

2種類の異なる Adhesion GPCR である  
GPR56 と Latrophilin1 の複合体形成と機能の解析

野島 悠佑  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス領域 分子情報薬理学 研究室  
(伊東 広 教授)

令和5年3月14日提出

## 目次

序論	3
材料と方法	7
結果	13
図	17
考察	32
謝辞	38
参考文献	39

## 序論

Gタンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は膜貫通型受容体の最大ファミリーであり、神経伝達物質、ホルモン、光、匂いなど細胞外からのシグナルを細胞内に伝える役割を担っている。創薬ターゲットとして最も注目されている分子の一つであり、現在使われている薬の30%以上はGPCRをターゲットとしているため、新薬のターゲット候補として更なる研究が求められている。GPCRはアミノ酸配列に基づいた統計学的分類からGlutamate、Rhodopsin、Adhesion、Frizzled/Taste2、Secretinの5種類に分類される (Fredriksson, R., *et al.*, 2003)。これらのGPCRファミリーのうちAdhesion GPCR (aGPCR)に属する受容体はヒトでは33種類が同定されており、様々な組織において細胞接着や細胞遊走、細胞分化などに関わることが知られている (Langenhan, T., *et al.*, 2013)。aGPCRの特徴として長い細胞外領域 (ECD) をN末端側に持ち、ECD上に存在するGPCRタンパク分解サイト (GPCR proteolysis site, GPS) において自己触媒的切断を受けることが知られている (図1) (Ushkaryov Y. A., *et al.* 2008)。切断を受けた受容体はECD側のN末端画分 (NTF) と7回膜貫通領域 (TM)を含むC末端断片 (CTF) に分かれるが、これら2つの断片は細胞膜上で非共有結合的に相互作用すると考えられている (Gray J. X., *et al.*, 1996; Krasnoperov V. G., *et al.*, 1997; Abe J., *et al.*, 2002)。この切断は受容体の活性化や成熟に重要なプロセスであると考えられているが、切断の生理学的意義の詳細は不明である (Lin H. H., *et al.*, 2010)。

GPR56およびLatrophilin1 (LPHN1)は共に脳に高発現するaGPCRである。全てのaGPCRはTM部分のN末側近くにGPCR Autoproteolysis INducing (GAIN) ドメインというtetrahymenaなどの原始生物から高度に保存されたドメインを持つ (図2)。このGAINドメインはGPSでの自己タンパク質分解に必要であると考えられている (Araç D., *et al.*, 2012)。切断されたNTFの生理機能が、最近2種類のaGPCR、GPR56およびLatrophilin-1 (LPHN1)で報告されている。LPHN1の線虫におけるオルソログであるlat-1のNTFは7TM非依存的な機能を持ち、線虫のオスの交尾行動に必須であることが示された (Matus D., *et al.*, 2022)。またGPR56においても、GPR56CTFと独立した血中のGPR56NTFの上昇量が関節リウマチ患者の陽性リウマチ因子および腫瘍壊死因子の上昇と関連しているという報告がなされた (Tsengab W. Y., *et al.*, 2018)。これらの報告は、NTF切断によるCTF活性化の調節だけでなく、CTFに依存しないシグナル調節においても、aGPCRのNTFが生理学的機能を示

すことを示唆している。

GPR56 は脳、心臓、甲状腺、腎臓、精巣、膵臓、骨格筋に発現しており、特に中枢神経系、血球系細胞でよく研究されている (Singh A. K., *et al.*, 2021)。例えば、GPR56 遺伝子の点変異が両側前頭頭頂多小脳回 (BFPP) および小脳の奇形を有する患者で同定された (Piao X., *et al.*, 2004)。また GPR56 ノックアウトマウスの解析の結果、脳の層形成時の過剰遊走、小脳の形成異常が見られるという報告がなされており (Li S., *et al.*, 2008)、GPR56 は G<sub>12/13</sub> を介したシグナルにより神経前駆細胞 (NPC) の遊走を抑制することが示唆されている (Iguchi T., *et al.*, 2008)。GPR56 は神経幹細胞または神経前駆細胞の維持にかかわり神経分化に伴い発現が抑制される (Bai Y., *et al.*, 2009)。マイクログリアを介したシナプスの剪定にも関わり、適切なシナプス数を維持することにもかかわるという報告がある (Li T., *et al.*, 2020, 17)。これらのことから GPR56 は発生時期における脳の神経細胞遊走や神経回路形成に関与し、脳形成に重要な役割を持つと考えられる。また、最近になって GPR56 が造血幹細胞の増殖と接着や (Saito Y., *et al.*, 2013)、筋芽細胞の融合にも関与することも示唆されている (Wu M. P., *et al.*, 2013)。

また、ある種のグリオーマで GPR56 が過剰に発現していること (Shashidhar S., *et al.*, 2005)、GPR56 が細胞接着を介してガン化に関わっていること (Ke N., *et al.*, 2007)、メラノーマや前立腺がんなどの進行を抑制することなど、がんの進行に様々な役割を担っていることを示唆する報告もなされてきている (Xu L., *et al.*, 2010)。このことから GPR56 は新規抗がん剤のターゲットとしても重要視されている。これまでに GPR56 の結合分子として細胞外マトリクスに存在する Transglutaminase2 (Xu L., *et al.*, 2006) や CollagenIII (Luo R., *et al.*, 2011)、CD81 (Little K. D., *et al.*, 2004) が報告されている。その中でも CollagenIII はマウスの GPR56 の NTF の 93-143 番目のアミノ酸の領域と相互作用し (図 2)、リガンド様に働いて細胞遊走を抑制するという報告がされたが、当研究室では Collagen III の GPR56 に対するリガンド活性が見出せておらず、GPR56 の活性化は CollagenIII 単独の結合によって起こるのではなく、その他の分子も関与している可能性が示唆されている。

一方、LPHN1 はクロゴケグモ由来の神経毒である  $\alpha$ -Latrotoxin (LTX) の受容体として同定された aGPCR である (Davletov B. A., *et al.*, 1996)。LPHN1 をノックアウトしたマウスを用いた実験から、LPHN1 は前シナプスに存在し神経伝達物質の放出に関わると考えられている (Tobaben S., *et al.*, 2002)。また統合失調症治療薬であるリスペリドンの長期投与により *lphn1* mRNA の発現上昇が起こることがマイクロアレイ解析により確認されている (Chen M. L., *et al.*, 2005)。LPHN に

は LPHN1-3 の 3つのアイソフォームが存在し、そのひとつである LPHN3 は ADHD との関連が報告されている (Kellendonk C., *et al.*, 2009)。またヒト LPHN1 がニューレキシン 1 およびテニューリンとの相互作用を介して、自閉症スペクトラム障害、双極性障害、統合失調症などのいくつかの障害に関連していることが示唆されている (Moreno-Salinas, A. L. *et al.*, 2019, Silva J. P., *et al.*, 2011)。様々なラット組織から単離した RNA のノーザンブロッティングにより、LPHN1 と LPHN3 の mRNA は主にマウスの脳に多く、他の組織にはほとんど存在しないが、LPHN2 はほとんどのマウス組織に見られた (Matsushita H., *et al.*, 1999)。このように LPHN は精神疾患との関連が報告されており LPHN1 の活性化機構の解析はこのような疾患の治療法の発展の一助となる可能性がある。テニューリンファミリーは脳で特異的に発現し、神経発達、神経突起伸長、シナプス形成に関与している (Tucker P. R., *et al.*, 2007)。テニューリン 2 のスプライシングバリエーションとしても知られる Latrophilin1-associated synaptic organizer (Lasso) は、LPHN1 の内因性リガンドとして同定されている (Silva J. P., *et al.*, 2011)。Lasso はシナプスギャップで特異的に LPHN1 に結合し、ニューロン同士を接続する (Tucker R. P., *et al.*, 2007)。ヒトにおいて teneurin-1 遺伝子の欠損、そして teneurin-2 遺伝子の再編成は精神遅滞を引き起こすことが知られている (Minet A. D., *et al.*, 1999)。Lasso と LPHN1 は複数の箇所でも相互作用し、強い結合を保つことが報告されており、この結合には NTF の全長が必要である (Del Toro D., *et al.*, 2020)。一方で LTX と LPHN1 の結合には GAIN ドメインとホルモンレセプターモチーフ (HRM) ドメインが必要であることが報告されている (Silva J. P., *et al.*, 2011)。

LPHN1 は aGPCR であるため、832 番目のロイシンと 833 番目のトレオニンの間で自己タンパク質分解されることが明らかにされている (図 2) (Krasnoperov V. G., *et al.*, 1997)。GPR56 の場合と同じように LPHN1 の GPS ドメインでのタンパク質切断は LPHN1 が細胞膜へ移行するために必要であることが明らかにされている (Krasnoperov V. G., *et al.*, 2002)。興味深いことに LPHN1NTF は細胞膜上に移行した後、LPHN1CTF と独立した挙動を示す可能性が示唆されている (Volynski K. E., *et al.*, 2004)。またそれぞれの aGPCR の間の GPS ドメインの相同性の高さから、LPHN1NTF が他の aGPCR の CTF と相互作用する可能性が示唆された。成体ラット脳ライセートを用いた免疫沈降法により LPHN1NTF が GPR56CTF と相互作用することが報告されている (Silva J. P., *et al.*, 2009)。

一方、当研究室でも HEK293T 細胞に LPHN1NTF あるいは GPR56CTF を一過性に発現させライセートを得た後、抗 LPHN1NTF 抗体を用いて免疫沈降することで、LPHN1NTF と GPR56CTF が相互作用することが確認された (佐々井 2012)。

GPR56 の全長 (GPR56FL)あるいは GPR56CTF は HEK293 細胞に過剰発現させるだけでリガンドの結合がなくても SRE を介した転写活性増加のシグナルを誘導する。しかしそこに LPHN1NTF を共発現させることで、GPR56FL あるいは GPR56CTF の過剰発現によって誘導されるシグナルが抑制されるという結果が SRE-luciferase を用いたレポーター遺伝子アッセイにより得られた (佐々井 2012)。これらのことから LPHN1NTF は GPR56CTF と複合体 (キメラ複合体)を形成し、この形成によりシグナル伝達が調節されることで受容体の機能の多様化を生じさせているモデルが想定された (図 3 C)。そこで本研究では GPR56 と LPHN1 のキメラ複合体形成と、これらによるシグナル伝達制御機構を調べることで、その生理機能を解明することを目的とした。

単独の受容体が細胞外においてリガンドを受容し、細胞内にシグナルを伝えるというのが GPCR の活性化機構のクラシカルなモデルである (図 3 A)。しかし近年になって  $\alpha 1$  アドレナリン受容体やアンジオテンシン受容体、GABA<sub>B</sub> 受容体など、ホモダイマーやヘテロダイマーを形成することによってリガンド刺激によるシグナル伝達を多様に制御するものが見つかってきている (Parmar V. K., *et al.*, 2016, Mikusic N. L. R., *et al.*, 2020, Satake H., *et al.*, 2014)。また、GPR56 と CD81 のように、GPCR がテトラスパニンなどの他の膜タンパクと共役し働く可能性も示唆されている (図 3 B) (Little K. D., *et al.*, 2004)。aGPCR の活性化機構として、CTF の N 末側にある Stachel シーケンスと呼ばれる GPS のつなぎ目の十数アミノ酸が、GPS で切断を受けたあとの受容体の活性化に必要であるという報告がある (Liebscher I., *et al.*, 2014)。また aGPCR のひとつである GPR126 の NTF は CTF と独立して生理活性を持つという報告もされている (Patra C., *et al.*, 2013)。しかし、今回想定しているキメラ複合体は GPR56 と LPHN1 という 2 つの異なる GPCR がそれぞれ GPS において切断され、その一部である NTF と CTF を交換することで新しい機能をもつという前例が全くないモデルである (図 3 C)。このキメラ複合体が生理活性を持つならば、GPCR の全く新しい活性化機構の発見となることが期待される。

## 材料と方法

### マウス胎仔脳由来神経細胞の調製と培養

野生型 (WT) および *Gpr56* <sup>-/-</sup> (KO) マウス(Saito Y., *et al.*, 2013)を含むすべてのマウスは奈良先端科学技術大学院大学の動物施設で飼育された。*Gpr56* 対立遺伝子のゲノム修飾識別は、耳の組織または尾の先端から調整し、ゲノム DNA を使用したジェノタイピング PCR によって行った。以下のプライマーを使用して、WT (639 bp) および *Gpr56* 欠損 (369 bp) 対立遺伝子を特定した。

: 野生型に対するフォワードプライマー

5'-CGAGAAGACTTCCGCTTCTG-3'

;変異体特異的なフォワードプライマー

5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'

; WT と KO に 共通のリバースプライマー

5'-AAAGTAGCTAAGATGCTCTCC-3'

ヘテロマウスの交配からホモ KO マウスおよび野生型同腹仔を対照として使用した。すべての動物実験は、奈良先端科学技術大学院大学動物実験委員会によって承認を受けた (承認番号.1801)。

胎生 16 日マウスから海馬を採取し、0.05 % トリプシン, 0.67 mg/ml ヒアルロニダーゼ, 0.1 mg/ml DNase を含む Low Ca & High Mg aCSF 培地 (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 3.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-グルコース) で細胞を懸濁し、37°C で 15 分間インキュベートした。1.4 mg /ml オボムコイドを加えトリプシンの反応を停止させた後、ピペッティングすることで個々の細胞に分離させた。1,000 rpm で 3 分間遠心後に上清を取り除き、5 ml の aCSF 培地 (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-グルコース) で沈殿を懸濁し 70 μm nylon cell strainer (BD Falcon) を用いて細胞をろ過した。ろ過した細胞懸濁液を 180 ×g で 3 分間遠心分離し、上清を除き、沈殿物を 1 mg の D/F 培地 (Doublecco's modified eagle's medium : Nutrient mixture F12 (1:1), Gibco) に懸濁し、あらかじめ 100 μg/ml poly-D-lysine および 10 μg/ml ラミニンコーティングしたスライドグラスが入ったプレートに播種した。1 mg/ml BSA (Sigma)、および Neuro-Brew-21 (Miltenyi Biotec) をサプリメントとして培地に添加した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養し、3 日ごとに培地交換を行った。

### 抗体の調製と購入先

抗マウス GPR56NTF モノクローナル抗体を単離するために、ラットの足蹠にマウス組換え GPR56ECD タンパク質を 4 回注射して 7 週間免疫した。膝窩リンパ節細胞をポリエチレングリコール法によりマウス PAI ミエローマ細胞と融合させた。ELISA によって 70 のハイブリドーマを選択し、増殖させた。ELISA プレートは、50 mM 炭酸緩衝液、pH 9.5 中の 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mGPR56ECD でコーティングして調製した。モノクローナル抗体を、CD ハイブリドーマ培地 (Invitrogen) を含むハイブリドーマの馴化培地からプロテイン G セファロース (GE Healthcare) によって精製した (太田 2015)。

抗マウス Latrophilin1 CTF ポリクローナル抗体を単離するために、Latrophilin1 の C 末端にある 21 アミノ酸の合成ペプチド CAPSLEGPGPDGDGQMLVTSL をウサギに投与し、LPHN1CTF に対するウサギ抗血清を得た (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES)。合成ペプチドを用いてアフィニティー精製により抗体を精製した。抗体の特異性は、免疫細胞化学法によって確認した (図 1 5 A, B)。リコンビナントマウス GPR56NTF をウサギに投与することで作製された抗マウス GPR56NTF ウサギポリクローナル抗体はすでに報告がなされているものを使用した (Iguchi T., *et al.*, 2008)。抗マウス/ヒト GPR56CTF ウサギポリクローナル抗体は以前に報告がなされたものを使用した (Ohta S., *et al.*, 2015)。抗体の特異性は、免疫細胞化学法およびウェスタンブロッティング法で確認した。抗マウス Latrophilin1 NTF ウサギポリクローナル抗体、抗  $\beta$  アクチン マウスモノクローナル抗体は、それぞれ Sigma-Aldrich Japan および Santa Cruze Biotechnology から入手した。 $\beta$  III-チューブリンに対するマウスモノクローナル抗体 Tuj1 は Babco から入手した。

### 株化細胞の培養

ヒト胎児腎臓由来である HEK293T 細胞は、10 %のウシ胎児血清 (MP Biomedicals) 及びペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む Doublecco's modified eagle's medium (DMEM; Sigma) 中で、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。

細胞は培養皿中でコンフルエントに達する前に 0.25 % トリプシン溶液で細胞をはがし、細胞を 10 倍に希釈して新しい培養皿に継代した。

### 培養細胞への形質導入

HEK293T 細胞へはリン酸カルシウム法により一過性にプラスミド DNA 導入を



行った。60 mm ディッシュにサブコンフルエントにした HEK293 細胞へ以下のようにして形質導入を行った。

DNA または PEI を PBS で希釈し、室温で 5 分間放置した。液体を混合し、室温で 15 分間放置した。その後、混合物を事前に播種した HEK293T 細胞に加えた。10 時間後、培地を交換した。細胞をさらに 16 時間培養し、Ca<sup>2+</sup> アッセイと免疫沈降に使用した。

## ウェスタンブロット

脳ライセートサンプルを調製するために、脳を液体窒素で瞬時に凍結し、溶解バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、0.5% NP-40、150 mM NaCl、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) および 1 µg/mL ロイペプチン) を加えた後、Potter-Elehm グラインダーを使用してホモジナイズした。ホモジネートを 5,000 rpm, 5 分遠心した上清をライセートとして使用した。

培養ニューロンまたは HEK293 サンプルを調製するために、細胞をセルスクレーパーで収集し、ライセートを溶解バッファーで調製した。LPHN1CTF または GPR56CTF を発現していない細胞のサンプルは、Laemmli バッファーを加えた後、95°C で 5 分以上加熱した。凝集を避けるため、LPHN1CTF と GPR56CTF のサンプルは煮沸せずに Laemmli バッファーを用いて調製した。

調製したサンプルを、12 % アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、その後 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Millipore) に転写した。メンブレンを 2 % スキムミルクを含む PBST (137 mM NaCl, 8 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 % (w/v) Tween-20) に 1 時間浸し、ブロッキングを行った。2 % スキムミルクを含む PBST で希釈した一次抗体でメンブレンを浸し 1 時間静置した。その後、5 分毎に 3 回 PBST で洗浄し、2 % スキムミルクを含む PBST によって希釈した HRP 標識二次抗体でメンブレンを浸し、1 時間静置した。PBST で 3 回洗浄し、ECL 試薬 (GE Healthcare) を用いて検出を行った。

なお、用いた一次抗体とその希釈率は次の通りである。

一次抗体：

Anti-mouse GPR56NTF rabbit polyclonal antibody , 1/1000 希釈

Anti-mouse/human GPR56 CTF (C 末端 21 ペプチドを抗原) rabbit antibody 1/1000 希釈

Anti-mouse Latrophilin-1 NTF rabbit polyclonal antibody (Sigma-Aldrich Japan), 1/1000 希釈

Anti-Latrophilin1 CTF rabbit polyclonal antibody 1/1000 希釈

Anti-actin mouse monoclonal antibody, 1/1000 希釈 (Santa cruz biotechnology)

### 免疫沈降法

P7 マウス脳ライセートまたは HEK293 ライセートを Protein G Sepharose レジンで 4°C、20 分間プレクリアし、その後 0.5 µg の抗 GPR56CTF ウサギポリクローナル抗体と 10 µl の Protein G Sepharose レジンを加え、4°C で 2 時間穏やかに攪拌した。セファロースビーズを 1% NP40 を含む PBS で 3 回洗浄した後、各サンプルに 50 µl の Laemmli バッファーを加えてビーズからタンパク質を分離し、SDS-PAGE に供した。

### 免疫染色法

免疫細胞化学法を行うために、懸濁した初代神経細胞をポリ-D-リジン/ラミニンでコーティングしたカバーガラスに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。一晚、4 日間、または 8 日間培養した後、細胞を PBS で 1 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) に 15 分間浸して細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄した後、細胞をブロッキングバッファー(0.1% Triton-X 100、10% FBS を含む PBS)に 30 分間浸した。次に、抗 GPR56NTF 抗体、抗 GPR56CTF、抗 LPHN1NTF、抗 LPHN1CTF、Tuj1 抗体をブロッキングバッファーで 1/500 に希釈した溶液をサンプルにのせ、室温で 1 時間静置した。Alexa594 結合抗マウス IgG 抗体 (Molecular probes) または Alexa488 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular probes) を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングバッファーで 1/1000 に希釈し、これらの溶液をサンプルにのせ 30 分間反応させた。細胞を PBS で 3 回洗浄し、マウントして、Axio オブザーバーZ1 (Carl Zeiss) を使用し観察した。核を Hoechst (青) で染色し、赤と緑のチャンネルを重ね合わせた図を右側のパネルに示した。

脳切片の免疫組織化学法を行うために、胎生 16、19 日および生後 7 日マウスの脳を収集し、4% PFA で 4°C で一晚固定した。その後 30% スクロースを含む PBS で脳を脱水し、続いて全脳を Tissue-Tek O.C.T コンパウンド (Sakura Finetek、#4583) で包埋した。厚さ 10 µm の凍結切片を作製し、一次抗体として抗 GPR56NTF ラット モノクローナル抗体 (1:500) および抗 GPR56CTF 抗体 (1:500)、抗 LPHN1NTF 抗体をブロッキング溶液で希釈し、一晚サンプルと反応させた。二次抗体をブロッキング溶液で 1/1000 に希釈し、室温で 30 分間反応させた。PBS 洗浄後、サンプルをスライドガラスにマウントし、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss、LSM980) で組織切片を観察した。

## アデノウイルス作製

GPR56 をノックダウンするアデノウイルスの作製方法はすでに報告されている方法に従った(Iguchi T., *et al.*, 2008)。shRNA を産生するアデノウイルスシャトルベクターに挿入されているオリゴ DNA 配列を以下に示す。LPHN1 をノックダウンするウイルスを作製するために、下記に示したオリゴヌクレオチドを pRNAT-H1.1/Adeno ベクター (GenScript, Edison, NJ) の MluI/HindIII 部位に挿入した。これらのプラスミドを、pAdEasy1 ベクターを内在的に保持する BJ5183-AD-1 コンピテントセルに導入した。大腸菌内で組換えが起こったアデノウイルスプラスミドを単離し、PacI で処理した後、HEK293 細胞にトランスフェクトしてウイルス粒子を得た。挿入したオリゴ DNA 配列を以下に示す。

### shLPHN1 センス鎖

5'-CGCGTCCTACCAAGGCCGTATTAATGTTCAAGAGACATTAATACGGCCTTG  
GTATTTTTTA-3' and

### shLPHN1 アンチセンス鎖

5'-AGCTTAAAAATACCAAGGCCGTATTAATGTCTCTTGAACATTAATACGGCCT  
TGGTAGGA-3'

### shGPR56 センス鎖

5'-CGCGTCCGGTAGAAGCCACTCACAAATCAAGAGATTTGTGAGTGGCTTC  
TACCTTTTTTA-3'

### shGPR56 アンチセンス鎖

5'-AGCTTAAAAAGGTAGAAGCCACTCACAAATCTCTTGAATTTGTGAGTGGC  
TTCTACCGGA-3'

また、コントロールに用いた配列を以下に示す。

### shCTRL センス鎖

5'-CGCGTCCAAATGTACTGCGTGGAGACTTCAAGAGAGTCTCCACGCAGTAC  
ATTTTTTTTTTA-3'

### shCTRL アンチセンス鎖

5'-AGCTTAAAAAAAATGTACTGCGTGGAGACTCTCTTGAAGTCTCCACGCAG

TACATTTGGA-3'

分化培養 4 日目の培養神経細胞にアデノウイルスをそれぞれ MOI 0.3-5 となるよう感染させ、その後 3 日間培養した。アデノウイルスに感染した細胞は GFP を発現するため、感染した細胞を GFP の蛍光を観察することで選別し、その後の実験に用いた。

### Latrotoxin N4C の調製

LTXN4C は、野生型の LTX と異なり、細胞膜に細孔を形成しない変異体であり、N 末端ドメインとアンキリンリピートの中に 4 アミノ酸(Val-Pro-Arg-Gly)が導入された変異体である (Volynski K. E., *et al.*, 2003)。

LTXN4C をコードする cDNA は、Yuri A. Ushkaryov 氏の厚意により提供された (Volynski K. E. *et al.*, 2003, 2004)。pCold GST LTXN4C の BamH I -Sall サイトに、N 末端 8 His タグを付加した LTXN4C の cDNA 配列を導入した。pCold GST LTXN4C を Origami B (DE3) 大腸菌に導入し、サブコンフルエント (OD、約 1.0) になるまで 37°C で増殖させ、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (100  $\mu$ M) を加え、組換えタンパク質の発現を 15°C で 20 時間誘導した。培養物を遠心分離し、得られたペレットを、50 mM HEPES pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、および 2  $\mu$ g/ml ロイペプチンを含む溶解バッファーに再懸濁した。再懸濁溶液を超音波破碎し、遠心分離により不溶物を除去し、上清中の組換え LTXN4C をグルタチオンアガロース (GE ヘルスケア) で精製した。PMSF を含まない溶解バッファーで 3 回洗浄した後、PreScission プロテアーゼ (GE Healthcare #27084301) を使用して、グルタチオンアガロースに結合した融合タンパク質を 4°C で 16 時間反応させ遊離させた。

### 細胞内カルシウム応答の測定

細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を、蛍光  $Ca^{2+}$  インジケータ CaTM-2 AM 色素 (五稜化薬) を使用して測定した。*in vitro* で 8 日間培養した初代神経細胞またはガラスボトムディッシュで培養した HEK293T 細胞を HBSS (Nakalai、#09735-75) で洗浄し、CaTM-2 AM を添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄して細胞内に取り込まれなかった色素を除去し、測定緩衝液として 2 mM のプロベネシドを含む HBSS を添加した。蛍光測定の際、細胞を 37°C のインキュベーターに入れ、Axio オプザーバーを使用して 10 秒ごとに合計 5 分間、蛍光撮影した。撮影開始後 50 秒の時点で、細胞を 2 nM

LTXN4C で刺激した。得られた画像データを基に $[Ca^{2+}]_i$  を算出し、100、150、200、250、および 300 秒の時点の $[Ca^{2+}]_i$  をそれぞれ比較し、有意差検定を行った。

## 統計解析

すべての統計分析は、Graphpad prism 9 (RRID:SCR\_002798)で一元配置分散分析、Tukey の t 検定、または Mann-whitney U 検定を使用した。すべてのデータは、平均  $\pm$  SEM として表示した。

## 結果

### 脳の発達に伴う GPR56 および LPHN1 の発現量の変化

マウス脳の発生過程における 2 種類の aGPCR である GPR56 および LPHN1 の全脳でのタンパク質発現を調べた。胎生期、出生後、成体のマウス脳の抽出液を調製し、それぞれを認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った(図 4. A、B)。GPR56NTF の発現は、E11 マウス胎児脳で最も高く、発生の進行とともに有意に減少した。NTF とは対照的に、GPR56CTF は発達のすべての段階で有意な変化はみられなかった。一方で、LPHN1NTF は、E11 および E16 の脳の初期段階では発現が認められなかったが、P7 脳では発現の増加が見られた。LPHN1CTF の発現レベルは、すべての発生段階で変化しなかった。これらの結果は、GPR56 および LPHN1 の NTF および CTF の発現は、それぞれがマウスの発達中の脳において独立して調節されていることを示唆している。また、GPR56CTF と LPHN1NTF は E19 から P7 のマウスの脳にともに多く発現することがわかった。この結果より、GPR56CTF と LPHN1NTF のキメラ複合体は E19 から P7 の間に形成される可能性が示唆された。

### マウス脳およびマウス初代培養神経細胞における内因性 GPR56NTF と CTF および LPHN1NTF と CTF の発現と局在

図 4 の結果より発生時期によって GPR56NTF と CTF の発現パターンが異なることが示唆されたため、次にマウス脳における GPR56NTF と CTF の部位別発現パターンを調べた。両方の発現が確認されている E16 のマウス脳切片を用いて組織免疫染色法により解析した (図 5 A、B)。その結果 GPR56NTF は主に神

経幹細胞や神経前駆細胞が存在する脳室帯 (VZ) で最も強く検出されたのに対し、GPR56CTF は Tuj1 陽性神経細胞と中間帯 (IZ) で共局在していることが分かった。GPR56 の NTF および CTF の神経内局在パターンをより詳細に調べるために、E16.5 マウスから初代神経細胞を調製し、抗 GPR56NTF と GPR56CTF 抗体で染色した (図 5 C)。その結果、培養一日目の神経細胞では GPR56NTF と GPR56CTF は細胞体に共局在した。一方、分化条件で 4 日間培養した分化神経細胞では、GPR56CTF と GPR56NTF はそれぞれ異なる発現パターンを示し、GPR56CTF は神経突起にも局在することが示唆された。GPR56NTF は神経突起では観察されなかった。

さらに、E16.5 マウスから初代神経細胞を単離して 8 日間培養し、成熟神経細胞に分化させた後、抗 GPR56NTF、GPR56CTF、LPHN1NTF、GPR56CTF、および Tuj1 でそれぞれ染色した (図 6 A-D)。その結果、図 5 C で見られた通り GPR56NTF は神経細胞体に局在した。一方、GPR56CTF は主に神経突起に局在した。これらの結果は、GPR56NTF が GPR56CTF から部分的に独立して神経突起に局在する傾向があることを示唆する。LPHN1NTF は Tuj1 陽性神経細胞で多く発現しており、細胞体と神経突起の両方で発現がみられた。LPHN1CTF は Tuj1 陽性および陰性の細胞両方で発現が見られ、細胞体と神経突起に発現がみられた。

これまでに GPR56CTF と LPHN1NTF が相互作用することがラット脳ライセートを用いた免疫沈降実験で示されている (Silva J. P., *et al.*, 2009)。そこで LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用がどの部位で起こっているかを検討するため、初めに両者の脳における局在パターンを調べた。両者が発現する E19 マウス脳における LPHN1NTF と GPR56CTF の分布を調べた。LPHN1NTF は IZ および皮質板 (CP) 層で検出され、GPR56CTF は IZ 層で最も強く検出された (図 7 A, B)。これらの結果より LPHN1NTF と GPR56CTF が発生の同じ時期において IZ で共発現する可能性を示唆している。そこで我々は LPHN1NTF と GPR56CTF が神経細胞で相互作用する可能性を考えさらに実験を進めた。

### **GPR56CTF と LPHN1NTF の相互作用の解析**

当研究室の先行研究において、HEK293T 細胞に LPHN1NTF あるいは GPR56CTF を一過性に発現させた細胞ライセートを抗 LPHN1NTF 抗体を用いて免疫沈降することで、LPHN1NTF と GPR56CTF が相互作用することが確認されている (佐々井 2012)。また今回 LPHN1NTF と GPR56CTF が神経突起において共局在し、両者が相互作用する可能性が図 5 で示唆されたため、その仮説を検

証するために我々は GPR56 ノックアウトマウスを用いて解析を行った (図 8 A, B)。野生型由来の出生 1 日目 (P 1) マウス脳と比較して、GPR56 ノックアウトマウスでは LPHN1NTF の発現量に有意な差はなかったが、LPHN1CTF は発現量が減少する傾向がみられた。この結果より、GPR56 が LPHN1 の発現量に影響を及ぼす可能性が示唆された。次に LPHN1NTF が最も豊富な P7 マウス脳を用いて(図 4 A, B)、免疫沈降法によりマウス脳における LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用を確認した(図 9)。その結果 LPHN1NTF は GPR56CTF と共沈降した。一方 GPR56 ノックアウトマウス由来脳ライセートでは LPHN1NTF は沈降されなかった。これらの結果から P7 マウス脳において GPR56CTF は LPHN1NTF と複合体を形成することが示唆された。

成体ラット脳を用いた実験において LPHN1NTF を免疫沈降させると LPHN1CTF および GPR56CTF の両方が共沈降されることが既に報告されている (Silva J. P., *et al.*, 2009)。この報告から LPHN1 と GPR56 がヘテロ二量体を形成する可能性がある。次に LPHN1NTF と GPR56CTF が複合体を形成することを確認するために、LPHN1NTF および GPR56CTF のみを発現する HEK293 細胞を用いて免疫沈降を行った。その結果、GPR56CTF に対する抗体を用いて GPR56CTF を免疫沈降させたところ LPHN1NTF が共沈降した(図 10)。これらの結果は、LPHN1NTF と GPR56CTF が相互作用しキメラ複合体を形成することを示唆している。

### Ca<sup>2+</sup> アッセイによるキメラ複合体の機能の解析

$\alpha$ -Latrotoxin は細胞膜上に細孔を形成し細胞内にカルシウムを流入させる作用を持つが、N4C 変異体 (LTXN4C) は膜細孔を形成しないにも関わらず LPHN1NTF に結合親和性を持ち、LPHN1CTF を介して細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナルを誘発する (Krasnoperov, V. *et al.*, 2002, Davletov, B. A. *et al.*, 1996)。また GPR56 の活性化は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる (Ohta S., *et al.*, 2015)。そこで LPHN1NTF と GPR56CTF の間の機能的相互作用を調べるために、初代培養神経細胞において LPHN1 と GPR56 をそれぞれノックダウンし、これら細胞における LTXN4C に対する細胞内カルシウム応答を観察した。初めに、LPHN1 あるいは GPR56 のノックダウン効率をウエスタンブロッティングおよび免疫染色法で確認した (図 11 A、図 15)。続いて LTXN4C によるカルシウム応答を測定した。ノックダウンしていない対照の神経細胞では顕著なカルシウム応答が観察されたが、GPR56 ノックダウンと LPHN1 ノックダウンされた神経細胞では、LTXN4C に対するカルシウム応答がほとんど見られなかった(図 9 B)。キメラ複合体の機能をさらに検証するために、GPR56 ノックアウトマウスの海馬

から初代神経細胞を単離し、これらにおける、LTXN4Cにより誘導される細胞内カルシウム応答を観察した。その結果 WT の初代神経細胞に比較してノックアウトマウス由来の神経細胞では LTXN4C に対する応答が顕著に抑えられた(図 1 2)。

GPR56 のノックアウトは LPHN1CTF の発現を減少させるため (図 8 A, B)、全長の LPHN1 発現量も減少している可能性がある。この減少がカルシウム応答の抑制に寄与している可能性がある。そこで キメラ複合体の機能をさらに詳細に評価するために、LPHN1NTF と GPR56CTF を一過性に HEK293 細胞へ発現させ、同様の  $\text{Ca}^{2+}$  アッセイを行った (図 1 3)。その結果、LPHN1NTF と GPR56CTF を共発現させた細胞では ポジティブコントロールである LPHN1 全長(LPHN1FL)と同程度の LTXN4C による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が見られたのに対し、LPHN1NTF または GPR56CTF を単独で発現させた細胞では応答が見られなかった。これらの結果は、LPHN1NTF と GPR56CTF がキメラ複合体を形成し、LPHN1 のリガンド刺激によって GPR56CTF を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることを示している。



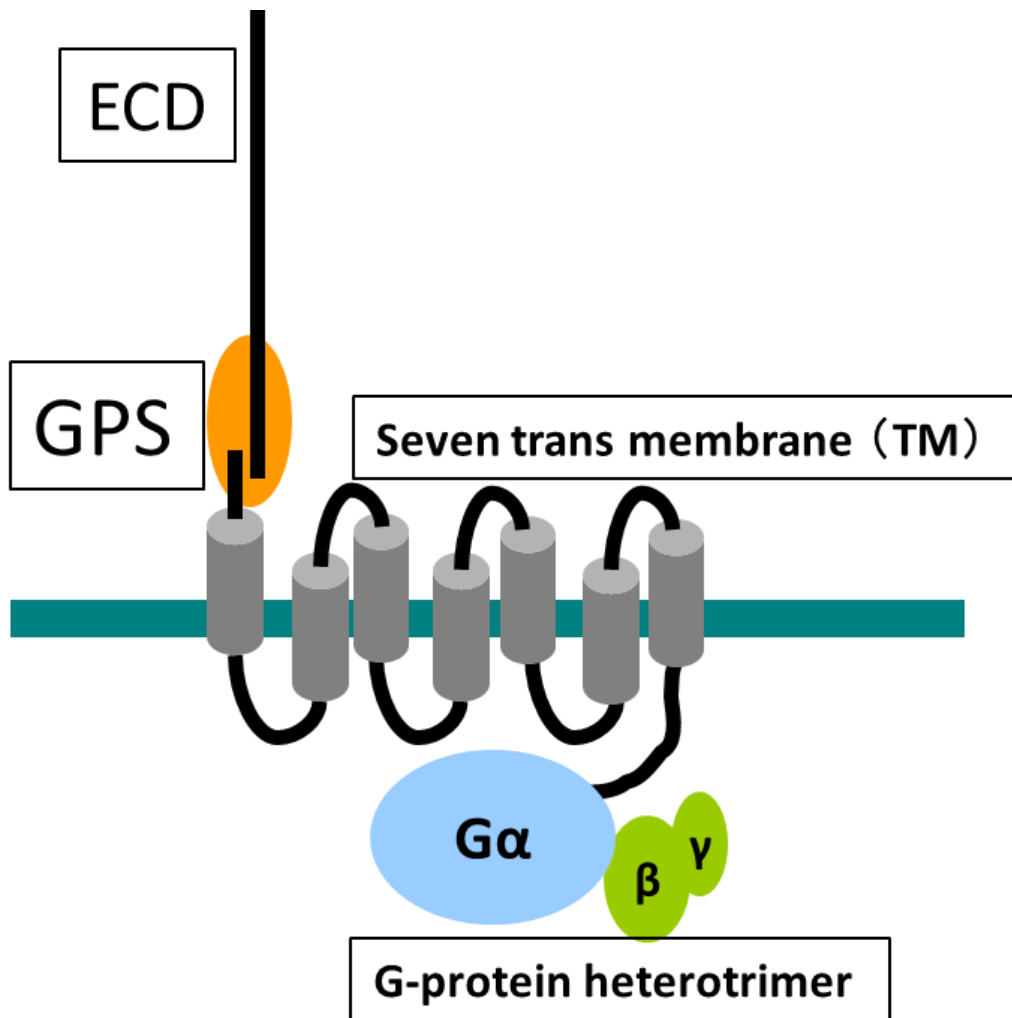
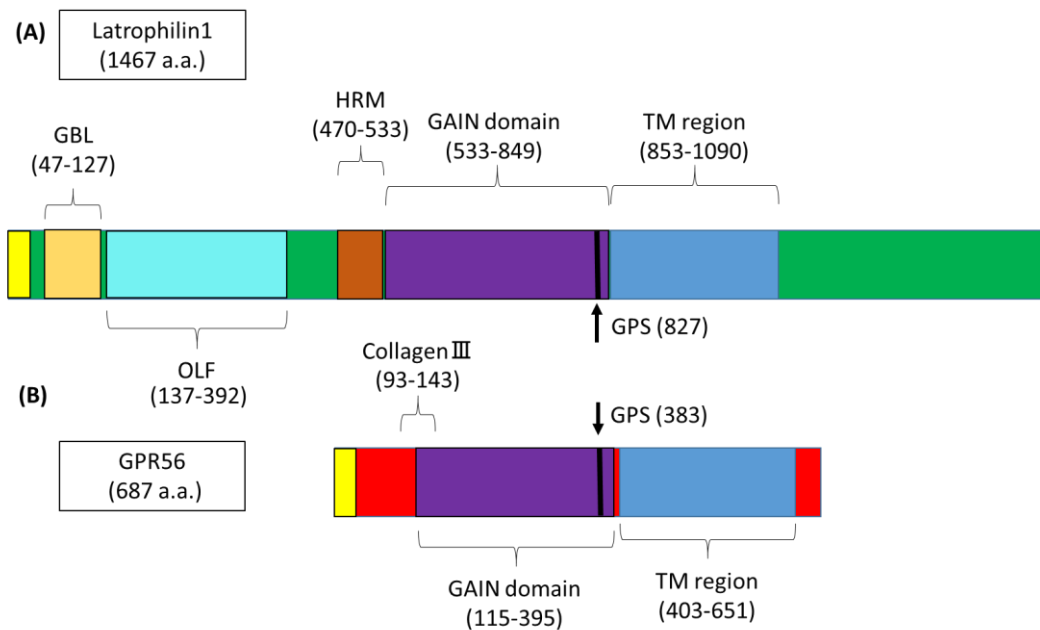


図 1 : Adhesion GPCR の特徴

GPCR に共通の特徴として、7回膜貫通 (TM) 領域を持つことと、G タンパク質へテロ三量体と共役していることが挙げられる。aGPCR に共通する特徴としては、長い細胞外ドメイン (ECD) を持つこと、また ECD 上の G タンパク質タンパク分解サイト (GPS) で切断を受けることが挙げられる。切られた NTF は非共有結合的によって CTF と相互作用すると言われているが、GAIN ドメイン以外のどの部分を介して相互作用しているのかなどは未だ明らかではない。



(OLF: Olfactomedin-like domain GBL: Galactose binding lectin HRM: Hormone receptor motif)

## 図 2 : LPHN1 および GPR56 の領域構造

(A) LPHN1 は LTX の受容体として同定された aGPCR である。LTX は GAIN domain と GAIN domain の N 末側すぐの HRM (Hormone receptor motif) に結合する。また LPHN1 の内在性リガンドとして最近同定された Lasso は LPHN1 と結合するために LPHN1-ECD 全体の構造を必要とする。GAIN domain を紫で、7 回膜貫通領域を青色で示し、矢印は切断を受ける部位を示した。( )内の数字は N 末端からのアミノ酸数を示す。

(B) GPR56 は CD81 や TG2、CollagenIII など様々な分子と相互作用することが報告されている。そのうち CollagenIII の結合に GPR56-ECD の 93-143 番目のアミノ酸が必要であることが判明している。

しかし、当研究室の先行研究より、CollagenIII が単純に GPR56 に結合するだけでは GPR56 を活性化できないことを示唆する結果が得られ、CollagenIII が GPR56 を活性化するメカニズムは、古典的な GPCR 活性化機構とは異なる可能性も示唆された。しかし、その活性化機構の詳細は不明である。

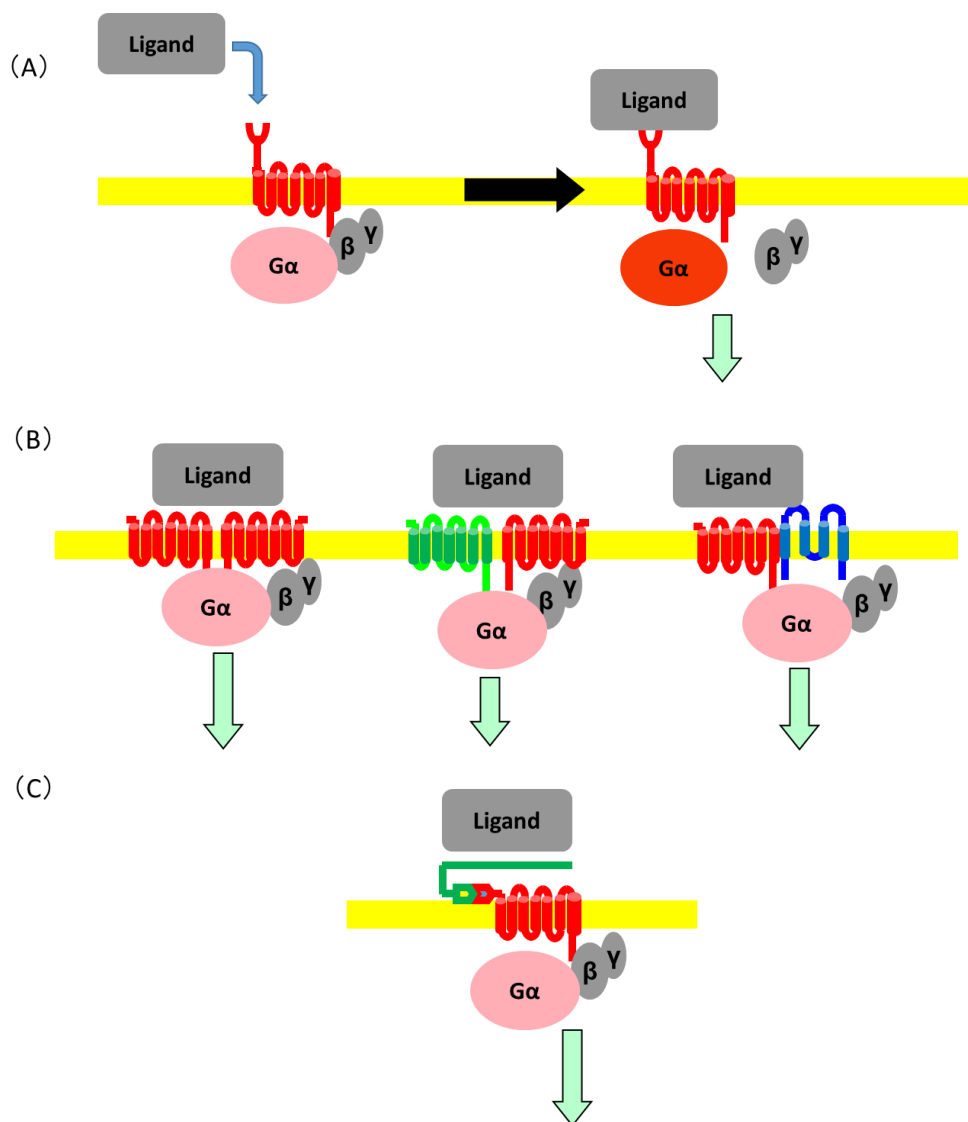


図 3 : 様々な GPCR のシグナル伝達機構

(A)GPCR の古典的なシグナル伝達機構は単一の GPCR にリガンドが結合することにより、GPCR が構造変化を起こし G タンパク質の GEF (Guanine nucleotide exchange factor) として働きシグナルを伝達するというものである。

(B) 最近になり様々なシグナル伝達機構を持つ GPCR が見つかってきた。GPCR がホモ二量体を形成し働くものや、ヘテロ二量体を形成するもの、そしてテトラスパニンのような他の膜タンパク質と共役するものなどがあげられる。

(C) aGPCR は ECD 上の GPS ドメインで切断を受け NTF と CTF に分かれる。今回の私の研究結果より、LPHN1NTF と GPR56CTF がキメラ複合体を形成し、機能を発揮することが想定される。この発見は、GPCR 同士がその一部を交換し新たな働きを持つという新しいシグナル伝達機構を提唱する。

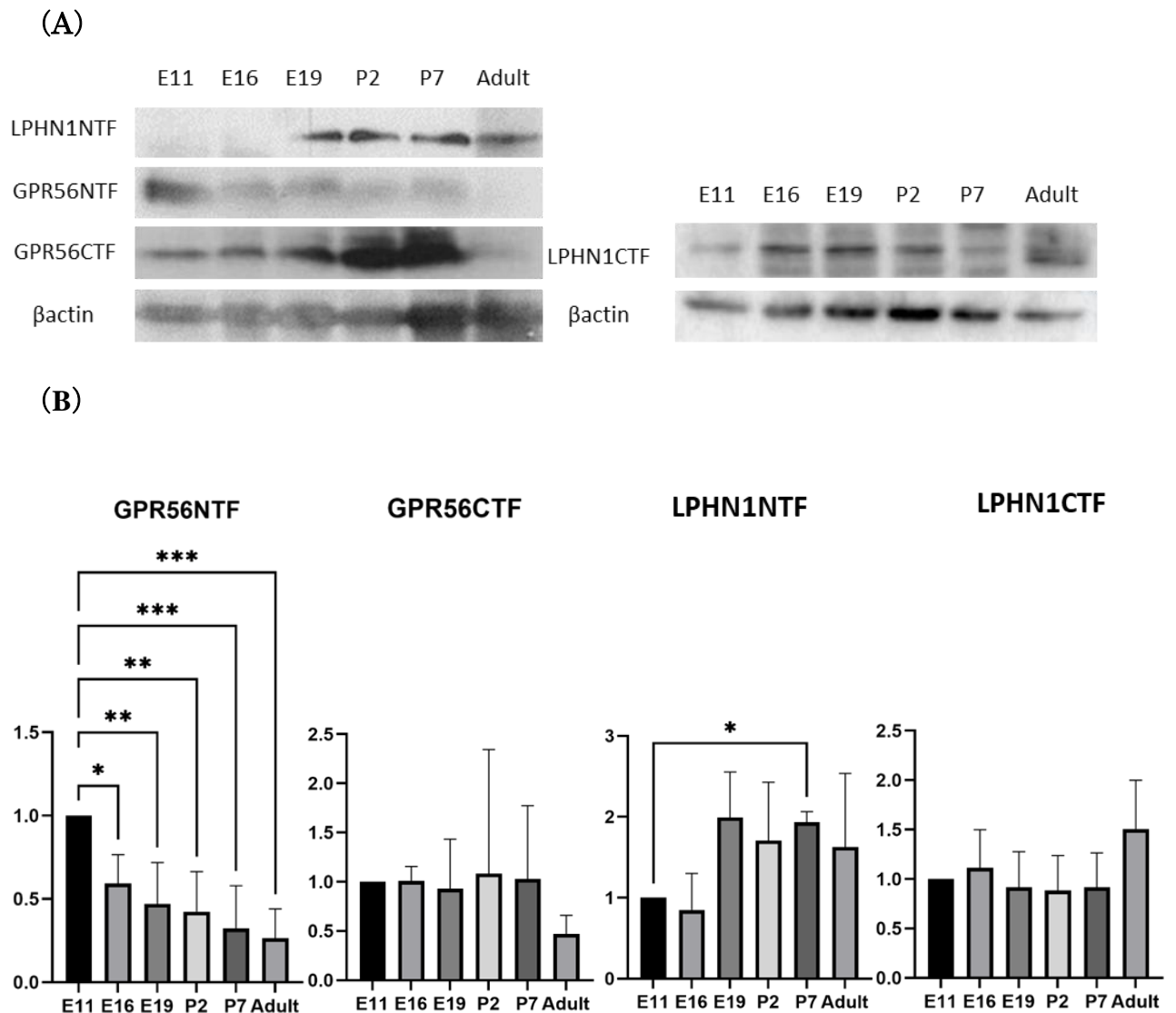


図 4 : 発達に伴う脳における GPR56NTF、GPR56CTF および LPHN1NTF、LPHN1CTF の発現量変化

- (A) 胎生 11 日目 (E11)、E16、E19、生後 2 日 (P2)、P7、成体マウスから、それぞれ脳を取り出し、ホモジナイズしてサンプルを作製した。ライセート中のタンパク質発現を図に示した 5 種類の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。
- (B) 3 回分のウェスタンブロッティングの結果をアクチンで標準化し E11 サンプルで測定されたタンパク質発現量との比較を示した。グラフは標準誤差を表し、Tukey 法により、有意差検定を行った (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ )。

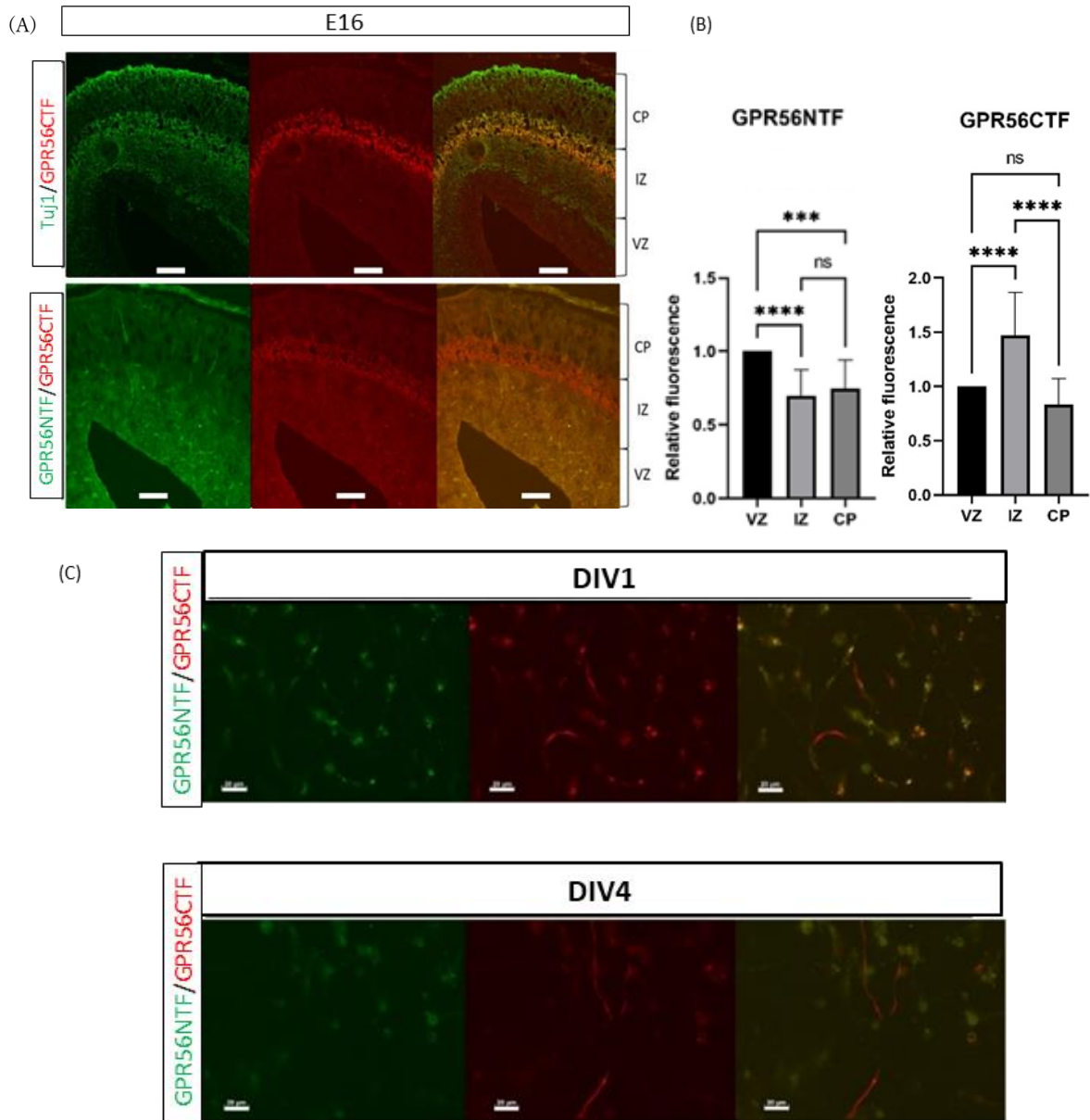


図 5: マウス脳切片あるいは初代培養神経細胞における GPR56NTF、GPR56CTF の局在の解析

(A) E16 マウス脳切片を調製し、GPR56NTF、GPR56CTF あるいは抗  $\beta$  III-tubulin 抗体を用いて免疫染色した。白いスケールバーは 100  $\mu$ m を示す。CP; 皮質板、IZ; 中間帯、VZ; 脳室帯。重ね合わせ画像を右側に示した。(B) 3つの独立したサンプルの蛍光強度を Image J ソフトウェアで定量化した。VZ に対する蛍光強度の平均  $\pm$  SE を表示した。n=3 \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001、一元配置分散分析。(C) E16 マウス海馬由来初代培養神経細胞を分化条件下で 1 日 (DIV1) および 4 日 (DIV4) 培養した。GPR56NTF および GPR56CTF に対する抗体を用いて免疫染色した。白いスケールバーは 20  $\mu$ m を示す。

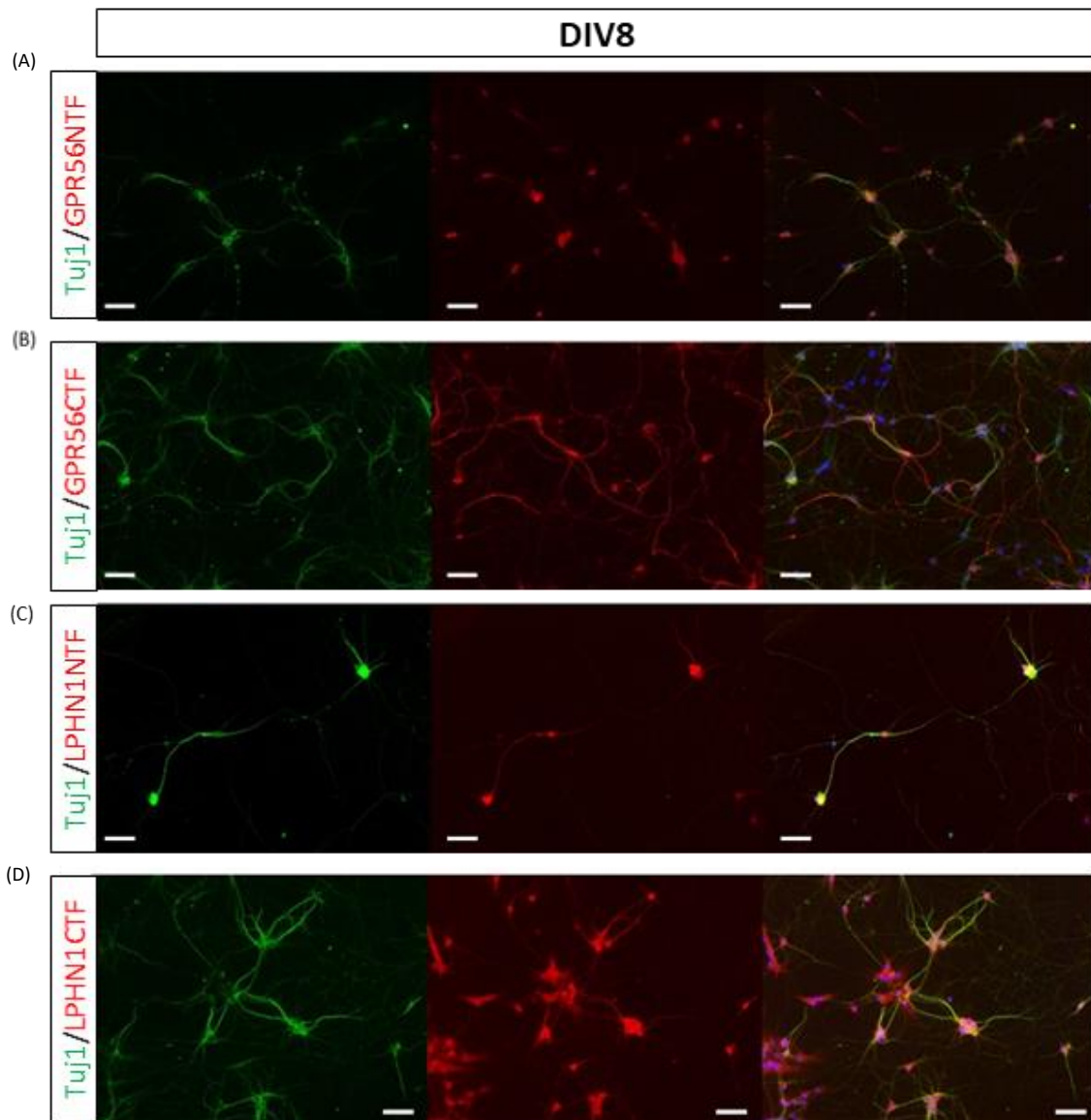


図 6: 初代培養神経細胞における GPR56NTF、GPR56CTF、あるいは LPHN1NTF、LPHN1CTF の局在の解析

(A-D) E16 マウス海馬から初代神経細胞を単離し、分化条件下で 8 日 (DIV8) 培養した。GPR56NTF、GPR56CTF、LPHN1NTF、LPHN1CTF、および抗  $\beta$  III-tubulin 抗体を用いて免疫染色した。白いスケールバーは 20  $\mu$ m を示す。

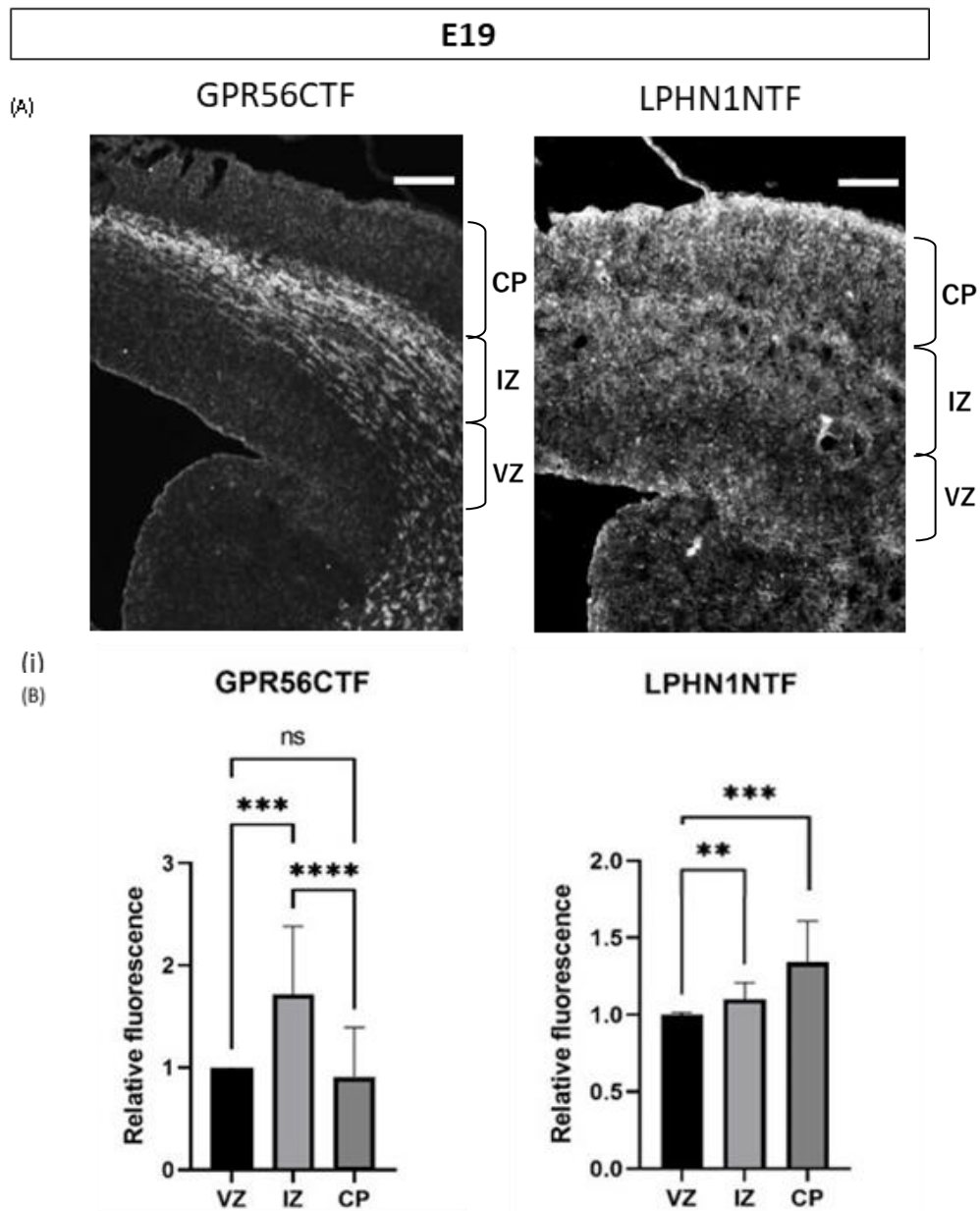


図 7 : マウス脳切片における LPHN1NTF、GPR56CTF の局在の解析

(A) E19 マウス脳切片を作製し、LPHN1NTF、GPR56CTF 抗体を用いて免疫染色した。白いスケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。(B) 蛍光強度は、Image J ソフトウェアを使用して定量化した。VZ に対する蛍光強度の平均  $\pm$  SE をグラフとして表した。\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  一元配置分散分析、\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  マンホイットニー U 検定。3つの独立したサンプルを使用した。

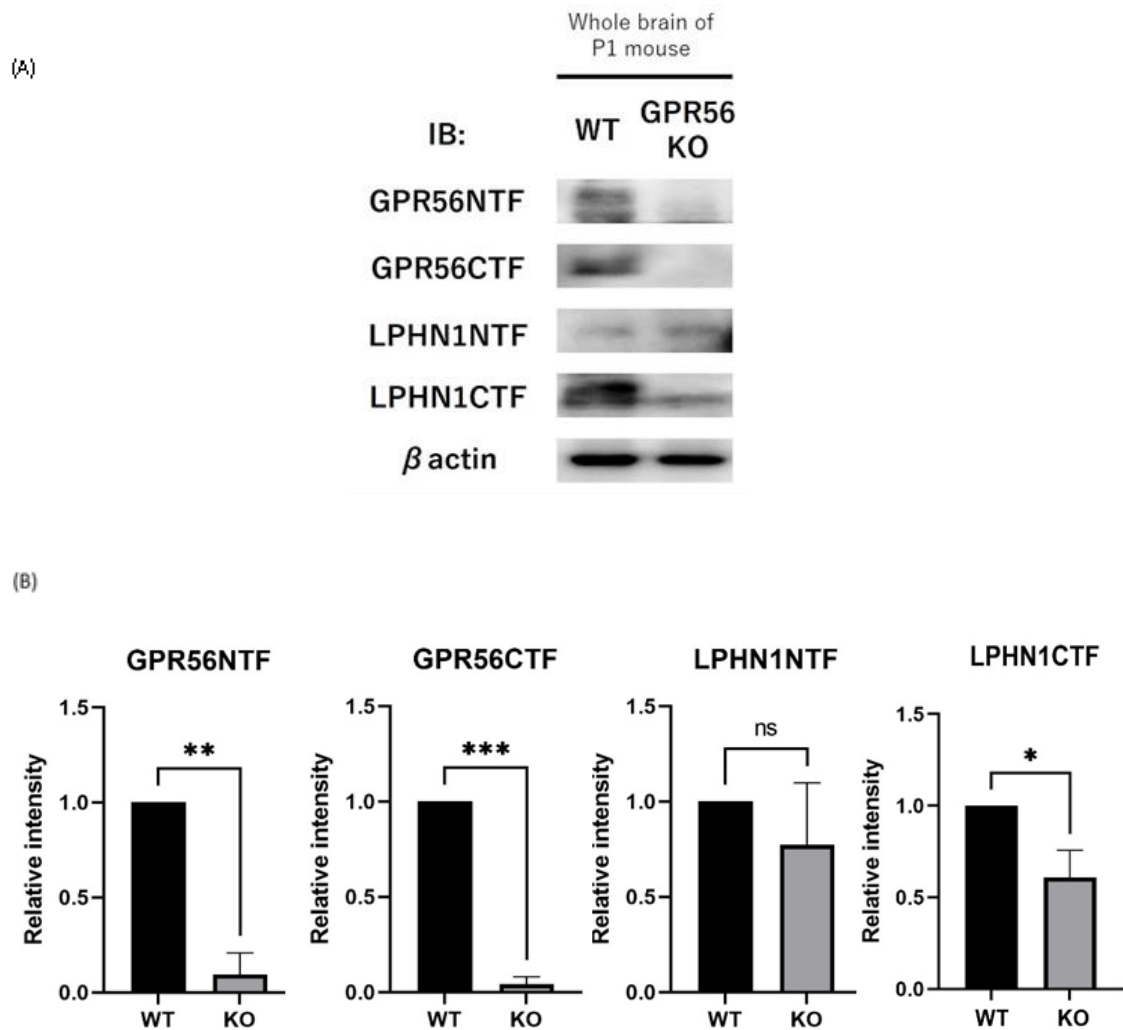
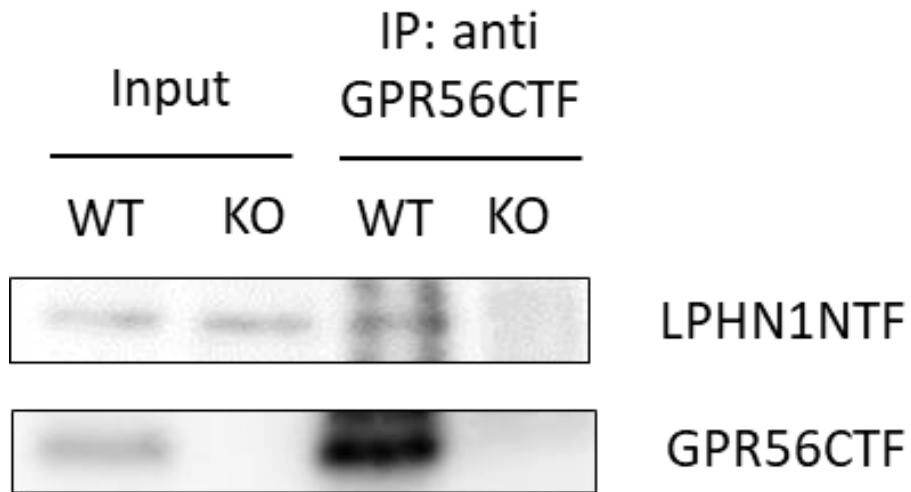


図 8: GPR56 ノックアウト(KO) および野生型(WT) マウス脳ライセートのウェスタンブロットティングによる解析

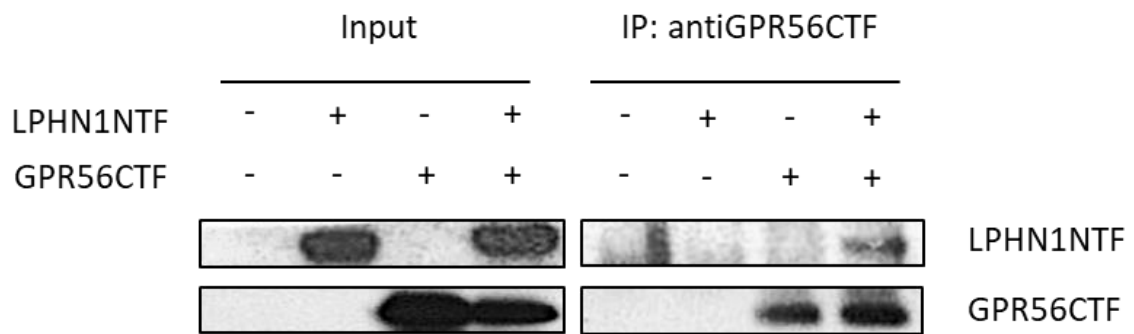
(A) P1 マウスの脳のライセートを調製し、図に示された抗体によるウェスタンブロットティングを行った。(B)  $\beta$ アクチンを用いて標準化した GPR56NTF、GPR56CTF、LPHN1NTF、LPHN1CTF のタンパク質発現レベルの平均  $\pm$  標準誤差。ns: 有意差なし、\* $p \leq 0.05$ 、\*\* $p \leq 0.01$ 、\*\*\* $p \leq 0.005$ 、KO 対 WT; 遺伝子型ごとに  $n = 3$  を定量化した。p 値はマンホイットニー U 検定を用いて計算した。





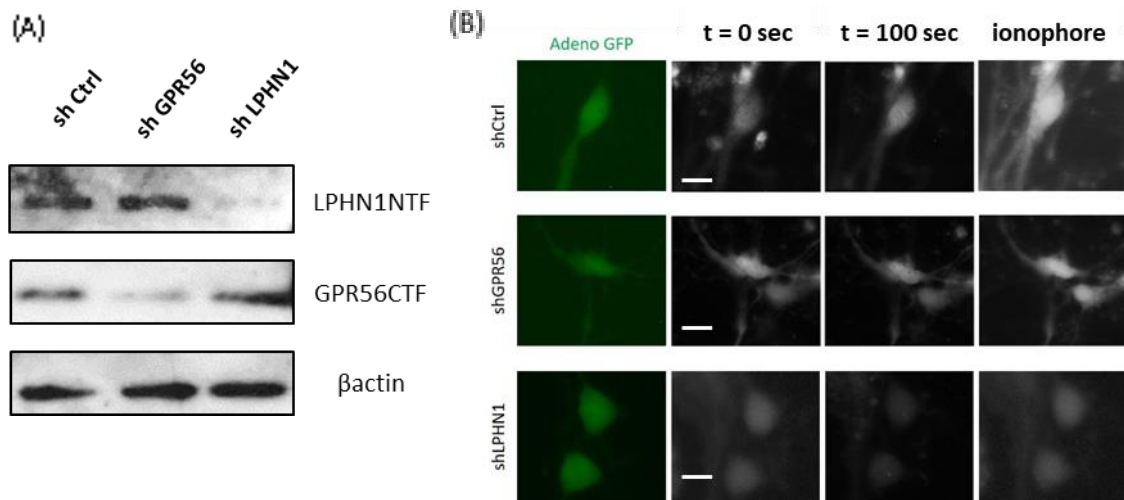
**図 9: GPR56 ノックアウト(KO) および野生型(WT) マウス脳ライセートを用いた LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用の解析**

P7 マウスの脳のライセートを調製し、抗 GPR56CTF 抗体を用いて免疫沈降を行った。 LPHN1NTF および GPR56CTF についてウェスタンブロッティングを行った。



**図 10 : HEK293T 細胞に一過性に発現させた LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用の解析**

HEK293T 細胞に LPHN1NTF および GPR56CTF 発現プラスミドを一過性導入した。ライセートの可溶性画分を全細胞溶解物として収集した。抗 GPR56CTF 抗体を用いて免疫沈降を行った。



(c) Adenovirus mediated knockdown neuron

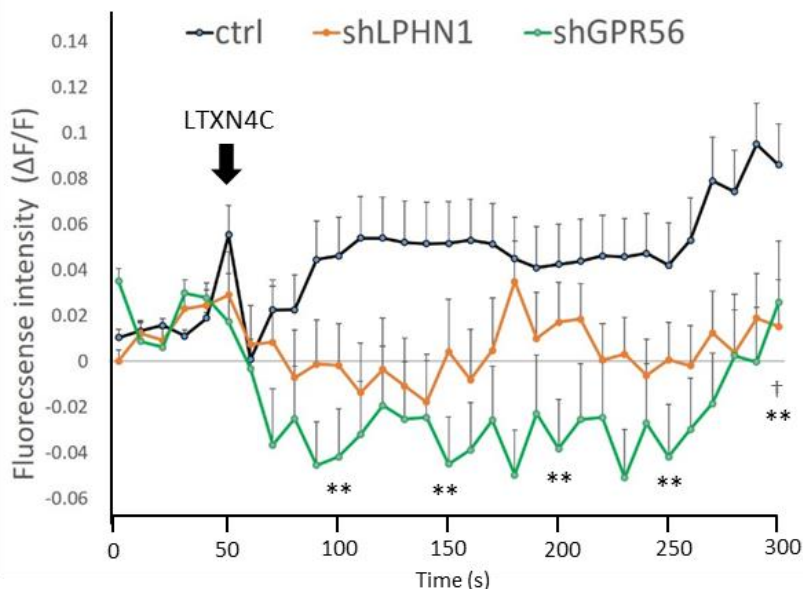


図 11: LTXN4C に対するカルシウム応答への LPHN1 および GPR56 ノックダウンの影響

(A) E16 マウス海馬初代培養神経細胞に shRNA を発現するアデノウイルスを感染させ、神経細胞溶解物をウェスタンブロッティングに供した。shLuciferase を発現するアデノウイルスに感染した神経細胞のライセートをコントロール (shCtrl) とした。(B) GPR56 または LPHN1 ノックダウン神経細胞の LTXN4C に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答のタイムラプス画像。神経細胞は、 $t = 50$  秒の直前に 2 nM LTXN4C で刺激した。白いスケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。(C) LTXN4C 刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光 (比率  $\Delta F/F$ ) の経時変化。 $n = 3$ 、平均  $\pm$  SE。アスタリスク(\*\*) は shGPR56 の p 値が 0.01 未満であることを示し、ダガー(†) は一元配置分散分析による shLPHN1 の p 値が 0.05 未満であることを示す。

## GPR56 knockout neuron

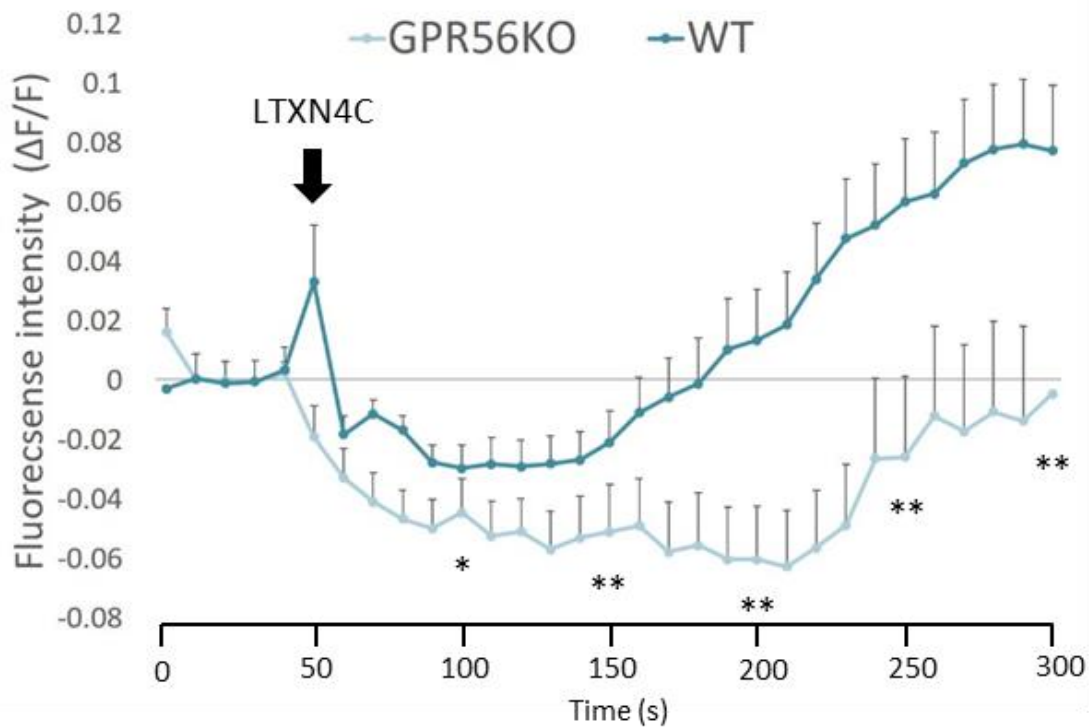


図 12: E16 の GPR56 ノックアウトマウス海馬から調製した初代培養神経細胞を使用した  $\text{Ca}^{2+}$  アッセイ

LTXN4C 刺激後の CaTM-2/ $\text{Ca}^{2+}$  蛍光(比  $\Delta F/F$ ) の相対的変化の時間依存曲線を示す。LTXN4C は 2 nM の濃度で使用した。n = 3、平均  $\pm$  SE。アスタリスク(\*) は p 値が 0.05 未満であることを示し、二重アスタリスク(\*\*) はマンホイットニーの U 検定を使用した p 値が 0.01 未満であることを示す。

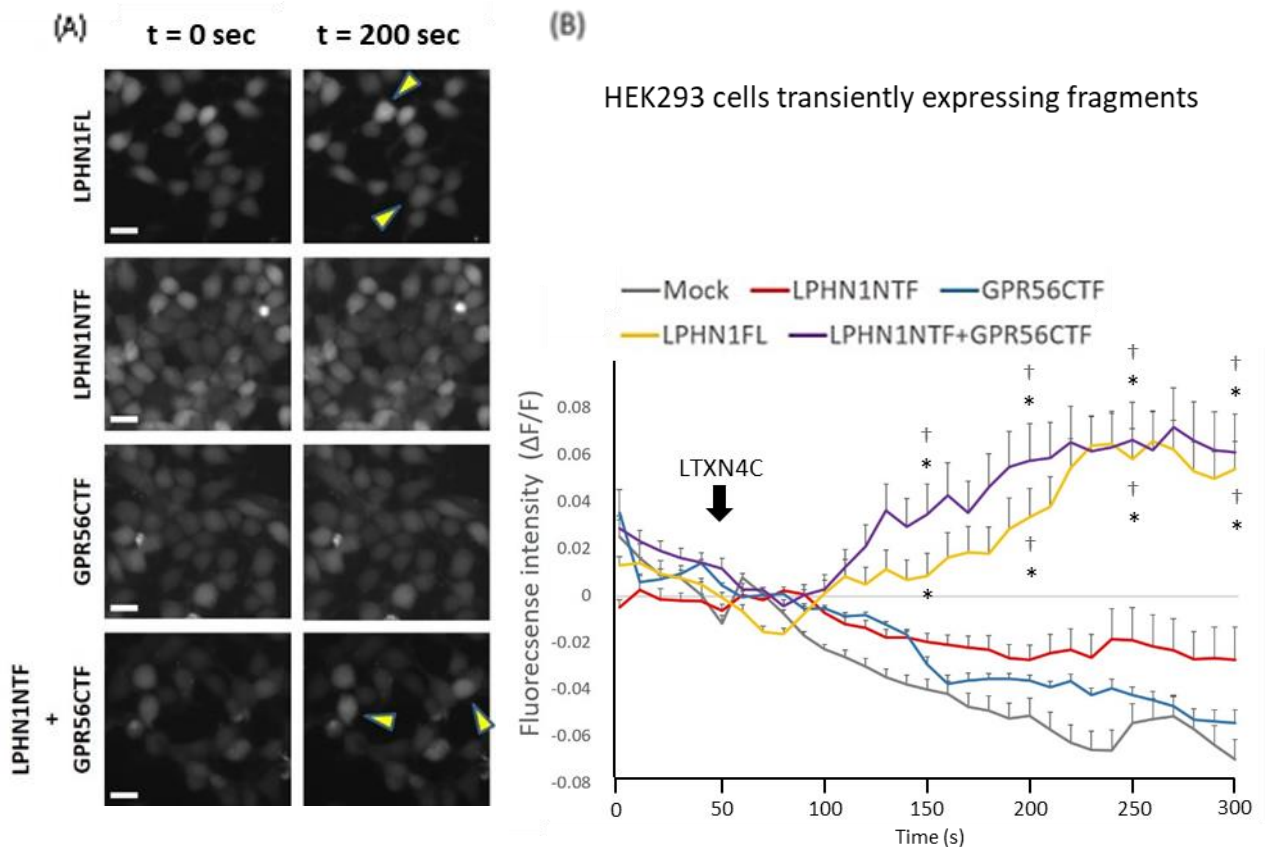


図 13 : HEK 細胞における LPHN1NTF と GPR56CTF 共発現時の  $\text{Ca}^{2+}$  応答

(A) カルシウム指示薬で標識された HEK293 細胞のタイムラプス画像。HEK293 細胞に LPHN1FL、LPHN1NTF、GPR56CTF、および LPHN1NTF と GPR56CTF の組み合わせで形質導入し、 $t = 50$  秒において  $2 \text{ nM}$  LTXN4C で刺激した。矢印は、刺激後に細胞内カルシウムの変化が  $200\%$  以上増加した細胞を示す。白いスケールバーは  $20 \mu\text{m}$  を示す。(B) LPHN1FL、LPHN1NTF、GPR56CTF、および LPHN1NTF と GPR56CTF の組み合わせを発現する HEK293 細胞における LTXN4C 刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光の相対変化(比率  $\Delta F/F$ ) の時間依存曲線を示す。クローニングサイトに何れの遺伝子も挿入されていない発現ベクターを形質導入した HEK293 細胞をネガティブコントロール(Mock) として用いた。 $n = 3$ 、平均  $\pm$  SE。アスタリスク(\*)は、Mock および GPR56CTF に対する一元配置分散分析を使用した  $p$  値が  $0.05$  未満であることを示し、ダガー(†) は LPHN1NTF に対する一元配置分散分析を使用した  $p$  値が  $0.05$  未満であることを示す。

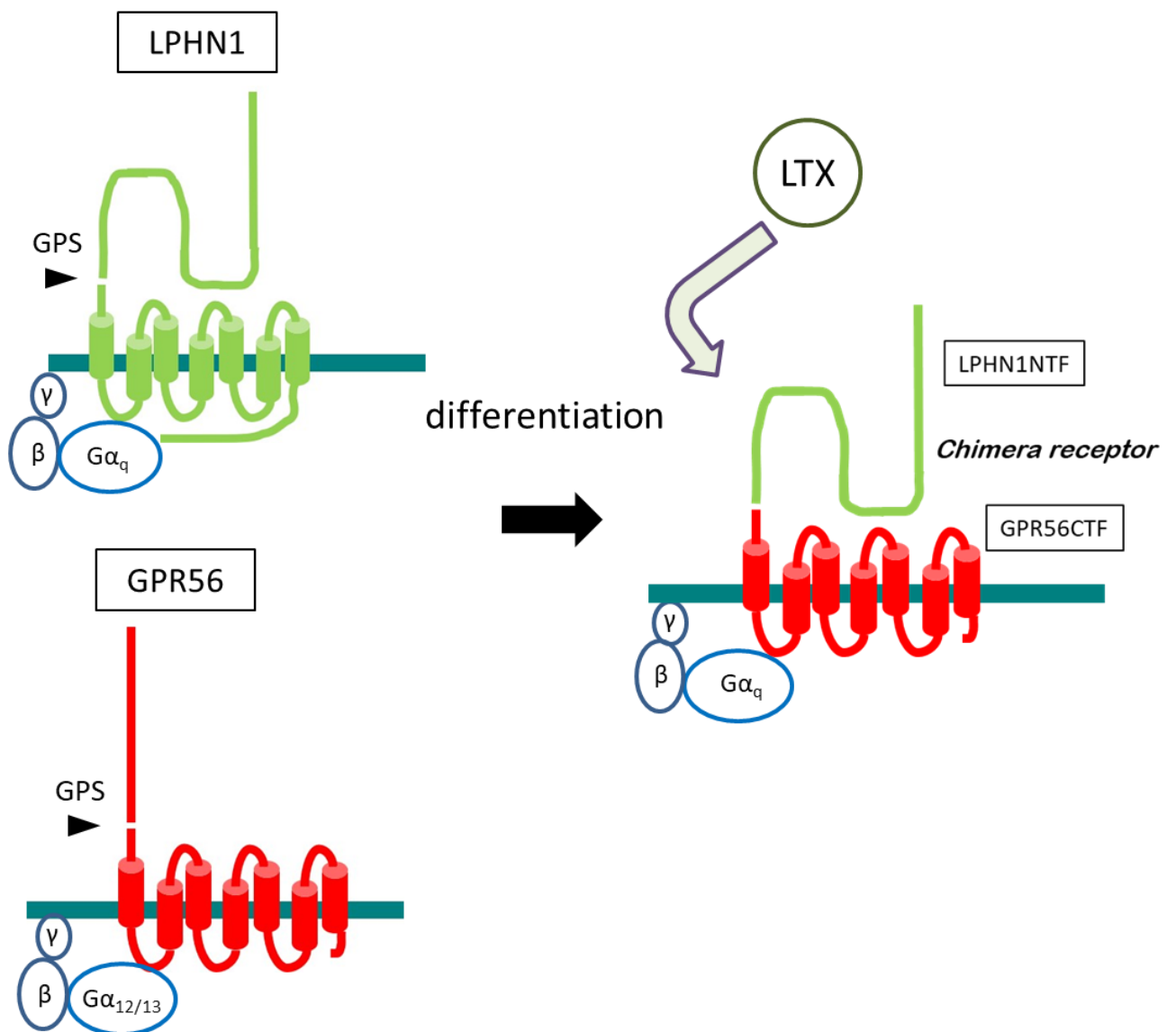


図 14 : キメラ複合体形成のモデル図

マウス胎生期において神経前駆細胞 NPC が分化すると GPR56NTF の発現が減少するのに対して GPR56CTF は変わらない (図 4A, B)。一方、LPHN1 の発現も胎生後期から始まり、GPR56CTF と LPHN1NTF が相互作用することでキメラ複合体を形成する。そしてキメラ複合体は神経細胞において新たな機能を獲得し、生理機能を発揮する可能性がある。

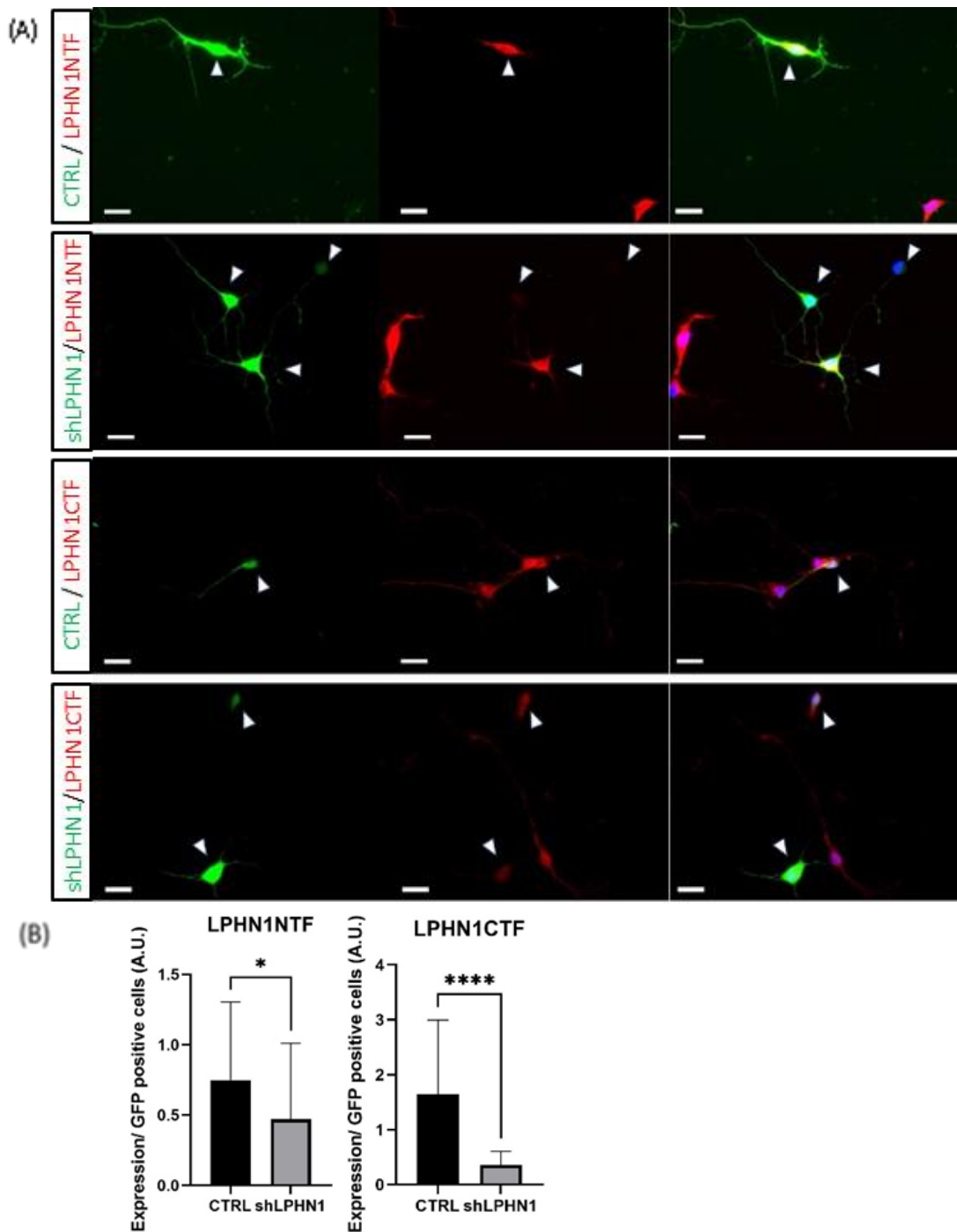


図 15 : 抗 LPHN1 抗体の免疫細胞化学による検定

(A) E16WT マウス海馬由来神経細胞を 5 日培養し、各 shRNA を発現するアデノウイルスを感染させ、分化条件下で 8 日間培養した。LPHN1NTF と LPHN1CTF の免疫細胞化学を示す。白いスケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。矢印は GFP 陽性シグナルを持つアデノウイルス感染細胞を示す。(B) タンパク質発現の平均値をグラフ化した。\* $p \leq 0.05$ , CTRL 対 shLPHN1; 遺伝子型毎に 3 回の独立実験を行い、20 以上の細胞を定量化した。p 値はマンホイットニーの U 検定を用い算出した。

## 考察

### GPR56NTF と GPR56CTF の発現パターン解析

マウス脳の発達ステージに応じた GPR56 の各フラグメントの発現量解析により、GPR56 の NTF と CTF は、発達に伴いそれぞれ異なる発現パターンを示すことが示唆された (図 4)。また GPR56 の GPS ドメインの近くに存在する C346 の変異体 C346S は GPS における切断を受けず、また、細胞膜表面へも移行しないことが報告されている (Krasnoperov V. G., *et al.*, 2002)。この報告より、GPR56 は全長が翻訳され、GPS で切断された後に、細胞膜表面に移行することが予想されるが、発達時期によって GPR56 の NTF と CTF の割合が異なることを示唆する私の実験結果は、NTF と CTF が細胞内で別々にトラフィックされる可能性、あるいは切断された複合体は一度細胞膜に移行するが、発生の段階に応じた細胞外ドメインと膜貫通ドメインの安定性の違いにより、それぞれのタンパク質量に変化が生じる可能性を新たに提唱する。抗 GPR56NTF 抗体を用いた当研究室の先行研究より、GPS における切断を受けていない全長の GPR56 は、E19 以降の脳において発現していることが示されている (Iguchi T., *et al.*, 2008)。今回得られた GPR56CTF の時期特異的発現パターンと照らし合わせると、GPR56 の全長は GPR56NTF の発現が減少した後に発現することが考えられた。GPR56 は神経前駆細胞の遊走に関連していることから、この時期の神経前駆細胞の遊走制御において、GPR56 の NTF、CTF が別々に、あるいは時期によっては両者が複合体となって役割を持つことが考えられた。

### マウス脳切片における GPR56NTF、GPR56CTF あるいは LPHN1NTF の局在

E16 のマウス脳において GPR56CTF は IZ に強く局在し、GPR56NTF は大部分が VZ に局在した (図 5 A, B)。このことから大脳皮質において GPR56CTF は GPR56NTF と一部独立して存在することが示された。さらに E16 マウス全脳から単離した初代神経細胞において、培養 1 日目では GPR56NTF と GPR56CTF は共局在していたが、分化条件で 4 日間培養すると、細胞体に存在する GPR56NTF と独立して GPR56CTF が神経突起に局在した (図 5 C)。これらのことから GPR56 の一部は、ニューロンの成熟に伴って NTF と CTF が独立し、それぞれ機能する可能性が示唆された。E16 マウス海馬から単離した初代神経細胞を分化条件で 8 日間培養すると LPHN1NTF および LPHN1CTF はどちらもニューロンの細胞体あるいは神経突起に発現が見られた (図 6 C, D, 図 1 5)。また、LPHN1NTF の発現が始まる E19 のマウス脳において GPR56CTF は IZ に存在する一方、



LPHN1NTF は IZ と CP に局在した(図 7 A, B) 。このことから、ニューロンの成熟に伴って、脳内の部位やマウスの週齢特異的に GPR56 の一部の NTF が LPHN1NTF に置き換わるモデルが考えられた(図 1 4)。

### GPR56CTF と LPHN1NTF の相互作用の解析

LPHN1NTF は GPR56 だけではなく、同じ aGPCR ファミリーに属する EMR2 の 7-TM 領域とも相互作用するという報告がある (Silva J. P., *et al.*, 2009) 。当研究室において、HEK293T 細胞に一過性に発現させた GPR56CTF と LPHN1NTF のライセートを用いた免疫沈降実験により、GPR56CTF と LPHN1NTF が相互作用することが確認されている (佐々井 2012) 。また LPHN1NTF と LPHN1CTF の相互作用よりも、LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用の方が強いという傾向が見られている。

成体ラット脳ライセートを用いた免疫沈降法によっても、LPHN1NTF が GPR56CTF と相互作用することが報告されている (Silva J. P., *et al.*, 2009) 。この実験は LPHN1NTF に対する抗体を用いた免疫沈降法によって行われているが、今回の私の検討では P7 マウス脳ライセートを GPR56CTF に対する抗体を用いた(図 5) 。先行研究も踏まえ、LPHN1NTF と GPR56CTF は、互いが非常に強い結合で相互作用し、また、それぞれのフラグメントにとって両者が主要な結合相手である可能性が考えられた。

### カルシウムアッセイ

GPR56CTF と LPHN1NTF を HEK293T 細胞に過剰発現させ、LPHN1 特異的なリガンドである LTXN4C の刺激に応じた細胞内カルシウム濃度の変化をイメージング解析した。その結果、この細胞において、ポジティブコントロールである LPHN1FL を発現させた細胞と同程度の細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた(図 1 3) 。LTX は 4 量体を形成し、細胞膜に細孔を形成することで細胞外のカルシウムを流入させ、受容体非依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を促進することが知られている。しかし今回は LTX の膜細孔を生じない変異体である LTXN4C を添加実験に用いている (Volynski K. E., *et al* 2003, Renterghem V. C., *et al.*, 2000) 。よって LTXN4C は LPHN1 のリガンドとして作用し、GPR56CTF を介して細胞内にシグナルを伝達したことが示唆された。

## GPR56 ノックアウトの LPHN1 への影響

GPR56 のノックアウトマウス由来脳において、LPHN1CTF 発現レベルが野生型脳に比べて低下していることがウエスタンブロッティング法 (図 8 A, B) によって示された。この結果から GPR56 は LPHN1 と直接的あるいは機能的に相互作用し、LPHN1 タンパク質の安定性に寄与する可能性が示唆された。さらに初代培養神経細胞を用いたカルシウムアッセイの結果、LPHN1 をノックダウンさせると N4C により誘導されるカルシウム応答を減弱させただけでなく、GPR56 をノックダウンしたときも N4C に対するカルシウム応答が減弱することが分かった(図 1 1. A-C, 図 1 5)。さらに GPR56KO マウスから培養した神経細胞でも N4C への応答が見られなくなった(図 1 2)。これらのことから、マウス脳内神経細胞において LPHN1 と GPR56 がキメラ複合体を形成し、LPHN1 のリガンド刺激を受け、シグナルを伝達することが示唆された(図 1 4)。

## NTF と CTF の相互作用部位

LPHN1 の NTF と CTF の相互作用は GPS ドメインによって媒介されると考えられている(Silva J. P., *et al.*, 2009)。また aGPCR の NTF が 2 つの折りたたまれた構造を持ち、これが CTF の N 末に存在する Tethered agonist (TA) 部分を包み込むように相互作用するモデルが分子動力学シミュレーションにより提唱されてきている (Beliu G., *et al.*, 2021)。TA は aGPCR 間で高く配列が保存されていることから (Stoveken H. M., *et al.*, 2015)、LPHN1NTF と GPR56CTF も GPS ドメインを介して相互作用する可能性がある。

今までに LTX が LPHN1NTF と LPHN1CTF の会合を促しシグナルを伝達させるモデルが提唱されている (Silva J. P., *et al.*, 2009)。一方 GPCR の活性調節機構として GRK と  $\beta$ アレスチンによる脱感作機構が知られているが (Watari K., *et al.*, 2014)、LPHN1FL を発現している細胞に LTXN4C を添加すると、LPHN1NTF および CTF が減少することが、ウエスタンブロッティング法を用いた解析で確認されている (データ未発表)。さらに、LPHN1NTF と GPR56CTF を共発現させた細胞に LTXN4C を添加した場合も同様に、LPHN1NTF と GPR56CTF の検出量の減少が見られた (データ未発表)。これらの結果は受容体へのリガンド結合により、GRK と  $\beta$ アレスチンによる受容体脱感作が促進され、インターナリゼーションによる受容体の細胞内取り込み及び分解が促進した結果、発現量が変化した可能性を提唱している。また、LPHN1NTF と GPR56CTF がキメラ複合体を形成し、リガンド刺激に応じた発現調節機構が発揮された可能性が示唆される。

## LPHN1 及び GPR56 の発現制御

出生後のマウスの脳において、LPHN1 mRNA レベルは、脳が成熟するにつれて増加することが *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて確認されている (Boucard A. A., *et al.*, 2014)。発達ステージにおける解析は進んでいないが、ヒトでは GPR56 のプロモーター領域に少なくとも 17 の選択的転写開始点が存在することが知られている。それに対しマウスの GPR56 転写開始点は 5 つである (Byoung-Il B., *et al.*, 2014)。またヒト胎児脳で最も確実な転写開始点であると考えられている e1m プロモーターは GABA 作動性ニューロンでの優先活性が示されている (Murayama A. Y., *et al.*, 2020)。今後は、GPR56 や LPHN1 の発現調節がどのようなメカニズムで調節されているのか明らかにする必要があると考える。特に GPR56 と LPHN1 の発現制御メカニズムを予測するうえで、LPHN1 と GPR56 のキメラ複合体が形成されると考えられる E19 から P7 までの間のトランスクリプトーム解析を行い、優先的に活性化しているプロモーターを特定したり、ヒトとマウスの細胞や組織間の発現量比較を行うことが必要である。

## GAD67-GFP Knock-In mouse を用いた検討

LPHN1NTF と GPR56CTF の胎児マウス脳切片組織免疫染色法の解析結果から、キメラ複合体は GABA 作動性抑制性ニューロンにも局在する可能性が示唆されているため、LPHN1-FL などの影響を抑えてキメラ複合体の機能に焦点をあわせるためには GAD67-GFP Knock-In マウスから GABA 作動性抑制性ニューロンをソーティングし、機能解析に用いることが望ましいと考えられる。

LPHN1 はプレシナプスに存在することが報告されていることから (Tobaben S., *et al.*, 2002)、キメラ複合体も神経伝達物質の放出、あるいはシナプス形成に関わっている可能性が想定される。そこで今後の予定として、GAD67-GFP Knock-In マウスから GABA 作動性抑制性ニューロンをソーティングし、LTXN4C や内在性リガンドである Lasso による細胞内カルシウム濃度の変化や細胞形態の変化について GPR56 をアデノウイルスでノックダウンした神経細胞とノックダウンしていない神経細胞を用いて比較する、あるいは GPR56KO マウスと組み合わせた実験を行うことを考えている。そこで何らかの差が見られるなら、後述するキメラ複合体のシグナル伝達のモデルの検討、生理機能の解明を目指す。

E16 のマウス脳において GPR56NTF は主に VZ に局在し、GPR56CTF は IZ に存在する (図 6 A)。この時に LPHN1NTF の発現は確認ができなかった。GABA 作動性抑制性ニューロンは E9~E16 の間に発生し、接線方向の移動により主に IZ に分布することが知られている。そして生後一気に皮質層全体に均一化して

いく。その後 P1 の時期から目的の場所に選別移動し、P7 では完全に遊走が完了する (Miyoshi G., *et al.*, 2011)。また GABA 作動性抑制性ニューロンはその発生した場所により移動する場所が異なるなど、性質が違ふと考えられている。これらことから E16 の時期に GPR56CTF のみが発現している細胞は GABA 作動性抑制性ニューロンであり、GPR56CTF がその性質を特徴づけている可能性が考えられる。GPR56 は神経前駆細胞の細胞遊走を抑制制御することが判っている (Iguchi T., *et al.*, 2008)。また NTF が存在しない GPR56CTF は、GPR56 の恒常活性化型と考えられることから (Paavola K. J., *et al.*, 2011)、GABA 作動性抑制性ニューロンに GPR56CTF が発現することで、P1 においてランダムウォークで脳全体に均一化するまで細胞の遊走を制御しているという仮説が立てられた。また今回の私の結果より GPR56CTF と LPHN1NTF がキメラ複合体を形成することが示唆されたことから、GPR56CTF が LPHN1NTF と結合することでその遊走抑制が解除される事も考えられる。これらのことは両者の GPCR が発現していないダブルノックアウトマウスや、HEK293T 細胞などに GPR56CTF あるいは LPHN1NTF を一過性発現させ、Migration Assay などを行うことにより確かめる必要がある。

### キメラ複合体のシグナル伝達モデルの検討

GPR56 および LPHN1 は GPCR であるためそのシグナル伝達には G タンパク質とのカップリングが必要である。GPR56 はヒト由来のものとマウス由来のものとの共役する G タンパク質が異なる可能性がある。ヒト GPR56 については免疫沈降実験より Gq と相互作用するという報告があり (Xu L., *et al.*, 2007)、さらにヒト GPR56 に対するモノクローナル抗体がヒトグリオーマ細胞 U-87-MG の細胞内カルシウム濃度を上昇させることも判明した (Ohta S., *et al.*, 2015)。一方、マウス GPR56 は当研究室の先行研究において、Gq 特異的な阻害剤である YM-254890 や G<sub>12/13</sub> 特異的な阻害剤である p115RGS を用いた結果から、G<sub>12/13</sub> のシグナル経路を活性化することが示されている (Iguchi T., *et al.*, 2008)。LPHN1 についてはラット脳ライセートを用いた結合実験により G<sub>0</sub> と共役していること (Lelianova V. C., *et al.*, 1997)、また神経以外の細胞では Gq と共役していると考えられている (Silva J. P., *et al.*, 2011)。また当研究室の先行研究による CRE のレポーター遺伝子アッセイの結果、あるいは他グループによる cAMP の蓄積をみる実験から LPHN1 は一般的に Gs と共役していると考えられている (Müller A., *et al.*, 2015, Röthe J., *et al.*, 2019, Sumbayev V. V., *et al.*, 2016)。

今回 LTXN4C の刺激によって LPHN1NTF と GPR56CTF のキメラ複合体を介したシグナルにより、細胞内カルシウム濃度が上昇した可能性が考えられる。G

タンパク質からのシグナルでは Gq を介した Ca 応答がよく知られている。Gq が活性化すると、ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化によって産生されるイノシトール 3 リン酸 (IP3) によって細胞内のカルシウムストアからカルシウムの流出が起こり、一過性のカルシウム上昇をおこす。また持続的なカルシウム応答も知られており、PLC の活性化によって産生されるジアシルグリセロールや、それによって活性化されるプロテインキナーゼ C (PKC) が受容体作動性カルシウムチャンネルを活性化し、細胞外カルシウムの流入を引き起こす。また細胞内カルシウムストアのカルシウムが枯渇すると、ストア作動性カルシウムチャンネルが活性化され細胞外からのカルシウムの流入が起こる。これらのことが持続的なカルシウム応答を引き起こすと考えられている (Horinouchi T., *et al.*, 2007)。よって今回の細胞内カルシウムの上昇には Gq が関わっている可能性が考えられる。これを確かめるために Gq 特異的阻害剤である YM-254890 を用いた実験を計画している。

キメラ受容体のカルシウム応答に Gq が関わっているとすると、G<sub>12/13</sub> と共役していたマウス GPR56 が、脳の発達や神経前駆細胞の分化に伴って NTF が LPHN1NTF に置き換わることで共役する G タンパク質も変わるというモデルが考えられた (図 1 4)。共役する G タンパク質が脳の発達にともなって変化するという事例は嗅覚受容体でも見られる (Nakashima A., *et al.*, 2013)。よって GPR56 も嗅覚受容体と同じように抑制性ニューロンが遊走する時期と外部刺激を受け取る時期で共役する G タンパク質が変化する可能性も考えられた。

GPR56 と共役する G タンパク質を決定する因子として、GPR56 の細胞内第一ループの 6 アミノ酸部分の関与が疑われている (Kim J. E., *et al.*, 2010)。マウスの GPR56 の細胞内第一ループのアミノ酸は、ヒトの GPR56 より 6 アミノ酸短い。このことが共役する G タンパク質を決定している可能性がある。キメラ複合体の場合も、GPR56 の NTF が LPHN1 の NTF に置き換わることで細胞内第一ループを含む受容体の構造変化が起きて共役する G タンパク質が変化している可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科メディカル生物学領域分子情報薬理学研究室において行われたものである。

伊東広教授は指導教官として本研究の機会を授けてくださり、また的確なアドバイスと激励を頂きました。多大なご迷惑をお掛けしながらも本論文としてまとめることができましたことに深く感謝致します。

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の川市正史教授、加藤順也教授にはアドバイザー委員として5年間、様々な視点からの貴重な御助言と御指導をいただき、本研究を適切に導いてくださいました。厚く御礼申し上げます。石田靖雅准教授には3年間アドバイザー委員として御指導いただいた上、今回の博士学位審査の審査委員を快くお引き受けいただき感謝の念を禁じえません。別所康全教授には突然のご連絡を差し上げましたにも関わらず博士学位審査の審査委員を引き受けてくださった上、温かい激励のお言葉を頂戴し、心より感謝しております。

宮崎大学フロンティア科学総合研究センターの森下和弘先生にはGPR56ノックアウトマウスをご提供いただき、心より感謝申し上げます。水野憲一博士（現 青森大学 薬学部）、多胡憲治博士（現 自治医科大学 医学部）、小林哲夫博士（現 順天堂大学 医学部）及び梶紀子博士には日ごろの研究に当たっての貴重なディスカッション及び適切な指導をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

鳥山真奈美助教には実験の方向性、実験手技、実験データのまとめ方、文章の書き方に至るまで幅広く細かい御指導を頂きました。御指導、御鞭撻がなければ本研究成果は得られませんでした。厚く御礼申し上げます。

太田茂之氏、高見健太氏、その他研究室でお会い致しました皆様には研究生活における多くのご助言を頂きましたことこの場を借りてお礼申し上げます。

最後に、長きにわたり援助をいただいた家族に心から感謝を捧げます。

2023年3月14日 野島 悠佑

## 参考文献

Abe J., Fukuzawa T., and Hirose S. Cleavage of Ig-Hepta at a “SER” module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site. *J. Biol. Chem.*, **277**: 23391-23398, (2002)

Araç D., Boucard A. A., Bolliger M. F., Nguyen J., Soltis S. M., Südhof T. C. & Brunker A. T. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J.* **31**, 1364 - 1378 (2012)

Bae B. I., Tietjen I., Atabay K. D., Evrony G. D., Johnson M. B., Asare E., Wang P. P., Murayama A. Y., Im K., Lisgo S. N., Overman L., Šestan N., Chang B. S., Barkovich A. J., Grant P. E., Topçu M., Politsky J., Okano H., Piao X., Walsh C. A. Evolutionarily dynamic alternative splicing of GPR56 regulates regional cerebral cortical patterning. *Science*. **14**;343(6172):764-8. (2014)

Bai Y., Du L., Shen L., Zhang Y., Zhang L. GPR56 is highly expressed in neural stem cells but downregulated during differentiation. *Neuroreport*, **20**: 918–922, (2009)

Beliu G., Altrichter S., Guixà-González R., Hemberger M., Brauer I., Dahse A. K., Scholz N., Wieduwild R., Kuhleemann A., Batebi H., Seufert F., Pérez-Hernández G., Hildebrand P. W., Sauer M., Langenhan T. Tethered agonist exposure in intact adhesion/class B2 GPCRs through intrinsic structural flexibility of the GAIN domain. *Mol. Cell.* **4**;81(5):905-921. (2021)

Boucard, A. A., Maxeiner, S., and Südhof, T. C. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **289**, 387–402. (2014)

Chen M. L., Chen C. H., Microarray analysis of differentially expressed genes in rat frontal cortex under chronic risperidone treatment. *Neuropsychopharmacology*. **30**:268-277, (2005)

Davletov B. A., Shamotienko O. G., Lelianova V. G., Grishin E. V., Ushkaryov Y. A. Isolation and biochemical characterization of a Ca<sup>2+</sup>-independent

alpha-latrotoxin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **271:23239-23245.** (1996)

Del Toro D., Carrasquero-Ordaz M. A., Chu A., Ruff T., Shahin M., Jackson V. A., Chavent M., Berbeira-Santana M., Seyit-Bremer G., Brignani S., Kaufmann R., Lowe E., Klein R., Seiradake E. Structural Basis of Teneurin-Latrophilin Interaction in Repulsive Guidance of Migrating Neurons. *Cell* **180:323–339.e19.** (2020)

Demet Araç, Antony A Boucard, Marc F Bolliger, Jenna Nguyen, S Michael Soltis, Thomas C Südhof and Axel T Brunger. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *EMBO J.* **31, 1364 - 1378** (2012)

Fredriksson R., Lagerstrom M. C., Lundin L.G., & Schioth H. B.  
The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63, 1256-1272.** (2003)

Gray J. X., Haino M., Roth M. J., Maguire J. E., Jensen P. N., Yarme A., Stetler Stevenson M. A., Siebenlist U., and Kelly K. CD97 is a processed, seven transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.*, **157: 5438-5447,** (1996)

Horinouchi T., Nishimoto A., Nishiya T., Lu L., Kajita E, and Miwa S.  
Endothelin-1 decreases  $[Ca^{2+}]_i$  via  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger in CHO cells stably expressing endothelin ETA receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **566: 28-33,** (2007)

Iguchi T., Sakata K., Yoshizaki K., Tago K., Mizuno N., and Itoh H. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a  $G\alpha_{12/13}$  and Rho pathway. *J. Biol. Chem.* **283: 14469-14478** (2008)

Ke N., Sundaram R., Liu G., Chionis J., Fan W., Rogers C., Awad T., Grifman M., Yu D., Wong-Staal F., Li QX., Orphan G protein-coupled receptor GPR56 plays a role in cell transformation and tumorigenesis involving the cell adhesion pathway. *Mol. Cancer Ther.*, **6: 1840-1850** (2007)

Kellendonk C, Simpson E. H., Kandel E. R. Modeling cognitive endophenotypes of schizophrenia in mice. *Trends Neurosci.* **32:347-358** (2009)



Kim J. E., Han J. M., Park C. R., Shin K. J., Ahn C., Seong J. Y., Hwang J. I., Splicing variants of the orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulate the activity of transcription factors associated with tumorigenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2010)

Kransperov V., Lu Y., Buryanovsky L., Neubert T. A., Ichtchenko K., and Petrenko A. G. Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J. Biol. Chem.* **277**: 46518-46526, (2002)

Krasnoperov V. G., Bittner M. A., Beavis R., et al., Alpha-latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G protein-coupled receptor *Neuron*, **18**: 925-937, (1997)

Langenhan T., Aust G., and Hamann J., Sticky signaling –Adhesion class G protein-coupled receptors take the stage, *Sci. Signal*, **6**, 276 re3 (2013)

Li T., Chiou B., Gilman C. K., Luo R., Koshi T., Yu D., Oak H. C., Giera S., Johnson-Venkatesh E., & Muthukumar A. K. A splicing isoform of GPR56 mediates microglial synaptic refinement via phosphatidylserine binding. *EMBO J.* **39**: (16) e104136, DOI: 10.15252/embj.2019104136

Li S., Jin Z., Koirala S., Bu L., Xu L., Hynes RO., Walsh CA., Corfas G., Piao X. GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J. Neurosci.*, **28**: 5817-26 (2008)

Liebscher I., Schon J., Petersen S. C., Fischer L., Auerbach N., Demberg L. M., Mogha A., Coster M., Simon KU., Rothmund S., Monk K. R., and Schoneberg T. A tethered agonist within the ectodomain activates the adhesion G protein-coupled receptors GPR126 and GPR133. *Cell reports*, **9**: 2018-2026, (2014)

Lin H. H., Stacey M., Yona S., and Chang G. W. GPS proteolytic cleavage of adhesion GPCRs. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **706**: 49-58, (2010)

Little K. D., Hemler M. E., and Stipp C.S. Dynamic regulation of a

GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Gαq/11 association. *Mol. Biol. Cell*, **15:2375-2387**, (2004)

Luo R., Jeong S.J., Jin Z., Strokes N., Li S., and Piao X. G protein-coupled receptor 56 and collagen iii, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **108: 12925-12930**, (2011)

Matsushita H., Lelianova V. G, Ushkaryov Y. A. The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett*. **443: 348–52**. (1999)

Matus D., Post W. B., Horn S., Schöneberg T., Prömel S. Latrophilin-1 drives neuron morphogenesis and shapes chemo- and mechanosensation-dependent behavior in *C. elegans* via a trans function *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **589, 152-158** (2022)

Mikusic N. L. R., Silva M. G, Pineda A. M., Gironacci M. M. Angiotensin receptors heterodimerization and trafficking: how much do they influence their biological function? *Front Pharmacol*. **11:1179**. (2020)

Minet A. D., Rubin BP., Tucker R. P., Baumgartner S., Chiquet-Ehrismann R., Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J. Cell Sci*. **112: 2019-2032** (1999)

Miyoshi G. and Fishell G. GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development *Creb. Cortex* **21: 845-852** (2011)

Moreno-Salinas A. L., Avila-Zozaya M., Ugalde-Silva P., Hernandez-Guzman D. A., Missirlis F., & Boucard A. A. Latrophilins: A Neuro-Centric View of an Evolutionary Conserved Adhesion G Protein-Coupled Receptor Subfamily. *Front. Neurosci*. **13: 700** (2019)

Murayama A. Y., Kuwako K., Okahara J., Bae B. I., Okuno M., Mashiko H., Shimogori T., Walsh C. A., Sasaki E., Okano H. The polymicrogyria-associated GPR56 promoter preferentially drives gene expression in developing GABAergic neurons in common

marmosets. *Sci Rep.* **10(1):21516. (2020)**

Müller A., Winkler J., Fiedler F., Sastradihardja T., Binder C., Schnabel R., Kungel J., Rothmund S., Hennig C., Schöneberg T., Prömel S. Oriented Cell Division in the *C. elegans* Embryo Is Coordinated by G-Protein Signaling Dependent on the Adhesion GPCR LAT-1. *PLoS Genet.***11(10): e1005624, DOI: 10.1371/journal.pgen.1005624 (2015)**

Nakashima A., Takeuchi H., Imai T., Saito H., Kiyonari H., Abe T., Chen M., Weinstein S.L., Yu R.C., Storm R.D., Nishizumi H., Sakano H. Agonist-Independent GPCR Activity Regulates Anterior-Posterior Targeting of Olfactory Sensory Neurons *Cell* **154: 1313-1325 (2013)**

Ohta S., Sakaguchi S., Kobayashi Y., Mizuno N., Tago K., Itoh H. Agonistic antibodies reveal the function of GPR56 in human glioma U87-MG cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **38: 594-600 (2015)**

Paavola K. J., Stephenson J. R., Ritter S. L., Alter S. P., and Hall R. A. The N terminus of the adhesion G protein-coupled receptor GPR56 controls receptor signaling activity. *J. Biol. Chem.*, **286: 28914-28921 (2011)**

Parmar V. K., Grinde E., Mazurkiewicz J. E., Herrick-Davis K. Beta2-adrenergic receptor homodimers: Role of transmembrane domain 1 and helix 8 in dimerization and cell surface expression. *Biochim Biophys Acta.***1859(9 Pt A):1445-1455 (2017)**

Patra C., Amerongen M. J., Ghosh S., Ricciardi F., Sajjad A., Novoyatleva T., Mogha A., Monk K. R., Muhlfeld C., and Engel F. B. Organ-specific function of adhesion G protein-coupled receptor GPR126 is domain-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **42: 16898-16903 (2013)**

Piao X., Hill R. S., Bodell A., Chang B. S., Basel-Vanagaite L., Straussberg R., Dobyns W. B., Qasrawi B., Winter R. M., Innes A. M., Voit T., Ross M. E., Michaud J. L., Descarie J. C., Barkovich A. J., and Walsh C. A., G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*, **303:2033-2036, (2004)**

Röthe J., Thor D., Winkler J., Knierim A. B., Binder C., Huth S., Kraft R., Rothmund

S., Schöneberg T., & Prömel S. Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release. *Cell Reports* **26**, 1573–1584 (2019)

Saito Y., Kaneda K., Suekane A., Ichihara E., Nakahata S., Yamakawa N., Nagai K., Mizuno N., Kogawa K., Miura I., Itoh H. and Morishita K. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56 *Leukemia*, **27** 1637 (2013)

Satake H., Matsubara S., Aoyama M., Kawada T., Sakai T. GPCR heterodimerization in the reproductive system: functional regulation and implication for biodiversity. *Front. Endocrinol.* **4**:100. (2013)

Shashidhar S., Lorente G, Nagavarapu U., Nelson A., Kuo J., Cummins J., Nikolich K., Urfer R., and Foehr E.D. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. *Oncogene*, **24**: 1673-1682, (2005)

Silva J. P., Lelianova V. G, Ermolyuk Y. S., Vysokov N., Hitchen P. G., Berninghausen O., Rahman M. A., Zangrandi A., Fidalgo S., Tonevitsky A. G., Dell A., Volynski K. E., Ushkaryov Y. A. Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**:12113-12118. (2011)

Silva J. P., Lelianova V., Hopkins C., Volynski K. E., Ushkaryov Y. A. Functional cross-interaction of the fragments produced by the cleavage of distinct adhesion G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* **284**:6495-6506. (2009)

Singh A. K., Lin H. H. The role of GPR56/ADGRG1 in health and disease. *Biomedical J.* **44**: 534-547 (2021)

Stoveken H. M., Hajduczuk A. G., Xu L., & Tall G. G. Adhesion G protein-coupled receptors are activated by exposure of a cryptic tethered agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **112** (19) 6194-6199 (2014)

Sumbayev V. V., Silva I. G, Blackburn J., Gibbs B. F., Yasinska I. M., Garrett M. D., Tonevitsky A. G., & Ushkaryov Y. A. Expression of functional neuronal receptor latrophilin 1 in human acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget.* **7**, 45575-45583

(2016)

Tobaben S., Südhof T. C., Stahl B., Genetic analysis of alpha-latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha.

***J. Biol. Chem.* 277: 6359-6365 (2002)**

Tseng W. Y., Wu Y. J. J., Yang T. Y., Chiang N. Y., Tsai W. P., Gordon S., Chang G. W., Kuo C. F., Luo S. F., & Lin H. H. High levels of soluble GPR56/ADGRG1 are associated with positive rheumatoid factor and elevated tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. ***J. Microbiol Immunol Infect* 51, (4), 485-49 (2018)**

Tucker P. R., Kenzelmann D., Trzebiatowska A., Chiquet-Ehrismann R. Teneurins: Transmembrane proteins with fundamental roles in development, ***Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 292-297 (2007)**

Ushkaryov Y. A., Rohou A, Sugita S.  $\alpha$ -Latrotoxin and Its Receptors. ***Handb. Exp. Pharmacol.* 184:171-206. (2008)**

Van Renterghem C, Iborra C, Martin-Moutot N, et al.,  $\alpha$ -Latrotoxin forms calcium-permeable membrane pores via interaction with latrophilin or neurexin. ***Eur. J. Neurosci.*; 12:3953-3962 (2000)**

Volynski K. E., Silva J. P., Lelianova V. G., Atiqur Rahman M, Hopkins C, Ushkaryov Y. A., Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C). ***EMBO J.*; 23(22): 4423-33 (2004)**

Volynski K. E., Capogna M., Ashton A. C., et al., Mutant  $\alpha$ -Latrotoxin (LTXN4C) Does Not Form Pores and Causes Secretion by Receptor Stimulation. ***J. Biol. Chem.*; 278: 31058-31066 (2003)**

Watari K., Nakaya M., Kurose H. Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. ***J. Mol. Signal.* 9(1):1 (2014)**

Wu M. P., Doyle J. R., Barry B., Beauvais A., Rozkalne A., Piao X., Lawlor M. W., Kopin A. S., Walsh C. A., Gussoni E. G-protein coupled receptor 56 promotes myoblast fusion through serum response factor- and nuclear factor of activated T-cell-mediated

signalling but is not essential for muscle development in vivo.

***FEBS J.*, 280: 6097-6113 (2013)**

Xu L., Begum S., Barry M., Crowley D., Yang L., Bronson R.T., Hynes R. O.,  
GPR56 Plays Varying Roles in Endogenous Cancer Progression

***Clin. Exp. Metastasis* 27: 241-249 (2010)**

Xu L., Begum S., Hearn J. D., and Hynes R.O. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 10: 9023-9028 (2006)**

太田茂之 本学博士論文 (2015)

佐々井直人 本学修士論文 (2012)