

氏 名 宮崎 裕理

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2048 号

学位授与の日付 平成 30 年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Binding mode and physiological role of epilepsy-related
ligand/receptor LGI1-ADAM22 complex based on structural
analysis

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘
教授 深田 正紀
准教授 村田 和義
教授 田淵 克彦
信州大学 医学部

(様式3)

博士論文の要旨

氏 名 宮崎 裕理

論文題目 Binding mode and physiological role of epilepsy-related ligand/receptor LGI1-ADAM22 complex based on structural analysis

Leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) is a neuronal secretory protein, which is known as an epilepsy-related protein. To date, at least 42 mutations of human *LGII* have been reported in the patients with a familial epilepsy, autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE). A disintegrin and metalloprotease 22 (ADAM22), a catalytically inactive ADAM metalloprotease, serves as a receptor for LGI1. Although it has been reported that either genetic or acquired loss of the LGI1-ADAM22 interaction causes epileptic disorders, the structural basis of this interaction for pathogenesis of epilepsy is elusive and the physiological role of the LGI1-ADAM22 complex formation remains incompletely understood.

Here, I examined the mode of interaction of human LGI1-ADAM22 complex, based on the X-ray crystal structure determined by Dr. Fukai's group (The University of Tokyo). In the crystal, the LGI1-ADAM22 complex forms a 2:2 heterotetrameric assembly mediated by the intermolecular LGI1-LGI1 interaction. At first, to verify the interface of LGI1-ADAM22 heterodimer, I performed the site-directed mutagenesis of human *LGII* and *ADAM22* and the biochemical binding assay *in vitro*. I found that the hydrophobic interactions are essential and the hydrogen bonds play a secondary role for the interaction between the EPTP domain of LGI1 and the metalloprotease-like domain of ADAM22. I also elucidated that the interaction mode of LGI1 and ADAM22 is essentially conserved in that of LGI1 and ADAM23, which is closely related to

ADAM22 and is another receptor for LGI1.

Next, to gain structural insights into pathogenic mechanisms of ADLTE mutations on LGI1, I mapped 28 missense mutations onto the determined LGI1 structure. I found that secretion-defective ADLTE mutations are localized at the structural cores of LGI1, suggesting that the mutations destabilize the LGI1 protein structure leading to the misfolding. On the other hand, the secretion-competent mutations occur at the structural surface of LGI1, expected to affect protein-protein interactions.

I also focused on the heterotetrameric assembly of LGI1–ADAM22 complex. Previous biochemical studies reported that LGI1 may tether two receptors, ADAM22 and ADAM23, in the mouse brain and that LGI1-associated protein complexes contain both pre- and post-synaptic proteins. Given these findings and the conserved LGI1-binding interface in ADAM22 and ADAM23, I hypothesized that the higher-order complex including LGI1, ADAM22 and ADAM23 might be formed at the synaptic cleft and function as the *trans*-synaptically bridging complex. Interestingly, an ADLTE mutation of LGI1 (R474Q) occurs at the LGI1–LGI1 interface of the tetrameric assembly. I found that the R474Q mutation of LGI1 did not affect either its secretion or the ADAM22 binding *in vitro*, suggesting that loss of LGI1–LGI1 interactions is the pathogenic mechanism of a R474Q mutation of LGI1. To prove this hypothesis, I characterized the mouse model harboring the R474Q mutation (*Lgi1*^{R474Q}) generated by Dr. Hirabayashi's group (NIPS). *Lgi1*^{R474Q} mutant mice showed a lethal epileptic phenotype, as reported in *Lgi1* knockout mice. Immunoprecipitation of ADAM22 or ADAM23 from mouse brain extracts demonstrated that the R474Q mutation disrupted the higher-order assembly between LGI1–ADAM22 and LGI1–ADAM23 heterodimers mediated through the LGI1–LGI1 interaction. These results indicate that the *trans*-synaptic linkage mediated by LGI1–ADAM22 and LGI1–ADAM23 heteromers essentially functions for

physiological brain excitability.

Furthermore, I investigated the binding specificity of LGI family members (LGI1, 2, 3 and 4) to ADAM22, based on the structural prediction using the LGI1–ADAM22 complex structure as a template. Mutations of LGI family members were reported to be linked to various neurological disorders, including intellectual disability for human *LGI3*. Although individual LGI family proteins were reported to interact with ADAM22 *in vitro*, their relative contributions as ligands for ADAM22 in the brain remain unclear due to the lack of direct comparison of their binding properties. Here, I compared the *in vivo* interactions between LGI family proteins and ADAM22 by immunoprecipitation experiments from the mouse brain and observed more efficient co-immunoprecipitations of LGI1 and LGI4 with ADAM22 than that of LGI3. Co-immunoprecipitation of LGI2 was hardly detected due to its low solubility under my experimental condition. Consistently, the cell-surface binding assay revealed relatively stronger bindings of LGI1 and LGI4 to ADAM22, than those of LGI2 and LGI3. *In vitro* binding assay with substitutions of interface residues between LGI family proteins indicated that the differences of a few interface residues critically yield their distinct binding affinities to ADAM22.

In conclusion, I determined the modes of interactions of LGI1–ADAM22/ADAM23 and demonstrated physiological and pathophysiological roles of their higher-order assembly as the *trans*-synaptic linkage. I also elucidated the different binding properties of LGI family proteins to ADAM22 caused by the substitutions of the interface residues, indicating their distinct functions in the nervous system.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 宮崎 裕理

Title
論文題目 Binding mode and physiological role of epilepsy-related ligand/receptor
LGI1-ADAM22 complex based on structural analysis

分泌タンパク質 Leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) の遺伝子変異により家族性のてんかんが引き起こされること、LGI1 が、神経細胞に発現する膜タンパク質である A disintegrin and metalloprotease 22 (ADAM22) に結合することが知られている。出願者、宮崎裕理氏は、本研究において LGI1 と ADAM22 の結合様式とその構造基盤等を解析し、LGI1-ADAM22 複合体がマウス脳の神経シナプスにおいて果たす生理的役割とその病態生理学的意義を明らかにした。

宮崎裕理氏は、まず、東京大学 深井周也准教授との共同研究により、LGI1-ADAM22 複合体の結晶構造解析を行った。その結果、LGI1 同士が結合することにより、LGI1 の 2 分子と ADAM22 の 2 分子が 2:2 の複合体を作ることを明らかにした。次に、構造上のインターフェース部分の変異体の生化学的解析により、LGI1 と ADAM22 の結合においては、また LGI1 と ADAM23 との結合においても、疎水性相互作用が重要であることを示した。さらに、てんかんを引き起こす LGI1 の変異に、フォールディングに関与し分泌の低下をおこすもの、ADAM との結合能を低下させるものに加えて、新たに LGI1 間の結合能を低下させるものがあることを示した。続いて、LGI1 遺伝子を欠失した短命のマウスにおいて、LGI1 間の結合が低下した変異体を遺伝子発現させてもレスキュー出来ないことを観察し、この複合体の機能的重要性を明らかにした。また、マウス脳のタンパク質を用いた免疫共沈降実験等により LGI1: ADAM22: ADAM23 の 2:1:1 の 3 者複合体の形成を示し、この複合体が前シナプス部位と後シナプス部位を架橋する役割を果たしていること、その架橋形成の異常がてんかんの病態となることを明らかにした。宮崎氏は、LGI のファミリーメンバーで、ヒト、イヌ等で、神経学的症候を引き起こすことが知られている LGI2,3,4 についても解析を行い、LGI4 が LGI1 と同程度に疎水性相互作用により ADAM に強く結合することを示した。LGI3 については、知的レベルの低下と関連が報告されている遺伝子変異が分泌異常を引き起こすことを明らかにした。LGI3 は ADAM22 との明確な結合を示さなかったことから、他の結合パートナータンパク質が存在する可能性が示唆された。

以上、本研究では、その遺伝子変異がてんかんを引き起こすことが知られている LGI1 と ADAM22 の複合体の結晶構造解析と構造情報に基づいた変異体を用いた徹底的な生化学的解析等により、2:2 の複合体を形成していることとその結合の様式を明らかにした。さらに、ADAM22 と 2 分子の LGI1 および ADAM23 の複合体がシナプスを架橋することを示した。LGI-ADAM 複合体の生理的役割と病態生理学的意義を明らかにしたもので、その科学的価値は極めて高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は全会一致で、本論文が学位論文として相応しいと判断した。