

# 研究報告書

## 「中枢シナプスオーガナイザーによる標的認識と特異的シナプス形成の調節機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 吉田 知之

### 1. 研究のねらい

私達の脳機能発現の基盤となる神経細胞ネットワークの形成と再編は発達期及び記憶学習の際に起こる極めて重要なイベントの1つである。神経細胞ネットワークの形成の一端はシナプスオーガナイザーと呼ばれるシナプス前終末と後終末の分化誘導能を持つ一部の細胞接着分子や受容体分子群が担うと考えられている。多様なシナプス結合の特異性を保証するためには様々な脳部位、層構造、神経回路もしくは神経細胞種特異的な標的認識分子と共役してシナプスオーガナイザーが機能する必要があるが、これまでに報告されているシナプスオーガナイザーは高々10種類ほどである。どのようにしてこれらの限られたシナプスオーガナイザーによってシナプスの特異性が維持され、多様でかつ整然としたシナプスの形成が進められるのかは全くわかっていない。また、一方で、複数のシナプスオーガナイザーの組み合わせによる調節や機能補完などシナプスオーガナイザー間の相互作用も特異的シナプス形成に重要と考えられる。本研究では多様な中枢シナプス結合の特異性を保証するプロテインコードとしてのシナプスオーガナイザーの機能解明とシナプスオーガナイザー間の相互作用によるシナプス形成の調節原理の解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

シナプス形成は軸索終末及び樹状突起に存在するシナプスオーガナイザー分子の活性化によって開始されることが知られている。私たちの同定したシナプス前部オーガナイザー、PTP $\delta$ は、その細胞外領域イムノグロブリン様(Ig)ドメイン内に2カ所のスプライスサイトを持ち、それぞれに挿入されるペプチドの種類と組み合わせによって多様なスプライスバリエーションを創出することを見出した。これらの PTP $\delta$  スプライスバリエーションはそれぞれ興奮性および抑制性シナプスの誘導特性が異なり、それぞれに特異的なリガンド分子を持つことを明らかにした。PTP $\delta$  リガンドは PTP $\delta$  スプライスバリエーション特異的なものと非特異的なものに大別され、前者はいずれもシナプスオーガナイザー能を有していた。このことから PTP $\delta$  の細胞外領域 Igドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に重要な役割を担い、その多様なスプライスバリエーションに対応したリガンドを介して標的依存的なシナプス形成を保証している可能性が示唆された。

シナプス前部オーガナイザーは Neurexin (NRXN)及び 2A 型受容体チロシン脱リン酸化酵素(2A 型 RPTP: LAR, PTP $\delta$ , PTP $\sigma$ )がその主要なものとして報告されている。PTP $\delta$  遺伝子欠損マウス由来神経細胞においては NRXN を介するシナプス誘導能が促進されており、逆に PTP $\delta$  を強制発現させた神経細胞では NRXN を介するシナプス誘導能が低下して

いたことから NRXN 及び 2A 型 RPTP は互いにバランス関係を保ち、シナプス形成を調節することが明らかとなった。このシナプスオーガナイザー間の抑制には PTP $\delta$  の細胞内ドメインが不可欠であった。異なるシナプスオーガナイザー間の抑制は細胞もしくはシナプスごとに主要なシナプスオーガナイザーを決定し、混線を防ぐことに寄与すると推測された。

## (2) 詳細

### PTP $\delta$ のスプライス多様性による特異的シナプス結合の創出機構

#### 1) PTP $\delta$ スプライスバリエント特異的リガンドの同定

PTP $\delta$  の細胞外領域 Ig 様ドメイン内には2カ所のスプライスサイト(A site, B site)があり、A site には3, 6, もしくは9アミノ酸よりなるミニエクソン(me) A ペプチドが、一方 B site には4アミノ酸よりなる me B ペプチドが挿入されることによって少なくとも8種類のプライスバリエントが作られる(図 1)。研究当初に既に同定していた IL1RAPL1 はこのうち A, B site にそれぞれ 9 及び 4 アミノ酸の挿入のあるバリエント(以後このバリエントを PTP $\delta$  と表記)に最も良く

結合した。IL1RAPL1 によるシナプス前終末誘導は PTP $\delta$  遺伝子欠損マウス由来神経細胞に対しては完全に消失した。一方、PTP $\delta$  によるシナプス後終末誘導能は IL1RAPL1 遺伝子欠損マウス由来神経細胞でも半分程度維持されたことから (Yasumura

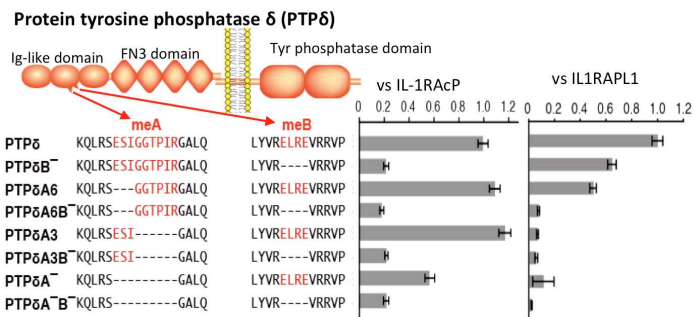


図1 PTP $\delta$  の Igドメインに挿入される mini-exon(me) A 及び B 配列(左)と各スプライスバリエントに対する IL-1RAcP, IL1RAPL1 の結合活性(右)

et al., 2014)、IL1RAPL1 以外に PTP $\delta$  によるシナプス後部誘導を担うオーガナイザーが存在することが示唆された。そこで構造上 IL1RAPL1 の分類される IL-1 受容体ファミリー分子を候補としてシナプス誘導能及び PTP $\delta$  結合能のスクリーニングを行った。これまでに報告されている9つの IL-1 受容体ファミリー分子のうち Interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) と IL1RAPL2 にシナプス前終末誘導活性があることを見出した(Yoshida et al., 2012)。IL-1RAcP は meB ペプチドの挿入を持つ PTP $\delta$  スプライスバリエントに選択的なリガンドであった。また、PTP $\delta$  によるシナプス誘導能は IL1RAPL1 及び IL-1RAcP ダブルノックアウトマウス由来神経細胞に対して 25%程度まで減少したことから、PTP $\delta$  によるシナプス後部誘導の際には IL1RAPL1, IL-1RAcP がリガンドとして主要な役割を担うことが明らかとなった。meA, meB の挿入の有無によって生じるいずれの PTP $\delta$  スプライスバリエントにもシナプス後部誘導能が認められた。B site への挿入の有無は興奮性・抑制性いずれのシナプスを誘導するかに寄与し、A site へのペプチドの挿入は誘導能の大きさに影響を与えることが明らかとなった。これらのバリエントによるシナプス後部誘導時のリガンドを系統的に単離するために、細胞外領域組換えタンパク質をコートした磁気ビーズを作製した。これらのビーズを神経細胞と共培養し、シナプス後部を誘導した際に架橋試薬によって磁気ビーズから神経細胞膜表面の PTP $\delta$  リガンドまでのシナプス形成複合体を架橋、単離し、質量分析によりリガ

ンド候補分子を同定した。種々の結合解析によって既知の分子を含めて9種類の PTP $\delta$  リガンドを同定した。これらはドメイン構造上極めて多様なものであった。これらのうち4種類は特定のスプライスバリエントに選択的な結合特性を示し、残りはいずれのスプライスバリエントにも結合した。特定のスプライスバリエントに選択的な結合特性を示したリガンドはいずれも神経細胞-線維芽細胞共培養系でシナプス前終末を誘導するシナプスオーガナイザーであることが判った。一方、顕著なスプライスバリエント特異性を持たない PTP $\delta$  リガンドにはシナプスオーガナイザー能は認められなかった。このことから PTP $\delta$  の細胞外領域 Igドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に重要な役割を担うことが示唆された(図2)。一方、シナプス誘導能を持たないリガンドについては今後の機能解析が必要である。

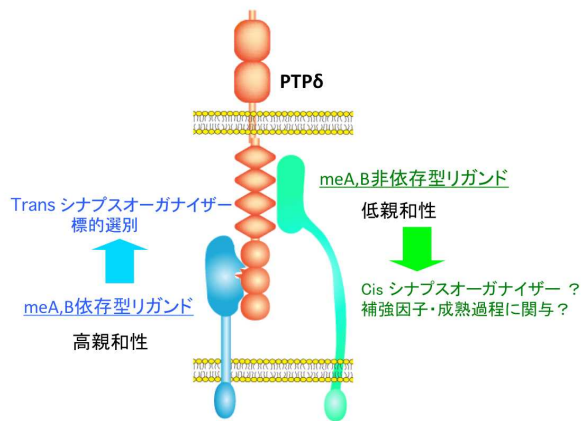


図2 PTP $\delta$  とそのリガンドによるシナプス形成調節モデル

## 2) PTP $\delta$ スプライスバリエント及びスプライスバリエント特異的リガンドの発現回路の同定

PTP $\delta$  スプライスバリエントを発現する神経細胞及びシナプスを検出する目的で meA, meB ペプチドの挿入の有無を特異的に認識する抗体の作出を試みた。これまでのところ組織染色に使用可能な抗体は得られていない。そのため PTP $\delta$  スプライスバリエントとその特異的リガンドがシナプス前終末, 後終末の対応関係で発現する神経回路の同定には至っていない。

## 3) me A 及び me B ペプチドの持つプロテインコードの構造生物学的基盤

IL1RAPL1, IL-1RAcP, PTP $\delta$  の細胞外領域の組換えタンパク質を哺乳類細胞より大量に発現・精製し、PTP $\delta$ -IL1RAPL1 複合体、PTP $\delta$ -IL-1RAcP 複合体結晶のスクリーニング、X 線結晶構造解析を行った。それぞれの複合体について 4.4 Å, 3.3 Å の分解能で構造決定した。これらの複合体においては IL1RAPL1, IL-1RAcP の1番目の Igドメイン(IgD1)を PTP $\delta$  の IgD2 と IgD3 が挟み込む形で結合し、PTP $\delta$  IgD2 内に存在する meA は結合面に存在した。一方、PTP $\delta$  の IgD2 と IgD3 のヒンジに存在する meB は IL1RAPL1, IL-1RAcP の IgD1 を挟み込むためのリンカーとして機能することが示唆された(図3)。複合体構

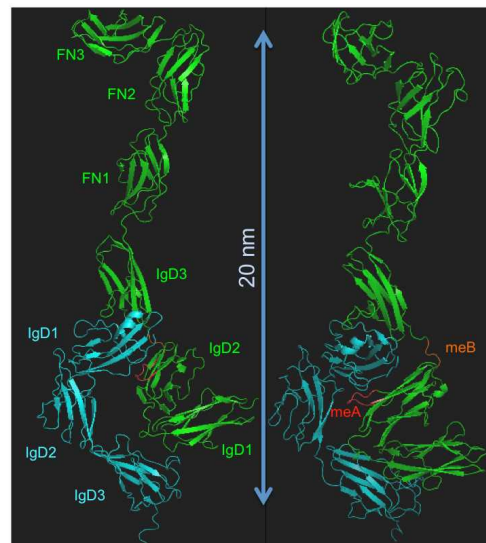


図3 PTP $\delta$ -IL1RAPL1 複合体の結晶構造 meAは結合面に存在し、meBはリンカーとして機能

造モデルから推定される結合面に存在し、水素結合、疎水性相互作用に寄与するアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体はいずれも複合体の形成とシナプス誘導に顕著な影響を与えたため、複合体構造モデルの妥当性が検証された。構造科学的解析からも PTP $\delta$  の細胞外領域 Ig ドメインは標的選別とシナプス誘導シグナルの惹起双方に不可欠であることが示された。

#### 異なるシナプスオーガナイザーシグナルの相互作用によるシナプス形成調節の分子機構

シナプスオーガナイザーは NRXN/NRXN リガンド及び 2A 型 RPTP/2A 型 RPTP リガンドに大別される。2A 型 RPTP の1つ PTP $\delta$  遺伝子欠損マウス由来神経細胞では NLGN によるシナプス誘導が亢進することから、通常は PTP $\delta$  が NRXN によるシナプス形成シグナルを抑制していることが明らかになった。更に PTP $\delta$  を強制発現させた神経細胞においては NRXN を介するシナプス誘導が全く起こらないことが分かった。このことは複数のシナプスオーガナイザーの中で細胞ごと、もしくはシナプスごとに特定のシナプスオーガナイザーが働くと、他のシナプスオーガナイザーが抑制されるような排他的な制御があることを示唆する。

PTP $\delta$  遺伝子欠損神経細胞に対する種々の NRXN リガンド及び 2A 型 RPTP リガンドを用いたシナプス誘導能の比較から、PTP $\delta$  による他のシナプスオーガナイザーシグナルの抑制範囲は NRXN 系に限局されることが明らかになった。

この PTP $\delta$  による NRXN 系の抑制が PTP $\delta$  欠損神経細胞における NRXN 分子の転写レベル、翻訳レベル、翻訳後の修飾のいずれの段階の相互作用に起因するのかを調べた。その結果、NRXN1,2,3 いずれの mRNA 発現量、タンパク質発現量(脳全体とシナプトソーム分画)共に野生型、PTP $\delta$  欠損細胞の間に差は認められなかった。また、NRXN の下流でシナプス前終末の誘導に関与すると考えられる CASK, Mint1, Syntenin 等の mRNA 発現量にも差は認められなかった。

PTP $\delta$  欠損神経細胞における IL1RAPL1 によるシナプス前終末誘導能の欠損と NRXN-NLGN シグナルの増強は PTP $\delta$  を遺伝子導入することでレスキューされたが、細胞内領域 D2 ドメインを欠く PTP $\delta$  変異体ではレスキュー出来ないことから、このドメインがシナプス前終末誘導と NRXN 抑制に関わることが明らかとなった(図4)。

IL1RAPL1 ビーズによって PTP $\delta$  を介して人工的にシナプス前終末を誘導した際に細胞膜透過性架橋試薬を投与し、PTP $\delta$ D2 ドメインを介する NRXN 抑制シグナル分子を架橋し、芋蔓式にシグナル分子を単離する方法を開発した。この

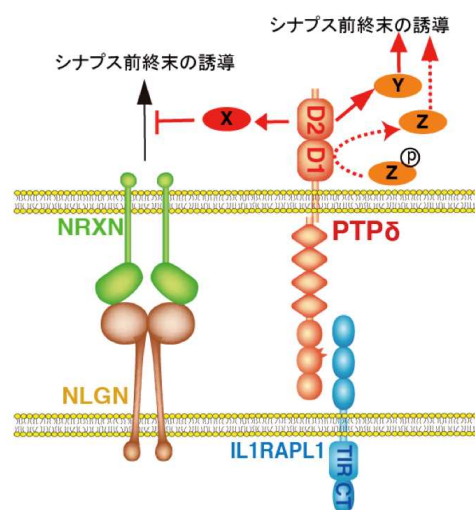


図4 PTP $\delta$ によるシナプス前終末誘導、及びNRXN シグナルの抑制モデル  
PTP $\delta$ 欠損神経細胞に対して種々のドメイン欠損型PTP $\delta$ を導入し、NLGN1によるシナプス前終末誘導能亢進表現型及びIL1RAPL1によるシナプス前終末誘導能欠損表現型をレスキューするか否かで、機能ドメインを抽出した

方法で単離した分子の 1/3 は直接 PTP8D2 ドメインに結合した。現在これらの分子について NRXN シグナルの抑制に関わるか否かについて解析中である。

異なるシナプスオーガナイザー間の排他的相互作用は細胞もしくはシナプスごとに主要なシナプスオーガナイザーを決定し、混線を防ぐことに寄与する可能性が考えられる。

### 3. 今後の展開

本研究ではシナプスオーガナイザーのスクリーニングを通して、シナプス前部オーガナイザー PTP8 はスプライシングによって多様性を増やし、スプライスバリエントに厳密に対応した構造上多様なリガンドがシナプス後部オーガナイザーとして機能することを明らかにした。このことはシナプスオーガナイザーがシナプス誘導に関わるだけでなく標的選別にも関わることを示唆するものである。これらのシナプスオーガナイザーセットが個体内でどのように使い分けられ、多様なシナプス形成を調節するかを理解することが今後の課題の1つである。そのためには PTP8 スプライスバリエント発現の可視化、特定のスプライスバリエント欠損マウスの作出などの新たな研究ツールの作出が不可欠である。また、本研究から見出した異なるシナプスオーガナイザー間の抑制的な相互作用によるシナプス形成調節の生理的意義について回路、個体レベルでの解析を今後進めていきたい。

シナプスの形成と再編は発達期のみならず成体脳でも引き続き起きており、記憶・学習成立の重要ステップの1つと考えられている。実際に私たちの作出したシナプスオーガナイザー欠損マウスでは発達期のシナプス形成の遅れの他に遠隔記憶形成の顕著な障害が認められた。今後、シナプスオーガナイザー活性化機構の理解と活性化神経回路の同定を通して、記憶回路痕跡や記憶回路の遷移機構の解明へ向けた研究へと発展させたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究課題の PTP8 スプライスバリエント特異的リガンドの同定(新規シナプスオーガナイザーの単離)、シナプス誘導の細胞内シグナル分子の単離、異なるシナプスオーガナイザーシグナルのクロストークに関わるシグナル分子の単離、PTP8 スプライスバリエント/meA, meB による標的認識の構造学的解析については予定通りに研究が進行し、当初の目標を達成した。中でも系統的な PTP8 のリガンドスクリーンから、スプライスバリエント特異的リガンドのみがシナプスオーガナイザー活性を持つことを見出したことは概念的に重要な発見であった。従来より、「標的認識分子群による標的選別の後にシナプスオーガナイザーが働き、シナプス形成へと移行する」と考えられていたが、シナプスオーガナイザー自体が標的認識を担う可能性が強く示唆された。さらに PTP8-IL1RAPL1 複合体の構造解析から 2A 型 PTP の Ig ドメインがリガンド結合とシナプス誘導双方の責任ドメインであることが明らかとなり、標的認識とシナプス誘導は切り離せないことが構造科学的にもサポートされた。構造科学的手法を取り入れたことが本研究の進展に大きく寄与したと言える。

一方、PTP8 スプライスバリエント発現回路の同定、脳内シナプス形成における PTP8 スプライスバリエントの意義については本研究期間にまとまった成果を得ることが出来なかった。特異的抗体の作出や単一神経細胞での発現解析など従来法でのスプライスバリエント発現の検出が

難しく、今後は遺伝子改変マウス等の作出によりスプライスバリエント発現を可視化するなどの新しい方法論の確立が必要である。

本研究遂行にあたり開発した人工的シナプス誘導系を用いたシナプス機能分子の解析法は、これまでに機能解析の困難であった脳内の多様なシナプス結合を単純系に落とし込み、均質なシナプスにおいて、機能分子の時空間的な挙動や機能を網羅的に解析することを可能にした。更に、従来の生化学的な分画法では不可能であったシナプス前部と後部の構成因子を別個に単離することを可能にした。同様の方法論はシナプス機能に限らず、様々な機能分子の探索において有効と考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経結合の特異性の分子的基盤は Sperry の chemoaffinity 説以来半世紀以上にわたる神経科学の重要問題であるが、この間にガイダンス分子や接着分子が多数同定されたにも拘わらずシナプスにおける分子メカニズムは解明からほど遠い。本研究は、先にゼブラフィッシュ胚でシナプス形成促進因子のスクリーニングにより IL1RAPL1 や PTP $\delta$  などを見出していたことに基づき、これらのシナプスオーガナイザー分子の構造、特にスプライスバリエントの結合特異性における意義に着目して、巧みな実験系を工夫して IL1RAPL1—PTP $\delta$  系の機能に深く詳細な解析を加え、さらにこの結合系と NRXN—NLGN 結合系の間の抑制関係の発見とその解析を行ったものである。これらの成果により、シナプス結合特異性の分子メカニズムの様相の主たる特徴が明らかになり、この問題への方法論のモデルとなるばかりでなく、今後の組織学的あるいは行動学的生理学的展開や、神経回路の維持調整メカニズムや神経疾患の研究に新たな見通しを提示した意義も大きい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshida T, Shiroshima T, Lee S, Yasumura M, Uemura T, Chen X, Iwakura Y, Mishina M. Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *J. Neurosci.* 32, 2588–2600, (2012).
2. Lee S, Uemura T, Yoshida T, Mishina M. GluR $\delta$  2 assembles four neuroligins into trans-synaptic triad to trigger synapse formation. *J. Neurosci.* 32, 4688–4701, (2012).
3. Yasumura M, Yoshida T, Lee S, Uemura T, Joo J, Mishina M. Glutamate receptor  $\delta$  1 induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neuroligins through cerebellin precursor protein subtypes. *J. Neurochem.* 121, 705–716, (2012).
4. Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. *PLoS One.* 8, e66254, (2013).
5. Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T, Mishina M. IL1RAPL1 knockout mice show spine

density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. *Scientific Reports* 4, 6613, (2014).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(シンポジウム・ワークショップ・口頭発表)

1. 吉田知之、城島知子、李聖眞、安村美里、植村健、陳西貴、岩倉洋一郎、三品昌美  
第35回日本神経科学大会 名古屋 2012年9月20日

Interleukin-1 receptor accessory protein functions as a neuronal cell adhesion molecule to organize synaptogenesis

2. 吉田知之

代償脳研究会セミナー 富山 2014年1月30日

シナプスオーガナイザーによる中枢シナプス形成の調節

3. 吉田知之

東京工業大学・バイオサイエンスシンポジウム 横浜 2014年2月18日

シナプスオーガナイザーによる中枢シナプス形成の調節

4. 吉田知之、森寿、三品昌美

日本生化学会北陸支部 第32回大会 富山 2014年5月24日

IL-1受容体共通サブユニットIL-1RAcPIは中枢シナプス形成を担うシナプスオーガナイザーとして機能する

5. 吉田知之

生理学研究所研究会「グリア細胞機能から迫る脳機能解明」岡崎 2014年10月23日

インターロイキン-1受容体ファミリー分子群による中枢シナプス形成の調節

6. 吉田知之、城島知子、山崎真弥、阿部学、山形敦史、深井周也、森寿、崎村建司、岩倉洋一郎、三品昌美

第37回日本分子生物学会年会「免疫受容体による細胞間コミュニケーションの新しい地平線」  
横浜 2014年11月26日

インターロイキン-1受容体ファミリータンパク質による中枢シナプス形成の調節機構

総説・著作物

1. Mishina M, Uemura T, Yasumura M, **Yoshida T**. Molecular mechanism of parallel fiber-Purkinje cell synapse formation. *Front Neural Circuits*. 6, 90, (2012), 総説

2. Mishina M, Yoshida T, Yasumura M, Uemura T. Synapse Formation in the Brain.  
**Cortical Development.** Kageyama R, Yamamori T, editors: Springer; 229–247, (2013), 著書
3. 深井周也, 植村健, 吉田知之. シナプス形成を誘導する膜受容体の機能と構造.  
**実験医学**32 (10) 92–97, (2014), 著書