

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03350

研究課題名（和文）神経細胞内でシナプス形成を時空間的・標的依存的に制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for spatiotemporal and target specific regulation of neuronal synapse formation

研究代表者

吉田 知之（Yoshida, Tomoyuki）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：90372367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：シナプスオーガナイザーPTP にはマイクロエクソンの選択的スプライシングによる様々なスプライスバリエーションが存在し、バリエーションごとに異なるシナプス後部リガンドと結合することで標的的特異的なシナプス形成を担うことを見出した。マイクロエクソン由来ペプチドはリガンドとの相互作用面に挿入され、結合の特異性の維持に寄与していた。また、異なるシナプスオーガナイザーは互いに競合関係にあることを見出した。実際に特定の組合せのシナプスオーガナイザー複合体の相互作用面に点変異を導入して、競合バランスを変えたマウス系統はEIバランス変調や社会性発達の異常など、神経発達障害に関連した中間表現型や行動表現型を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロエクソンは3-27ヌクレオチドの極めて短いエクソンであり、脊椎動物の神経細胞で選択的に利用されることから、その機能に注目が集まっていた。シナプスオーガナイザー遺伝子の持つマイクロエクソン由来ペプチドが中枢シナプス形成時の標的選別に重要な役割を担うことを見出し、マイクロエクソンの新しい機能を提案した点が本研究の学術的意義である。またシナプスオーガナイザー間の競合バランスの変調が神経発達障害の発病の要因となることを示した。神経発達障害の新たな治療・創薬標的として、マイクロエクソン選択機構やシナプスオーガナイザー間の競合機構の重要性を提示した点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：Protein tyrosine phosphatase (PTP) is a presynaptic organizer and exists in various splice variants generated by alternative microexons' splicing. Each PTP variant is responsible for target-specific synapse formation by binding to different type of postsynaptic ligands. We found that microexon-derived peptides are inserted into the interaction interface with ligand proteins to ensure selective binding and synaptic target specificity. In fact, knock-in mutant mouse strains carrying point mutations in the specific interaction interface to disrupt the selective interaction and balancing mechanism among different types of synapse organizers exhibited excitatory and inhibitory synaptic imbalance and behavioral abnormalities associated with neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorder and intellectual disability.

研究分野：分子神経科学

キーワード：シナプス シナプスオーガナイザー マイクロエクソン 神経発達障害

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能を支える機能的な神経ネットワークを構築するためには脳内の 1,000 億もの神経細胞が“適切なタイミング”で“適切な場所”に“適切な相手”とシナプスを作る必要がある。シナプスは神経伝達物質の放出に特化した前終末と受容に特化した後終末から構成される非対称な細胞接着構造体であり、シナプスオーガナイザーと呼ばれる僅か 10 種類程度の接着分子ファミリーによって分化誘導される。これまでに Neurexin (Nrxn1-3)と 2A 型チロシン脱リン酸化酵素(2A-RPTP: PTP δ , LAR, PTP σ)の 2 つのファミリーがシナプス前部オーガナイザーとして知られ、一方、それらの結合パートナーである Neuroligin (Nlgn) 1-4、LRRTMs、グルタミン酸受容体(GluR) δ 1-2、IL1RAPL1, Slitrk1-6, SALM1-5、TrkC などがシナプス後部オーガナイザーとして機能することが知られていた。従って、個々の神経細胞はこれらの限られたシナプスオーガナイザータンパク質を時空間的にうまく使い分けることによって、秩序だったシナプスの形成を調節すると考えられてきたが、その調節機構の実体はほとんど明らかにされていなかった。特に“適切な相手”と標的依存的なシナプスを作るためのシナプス前部と後部のオーガナイザー間の結合多様性および結合特異性の創出機構や、シナプス前部側あるいは後部側に共発現する異なるオーガナイザー (Nrxn1-3 と 2A 型チロシン脱リン酸化酵素、NLGN1-4 と LRRTM2 など) 間の相互関係の理解は重要課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経細胞内の“適切な場所”に“適切なタイミング”で“適切な相手”とシナプスが形成されるメカニズムを解明することである。特に、神経細胞における時空間的なシナプスオーガナイザー遺伝子のスプライシング制御とシナプスオーガナイザー間の相互作用に注目した。私達の同定したシナプス前部オーガナイザー-PTP δ (遺伝子は *Ptprd*) はマイクロエクソンの取捨選択によるスプライス多様性を持ち、各スプライスバリエントは互いに異なるシナプス誘導特性を持っていた。また、PTP δ と Nrxn が相互に抑制関係にあることや、PTP δ と Nrxn の結合パートナーとなるシナプス後部オーガナイザーも互いに排他的な競合関係にあることを見出していた。そこで、個々の神経細胞における時空間的な *Ptprd* 遺伝子マイクロエクソンの取捨選択制御、マイクロエクソンにコードされるペプチドの構造特性、オーガナイザー間の競合関係が時空間的に秩序だったシナプスの形成を調節する分子機構であるとの仮説のもと、これらのスプライス多様性の制御とオーガナイザー間の競合関係の分子機構を明らかにし、これらの調節機構が機能的神経ネットワーク構築において果たす役割を明確にすることを本研究の目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、代表的シナプス前部オーガナイザーである PTP δ をモデルとして、① 時空間的な *Ptprd* スプライスバリエントの発現パターン (マイクロエクソン選択パターン)、② マイクロエクソン由来ペプチドの構造機能基盤、③ シナプスオーガナイザー間の競合制御の機能的神経ネットワーク構築における生理的役割、を明らかにした。①~③の方法は以下の通りである。

- ① 時空間的な *Ptprd* スプライスバリエントの発現パターンの解析：マウス脳内各部の cDNA ライブラリーより PCR 増幅した *Ptprd* 遺伝子断片を大腸菌にクローニングした後に、各大腸菌クローンの持つ *Ptprd* 遺伝子断片をフィンガープリント法によって解析した。
- ② マイクロエクソン由来ペプチドの機能構造解析：マイクロエクソンのスプライシング制御によって作り出される PTP δ バリエントとシナプス後部オーガナイザーの間で特異的に形成される複合体の X 線結晶構造解析を行った。また、神経細胞と各バリエント組換えタンパク質ビーズを用いたシナプス誘導実験系を構築して、シナプス誘導特性を調べた。
- ③ シナプスオーガナイザー間の競合関係の生理的役割：シナプスオーガナイザー間の競合関係を壊す点変異体をシナプスオーガナイザーの結晶構造をもとにデザインし、それらの変異を導入したモデルマウス系統をゲノム編集技術を用いて作出した。それらのマウス系統に対してシナプスの組織学的解析、電気生理学的解析、および網羅的な行動バッテリー試験を行なった。

4. 研究成果

① 時空間的な *Ptprd* スプライスバリエントの発現パターンの解析：*Ptprd* 遺伝子の 3 つのマイクロエクソン (microexon: meA3, meA6, および meB) の取捨選択によって作られる 8 種類のスプライスバリエント発現解析から、8 種類のスプライスバリエントはマウス脳内各部および発達時期ごとに固有の比率で発現することがわかった。また、神経活動や炎症などの刺激に応じてそのパ

ターンが変化することを見出した（未発表）。

② マイクロエクソン由来ペプチドの機能構造解析：8種類のスプライスバリエントをコートした磁気ビーズとマウス大脳皮質神経細胞を共培養し、ビーズ周囲に誘導される興奮性シナプスおよび抑制性シナプスの量を評価したところ、meBを含むスプライスバリエントは興奮性シナプスのみを誘導し、meBを含まないスプライスバリエントは興奮性・抑制性両方のシナプスを誘導することを見出した。一方、meA3、およびmeA6を含むスプライスバリエントは含まないものに比べてより多数のシナプスを誘導した。従って、Ptp δ のマイクロエクソンは誘導するシナプスの特性（興奮性あるいは抑制性）とシナプス誘導量の両方を調節することが明らかとなった（図1, Yoshida et al, Nat. Commun. 2021）。さらに、meBを含まない PTP δ スプライスバリエントに選択的なシナプス後部オーガナイザーと

結合して Neurologin3 (NLGN3) を同定した。また、PTP δ -NLGN3 複合体の結晶構造解析から、meA および meB ペプチドが結合面或いはその近傍に挿入され、特異的な複合体形成に寄与する機構を解明した。

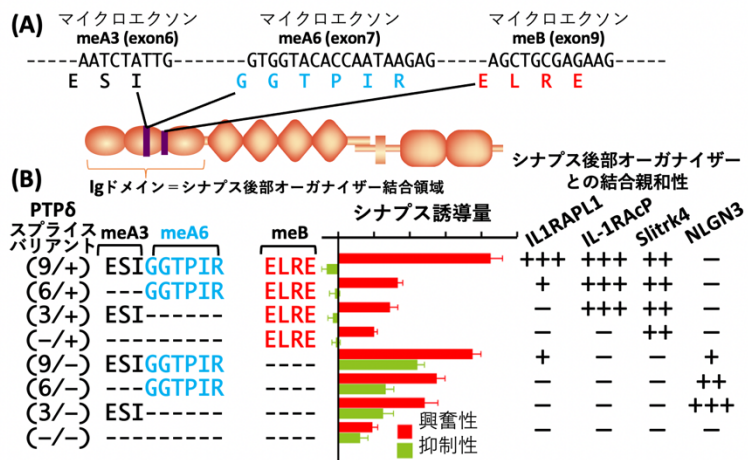


図1. (A) Ptp δ 遺伝子の3つのマイクロエクソンmeA3, A6, Bの塩基配列、およびそれらにコードされるペプチド配列。マイクロエクソン由来ペプチドはPTP δ のシナプス後部オーガナイザー結合領域に挿入され、8種類のスプライスバリエントを作り出す。(B) 8種類のPTP δ スプライスバリエントのシナプス誘導特性（左）とシナプス後部オーガナイザーとの結合特性（右）。シナプス誘導量（数）はmeAペプチドの長さに比例した。meB選択型スプライスバリエントは興奮性シナプスのみを誘導するのに対してmeB非選択型スプライスバリエントは興奮性・抑制性シナプスの両方を誘導した。

③ シナプスオーガナイザー間の競合関係の生理的役割：NLGN3 遺伝子上の様々な変異が自閉スペクトラム症 (ASD) 患者より見出されていることから、NLGN3 が社会性発達の調節に極めて重要な役割を担うと考えられてきた。従来、NLGN3 はシナプス前部の NRXNs と結合してシナプスを誘導し (NLGN3 古典経路)、この相互作用の破綻が ASD を引き起こすと考えられていた。本研究において PTP δ と NLGN3 の間でシナプスを形成する新規の経路 (非古典経路) を見出したことから、古典経路と非古典経路の関係について解析を進めた。興味深いことに NLGN3 は同一の結合面を使って、同等の親和性で NRXN および PTP δ と結合するため、古典経路と非古典経路は競合関係にあることが示唆された。NLGN3-PTP δ 複合体の結晶構造解析から得られた結合面の構造情報を基にして、NRXN1-3、PTP δ それぞれとの結合を選択的に遮断した NLGN3 変異体をデザインすることに成功した。非古典 (PTP δ) 経路を遮断した NLGN3 点変異マウスでは社会性が低下したのに対して、古典 (NRXN) 経路を遮断した NLGN3 点変異マウスではむしろ社会性が亢進した。このことから、古典経路と非古典経路のバランスによって社会性が両方向性に調節されており、このバランスの破綻が社会性の障害を引き起こすことが考えられた (図2)。実際に自閉症患者より見出された NLGN3 の R451C 変異を導入した神経細胞においても非古典経路を介するシナプス誘導と古典経路を介するシナプス誘導のバランスが大きく崩れていることを見出した (Yoshida et al, Nat. Commun. 2021)。また、この他にも PTP δ のマイクロエクソン (meB) の欠損マウス (Wakita et al, Nat. Commun. 2020) やスプライシング調節エレメントの変異システムを作出してシナプス誘導バランスの変調が来たすシナプス病態と行動制御への影響を解析中である。

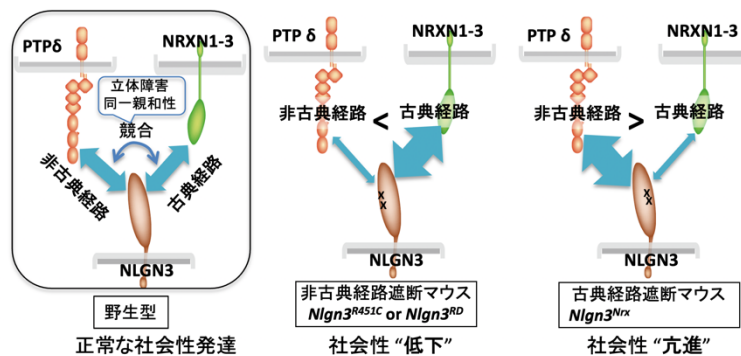


図2: NLGN3古典経路と非古典経路の競合バランスによる社会性調節モデル: 社会性調節の責任シナプス(本申請研究で同定予定)では古典経路と非古典経路を介するシナプス形成が拮抗している。古典経路を介するシナプス誘導が優位な *Nlgn3^{R451C}* 系統や *Nlgn3RD* 系統では社会性行動の低下が認められた。一方、非古典経路を介するシナプス誘導が優位な *Nlgn3^{Mx}* 系統では社会性行動の増加が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Uemura T, Suzuki-Kouyama E, Kawase S, Kurihara T, Yasumura M, Yoshida T, Fukai S, Yamazaki M, Fei P, Abe M, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M, Tabuchi K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Neurexins play a crucial role in cerebellar granule cell survival by organizing autocrine machinery for neurotrophins.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110624.	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 吉田知之	4. 巻 96
2. 論文標題 マイクロエクソンの取捨選択による中枢シナプス形成の調節	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 845-851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 吉田知之	4. 巻 74
2. 論文標題 シナプスオーガナイザーPTP によるシナプス形成調節の分子機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yaku K, Palikhe S, Izumi H, Yoshida T, Hikosaka K, Hayat F, Karim M, Iqbal T, Nitta Y, Sato A, Migaud ME, Ishihara K, Mori H, Nakagawa T	4. 巻 12
2. 論文標題 BST1 regulates nicotinamide riboside metabolism via its glycohydrolase and base-exchange activities.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27080-3.	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 Fukai S, Yoshida T	4. 巻 288
2. 論文標題 Roles of type IIa receptor protein tyrosine phosphatases as synaptic organizers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 6913-6926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15666.	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 Krasovec G, Hozumi A, Yoshida T, Obita T, Hamada M, Shiraishi A, Satake H, Horie T, Mori H, Sasakura Y	4. 巻 8
2. 論文標題 d-Serine controls epidermal vesicle release via NMDA receptor, allowing tissue migration during the metamorphosis of the chordate <i>Ciona</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Advances	6. 最初と最後の頁 eabn3264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abn3264.	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 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 1848
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 該当する

1. 著者名 Takahashi Y, Nishimura S, Takao E, Kasai R, Enokida K, Ida K, Fukuoka M, Koike T, Omatsu H, Yamaguchi T, Takano S, Yoshida T, Mori H.	4. 巻 349
2. 論文標題 Characteristics of internalization of NMDA-type GluRs with antibodies to GluN1 and GluN2B.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2020.577427.	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 Ishizuka K, Yoshida T, Kawabata T, Imai A, Mori H, Kimura H, Inada T, Okahisa Y, Egawa J, Usami M, Kushima I, Morikawa M, Okada T, Ikeda M, Branko A, Mori D, Someya T, Iwata N, Ozaki N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional characterization of rare NRXN1 variants identified in autism spectrum disorders and schizophrenia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurodevelopmental Disorders	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s11689-020-09325-2.	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 Miyao N, Hata Y, Izumi H, Nagaoka R, Oku Y, Takasaki I, Ishikawa T, Takarada S, Okabe M, Nakaoka H, Ibuki K, Ozawa S, Yoshida T, Hasegawa H, Makita N, Nishida N, Mori H, Ichida F, Hirono K.	4. 巻 15
2. 論文標題 TBX5 R264K acts as a modifier to develop dilated cardiomyopathy in mice independently of T-box pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0227393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227393.	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉田知之
2. 発表標題 自閉スペクトラム症関連タンパク質 Neuroligin 3 による社会性発達調節の分子機構
3. 学会等名 生命科学4 プラットフォーム 支援説明会・キックオフシンポジウムシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽 絢夏、今井 彩子、和泉 宏謙、北嶋 悠希、川瀬 修平、森 寿、吉田 知之
2. 発表標題 PTP 遺伝子のマイクロエクソン選択機構の解明
3. 学会等名 第40回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Imai, Hironori Izumi, Yumie Koshidaka, Keizo Takao, Hisashi Mori, Tomoyuki Yoshida
2. 発表標題 Distinct roles of canonical and non-canonical neuroigin 3 pathways in behavioral regulation
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田知之
2. 発表標題 ゲノム編集によるSAM系統での遺伝子改変
3. 学会等名 第37回老化促進モデルマウス学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyuki Yoshida
2. 発表標題 Molecular and structural mechanisms of PTP -mediated synapse formation
3. 学会等名 ISN-APSN 2022 meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北嶋悠希, 今井彩子, 吉田知之, 森寿, 田端俊英
2. 発表標題 電気刺激を用いたヒトiPS 細胞由来ニューロンによる神経回路形成の促進法の開発
3. 学会等名 第39回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川瀬 修平, 今井彩子, 北嶋悠希, 赤羽絢夏, 田端俊英, 森寿, 吉田知之
2. 発表標題 シナプスオーガナイザーPtpd遺伝子の微小エクソン選択パターンの解析
3. 学会等名 第39回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿
2. 発表標題 シナプス形成を指標としたグルホシネート曝露による中枢神経系への影響評価
3. 学会等名 第55回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izumi Hironori, Maina Demura, Ayako Imai, Tomoyuki Yoshida, Ryohei Ogawa, Hisashi Mori
2. 発表標題 Effect of the herbicide glufosinate-ammonium exposure on neural synapse formation
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田知之
2. 発表標題 Ptpd遺伝子マイクロエクソンの取捨選択調節が作り出す脳神経回路の設計図
3. 学会等名 生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田知之
2. 発表標題 自閉症関連タンパク質 Neuroligin 3 による新規のシナプス誘導経路と社会性調節機構
3. 学会等名 生理研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 出村 舞奈, 今井 彩子, 田端 俊英, 森 寿, 田 知之
2. 発表標題 大脳皮質神経細胞の電気刺激によるPtpd遺伝子の微小エクソン選択調節
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Yamagata, Tomoyuki Yoshida, Shuya Fukai
2. 発表標題 Structural basis of selective interaction between Lia RPTP and Liprin
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Tabata-Imai, Mizuki Sendo, Hironori Izumi, Keizo Takao, Hisashi Mori, Tomoyuki Yoshida
2. 発表標題 Microexon splicing of Ptpd gene controls locomotor activity and social behavior
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出村 舞奈, 今井 彩子, 田端 俊英, 森 寿, 吉田 知之
2. 発表標題 大脳皮質神経細胞の電気刺激によるPtprd遺伝子微小エクソンの選択的スプライシング調節
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Krasovec Gabriel, 保住 暁子, 吉田 知之, 濱田 麻友子, 白石 慧, 佐竹 炎, 堀江 健生, 森 寿, 笹倉 靖徳
2. 発表標題 D-serinelは脊索動物ホヤの変態時に表皮細胞からの細胞外基質の分泌を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田知之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 バイオサイエンスとインダストリー	5. 総ページ数 5
3. 書名 シナプス接着タンパク質NLGN3を介した社会性の発達を調節する分子機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>富山大学大学院生命融合科学教育部ホームページ https://www.ils.u-toyama.ac.jp 富山大学学術研究部医学系 分子神経科学講座ホームページ http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html 富山大学学術研究部医学系 分子神経科学講座ホームページ http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html 富山大学大学院生命融合科学教育部ホームページ https://www.ils.u-toyama.ac.jp/</p>

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 分 担 者	和泉 宏謙 (Izumi Hironori) (00377342)	富山大学・医学部・技術専門職員 (13201)	

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