

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
平成24年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

深井 周也

東京大学放射光連携研究機構・准教授

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

§1. 研究実施体制

(1)「深井」グループ

① 研究代表者: 深井 周也 (東京大学放射光連携研究機構、准教授)

② 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

① 主たる共同研究者: 植村 健 (信州大学医学部、講師(東京大学大学院医学系研究科、助教))

② 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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい

シナプスを介して接続された神経細胞は、無数の神経ネットワークを構築することで、複雑かつ多様な脳高次機能を可能にする。本研究では、神経ネットワークの構築に重要な役割を担うシナプス形成誘導因子の分子実体を明らかにし、その作用機序を原子のレベルで理解することを目的とする。さらに、原子レベルでの理解に基づいてシナプス形成を制御する方法の基盤となる技術を開発することを目指す。

これまでの研究の概要

主たる共同研究者である植村らは、タンパク質を固定したビーズを利用した独自のスクリーニング系を開発し、後シナプス膜に発現するグルタミン酸受容体ファミリーの $\delta 2$ 受容体(GluR $\delta 2$)が分泌タンパク質 Cbln1 を介して前シナプス膜に発現する神経接着分子ニューレキシン(Nrxn)と結合し、小脳でのシナプス形成と成熟を誘導することを世界に先駆けて報告している(Uemura et al., Cell, 2010)。また、植村グループの吉田(さきがけ研究者、研究領域「脳神経回路の形成・動作と制御」)らは、ゼブラフィッシュを用いた知的障害・自閉症の関連タンパク質の機能スクリーニングで単離した IL-1 receptor accessory protein-like 1(IL1RAPL1)が後シナプス膜に発現し、前シナプス膜の受容体型チロシン脱リン酸化酵素 PTP δ と結合して、シナプスの形成と成熟を誘導することを明らかにしている(Yoshida et al., Mol. Cell. Neurosci., 2008; Yoshida et al., J. Neurosci., 2011)。Nrxn や PTP には、多様なアイソフォームやスプライシングバリエーションの存在が知られており、その多様性が特定の神経細胞間のシナプス結合の特異性を決定し、複雑かつ秩序だった神経ネットワークの形成を可能にしていることが想定される。したがって、シナプス形成を誘導するこれらの膜受容体複合体の特異的相互作用のメカニズムを理解することで、神経ネットワークがいかにして形成されるかという根源的な問いに対する一つの答えを得ることができると期待される。また、GluR $\delta 2$ -Cbln1-Nrxn β 複合体や IL1RAPL1-PTP δ 複合体の発見につながった独自のスクリーニング系を応用してシナプス形成シグナルを担う分子を同定し、さらに、シグナリング複合体の結晶構造を決定することによって、シナプス形成を誘導する細胞内シグナル伝達メカニズムを原子のレベルで理解する。

研究成果

平成 24 年度は、(1) GluR $\delta 2$ の N 末端ドメイン (GluR $\delta 2$ -NTD) と Cbln1 の単体構造にもとづいた変異体解析、(2) Nrxn β の細胞外領域 (Nrxn β -ECD) と Cbln1 複合体の高分解能結晶作成のための条件検討、(3) IL1RAPL1 の細胞外領域 (IL1RAPL1-ECD) と PTP δ の細胞外領域 (PTP δ -ECD) それぞれ単体および複合体の高分解能結晶作成のための条件検討、(4) 前シナプスの形成に関わる下流シグナル分子の探索、を行うことを計画した。

(1) については、決定した GluR δ 2-NTD 単体の結晶構造と全長 GluRA2 四量体の結晶構造を重ね合わせて、実際の機能単位である GluR δ 2-NTD 四量体の立体構造モデル(図1)を作製し、機能領域を推測して部位特異的な変異体を作成した。現在、これらの変異体のシナプス形成能を細胞レベルで検討している。

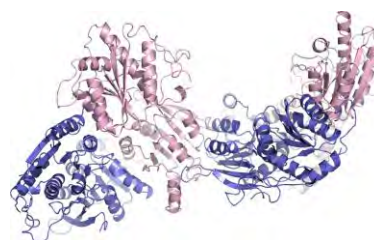


図1. GluR δ 2-NTD の4量体モデル

(2) については、Cbln1-Nrxn1 β -ECD 二者複合体と期待される微小結晶が得られた(図2)。結晶の電気泳動でそれぞれに対応するバンドを確認した。また、予備的な回折実験を行い、格子長が Cbln1 単体の結晶とは異なり、複合体結晶であることが支持された。



図2. Cbln1-Nrxn1 β ECD 複合体と期待される結晶

(3) については、IL1RAPL1-ECDと PTP δ -ECD を含む二者複合体の結晶は得られているが、分解能が構造決定には不十分であった。デハイドレーションなどの処理の検討を行ったが有為な分解能の改善は見られなかった。そこで、PTP δ -ECD を切り詰めることによる結晶の改善を目指し欠失変異体の発現系を構築した。現在、発現精製の検討を行っている。IL1RAPL1 単体については、2.8 Å 分解能の回折データセットを収集することに成功したが、すでに立体構造が決定されている IL1RAP-ECD をレファレンスとした分子置換法によっては、今のところ構造決定には至っていない。

(4) については、GluR δ 2-NTD または IL1RAPL1-ECD を結合させた磁気ビーズをつかって、前シナプス形成の誘導に関わるシグナル分子群の探索を行うと共に、いくつかの候補分子については、一次配列レベルでの機能予測や過去報告された文献による検討を進めた。

今後の見通し

(1)については、GluR δ 2-NTD の機能領域を細胞レベルで検討した後に、Cbln1 との結合を *in vitro* で検討し、結果をまとめて原著論文として発表する予定である。Cbln1 の機能領域については、(2)で述べた通り、Cbln1-Nrxn1 β -ECD 二者複合体と期待される結晶が得られているため、複合体の結晶構造を決定することを優先して研究を進める。回折像に異方性があるが、微小結晶でも 3.0 Å 近い分解能の回折点を確認されているので、数十 μm 程度の大きさの結晶が得られれば構造決定可能な回折データセットが収集できるのでないかと期待している。Nrxn1 β -ECD の結晶構造も既知であるので、分子置換法による構造決定を行う予定である。(3)については、切り詰めた PTP δ -ECD の発現は確認できているので、順次、精製と結晶化を進めていく。(4)については、候補分子にある程度の優勢順位を設けて、*in vitro* 再構成系を用いて免疫沈降法により結合を確認すると共に、順次 siRNA を用いたノックダウンによるシナプス形成誘導への関与を検討する。