

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640038

研究課題名(和文) シナプスオーガナイザーズプライスバリエントの時空間的発現様式の解明

研究課題名(英文) Spatiotemporal expression pattern of splice variants of synapse organizers

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプスの分化誘導にはシナプスオーガナイザーと呼ばれる細胞接着分子が関与する。シナプスオーガナイザーの1つPTP の細胞外領域Igドメインには3,6及び4アミノ酸をコードするミニエクソンが選択的スプライシングによって挿入される。それによりマウス脳内には少なくとも8種類のスプライスバリエントが存在し、その比率は脳部位、発達時期によって変化することがわかった。更にPTP・リガンド複合体の構造解析から、ミニエクソンがリガンド認識とシナプス誘導において重要な役割を担うことが明らかとなった。このことからミニエクソンペプチドが標的的特異的シナプス形成のプロテインコードとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Synapse formation in the brain is partly mediated by a small subset of trans-synaptic cell adhesion molecules called synapse organizers. We found that PTP one of presynaptic synapse organizers, existed in multiple splice variants generated by insertions of 3, 6 and 4 amino-acid residue peptides (termed mini-exon peptides) in the extracellular immunoglobulin (Ig)-like domains. At least 8 splice variants in the Ig-like domains of PTP were expressed in the developing mouse brains. Proportions of these splice variants varied across brain regions and developmental stages. Furthermore, structural analyses of synapse-organizing complex of PTP and its ligands revealed the role of mini-exon peptides on the ligand recognition and synaptic differentiation. These results suggest that the choice of mini-exons may be determinants for selective pairing between PTP variants and their corresponding postsynaptic ligands to ensure the target specific synapse formation in the brain.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：選択的スプライシング シナプスオーガナイザー

## 1. 研究開始当初の背景

発達期の神経回路網構築過程では種々の神経細胞間に多様なシナプスが整然と形成される。近年、中枢神経系においてシナプス前部及び後部を分化誘導する活性を持つ細胞接着分子(シナプスオーガナイザー)として Neuroligin-Neurexin 等が同定され、シナプス形成の引き金を引く分子として注目されるようになった。しかしながら極めて多様な中枢神経細胞間に形成される標的依存的なシナプス結合がどのようにして少数のシナプスオーガナイザーによって調節されているのかは未解明のままである。更に、脳内の様々な神経回路網形成においてどのようなシナプスオーガナイザーが寄与しているかも全く分かっていない。我々は新規シナプスオーガナイザーとして受容体チロシン脱リン酸化酵素 PTP $\delta$  を同定した(Yoshida et al., 2011, J. Neurosci.)。PTP $\delta$  の細胞外イムノグロブリンドメイン内には 2 カ所のスプライスサイト(A サイトと B サイト)が存在し、A サイトには 3, 6, 9 アミノ酸をコードするミニエクソン A の挿入による、また一方 B サイトには 4 アミノ酸をコードするミニエクソン B の挿入によるスプライス多様性が存在することを明らかにした(Yoshida et al., 同上)。さらにミニエクソン A, B ペプチドの挿入の有無によって形成される PTP $\delta$  スプライスバリエーションにきわめて厳密に対応する PTP $\delta$  リガンドが存在することを見出した(Yoshida et al., 2012; J. Neurosci.)。これらのことから PTP $\delta$  遺伝子のスプライシング制御は複雑な神経回路網形成の標的特異性を保証する分子基盤そのものであるという仮説を持つに至った。

## 2. 研究の目的

中枢シナプス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、後終末分化を誘導する活性を有する細胞接着分子複合体が担う。最近、我々はシナプスオーガナイザーである受容体チロシン脱リン酸化酵素 PTP $\delta$  の細胞外領域に形成されるスプライス多様性がシナプスオーガナイザー複合体の組み合わせの決定要因であることを発見した。このことから PTP $\delta$  遺伝子のスプライシング制御が神経回路網形成の標的特異性を保証する分子基盤であるという新たな可能性が示唆された。本研究では脳内各部、各神経細胞における PTP $\delta$  遺伝子のスプライスバリエーションの発現パターンを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PTP $\delta$  遺伝子スプライスバリエーションの発達期マウス脳における発現解析：発達期マウス脳内各部より RNA を精製し、逆転写し、cDNA ライブラリーを合成した。この cDNA ライブ

ラリーに対して PTP $\delta$  の細胞外領域全体を増幅する PCR を行い、PCR 断片をクローニング後、DNA フィンガープリンティングによって A サイトおよび B サイトに挿入されたミニエクソン配列の組み合わせを網羅的に調べた。これにより脳内各部で発現する PTP $\delta$  スプライスバリエーションの存在比率を定量的に算出した。

(2) 単一神経細胞における PTP $\delta$  スプライスバリエーションの発現解析：発達期マウス大脳皮質を酵素的、物理的に破碎して得られる単一神経細胞より cDNA を合成し、DNA フィンガープリンティングによって PTP $\delta$  スプライスバリエーションの存在比率を調べた。

## 4. 研究成果

発達期マウス脳内には PTP $\delta$  の A サイトおよび B サイトに挿入されるミニエクソン配列の有無と組み合わせによって、少なくとも 8 種類のスプライスバリエーションが発現していた。これら 8 種類の PTP $\delta$  スプライスバリエーション発現比率は脳部位ごとに大きく異なっていた。さらに同一脳部位においても発達時期に応じて 8 種類の PTP $\delta$  スプライスバリエーション発現比率が変化することが判った。一方、単一神経細胞に発現する PTP $\delta$  スプライスバリエーションの種類は比較的少数であることが判った。

PTP $\delta$  とそのスプライスバリエーション特異的リガンドである IL1RAPL1, IL-1RAcP との複合体の X 線結晶構造解析から、A サイトに挿入されるミニエクソンペプチドはこれらのリガンドとの結合面を形成することが明らかとなった。一方、B サイトに挿入されるミニエクソンペプチドは PTP $\delta$  の細胞外イムノグロブリンドメインの相対的位置関係を調節することによって、リガンドの認識に寄与することが示唆された。

## 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 6 件)

1. Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shiroshima T, Yoshida T\*, Fukai S\*. (2015) Structure of Slitrk2-PTP $\delta$  complex reveals mechanisms for splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion. Scientific Reports 5, 9686. 査読有. doi: 10.1038/srep09686.
2. 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 PTP $\delta$ -IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation. Nature Communications 6, 6926. 査読有. doi: 10.1038/ncomms7926.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yasumura M, Yoshida T, Mishina M. Phenotypic analysis of IL1RAPL1 knockout mice. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2015;145(4): 187-192. 査読無.
- [学会発表](計 16 件)
1. 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).
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 畦地健司, 吉田知之, 岡本志穂, 森寿. PTP スプライスバリエーション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).
12. 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).

13. 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の中樞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).

14. 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).

15. 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).

16. 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).

〔図書〕(計 2 件)

1. 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.

2. 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.

〔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

研究者番号:

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: