

—— 研究助成報告 ——

遺伝性側頭葉てんかんの分子・回路病態の解明

Molecular and circuit mechanisms for familial temporal lobe epilepsy

深 田 優 子^{1, 2)}

要旨：てんかんは人口の約1%に見られる頻度の高い神経疾患であるが、治療困難な症例も存在し分子病態の解明が求められている。ある種の家族性てんかんの原因遺伝子産物LGI1は、神経細胞が分泌する蛋白質の一つで、ADAM22ファミリー蛋白質を受容体として機能する。*Lgii*遺伝子変異の多くは、LGI1蛋白質の分泌不全あるいはADAM22ファミリーとの結合不全を引き起こす。また、痙攣と記憶障害を呈する自己免疫性脳炎患者の多くで見出される抗LGI1自己抗体は、LGI1とADAM22の結合を阻害する。我々は、てんかんの分子病態を明らかにするために、LGI1-ADAM22リガンド・受容体複合体の立体構造を決定し、LGI1-ADAM22がシナプス間を架橋する高次複合体を形成する可能性を示した。さらに、この立体構造に基づき、発症原因が不明であったヒトLGI1変異のてんかん病態機構を明らかにした。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2020；31：17-24

Key Words：LGI1, ADAM22, ADLTE, Limbic encephalitis, autoantibody

【序論】

近年のヒトやマウスの遺伝学的知見の蓄積により、遺伝学的要因によるてんかん（特発性てんかん）の原因遺伝子の多くは、神経細胞の興奮性やシナプス伝達を制御するイオンチャネルをコードしていることが明らかになってきた。これらの知見は現在の抗てんかん薬の大半がイオンチャネルを作用点とすることとよく合致している。しかし、これら抗てんかん薬でコントロール可能な症例がある一方で、難治性の症例も存在し、副作用の問題も残されている。したがって、イオンチャネル以外の新たな作用点を有するてんかん治療薬の開発は医学的・社会的観点からも重要課題の一つで

ある。LGI1は常染色体優性外側側頭葉てんかん（Autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy; ADLTE）患者の約50%で変異が見られる神経系に特異的な分泌蛋白質である¹⁻³⁾。興味深いことに、LGI1はけいれんと記憶障害を呈する自己免疫性辺縁系脳炎の主要な標的抗原としても多くの症例が報告されており^{4, 5)}、LGI1の脳機能および脳病態における役割に注目が集まっている。私共はこれまでにLGI1とその受容体ADAM22が、脳内の主要な興奮性シナプス伝達を司るAMPA型グルタミン酸受容体の制御分子であることを見出した⁶⁾。また、てんかん表現型を示す*Lgii*遺伝子欠損（KO）および変異マウスと*Adam22*遺伝子 KOマウスの解析、さらに辺縁系脳炎におけるLGI1自己抗体の作用

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

²⁾総合研究大学院大学 生命科学研究所 生理科学専攻

機構の解析を通じて、LGIIとADAM22の結合量の低下がAMPA受容体を介したシナプス伝達を低下させることを見出してきた⁷⁻¹²⁾。本研究では、LGII-ADAM22リガンド-受容体の機能欠損が、どのようにしててんかん病態をひき起こすのかを明らかにするために、リガンド-受容体の分子構造に着目して検討した。

【方法】

1) LGII-ADAM22蛋白質複合体の構造解析

ヒトLGII蛋白質（全長およびLRRドメイン、EPTPドメイン（Fig. 1A）を含む領域）（His6タグ融合）とヒトADAM22蛋白質（細胞外領域）をExpi293F細胞に共発現させた。培養上清からNi-NTAカラム（Qiagen）およびゲル濾過カラム（GE healthcare, Superdex200）クロマトグラフィーを用いてLGII-ADAM22複合体を精製した。続いて、精製複合体結晶のX線結晶構造解析（BL41XU, SPring-8）を行い、LGII全長-ADAM22複合体、LGII EPTPドメイン-ADAM22複合体およびLGII LRRドメインの結晶構造を決定した（東京大学、山形敦史博士、深井周也博士らとの共同研究）。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱測定法（size exclusion chromatography-multi angle light scattering, SEC-MALS）、サイズ排除クロマトグラフィー-小角散乱測定法（size exclusion chromatography-small angle X-ray scattering, SEC-SAXS）および低温電子顕微鏡（Cryo-EM）法（理化学研究所、重松秀樹博士らとの共同研究）により、詳細なLGII全長-ADAM22複合体の立体構造情報を得た。得られた構造情報に基づき、LGIIおよびADAM22蛋白質のさまざまな点変異体を作製し、HEK293T細胞発現系を用いたpull-down法をおこない、LGII-ADAM22複合体形成を担うアミノ酸残基を決定した。

2) LGII遺伝子変異マウスの作製と解析

得られた構造情報と報告されているADLTEにおけるLGII変異^{10, 13-16)}（Fig. 1A）に基づき、ヒトてんかん変異R474Qを有するLGII変異マウスを作製した。具体的には、*LgiI*野生型遺伝子 $LgiI^{WT}$ あるいは変異遺伝子 $LgiI^{R474Q}$ を $Thy1.2$

プロモーター下流で発現するトランスジェニックマウスを作製した（生理学研究所、平林真澄博士らとの共同研究）。これらのトランスジェニックマウス系統とLGII遺伝子欠損（KO）マウス系統⁷⁾を交配させて、 $LgiI^{-/-WT}$ あるいは変異マウス $LgiI^{-/-R474Q}$ を得て、その表現型を比較した。また、得られた変異マウス脳内のLGII-ADAM22複合体の存在様式を調べるため、ADAM22抗体を用いて脳粗抽出液からの免疫沈降実験を行った。

3) 自己免疫性脳炎患者由来のモノクローナルLGII自己抗体を用いた分子病態解析

自己免疫性脳炎患者脳脊髄液（CSF）中のB細胞由来の遺伝子組換えモノクローナル抗体群から単離されたLGIIに反応する2クローンについて（ドイツDZNE, Prüss博士らとの共同研究）、その反応特異性を $LgiI$ 遺伝子KOマウスの新鮮凍結脳切片を用いて免疫組織学的に調べた。また各クローンの抗原認識特性と生物学的特性（LGII-ADAM22結合に及ぼす影響）を、COS7細胞を用いたCell-based binding assay（CBA）⁸⁾で調べた。さらにマウス海馬組織培養を用いて、各クローンの神経細胞興奮特性に対する影響を電気生理学的に調べた（ドイツDZNE, Kornau博士らとの共同研究）。

本研究の動物実験、遺伝子組換え実験およびヒト試料を用いた実験は、各所属機関で承認を得た実験計画に基づき実施したものである。

【結果】

1) LGII-ADAM22蛋白質複合体の結晶化に成功し、大型放射光施設SPring-8の高輝度X線を利用したX線結晶構造解析により、その立体構造を決定した。LGII-ADAM22 2者の結合は、LGIIのEPTPドメインとADAM22のメタロプロテアーゼドメインの間で起こることが初めて明らかになった（Fig. 1A, B）。両者の結合面に位置する点変異体を多数作成し、pull-down法による結合活性を調べた結果、LGIIとADAM22の結合は、疎水性相互作用が中心的役割を果たしていることが明らかになった。さらに、LGII全長とADAM22からなる複合体は、2つのLGII分子と2つのADAM22分子で構成されたヘテ

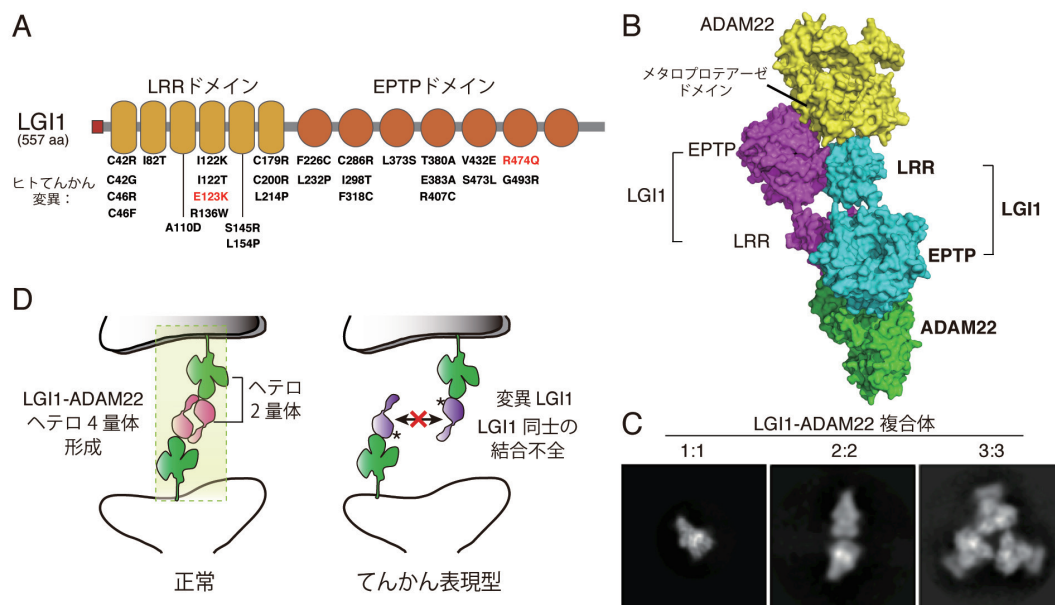


Fig. 1 LGI1-ADAM22リガンド-受容体の分子構造 (文献17から改変して引用)

- A. LGI1の1次構造とヒトてんかんADLTE家系で見出されたミスセンス変異：ADLTE患者で見られるE123K変異とR474Q変異は、LGI1-LGI1間の結合面に位置する (赤)。
- B. X線結晶構造解析で決定した2つのLGI1-ADAM22複合体 (ヘテロ2量体) が結合したヘテロ4量体の立体構造：LGI1とADAM22間の結合は、LGI1のEPTPドメインとADAM22のメタプロテアーゼドメイン間でおこる。また、LGI1-LGI1間の結合は、互いのLRRドメインとEPTPドメイン間でおこる。
- C. LGI1-ADAM22複合体の低温電子顕微鏡観察像：LGI1-ADAM22ヘテロ2量体 (1:1)、2つのLGI1-ADAM22ヘテロ2量体からなるヘテロ4量体 (2:2)、および3つのLGI1-ADAM22ヘテロ2量体からなるヘテロ6量体 (3:3)。
- D. LGI1-ADAM22複合体によるシナプス間連結モデル

ロ4量体構造を示した (Fig. 1B)。すなわち、LGI1とADAM22からなるヘテロ2量体がLGI1同士の相互作用を介して会合してヘテロ4量体を形成していた。LGI1同士の相互作用は、異なる2つのLGI1のLRRドメインとEPTPドメインの間の会合によるものであった (Fig. 1B)。低温電子顕微鏡法 (Fig. 1C; 2:2)、SEC-MALS法やSEC-SAXS法を用いた解析でもヘテロ4量体形成を示す結果が得られた。3つのLGI1-ADAM22ヘテロ2量体がLGI1同士の相互作用を介して会合した複合体 (6量体) も存在することも分かった (Fig. 1C; 3:3)。LGI1-ADAM22ヘテロ4量体の長径は約19 nmであり、シナプス間隙の距離 (約20nm) に良く合致すると考えられた。このヘテロ4量体構造は、「LGI1-ADAM22蛋白

質複合体がシナプス間を架橋する」可能性を強く裏付ける結果であった (Fig. 1D)¹⁷⁾。

2) ヘテロ4量体構造において、LGI1同士の会合を担うアミノ酸残基の2つが、ヒトてんかん家系で報告されている変異アミノ酸 (LRRドメイン内E123KとEPTPドメイン内R474Q; Fig. 1A) と一致することを見出した。とくに、R474Q変異は、LGI1の分泌やADAM22との結合には影響を与えないことが分かっており¹⁰⁾、その病態機構は不明であった。精製蛋白質を用いたSEC-MALS法により、LGI1 R474Q変異はADAM22との結合 (ヘテロ2量体形成) には影響しないが、ヘテロ4量体形成を阻害することが分かった。このLGI1 R474Q変異を有する変異マウス *Lgi1*^{-/-R474Q} を作製したところ、*Lgi1* 遺

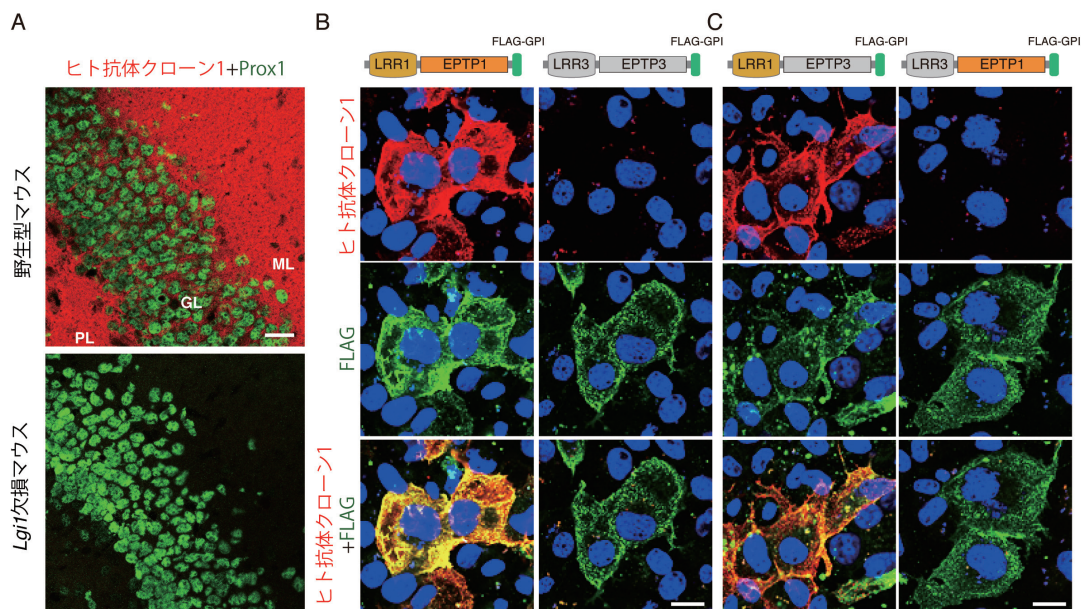


Fig. 2 自己免疫性脳炎患者由来抗LGI1モノクローナル抗体の性状 (文献18から改変して引用)

- A. 自己免疫性脳炎患者由来の組換え抗体クローン群のうち抗体クローン1 (赤) は、野生型マウス脳組織に対する強い結合活性を示した (海馬歯状回: ML, 分子層; GL, 顆粒細胞層; PL, 多型細胞層)。一方、このクローンは *Lgi1* 遺伝子を欠損したマウス脳組織には全く結合しなかった。
- B, C. 抗体クローン1のエピトープ解析: LGI1あるいはLGI3 (B), LGI1とLGI3のキメラ蛋白質⁸⁾ (LRR1, LGI1のLRRドメイン; LRR3, LGI3のLRRドメイン; EPTP1, LGI1のEPTPドメイン; EPTP3, LGI3のEPTPドメイン) (C) を、COS7細胞表面に発現させた (FLAGタグ, 緑)。抗体クローン1 (赤) は、LGI1に特異的な結合活性を示し、LGI1のLRRドメイン (LRR1) に選択的に結合した。スケールバー: 20 μ m

伝子KOマウス *Lgi1*^{-/-}と同様の致死性てんかんが起きた。生化学実験により、*Lgi1*^{-/-:R474Q}変異マウス脳では、LGI1-ADAM22間の結合が保たれていたが、LGI1同士の相互作用が起これず、LGI1-ADAM22ヘテロ4量体形成が大きく低下していた (Fig. 1D)¹⁷⁾。

3) 免疫組織学的解析により、自己免疫性脳炎患者のCSF細胞から単離された組換えモノクローナル抗体の中のうち2クローンについて、*Lgi1* 遺伝子KOマウスの脳切片における反応性が完全に消失することを示した (Fig. 2A)。LGI1とLGI3に対する反応性 (Fig. 2B), さらにLGI1-LGI3キメラ蛋白質に対する反応性から、各クローンの抗原認識部位が、それぞれLRRドメイン (Fig. 2C) あるいはEPTPドメインであることが分かった。過去の患者血清を用いた実験結果⁸⁾ や上記LGI1-ADAM22構造解析の結

果と一致して、EPTPドメインに対する抗体クローンは、LGI1とADAM22との結合を効率良く阻害した。一方、LRRドメインに対する抗体クローンはLGI1-ADAM22結合に影響を与えなかった。興味深いことに、マウス海馬組織を各抗体クローンで処理して、電気生理学的に海馬神経細胞の興奮性を評価したところ、いずれのクローンも神経細胞の興奮性を上昇させた¹⁸⁾。

【考察】

本研究により、てんかん発症と強く関連するLGI1-ADAM22リガンド-受容体の構造基盤が初めて明らかになった¹⁷⁾。LGI1-ADAM22はLGI1同士の会合を介して高次複合体を形成しており、LGI1-ADAM22ヘテロ4量体は、脳内でシナプス間を架橋する“経シナプス (trans-synaptic)”構造体として機能しうると考えられ

た。さらに、家族性てんかんの変異のひとつを導入したマウスを用いて、LGII-ADAM22ヘテロ4量体形成不全がてんかんの原因となることを示した (Fig. 1D)。LGII分子間の結合不全 (4量体形成不全) によるてんかん発症の病態機構は、これまでのLGII-ADAM22結合不全とは異なる新しい病態機構であった。本変異マウスは、ヒトてんかんモデルとして有用と考えられる。最近、超解像顕微鏡を用いたシナプス蛋白質の詳細な局在解析から、シナプス内部には、これまで知られていなかったナノメートルサイズのドメイン (ナノドメイン) が存在することが示された^{19, 20)}。このナノドメインは神経伝達物質が放出されるシナプス前部と、その受容体が配置されているシナプス後部の両側に存在し、両者は正確に対面配置する (経シナプス・ナノカラム説)²¹⁾。この精緻な対面配置が損なわれると、本来の正確で、効率のよいシナプス伝達が損なわれると考えられる。LGII-ADAM22ヘテロ4量体は経シナプス・ナノカラムの構成因子の一つとして機能し、この破綻がシナプス伝達の異常を惹起し、てんかん病態へと結びつく可能性がある (Fig. 1D)。

我々はてんかん病態機構の理解のための別のアプローチとして自己免疫性脳炎の分子病態解析もおこなった¹⁸⁾。辺縁系脳炎患者由来の抗LGII抗体には、LRRドメインをエピトープとし、LGII-ADAM22間の結合を阻害しないクローンも含まれていた (抗LRR抗体)。抗LRR抗体は、LGII-ADAM22間の結合を阻害する抗体 (抗EPTP抗体) と同様に、神経細胞の興奮特性を変化させることから、病原性抗体であると考えられた。LGII-ADAM22の構造解析の結果と併せて考えると、抗LRR抗体はLGII同士との結合を阻害し、LGII-ADAM22の高次複合体形成を低下させて脳炎病態に関与する可能性が示唆された。これまでLGIIのLRRドメインの機能は明らかではなかったが、LRRドメインはLGII-ADAM22の機能発現と病態機構に深く関与すると考えられる。現在も自己免疫性脳炎と関連する自己抗体が次々と明らかになっている^{12, 22-24)}。今後も、組換え抗体技術と組み合わせで多くの抗体クローンを単離することにより、

LGII自己抗体の作用機構と病態との関連が詳細に解明されるだろう。

【付記】

本研究の一部は、文献に記載した17, 18として公表されている (図を一部改変して引用した)。

【謝辞】

本研究は、生理学研究所 深田正紀教授のもと、宮崎裕理博士、横井紀彦博士らとともに行った。また、共同研究を強力に推進して下さった東京大学定量生命科学研究所 深井周也博士、山形敦史博士、理化学研究所 重松秀樹博士、生理学研究所 平林真澄博士、DZNE Prüss博士、Kornau博士らに深く感謝いたします。てんかん治療研究振興財団の多大なるご支援に深く感謝いたします。

【文献】

- 1) Gu W, Brodtkorb E, Steinlein OK. LGII is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. *Ann Neurol* 2002 ; **52** : 364-367.
- 2) Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, et al. Mutations in LGII cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002 ; **30** : 335-341.
- 3) Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Sáenz A, Poza JJ, Galán J, et al. Mutations in the LGII/Epileptin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 2002 ; **11** : 1119-1128.
- 4) Lai M1, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGII as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels : a case series. *Lancet Neurol* 2010 ; **9** : 776-785.
- 5) Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. 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* 2010 ; **133** : 2734-2748.
- 6) Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Brecht DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 2006 ; **313** : 1792-1795.
 - 7) Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, et al. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; **107** : 3799-3804.
 - 8) Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, et al. Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci* 2013 ; **33** : 18161-18174.
 - 9) Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA. The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; **112** : E4129-4137.
 - 10) Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, et al. Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nat Med* 2015 ; **21** : 19-26.
 - 11) Fukata Y and Fukata M. Epilepsy and synaptic proteins. *Curr Opin Neurobiol* 2017 ; **45** : 1-8.
 - 12) Fukata M, Yokoi N, Fukata Y. Neurobiology of autoimmune encephalitis. *Curr Opin Neurobiol* 2018 ; **48** : 1-8.
 - 13) Nobile C, Michelucci R, Andreazza S, Pasini E, Tosatto SC, Striano P. LGI1 mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy. *Hum Mutat.* 2009 ; **30** : 530-536.
 - 14) Berkovic SF, Izzillo P, McMahon JM, Harkin LA, McIntosh AM, Phillips HA, et al. LGI1 mutations in temporal lobe epilepsies. *Neurology* 2004 ; **62** : 1115-1119.
 - 15) Pizzuti A, Flex E, Di Bonaventura C, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, et al. Epilepsy with auditory features : a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism. *Ann Neurol* 2003 ; **53** : 396-399.
 - 16) Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R. Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy : the first report from Asian families. *Epilepsia* 2010 ; **51** : 690-693.
 - 17) Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, Shigematsu H, Sato Y, Goto-Ito S, et al. Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22. *Nat Commun* 2018 ; **9** : 1546.
 - 18) Kornau HC, Kreye J, Stumpf A, Fukata Y, Parthier D, Sammons RP, et al. Human CSF monoclonal LGI1 autoantibodies increase neuronal excitability. *Ann Neurol* 2020 ; **87** : 405-418.
 - 19) Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer, O, Perez, F, Fukata M. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol* 2013 ; **202** : 145-161.
 - 20) Nair D1, Hosy E, Petersen JD, Constals A, Giannone G, Choquet D, et al. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J Neurosci* 2013 ; **33** : 13204-13224.
 - 21) Tang AH, Chen H, Li TP, Metzbowser SR, MacGillavry HD, Blanpied TA. A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 2016 ; **536** : 210-214.
 - 22) Giannoccaro MP, Wright SK, Vincent A. In vivo Mechanisms of Antibody-Mediated Neurological Disorders : Animal Models and Potential Implications. *Front Neurol* 2020 ; **10** : 1394.
 - 23) Yoshikura N, Kimura A, Fukata M, Fukata Y, Yokoi N, Harada N. et al. Long-term clinical follow-up of a patient with non-paraneoplastic

- cerebellar ataxia associated with anti-mGluR1 autoantibodies. J Neuroimmunol 2018 ; **319** : 63-67.
- 24) Hasegawa D, Ohnishi Y, Koyama E, Matsunaga S, Ohtani S, Nakanishi A, et al. Deleted in colorectal cancer (netrin-1 receptor) antibodies and limbic encephalitis in a cat with hippocampal necrosis. J Vet Intern Med 2019 ; **33** : 1440-1445.

Summary

Molecular and circuit mechanisms for familial temporal lobe epilepsy

Yuko Fukata

Affecting ~1% of the population, epilepsy is one of the most common neurological disorders. Epilepsy-related ligand-receptor complex, LGI1-ADAM22, regulates synaptic transmission and has emerged as a determinant of brain excitability, as their mutations and acquired LGI1 autoantibodies cause epileptic disorders in human. Here, to understand how the LGI1-ADAM22 interaction controls physiological brain functions in detail, we determined the first crystal structure of human LGI1-ADAM22 complex. The overall structure of the LGI1-ADAM22 complex reveals their 2 : 2 heterotetrameric assembly. We found that one of LGI1 mutations found in familial epilepsy, R474Q, disrupts the higher-order, heterotetrameric LGI1-ADAM22 complexes *in vitro* and also in a mouse model for familial epilepsy. These studies provide a novel epileptogenic mechanism and propose that LGI1-ADAM22 complex functions as the *trans*-synaptic machinery for precise synaptic transmission.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2020 ; 31 : 17-24

