

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293057

研究課題名(和文) シナプス前終末構築の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of presynaptic differentiation

研究代表者

吉田 知之 (YOSHIDA, Tomoyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：90372367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢シナプス形成を誘導する細胞接着分子群(シナプスオーガナイザー)の活性化によって形成されるシナプス前終末の分化誘導タンパク複合体の構成因子の網羅的解析から、およそ10種の新規分子を同定した。また、シナプス前終末構造を分化誘導するシナプスオーガナイザー複合体(IL1RAPL1・PTP、IL-1RACp・PTP およびSlitrk2・PTP 複合体)のX線結晶構造解析及びシナプスオーガナイザー変異体の機能解析からシナプス前終末構築におけるシナプスオーガナイザーの構造・機能相関を原子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Presynaptic differentiation is induced by an activation of small subset of cell adhesion molecules called synapse organizers. Using artificially induced hemi-synapses between recombinant synapse organizer-coated beads and cultured neurons, we identified components of presynaptic protein complexes formed on the cytoplasmic domain of synapse organizers on activation. Crystal structural analyses of presynaptic organizer PTP in complex with IL1RAPL1, IL-1RACp or Slitrk2 and mutational analyses of these synapse organizers revealed structure-function relationships of synapse-organizing complexes for presynaptic differentiation.

研究分野：分子神経科学

キーワード：シナプス形成 シナプスオーガナイザー

### 1. 研究開始当初の背景

シナプスはその前終末に神経伝達物質の放出装置、一方後終末には神経伝達物質の受容装置を有する非常に複雑な細胞間接着構造である。シナプス前終末はシナプス小胞の放出の場となるアクティブゾーンと呼ばれる膜構造を介してシナプス後終末と対峙する。シナプス前部はアクティブゾーンに近接するシナプス小胞群(放出可能小胞プール)、遠位に存在するシナプス小胞群(リザーブプール)、更に遠位に存在するミトコンドリア群が配置され、特徴的な階層構造をとることが電子顕微鏡解析からよく知られている。更に、アクティブゾーン、シナプス小胞に特異的に局在するタンパク質が多数報告され、シナプス小胞の放出における機能解析が進んでいる。しかしながらこれらのアクティブゾーンやシナプス小胞タンパク質をシナプス形成部にリクルートし、シナプス前終末の構築を調節する分子機構は全くわかっていない。従来の培養海馬神経細胞や大脳皮質神経細胞を用いた遺伝子機能解析系ではシナプス前終末の構造変化を観察することが困難であるため、シナプス前終末の構築を調節する分子機構に関する研究は著しく遅れている。シナプス形成は軸索終末と樹状突起に存在するシナプスオーガナイザーと呼ばれる細胞接着分子間の結合によって開始される。私達はシナプスオーガナイザーのスクリーニングから GluRδ2-Cbln1-Neurexin、IL1RAPL1-PTPδ などの新規シナプスオーガナイザーを同定した(Uemura et al.,2010; Yoshida et al.,2011,2012)。これまでの研究からシナプス前部のシナプスオーガナイザーとして Neurexin ファミリー及び 2A 型受容体チロシン脱リン酸化酵素ファミリー (PTPδ, PTPσ, LAR) が中心的な役割を担うことが明らかになっている。

### 2. 研究の目的

神経細胞間情報伝達の場合であるシナプスは極めて複雑な細胞間接着構造であり、シナプス形成に伴い、その前終末及び後終末にそれぞれ神経伝達物質の放出と受容に特化した細胞内構造が構築される。とりわけシナプス前終末にはアクティブゾーン、シナプス小胞クラスター、ミトコンドリアクラスターなど階層的な構造変化が整然と誘導されるが、これらの構造変化を調節する分子機構は不明である。本研究ではシナプス形成の引き金となるシナプス接着分子の活性化によって惹起されるシナプス前終末構築のメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

シナプスオーガナイザー組換えタンパク質をコートした磁気ビーズと神経細胞の間に人工的にシナプス前終末を誘導した際に惹起される細胞内シグナル伝達タンパク質複合体を化学的に架橋・単離し、構成因子のイ

ンタラクトーム解析により同定する。次いで同定された分子群はロックダウンにより培養神経細胞における人工的シナプス誘導を阻害するか否かで機能的スクリーンにかけられる。このようにして得られたシナプス前終末構築の鍵分子は欠損マウスを作製し、個体レベルでの機能の重要性を検証する。

### 4. 研究成果

種々のシナプスオーガナイザービーズを用いてシナプス前終末構造を分化誘導した際に、シナプス前部シナプスオーガナイザー PTPδ の細胞内領域に形成されるシグナル伝達複合体を単離し、質量分析によって凡そ 10 種の新規分子を含む構成因子を同定した。同定分子の多くはガン抑制遺伝子産物に分類され、新たなシグナル経路の関与が示唆された。そのうち PTPδ の細胞内領域に直接結合するもの、及び間接的に結合する分子をプルダウン法等で分類した。直接結合するものはロックアウトマウスの作製を行った。また、PTPδ を介してシナプス前終末構造を分化誘導する IL1RAPL1, IL-1RAcP および Slitrk と PTPδ とのシナプス形成複合体の X 線結晶構造解析からそれぞれの立体構造を原子レベルで明らかにした。その結果、PTPδ のイムノグロブリンドメインを介する結合がシナプス誘導に不可欠であることが明らかとなった(雑誌論文 3 及び 4)。これらのリガンドは PTPδ と 1:1 の対応関係で複合体を形成し、単量体でシナプス誘導シグナルを惹起することが示唆された。

PTPδ と結合して興奮性シナプス前終末の誘導を担う IL1RAPL1 のヒトにおける遺伝子変異は非特異型知的障害や自閉症の原因となることが知られている。そこで、IL1RAPL1 欠損マウスを作製し、シナプス形態観察及び行動解析を行った。その結果、大脳皮質及び海馬において興奮性シナプスの減少が認められた他に、空間学習、恐怖学習の低下、社会性行動の異常、固執傾向など、ヒトの発達障害に関連する行動表現型が認められた(雑誌論文 6)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Talukdar G, Inoue R, Yoshida T, Ishimoto T, Yaku K, Nakagawa T, Mori H.\* (2017) Novel role of serine racemase in anti-apoptosis and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1861, 3378-3387. 査読有 .doi: 10.1016/j.bbagen.2016.08.020.
2. Shimada T\*, Yoshida T, Yamagata K. (2016) Neuritin Mediates Activity-Dependent Axonal Branch Formation in Part via FGF Signaling.

- Journal of Neuroscience** 36, 4534-4548. 査読有. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1715-15.2016.
3. Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Yoshida T\*, Fukai S\*. (2015) Structure of Slitrk2-PTPδ complex reveals mechanisms for splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion. **Scientific Reports** 5, 9686. 査読有. doi: 10.1038/srep09686.
  4. Yamagata A, Yoshida T\*, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Iwasawa-Okamoto S, Mori H, Mishina M, Fukai S\*. (2015) Mechanisms of splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion by PTPδ-IL1RAPL1/IL-1RacP for synaptic differentiation. **Nature Communications** 6, 6926. 査読有. doi: 10.1038/ncomms7926.
  5. Tanaka-Hayashi A, Hayashi S, Inoue R, Ito T, Konno K, Yoshida T, Watanabe M, Yoshimura, T, Mori H\*. (2015) Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got1l1): a putative aspartate racemase? **Amino Acids**. 47, 79-86. 査読有. doi: 10.1007/s00726-014-1847-3.
  6. Yasumura M, Yoshida T, Mishina M. Phenotypic analysis of IL1RAPL1 knockout mice. **Nihon Yakurigaku Zasshi**. 2015;145(4): 187-192. 査読無
  7. Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T, Mishina M\*. (2014) IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. **Scientific Reports** 4, 6613. 査読有. doi: 10.1038/srep06613.
  8. Kinoshita K, Komatsu T, Nishide K, Hata Y, Hisajima N, Takahashi H, Kimoto K, Aonuma K, Tsushima E, Tabata T, Yoshida T, Mori H, Nishida K, Yamaguchi, Y., Ichida F, Fukurotani K, Inoue H, Nishida N\*. (2014) A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases IKs channel trafficking and function but not Yotiao interaction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 72, 273-280. 査読有. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.019.
  9. Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M\*. (2013) 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. doi:10.1371/journal.pone.0066254.
- [学会発表](計24件)
1. Haruka Munezane, Hiroaki Oizumi, Tomoyuki Yoshida, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo. The identification of the interactor of CLAC-P/Collagentyp XXV in motor nerve innervation of skeletal muscle; Society For Neuroscience; 2016年11月13日 (San Diego, USA).
  2. Haruka Munezane, Hiroaki Oizumi, Tomoyuki Yoshida, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo. The elucidation of the physiological function of CLAC-P/collagen XXV in neuromuscular development; 7th NIPS International Symposium "Decoding Synapses"; 2016年10月27日(生理学研究所, 愛知県).
  3. Gourango Talukdar, Ran Inoue, Tomoyuki Yoshida, Hisashi Mori. Impairment of extinction of auditory fear memory in Syntenin-1 knockout mice; 第39回日本神経科学大会; 2016年7月21日(パシフィコ横浜, 神奈川県).
  4. 島田忠之, 吉田知之, 山形要人. NeuritinはFGFシグナルを活性化することで海馬顆粒細胞の軸索分枝形成を誘導する; 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム; 2016年3月28日(札幌).
  5. 山形敦史, 佐藤祐介, 伊藤桜子, 植村健, 吉田知之, 深井周也. Slitrkファミリータンパク質とIIa型受容体タンパク質チロシン脱リン酸化酵素がスプライスインサートに依存して相互作用するメカニズム; 第38回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2015年12月3日(神戸国際会議場, 兵庫県).
  6. 宗実悠佳, 大泉寛明, 吉田知之, 若林朋子, 岩坪威. 運動ニューロンの標的骨格筋への投射にCLAC-P/Collagen type XXVが果たす分子メカニズムの解明; 第38回日本分子生物学会年会. 2015年12月2日(神戸国際会議場, 兵庫県).
  7. 植村健, 佐藤祐介, 山形敦史, 吉田知之, 後藤桜子, 前田亜沙美, 城島知子, 田淵克彦, 三品昌美, 深井周也. 小脳シナプス形成を制御するGluD2-Cbln1-neurexin接着分子複合体の構造基盤; 第38回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2015年12月1日(神戸国際会議場, 兵庫県).

8. 山形敦史, 吉田知之, 佐藤祐介, 伊藤桜子, 植村健, 森寿, 三品昌美, 深井周也. IIa型受容体チロシンフォスファターゼとインターロイキン1受容体タイプのシナプスオーガナイザー間の選択的スプライシング依存的相互作用制御の構造基盤; 第38回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2015年12月1日(神戸国際会議場, 兵庫県).
9. 吉田知之. ミニエクソンペプチド選択によるシナプスオーガナイザー機能の調節; 第38回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2015年12月1日(神戸国際会議場, 兵庫県).
10. Tomoyuki Yoshida. Interleukin-1 receptor family proteins function as neuronal synapse organizers; 第58回日本神経化学学会年会 APSN/JSN Joint Symposium; 2015年9月12日(大宮ソニックシティ, 埼玉県).
11. 山形敦史, 佐藤祐介, 伊藤桜子, 植村健, 前田亜沙美, 城島知子, 吉田知之, 深井周也. Slitrk2 によるPTP のスプライシング依存的認識機構の構造基盤; 第38回日本神経科学大会; 2015年7月31日(神戸国際会議場, 兵庫県).
12. 吉田知之, 山形敦史, 佐藤祐介, 伊藤桜子, 植村健, 前田亜沙美, 城島知子, 岡本志穂, 森寿, 三品昌美, 深井周也. シナプス形成を司るIL1RAPL1-PTP 複合体の構造基盤; 第38回日本神経科学大会; 2015年7月31日(神戸国際会議場, 兵庫県).
13. 植村健, 佐藤祐介, 山形敦史, 吉田知之, 後藤桜子, 田淵克彦, 三品昌美, 深井周也. 小脳シナプス形成を担うGluR2-Cbln1-Neurexin複合体の構造生物学的解析; 第38回日本神経科学大会; 2015年7月31日(神戸国際会議場, 兵庫県).
14. Gourango Talukdar, Ran Inoue, Tomoyuki Yoshida, Tetsuya Ishimoto, Takashi Nakagawa, Hisashi Mori. Intrinsic role of serine racemase in apoptosis and metabolism; 第38回日本神経科学大会; 2015年7月30日(神戸国際会議場, 兵庫県).
15. 畦地健司, 吉田知之, 岡本志穂, 森寿. PTP スプライスパリアントのシナプス形成における機能解析と脳部位別発現解析; 第33回日本生化学会北陸支部大会; 2015年5月23日(富山大学杉谷キャンパス, 富山県).
16. 宗実悠佳, 若林朋子, 吉田知之, 岩坪威. アルツハイマー病脳老人斑構成成分CLAC-Pの中枢神経系における生理機能の解明; 第33回日本認知症学会; 2014年11月30日(パシフィコ横浜, 神奈川県).
17. 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. 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; 第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ; 2014年11月26日(パシフィコ横浜, 神奈川県).
18. 林-田中亜由美, 井上蘭, 吉田知之, 林修平, 伊藤智和, 吉村徹, 森寿. Got111 ノックアウトマウスの解析; 第87回日本生化学会; 2014年10月18日(国立京都国際会館, 京都府).
19. 島田忠之, 吉田知之, 山形要人. NeuritinはFGFシグナルを介して、神経活動依存的な軸索分枝形成を誘導する; 第37回日本神経科学大会; 2014年9月11日(パシフィコ横浜, 神奈川県).
20. 吉田知之, 森寿, 三品昌美. IL-1受容体共通サブユニットIL-1RAcP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; 第32回日本生化学会北陸支部大会; 2014年5月24日(富山大学杉谷キャンパス, 富山県).
21. 林修平, 伊藤智和, 邊見久, 田中亜由美, 吉田知之, 森寿, 吉村徹. D-アスパラギン酸合成酵素とされる哺乳動物GOT1L1の酵素活性; 第9回D-アミノ酸研究会学術講演会; 2013年9月5日(大阪大学, 大阪府).
22. 安村美里, 吉田知之, 高雄啓三, 山崎真弥, 阿部学, 植村健, 宮川剛, 崎村建司, 三品昌美. IL1RAPL1欠損マウスの行動学的解析; 第36回日本神経科学大会; 2013年6月21日(京都国際会議場, 京都府).
23. 島田忠之, 吉田知之, 山形要人. Neuritinは海馬顆粒細胞における神経活動依存的な軸索分枝の形成を誘導する; 第36回日本神経科学大会; 2013年6月20日(京都国際会議場, 京都府).
24. 林崇, 吉田知之, 三品昌美. 精神疾患原因遺伝子IL1RAPL1による下流RhoAシグナル系を介したグルタミン酸作動性シナプス制御; 2013年6月20日(京都国際会議場, 京都府).

〔図書〕(計2件)

1. 吉田知之. 「分子脳科学」化学同人; 2015.  
22章「神経回路網形成とシナプス形成」:  
p249-259.

2. 深井周也, 植村健, 吉田知之. 実験医学増  
刊 構造生命科学で何がわかるのか, 何が  
できるのか. Vol.32; 羊土社; 2014. 「シ  
ナプス形成を誘導する膜受容体の機能と構  
造」: p92-97.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 知之 (YOSHIDA TOMOYUKI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授  
研究者番号: 90372367

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

植村 健 (UEMURA TAKESHI)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00372368

### (4) 研究協力者

( )