

報道機関 各位

2021年5月14日

国立大学法人信州大学

国立大学法人愛媛大学

株式会社島津テクノロジー

シナプス後部基本骨格格子構造の精製に成功

【研究成果のポイント】

神経伝達の要、シナプスでの信号情報処理の中枢であるシナプス後肥厚部内部にある骨格構造の精製に成功。従来のシナプス後部構造モデルを更に進化させた。

【概要】

信州大学医学部 鈴木 龍雄 特任教授、信州大学学術研究院医学系 白井 良憲 助教、信州大学学術研究院医学系/信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所 田渕 克彦 教授、信州大学学術研究院保健学系 寺田 信生 教授、信州大学医学部保健学科/現・酪農学園大学大学院獣医学研究科 亀谷 清和 特任教授、上海交通大学Bio-X研究院 李衛東 (Li Weidong) 教授 (信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所 特別招聘教授)、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 東山 繁樹 教授、株式会社 島津テクノロジー 医薬ライフサイエンス事業部 本田 守、甲斐 力からなる研究グループは、脳内興奮性シナプスのシナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) に内在する骨格構造 (PSD lattice) の精製に成功し、その基本骨格と考えられる PSD lattice backbone 構造の存在を明らかにした。さらに、この PSD lattice backbone 構造は、チュブリンを最大構成成分として含有し、従来からの PSD分子構築モデル (アッセムブリーモデル) で想定されている、複数の鋳型分子 (PSD scaffold/adaptor分子) が構築する3次元構造とは異なるものであることを明らかにした。また、脳組織シナプス後肥厚部にチュブリンが分布することを金標識を用いた包埋後免疫電顕法にて示した。これらの結果に基づいて、チュブリンが主要分子として形成する PSD lattice backbone 構造をプラットフォームとして、複数のシナプス後肥厚部鋳型分子 (PSD scaffold/adaptor分子) やそれらが形成する微小ドメイン (ナノドメイン)、および他のシナプス後部機能分子が結合することによって PSD が構築されるという、PSD の分子構築モデルを提唱した。このモデルは、発表者らが2018年に提唱している、PSD lattice構造と鋳型分子アッセムブリー構造とを合体させた PSD分子構築モデル (“combined scaffold-organized structure and PSD lattice” model) の発展型である。

本成果は、2021年5月18日9時(米国東部時間)に国際学術誌「Life Science Alliance」に掲載されました。

【背景】

神経細胞の接続部位であるシナプスにおいて、シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) は細胞内の化学反応の連鎖により、シナプスでの神経信号の伝わり方をコントロールし、記憶の成立や維持に関わっている。コントロールの仕組みとして、シナプス後部分子の数や、存在場所、化学修飾の他に、シナプス後肥厚部の形や大きさに関係している。シナプスでの信号伝達の仕組みを明らかにするためには、シナプス後肥厚部の構造を明らかにした上で、シナプス後肥厚部構造内における機能タンパク質分子の量や配置の状態などについて知ることが不可欠である。シナプス後肥厚部構造に関しては、1990年代以降発見された数多くの鋳型分子がタンパク質-タンパク質結合を介してシナプス後部構造を作るとする「鋳型タンパク質アッセムブリーモデル」が最近では広く信じられているが、1970年代にすでに電子顕微鏡観察により脳内に発見されているシナプス後肥厚部内格子構造 (PSD lattice) との関係が不明確であった (図1)。2018年に鈴木ら

は PSD lattice と思われる構造の精製に成功し、鑄型タンパク質アッセムブリ構造モデルと PSD lattice 構造とを併合した構造モデル(図 2)を提唱したが、当時の精製法には欠陥があり、精製された PSD lattice の構成タンパク質をすべて明らかにすることはできなかった。今回はより生理的な PSD lattice の精製法の開発に成功し、より精度の高い PSD lattice 構造の解析を行うことができた。

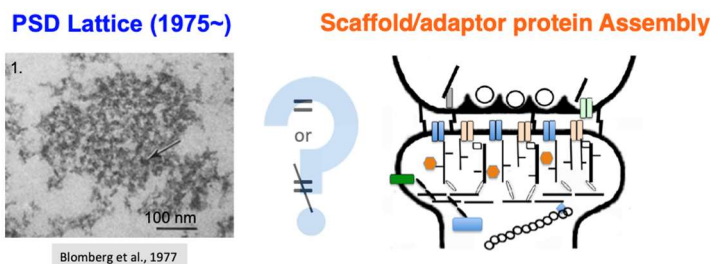


図 1. PSD lattice 構造は scaffold/adaptor protein assembly が形成する構造か？ (図は許可を得て掲載)

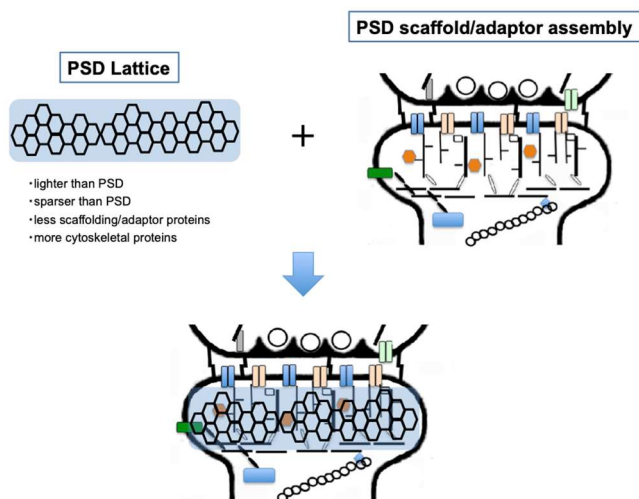


図 2. PSD lattice 構造と PSD scaffold/adaptor protein assembly との合体モデル (Suzuki et al., 2018)

【研究手法・成果】

PSD lattice 精製法の確立

成獣雄ラットから精製したシナプス膜を界面活性剤のオクチルグルコシド (n-octyl- β -D-glucoside) にて可溶化し、ショ糖密度勾配遠心法により、第 11 画分 (沈渣の直上画分) の上方部分と下方部分を回収。それぞれをバッファーで希釈後、更に超遠心して沈渣を得た。この沈渣が PSD lattice 精製物である。最後の超遠心により、第 11 画分に混入していた可溶性タンパク質を取り除いた。解析には主に第 11 画分上方部分からの回収物を用いた。可溶化に 0.75%, 1%, 5% オクチルグルコシドを用いることにより、lean-type と enriched-type の PSD lattice 精製物を回収した。

PSD lattice 精製物の解析

PSD lattice 構造の同定は透過型電子顕微鏡観察 (ネガティブ染色法) により行った。成分タンパク質の同定は、電気泳動、ウエスタンブロッティング、ショットガン質量分析法により行った。代表的成分タンパク質の PSD lattice 構造内分布及び分布量の解析は、金標識を用いた免疫電顕法 (Immunogold negative-staining EM 法) により行った。主要タンパク質成分であるチュブリンのシナプス近傍分布はマウス脳で金標識を用いた包埋後免疫電顕法により観察した。

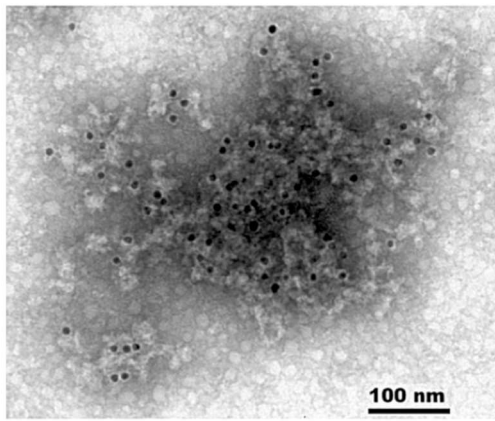


図 3. PSD lattice 上の チュブリンの分布 (金標識)

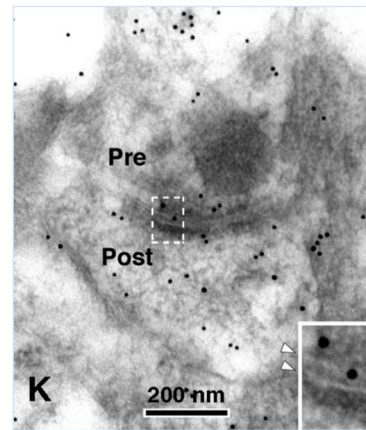


図 4. 大脳皮質シナプス領域のチュブリン分布
中央にシナプス構造がある (金標識)

【波及効果・今後の予定】

PSD の分子構築に関して、今回の研究で PSD lattice 構造と鋳型タンパク質アッセンブリー構造との関係が明らかになった。更に、PSD lattice backbone 構造の構築に関わる主要分子が チュブリンであり、非微小管として存在していることが明らかになった(図 3)。チュブリンのシナプス後肥厚部における存在は長い間コンセンサスとしては受け入れられていなかったように思われるが、今回の金標識を用いた包埋後免疫電顕法での観察により、シナプス後肥厚部内存在が再確認された(図 4)。

今後は、今回の発見をもとに、シナプス後肥厚部の分子構築の様式のさらなる解明、シナプス後肥厚部形成の全課程とその変動・改変の仕組みの解明へと進むことが見込まれる。この研究のさらなる進展に伴い、シナプス後部のタンパク質動態の全貌の解明が進み、同時に病態との関係も明らかになると期待される。

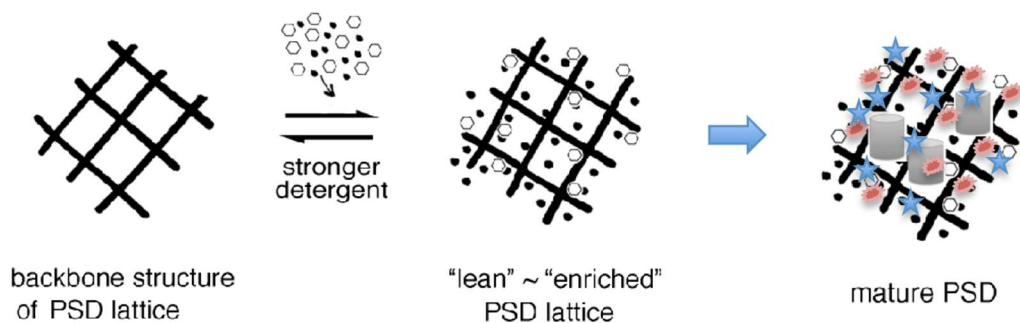


図 5. PSD lattice 構造とその基本骨格、 PSD lattice backbone 構造との関係
「○」は鋳型分子、「・」はその他の機能分子。 backbone 構造は鋳型分子を含まない。

【論文タイトルと著者】

タイトル：**Non-microtubule tubulin-based backbone and subordinate components of postsynaptic density lattices**

著者：Tatsuo Suzuki, Nobuo Terada, Shigeki Higashiyama, Kiyokazu Kametani, Yoshinori Shirai, Mamoru Honda, Tsutomu Kai, Weidong Li, and Katsuhiko Tabuchi

掲載誌：Life Science Alliance

URL: <https://www.life-science-alliance.org>

DOI: 10.26508/lsa.202000945

<参考文献>

T. Suzuki, K. Kametani, W. Guo, and W. Li, 2018. Protein components of post-synaptic density lattice, a backbone structure for type I excitatory synapses. *J Neurochem.* 144:390-407. DOI: 10.1111/jnc.14254

<用語解説>

シナプス：神経細胞の接続部。シナプス前部、後部からなる。前部と後部の間には狭い細胞外空間（シナプス間隙）があり、シナプス前部からシナプス間隙に放出された神経伝達物質がシナプス後部に受け渡される。

神経伝達物質受容情報は主にシナプス後肥厚部における分子間反応、化学反応によって処理され、最終的にシナプス後電位が発生する。シナプス後電位の大きさはシナプス後部における情報処理によって規定される。シナプスには、興奮性伝達を行うものと抑制性伝達を行うものがある。

シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD)：神経伝達の場合であるシナプスの後部側（伝達物質の受け手側）の細胞内、細胞膜直下に存在している特殊な細胞骨格。通常の電子顕微鏡観察で黒くみえる。神経伝達物質を受け取った後の細胞内情報処理の中核となる場となっている。ここでの情報処理により、信号の伝わりやすさが調整され、記憶の形成などに影響を与える。

シナプス後部鋳型分子：postsynaptic scaffold protein. scaffold/adaptor protein とも言う。ほとんどは酵素活性を持たずに、タンパク質結合ドメインのみから形作られているタンパク質。

鋳型タンパク質アッセンブリーモデル：シナプス後肥厚部の分子構築モデル。シナプス後肥厚部内で同定された複数の鋳型タンパク質どうしの結合が組み合わさることによって、シナプス後肥厚部3次元構造が形成されるとするモデル。シナプス後部形質膜に埋め込まれた神経伝達物質受容体や細胞接着分子が、細胞膜直下の PSD-95 タンパク質から成る層に係留され、より深部の Shank 層、それら2層の中間で2層をつなぐ GKAP の層の3層構造で構築される。この3次元3層アッセンブリー構造がシナプス後肥厚部の骨組みとなり、多数の細胞内情報伝達に関わる機能分子がそこに配備されるとするモデル。

PSD lattice：シナプス後肥厚部内の基本骨格となる網目構造で、1970年代には電子顕微鏡によって観察されていたが、それ以上のことは不明であった。

微小管、チューブリン：

微小管 (microtubule) は細胞内骨格を形成する主要な繊維状構造の一つ。 α -チューブリンと β -チューブリン球状タンパク質が重合して順に隣接して並んで形成される直径 25 nm の環状繊維構造。微小管は細胞内環境に依存して重合・脱重合する。神経細胞の樹状突起頭部内 (spine head) の微小管は形成されても短時間しか維持されず、また、温度変化や固定操作などに非常に敏感で壊れやすいので、通常の電子顕微鏡観察では検出が困難であった。シナプス後肥厚部のチューブリンは 3,3'-diaminobenzidine 発色法では 1975 年にすでに検出されていたものの、それ以降長い間、金標識を用いた免疫電顕法で検出報告がなかったため、チューブリンのシナプス後肥厚部内存在は疑わしいとする意見もあった。

<研究内容に関する問い合わせ先>

信州大学医学部 特任教授 鈴木龍雄
〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1
TEL: 0263-37-2683
E-mail: suzukit@shinshu-u.ac.jp

<報道に関する問い合わせ先>

国立大学法人信州大学 総務部総務課広報室
〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1
TEL: 0263-37-3056
E-mail: shinhp@shinshu-u.ac.jp

国立大学法人愛媛大学 総務部広報課広報チーム
〒790-8577 愛媛県松山市道後樋又 10-13
TEL: 089-927-9022
E-mail: koho@stu.ehime-u.ac.jp

株式会社島津テクノロジー 医薬ライフサイエンス事業部
〒604-8436 京都市中京区西ノ京下合町 1
Tel 075-811-3185