

## 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

深井 周也, 山形 敦史

### 1. シナプスオーガナイザー

哺乳類の脳は数千億の神経細胞から構成されているといわれている。神経細胞は、特殊な細胞接着構造であるシナプスを介して互いに接続することで巨大な神経回路を形成し、高次の脳機能を発揮するための情報処理を行う。神経発生過程でのシナプス分化は、シナプスオーガナイザーと呼ばれる膜受容体様接着分子によって誘導される。軸索末端と樹状突起のそれぞれに発現したシナプスオーガナイザーが、細胞外ドメイン (extracellular domain: ECD) を介してトランスシナプティックな選択的相互作用をすることにより、前シナプスと後シナプスの形成を誘導する。シナプスオーガナイザーは、シナプス標的選択の鍵を握るとともに、興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスを調節する役割を担うことも示唆されている。このバランス調節の破綻は自閉症や知的障害などの神経発達障害に関係していると考えられており、実際に、シナプスオーガナイザーをコードする遺伝子の異常が神経発達障害と関連することが報告されている<sup>1-6)</sup>。

前シナプスのオーガナイザーとしてNeurexin (Nrxn) とIIa型受容体チロシンホスファターゼ (receptor protein tyrosine phosphatase: RPTP) の2種類のタンパク質ファミリーが知られている<sup>3, 5, 6)</sup>。Nrxnには $\alpha$ と $\beta$ の2種類のアイソフォーム ( $\alpha$ -Nrxnおよび $\beta$ -Nrxn) が存在する。 $\alpha$ -NrxnのECDは六つのlaminin/Nrxn/sex-hormone-binding globular (LNS) ドメインと三つの上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) 様のドメインを持つが、二つのLNSドメインには含まれたEGF様ドメイン (LNS-EGF-LNS) を一つの構造単位として、3単位の繰り返しとして構成される。一方、 $\beta$ -NrxnのECDは一つのLNSのみで構成さ

れる。 $\beta$ -NrxnのLNSは、 $\alpha$ -Nrxnの6番目のLNSに対応する。Nrxnと相互作用する後シナプスのオーガナイザーとしては、イオンチャネル型グルタミン酸受容体ファミリーのGluD2<sup>7)</sup>、ロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat: LRR) 膜貫通タンパク質 (LRR transmembrane proteins: LRRTM)<sup>8)</sup> とNeurologin (Nlgn)<sup>3)</sup> の各タンパク質ファミリーが知られている。これらのうちGluD2は、分泌タンパク質Cbln1を介してNrxnと相互作用する。

IIa型RPTPは、哺乳類ではPTP $\delta$ , PTP $\sigma$ , LARの3種類がある<sup>5, 6)</sup>。IIa型RPTPのECDは、三つの免疫グロブリン (Ig) ドメイン (Ig1~3) と四つから九つのIII型フィブロネクチン (Fn) ドメイン (Fn1~9) がN末端側から順に並んだ形で構成される (図1A)。IIa型RPTPは、後シナプスの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 (interleukin-1 receptor accessory protein: IL-1RAcP)<sup>9)</sup>、IL-1RAcP様1 (IL-1RAcP-like1: IL-1RAPL1)<sup>10)</sup>、TrkC<sup>11)</sup>、ネトリンGリガンド-3 (Netrin G ligand 3: NGL-3)<sup>12)</sup> や、SlitおよびTrk様 (Slit- and Trk-like: Slitrk) タンパク質ファミリー<sup>13)</sup> と相互作用してシナプス形成を誘導する。

### 2. 選択的スプライシングによるシナプス標的の調節

後シナプスのオーガナイザーの多くは、選択的スプライシングによって生じるNrxnやIIa型RPTPのバリエーションのそれぞれに対して異なる結合能を示す。たとえば、後シナプスのオーガナイザーとの結合能を制御するNrxnのスプライス部位は、 $\alpha$ -Nrxnと $\beta$ -Nrxnに共通のLNSドメインに存在するスプライス部位4 (SS-4) であり、Cbln1-GluD2はSS-4に挿入のあるバリエーションと選択的に結合するのに対して、LRRTMはSS-4に挿入のないバリエーションと選択的に結合する<sup>7, 8)</sup>。一方、後シナプスのオーガナイザーとの結合能を制御するIIa型RPTPのスプライス部位は、Ig2内およびIg2とIg3の境界に存在する (図1A)。この2か所に短いエクソン (ミニエクソン) に対応するペプチドが挿入される。前者はミニエクソンペプチドA (mini-exon peptide A: meA)、後者はミニエクソンペプチドB (mini-exon peptide B: meB) と呼ばれる。PTP $\delta$ の場合は、9残基、6残基、3残基のmeAが挿入されたバリエーション (A9, A6, A3) と欠失したバリエーション (A-) が存在する。さらに各々の

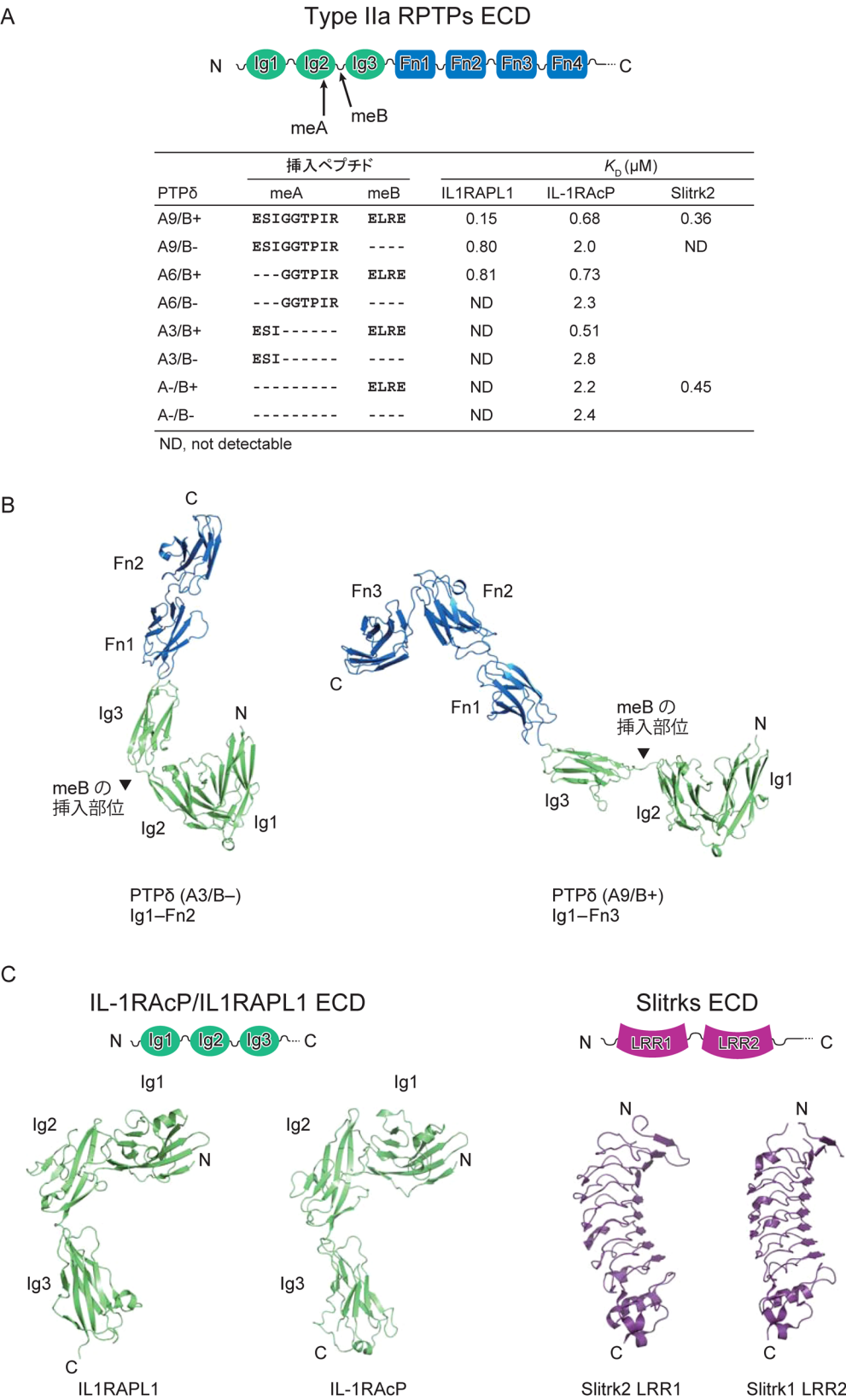
東京大学放射光連携研究機構生命科学部門/分子細胞生物学研究所 (〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1 東京大学分子細胞生物学研究所 本館306)

Structural basis of synaptic organizer complexes for inducing synapse formation in the central nervous system

Shuya Fukai and Atsushi Yamagata (Life Science Division, Synchrotron Radiation Research Organization and Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, IMCB Main Bldg 306, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880391

© 2016 公益社団法人日本生化学会



**図1** IIa型RPTPシナプスオーガナイザー複合体の構成分子とスプライシング依存的な結合特異性  
(A)IIa型RPTP ECDのドメイン構成とPTPδのスプライシング依存的な結合特異性. (B)PTPδのA3/B-およびA9/B+バリエーションのECDの立体構造. (C)IL1RAPL1, IL-1RAcP, SlitrkのECDのドメイン構成と立体構造.

meAのバリエーションに、4残基のmeBが挿入されたバリエーション(B+)と欠失したバリエーション(B-)が存在する。たとえば、同じIL-1RファミリーのIL1RAPL1とIL-1RAcPであっても、結合特異性はバリエーションによって異なる(図1A)<sup>9, 10, 14)</sup>。IL1RAPL1はA9とB+のバリエーション(A9/B+)に最も強く結合し、A6/B+やA9/B-にもやや弱く結合するが、その他のバリエーションとは結合しない<sup>10, 14)</sup>。一方、IL-1RAcPはA9/B+, A6/B+, A3/B+に対してほぼ同じ強さで結合するが、meAやmeBの欠失によって結合が弱くなる<sup>9, 14)</sup>。また、Slitkは、meAの有無や配列とは無関係に、B+だけに選択的に結合する<sup>15, 16)</sup>。

最近、我々の報告も含めて、IIa型RPTPのシナプスオーガナイザー複合体の結晶構造が複数報告され、IIa型RPTPの選択的スプライシングによるシナプス標的の調節メカニズムの構造基盤が明らかになったので本稿で紹介する<sup>14-16)</sup>。

### 3. IIa型RPTPのシナプスオーガナイザー複合体の立体構造

最初に、IIa型RPTPのPTP $\delta$ とその相互作用相手であるIL1RAPL1、IL-1RAcP、Slitk1およびSlitk2それぞれのECDの概観にふれておきたい。図1Bに示すように、PTP $\delta$ のECDは細長く伸びた形をしている<sup>14)</sup>。N末端側に位置するIg1とIg2は、ドメイン間の相互作用により、コンパクトなV字形の構造ユニットを形成する。それに続くIg3は、meBが挿入されない場合はIg2の近傍に位置することになるが、meBが挿入されるとIg1-2のユニットからは空間的に離れて位置することができる。Ig3、Fn1、Fn2は直線状に並ぶが、Fn3の前で折れ曲がる。IL1RAPL1とIL-1RAcPのECDは三つのIgドメインで構成され、L字形に配置されている(図1C)<sup>14)</sup>。PTP $\delta$ との複合体では、先端に位置するIg1がPTP $\delta$ のIg2およびIg3の両方と相互作用する。さらに、IL1RAPL1では、Ig3がPTP $\delta$ のIg1と相互作用する。SlitkのECDは、二つのLRRドメイン(N末端から順にLRR1、LRR2)で構成される(図1C)。LRR1とLRR2ともにリピート数が比較的少ないLRRであり、扇形をしている<sup>15, 16)</sup>。LRR1がIIa型RPTPとの結合を担っており、前シナプスの形成を誘導することができる<sup>15, 16)</sup>。

### 4. meAによる相互作用の調節メカニズム

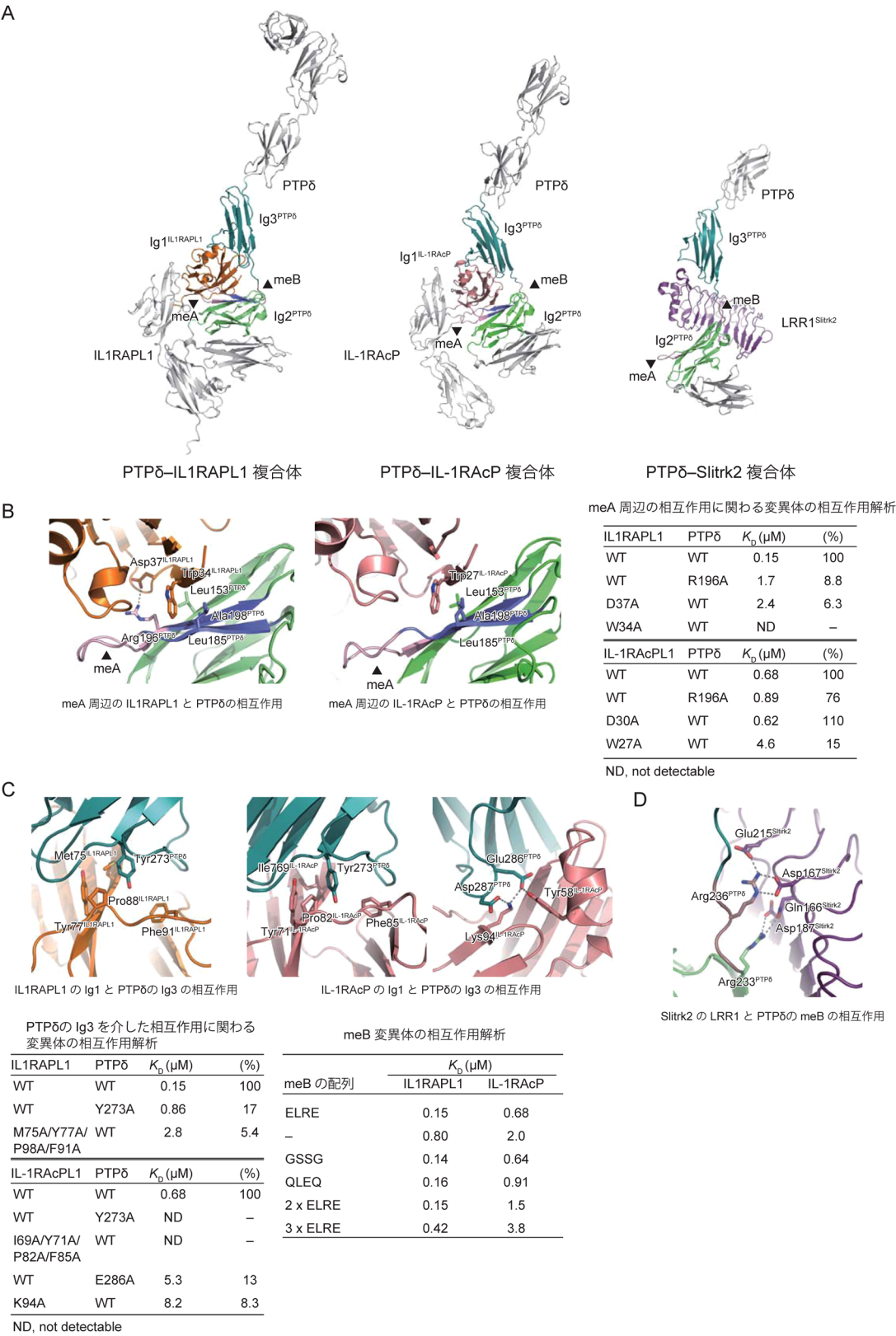
PTP $\delta$ のIg2に挿入されているmeAは、IL1RAPL1やIL-1RAcPのIg1と相互作用する2本の $\beta$ ストランドをつなぐターンを形成する(図2A, B)。この相互作用部位ではIL1RAPL1のTrp34やIL-1RAcPのTrp27がPTP $\delta$ のLeu153、Ala198やLeu185と疎水性の相互作用をしている(図2B)。

それに加えて、IL1RAPL1との結合では、A9やA6のC末端のアミノ酸残基であるArg196とIL1RAPL1のAsp37の間に水素結合が形成されている。Arg196の側鎖の疎水部は、IL1RAPL1のTrp34と相互作用することで疎水性の相互作用を強めている。一方、IL-1RAcPとの複合体では、IL1RAPL1のAsp37に相当するAsp30の近くにPTP $\delta$ のArg196が位置しているものの、側鎖の電子密度がみえておらず、水素結合は形成されていない。結果的に、IL-1RAPL1との複合体でみられたようなArg196による疎水性相互作用の強化は起きていない。

これらの構造的知見は、部位特異的変異体を用いた相互作用解析の結果と一致する(図2B)。IL1RAPL1のW34A変異体は結合を失うのに対して、IL-1RAcPのW27A変異体は親和性が1/7に低下するが結合能は残る。また、PTP $\delta$ のR196A変異はIL1RAPL1との結合を著しく弱めるが、IL-1RAcPとの結合にはほとんど影響しない。同様に、IL1RAPL1のD37A変異体も結合を著しく減じるのに対して、IL-1RAcPのD30A変異体は野生型同様の結合能を持つ。PTP $\delta$ のIg2を介した相互作用は、IL1RAPL1との結合では必須であり、PTP $\delta$ のArg196とIL1RAPL1のAsp37間の水素結合がその調節の鍵を握っている。そのため、Arg196を含むバリエーションであるA9もしくはA6のみが結合能を有する。一方、IL-1RAcPとの結合では、PTP $\delta$ のArg196はその調節には関わらない。したがって、A9、A6、A3のどのバリエーションでも同様の結合能を有する。

### 5. meBによる相互作用の調節メカニズム

PTP $\delta$ がIL1RAPL1やIL-1RAcPと結合する際に、meBはIL1RAPL1やIL-1RAcPと直接相互作用して認識されているわけではない(図2A)。最初にPTP $\delta$ の構造の説明の際にもふれたが、B+とB-のバリエーションの構造を比較してみると、meBの有無でIg1-2のユニットに対するIg3の配置に違いが生じることがわかる(図1B)。PTP $\delta$ のIg3はIL1RAPL1やIL-1RAcPのIg1と相互作用する(図2A, C)。この相互作用は、PTP $\delta$ のTyr273とIL1RAPL1のTyr77あるいはIL-1RAcPのTyr71をコアとした疎水性相互作用である。IL-1RAcPとの結合の場合は、これらのチロシン残基が主鎖との水素結合によって強化されている。さらに、PTP $\delta$ のIg3のGlu286とAsp287がIL-1RAcPのLys94とTyr58のそれぞれと水素結合を形成している。PTP $\delta$ のIg3とIL-1RAcPのIg1との疎水性相互作用に影響するPTP $\delta$ のY273A変異体やIL-1RAcPの疎水性残基群の多重変異体(I69A/Y71A/P82A/F85A変異体)が完全に結合を失うのに対し、IL1RAPL1のIg1との疎水性相互作用に影響する同様の変異体(M75A/Y77A/P98A/F91A変異体)は弱い結合を維持する(図2C)。一方、PTP $\delta$ のIg3とIL-1RAcPのIg1



**図2** PTPδシナプスオーガナイザー複合体の立体構造と相互作用様式 (A)PTPδとIL1RAPL1、IL-1RAcPおよびSlitrk2との複合体の立体構造。(B)meA周辺のPTPδとIL1RAPL1/IL-1RAcPとの相互作用。点線は水素結合。(C)PTPδのIg3とIL1RAPL1/IL-1RAcPのIg1との相互作用とmeBの機能的役割。(D)Slitrk2のLRR1によるmeBの認識。



との水素結合に影響する IL-1RAcP の K94A 変異体や PTP $\delta$  の E286A 変異体では結合が 10 倍近く落ちるが、完全には結合が失われないことから、PTP $\delta$  と IL-1RAcP の結合を強める役割を果たしていると考えられる。構造的な知見とこれらの変異体解析の結果は、PTP $\delta$  の Ig3 との相互作用が IL-1RAcP との結合に必須であるのに対して、IL1RAPL1 との結合には重要ではあるが、必須ではないことを示している。

以上の結果から、meB は、PTP $\delta$  の Ig2 と Ig3 が同時に IL-1RAcP や IL1RAPL1 の Ig1 と相互作用できるように適切に配置させるためのリンカーとして機能することが考えられた。実際に、meB の 4 残基の配列を ELRE から GSSG や QLEQ へと変化させても結合に影響はないが、meB と同じ配列を 3 回繰り返して 12 残基に伸ばした場合には結合能が低下した。これらの結果は meB が結合に適した長さのリンカーであることを支持している。

一方、Slitrk との結合においては、meB は直接の相互作用に参与する (図 2D)。Slitrk1 および 2 との複合体の構造では、LRR1 が meB の Arg236 と水素結合を形成することにより PTP $\delta$  の meB を直接認識している<sup>15, 16)</sup>。Slitrk2 では Asp167 と Glu215 が水素結合を形成している。Arg236 との水素結合は必須であり、PTP $\delta$  の R236E 変異体、Slitrk2 の D167A 変異体は結合を失い、E215A 変異体は解離定数を決定できないレベルに結合能が低下する。

## 6. シナプス形成を誘導する下流の分子シグナル

シナプスオーガナイザーによるシナプス形成の誘導は、シナプスオーガナイザーを発現する非神経細胞やシナプスオーガナイザーをコートしたビーズを初代培養神経細胞と共培養し、前シナプスや後シナプスに特異的な分子マーカーの集積を調べることで確認することができる。このアッセイ法を利用して、本稿で紹介した PTP $\delta$  と IL-1RAcP、IL1RAPL1、Slitrk1 および 2 との複合体構造から明らかになった相互作用が、複合体形成とそれに続くシナプス誘導に重要であることも示されている<sup>14-16)</sup>。結合の強さとシナプス誘導能には正の相関がみられるが、シナプス誘導に必要な結合力にはある一定の閾値が存在することが示唆された。これは、非特異的な結合による誤ったシナプス誘導を防ぐ意味合いがあるものと思われる。シナプスオーガナイ

ザー複合体の形成とそのシナプス誘導能の関係が具体的に理解できた一方で、複合体形成に続くイベントがどのようなものであるかはほとんどわかっていない。下流シグナルも含めた分子機構の理解が今後の課題である。

## 文 献

- 1) Carri , A., Jun, L., Bienvenu, T., Vinet, M.C., McDonell, N., Couvert, P., Zemni, R., Cardona, A., Van Buggenhout, G., Frints, S., Hamel, B., Moraine, C., Ropers, H.H., Strom, T., Howell, G.R., Whittaker, A., Ross, M.T., Kahn, A., Fryns, J.P., Beldjord, C., Marynen, P., & Chelly, J. (1999) *Nat. Genet.*, **23**, 25–31.
- 2) Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., R stam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2008) *Nat. Genet.*, **34**, 27–29.
- 3) Sudhof, T.C. (2008) *Nature*, **455**, 903–911.
- 4) Pinto, D., et al. (2010) *Nature*, **466**, 368–372.
- 5) Takahashi, H. & Craig, A.M. (2013) *Trends Neurosci.*, **36**, 522–5334.
- 6) Um, J.W. & Ko, J. (2013) *Trends Cell Biol.*, **23**, 465–475.
- 7) Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., & Mishina, M. (2010) *Cell*, **141**, 1068–1079.
- 8) Siddiqui, T.J., Tari, P.K., Connor, S.A., Zhang, P., Dobie, F.A., She, K., Kawabe, H., Wang, Y.T., Brose, N., & Craig, A.M. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 7495–7506.
- 9) Yoshida, T., Shiroshima, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Uemura, T., Chen, X., Iwakura, Y., & Mishina, M. (2012) *J. Neurosci.*, **32**, 2588–2600.
- 10) Yoshida, T., Yasumura, M., Uemura, T., Lee, S.J., Ra, M., Taguchi, R., Iwakura, Y., & Mishina, M. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 13485–13499.
- 11) Takahashi, H., Arstikaitis, P., Prasad, T., Bartlett, T.E., Wang, Y.T., Murphy, T.H., & Craig, A.M. (2011) *Neuron*, **69**, 287–303.
- 12) Woo, J., Kwon, S.K., Choi, S., Kim, S., Lee, J.R., Dunah, A.W., Sheng, M., & Kim, E. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 428–437.
- 13) Yim, Y.S., Kwon, Y., Nam, J., Yoon, H.I., Lee, K., Kim, D.G., Kim, E., Kim, C.H., & Ko, J. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4057–4062.
- 14) 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) *Nat. Commun.*, **6**, 6926.
- 15) Um, J.W., Kim, K.H., Park, B.S., Choi, Y., Kim, D., Kim, C.Y., Kim, S.J., Kim, M., Ko, J.S., Lee, S.G., Choi, G., Nam, J., Heo, W.D., Kim, E., Lee, J.O., Ko, J., & Kim, H.M. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 5423.
- 16) Yamagata, A., Sato, Y., Goto-Ito, S., Uemura, T., Maeda, A., Shiroshima, T., Yoshida, T., & Fukai, S. (2015) *Sci. Rep.*, **5**, 9686.

## 著者寸描

## ●深井 周也（ふかい しゅうや）



東京大学准教授（放射光連携研究機構／分子細胞生物学研究所）。博士（理学）。

■略歴 1974年広島県に生る。97年東京大学理学部生物化学科卒業。99年同大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了。同年日本学術振興会特別研究員DC1。2002年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程修了。同年日本学術振興会海外特別研究員。03年東京工業大学

大学院生命理工学研究科助手。06年同大学バイオ研究基盤支援総合センター助教授。07年より現職。

■研究テーマと抱負 構造神経科学，ユビキチンシグナルの構造生物学。

■ウェブサイト <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/>

■趣味 壁登り。

## ●山形 敦史（やまがた あつし）



東京大学助教（放射光連携研究機構／分子細胞生物学研究所）。博士（理学）。

■略歴 1976年三重県に生る。98年大阪大学理学部生物科学科卒業。2000年同大学院理学研究科生物科学専攻修士課程修了。01年日本学術振興会特別研究員DC2。02年大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻博士課程修了。同年米国スクリップス研究所博士研究員。07年より現

職。

■研究テーマと抱負 シナプス形成の構造生物学。

■ウェブサイト <http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/srro/>

■趣味 山登り，キャンプ。