

TSUBAME 共同利用 令和6年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 シナプスタンパク質間相互作用の解析
英文: Analysis of Synaptic Protein-Protein Interactions

利用課題責任者
Sotaro Ichinose

所属

Gunma University Graduate School of Medicine, Department of Anatomy, Maebashi, JAPAN

邦文抄録(300 字程度)

本研究では、抑制性シナプス形成に必須なシナプスオーガナイザー Teneurin-2 (TEN2) の機能を解析した。TEN2 は微小管+端追跡タンパク質 EBs と相互作用し、抑制性後シナプスへの微小管リクルートを促進する。さらに、TSUBAME4.0 による解析と実験的検証により、TEN2 は EBs 以外の微小管関連タンパク質や微小管そのものとも結合することが明らかとなった。これらの知見は、TEN2 が細胞外では接着分子として、細胞内では微小管と直接結合することで、抑制性シナプスにおけるタンパク質集積を制御するハブとして機能していることを示唆する。

英文抄録(100 words 程度)

In this study, we investigated the function of Teneurin-2 (TEN2), a synaptic organizer essential for inhibitory synapse formation. We found that TEN2 interacts with microtubule plus-end tracking proteins (EBs) to facilitate microtubule recruitment to inhibitory postsynapses. Computational analysis using TSUBAME4.0 and subsequent experimental validation revealed that TEN2 also binds to other microtubule-associated proteins and directly to microtubules themselves. These findings suggest that TEN2 functions as a molecular hub at inhibitory synapses, coordinating protein accumulation by acting as an adhesion molecule via its extracellular domain and directly associating with microtubules via its intracellular domain.

Keywords: 5つ程度

Neuronal cell biology, synaptogenesis, protein-protein interactions, microtubules, adhesion molecules

背景と目的

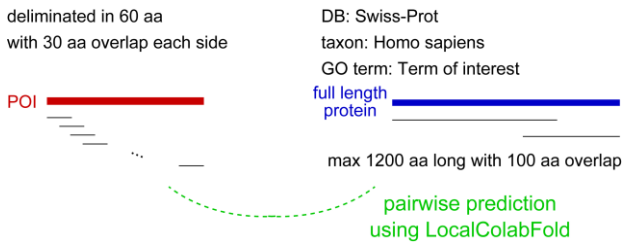
神経細胞はシナプスを介して相互に情報を伝達し、シナプス受容体を通じた情報交換により、複雑な神経回路を形成している。これらの受容体は、脳機能の維持に不可欠な要素である。興奮性後シナプスは一般にアクチンに富む樹状突起スパイン上に形成されるのに対し、抑制性シナプスはアクチンおよび微小管(MT)を含む樹状突起シャフト上に直接形成される。この構造的特徴が非シナプス領域と類似していることから、抑制性シナプスには特定のタンパク質が選択的に集積し、それがシナプスの特異性を担っていると考えられている。ここで重要となる問いは、「抑制性シナプス特異的なタンパク質は、どのようにしてその局所集積を達成しているのか」である。

細胞は主に、モータータンパク質による微小管依

存的輸送によってこれを実現しようとしているが、輸送経路に関与するタンパク質の種類は、集積対象となるタンパク質に比べて極めて限られており、異なるタンパク質の組み合わせによって機能が制御されていると推察される。しかし、実際にどのようなタンパク質間相互作用が存在するのかについては、ほとんど明らかになっていない。その主因として、実験的手法による解析のスループットが極めて低く、解析のボトルネックとなっている点が挙げられる。そこで本研究では、このスループットの限界を補うために、スーパーコンピュータ TSUBAME を用いたタンパク質構造ベースの相互作用予測シミュレーションを行い、得られた高スコアの候補を実験的に検証するアプローチを試みた。

概要

タンパク質構造予測ソフトウェアの一つである AlphaFold2 を用いて、関心のあるタンパク質 (POI: Protein of Interest) とその候補結合相手タンパク質群との全組み合わせについて複合体構造の予測を行った (下図)。予測された構造において高いスコアを示したペアは、実際にタンパク質複合体を形成している可能性が高いと考えられるため、これらを候補として実験的検証を行う。



結果および考察

Teneurin-2 の結合部位を特定するため、60 アミノ酸ごとに区切った断片を作成し、それぞれを微小管関連タンパク質群との複合体構造として予測し、スコアを算出した (図 A)。その結果、高スコアを示す結合候補として、GABARAPL、DLC、 β -tubulin、ARF3/6、IFT70A/B が同定された (図 B)。このうち、これまでに我々が細胞生物学的手法により解析してきた Teneurin-2 の機能との関連から、 β -tubulin との結合が最も重要であると考えられた。 β -tubulin は重合することで微小管を形成することが知られている。

そこで、Teneurin-2 と微小管との直接的な相互作用

について実験的に検証を行った。その結果、顕微鏡観察および生化学的手法の両方により、両者の結合状態が確認された (図 D, E)。以上のことから、本シミュレーション手法はタンパク質間相互作用の検出に有効であり、さらに Teneurin-2 と微小管の生物学的に意義の高い直接的相互作用を提唱することができた。

加えて、シミュレーションによって予測された結合構造を解析したところ、Teneurin-2 は微小管重合に重要な領域に結合していることが示唆された (図 C)。このことから、Teneurin-2 が微小管の重合調節機能を有する可能性があり、今後のさらなる実験により、新たな分子機能の解明につながることを期待される。

まとめ、今後の課題

TSUBAME を用いたタンパク質構造ベースの相互作用予測シミュレーションは、実験的手法による解析のスループットの低さを補完し、今後のタンパク質間相互作用解析を加速させる手段として期待される。我々の実行環境においては、特に multiple sequence alignment (MSA) の処理に多くの時間を要しており、この部分のアルゴリズムを改良することで、さらなる高速化が可能と考えられる。また、質量分析法などの実験的なハイスループット手法と本手法を組み合わせることで、両者における非特異的な検出を相互に補正し、高精度な相互作用解析が可能になると期待される。今後はこのような統合的アプローチの展開も視野に入れて取り組んでいきたい。

