

氏 名 Chang WenHsin

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1772 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Structural and functional analysis of cytoplasmic region of  
synapse organizer Neurexin-1 that mediates intracellular  
signals for synapse formation

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘  
教授 富永 真琴  
教授 川口 泰雄  
教授 鈴木 龍雄 信州大学大学院  
教授 田渕 克彦 信州大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Neurexins are synaptic cell adhesion proteins originally isolated as receptors for  $\alpha$ -Latrotoxin, a widow spider venom, that attacks presynaptic terminals. Neurexins consist of three proteins (Neurexin-1, -2, -3), each of which has two promoters that produce longer  $\alpha$ - and shorter  $\beta$ -form. Extracellular function of Neurexins has been intensively studied. They have been shown to form complexes with postsynaptic proteins, including Neuroligins, LRRTMs, and GluR $\delta$ 2, *via* their extracellular domains and induce synapse formation and maturation. Although Neurexins have been expected to be presynaptic, their subcellular localization has not been determined due to the absence of antibodies suitable for immunostaining. In addition, the existence of thousands of isoforms in Neurexins makes it difficult to generate complete knockout of these genes in mice. Thus, loss-of function effect of Neurexins, especially in synaptic transmission, is poorly understood. Furthermore, intracellular signaling by which Neurexins transmit upon induction of synapse formation remains unsolved.

To study the subcellular localization of Neurexins, I first generated antibodies for Neurexins. I immunized peptide with last nine amino acid sequence of mouse Neurexins that conserved among all three Neurexins in rabbits and guinea pigs and obtained those antisera. After confirmation of the specificity of these antibodies by western blotting, I performed pre-embedding immuno electron microscopy in molecular layer of the cerebellum of mice. In this experiment, I detected Neurexin signals specifically in the presynaptic terminals of parallel fibers, suggesting that Neurexins are presynaptic.

To study the Neurexin function in synapses, I knocked down all isoforms of neurexin genes by introduction of shRNAs in cultured mouse hippocampal neurons. I analyzed spontaneous synaptic activity using patch clamp technique in the presence of tetrodotoxin and observed that frequency, but not amplitude, of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) was selectively reduced in neurexin knocked down neurons, suggesting that the function of Neurexins was also presynaptic.

There was no clue to solve the intracellular signaling for Neurexins. For this, I first studied the structure of cytoplasmic tail (C-tail) of mouse Neurexin-1. A computer program, called "PSIPRED", predicted that this region was intrinsically disordered. I confirmed this with a mouse recombinant Neurexin-1 C-tail protein using circular dichroism spectroscopy. Intrinsically Disordered Proteins (IDPs) are known to exhibit molecular interaction based on the property of amino acids constituting the region, and phosphorylation tends to affect the interaction. The

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

C-tail of Neurexin-1 is enriched by basic amino acids. I examined the interaction with phospholipids constituting plasma membrane by dot blot using GST-fusion Neurexin-1 C-tail protein as a probe. In this experiment, I found that Neurexin C-tail bound negatively charged phospholipids including PI(4,5)P2. There are eight serines in Neurexin-1 C-tail. To test the effect of phosphorylation of these serines, I examined the phospholipid interaction with phospho-mimic mutant of Neurexin-1 C-tail of which serines were mutated to aspartic acids. In this experiment, I found that the phospho-mimic mutation in the last three serines sufficiently abolished the interaction. To identify the kinase responsible for this phosphorylation, I transfected HEK293T cells with mouse Neurexin constructs and treated with chemicals to induce kinase activities. I monitored the phosphorylation by western blotting with phos-tag gels in which phosphorylation was detected by mobility shift of Neurexin-1 band. In this experiment, I found that Protein kinase C (PKC), but not Protein kinase A (PKA) nor  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), phosphorylated these serines. I performed the same experiment in mouse cultured cortical neurons and confirmed that this phosphorylation was conserved in neurons.

To study the effect of this phosphorylation on synapse formation, I employed HEK293T-neuron co-culture assay. Neurons do not form synapses onto non-neuronal cells, such as HEK293T cells. But when HEK293T cells were transfected with mouse Neuroligin-1, co-cultured neurons form synapses onto HEK293T cells. This artificial synapse formation was abolished when neurexins were knocked down in co-cultured neurons. Superinfection of lentivirus expressing wild-type mouse Neurexin-1 in this co-cultured neurons rescued the artificial synapse formation. But infection with phospho-mimic mutant Neurexin-1 failed to rescue the synapse formation. These results suggest that phosphorylation of Neurexin-1 negatively regulates synapse formation.

In conclusion, by using multidisciplinary approaches including immuno electron microscopy, electrophysiology, biochemistry and molecular biology, I determined the localization and function of Neurexins and the regulatory mechanism relevant to synapse formation. I found that Neurexins were specifically localized at presynaptic terminals and they contributed to the neurotransmitter release from presynaptic terminals. The C-tail of Neurexin-1 bound phosphatidylinositol and this binding was abolished by the PKC phosphorylation of the last three serines. And this reduced the synaptogenic activity of Neurexin-1.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

Neurexin ファミリーのタンパク質は、もともとシナプス前終末をターゲットとするクモ毒である  $\alpha$ -Latrotoxin の受容体候補として単離された細胞接着因子であり、後にシナプス後部タンパク質 Neuroligin、LRRTM、GluR $\delta$ 2 などと複合体を形成することが示され、シナプスの形成および成熟に寄与していると考えられている。これらの実験結果から、Neurexin は、シナプス前終末に局在するタンパク質であると予想されるが、細胞内レベルでの局在を同定できる抗体が存在しなかったため、正確な局在の確定には至っていなかった。また、Neurexin ファミリーは数多くのアイソフォームが存在するため、全てのアイソフォームを除去したノックアウトマウスが作成されておらず、シナプスにおける機能が十分に解析されていなかった。また、シナプスの形成と成熟を誘導するための細胞内シグナルに関しては、ほとんど知見が得られていなかった。

出願者 Chang WenHsin 氏は、マウス Neurexin の全てのアイソフォームで共通の C 末端の 9 アミノ酸配列に対するウサギ及びモルモットのポリクローナル抗体を作成し、マウスの小脳分子層の pre-embedding 免疫染色標本の電子顕微鏡観察により、Neurexin タンパク質がシナプス前終末側に特異的に局在することを見出した。また、Neurexin の全てのアイソフォームの網羅的機能抑制を目的として、共通の配列を標的とした shRNA をマウス海馬培養神経細胞に導入し電気生理学的解析を行った結果、Neurexin のノックダウンでは、微小興奮性シナプス後電流の頻度が低下していること、すなわち、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出効率が低下していることを見出した。

次のステップとして、Neurexin を介したシナプス形成・成熟の細胞内シグナルについて手掛かりを得るため、Chang WenHsin 氏は、Neurexin-1 の細胞内領域の構造を、コンピュータによる予測及び円偏光二色性実験により解析し、この領域が天然変性タンパク質の特徴を有することを見出した。さらに、この領域は陽性に荷電した塩基性アミノ酸に富むことから、陰性に荷電した細胞膜分子との静電学的相互作用を予測し、細胞膜を構成するリン脂質との結合をドットプロットにより解析した。その結果、PI(4,5)P2 等の陰性に荷電したイノシトールリン脂質と結合することを見出した。Neurexin-1 の細胞内領域には、8 個のセリンが存在するため、これらのセリンを陰性に荷電したアスパラギン酸に置換して、リン酸化状態を模倣した変異タンパクを作成して解析したところ、C 末端側から数えて 3 個のセリンの陰性荷電化変異が、これらリン脂質との結合を阻害することを見出した。また、HEK293T 細胞、及び培養神経細胞でのリン酸化誘導実験により、Protein Kinase C がリン酸化に関わっていることを見出した。続いて、Neuroligin-1 発現 HEK293T 細胞と神経細胞の共培養実験により Neurexin を介したシナプス形成能の解析を行い、この部位のリン酸化によりシナプス形成能が低下することを見出した。

以上、本研究は、免疫電子顕微鏡観察、電気生理学的記録、多岐に渡る生化学的および分子生物学的研究手法による解析を組み合わせ得られた実験結果を統合して、Neurexin が、シナプス前終末に局在し伝達物質の放出に寄与することを確定し、さらに、細胞内 C 末端領域がイノシトールリン脂質に結合すること、Protein Kinase C によるリン酸化により

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

その結合が阻害され、シナプス形成能が低下すること等、機能の分子機構を明らかにしたもので、その科学的価値は高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は、全員一致で本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。