

[課程—2]

## 審査の結果の要旨

氏名 朱 宰 烈

本研究は脳のシナプス形成に重要な役割を演じていると考えられる細胞接着分子である neurexin(NRXN)と分泌蛋白である cerebellin precursor protein(Cbln) の相関関係を明らかにするため蛋白質の結合を生化学的に解析を試みたものであり下記の結果を得ている。

1. NRXN variant - NRXN1 $\alpha$ , NRXN1 $\beta$ , NRXN2 $\beta$ , NRXN3 $\beta$ と splice segment 4 が deletion された NRXN1 $\alpha$ (-S4), NRXN1 $\beta$ (-S4), NRXN2 $\beta$ (-S4), NRXN3 $\beta$ (-S4)を作成した。そして Cbln1, Cbln2, Cbln4, NRXN1 $\alpha$ -ECD, NRXN1 $\beta$ -ECD, NRXN2 $\beta$ -ECD, NRXN3 $\beta$ -ECD, NRXN1 $\alpha$ (-S4)-ECD, NRXN1 $\beta$ (-S4)-ECD, NRXN2 $\beta$ (-S4)-ECD, NRXN3 $\beta$ (-S4)-ECD 蛋白を free style 293 細胞に発現させ精製した。

2. Magnetic beads にそれぞれ精製した Cbln1, Cbln2, Cbln4 の蛋白を結合させた後この beads を培養された脳皮質ニューロンに入れて培養させた。その後 bassoon, VGLUT1, VGAT の抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Cbln1、Cbln2 を結合させた beads では bassoon signal が集まる事を観察した。VGLUT1 は Cbln1 を結合させた beads のみ弱く signal が集まる事を見られたが VGAT は Cbln1, Cbln2 を結合させた beads で強く signal が集まる事を見られた。しかし、Cbln4 を結合させた beads では signal が集まる事を観察できなかった。

3. Cbln1, Cbln2, Cbln4 よる bassoon, VGLUT1, VGAT の signal の集まりが NRXN1 $\beta$ -ECD 蛋白によって suppression される事を確認するため magnetic beads にそれぞれ精製した Cbln1, Cbln2, Cbln4 の蛋白を結合させた beads と精製した NRXN1 $\beta$ -ECD 蛋白を培養された脳皮質ニューロンに入れて培養させた。その後 bassoon, VGLUT1, VGAT の抗体を用いて免疫染色を行ったところ、NRXN1 $\beta$ -ECD 蛋白を入れた group で Cbln subtype による bassoon, VGLUT1, VGAT の signal の集まりが suppression された事を観察した。

4. Cell surface binding assay を用いて NRXN variant と Cbln subtype が directly interaction する事を確認した。培養された HEK293T cell に NRXN1 $\alpha$ , NRXN1 $\beta$ , NRXN2 $\beta$ , NRXN3 $\beta$  と splice segment 4 が deletion された NRXN1 $\alpha$ (-S4), NRXN1 $\beta$ (-S4), NRXN2 $\beta$ (-S4), NRXN3 $\beta$ (-S4)の DNA を transfection させた後それぞれ精製した Cbln1, Cbln2, Cbln4 蛋白を入れた。その後免疫染色を行ったところ、splice segment 4 を含む NRXN variants は Cbln1, Cbln2, Cbln4 蛋白と結合する事を見られたが splice segment 4 が deletion された NRXN variants は結合できなかった。Cbln1, Cbln2 は NRXN variants と強く結合しましたが Cbln4 は非常に弱く結合する事を見られた。

5. Pull-down assay を用いて NRXN variants と Cbln subtype 蛋白が directly interaction する事を確認した。Protein A beads に精製した HA-Cbln1, HA-Cbln2, HA-Cbln4, NRXN1 $\alpha$ -ECD-Fc, NRXN1 $\beta$ -ECD-Fc, NRXN2 $\beta$ -ECD-Fc, NRXN3 $\beta$ -ECD-Fc, NRXN1 $\alpha$ (-S4)-ECD-Fc, NRXN1 $\beta$ (-S4)-ECD-Fc, NRXN2 $\beta$ (-S4)-ECD-Fc, NRXN3 $\beta$ (-S4)-EC-Fc 蛋白を入れて反応させた後 HA と Fc 抗体を用いて western blot を行ったところ、splice segment 4 を含む NRXN variants のみで Cbln subtype と結合する事を見られた。一方 Cbln4 と splice segment 4 を含む NRXN variants との結合力は非常に弱かった。

6. 分子間相互解析装置(Biacore)をもちいて相互作用の速度論的解析(Surface Plasmon Resonance assay)を行ったところ、NRXN variants と Cbln subtype との結合親和力( $K_D$  value)は次の通りだった。Cbln1 は NRXN1 $\beta$ , NRXN1 $\alpha$ , NRXN2 $\beta$ , NRXN3 $\beta$ の順番で、Cbln2 は NRXN1 $\beta$ , NRXN1 $\alpha$ , NRXN3 $\beta$  and NRXN2 $\beta$  順番で結合親和力ある事を明らかにした。

以上、本論文は細胞接着分子である NRXN の variants と分泌蛋白 Cbln subtype との結合は脳皮質ニューロンのシナプス形成を誘導する事を明らかにした。特に NRXN variants と Cbln1, Cbln2 は強い結合力を確認したが Cbln4 は非常に弱い結合力を持っている事を明らかにした。本研究は NRXN variants と Cbln

subtype の結合は脳ニューロンのシナプス形成の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。