

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03162

研究課題名(和文) シナプス形成を制御する新規メカニズムの構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of the novel mechanism to regulate the synapse formation

研究代表者

山形 敦史 (Yamagata, Atsushi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20463903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス形成を司る細胞接着因子であるIIaRPTPの細胞内ドメインとシナプス足場タンパク質であるLiprin- との複合体の立体構造を結晶構造解析法により決定した。その結果、両者の特異的相互作用の機構を明らかにし、さらに構造に基づいた変異体解析により両者の結合がシナプス形成に必須であることを明らかにした。また、シナプス形成の新規メカニズムとして、IIaRPTPとニューロリギン3(NL3)との相互作用を新たに見出し、さらにその複合体の立体構造解析を行なった。ノックインマウスを用いた行動解析により、IIaRPTPとNL3の相互作用は社会性の発達に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳は1000億以上もの神経細胞が集まっており、それぞれの神経細胞間はシナプスによって接合されている。シナプス形成の異常は、統合失調症や自閉症、難治性てんかんといった神経発達障害の原因となることが知られている。本研究はこれまで解析されていないタンパク質分子複合体であるIIaRPTP-Liprin- 複合体とIIaRPTP-NL3複合体について立体構造を明らかにし、さらに複合体形成の破綻がもたらすシナプス形成不全や高次脳機能(社会性など)の異常との関わりを明らかにした。一連の研究はシナプス形成異常がもたらす神経発達障害のメカニズムの解明につながるものであり、将来の創薬の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined the crystal structure of IIaRPTP, a neuronal cell adhesion protein that governs the synapse formation, and the synaptic scaffold protein, Liprin-. The structure reveals the specific interaction between them. The structure-based mutational analyses demonstrated that their specific interaction is essential for synapse formation. In addition, we identified the interaction between PTPRD and NLGN3, as a novel trans-synaptic complex to regulate the synapse formation. We solved the crystal structure of the complex between IIaRPTP and Neuroligin 3(NL3). Moreover, the behavioral testing using the knock-in mice revealed that the specific interaction between IIaRPTP and NL3 plays an important role for the development of sociality.

研究分野：構造生物学

キーワード：シナプス 結晶構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞はシナプスと呼ばれる特殊な接合部によって接合し神経回路を形成する。シナプスの形成にはシナプスオーガナイザーと呼ばれる神経細胞特異的な細胞接着因子が司る。代表的なシナプスオーガナイザーである IIa 型受容体プロテインフォスファターゼ (RPTP) は多様なシナプスオーガナイザーとシナプス間隙を跨ぐ複合体を形成し、その複合体形成をシグナルとしてシナプス分化を誘導する。IIa RPTP は細胞外での複合体形成をトリガーとして細胞内でシナプスの足場タンパク質を集積させ、シナプス分化を誘導する。研究開始当初、IIa RPTP の細胞内ドメインと足場タンパク質との相互作用について詳細に解析した例は報告されていなかった。また、研究開発当初に共同研究者の富山大学准教授の吉田らによって IIa RPTP と相互作用する新たなシナプスオーガナイザーとしてニューロリギン 3 (NL3) が同定された。しかし、その相互作用の詳細や、シナプス形成および高次の脳機能における役割等については全く分かっていなかった。

もう一つの代表的なシナプスオーガナイザーとして、ニューレキシン (Nrxn) が挙げられる。研究開始当初、Nrxn への新たな相互作用因子として SorCS が同定され、Nrxn の細胞外への輸送を正に制御していることが明らかとなった。Nrxn はニューロリギンや LRRTM といったシナプスオーガナイザーとも相互作用するが、SorCS との相互作用が最も強い。しかし、構造も含めた詳細な解析例はなく、そのような強い相互作用の機構や他の因子との相互作用との関連については全く調べられていない。

### 2. 研究の目的

本申請では IIa RPTP の一つ PTP $\delta$  と Nrxn に注目し、(1) PTP $\delta$  とシナプス足場タンパク質 Liprin- $\alpha$  との細胞内複合体の構造基盤、(2) PTP $\delta$  と NL3 との細胞外複合体の構造基盤と高次脳機能との関連、(3) SorCS と Nrxn の細胞外複合体の構造基盤を明らかにし、シナプス形成を制御する新規メカニズムを構造に基づいて解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

目的タンパク質の様々な長さのコンストラクトを作製し、大腸菌発現系やヒト培養細胞発現系を用いて発現させる。アフィニティークロマトグラフィーとサイズ排除クロマトグラフィーを用いてそれぞれを精製する。得られた精製産物を用いて目的の複合体を形成させる。得られた複合体の結晶化を行い、得られた結晶の回折データを大型シンクロトロン放射光施設 (SPring-8) にて測定する。類似タンパク質の立体構造を用いた分子置換法により位相を決定し、構造モデルを精密化する。立体構造より複合体の相互作用に重要なアミノ酸残基を同定し、それらの変異体タンパク質を作製する。表面プラズモン共鳴法 (SPR) や等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いた定量的相互作用解析によって結合を失わせる変異を同定する。同定された変異が導入されたタンパク質遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集によってマウスゲノムに導入しノックインマウスを作製する。作製したノックインマウスの胎児マウス脳より初代培養神経細胞を調整する。シナプスオーガナイザーの細胞外ドメインをコートしたビーズと共培養法し、ビーズとの接触面に形成されるシナプス関連タンパク質の集積を調べることによりシナプス誘導能を解析する。これにより、相互作用の破綻とシナプス誘導との関連を調べる。さらに(2)においては、ノックインマウスの行動解析を行うことにより高次脳機能との関連を解析する。また、(3)ではクライオ透過電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって構造を決定する。

### 4. 研究成果

(1) PTP $\delta$  の細胞内ドメインは2つのホスファターゼドメインがタンデムにつながった構造である (図 1A)。このうち N 末端側のドメイン (D1) は脱リン酸化活性を有しているのに対し、C 末端側のドメイン (D2) はその活性を失っており、Liprin- $\alpha$  との結合に使われる。Liprin- $\alpha$  は哺乳類では  $\alpha 1 \sim \alpha 4$  の4種が存在する。いずれのリプリン  $\alpha$  も C 末端側に3つの sterile alpha motif (SAM) ドメインがつながった SAM 領域を持ち、SAM 領域で PTP $\delta$  と相互作用する (図 1A)。PTP $\delta$  の D1-D2 ドメイン、D2 ドメインと Liprin- $\alpha 1 \sim \alpha 4$  の全

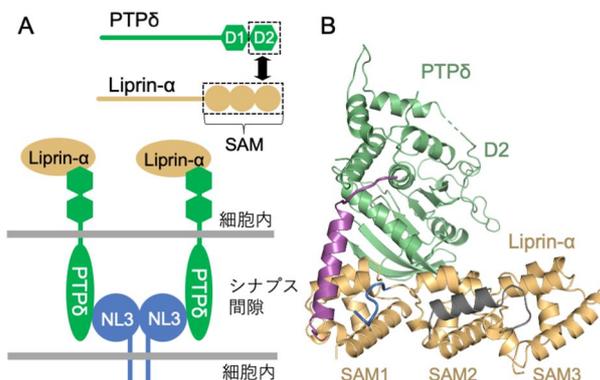


図 1. PTP $\delta$  と Liprin- $\alpha$  の細胞内複合体の概念図 (A) と結晶構造 (B)

ての SAM 領域を大腸菌にて発現・精製を行い、それぞれに対して結晶化を試みた。その結果、PTPδ D2 と Liprin-α との複合体の結晶化に成功した。SPring-8 での回折データ測定の結果、1.9Å 分解能の回折データを得ることができ、分子置換法によって構造を決定した。PTPδ D2 は Liprin-α の SAM1, SAM2 と相互作用面を形成していた(図 1B)。次に構造を基にした変異体作製と SPR による相互作用解析より相互作用に必須な残基を同定した。さらに、その変異を導入した PTPδ 遺伝子のノックインマウスを作製し、その初代培養神経細胞を用いたシナプス誘導能解析を行なった。その結果、Liprin-α との相互作用を失うとシナプス誘導能も失われたことから、PTPδ と Liprin-α との相互作用がシナプス分化に必須であることが示された。さらに、Liprin-α が PTPδ の D2 と結合するが D1 とは結合しないこと、PTPδ が Liprin-α の類似タンパク質である Liprin-β とは結合しないことなど相互作用の特異性を構造に基づいて説明した。さらに、Liprin-α は CASK と呼ばれるシナプスタンパク質とも結合する。Liprin-α の CASK との相互作用面は PTPδ との相互作用面の裏側にあり、PTPδ-Liprin-α-CASK の三者複合体の形成が示唆された。実際にプルダウンアッセイにより三者複合体の形成を確認した。

(2) PTPδ と NL3 のそれぞれの細胞外ドメインについてヒト培養細胞を用いて培地中に発現させた。培地より精製した両タンパク質の細胞外ドメインを用いて複合体を形成させ、結晶化を行なった。得られた結晶の回折データを測定し、分子置換法によって構造を決定した。NL3 は二量体を形成しており、NL3 一分子に対し PTPδ 一分子がそれぞれ結合した 2:2 複合体を形成していた(図 2)。NL3 には自閉症に関連する遺伝子変異(R451C)が知られている。この変異箇所は立体構造では C 末端側の二量体界面近くに存在していた。そこで R451C 変異体を調整したところ、予想通り二量体構造が不安定化していることが明らかとなった。

PTPδ は選択的スプライシングによって生じた二つの短いペプチド挿入(mini exon A, mini exon B)によって異なる相手との特異的な相互作用を制御している。NL3 は 3 残基の mini exon A を持ち、mini exon B を欠いたバリエーションに特に強く相互作用する。構造解析より NL3 は mini exon A と直接相互作用する一方、mini exon B がないことによるドメイン運動の柔軟性の低下も相互作用に重要であることが分かった。NL3 は Nrnx と結合する。NL3 には PTPδ にもみ結合する領域、Nrnx にもみ結合する領域、両者の結合に用いられる領域の三つが存在していた。ITC を用いた定量的相互作用解析を利用して、PTPδ との結合を特異的に欠失させた変異体、Nrnx との結合を特異的に欠失させた変異体をそれぞれ作製した。さらに、これらの変異を導入したノックインマウスを作製し行動解析を行なうことにより、それぞれの相互作用が高次の脳機能における役割を明らかにすることができる。その結果、PTPδ と NL3 との相互作用が社会性の形成に特に重要であることが明らかとなった。

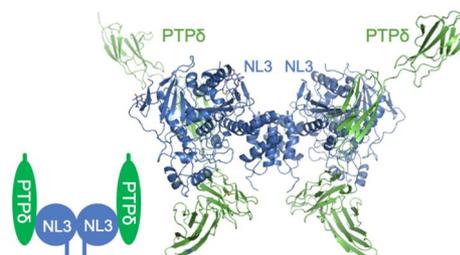


図 2. PTPδ と NL3 の細胞外複合体の概念図と結晶構造

(3) SorCS と Nrnx(本研究では Nrnx1β を使用)のそれぞれの細胞外ドメインについてヒト培養細胞発現系を用いて発現・精製を行なった。精製した各々の細胞外ドメインを混合して複合体を形成させた。さらに、架橋剤 BS<sup>3</sup> を用いて架橋した後、サイズ排除クロマトグラフィーによって架橋された複合体を精製した(図 3A)。精製された複合体をグリッドにアプライし、液体エタン中に急速凍結した。加速電圧 200kV のクライオ透過電子顕微鏡(ThermoFisher Tecnai Arctica)を用いて測定し、単粒子解析法にて構造を解析した。しかし、通常のクライオ電顕用グリッドでは十分な粒子のコントラストを得ることが出来なかった。そこで、化学気相成長法を用いたグラフェングリッドを作製し、データ測定を行なった。その結果、現在約 6Å 程度の分解能で構造解析に成功し、SorCS 二量体の密度にさらに Nrnx と思われる密度が観察されたクライオ電顕マップが得られている(図 3B)。今後、グリッドの作製条件や画像解析法を改良し、さらなる高分解能での構造解析を目指す。

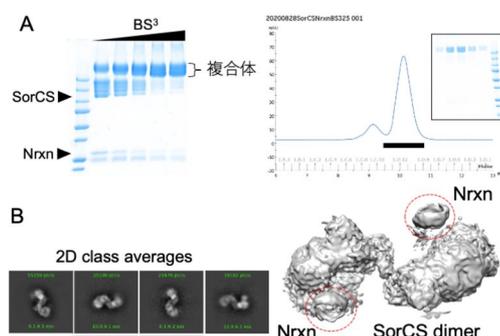


図 3. SorCS と Nrnx の細胞外複合体の架橋とクライオ電顕による構造解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sato Yusuke, Tsuchiya Hikaru, Yamagata Atsushi, Okatsu Kei, Tanaka Keiji, Saeki Yasushi, Fukai Shuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13697-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wakita Maiko, Yamagata Atsushi, Shiroshima Tomoko, Izumi Hironori, Maeda Asami, Sendo Mizuki, Imai Ayako, Kubota Keiko, Goto-Ito Sakurako, Sato Yusuke, Mori Hisashi, Yoshida Tomoyuki, Fukai Shuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insights into selective interaction between type IIa receptor protein tyrosine phosphatases and Liprin-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14516-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shirakawa Ryutaro, Goto Ito Sakurako, Goto Kota, Wakayama Shonosuke, Kubo Haremaru, Sakata Natsumi, Trinh Duc Anh, Yamagata Atsushi, Sato Yusuke, Masumoto Hiroshi, Cheng Jinglei, Fujimoto Toyoshi, Fukai Shuya, Horiuchi Hisanori	4. 巻 e104120
2. 論文標題 A SNARE geranylgeranyltransferase essential for the organization of the Golgi apparatus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019104120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida T., Yamagata A., Imai A., Kim J., Izumi H., Nakashima S., Shiroshima T., Maeda A., Iwasawa-Okamoto S., Azechi K., Osaka F., Saitoh T., Maenaka K., Shimada T., Fukata Y., Fukata M., Matsumoto J., Nishijo H., Takao K., Tanaka S., Okabe S., Tabuchi K., Uemura T., Mishina M., Mori H., Fukai S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22059-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Laura Bracun, Atsushi Yamagata, Bern M. Christianson, Tohru Terada, Daniel P. Canniffe, Mikako Shirouzu, Lu-Ning Liu	4. 巻 12
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the photosynthetic RC-LH1-PufX supercomplex at 2.8 resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf8864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoi Norihiko, Fukata Yuko, Okatsu Kei, Yamagata Atsushi, Liu Yan, Sanbo Makoto, Miyazaki Yuri, Goto Teppei, Abe Manabu, Kassai Hidetoshi, Sakimura Kenji, Meijer Dies, Hirabayashi Masumi, Fukai Shuya, Fukata Masaki	4. 巻 37
2. 論文標題 14-3-3 proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110107 ~ 110107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 山形敦史
2. 発表標題 Structural insights into the synapse formation by tyro11 protein tyrosine phosphatase
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山形敦史
2. 発表標題 Selective interaction between RPTP pseudo phosphatase domain and the neuronal scaffold protein, Liprin-alpha
3. 学会等名 International Conference on Protein Phosphatases (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山形敦史
2. 発表標題 Structural insights into the selective interaction between type IIa protein tyrosine phosphatase and the neuronal scaffolding protein, Liprin-alpha.
3. 学会等名 BDR Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山形敦史
2. 発表標題 IIa型受容体ホスファターゼとシナプスオーガナイザーとのシナプスを跨ぐ複合体の構造基盤
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山形敦史
2. 発表標題 IIa 型受容体型チロシンホスファターゼによるシナプス形成の構造基盤
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 横井紀彦、深田優子、尾勝圭、山形敦史、劉岩、三宝誠、宮崎裕理、後藤哲平、平林真澄、深井周也、深田正紀
2. 発表標題 抗てんかんLG11-ADAM22複合体を安定化する14-3-3-ADAM22相互作用
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前田 亜沙美  (Maeda Asami)		
研究協力者	城島 知子  (Shiroshima Tomoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------