

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「シナプス形成を誘導する膜受容体複合
体と下流シグナルの構造生命科学」

研究終了報告書

研究期間 平成30年4月～平成31年3月（追加支援）

研究代表者：深井 周也
（東京大学定量生命科学研究所、准教授）

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

脳を構成する無数の神経細胞はシナプスと呼ばれる細胞接着構造を介して接続され、回路を形成することで学習や記憶などの高次の脳機能を可能にする。シナプス形成の異常は知的障害や自閉症などの神経発達障害と深く関係する。本研究では、シナプス形成を誘導するタンパク質(シナプスオーガナイザー)の解析によりシナプス形成の詳細な分子メカニズムを解明し、その情報に基づいてシナプス形成を制御する方法を開発することを目指した。

通常の研究期間(H24.10.~H.30.3.)には、研究代表者の研究グループ(深井グループ)と主たる共同研究者の研究グループ(植村グループ)の二つの研究グループが共同で研究を進めた。深井グループでは、シナプス前終末で機能する主要なシナプスオーガナイザーの一つである IIa 型受容体脱リン酸化酵素(IIa RPTP)とシナプス後終末で機能する 5 種類の異なるシナプスオーガナイザーとの複合体の立体構造を決定した。また、構造情報に基づいて設計した変異体の分子間相互作用解析を行うことで特異的相互作用メカニズムを明らかにし、植村グループが同じ変異体を用いて細胞レベルでの結合能およびシナプス形成誘導能の解析を行った。原子レベルから細胞レベルまでの解析により、選択的スプライシングにより挿入される短いペプチド配列がシナプス特異性の決定に重要であることを明らかにした。シナプス前終末で機能するもう一つの主要なシナプスオーガナイザーである Neurexin(Nrxn)が形成する GluR82-Cbln1-β-Nrxn 複合体については、個々のタンパク質の立体構造を決定した後、化学架橋産物の質量分析と網羅的に導入した部位特異的変異体のシナプス形成誘導能の解析により、その結合様式を予測した。しかし、得られた成果の発表を検討していた時期に、オックスフォード大学と慶應大学の共同研究グループから GluR82-Cbln1 融合体の結晶構造解析と Cbln1-Nrxn18 複合体の電顕解析の結果が *Science* 誌に報告された。GluR82-Cbln1 複合体を模した融合体の構造は、我々の予測した相互作用モデルとは異なっていたが、部位特異的変異体を用いた結合実験やシナプス形成誘導アッセイで裏付けられており、我々のシナプス形成誘導能の解析の結果とも合致するものであった。この *Science* 誌の報告を受けて、β-Nrxn が形成する別のシナプスオーガナイザー複合体である LRRTM2-Nrxn18 複合体の研究を開始して立体構造を決定した。変異体の機能解析と合わせてスプライスインサートによって相互作用が制御されるメカニズムを明らかにした。その他、植村グループでは、新規のシナプスオーガナイザーや下流シグナル分子を探索して新たな候補分子を同定すると共に、Nrxn18 のシナプス前終末における共受容体の候補分子を同定した。さらに、シナプスオーガナイザーの遺伝子改変による神経発達障害モデルマウスの作出を検討した。研究全体を通じて、シナプス後終末の新規シナプスオーガナイザーやシナプス前終末の下流エフェクターの探索・同定、シナプスオーガナイザー複合体の立体構造解析と構造に基づいた *in vitro* および細胞レベルでの変異体解析による選択的相互作用メカニズムの解明、さらに遺伝子改変技術を利用した神経発達障害モデルマウスの作出と行動解析を行うことで、シナプス形成を誘導する仕組みの理解を深めた。

一年間の追加支援(H30.4.~H.31.3.)では、磁気ビーズを用いたこれまでのシナプス形成誘導アッセイに改良を加えた新たなアッセイ法の開発を行うことを目指した。半導体の微細加工技術を応用して μm オーダーで分子を配置し、神経細胞の軸索伸長を制御するデバイス開発に成功している東京大学大学院工学系研究科の渡邊力也講師の協力の下で、シナプスオーガナイザーをガラス上に一定のパターンで配置してシナプス形成を誘導するデバイスの開発を行うことを計画した。このアッセイ系では、Nrxn 系のシグナルと IIa RPTP 系のシグナルとを特定の異なる場所で誘導できることから、個々の神経細胞あるいは個々のシナプスが

Nrxn 系のシグナルと IIa 型 RPTP 系のシグナルのどちらを利用しているかを一つのカルチャー上で観察することができる。また、この技術を応用すれば、シナプス形成誘導に必要なシナプスオーガナイザー分子の密度や分子数を見積もったり、誘導に使われるシナプスオーガナイザーの種類で神経細胞を分類したりすることも可能になると期待される。本年度は、(1) マイクロデバイスのプロトタイプの作製と (2) マイクロデバイスを利用したシナプス形成誘導アッセイの条件検討に必要なプロトコルの確立を目標として研究を進めた。また、通常期間に行った研究の成果を論文として発表した。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. シナプスオーガナイザー複合体 LRRTM2-Nrxn18 の構造・機能解析

概要: シナプス形成は、軸索末端と樹状突起にそれぞれ局在する膜受容体様接着因子(シナプスオーガナイザー)がシナプス間隙を跨って相互作用することで誘導される。この相互作用は、スプライスインサートの選択により制御される。興奮性シナプスを誘導するシナプスオーガナイザー複合体 LRRTM2-Nrxn18 の立体構造を決定し、変異体の相互作用解析やシナプス誘導能解析と合わせて、スプライスインサートを欠失した Nrxn18 特異的に相互作用するメカニズムを解明した。

2. てんかん関連リガンド-受容体複合体 LGI1-ADAM22 の構造・機能解析

概要: てんかんは人口の 1% 程度に発症する頻度の高い神経疾患である。神経細胞が分泌するタンパク質 LGI1 の遺伝子異常は、遺伝性てんかんの一つである常染色体優性外側側頭葉てんかんの原因となることが知られている。LGI1 とその受容体である ADAM22 が結合した状態の複合体の立体構造を決定することで、これまでに知られていた LGI1 の変異の中で発症の仕組みが不明であった変異に関して、新たな発症の仕組みを解明した。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. パーキンソン病関連酵素 PINK1 の構造・機能解析

概要: パーキンソン病は進行性の神経変性疾患であり、原因の一つは不良ミトコンドリアの蓄積である。不良ミトコンドリアを分解へ導くユビキチン化反応を触媒するユビキチンリガーゼ Parkin の活性化には、Parkin の UBL ドメインとユビキチンのリン酸化が必要であり、PINK1 は、ミトコンドリアの膜電位低下に反応して、これらのリン酸化反応を触媒する。本研究で解明した PINK1 の高分解能構造情報は活性化剤設計の足がかりとなって治療薬開発に繋がることが期待される。

< 代表的な論文 >

1. Yamagata, A., Goto-Ito, S., Sato, Y., Shiroshima, T., Maeda, A., Watanabe, M., Saitoh T., Maenaka, K., Terada, T., Yoshida, T., *Uemura, T., *Fukai, S. “Structural insights into modulation and selectivity of transsynaptic neurexin-LRRTM interaction”, *Nat. Commun.*, *in press*.
2. Yamagata, A., Miyazaki, Y., Yokoi, N., Shigematsu, H., Sato, Y., Goto-Ito, S., Maeda, A., Goto, T., Sanbo, M., Hirabayashi, M., Shirouzu, M., Fukata, Y., *Fukata, M., *Fukai, S. “Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22”, *Nat. Commun.*, **9**, 1546, 2018
3. Okatsu, K., Sato, Y., Yamano, K., Matsuda, N., Negishi, L., Takahashi, A., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Mishima, M., Ito, Y., Oka, T., Tanaka, K., *Fukai, S. “Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1”, *Sci. Rep.*, **8**, 10382, 2018

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「深井」グループ

研究代表者:深井 周也(東京大学定量生命科学研究所 准教授)

研究項目

・構造情報を利用したシグナル制御の研究に有効な新たなシナプス形成誘導アッセイ法の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・島津製作所ライフサイエンス研究所 嶋田崇史フェロー (質量分析)
- ・自然科学研究機構生理学研究所 深田正紀教授、深田優子准教授 (質量分析)
- ・北海道大学大学院薬学系研究科 前仲勝実教授 (分子間相互作用解析、発現系構築)
- ・理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 白水美香子プロジェクトディレクター、重松秀樹上級研究員 (電子顕微鏡解析)
- ・富山大学 研究推進機構 研究推進総合支援センター 高雄啓三教授 (マウス行動解析)
- ・新潟大学脳科学研究所 崎村建司教授、阿部学准教授 (遺伝子改変マウス作製)
- ・富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 森寿教授 (遺伝子改変マウス作製)
- ・東京大学大学院工学系研究科 渡邊力也講師 (マイクロデバイスの作製)