

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「シナプス形成を誘導する膜受容体複合
体と下流シグナルの構造生命科学」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：深井 周也
(東京大学分子細胞生物學研究所、准
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

脳を構成する無数の神経細胞は、シナプスと呼ばれる細胞接着構造を介して接続され、回路を形成することで、学習や記憶などの高次の脳機能を可能にする。シナプス形成の異常は、知的障害や自閉症などの神経発達障害と深く関係する。本研究では、シナプス形成を誘導するタンパク質(シナプスオーガナイザー)の解析によりシナプス形成の詳細な分子メカニズムを解明し、その情報に基づいてシナプス形成を制御する方法を開発することを目指した。

深井グループでは、植村グループが発見したシナプスオーガナイザー複合体である IL1RAPL1-PTPδ、IL-1RAcP-PTPδ に加えて、PTPδ に関連する三種類の複合体(計五種類)の立体構造を決定し、構造情報に基づいて設計した変異体の分子間相互作用解析を行うことで、特異的相互作用メカニズムを明らかにした。植村グループは、同じ変異体を用いて細胞レベルでの結合能およびシナプス誘導能の解析を行った。原子レベルから細胞レベルでの解析により、選択的スプライシングにより挿入される短いペプチド配列がシナプス特異性の決定に重要であることを明らかにした。もう一つの別のタイプのシナプスオーガナイザー複合体である GluRδ2-Cbln1-β-Nrxn については、個々のタンパク質の立体構造を深井グループが決定し、植村グループによる化学架橋産物の質量分析と網羅的に導入した部位特異的変異体のシナプス誘導能の解析により、その結合様式を予測した。しかし、得られた成果をまとめることを検討していた時期に、オックスフォード大学と慶應大学の共同研究グループから GluRδ2-Cbln1 融合体の結晶構造解析と Cbln1-Nrxn1β 複合体の電顕解析の結果が *Science* 誌に報告された。GluRδ2-Cbln1 複合体を模した融合体の構造は、我々の予測した相互作用モデルとは異なっていたが、部位特異的変異体を用いた結合実験やシナプス誘導アッセイで裏付けられており、我々のシナプス誘導能の解析の結果とも合致するものであった。この *Science* 誌の報告を受けて、β-Nrxn が関与する別のシナプスオーガナイザー複合体の解析にも取り組んだ。複合体の構造決定には成功しているので、変異体の機能解析と合わせてスプライスインサートによって相互作用が制御されるメカニズムをプロジェクト終了までに明らかにする予定である。

植村グループでは、新規のシナプスオーガナイザーや下流シグナル分子を探索し、新たな候補分子を同定した。この過程で Nrxn1β のシナプス前終末における共受容体の候補分子を同定した。Nrxn1β の細胞内領域を他の受容体の細胞質内領域と入れ換えたキメラを作製して解析したところ、従来想定したモデルとは異なり、Nrxn1β の共受容体が存在してシナプス誘導に寄与していることを支持する結果が得られた。そこで共受容体ノックアウトマウスを作製し、共受容体の分子機能の解析を進めた。PTPδ の細胞内領域を介してシナプス前終末誘導する複数の候補分子の多くはガン抑制遺伝子産物として知られ、ガン抑制遺伝子産物シグナルネットワークのシナプス形成における新たな機能が示唆された。PTPδ の下流シグナル候補分子については、ゲノム編集技術を用いたノックアウトマウス系統を樹立中である。Nrxn1β と PTPδ の下流では異なった候補分子と共通の候補分子が同定されている。これらを比較することで中枢シナプス形成を制御する細胞内シグナル伝達機構の共通基盤および固有のシグナル伝達機構を抽出できる可能性があり、神経発達障害の治療にむけた創薬標的の提示に貢献できることが期待される。植村グループでは、さらに、シナプスオーガナイザーの遺伝子改変による神経発達障害モデルマウスの作出を検討した。IL1RAPL1 欠損マウスの行動解析を行い、この遺伝子改変マウスが多動、学習記憶障害等の神経発達障害に類した行動異常を呈することから疾患モデルとして有用であることを示した。また、小脳顆粒細胞特異的 Nrxn1,2,3トリプルノックアウトマウスを用いて Nrxn の分子機能を解析した。ノックアウトマウスの

小脳および培養小脳顆粒細胞を用いた解析から、Nrxn は小脳顆粒細胞の生存に必須の分子であることが明らかとなった。ノックアウトマウスの作製・解析を進める一方で、シナプス機能分子を脳神経細胞で迅速に解析する新たな方法論を開発した。CRISPR/Cas9 システムと子宮内電気穿孔法による神経前駆細胞への遺伝子導入技術を組み合わせることにより生きた個体の脳神経細胞で相同組換えによるゲノム編集が可能となった。

研究全体を通じて、シナプスオーガナイザーによるシナプス特異性の決定とシナプス形成を誘導する分子メカニズムの包括的理解が進んだ。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. シナプスオーガナイザー複合体 IL1RAPL1-PTPδ と IL-1RAcP-PTPδ の構造・機能解析

概要：シナプス形成は、軸索末端と樹状突起にそれぞれ局在する膜受容体様接着因子(シナプスオーガナイザー)がトランスシナプティックに相互作用することで誘導される。この相互作用は、スプライスインサートの選択により制御されている。興奮性のシナプス前部と後部の両方を誘導するシナプスオーガナイザー複合体 IL1RAPL1-PTPδ と IL-1RAcP-PTPδ の結晶構造を決定し、変異体の相互作用解析やシナプス誘導能の解析と合わせて、スプライスインサート特異的に相互作用するメカニズムを解明した。

2. シナプスオーガナイザー複合体 Slitrk-PTPδ の構造・機能解析

概要：シナプス形成は、軸索末端と樹状突起にそれぞれ局在する膜受容体様接着因子(シナプスオーガナイザー)がトランスシナプティックに相互作用することで誘導される。この相互作用は、スプライスインサートの選択により制御されている。興奮性および抑制性のシナプス前部を誘導するシナプスオーガナイザー複合体 Slitrk2-PTPδ の結晶構造を決定し、変異体の相互作用解析やシナプス誘導能の解析と合わせて、スプライスインサート特異的に相互作用するメカニズムを解明した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. CRISPR/Cas9 システムを用いた脳神経細胞での相同組換え法の確立

概要：シナプス機能分子を脳神経細胞で迅速に解析する新たな方法論を開発した。CRISPR/Cas9 システムと子宮内電気穿孔法による神経前駆細胞への遺伝子導入技術を用いた「脳神経細胞での相同組換えによるゲノム編集法」を確立させた。この技術を用いることで脳神経回路網構築と機能発現に関わる多くの遺伝子を容易かつ迅速に解析することが可能となり、今後のシナプス機能分子の解析を飛躍的に早めることが期待される。

2. 神経発達障害モデルマウスの作出

概要：ヒトにおいて興奮性シナプスを誘導するシナプスオーガナイザーであるインターロイキン1受容体アクセサリタンパク質様タンパク質1(IL1RAPL1)の遺伝子変異は知的障害と自閉症を引き起こすことが知られている。IL1RAPL1 を欠損したマウスを作出し、その表現系を解析した。IL1RAPL1 欠損マウスは空間の参照記憶や作業記憶、恐怖記憶の遠隔記憶が障害されていることから、知的障害のモデルマウスとしての可能性を示した。シナプス形成を制御する技術の開発に役立つことが期待できる。

3. パーキンソン病関連酵素 USP30 の構造・機能解析

概要：パーキンソン病は進行性の神経変性疾患であり、その原因の一つが不良ミトコンドリアの蓄積である。不良ミトコンドリアはユビキチン化を経て分解されるが、USP30 は、ユビキチン

を切断除去することで過剰な分解を抑える。USP30 の阻害は不良ミトコンドリアの分解を促進することから、その阻害剤はパーキンソン病に対する創薬シーズとして注目されている。本研究で解明した USP30 の高分解能構造情報が阻害剤設計の足がかりとなって治療薬開発に繋がることが期待される。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「深井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
深井 周也	東京大学分子細胞生物学研究所	准教授	H24.10～
山形 敦史	同上	助教	H24.10～
佐藤 裕介	同上	助教	H24.10～
伊藤 桜子	同上	助教	H24.10～
城島 知子	同上	特任研究員	H25.4～
前田 亜沙美	同上	学術支援専門職員	H25.4～
高橋 富雄	同上	JSPS 外国人特別研究員	H25.4～
尾勝 圭	同上	JSPS 特別研究員 PD	H27.4～
窪田 恵子	同上	特任研究員	H24.10～H27.3
陳 鑒行	東京大学大学院新領域創成科学研究科	D1～D5	H24.10～H29.3
中村 美紅	同上	M1～M2	H26.4～H28.3

研究項目

- ・ シナプス形成を誘導するタンパク質複合体のX線結晶構造解析

②「植村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
植村 健	信州大学学術研究院医学系	准教授	H24.10～
吉田 知之	富山大学医学薬学研究部	准教授	H24.10～
川瀬 詩織	信州大学医学部医学科	研究支援推進員	H25.4～
小池 梨絵	同上	技能補佐員	H26.9～
鈴木 絵美	同上	研究員	H27.4～
安村 美里	東京大学大学院医学系研究科	特任助教	H24.10～H25.3
前田 亜沙美	同上	学術支援職員	H24.11～H24.12
城島 知子	同上	学術支援職員	H24.10～H25.3
関川 明生	信州大学医学部医学科	研究員	H25.6～H26.6

研究項目

- ・ シナプス形成を誘導するタンパク質複合体の機能解析
- ・ シナプス形成制御法の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

島津製作所ライフサイエンス研究所 嶋田崇史フェロー (質量分析)

自然科学研究機構生理学研究部 深田正紀教授、深田優子准教授 (質量分析)

北海道大学大学院薬学系研究科 前仲勝美教授 (分子間相互作用解析、発現系構築)

理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 白水美香子プロジェクトディレクター、
重松秀樹上級研究員(電子顕微鏡解析)

富山大学 研究推進機構 研究推進総合支援センター 高雄啓三教授(マウス行動解析)

新潟大学脳科学研究所 崎村建司教授、阿部学准教授(遺伝子改変マウス作製)

富山大学 大学院医学薬学研究部(医学) 森寿教授(遺伝子改変マウス作製)

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 GluRδ2-Cbln1-Nrxn1β 複合体の解析(東京大学 深井グループ 信州大学 植村グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

構造未知であった GluRδ2 のアミノ末端ドメイン(ATD)と Cbln1 それぞれの単独の立体構造を決定した。配列保存性や分子表面形状の情報をもとに GluRδ2-Cbln1 の相互作用様式を予測し、変異を導入して相互作用様式の検証を行った。しかし、ほとんどの変異がシナプス誘導能に影響を与えなかったため、化学架橋と質量分析を組み合わせる直接的に相互作用残基を同定することを試みた。GluRδ2 と Cbln1 双方の相互作用残基の候補が得られたので、同様の手法を用いて、Cbln1-Nrxn1β 間の相互作用残基の同定を試みた。その結果、2組のアミノ酸残基ペアが同定され、分子表面形状の相補性の情報を加えて Cbln1-Nrxn1β の相互作用モデルを予測した。一方で、GluRδ2 : Cbln1 : Nrxn1β の結合比を、当初の想定である 2 : 6 : 2 の二量体とすると、GluRδ2 と Nrxn1β との結合部位に重なりが生じることになった。ゲルろ過クロマトグラフィーと多角度レーザー散乱(SEC-MALS)を組み合わせた分子量測定により、Cbln1 : Nrxn1β が 6 : 1 の比で結合することが示唆された。これらの成果をまとめることを検討していたところ、オックスフォード大学と慶應大学の共同研究グループから GluRδ2-Cbln1 融合体の結晶構造が *Science* 誌に報告された。この融合体の構造は GluRδ2-Cbln1 複合体に対応する構造であったが、我々の予測した相互作用モデルとは異なっていた。彼らの構造は、部位特異的な変異体を用いた結合実験やシナプス誘導アッセイで裏付けられており、また、我々のシナプス誘導アッセイの結果とも合致するものであった。したがって、予測した相互作用様式と実際の結晶構造との相違は、我々の化学架橋の条件に何らかの原因があることを示唆していた。同じ論文で、彼らは Cbln1-β-Nrxn 複合体のゲルろ過クロマトグラフィー(SEC) - 多角度レーザー光散乱(MALS)分析および電子顕微鏡解析の結果も報告しているが、結合比については、我々の SEC-MALS 解析と同じ結果(Cbln1: β-Nrxn = 6 : 1)であった。一方で、Cbln1 と β-Nrxn との相互作用に必須な β-Nrxn の 4 番目のスプライスインサート(S4)の認識様式の詳細は明確ではなく、議論の余地が残っている。

3. 2 IL1RAPL1-PTPδ 複合体の解析 (東京大学 深井グループ 信州大学 植村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

IL1RAPL1-PTPδ 複合体に加えて IL-1RAcP-PTPδ 複合体や Slitrk2-PTPδ 複合体の立体構造決定にも成功し、選択的スプライシングにより挿入されるペプチド(ミニエクソンペプチド)が複合体形成の特異性を決定するメカニズムを明らかにした(Yamagata *et al.*, *Nat. Commun.*, 2015; *Sci. Rep.*, 2015)。植村グループでは、シナプス特異性決定におけるミニエクソンペプチドの重要性をいち早く提唱してきた。IL1RAPL1とIL-1RAcPは共に興奮性シナプスを誘導するシナプスオーガナイザーであり、ミニエクソンペプチドの挿入がその相互作用に必須である。一方、植村グループでは、ミニエクソンペプチドの欠失が相互作用に必須なシナプスオーガナイザーを見出している。このシナプスオーガナイザーについて分子(構造)レベルから細胞レベルまでの解析を行った(Yoshida *et al.*, 未発表)。一方、スプライスインサートによる調節は不明であるが、PTPδに結合する新たなシナプスオーガナイザー候補としてSALMファミリータンパク質が近年注目されている。我々のスクリーニング系においてもSALMファミリー分子は検出されている(Uemura *et al.*, *J. Biochem.*, 2017)。PTPδとSALM2およびSALM5との複合体の結晶化を行い、それぞれ分解能3.2 Åおよび3.9 Åで立体構造を決定した。構造情報に基づいて設計した部位特異的変異体を用いた相互作用解析やシナプス誘導アッセイを行うことで機能メカニズムの解明を行った。これまで知られているシナプスオーガナイザーと異なり、シナプス形成の誘導にSALMタンパク質の二量体化が必要であることを示す結果を得た。その結果を論文としてまとめて投稿した(Goto-Ito *et al.*, *Nat. Commun.*, 改訂中)。

3. 3 下流シグナル複合体の探索と解析(信州大学 植村グループ 東京大学 深井グループ)

(1)研究実施内容及び成果

PTPδ-IL1RAPL1複合体およびGluRδ2-Cbln1-Nrxn1β複合体の下流ではたらく前シナプス部の候補分子の探索を行った。タンパク質をコートした磁気ビーズを利用したスクリーニング法を応用し、シナプス形成に関わる細胞内シグナル分子のスクリーニングを実施した。その結果、Nrxn1βの細胞内領域を介するシナプス前終末誘導シグナル分子複合体を構成する複数の候補分子を同定した。また、Nrxn1βの細胞質内領域の機能を明らかにする目的で、Nrxn1βの細胞内領域を他の受容体の細胞質内領域と入れ換えたキメラを作製した。キメラ分子のシナプス前終末の誘導能を調べた結果、Nrxn1βの細胞質内領域はシナプス小胞タンパク質Synaptophysinの集積を指標にしたシナプス前終末誘導には必ずしも必要ではないことが示唆された。この結果は、従来想定したモデルとは異なり、Nrxn1βの共受容体が存在し、シナプス誘導に寄与していることを示唆していた。これらの知見に一致するように、下流シグナルを同定する過程で、Nrxn1βのシナプス前終末における共受容体の候補分子を同定した。この共受容体を抗体で多量体化することでシナプス前終末の分化誘導が誘導されることからNrxn1βのプレシナプスにおける機能的な共受容体であることが強く示唆された。共受容体ノックアウトマウスを作製し、共受容体の分子機能の解析を進めた。

PTPδの細胞内領域を介するシナプス前終末誘導シグナルについても複数の候補分子が同定された。これらの多くはガン抑制遺伝子産物として知られ、ガン抑制遺伝子産物シグナルネットワークのシナプス形成における新たな機能が示唆された。PTPδの下流シグナル候補分子については、ゲノム編集技術を用いたノックアウトマウス系統を樹立中である。Nrxn1βとPTPδの下流では異なった候補分子と共通の候補分子が同定されている。これらを比較することで中枢シナプス形成を制御する細胞内シグナル伝達機構の共通基盤および固有のシグナル伝達機構を抽出できる可能性があり、神経発達障害の治療にむけた創薬標的の提示に貢献できることが期待される。

3. 4 神経発達障害モデルマウスの作出と解析(信州大学 植村グループ)

(1)研究実施内容及び成果

IL1RAPL1欠損マウスの行動解析を行い、この遺伝子改変マウスが多動、学習記憶障害

等の神経発達障害に類した行動異常を呈することから疾患モデルとして有用であることを示した(Yasumura *et al.*, *Sci. Rep.*, 2014)。また、小脳顆粒細胞特異的 *Nrxn1,2,3* トリプルノックアウトマウスを用いて *Nrxn* の分子機能を解析した。ノックアウトマウスの小脳および培養小脳顆粒細胞を用いた解析から、*Nrxn* は小脳顆粒細胞の生存に必須の分子であることが明らかとなった。

ノックアウトマウスの作製・解析を進める一方で、シナプス機能分子を脳神経細胞で迅速に解析する新たな方法論を開発して発表した(Uemura *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016)。CRISPR/Cas9 システムと子宮内電気穿孔法による神経前駆細胞への遺伝子導入技術を組み合わせることにより生きた個体の脳神経細胞で相同組換えによるゲノム編集が可能となった。この技術を用いることで、抗体を用いることなく内在性のシナプス機能分子の局在が解析できるばかりでなく、遺伝子ノックアウト、点変異導入も可能となる。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 19 件)

1. Atsushi Yamagata, Yuri Miyazaki, Norihiko Yokoi, Hideki Shigematsu, Yusuke Sato, Sakurako Goto-Ito, Asami Maeda, Teppei Goto, Makoto Sanbo, Masumi Hirabayashi, Mikako Shirouzu, Yuko Fukata, Masaki Fukata and Shuya Fukai, “Structural basis of epilepsy-related ligand–receptor complex LGI1–ADAM22”, *Nature Communications*, in press
2. Sakurako Goto-Ito, Atsushi Yamagata, Yusuke Sato, Takeshi Uemura, Tomoko Shiroshima, Asami Maeda, Ayako Imai, Hisashi Mori, Tomoyuki Yoshida and Shuya Fukai, “Structural basis of *trans*-synaptic interactions between PTPδ and SALMs for inducing synapse formation”, *Nature Communications*, vol 9, pp. 269, 2018
3. Yusuke Sato, Kei Okatsu, Yasushi Saeki, Koji Yamano, Noriyuki Matsuda, Ai Kaiho, Atsushi Yamagata, Sakurako Goto-Ito, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Keiji Tanaka and Shuya Fukai, “Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30”, *Nature Structural & Molecular Biology*, vol 24, pp. 911-919, 2017
4. Shinsuke Niwa, Fumio Nakamura, Yuri Tomabechei, Mari Aoki, Hideki, Shigematsu, Takashi Matsumoto, Atsushi Yamagata, Shuya Fukai, Nobutaka Hirokawa, Yoshio Goshima, Mikako Shirouzu and Ryo Nitta, “Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation”, *Scientific Reports*, vol 7, pp. 10681, 2017
5. Takeshi Uemura, Tomoko Shiroshima, Asami Maeda, Misato Yasumura, Takashi Shimada, Yuko Fukata, Masaki Fukata and Tomoyuki Yoshida, “*In situ* screening for postsynaptic cell adhesion molecules during synapse formation”, *The Journal of Biochemistry*, mvx030, 2017 (DOI:10.1093/jb/mvx030)
6. Hisashi Mori, Ryogo Wada, Satoyuki Takahara, Yoshikazu Horino, Hironori Izumi, Tetsuya Ishimoto, Tomoyuki Yoshida, Mineyuki Mizuguchi, Takayuki Obita, Hiroaki Gouda, Shuichi Hirono and Naoki Toyooka, “A novel serine racemase inhibitor suppresses neuronal over-activation *in vivo*”, *Bioorganic and Medical Chemistry*, vol 25, pp. 3736-3745, 2017 (DOI: 10.1016/j.bmc.2017.05.011)
7. Sakurako Goto-Ito, Atsushi Yamagata, Tomio S. Takahashi, Yusuke Sato and Shuya Fukai, “Structural basis of the interaction between Topoisomerase IIIβ and the TDRD3 auxiliary factor”, *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 42123, 2017 (DOI:10.1038/srep42123)

8. Jianxing Chen, Atsushi Yamagata, Keiko Kubota, Yusuke Sato, Sakurako Goto-Ito and Shuya Fukai, "Crystal structure of Sec10, a subunit of the exocyst complex", *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 40909, 2017 (DOI:10.1038/srep40909)
9. Shunsuke Kimura, Masami Yamashita, Megumi Yamagami-Kimura, Yusuke Sato, Atsushi Yamagata, Yoshihiro Kobashigawa, Fuyuhiko Inagaki, Takako Amada, Koji Hase, Toshihiko Iwanaga, Hiroshi Ohno and Shuya Fukai, "Distinct roles for the N- and C-terminal regions of M-Sec in plasma membrane deformation during tunneling nanotube formation", *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 33458, 2016 (DOI:10.1038/srep33548)
10. Takeshi Uemura, Takuma Mori, Taiga Kurihara, Shiori Kawase, Rie Koike, Michiru Satoga, Xueshan Cao, Xue Li, Toru Yanagawa, Takayuki Sakurai, Takayuki Shindo and Katsuhiko Tabuchi "Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques", *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 35861, 2016 (DOI:10.1038/srep35861)
11. Tadayuki Shimada, Tomoyuki Yoshida and Kanato Yamagata, "Neuritin mediates activity-dependent axonal branch formation in part via FGF Signaling", *Journal of Neuroscience*, vol. 36, pp. 4534-4548, 2016 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1715-15.2016)
12. *Atsushi Yamagata, Tomoyuki Yoshida, Yusuke Sato, Sakurako Goto-Ito, Takeshi Uemura, Asami Maeda, Tomoko Shirosima, Shiho Iwasawa-Okamoto, Hisashi Mori, Masayoshi Mishina and Shuya Fukai, "Mechanisms of splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion by PTPδ–IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation", *Nature Communications*, vol. 6, pp. 6926, 2015 (DOI:10.1038/ncomms7926)
13. Atsushi Yamagata, Yusuke Sato, Sakuako Goto-Ito, Takeshi Uemura, Asami Maeda, Tomoko Shirosima, Tomoyuki Yoshida and Shuya Fukai, "Structure of Slitrk2–PTPδ complex reveals mechanisms for splicing-dependent *trans*-synaptic adhesion", *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 9686, 2015 (DOI: 10.1038/srep09686)
14. Yusuke Sato, Eiji Goto, Yuri Shibata, Yuji Kubota, Atsushi Yamagata, Sakurako Goto-Ito, Keiko Kubota, Jun-ichiro Inoue, Mutsuhiro Takekawa, Fuminori Tokunaga and Shuya Fukai, "Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity", *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 22, No. 3, pp. 222-229, 2015 (DOI: 10.1038/nsmb.2970)
15. Misato Yasumura, Tomoyuki Yoshida, Maya Yamazaki, Manabu Abe, Rie Natsume, Kouta Kanno, Takeshi Uemura, Keizo Takao, Kenji Sakimura, Takefumi Kikusui, Tsuyoshi Miyakawa and Masayoshi Mishina, "IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours", *Scientific Reports*, vol. 4, pp. 6613, 2014 (DOI: 10.1038/srep06613).
16. Masaru Ikegami, Takeshi Uemura, Ayumi Kishioka, Kenji Sakimura and Masayoshi Mishina, "Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning", *Scientific Reports*, vol. 4, 3976, 2014
17. Kazumi Hirano, Takaaki Kinoshita, Takeshi Uemura, Hozumi Motohashi, Yohei Watanabe, Tatsuhiko Ebihara, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga, Yuusuke Maruyama, Noriko M. Tsuji, Masayuki Yamamoto, Shoko Nishihara and Chikara Sato, "Electron microscopy of

primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM”, *Ultramicroscopy*, vol. 143, pp. 52-66, 2014

18. Ayumi Kishioka, Takeshi Uemura, Fumiaki Fukushima and Masayoshi Mishina, “Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and de novo protein synthesis in the striatum”, *Mol. Brain*, vol. 6, 17, 2013
19. Takashi Hayashi, Tomoyuki Yoshida, Moonjin Ra, Ryo Taguchi and Masayoshi Mishina, “IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway”, *PLoS One*, vol. 8, e66254, 2013

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 深井 周也, 山形 敦史「中枢シナプス形成を誘導するシナプスオーガナイザー複合体の構造基盤」生化学, 88 巻, 2016
2. 山形 敦史, 深井 周也「神経細胞間シナプス形成とその調節メカニズム」日本結晶学会誌, 57 巻, 2015
3. 吉田知之「分子脳科学」化学同人, 22 章「神経回路網形成とシナプス形成」、p249-259, 2015
4. 深井 周也, 植村 健, 吉田 知之、「シナプス形成を誘導する膜受容体の機能と構造」、実験医学, 92-97 頁, 2014
5. 植村 健、「大気圧走査電子顕微鏡を用いたシナプス構造と分子局在の解析」、顕微鏡, vol. 49, No.1, pp.7-9, 2014
6. 植村 健、「シナプスオーガナイザーによるシナプス形成の制御機構」、生物物理, vol.53, No. 2, pp.090-093, 2013 (DOI: <http://doi.org/10.2142/biophys.53.090>)
7. Masayoshi Mishina, Tomoyuki Yoshida, Misato Yasumura and Takeshi Uemura, “Synapse formation in the brain”, *Cortical Development*, pp.229-247, 2013 (DOI: 10.1007/978-4-431-54496-8_11)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 13 件、国際会議 3 件)

1. Shuya Fukai (The University of Tokyo), Structural basis of splice insert-dependent synaptic adhesion mediated by receptor protein tyrosine phosphatase δ , The 47th NIPS International Symposium “Decoding Synapses”, Okazaki Conference Center (OCC), Okazaki, Aichi, 2016 年 10 月 27 日
2. 植村健(信州大学)、小脳シナプス形成を担う GluR δ 2-Cbln1-neurexin 接着分子複合体の構造基盤、BMB2015、神戸国際会議場、2015 年 12 月 1 日
3. 山形敦史(東京大学)、IIa 型受容体チロシンホスファターゼ δ 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ッシング依存的相互作用制御の構造基盤、BMB2015、神戸国際会議場、2015 年 12 月 1 日

4. 吉田知之(富山大学)、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、BMB2015、神戸国際会議場、2015 年 12 月 1 日
5. 深井周也(東京大学)、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、BMB2015、神戸国際会議場、2015 年 12 月 3 日
6. 植村健(信州大学)、小脳シナプス形成を担う GluRδ2-Cbln1-neurexin 接着分子複合体の構造基盤、第53回日本生物物理学会年会、金沢大学、2015 年 9 月 14 日
7. 深井周也(東京大学)、シナプス分化を制御するスプライスインサート暗号の解読メカニズム、第53回日本生物物理学会年会、金沢大学、2015 年 9 月 14 日
8. Tomoyuki Yoshida (Toyama University), Interleukin-1 receptor family proteins function as neuronal synapse organizers, 第 58 回日本神経化学会, APSN-JSN Joint Symposium, 大宮ソニックシティ, 2015 年 9 月 12 日
9. 深井周也(東京大学)、スプライスインサートによるシナプスオーガナイザーの選択的相互作用調節の構造基盤、生理学研究所研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」、生理学研究所、2015 年 6 月 18 日
10. 深井周也(東京大学)、マルチサブユニット繫留因子複合体の全体構造決定へのアプローチ、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 27 日
11. 植村健(信州大学)、C1q ファミリー分子 Cbln1 とその受容体であるグルタミン酸受容体 GluRδ2 と neurexin による小脳シナプス形成の調節、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 26 日
12. 吉田知之(富山大学)、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機構、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 26 日
13. 吉田知之(富山大学)、インターロイキン-1 受容体ファミリー分子群による中枢シナプス形成の調節、生理学研究所研究会「グリア細胞機能から迫る脳機能解明」、生理学研究所、2014 年 10 月 24 日
14. 植村健(信州大学)、シナプス形成を司る GluRδ2-Cbln1-Neurexin 三者複合体の構造解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア、2014 年 6 月 27 日
15. 深井周也(東京大学)、中程度の分解能での結晶構造解析、第 14 回日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア、2014 年 6 月 27 日
16. Shuya Fukai (The University of Tokyo), Structural basis for selective cleavage of M1- and K63-linked polyubiquitin chains by a CYLD deubiquitinase, Cold Spring Harbor Laboratory 2013 meeting - The Ubiquitin Family, Cold Spring Harbor(米国), 2013 年 5 月 14 日

② 口頭発表 (国内会議 5 件、国際会議 1 件)

1. 植村健、鈴木絵美、小池梨絵、川瀬詩織、栗原大河、崎村建司、三品昌美、田渕克彦、小脳顆粒細胞特異的ニューレニントリプルノックアウトマウスの作成と解析、第40回日本神経科学大会、幕張メッセ、2017年7月21日
2. 植村健、森琢磨、栗原大河、里賀みちる、田渕克彦、CRSIPR/Cas9-mediated gene knock-in in single neurons *in vivo*、第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016 年 7 月 21 日
3. 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、富山大学、2015 年 5 月 24 日
4. 三品昌美、池上賢、植村健、岸岡歩、崎村建司、線条体ドパミン D1 受容体は文脈依存怖条件付け学習に必須である、第 37 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 13 日
5. 植村健、佐藤真理、西山英利、須賀三雄、佐藤主税、受容体でコートした磁気ビーズによる初代培養シナプス形成誘導のASEM水中免疫電顕、日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会、幕張メッセ国際会議場、2014年5月11日
6. Chikara Sato, Takaaki Kinoshita, Takeshi Uemura, Kazumi Hiarno, Masaaki Kawata, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Tatsuhiko Ebihara, Mitsuo Suga and Shoko Nishihara, The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Synaptic Induction in Solution, The 2014 Microscopy & Microanalysis meeting, Hartford, CT, Aug. 15, 2014

③ ポスター発表 (国内会議 13 件、国際会議 2 件)

1. 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、パシフィコ横浜、2016 年 7 月 21 日
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”、Okazaki Conference Center、2016 年 10 月 27 日
3. Haruka Munezane, Hiroaki Oizumi, Tomoyuki Yoshida, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo、The identification of the interactor of CLAC-P/Collagen XXV in motor nerve innervation of skeletal muscle、Society For Neuroscience、San Diego、2016 年 11 月 13 日
4. Ayako Imai-Tabata, Kenji Azechi, Hisashi Mori, Masayoshi Mishina, Tomoyuki Yoshida、Expression analyses of Ptpd variants generated by alternative microexons splicing within the extracellular immunoglobulin-like domains、第 40 回日本神経科学大会、幕張メッセ、2016 年 7 月 20 日
5. Gourango Talukdar, Ran Inoue, Tomoyuki Yoshida, Hisashi Mori、Involvement of syntenin-1 in extinction of auditory fear memory、第 40 回日本神経科学大会、幕張メッセ、2016 年 7 月 22 日
6. 植村健、佐藤裕介、山形敦史、吉田知之、後藤桜子、前田亜沙美、城島知子、田渕克彦、

三品昌美、深井周也、小脳シナプス形成を担う GluRδ2-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、パシフィコ横浜、2015 年 7 月 30 日

7. 吉田知之、山形敦史、佐藤裕介、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-PTPδ 複合体の構造基盤、第 38 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2015 年 7 月 30 日
8. 山形敦史、佐藤裕介、後藤(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 PTPδ 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、パシフィコ横浜、2015 年 7 月 30 日
9. 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、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 30 日
10. 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、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 11 日
11. 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、Got1l1 ノックアウトマウスの解析、第 87 回日本生化学会、京都国際会館、2014 年 10 月 18 日
12. 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、大阪、2013 年 9 月 5 日
13. 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、京都、2013 年 6 月 21 日
14. 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、京都、2013 年 6 月 20 日
15. 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、第 36 回日本神経科学大会、京都、2013 年 6 月 20 日

(4)知財出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)

③その他の知的財産権
該当なし。

(5)受賞・報道等

- ①受賞
該当なし

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 自閉症などの神経発達障害に関連するタンパク質 PTPδ と IL1RAPL1/IL-1RAcP が神経細胞

同士を適切につなぐ仕組みを明らかにした成果に関して、2015 年 4 月 24 日にプレスリリースを行い、以下のマスコミ媒体に記事として取り上げられた。

- 東京大学新聞、東大最前線 神経細胞の結合、2015 年 6 月 2 日
- 北日本新聞、富山大・吉田准教授ら神経細胞の連結解明 自閉症治療の足掛かりに、2015 年 5 月 11 日
- 日刊工業新聞、東大・富山大、自閉症など神経発達障害関与たんぱく質の立体構造決定し結合機構を解明、2015 年 5 月 5 日
- QLifePro 医療ニュース、神経発達障害に関わるタンパク質が神経細胞同士を適切につなぐ仕組みを解明―東大ら、2015 年 4 月 30 日
- 中日新聞、富大 自閉症創薬へ道 脳内タンパク質の構造解明、2015 年 4 月 25 日

2. シナプス形成への関与も示唆されている癌抑制タンパク質 CYLD がポリユビキチン鎖を切断するメカニズムを明らかにした成果に関して、2015 年 2 月 17 日にプレスリリースを行い、以下のマスコミ媒体に記事として取り上げられた。

- 日刊工業新聞、東大と群馬大、がん抑制する新たな分子メカニズムを発見―構造変化で結合鎖切断、2015 年 2 月 19 日
- 日経バイオテク、東大の深井准教授ら、癌抑制蛋白質 CYLD がポリユビキチン鎖を切断する機構を解明、2015 年 2 月 19 日
- QLifePro 医療ニュース、がん抑制タンパク質がポリユビキチン鎖を切断するメカニズムを解明―東大、2015 年 2 月 19 日

③その他
該当なし

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開
該当なし

②社会還元的な展開活動

該当なし

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

§ 6 最後に