

特集 2 シナプスオミクスが切り開くシナプスの生化学的多様性と動物行動・病態解明への新展開**3. 近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法を応用した脳内のシナプスプロテオーム**松林 潤平¹⁾, 高野 哲也^{1, 2)}

抄録: 脳内のシナプスは情報伝達の基盤であり、多様な高次脳機能の制御に不可欠な役割を担っている。複雑な脳機能の理解や精神・神経疾患の病態解明には、異なる脳領域に特異的なシナプスの構成タンパク質成分や分子メカニズムを同定することが重要である。しかし、従来の生化学的な解析手法では、生体脳から特定のシナプスを選択的に分離し、その詳細な分子情報を得ることは困難であった。このような背景のなか、近年、近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法を応用した生体内 BioID 法が開発され、脳内の特定シナプスや細胞接着部位のプロテオームを高い空間解像度で網羅的に解析することが可能となっている。本稿では、進展を続ける BioID 法による脳内のシナプスプロテオーム研究の最新成果を概説し、筆者らが新たに開発した生体内 BioID 技術を用いたアストロサイト-神経細胞シナプス間の新規分子メカニズムの解明についても紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 36 (2) : 80-85, 2025

Key words : synapse, BioID, proteomics, neuron, astrocyte, TurboID, Split-TurboID**はじめに**

ヒトの脳は約 860 億個の神経細胞からなり、約 150 兆個のシナプスを介して複雑なネットワークを形成している。またシナプスは、アストロサイトなどのグリア細胞とも三者間シナプスとよばれる細胞接着構造を形成し、細胞間ネットワークを構築している。このように、シナプスは神経回路形成にきわめて重要であり、記憶、学習、感情といった多様な脳機能の制御に不可欠である。近年、シングルセル RNA シークエンス (single-cell RNA sequencing : scRNA-seq) や RNA スコープなどの網羅的遺伝子計測技術、および脳の透明化技術や神経活動イメージング技術などの画像解析技術の進展により、神経細胞およびグリア細胞の多様性が次第に明らかになってきている。驚くべきことに、シナプスにはその微小な構造にもかかわらず何千ものタンパク質が集積し、構成分子は神経細胞の種類により大きく異

なっている¹⁸⁾。そのため、シナプス特有の構成分子に起因する分子メカニズムの違いが、多様な脳機能や細胞間相互作用の制御に大きく影響すると考えられる。一方で、シナプスタンパク質の機能破綻が自閉スペクトラム症やアルツハイマー病、パーキンソン病など多くの精神・神経疾患の病態と関連することが報告されている¹¹⁾。これらのことから、脳機能を深く理解するためには、特定の神経細胞間や神経-グリア細胞間で形成されるシナプスの構成分子群を同定し、シナプス特有の分子メカニズムを解明することが大きな課題の一つとなっている。

従来、シナプスタンパク質は細胞分画法、密度勾配遠心法 (シナプトソームなど)、免疫沈降法、アフィニティークロマトグラフィーなどの生化学手法を用いて分離した後に、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (liquid chromatography-mass spectrometry : LC-MS/MS) を用いたプロテオーム解析により同定されてきた。これらの手法により、

Synaptic proteome in the brain applying the biotin ligase-based proximity labeling (BioID)

1) 九州大学高等研究院脳機能分子システム分野/九州大学生体防御医学研究所 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学病院地区 九州大学生体防御医学研究所) Junpei Matsubayashi, Tetsuya Takano : Kyushu University Division of Molecular Systems for Brain Function, Institute for Advanced Study, Medical Institute of Bioregulation. 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

2) 国立研究開発法人科学技術振興機構 さきがけ (〒102-0076 東京都千代田区五番町 7) Tetsuya Takano : PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan. 7 Gobancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0076, Japan

【高野 哲也 E-mail : tetsuya.takano@bioreg.kyushu-u.ac.jp】

近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法

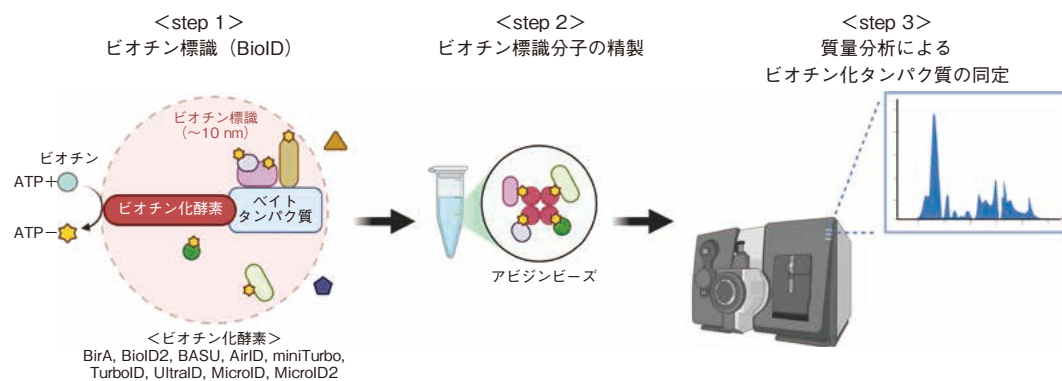


図1 BioID 法の実験ワークフロー

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 受容体, postsynaptic density protein 95 (PSD95), ゲフィリンといった主要なシナプスタンパク質が発見されている⁵⁾。しかし, 従来の解析手法では細胞種選択的にシナプスを単離することが難しく, 十分な空間情報を保ちながら特定のシナプス領域の構成分子群を解析することは困難であった。この課題を克服する手法として, 近年, 生体内近位依存性ビオチン標識 (in vivo biotin ligase-based proximity labeling: iBioID) 法を応用した脳内のシナプスプロテオーム解析技術が注目されている⁵⁾。この新しい分子探索技術により, 生体脳の特定のシナプスや細胞間接着部位 (シナプス間隙など) の構成分子を高い空間解像度で選択的かつ網羅的に同定することが可能となった。本稿では, iBioID 法の基本原理およびシナプス研究における BioID 法の活用例を解説する。さらに, 筆者らが開発した生体内細胞表面 iBioID 技術およびこの技術を用いて解明された三者間シナプスの新規分子メカニズムについても紹介する。

1. 近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法

Proximity labeling (PL) 技術は, タンパク質間相互作用の解析に広く利用されており, 近年では空間プロテオーム解析のための有力な手法としても注目されている。また, PL 技術は培養細胞や生体組織の特定の細胞種や細胞内領域に存在するタンパク質成分を空間的に標識し, 網羅的に同定することを目的とした新しい分子探索技術である。代表的な PL 技術として, 大腸菌由来の変異型ビオチン化酵素 BirA^{*}-R118G を用いた BirA 系 (BioID 法) や大豆由来の変異型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ

(ascorbate peroxidases: APEX) または西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) を用いたペルオキシダーゼ系が確立されており, 反応性は異なるものの標的タンパク質の近傍に存在するタンパク質をビオチン標識する。標識されたビオチン化タンパク質はアビジンビーズなどを用いて精製し, 質量分析法により同定することが可能である^{4, 9, 13)}。BioID 法においては, BirA をベイトタンパク質に融合し細胞に導入すると, ビオチン存在下で BirA が中間体の反応性ビオチン (biotinoyl-5'-AMP) を産生し, 約 10 nm 範囲内のタンパク質のリジン残基にビオチンを共有結合する。現在, BioID 法に用いられるビオチン化酵素には由来種や変異型を含む多様な改良型が開発されており, 代表的なものには BioID2⁸⁾ や BASU¹⁴⁾, miniTurbo²⁾, TurboID²⁾, UltraID¹⁰⁾, MicroID¹⁰⁾, MicroID2⁶⁾, AirID⁷⁾ などがある (図1)。これらの酵素は大きさや反応温度, 至適 pH, ビオチン標識速度などが異なり, 研究デザインに応じて適した酵素を選択することが可能である。さらに, 生体組織と BioID 法を組み合わせた生体内 BioID (iBioID) 法が開発され, 従来手法では得られなかった生体適合性, 高い検出感度, 空間解像度によるプロテオーム解析を実現している^{15, 17)}。神経科学分野においても, iBioID 法の登場により異なる脳領域を空間的に限定しながら解析することが可能となり, 脳機能に関する新たな知見が次々と見いだされている。

2. PL 技術を応用した脳内のシナプスおよびシナプス間隙選択的な空間プロテオーム解析

脳内のシナプスは, 興奮性シナプスと抑制性シナプスの2種類に大別され, 脳領域や神経細胞種に応じてその機能や構造的特徴, 構成分子など多様に

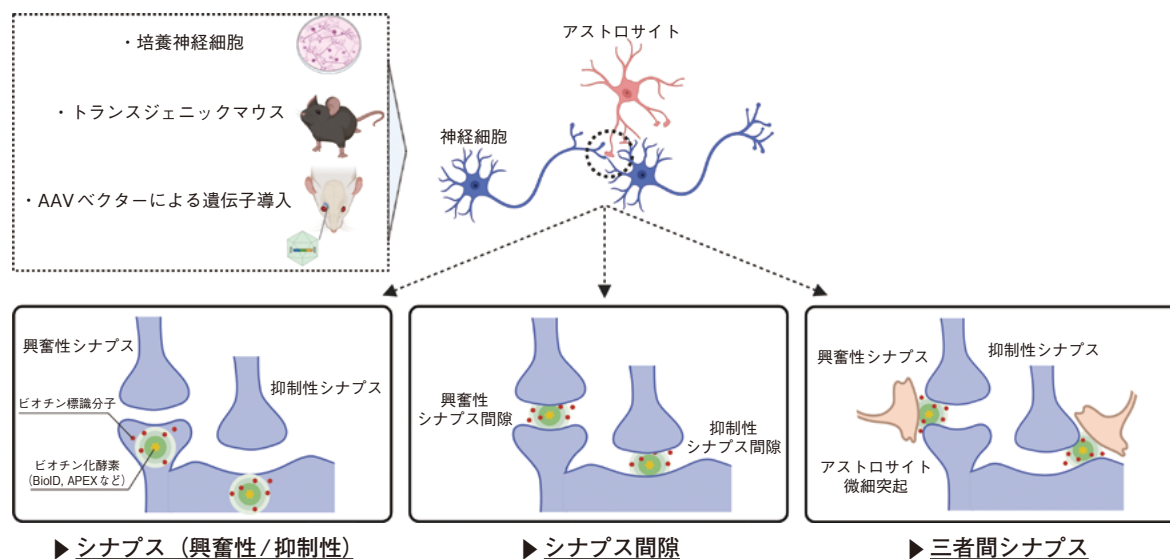


図2 BioID法を応用したシナプスプロテオーム解析

示す。しかし、従来の細胞分画法では、生体脳に存在する興奮性シナプスと抑制性シナプスを区別して単離し、機能するタンパク質成分を解析することは困難であった。興味深いことに、最近、fluorescence activated synaptosome sorting (FASS) 法を用いたプロテオーム解析によりマウス脳組織に存在する1,800以上ものタンパク質成分が18種類の異なるシナプスをそれぞれ特徴づけていることが示された¹⁸⁾。他方、BioID法はその高い空間分解能から、近年では生体脳の特定の種類のシナプスを標的としたプロテオーム解析にも応用されている^{15, 17)}。この手法では、BioID酵素を目的のシナプス種に発現するマーカー分子や局在分子（ベイトタンパク質）に融合し、アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus: AAV）やトランスジェニックマウスを用いて遺伝子導入を行うことで、標的シナプス近傍のタンパク質を選択的かつ網羅的にビオチン標識することが可能となる（図2）。実際に、AAVを用いて興奮性シナプスの足場タンパク質 PSD-95 または抑制性シナプスの足場タンパク質ゲフィリンと BirA を融合させたマウス脳におけるプロテオーム解析では、121種類の興奮性シナプスタンパク質や118種類の抑制性シナプスタンパク質が同定された¹⁷⁾。さらに、このプロテオーム解析により、新たに抑制性シナプスタンパク質 inhibitory synaptic factor 1 (InSyn1) も同定され、抑制性シナプスの形成や機能制御に関与することが示された¹⁷⁾。

また、これまでにシナプス間隙を対象としたプロテオーム解析も行われている。シナプス間隙は、神経細胞間に形成される約20 nmの空間であり、神

経情報伝達の架け橋として重要な役割を担う。多くのシナプス間隙タンパク質は膜表面で機能し、シナプス伝達効率や細胞間相互作用の制御に寄与している。そのため、これらの分子メカニズムの解明は、神経伝達や神経回路形成の制御機構の理解に不可欠である。こうした背景から、BioID法やペルオキシダーゼ系を用いたビオチン標識技術はシナプス間隙のタンパク質を同定するための強力なツールとして注目されている（図2）。実際に、既知のシナプス間隙分子 leucine-rich repeat transmembrane neuronal 1 (Lrrtm1), Lrrtm2, slit and NTRK-like family member 3 (Slitrk3), neuroligin-2 (Nlgn2) などに HRP を融合させプロテオーム解析した研究では、培養皮質神経細胞の興奮性シナプス間隙から199、抑制性シナプス間隙から42のタンパク質が同定された¹²⁾。また、抑制性シナプス間隙から新たに同定された MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2 (Mdga2) は、細胞接着分子 Nlgn2 をシナプス後部にリクルートすることで抑制性シナプスの形成を制御していることが示された¹²⁾。さらに、興奮性シナプスの細胞接着分子 synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM1) に HRP を融合させプロテオーム解析した研究では、培養皮質神経細胞の興奮性シナプス間隙から受容体型チロシンファクターゼ receptor protein-tyrosine phosphatase ζ (R-PTP ζ) が新たに同定された³⁾。

3. BioID 法を応用した脳内の三者間シナプスを標的とした空間プロテオーム解析

アストロサイトは脳内にもっとも多く存在するグリア細胞の一種であり、神経細胞の保護や栄養供給、血液脳関門の形成といった中枢神経系における支持機能を担うことが知られている。一方、電子顕微鏡や二光子顕微鏡を用いた研究から、アストロサイトの微細突起の先端がシナプスと接続していることが示された。この神経細胞-アストロサイト間で形成されるユニークな細胞接着構造は三者間シナプスとよばれ、アストロサイトは三者間シナプスを介してシナプスの形成や成熟、除去などに寄与することがわかりつつある^{1, 15, 16)}。実際に、三者間シナプスの機能的および構造的破綻は自閉スペクトラム症や統合失調症、躁うつ病、さらにはアルツハイマー病といった多くの精神・神経疾患に関与することが示唆されている¹⁾。しかし、三者間シナプスを対象とした網羅的な分子解析はまだ行われておらず、これまでは個別の研究によって分子メカニズムの解明が進められてきた。このような背景から、筆者らは脳内の三者間シナプスをはじめとする特定の細胞種の細胞膜表面や細胞間隙に存在するタンパク質を標的とする新たな iBioID 技術として TurboID-surface と Split-TurboID を開発した^{15, 16)}。TurboID-surface は、高活性型 BioID 酵素である TurboID に細胞膜へ選択的に局在する glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを融合させたもので、AAV を用いた遺伝子導入法より脳組織中の特定の細胞種の細胞膜表面におけるプロテオーム解析が可能となる^{15, 16)}。Split-TurboID は、TurboID-surface を N 末端断片 (N-Turbo) と C 末端断片 (C-Turbo) に分割し、これら断片を異なる細胞種の細胞膜に別々に発現させると、それらの細胞間の接着部位でのみ TurboID 再活性化する技術である^{15, 16)}。これにより、三者間シナプスのような異種細胞間の相互作用部位を空間的に限定し、タンパク質を網羅的にビオチン標識することが可能となった (図 2)。実際に、TurboID-surface をアストロサイト選択的な AAV ベクターを用いてマウス大脳皮質に発現させプロテオーム解析を行ったところ、アストロサイトの微細突起上からシナプスタンパク質を含む 178 種類の細胞膜タンパク質が同定された¹⁵⁾。また、Split-TurboID の各断片をマウス大脳皮質の神経細胞およびアストロサイトにそれぞれ発現させプロテオーム解析を行ったところ、三者間シナプスの構成タンパク質成分として 118 種類ものタンパク質を同定した¹⁵⁾。さらに、

興味深いことに、新たな三者間シナプス構成分子として同定された細胞接着分子 neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) は、従来の定説と異なり、神経細胞よりもアストロサイトに高発現していることが判明した¹⁵⁾。さらに、分子機能解析の結果、アストロサイト特異的 NRCAM は神経細胞の NRCAM とのホモフィリック結合を介して抑制性シナプスの足場タンパク質であるゲフィリンをリクルートし、抑制性シナプスの形成と機能を制御していることが示された¹⁵⁾。このように、TurboID-surface や Split-TurboID を用いた革新的なアプローチによって、特定の細胞種や異種細胞間の局所領域を標的とした空間プロテオーム解析が実現し、神経細胞とアストロサイトの複雑な相互作用の分子基盤に関する理解が飛躍的に進展する可能性が開かれた。

おわりに

本稿で述べたように、iBioID 法の応用により、脳内シナプスのプロテオーム解析は従来の技術を超える高い空間解像度での解析が可能となった。この技術は、特定のシナプスや三者間シナプスに関する分子メカニズムを詳細に解明するだけでなく、脳を構成する多様な神経細胞 (グルタミン酸作動性神経細胞, GABA 作動性神経細胞, ドーパミン作動性神経細胞など)、ミクログリア、オリゴデンドロサイトといった細胞種の複雑な相互作用の理解を促進するものである。このように個々の細胞種レベルでの分子マッピング技術の精密化は、患者ごとの神経ネットワークの特異性に基づいた治療法の開発に貢献する可能性を秘めている。これにより、より効果的で副作用の少ない個別化医療の実現が期待される。

さらに、このような空間プロテオーム解析の進展は、脳機能に関する理解を飛躍的に深め、多様な研究分野への応用可能性を広げることが期待される。たとえば、精神疾患の病態メカニズムを解明するためには、シナプスレベルのプロテオーム情報に加え、病態に関連する単一細胞レベルの遺伝子情報や神経ネットワーク情報を統合した大規模データ解析が重要である。この 3 層にわたる統合的なアプローチにより、各神経回路の動的変化、遺伝子発現の制御機構、それに基づく分子メカニズムの空間的理解が大幅に進展し、精神疾患の根本的な病態メカニズムの理解と、より効果的な治療戦略の確立に寄与する。また、神経活動データや脳波をシナプスプロテオーム情報と統合することにより、行動や認知プロセス

の分子基盤の理解が加速し、脳内の情報処理の複雑さをより深く理解することが可能となる。さらに、AI および機械学習技術を活用することで、膨大なプロテオームデータから病態の原因となる機能分子や構成分子の変動を予測するモデルを構築し、疾患メカニズムの迅速な解明や新たな治療ターゲットの発見が期待される。さらに、シナプスパターンの異常を早期に検出することで、病態発症の予防にも貢献できるものと期待される。

以上のように、iBioID 法を基盤とした革新的なプロテオーム・アプローチは、脳の高次機能や病態生理の理解に新たな知見を提供するものである。これらの技術の進展により、複雑で多様な脳機能の全容が解明され、精神・神経疾患に対するより効果的な診断および治療法を開発するための強固な基盤が築かれることが期待される。

本論文に記載した筆者らの研究についてすべて倫理的配慮を行っている。本論文の執筆に際し、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Allen NJ and Eroglu C (2017) Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron*, 96 : 697-708.
- 2) Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, et al (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, 36 : 880-887.
- 3) Cijssouw T, Ramsey AM, Lam TT, et al (2018) Mapping the proteome of the synaptic cleft through proximity labeling reveals new cleft proteins. *Proteomes*, 6 (4) : 48.
- 4) Han S, Li J and Ting AY (2018) Proximity labeling : spatially resolved proteomic mapping for neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*, 50 : 17-23.
- 5) Ito Y, Nagamoto S and Takano T (2024) Synaptic proteomics decode novel molecular landscape in the brain. *Front Mol Neurosci*, 17 : 1361956.
- 6) Johnson BS, Chafin L, Farkas D, et al (2022) MicroID2 : a novel biotin ligase enables rapid proximity-dependent proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 21 : 100256.
- 7) Kido K, Yamanaka S, Nakano S, et al (2020) AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. *Elife*, 9 : e54983.
- 8) Kim DI, Jensen SC, Noble KA, et al (2016) An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol Biol Cell*, 27 : 1188-1196.
- 9) Kotani N, Gu J, Isaji T, et al (2008) Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 : 7405-7409.
- 10) Kubitz L, Bitsch S, Zhao X, et al (2022) Engineering of ultraID, a compact and hyperactive enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells. *Commun Biol*, 5 : 657.
- 11) Lepeta K, Lourenco MV, Schweitzer BC, et al (2016) Synaptopathies : synaptic dysfunction in neurological disorders - a review from students to students. *J Neurochem*, 138 : 785-805.
- 12) Loh KH, Stawski PS, Draycott AS, et al (2016) Proteomic analysis of unbounded cellular compartments : synaptic clefts. *Cell*, 166 (5) : 1295-1307. e21.
- 13) Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, et al (2012) Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol*, 30 : 1143-1148.
- 14) Ramanathan M, Majzoub K, Rao DS, et al (2018) RNA-protein interaction detection in living cells. *Nat Methods*, 15 : 207-212.
- 15) Takano T, Wallace JT, Baldwin KT, et al (2020) Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition in vivo. *Nature*, 588 : 296-302.
- 16) Takano T and Soderling SH (2021) Tripartite synaptomics : cell-surface proximity labeling in vivo. *Neurosci Res*, 173 : 14-21.
- 17) Uezu A, Kanak DJ, Bradshaw TW, et al (2016) Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. *Science*, 353 : 1123-1129.
- 18) van Oostrum M, Blok TM, Giandomenico SL, et al (2023) The proteomic landscape of synaptic diversity across brain regions and cell types. *Cell*, 186 (24) : 5411-5427. e5423.

■ ABSTRACT

Synaptic proteome in the brain applying the biotin ligase-based proximity labeling (BioID)Junpei Matsubayashi¹⁾, Tetsuya Takano^{1,2)}

- 1) *Kyushu University Division of Molecular Systems for Brain Function, Institute for Advanced Study, Medical Institute of Bioregulation*
2) *PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan*

Synapses are fundamental for the formation of neural circuits in the brain and are essential for regulating higher brain functions such as learning, memory and emotions. Moreover, synapses exhibit a diversity of structures and functions across different brain regions. To gain a deeper understanding of complex brain functions and elucidate the pathological mechanisms underlying psychiatric and neurological disorders, it is crucial to characterize the protein components and distinctive molecular mechanisms specific to each synapse types. However, conventional biological approaches have struggled to spatially isolate specific synapses from different brain regions and comprehensively analyze their protein components. To address this challenge, biotin ligase-based proximity labeling (BioID) has recently been applied to spatial proteome analysis in the brain, leading to the development of the “*in vivo* BioID (iBioID)” technique. iBioID enables comprehensive proteome analysis of specific synapse types and synaptic clefts in the brain with high spatial resolution. In this brief review, we summarize recent advancements in iBioID-based synaptic proteome techniques in the brain. Additionally, we introduce a novel molecular mechanism in astrocyte-neuronal synapses using our newly developed iBioID technique.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 36 (2) : 80–85, 2025)
