと考えられる。

このように疾患症状とタンパク質の発現量を関連づけることは患者個人に対する適切な介入のタイミングと治療法の判断に重要な役割を果たし、プレジジョン・メディシン(精密医療)の基盤になると考えられる。近年、全ゲノム解析による疾患関連遺伝子の報告や、1細胞RNA-seq解析等による遺伝子発現の情報が日々、蓄積している。一方、実際の生体機能の多くを担うタンパク質の発現量は複数の翻訳後段階を経るため、必ずしも遺伝子の発現量とは対応しない。したがって、遺伝子発現情報とタンパク質の発現情報の関連づけが今後ますます重要になると考えられる。そのためにも、生体組織でのタンパク質発現量のハイスループット測定の新技術革新が待たれる。

謝辞

本研究成果は、生理学研究所深田研究室の宮崎裕理博士、稲橋宏樹氏、鈴木由美氏、渡辺聖愛氏、古川佐千子氏、遺伝子改変動物作製室の平林真澄博士、後藤鉄平博士、三宝誠氏、京都大学の深井周也博士、尾勝圭博士、劉岩氏、理研BDRの山形敦史博士等多くの方々の支援によるものです。この場をお借りして御礼申し上げます。

文 献

- Ramalho, A.S., Beck, S., Meyer, M., Penque, D., Cutting, G.R., & Amaral, M.D. (2002) Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **27**, 619–627.
- Rubenstein, R.C., Egan, M.E., & Zeitlin, P.L. (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.*, **100**, 2457–2465.
- Stevens, L.M., Lam, C.V., Leysen, S.F.R., Meijer, F.A., van Scheppingen, D.S., de Vries, R.M.J.M., Carlile, G.W., Milroy, L.G., Thomas, D.Y., Brunsveld, L., et al. (2016) Characterization and small-molecule stabilization of the multisite tandem binding between 14-3-3 and the R domain of CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1152–E1161.
- Hurley, S., Mohan, C., Suetterlin, P., Ellingford, R., Riegman, K.L.H., Ellegood, J., Caruso, A., Michetti, C., Brock, O., Evans, R., et al. (2021) Distinct, dosage-sensitive requirements for the autism-associated factor CHD8 during cortical development. *Mol. Autism*, **12**, 16.
- Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., & Fukata, M. (2006) Epilepsy-related ligand/receptor complex LGII and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*, **313**, 1792–1795.
- Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., Winawer, M., Barker-Cummings, C., Martinelli Boneschi, F., Choi, C., Morozov, P., Das, K., Teplitskaya, E., et al. (2002) Mutations in LGII cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat. Genet.*, **30**, 335–341.
- Lai, M., Huijbers, M.G.M., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K., & Dalmau, J. (2010) Investigation of LGII as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: A case series. *Lancet Neurol.*, **9**, 776–785.
- Irani, S.R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., & Vincent, A. (2010) Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*, **133**, 2734–2748.
- Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., & Fukata, M. (2013) Autoantibodies to epilepsy-related LGII in limbic encephalitis neutralize LGII-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J. Neurosci.*, **33**, 18161–18174.
- Muona, M., Fukata, Y., Anttonen, A.K., Laari, A., Palotie, A., Pihko, H., Lönnqvist, T., Valanne, L., Somer, M., Fukata, M., et al. (2016) Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. *Neurol. Genet.*, **2**, e46.
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., & Fukata, M. (2010) Disruption of LGII-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3799–3804.
- Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., et al. (2018) Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGII-ADAM22. *Nat. Commun.*, **9**, 1546.
- Fukata, Y., Chen, X., Chiken, S., Hirano, Y., Yamagata, A., Inahashi, H., Sanbo, M., Sano, H., Goto, T., Hirabayashi, M., et al. (2021) LGII-ADAM22-MAGUK configures transsynaptic nanoalignment for synaptic transmission and epilepsy prevention. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2022580118.
- Yokoi, N., Fukata, Y., Kase, D., Miyazaki, T., Jaegle, M., Ohkawa, T., Takahashi, N., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., et al. (2015) Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat. Med.*, **21**, 19–26.

15) Yokoi, N., Fukata, Y., Okatsu, K., Yamagata, A., Liu, Y., Sanbo, M., Miyazaki, Y., Goto, T., Abe, M., Kassai, H., et al. (2021) 14-3-3

proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice. *Cell Rep.*, **37**, 110107.

著者寸描

●横井 紀彦 (よこい のりひこ)



自然科学研究機構生理学研究所分子細胞生理研究領域生体膜研究部門 助教, 総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻 助教 (兼任), 博士 (理学).

■略歴 1980年愛知県に生る。2009年名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻 (化学系) 修了, 生理学研究所博士研究員, 日本学術振興会特別研究員 (PD), 生理学研究所特任助教を経て2015年より現職。

■研究テーマと抱負 シナプスにおけるタンパク質の複合体形成と翻訳後修飾を手がかりとして, 原子・分子から細胞, 組織, 個体を通して解析することで, 脳神経疾患の原因の解明と治療戦略の創出を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.nips.ac.jp/fukata/>

■趣味 軽めのジョギング。