

氏 名 Gopal Pramanik

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1777 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 Analysis of Cell Adhesion Molecules in Synapse Formation  
and Synaptic Transmission

論文審査委員 主 査 教授 深田 正紀  
教授 吉村 由美子  
教授 鍋倉 淳一  
教授 服部 光治 名古屋市立大学大学院  
教授 田淵 克彦 信州大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Synaptic cell-adhesion molecules (CAMs) play a critical role in synapse formation and synaptic transmission. Numerous synaptic CAMs have been identified, but their physiological functions remain incompletely understood. For better understanding of the function of CAMs in synapses, I focused on two important synaptic CAM families, Calsyntenins and leukocyte common antigen-related receptor protein tyrosine phosphatases (LAR-RPTPs), and analyzed their functions in synapse formation and synaptic transmission.

Calsyntenins are postsynaptic membrane proteins consisting of cytoplasmic calcium binding domains and extracellular cadherin binding domains. Calsyntenin family comprises Calsyntenin-1, Calsyntenin-2 and Calsyntenin-3. To study the effect of Calsyntenins on synapse formation, I first employed HEK293T-neuron co-culture assay. In this experiment, I found Calsyntenin-3, but not Calsyntenin-1 and Calsyntenin-2, induced synapse formation on HEK293T cells from co-cultured rat/mouse neurons when it was overexpressed in HEK293T cells. Next I knocked down Calsyntenins in neurons and examined the effects on synapse formation and synaptic transmission. Simultaneous knockdown of Calsyntenin-1, Calsyntenin-2 and Calsyntenin-3 (CST-TKD) in mouse cultured hippocampal neurons reduced synapse density both in inhibitory and excitatory synapses. CST-TKD reduced the expression of presynaptic marker synapsin-1, inhibitory presynaptic marker GAD67, excitatory presynaptic marker VGLUT1, inhibitory postsynaptic marker gephyrin, but not excitatory postsynaptic marker homer-1. However, single knockdown of any Calsyntenin did not affect synapse formation, suggesting that Calsyntenins are

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

important for the maintenance of synapses. By using electrophysiological methods, I showed that CST-TKD in mouse cultured hippocampal neurons reduced the frequency, but not amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs). Under my experimental conditions, the frequency and amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were unaltered. CST-TKD reduced the frequency but increased amplitude of mIPSCs in mouse layer 2/3 pyramidal neurons in somatosensory cortex. In contrast, CST-TKD did not alter the frequency and amplitude of mEPSCs in layer 2/3 pyramidal neurons. The paired pulse ratio (PPR) of IPSCs was unaltered in CST-TKD in layer 2/3 pyramidal neurons in somatosensory cortex. Next, I identified  $\alpha$ -Neurexin as a binding partner for Calsyntenin-3 from rat brain extracts by using affinity chromatography, liquid chromatography and mass spectrometry. Importantly, simultaneous knockdown of Neurexin-1, Neurexin-2, and Neurexin-3 in mouse cultured hippocampal neurons inhibited Calsyntenin-3-induced synapse formation in artificial synapse formation assay. Collectively, these results suggest that three Calsyntenins regulate synapse formation and inhibitory synaptic transmission in concert with  $\alpha$ -Neurexin.

LAR, PTP $\delta$  and PTP $\sigma$  are the members of (LAR-RPTPs) family proteins, known to be involved in synapse formation and synaptic transmission. They have common domain structures which include extracellular three immunoglobulin like domains, fibronectin type III domains, and transmembrane regions. Because extracellular domains of synaptic CAMs play an important role in their cell adhesive activity. I explored the binding protein to the extracellular domain of PTP $\sigma$ . Here, I identified Glypican-4 (GPC-4) as a binding partner of PTP $\sigma$  from rat brain extracts by affinity chromatography, liquid chromatography and mass spectrometry. GPC-4 is a member

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

of vertebrate six glypicans that are heparan sulfate (HS) proteoglycans and binds to the plasma membrane through glycosylphosphatidylinositol anchor. I found that GPC-4 bound to LAR, PTP $\delta$  and PTP $\sigma$  and that PTP $\sigma$  interacted with only proteolytically cleaved forms of GPC-2, GPC-3, GPC-4 and GPC-6, but not full length glypicans. The interaction between PTP $\sigma$  and GPC-4 depends on HS-binding because mutation of HS-binding residues (KKKK) in PTP $\sigma$  to PTP $\sigma$ -AAAA or (SSS) in GPC-4 to GPC-4-AAA abolished their interaction. Leucine-rich repeats transmembrane 4 (LRRTM4) induces excitatory synapse formation in artificial synapse formation assay using rat cultured hippocampal neurons, however, knockdown of PTP $\sigma$ , but not LAR, inhibited this LRRTM4-induced synaptogenic activity. Wild-type PTP $\sigma$ , but not PTP $\sigma$ -AAAA (HS-binding deficient mutant), rescued the effect of PTP $\sigma$ -knockdown on LRRTM4-induced synapse formation. Knockdown of PTP $\sigma$  in rat cultured hippocampal neurons reduced both frequency and amplitude of mEPSCs. Wild-type PTP $\sigma$ , but not HS-binding mutant PTP $\sigma$ -AAAA reversed the effect of PTP $\sigma$  knockdown on excitatory synaptic transmission. In contrast, knockdown of PTP $\delta$  in rat cultured hippocampal neurons reduced the frequency, but not amplitude of mIPSCs. Knockdown of LAR and PTP $\sigma$  did not affect the frequency and amplitude of mIPSCs. In addition, knockdown of PTP $\sigma$  did not affect the PPR of EPSCs. Together these results suggest that presynaptic PTP $\sigma$  and GPC-4 regulate excitatory synapse formation and synaptic transmission in HS-dependent manner. Electrophysiological data suggests that PTP $\delta$  may regulate inhibitory synaptic transmission. Further, LRRTM4 may induce excitatory synapse formation through LRRTM4, PTP $\sigma$  and GPC-4 complex.

In conclusion, I showed that postsynaptic Calsyntenis redundantly regulate

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

inhibitory synapse formation and synaptic transmission through interaction with presynaptic  $\alpha$ -Neurexin. In addition, I found that presynaptic PTP $\sigma$  forms complex with presynaptic glypican-4 and postsynaptic LRRMT4, and modulates excitatory synaptic transmission. These results should contribute to understanding the molecular mechanisms for synapse formation and synaptic transmission in mammalian brain.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

シナプス接着分子は、シナプス形成やシナプス伝達の制御において中心的な役割を担うと考えられている。最近の研究により、数多くのシナプス接着分子が見出されているが、未だその全容は明らかにされていない。Pramanik 氏は、シナプス接着分子 Calsyntenin ファミリーと leukocyte common antigen-related receptor protein tyrosine phosphatase (LAR-RPTP) ファミリータンパク質に焦点を当て、それらのシナプス形成やシナプス伝達の制御における生理機能を解明することを目的として研究を行った。

Calsyntenin は大脳皮質や海馬で強く発現する細胞接着分子で、哺乳類では Calsyntenin-1, -2, -3 という 3 つのファミリー分子が知られている。Calsyntenin はシナプス後部に局在するが、シナプスにおける機能はあまりよくわかっていなかった。Calsyntenin のシナプスにおける役割を解明するために、マウス Calsyntenin-1, -2, -3 遺伝子をそれぞれ導入した HEK293T 細胞をラットもしくはマウス培養海馬神経細胞と共培養したところ、Calsyntenin-3 を導入した HEK293T 細胞の表面に、共培養した神経細胞の軸索末端が集積し、シナプス様構造の形成がみられた。一方、shRNA により、Calsyntenin-1, -2, -3 遺伝子をマウス培養海馬神経細胞でノックダウンしたところ、それぞれ単独のノックダウンでは有意なシナプス密度の変化は認められなかったが、3 つの遺伝子を同時にノックダウンしたところ興奮性及び抑制性シナプスの密度の減少がみられた。また、Calsyntenin-1, -2, -3 を同時にノックダウンしたマウス培養神経細胞及び大脳皮質第 2/3 層の神経細胞では、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の頻度の低下がみられたが、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) に関しては、頻度も振幅も変化が見られなかった。さらに、ラットの脳抽出液からの親和性沈降と質量分析法により、Calsyntenin-3 がシナプス接着分子  $\alpha$ -Neurexins と間接的に複合体を形成することを見出した。shRNA により培養神経細胞で Neurexin-1, -2, -3 を同時にノックダウンしたところ、Calsyntenin-3 によって誘導されるシナプス形成が阻害された。以上により、Calsyntenin は、 $\alpha$ -Neurexins を介してシナプス形成の誘導及び抑制性シナプス機能の制御に寄与していることが示唆された。

シナプス前終末に局在する LAR-RPTP ファミリータンパク質は、LAR, PTP $\delta$ , PTP $\sigma$  の 3 つがあり、シナプス形成やシナプス伝達に関与することが知られている。Pramanik 氏は、ラットの脳抽出液から親和性沈降と質量分析法により、glypican-4 (GPC-4) が PTP $\sigma$  と相互作用することを見出した。また、PTP $\sigma$  と GPC-4 との結合は、ヘパラン硫酸との結合を介していることを見出した。シナプス後部に局在するシナプス接着分子の一つ leucin-rich repeats transmembrane 4 (LRRTM4) は、興奮性シナプスの形成を誘導することが知られているが、ラット培養海馬神経細胞において、shRNA によって PTP $\sigma$  をノックダウンすると、LRRTM4 によるシナプス形成が起こらないことが判明した。また、PTP $\sigma$  のノックダウンでは、mEPSC の頻度と振幅の両方が低下していた。野生型の PTP $\sigma$  は、PTP $\sigma$  のノックダウンでみられた mEPSC の低下をレスキューしたが、ヘパラン硫酸結合配列に変異を加えた PTP $\sigma$  は、レスキューしなかった。これらのことから、PTP $\sigma$  はヘパラン硫酸を介した GPC-4 との結合に

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

より興奮性シナプスの形成およびシナプス伝達を制御していることが示唆された。さらに、LRRTM4 は、PTP $\sigma$  /GPC-4 との結合を介して興奮性シナプスの形成を誘導していると考えられた。

本研究は、「シナプス接着分子によるシナプス形成とシナプス伝達機構の解明」を研究テーマに掲げ、分子細胞生物学、生化学や電気生理学の手法を駆使して行われたものであり、当該分野の発展に大いに貢献するものと考えられる。したがって、本研究が学位論文としてふさわしいものであることに、審査委員全員の意見が一致した。