

課題番号	LS123
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	シナプス伝達制御機構とその破綻によるシナプス疾患の病態機構の解明
研究機関・ 部局・職名	生理学研究所・細胞器官研究系・教授
氏名	深田 正紀

1. 当該年度の研究目的

<p>AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) は脳内の興奮性シナプス伝達の大部分を司るので、この受容体のシナプス輸送や機能がどのように制御されているかは現在の脳科学において明らかにすべき最重要課題の一つである。本研究では私達が独自に発見したシナプス伝達を制御する 1) 新規のリガンド・受容体 (LGI1/ADAM22)、および 2) 新規の酵素群 (パルミトイル化脂質修飾酵素 DHHC 蛋白質) を手がかりに AMPA 受容体を介したシナプス伝達の根幹的な制御機構を解明し、精神・神経疾患の病態解明を目指す。</p> <p>平成 25 年度は具体的に以下の点について研究を進めることを目的とした。</p> <p>1) LGI1 による AMPA 受容体制御機構とてんかん発症機序の解明</p> <p> a) LGI1 自己抗体の作用機序の解明、b) ヒト LGI1 変異体の病態機構の解明</p> <p> c) LGI1 機能異常により生じるてんかん発作の原因となる神経回路の同定</p> <p>2) パルミトイル化サイクルによる AMPA 受容体制御機構の解明</p> <p> a) パルミトイル化 PSD-95 動態の可視化、b) PSD-95 脱パルミトイル化酵素の同定</p>
--

2. 研究の実施状況

<p>1) LGI1 による AMPA 受容体制御機構とてんかん発症機序の解明</p> <p>a) LGI1 自己抗体の作用機序の解明</p> <p>最近けいれんや記憶障害を引き起こす自己免疫性辺縁系脳炎 (LE) 患者が LGI1 に対する自己抗体を有することが報告された。私達は LGI1 抗体の作用機序がてんかん・けいれん発症機序を説明しているのではないかと考え、LE 患者血清を網羅的に解析して、LGI1 抗体が LE 患者で最も高頻度に出現し、単独で LE と関連することを明らかにした。また、LGI1 抗体が LGI1 と ADAM22 受容体との結合を阻害し、シナプスにおける AMPA 受容体数を低下させることを明らかにした (Ohkawa et al., J Neurosci 2013)。さらに、本研究をきっかけに、LGI1 以外にも、さまざまなシナプス伝達関連分子が脳炎患者における自己抗体の標的となっていることを新規に同定し、その作用機構を明らかにした (Ohkawa et al., J Neurosci 2013 および 2014 in press)。</p> <p>b) ヒト LGI1 変異体の病態機構の解明</p> <p>平成 24 年度までにヒトてんかん患者で報告されている 22 種類の LGI1 変異体を分泌不全型と分泌</p>
--

様式19 別紙1

型に分類し、2種類のヒトてんかんモデルマウスを作製した。平成25年度はこれらLGI1変異体の個体レベルの病態を詳細に明らかにし、病態に基づく治療法の開発について検討した(Yokoi et al., 査読実験中)。

c) LGI1機能異常により生じるてんかん発作の原因となる神経回路の同定

平成24年度に引き続き、LGI1ノックアウト(KO)マウスの海馬神経細胞種毎にLGI1を発現させ、LGI1KOマウスでのてんかんが救済されるかを検討している。ある細胞種でのLGI1の発現がてんかん表現型を部分的に救済することを明らかにした(投稿準備中)。また、LGI1KOマウスの海馬歯状回にてAMPA受容体の発現が低下していることを見出した。

2) パルミトイル化サイクルによるAMPA受容体制御機構の解明

a) パルミトイル化 PSD-95 動態の可視化

パルミトイル化 PSD-95 を平成24年度までに開発した新規プローブと超解像顕微鏡を用いて可視化することにより、一つのスパイン構造内に複数のナノドメインを発見し、これら個々のナノドメインがAMPA受容体をアンカリングしていることを見出した(Fukata et al., J Cell Biol 2013)。

b) 平成25年度は平成24年度に単離した脱パルミトイル化酵素候補遺伝子群の生理機能の解析を進めた(投稿準備中)。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計6件
計7件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kegel L, Jaegle M, Driegen S, Aunin E, Leslie K, Fukata Y, Watanabe M, <u>Fukata M</u>, Meijer J. Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. Development 141:1749-1756 (2014) ISSN: 0950-1991 2. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, Watanabe M, Watanabe O, <u>Fukata M</u>. Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. J Neurosci. 33:18161-18174 (2013) ISSN 0270-6474, http://www.jneurosci.org/content/33/46/18161.long 3. Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer, O, Perez, F, <u>Fukata M</u>. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. J Cell Biol. 202:145-161 (2013) ISSN: 1540-8140 4. Oku S, Takahashi N, Fukata Y, <u>Fukata M</u>. <i>In silico</i> screening for palmitoyl substrates reveals a role for DHHC1/3/10 (zDHHC1/3/11)-mediated neurochondrin palmitoylation in its targeting to Rab5-positive endosomes. J Biol Chem. 288:19816-19829 (2013) ISSN: 0021-9258 5. Zheng B, Deran M, Li X, Liao X, <u>Fukata M</u>, Wu X. 2-bromopalmitate analogues as activity-based probes to explore palmitoyl acyltransferases. J Am Chem Soc. 135:7082-7085 (2013) ISSN: 0002-7863 6. Kawahara A, Kurauchi S, Fukata Y, Martínez-Hernández J, Yagihashi T, Itadani Y, Sho R, Kajiyama T, Shinzato N, Narusuye K, <u>Fukata M</u>, Luján R, Shigemoto R, Ito I. Neuronal major histocompatibility complex class I molecules are implicated in the generation of asymmetries in hippocampal circuitry. J Physiol. 591:4777-4791 (2013) ISSN: 0022-3751
	(掲載済み一査読無し) 計0件
	(未掲載一査読有り) 計1件
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ohkawa T, Satake S, Yokoi N, Miyazaki Y, Ohshita T, Sobue G, Takashima H, Watanabe O, Fukata Y, <u>Fukata M</u>. Identification and characterization of GABA_A receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis. J Neurosci. in press

様式19 別紙1

<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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 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」岡崎 (2013/6/6-7) 生理学研究所主催 2. <u>Fukata M</u> Role of synaptic DHHC2 palmitoyl transferase in the postsynaptic subdomain organization. FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains Vermont, USA (2013/7/14-19) (国際招待講演) Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB) 主催 3. Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, <u>Fukata M</u> Local PSD-95 palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains Vermont, USA (2013/7/14-19) Federation of American Societies For Experimental Biology (FASEB) 主催 4. <u>Fukata M</u> Direct imaging of palmitoylated PSD-95 in neurons. IUPS2013 Symposium. Birmingham, UK ((2013/7/22-26)) (国際招待講演) International Union of Physiological Sciences (IUPS) 主催 5. <u>深田正紀</u> シナプス伝達制御の中心的機構とその破綻～新しいてんかん分子病態の解明～ がん・ゲノム・脳 支援活動 3 領域合同シンポジウム 東京 (2013/8/6) (招待講演) 新学術領域研究「生命科学系 3 分野支援活動」主催 6. Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, <u>Fukata M</u> Pathogenic mechanism of epilepsy-related LGI1 mutations in vivo. The 3rd NIPS-CIN Joint Symposium 岡崎 (2013/10/10) 生理学研究所主催 7. Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, <u>Fukata M</u> Molecular pathogenic mechanisms of epilepsy caused by LGI1 mutations 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, CA (2013/11/9-13) Society for Neuroscience 主催 8. <u>Fukata M</u>, Sekiya A, Murakami T, Perez F, Fukata Y Role of synaptic palmitoylation cycles in the postsynaptic subdomain organization 第 36 回日本分子生物学会 神戸 (2013/12/4) (招待講演) 日本分子生物学会主催 9. Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata Y, <u>Fukata M</u> Identification and Characterization of Depalmitoylating Enzyme Family in Neurons 第 36 回日本分子生物学会 神戸 (2013/12/4) 日本分子生物学会主催 10. Murakami T, Sekiya A, Fukata Y, <u>Fukata M</u> Regulatory mechanism of H-Ras trafficking by novel depalmitoylating enzymes 第 36 回日本分子生物学会 神戸 (2013/12/3-6) 日本分子生物学会主催 <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書 計 0 件</p>	<p>計 0 件</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	<p>1. プレスリリース「けいれん・記憶障害をきたす自己免疫性辺縁系脳炎の病態を解明」 自然科学研究機構 生理学研究所 http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2013/11/-lgi1.html</p> <p>2. プレスリリース「神経と神経の“つなぎ目”（シナプス）の「数」と「サイズ」は、どのように決まっているの？」 自然科学研究機構 生理学研究所 http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2013/07/-dhhc2.html</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>出前授業、2013/10/10、岡崎市（岡崎市立北中学校） （対象者）中学2年生 241名 （内容）「細胞の動く仕組み」について動画を用いた授業を行い、生命科学に興味を抱いてもらえるような機会となるよう努めた。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計5件	<p>1. 中日新聞(H25.11.13日3面) “けいれん、記憶障害の脳疾患：自己抗体量で早期診断” 2. 科学新聞(H25.11.22日1面) “けいれん、記憶障害来す自己免疫性辺縁系脳炎 生理研の研究グループ病態を解明” 3. 中日新聞(H25.7.9日3面) “神経細胞間の情報 情報場所つくる酵素発見” 4. 日経産業新聞(H25.7.12日10面) “脳神経細胞つなぎ目変化 酵素の働きが関与” 5. 科学新聞(H25.7.26日12面) “生きたシナプス変化 ダイナミックに観察”</p>
その他	<p>1. Faculty of 1000 (F1000Prime) による推薦（上記雑誌論文 2） http://f1000.com/prime/718175488 2. Faculty of 1000 (F1000Prime) による推薦（上記雑誌論文 3） http://f1000.com/prime/718042748</p>

4. その他特記事項

該当無し。

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	133,000,000	113,000,000	20,000,000	0	0
間接経費	39,900,000	33,900,000	6,000,000	0	0
合計	172,900,000	146,900,000	26,000,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	9,008,117	20,000,000	0	29,008,117	29,008,117	0	0
間接経費	29,913,931	6,000,000	0	35,913,931	35,913,931	0	0
合計	38,922,048	26,000,000	0	64,922,048	64,922,048	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	25,409,373	スライスパッチクランプシステム、実験試薬等
旅費	280,600	研究成果発表旅費(米国、広島、神戸)
謝金・人件費等	672,178	技術支援員人件費
その他	2,645,966	動物飼育費、Paradigm MS2保守契約費、論文掲載費等
直接経費計	29,008,117	
間接経費計	35,913,931	
合計	64,922,048	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
Protein A Sepharose 他1式	GEヘルスケア	1	879,749	879,749	2013/4/3	生理学研究所
牛胎児血清他1式	SAFC	1	560,652	560,652	2013/4/5	生理学研究所
QIAfilter Plasmid Midi Kit (25)他1式	キアゲン	1	555,697	555,697	2013/4/19	生理学研究所
B-27添加物他1式	ライフテクノロジー	1	755,095	755,095	2013/8/9	生理学研究所
スライスパッチク ランプシステム	フィジオテック社 製 SP-Phy-SYS- 1	1	12,638,246	12,638,246	2014/2/14	生理学研究所
Vectastain Elite ABC Standard kit 他1式	ベクター	1	686,054	686,054	2014/2/28	生理学研究所