

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04749

研究課題名(和文) 選択的スプライシング依存的なシナプス形成制御の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of splicing-dependent regulation for synaptogenesis

研究代表者

山形 敦史 (Yamagata, Atsushi)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：20463903

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)：シナプス形成を司る細胞接着因子複合体であるLRRTM-ニューレキシン複合体とSALM-PTP複合体について、結晶構造解析、定量的相互作用解析、シナプス誘導解析を組み合わせた解析を行った。その結果、それぞれの複合体について選択的スプライシングが相互作用を制御する機構を明らかにした。さらに、ヒトに存在する4種のLRRTMのうち、ニューレキシンがLRRTM1、LRRTM2にのみ選択的に結合する機構を明らかにした。また、SALMの二量体化を軸とする新たなシナプス形成のメカニズムを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳は数千億の神経細胞が複雑な回路を形成して成り立っている。神経細胞同士はシナプスを介して連結しており、シナプス形成の異常や破綻は自閉症や統合失調症など精神発達障害の原因となる。シナプスの形成はシナプスオーガナイザーと呼ばれる細胞接着因子の複合体形成が必須である。本研究はシナプス形成を司るシナプスオーガナイザー複合体の形成と制御の機構を、立体構造とそれに基づく詳細な解析によって明らかにしたものである。これらのシナプスオーガナイザーの遺伝子異常が精神発達障害の原因となることも知られており、本研究は精神発達障害の機構の解明や、それに対する薬剤開発につながるような重要な基礎研究と言える。

研究成果の概要(英文)：We performed X-ray crystallographic, quantitative interaction, and synaptogenic analyses for LRRTM-Neurexin complex and SALM-PTP complexes, those are cell-adhesion complexes capable of regulating synaptogenesis. As a result, we elucidated the mechanism how alternative splicing can regulate the interaction of these complexes. In addition, we revealed the mechanism for selective binding of neurexin to LRRTM1 and LRRTM2 among four LRRTM members in human. Moreover, we found the novel synaptogenic mechanism by SALM-PTP complex, in which the dimerization of SALM is crucial for synaptogenesis.

研究分野：構造生物化学

キーワード：シナプス 結晶構造解析 選択的スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプスの形成と維持は、シナプスオーガナイザーと呼ばれる細胞接着因子が司る。シナプスオーガナイザーは、細胞外ドメインにてヘテロな複合体を形成し、シナプス形成を惹起する。その際に特定の相手と選択的に相互作用することによってシナプス標的の特異性を決定していると考えられている。この選択的な相互作用は、選択的スプライシングによって生じた多様なバリエーションによって可能となっていると考えられていたが、その分子機構の実態には不明な点も多かった。

シナプスオーガナイザーのうち、シナプス前終末側に存在するプレシナプスオーガナイザーとして、ニューレキシンと IIa 型受容体チロシンホスファターゼが存在する。ニューレキシンは少なくとも 3 種のシナプス後終末側のポストシナプスオーガナイザー (ニューロリギン, LRRTM, Cbln) と相互作用する。その相互作用は、ニューレキシンの細胞外ドメインに存在する S4 と呼ばれるペプチド挿入によって制御されている。ニューレキシンとニューロリギンの結晶構造や定量的相互作用解析は精力的に行われてきた。一方、LRRTM, Cbln とニューレキシンとの複合体については立体構造解析をはじめとする詳細な解析の報告例はなかった。

IIa 型受容体チロシンホスファターゼは 6 種のポストシナプスオーガナイザー (IL1RAPL1, IL-1RAcP, Slitrk, SALM, TrkC, NGL-3) と相互作用することが知られている。このうち NGL-3 を除く 5 種のシナプスオーガナイザーとの相互作用は、IIa 型受容体チロシンホスファターゼの細胞外の 3 つの免疫グロブリン (Ig) ドメイン内に挿入される 2 カ所のミニエクソンペプチド (meA, meB) の長さや有無に依存する。申請者らはこれまでに、IIa 型受容体チロシンホスファターゼの一つ PTP δ と 3 つのポストシナプスオーガナイザー、IL1RAPL1, IL-1RAcP, Slitrk2 との複合体の構造解析に成功した。その結果、選択的スプライシングによって挿入されたペプチド部位が直接認識に関わるメカニズムと、挿入ペプチドによるドメイン運動の柔軟性が相互作用の特異性に寄与するメカニズムも明らかにした。最近、IIa 型受容体チロシンホスファターゼに対する新たなポストシナプスオーガナイザーとして SALM が同定された。SALM も他のシナプスオーガナイザーと同じく、ミニエクソンペプチドによる相互作用制御を受けていることが示唆されていたが、その詳細は明らかでなかった。

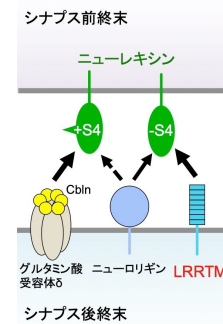


図 1. ニューレキシンと相互作用するシナプスオーガナイザー

2. 研究の目的

ヒト培養細胞を用いて各シナプスオーガナイザーの細胞外ドメインの発現・精製を行った。得られた細胞外ドメインを用いて複合体を調整し、シットティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶の回折データ測定を大型シンクロトロン放射光施設 (SPring-8, Photon Factory) にて行い、分子置換法を用いた構造解析を行った。得られた立体構造を基に変異体タンパク質を作製し、表面プラズモン共鳴法などの生物物理学的手法を用いて結合への影響を定量的に調べた。さらに、初代培養神経細胞と変異を含むシナプスオーガナイザーを発現させた培養細胞を共培養法し、シナプス誘導能を解析することにより、変異体タンパク質がシナプス形成にどのような影響をもたらすかを検証した。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞を用いて各シナプスオーガナイザーの細胞外ドメインの発現・精製を行う。得られた細胞外ドメインを用いて複合体を調整し、シットティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行う。得られた構造を基に変異体タンパク質を作製し、表面プラズモン共鳴法などの生物物理学的手法を用いて結合への影響を定量的に調べる。さらに、初代培養神経細胞とシナプスオーガナイザーを発現させた培養細胞との共培養法によるシナプス誘導解析を行い、シナプス形成に変異体タンパク質がどのような影響をもたらすかを検証する。

4. 研究成果

(1) LRRTM とニューレキシンの複合体形成の構造基盤

LRRTM は細胞外にロイシンリッチリピート (LRR) ドメインを持った一回膜貫通型のタンパク質である。ほ乳類では、LRRTM ファミリーとして LRRTM1~LRRTM4 の 4 種が存在する。その全てでシナプス誘導能が確認されているが、このうち LRRTM1 と LRRTM2 においてニューレキシンとの結合が報告されている。まず、ヒト由来の LRRTM の細胞外領域を C 末端ヒスチジンタグ融合タンパク質となるように pEBMulti ベクターにクローニングした。発現ベクターを浮遊性の Expi293F 細胞にトランスフェクションさせて、培地中に一過性に発現させた。4 種の LRRTM のうち、特に LRRTM2 で良好な発現が確認された。LRRTM2 を Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した後、微量自動結晶化装置を用いてシットティングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行なった。最初に野生型のタンパク質を用いて結晶化を行なったが、十分な回折

分解能を持った結晶が得られなかったため、様々な長さの LRRMT2 のコンストラクトや点変異体を試したところ、最終的に糖鎖修飾部位を無くした変異体である T59L を用いて LRRMT2 の良好な結晶を得ることに成功した。大型シンクロトン放射光施設である SPring-8 を用いた回折データ測定により、3.15 分解能での回折データ測定に成功し、マウス由来の改変 LRRMT2 の構造を基にした分子置換法によって構造解析を行なった。

次に、LRRTM とニューレキシンとの複合体の構造解析を着手した。ニューレキシンは複数のドメインからなる細胞外領域を持った サブファミリーと、LNS (laminin, nectin, sex-hormone binding globulin) と呼ばれるドメインのみからなる細胞外領域を持った サブファミリーに分かれる。本研究では、サブファミリーに属する Neurexin1 β のうち、LRRMT2 への結合が確認されているスプライシングバリエーション(-S4)を用いた。Neurexin1 β (-S4)の LNS ドメインを C 末端ヒスチジンタグ融合タンパク質となるように pEBMulti ベクターにクローニングした。その発現ベクターを LRRMT2 の発現ベクターとともに Expi293F 細胞にトランスフェクションして共発現を行なった。Ni アフィニティークロマトグラフィーによる精製の後、カルシウムを加えることにより両者が安定な複合体を形成することを見出した。複合体をカルシウム存在下でのゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに精製し、結晶化を行なった。しかし、結晶は得られるものの、どれもが LRRMT2 単体の結晶であるという問題点が生じた。得られた LRRMT2 の結晶構造は全て同じ二量体構造を格子中に形成しており、この二量体形成が複合体結晶の作成を阻害していると考え、この二量体界面への変異体 (H355A) を用いてニューレキシンとの複合体の結晶化を行なった。その結果、3.4 分解能での複合体結晶の回折データ測定に成功し、それぞれの構造を基にした分子置換法によって構造解析を行なった。

LRRMT2 の立体構造はロイシンリッチリピートの繰り返し構造と、N, C 末端に存在するジスルフィド結合を含むキャップ構造から形成されている (図 2a)。ニューレキシンは、LRRMT2 の C 末端キャップ構造部位にカルシウムを介して結合していた (図 2a, 2b)。神経細胞間の接着には LRRTM 以外にも多くの LRR タンパク質が関与しているが、それらの複合体形成のほとんどはロイシンリッチリピート部位で起こっており、今回の C 末端キャップ構造部位への結合はこれまでに例のないユニークなものであった。相互作用残基に対する変異体を用いて、表面プラズモン共鳴による定量的相互作用解析を行なったところ、全ての残基でその変異によって結合の消失や著しい低下が見られた。S4 挿入部位はニューレキシンとの結合部位の近傍に位置する (図 2b)。S4 挿入のあるニューレキシンの構造では、結合に重要なニューレキシンのアルギニン残基(Arg206)が結合部位より離れる形に配向していた (図 2c)。このアルギニン残基の変異体ニューレキシン (R206A) と S4 挿入されたニューレキシンは、LRRMT2 への結合アフィニティーを野生型と比べ、約 20 倍と約 40 倍とそれぞれ低下させていた。両者が同程度ほど結合ありにティーを低下させていることから、このアルギニン残基の配向が S4 挿入によって変化することが選択的結合の機構であると考えられた。

これまで、ニューレキシンに結合する 3 種のポストシナプスオーガナイザーのうち、ニューロリギンとの複合体の構造解析が報告されている。ニューロリギン-ニューレキシン複合体と LRRMT2-ニューレキシン複合体の立体構造を比較すると、両者の相互作用部位は重なりあっており、ニューロリギンと LRRTM のニューレキシンへの結合は互いに排他的であるというこれまでのデータとよく一致した。さらに、哺乳類に存在する 4 種の LRRTM (LRRTM1-LRRTM4) の配列を今回得られた立体構造を基に比較すると、LRRTM1, LRRTM2 ではニューレキシンとの相互作用に重要な残基の全てが保存されているのに対し、LRRTM3, LRRTM4 では違う残基に置き換わっている箇所も存在した。LRRTM3, LRRTM4 のニューレキシンへの結合については、これまで精製したサンプルを用いた定量的な相互作用解析の報告例が存在しなかったため、今回新たに表面プラズモン共鳴による定量的相互作用解析を試みた。LRRTM4 は発現と精製に成功したが、LRRTM3 は全く発現が確認できなかった。そこで、LRRTM2 を基に LRRTM3 のニューレキシン結合部位に相当する C 末端キャップ部位を入れ換えたキメラタンパク質 (LRRTM2+3) を作成した。精製した各タンパク質を用いて表面プラズモン共鳴による定量的相互作用解析を行ったところ、LRRTM2+3 及び LRRTM4 共にニューレキシンと結合しないことが明らかとなった。従って、ニューレキシンの LRRTM1, LRRTM2 への選択性が構造と相互作用解析の両面から確かめられた。最後に、LRRTM2 とその変異体を発現させた HEK 細胞と初代神経培養細胞との共培養を行い、両細胞の接触面に起きる興奮性シナプスのマーカータンパク質

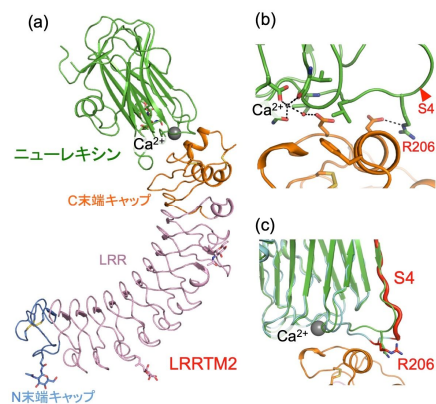


図 2. (a) ニューレキシンと LRRMT2 との複合体構造 (b) ニューレキシンと LRRMT2 の相互作用面 (c) ニューレキシン (+S4) 構造の重ね合わせ

(Basoon) の集積を観察して、シナプス誘導能を解析した。その結果、ニューレキシンとの結合を失わせた LRRTM ではシナプス誘導能も失われており、ニューレキシンへの結合とシナプス誘導との関連が確認された。

(2) IIa 型受容体チロシンホスファターゼと SALM の複合体形成の構造基盤

哺乳類には 3 種の IIa 型受容体チロシンホスファターゼ (PTP δ , PTP σ , LAR) が存在し、共通して三つの免疫グロブリン様ドメイン (Ig1-Ig3) と四つのフィブロネクチン III ドメイン (Fn1-Fn4) からなる細胞外領域を持つ。一方、SALM は哺乳類では SALM1~SALM5 までの 5 種が存在し、LRR、Ig、Fn からなる細胞外領域を共通して持つ。このうち、SALM3、SALM5 については IIa 型受容体チロシンホスファターゼとの結合を介したシナプス誘導能が確認されている。一方、その他の SALM については IIa 型受容体チロシンホスファターゼと結合しうるがシナプス誘導を示さないことが明らかとなっている。本研究では 3 種の IIa 型受容体チロシンホスファターゼのうち、当研究室における構造解析例が最も豊富な PTP δ を用いた。SALM については全ての SALM のメンバーを用いて、複合体の結晶化を試みた。それぞれの細胞外領域について各ドメイン毎に短くした様々な領域をコードする遺伝子を pEB ベクターにクローニングし、Expi293F 細胞を用いて発現をテストした。次に発現が確認されたものに対して、Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。精製した各サンプルを混合して複合体を形成させ、結晶化を行なった。一連の発現・精製と結晶化の結果、SALM については LRR-Ig までの領域を用いた場合、PTP δ については Ig1-Fn1 までの領域を用いたときに結晶を得ることができた。最終的に、SALM5 単体、SALM2-PTP δ 複合体、SALM5-PTP δ 複合体のそれぞれの結晶回折データ測定を行い、分子置換法による構造解析に成功した。

SALM5 単体の結晶構造解析では LRR-Ig ドメインを用いたにも関わらず、LRR ドメインのみしか電子密度図で見えておらず、Ig ドメインがフレキシブルに動く構造であると考えられた。一方、SALM2-PTP δ 、SALM5-PTP δ の両複合体では PTP δ との結合によって Ig ドメインが固定化されていた (図 3a)。SALM と PTP δ は SALM LRR-PTP δ Ig2、SALM Ig-PTP δ Ig2、SALM Ig-PTP δ Ig3 の三つの相互作用面を形成していた (図 3a)。それぞれの相互作用面における変異体を作製し、表面プラズモン共鳴による定量的相互作用解

析を行なったところ、結合の大幅な減弱が確認された。選択的スプリングによって生じるミニエクソンペプチドと結合の関連については、まず PTP δ の Ig ドメイン内にある meA は結合部位からは離れており結合に影響しないと考えられた。一方、Ig2-Ig3 間にある meB は Ig2、Ig3 ドメインのそれぞれが SALM と結合するための適切な配向に重要であると考えられた (図 3a)。実際に、PTP δ の meA、meB をそれぞれ欠いたバリエーションを用いて表面プラズモン共鳴による定量的相互作用解析を行なったところ、meA の有無は結合に影響しなかったのに対し、meB の欠損によって結合アフィニティーが 10 倍程度低下した。このことより、SALM と IIa 型受容体チロシンホスファターゼとの結合が選択的スプリングによって生じるミニエクソンペプチドのうち、meB にのみ依存することを初めて明らかにした共に、そのメカニズムを構造の面から明らかにした。

SALM2-PTP δ 、SALM5-PTP δ の両複合体は結晶中で 2 : 2 の複合体を形成していた (図 3b)。この 2 : 2 複合体は、SALM 二量体に対し PTP δ が一分子ずつ結合して形成されている。SALM の二量体は SALM の LRR ドメイン間の相互作用によって形成されており (図 3b)、SALM5 単体の結晶構造でも同様の二量体構造が見られた。SALM の二量体の相互作用残基に対する変異体を作製し、多波長光散乱を用いて溶液中での分子量を計測することによって、SALM の二量体が解離した変異体 SALM (Q134N) の作製に成功した。この変異体を用いて、PTP δ に対する結合及びシナプス誘導活性を解析したところ、PTP δ との結合能に変化は無かったが、シナプス誘導活性を失っていた。このことは SALM の二量体化がシナプス誘導に必須であることを示している。これまで申請者が構造解析してきた PTP δ と他のポストシナプスオーガナイザーとの複合体は全て 1 : 1 の複合体であり、二量体化を軸とするシナプス誘導のメカニズムはこれまでにない全く新たな知見であった。

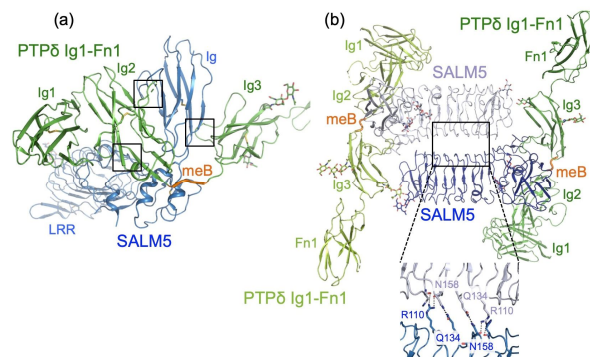


図 3. (a) SALM5 と PTP δ との相互作用
(b) SALM5 と PTP δ の 2:2 複合体と SALM 二量体の相互作用

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

山形敦史、深井周也、

Structural insights into leucine-rich repeat-containing synaptic cleft. *Curr. Opin. Struc. Biol.* (2019) **54**, pp68-77 (査読有り)

DOI: 10.1016/j.sbi.2019.01.001

山形敦史、後藤(伊藤)桜子、佐藤裕介、城島知子、前田亜沙美、渡辺雅彦、齊藤貴士、前仲勝実、寺田透、吉田知之、植村健、深井周也、

Structural insights into modulation and selectivity of transsynaptic neurexin-LRRTM interaction. *Nat. Commun.*(2018) (査読有り)

DOI:10.1038/s41467-018-06333-8

山形敦史、宮崎裕理、横井紀彦、重松英樹、後藤(伊藤)桜子、佐藤裕介、前田亜沙美、後藤鉄平、三宝誠、平林眞澄、白水美香子、深田優子、深田正紀、深井周也、

Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22. *Nat. Commun.* (2018) (査読有り)

DOI:10.1038/s41467-018-03947-w

後藤(伊藤)桜子、山形敦史、佐藤裕介、植村健、城島知子、前田亜沙美、今井彩子、森寿、吉田知之、深井周也、(査読有り)

Structural basis of trans-synaptic interaction between PTP δ and SALMs for inducing synapse formation. *Nat. Commun* (2018)

DOI:10.1038/s41467-017-02417-z

〔学会発表〕(計 3 件)

山形敦史、宮崎裕理、深田優子、深田正紀、深井周也、

てんかんの原因となる蛋白質複合体 LGI1-ADAM22 の構造基盤、

第 41 回 日本分子生物学会、2018

山形敦史、

Splicing-dependent regulation of the interaction between PTP δ and postsynaptic organizers Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery、2018

山形敦史、宮崎裕理、重松英樹、白水美香子、深田優子、深田正紀、深井周也、

てんかん関連リガンド-受容体複合体 LGI1-ADAM22 の構造基盤、

第 56 回 日本生物物理学会、2018

〔その他〕

ホームページ等

東京大学定量生命科学研究先駆先端定量生命科学研究部門 蛋白質複合体解析研究分野

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/SRRORLifeSciDivJp2/Welcome.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：前田 亜沙美

ローマ字氏名：Asami Maeda

研究協力者氏名：城島 知子

ローマ字氏名：Tomoko Shirosima

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。