

## 21. LRR 膜タンパク質による内分泌・血管制御機構の解明

有賀 純

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 (医学系) 医科薬理学

Key words : シナプス接着分子, シナプス可塑性, 神経発達障害, 自閉スペクトラム症, 疾患動物モデル

### 緒言

近年、Leucine-rich repeat (LRR) ドメインを持つ膜タンパク質群がシナプス機能の成立・調節に重要な役割を持つことが示され、新たな治療薬の標的として注目を集めている。しかし、これらの膜タンパク質が自律神経・内分泌系においても役割を持つのか、持つとすれば、どの点に作用し、内臓機能・代謝制御にどのような生理的意義を持つのかについては明らかにされていない。筆者らはこれまでに多数のシナプス LRR 型膜タンパク質の機能解析を進めてきた<sup>1-7)</sup>。最近の研究から、LRR シナプス膜タンパク質欠損動物群の一部に内臓機能異常、代謝異常を示唆する症状が現れることが明らかになった<sup>5)</sup> (未発表)。LRR シナプス膜タンパク質群の一部が生理的な内臓機能・代謝の制御因子となっていることを示唆され、LRR シナプス膜タンパク質の内分泌代謝系・血液循環系における役割に関する解析が進行中である。本稿では上原財団からの助成期間中に成果発表に至った新たな LRR シナプス膜タンパク質 Lrln2 (Leucine-rich repeat and fibronectin3 domain containing neuronal 2) 欠損マウスに表れた神経発達障害に関連する病態について紹介する<sup>8)</sup>。

哺乳類脳的主要な興奮性の神経伝達物質はグルタミン酸であり、イオンチャネル型グルタミン酸受容体には NMDA 型と AMPA 型があり、特に AMPA 型グルタミン酸受容体の分布の変化が、シナプスの活動状態などによってシナプス伝達の効率に変化する性質 (シナプス可塑性) と関係するものと考えられている。これらのイオンチャネル型グルタミン酸受容体の分布を決める上で重要な役割を果たすことが知られているものにシナプス足場タンパク質 PSD-95 があり、PSD-95 はイオンチャネル型グルタミン酸受容体と結合することができる。記憶の形成や想起に重要な役割を持ち、シナプス可塑性の研究が数多く行われている海馬の神経回路では、生後の発達過程で後シナプスの PSD-95 の量が増え、それに伴ってシナプスの形態、機能が成熟していくことが知られているが、どのタンパク質が海馬の生後発達の過程で、PSD95 の分布を決めているのかが、不明であった。

Lrln2 タンパク質は 1 回膜貫通型のタンパク質で、細胞内には PSD-95 と結合する部位がある。このタンパク質は、興奮性ニューロンで作り出され、シナプスにも局在して PSD-95 や NMDA 受容体 GluN1 と結合することが知られている。

### 方法

Lrln2 の脳における役割を知るために Lrln2 欠損マウス (ノックアウトマウス) を作製した<sup>8)</sup>。系統的な行動解析、電顕・ゴルジ染色による形態解析、電気生理学的解析、免疫染色・免疫沈降・ウェスタンブロットなどによる、Lrln2 欠損マウスの表現型解析を行った<sup>8)</sup>。また、神経細胞初代培養系での外来遺伝子発現系を用いて分子機能解析を行った<sup>8)</sup>。

### 結果および考察

#### 1. Lrln2 欠損マウスにおける神経発達障害に関連した行動異常<sup>8)</sup>

Lrln2 欠損マウスは単独で飼っていると正常マウスと同じ体重を示したが、集団で飼っていると正常マウスよりも体重が低くなった (図 1)。

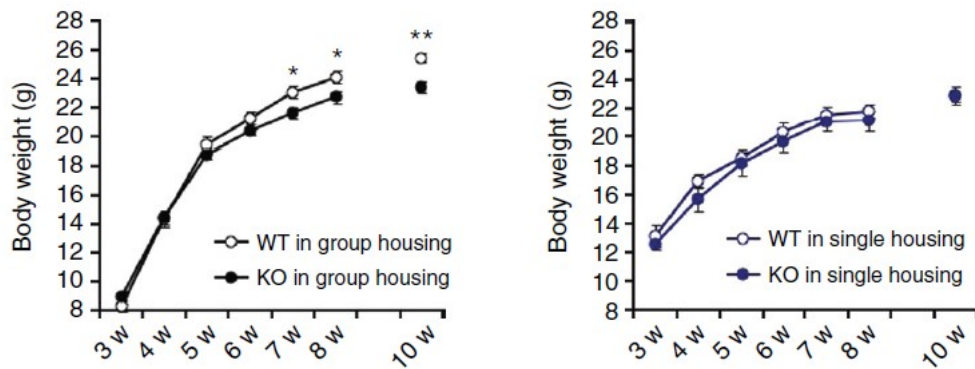


図1. Lrln2欠損 (KO) と野生型 (WT) オスマウスの生後体重変化

左図、集団飼育；右図、単独飼育。各点は平均値、エラーバーは標準誤差。n = 10 マウス (各遺伝子型)。\*P < 0.05; \*\*P < 0.01, t-test. 文献8) より引用。

このことから、我々はこのマウスの社会性に問題があるのではないかと考え、社会性行動を調べるいくつかの実験を行った。居住者侵入者試験では Lrln2 欠損マウスは床敷の下にもぐって逃避し、他者との接触を避ける様子が観察された。また、かごに入れられた初見マウスに近づく回数も減っていた。超音波発生の頻度も Lrln2 欠損マウスでは減っており、音声によるコミュニケーションにも異変が生じていると思われた。以上の社会性行動に関係した異常の他に固執性の増強や感覚情報処理の異常も観察された。

## 2. Lrln2 欠損マウスにおける記憶機能およびシナプス可塑性の異常<sup>8)</sup>

Lrln2 欠損マウスでは記憶力が良くなっていることがわかった。それは、周囲の風景と迷路のゴールの位置との関係覚える「空間記憶」と、ある場所に行く嫌な刺激（電気刺激）がくると覚える「恐怖記憶」の両者に当てはまる。これらの記憶は、体験したことをその場所や自分の状況と結び付けて覚えておくことが必要なので、「エピソード記憶」と呼ばれる。

エピソード記憶を形成や想起には、海馬が重要な役割を果たすことが知られている。我々は正常マウス脳での Lrln2 タンパク質の分布を調べたところ、海馬や大脳皮質のシナプスに多く分布し、特に海馬の生後発達の過程で Lrln2 タンパク質の量が増加することを見いだした。そこで、Lrln2 欠損マウスの海馬のシナプスの性質を調べてみたところ、興奮性シナプス後部の足場タンパク質 PSD-95 の量が減っており、興奮性シナプス後部がある突起が細長くなっていることがわかった (図2)。

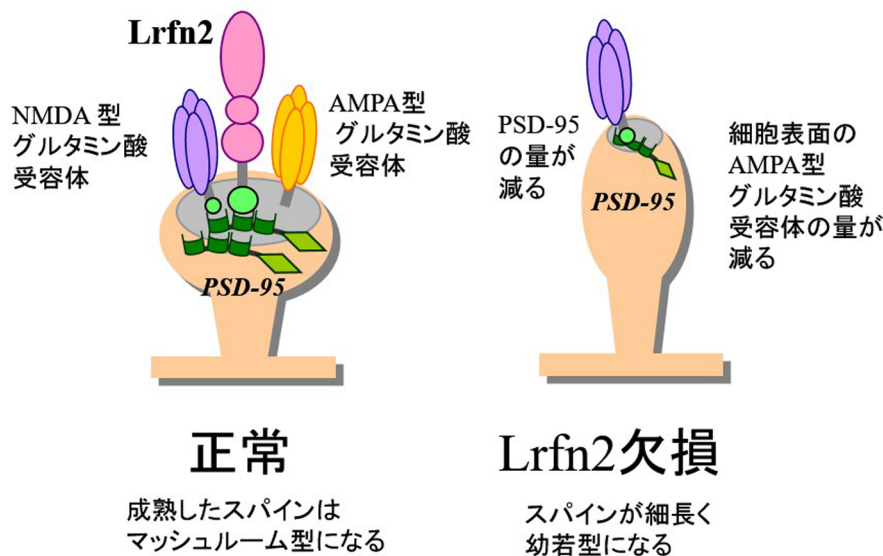


図2. Lrfn2欠損マウスのシナプス異常  
形態学的解析、電気生理学的解析、分子マーカー解析の結果に基づく。

この突起はスパイン（棘突起）と呼ばれ、正常マウスでは脳が発達していく過程で太く、短くなっていき、マッシュルームの様な形のものが増える。

次にシナプス可塑性がどのように変化するかを調べた。海馬のシナプスに頻度の高い電気刺激を与えてやるとシナプスの伝達効率が上がった状態が長く続くことが知られている。この性質はシナプス伝達の長期増強と呼ばれ、記憶の基礎になるものと考えられている。Lrfn2欠損マウスのシナプス伝達の長期増強は正常マウスよりも上がっており、可塑性が高いと考えられた。

最近の研究では海馬のCA1と呼ばれる領域のシナプス伝達の長期増強には、AMPA型のグルタミン酸受容体がシナプス後部の細胞表面に出てくることが関係していることが示されている。そこで、Lrfn2欠損マウスのシナプス後部でPSD-95と同じ場所に存在しているAMPA型グルタミン酸受容体タンパク質の量を測ってみたところ、減少していた(図2)。逆に培養した神経細胞にLrfn2を過剰に産生させてやると、細胞表面にでてくるAMPA型グルタミン酸受容体タンパク質の量が増え、この働きにはLrfn2とPSD-95の結合が必要なことが示された。これらの結果から、海馬が発達する過程でLrfn2がシナプスを成熟させるものと考えられた。

### 3. 発達障害患者に見られたLrfn2機能低下型変異<sup>8)</sup>

我々はマウスに現れた行動の異常が自閉スペクトラム症や統合失調症の患者の症状と一部類似すると考え、自閉症および統合失調症患者および健康人由来伝子材料を用いてLrfn2の遺伝子変異探索を行った。その結果、患者群にのみ認められるミスセンス変異(タンパク質の構造に影響がでる遺伝子変異)があることがわかった。細胞培養した海馬の神経細胞に正常のLrfn2タンパク質、ミスセンス変異を持つLrfn2タンパク質を産生させて比較したところ、患者由来のミスセンス変異を持つLrfn2は細胞内での分布が異常になり、PSD-95と結合する能力が下がることがわかった。

以上の結果はLrfn2が脳の発達に伴うシナプスの成熟に重要であることを示している。その欠乏は神経発達障害に近い病態を引き起こすのではないかと考えられた。最近、報告された家系研究や遺伝子関連研究で、ヒトのLrfn2を産生する遺伝子近傍の構造変化が学習障害、反社会性パーソナリティ障害へ関与する可能性が示されている<sup>9,10)</sup>。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は文献8の共著者である。本研究を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, et al. *Elfn1* recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun.* 2014;5:4501. doi: 10.1038/ncomms5501. PubMed PMID: 25047565.
- 2) Tekin M, Chioza BA, Matsumoto Y, Diaz-Horta O, Cross HE, Duman D, et al. *SLITRK6* mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J Clin Invest.* 2013;123(5):2094-102. doi: 10.1172/JCI65853. PubMed PMID: 23543054; PubMed Central PMCID: PMC3635725.
- 3) Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, et al. Selective control of inhibitory synapse development by *Slitrk3*-PTPdelta trans-synaptic interaction. *Nat Neurosci.* 2012;15(3):389-98, S1-2. doi: 10.1038/nn.3040. PubMed PMID: 22286174; PubMed Central PMCID: PMC3288805.
- 4) Takashima N, Odaka YS, Sakoori K, Akagi T, Hashikawa T, Morimura N, et al. Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking *Lrrtml*, a gene associated with schizophrenia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22716. doi: 10.1371/journal.pone.0022716. PubMed PMID: 21818371; PubMed Central PMCID: PMC3144940.
- 5) Matsumoto Y, Katayama K, Okamoto T, Yamada K, Takashima N, Nagao S, et al. Impaired auditory-vestibular functions and behavioral abnormalities of *Slitrk6*-deficient mice. *PLoS One.* 2011;6(1):e16497. doi: 10.1371/journal.pone.0016497. PubMed PMID: 21298075; PubMed Central PMCID: PMC3027700.
- 6) Katayama K, Yamada K, Ornthanalai VG, Inoue T, Ota M, Murphy NP, et al. *Slitrk1*-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. *Mol Psychiatry.* 2010;15(2):177-84. doi: 10.1038/mp.2008.97. PubMed PMID: 18794888.
- 7) Katayama K, Zine A, Ota M, Matsumoto Y, Inoue T, Fritzsche B, et al. Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of *Slitrk6*-deficient mice. *PLoS One.* 2009;4(11):e7786. doi: 10.1371/journal.pone.0007786. PubMed PMID: 19936227; PubMed Central PMCID: PMC2777407.
- 8) Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama K, Hatayama M, Tomioka NH, et al. Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfrn2*/*SALM1*-deficient mice. *Nat Commun* 2017;8:15800. doi: doi:10.108/ncomms15800.
- 9) Thevenon J, Souchay C, Seabold GK, Dygai-Cochet I, Callier P, Gay S, et al. Heterozygous deletion of the *LRFN2* gene is associated with working memory deficits. *European journal of human genetics : EJHG.* 2015. doi: 10.1038/ejhg.2015.221. PubMed PMID: 26486473.
- 10) Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature.* 2011;474(7351):380-4. doi: 10.1038/nature10110. PubMed PMID: 21614001; PubMed Central PMCID: PMC3607626.