

Title	Structural basis for trans-synaptic cell adhesion mediated by neurexin and neuroligin
Author(s)	田中, 宏樹
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58506">https://hdl.handle.net/11094/58506</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	たなかひろき 田中宏樹
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24221 号
学位授与年月日	平成 22 年 9 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Structural basis for trans-synaptic cell adhesion mediated by neurexin and neuroligin (Neurexin/Neuroliginによるシナプス間細胞接着の構造的基盤)
論文審査委員	(主査) 教授 高木 淳一 (副査) 教授 村上富士夫 教授 難波 啓一 教授 中川 敦史

## 論文内容の要旨

ニューレキシン(NX)、ニューロリギン(NL)は中枢神経系に主に発現する一回膜貫通型の接着蛋白質であり、それぞれシナプスにおいて軸索側と樹状突起側に局在して、シナプス間でヘテロフィリックな細胞間接着を行う。接着複合体を形成したNXとNLは、細胞内ドメインとの相互作用を介して、異なる組み合わせのシナプス関連蛋白質をシナプス近傍に誘導し、シナプス伝達を行う蛋白質集合体の形成を引き起こす。従って、NXとNLはシナプス形成の過程で、シナプスの非対称構造の形成に貢献していると考えられている。

私は、NX・NLのシナプス間での接着の構造的基盤を解明することを目的とし、NX・NLの相互作用可能な最小断片である、 $\beta$ -NXとNLの可溶性細胞外領域を組み換え蛋白質として作成した。そしてこれらの蛋白質を精製した後、その複合体の結晶化を行った。その際私は、この複合体が生理的なbuffer条件下において、 $Ca^{2+}$ を添加するだけという非常にユニークな結晶化条件を見出し、この結晶に対してX線結晶構造解析を行った結果、3.3 Å分解能の立体構造を決定することに成功した。この結晶構造中では、NXとNLは2:2のストイキオメトリーで複合体を形成しており、複合体の相互作用面形成のために $Ca^{2+}$ が必要であることを明らかにした。また、この結晶は生理的なbuffer条件下で得られたことから、NXとNLの複合体は自己の相互作用で容易に集積して三次元結晶を形成する性質を有することが予想されたが、実際にこの複合体は結晶中で二次元的な集積構造を形成していること、それがスタックして三次元結晶を形成していることが明らかになった。結晶中で見いだされたこの二次元集積構造は、それを構成しているNXとNLのC末端が互いに逆方向を向いており、あたかも対向する神経細胞膜から突き出たNXとNLが、シナプス間隙でヘテロフィリックな接着複合体を形成している環境を反映しているかのようであった。それに加え、NXとNLによって形成される二次元集積構造は、両側の細胞膜を繋ぎ止めるだけでなく、シナプス間隙で自己集積することでシナプス構成蛋白質をシナプス近傍へ誘導するという、今まで知られていなかったNXとNLの機能の存在を示唆するものであった。

ただし、この集積構造は、両者の細胞外領域の可溶性断片において形成されたものであり、実際の細胞間でこのような構造を形成するかどうかは不明であった。そこで、NXとNLを発現させた細胞を用いることで、実際に二次元集積構造が形成可能かどうかを検証した。まず、NX1 $\beta$ とNL1を発現する細胞を用いて、両細胞を接触させたところ、接触面にNX1 $\beta$ とNL1が集まることを見出した。そし

て、蛍光(光学)顕微鏡と電子顕微鏡で同一視野を観察するcorrelative light and electron microscopy (CLEM) 法を用いて、NX1 $\beta$ とNLの発現細胞間の接触面を解析した結果、NX1 $\beta$ とNL1の細胞外領域が実際の細胞間スペースにおいて平面上の集合体を形成することを見出した。また、この集合体が細胞膜間で形成されるとそれを挟んだ二枚の細胞膜が一定の距離で近接し、細胞間での集合体が平面的な集積を行っていることが示唆された。この結果は、結晶構造から得られたNXとNLの二次元集積構造の性質と合致しており、結晶構造で見られた相互作用を基にして、NXとNLが実際の細胞膜間で集積構造を形成することが強く示唆された。

私はこれらの研究を通じて、NXとNLが最初にシナプス間隙において二次元集合体を形成し、その後この構造体がシナプス構成蛋白質の集積や再配向のための足場となって細胞内外のシナプス関連蛋白質の集積を誘導し、最終的に前シナプスと後シナプスの分子組成の分化をもたらすという仮説の提唱に至った。

### 論文審査の結果の要旨

ニューレキシン(NX)、ニューロリギン(NL)は中枢神経系に主に発現する一回膜貫通型の接着蛋白質であり、それぞれシナプスにおいて軸索側と樹状突起側に局在して、シナプス間でヘテロフィリックな細胞間接着を行う。本研究では、NX1 $\beta$ とNL1の細胞外可溶性断片の複合体の立体構造解析から、シナプス間に形成される新規の二次元集合構造の存在を予想し、この構造体が実際の細胞膜間で形成可能であることを以下の様に検証した。まず光学顕微鏡によって両細胞の接触面にNX1 $\beta$ とNL1が集まることを確定し、次に電子顕微鏡を用いた解析の結果から、実際の細胞間スペースでNX1 $\beta$ とNL1の細胞外領域が二次元の集積構造を形成することを証明した。この研究は、構造生物学的手法を駆使して、NXとNLがシナプス間隙という細胞の外において形成する二次元集合体が、シナプスそのものの機能を制御する重要なファクターであるという、従来の考えを覆す大胆な仮説の提唱に至ったもので、博士の学位論文に値すると認められた。