

研究報告書

研究課題名：
シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 深田 正紀

(研究期間: 2005 年 10 月 1 日 ~ 2009 年 3 月 31 日)

研究報告書

1. 研究課題名

シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析

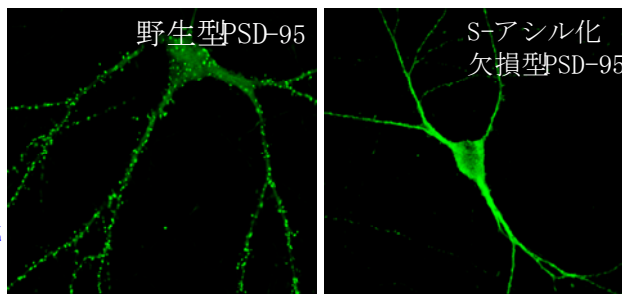
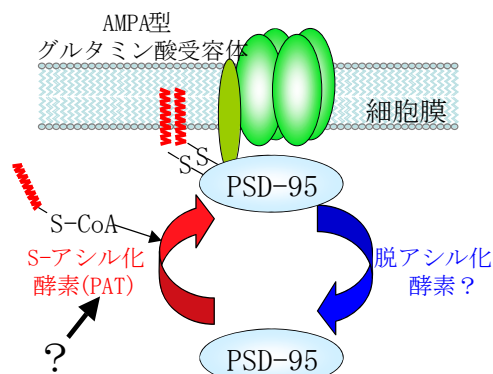
2. 氏名

深田 正紀

3. 研究のねらい

蛋白質はリン酸化やユビキチン化、脂質修飾などの翻訳後修飾により、遺伝情報を超えて新たな機能や制御機構が付加され、複雑な細胞機能を制御する。中でもパルミトイル化に代表される S-アシル化修飾は多くの機能蛋白質にみられる脂質修飾であり、蛋白質を特定の膜ドメインに輸送し、その機能をダイナミックに制御する。S-アシル化は脂質修飾の中でも唯一、外界刺激依存的に可逆的に代謝回転する脂質修飾であり、生体の恒常性や可塑性を精密に制御していると考えられてきた。しかし、S-アシル化サイクルの発見以来 30 年以上その責任酵素は同定されず、また有効な測定、可視化技術がなかったため、S-アシル化サイクルの動態、およびその制御機構は長らく不明であった。私は酵母の遺伝学的知見を基に S-アシル化に関わると考えられる S-アシル化酵素群(全23種類)をゲノムワイドに探索し単離した。また、神経シナプスでイオンチャンネルの機能発現を制御する蛋白質 PSD-95 を特異的に S-アシル化する酵素(P-PAT)を同定した。

本研究ではこの新規 S-アシル化(パルミトイル化)酵素群を手がかりとして、PSD-95 などのシナプス機能に関わる蛋白質のパルミトイル化動態を測定、可視化する技術を創出する。さらにはパルミトイル化酵素の活性制御機構を解明することによりパルミトイル化修飾反応の全容解明を目指すとともに、特に神経シナプス機能制御機構との関連を明らかにする。



S-アシル化 (パルミトイル化) 脂質修飾は PSD-95のシナプス後膜への局在に必要である。

4. 研究成果

1) パルミトイル化動態の可視化技術の創出

S-アシル化(パルミトイル化)反応は外界刺激によりダイナミックに制御され、神経シナプス機能など様々な細胞状態を規定している。しかし、パルミトイル化の検出法にはこれまでラジオアイソトープを用いた代謝ラベリング法以外には有効な方法が開発されていなかった。本研究では、生化学的手法と生細胞イメージング法を組合わせて、細胞内のパルミトイル化動態のダイナミックな変動を検出する実験系を構築した。

1) ABE(Acyl-Biotinyl-Exchange)法による神経細胞におけるパルミトイル化蛋白質の精製法の確立

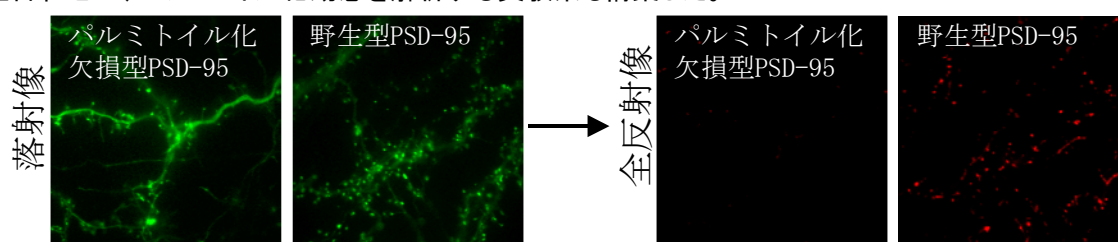
ごく最近、酵母を用いた解析から酵母細胞内のパルミトイル化蛋白質を精製する手法として ABE法が報告された(Roth et al. Cell 2005)。私は ABE法に改良を加え、海馬培養神経細胞から再現性良く高感度にパルミトイル化蛋白質を精製する技術を確立した。この手法により神経機能蛋

白質のパルミトイル化レベルを簡便にまた網羅的にモニタリングすることが可能となった。さらに電気泳動上の移動度からPSD-95 パルミトイル化の絶対量を測定できることを見出した。興味深いことに、シナプスの約2%を占める足場蛋白質PSD-95のパルミトイル化レベルは神経活動を遮断した際に、2時間以内に大きく(stoichiometrical)上昇することが明らかになった。一方、他のパルミトイル化蛋白質である3量体G蛋白質 α サブユニットG α_q や足場蛋白質GRIPのパルミトイル化レベルは神経活動に依存しなかった。私は、下記II)-4で述べるように、さまざまな基質とパルミトイル化酵素群の関係を明らかにしてきたが、P-PAT(DHHC2, 3, 7, 15)のなかでも、DHHC3,7はPSD-95以外にG α_q など多くの基質をパルミトイル化するが、DHHC2,15はより選択的にPSD-95をパルミトイル化することを明らかにしている。すなわち、神経活動依存的に変動するPSD-95のパルミトイル化を担う酵素はDHHC2,15であると考えられた(則竹ら、投稿中)。生体内のパルミトイル化反応は基質蛋白質および責任酵素によって個別に、かつ精密に制御されていることが示唆された。そこで本研究では、細胞内で違った制御を受ける基質PSD-95とG α に焦点を絞り、研究を進めた。

2)パルミトイル化動態の可視化技術の創出

a) 全反射顕微鏡を用いたパルミトイル化動態の可視化

上述の生化学的手法によりパルミトイル化蛋白質の時間的変動を生化学的に検出することが可能となったが、細胞内の空間的位置情報には言及できず十分とは言えない。そこで、私はパルミトイル化の時間的、空間的ダイナミクスを明らかにするために、全反射顕微鏡を用いてパルミトイル化動態の可視化を試みた。全反射顕微鏡はスライドガラス面から100-200 nmという極めて細胞膜に近接した領域のみを励起することができる。野生型の PSD-95-GFP を発現させた海馬培養神経細胞を観察してみると、細胞膜近傍(主にシナプス後部膜)に存在すると考えられるクラスター状の PSD-95 シグナルを落射蛍光像に比べて高い S/N 比で可視化できることが分かった(下図)。一方、パルミトイル化部位に変異を導入した PSD-95 は全反射顕微鏡では殆ど観察されなかったことから、全反射顕微鏡を用いれば、蛋白質のパルミトイル化レベルの変動と動態(シナプス局在化)の関係を時空的にモニタリングできると考えられた。私はこの手法により神経活動の遮断後 1-2 時間以内に、シナプス後部膜の PSD-95 が増加することを見出した。この結果は上述の ABE 法から得られた生化学的データと見事に合致していた。すなわち、海馬培養神経細胞においては神経活動遮断時に PSD-95 のパルミトイル化レベルが亢進し、シナプス後部膜への PSD-95 の集積が増加することが明らかとなった(則竹ら、投稿中)。全反射顕微鏡に加えて、下記 II)-3で述べるように、Photoconversion 法や FRAP 法とパルミトイル化阻害剤、PAT の RNAi を組合わせて、パルミトイル化動態を解析する実験系も構築した。



b) PSD-95 のパルミトイル化部位特異的リコンビナント抗体の開発

さらに、内在性の PSD-95 のパルミトイル化動態を可視化するために、パルミトイル化された PSD-95 のみを特異的に認識する抗体の作成に挑戦した。まず、P-PAT 酵素を用いることにより stoichiometrical にパルミトイル化された PSD-95 を抗原として精製した。Franck Perez 博士(Curie institut)との共同研究にて、パルミトイル化された PSD-95 を特異的に認識するリコンビナント抗体をスクリーニングし、有望な候補クローン(PF11)を得た。

II)パルミトイル化酵素の活性制御機構の解明

1) 神経シナプスにおけるPSD-95 パルミトイル化の制御機構

細胞内のパルミトイル化動態の変動を検出することにより、PSD-95 のパルミトイル化レベルが神経活動遮断時に特異的に増加し、PSD-95 のシナプス局在が促進することが明らかになった。そこで、この神経活動感受性の PSD-95 パルミトイル化が神経細胞のどの部位でどのように制御されているかを明らかにすることを試みた。まず、神経活動依存的に PSD-95 をパルミトイル化すると考えられた DHHC2,15 のうち、海馬神経細胞で主に発現している酵素は DHHC2 であることを見出した。そこで、バキュロウイルスディスプレイ法により DHHC2 と DHHC3 の特異的モノクローナル抗体を作成した(東大、浜窪教授、児玉教授との共同研究)。興味深いことに、DHHC2 は樹状突起内およびスパイン近傍に小胞状に存在していた。さらに、神経活動の低下に伴い、DHHC2 はシナプス後部膜近傍にダイナミックに移動し、PSD-95 のパルミトイル化レベルを増加させること、その結果、AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス発現量を増加させることを見出した。一方、DHHC3 は細胞体内のゴルジ装置に限局して存在し、神経活動とは無関係に様々な基質蛋白質をパルミトイル化していると考えられた。このように、1) 23 種類のパルミトイル化酵素は外界刺激の下流で分子種により異なる制御をうけていること、2) パルミトイル化酵素の細胞内局在がパルミトイル化の ON/OFF を規定すること、さらに3) パルミトイル化酵素がシナプス機能(AMPA 受容体の発現量)を一定に保つホメオスタシス(Synaptic scaling)という現象を制御していることを見出した(則竹ら、投稿中)。

2) 脳内 PSD-95 複合体の同定

一方、P-PAT の活性制御因子や PSD-95 の脱パルミトイル化酵素を同定するために、基質蛋白質 PSD-95 の免疫沈降を行い、脳内の生理的複合体を精製、同定した。大変興味深いことに、この過程で、てんかん関連たんぱく質 LGI1、ADAM22 および Stargazin が、脳内で PSD-95 に相互作用する主要な蛋白質であることを見出した。これら複合体の結合様式を解析した結果、分泌蛋白質である LGI1 は膜蛋白質 ADAM22 を受容体として結合し、ADAM22 は PSD-95 によりシナプスに裏打ちされることが明らかになった。LGI1 は ADAM22 と結合することにより AMPA 受容体の機能を促進したことから、AMPA 受容体機能を制御する新たなリガンド/受容体を同定したといえる(発表論文3)。

3) G蛋白質シグナルにおけるパルミトイル化酵素の役割

3 量体G蛋白質 α サブユニット($G\alpha$)は古くからパルミトイル化を受けることが知られており、パルミトイル化が $G\alpha$ の細胞膜への集積や機能の発揮に重要であることが示唆されてきた。しかし、 $G\alpha$ では酵素非依存的なパルミトイル化反応も提唱されており、パルミトイル化酵素は同定されていなかった。私どもは独自のスクリーニング法(下記II-4および発表論文4、8)によりDHHCファミリーから $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{12}$ をパルミトイル化する酵素を探索し、DHHC3 およびDHHC7 が特異的に $G\alpha$ のパルミトイル化を亢進することを見出した。また、RNA干渉法によりDHHC3 およびDHHC7 の発現を抑制したところ、 $G\alpha_q$ のパルミトイル化が低下するとともに $G\alpha_q$ の細胞膜への局在が減弱した。また、アゴニスト依存的な α_{1A} アドレナリン受容体・ $G\alpha_q$ を介した情報伝達系にDHHC3 およびDHHC7 が必須であることを示した。さらに、photoconversion法ならびにFRAP法を利用し、 $G\alpha_q$ はパルミトイル化依存的にゴルジ装置-細胞膜間を双方向に恒常的にシャトルしており、このシャトルングにはDHHC3/7 によるゴルジ体でのパルミトイル化が必須であることを明らかにした(発表論文11)。本知見は、生体内の $G\alpha$ のパルミトイル化がパルミトイル化酵素によって起こっていることを初めて示したものである。

4) パルミトイル化酵素ファミリーの基質特異性の解明

独自に単離したパルミトイル化酵素群を用いて、PSD-95 以外にも様々な基質に対する特異的パルミトイル化酵素をスクリーニングする手法を確立した(発表論文4、8)。すでに、30 種類以上の基質蛋白質(SNAP-25、GAP-43、 $G\alpha$ 、H-Ras、Lck、eNOS、CSP、NCAM など)の候補酵素のスクリーニングを終えており、パルミトイル化酵素群にサブファミリーが存在することを明らかにしている。これまでのスクリーニングの結果から、例えば1)DHHC21 はミリスチル化脂質修飾を同時にうけるパルミトイル化蛋白質を好んで基質とする、2)DHHC17 は Internal Cysteine cluster を

好んで基質とする等の法則 (consensus sequence) を明らかにしつつある。これらの解析は殆どが国際共同研究(6ヶ国、20グループ)として展開しており、本分野を主導的立場で牽引していると言える(発表論文2、11等)。

5. 今後の展開

今後は、LGI1 ノックアウト(てんかんモデル)マウスや P-PAT ノックアウトマウス脳におけるパルミトイル化動態の変動を ABE 法により網羅的に解析し、脳機能や脳病態とパルミトイル化の関係を明らかにすると共に、脱パルミトイル化酵素の本体を明らかにしていきたい。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matthias Hundt, Hiroki Tabata, Myung-Shin Jeon, Keitaro Hayashi, Yoshihiko Tanaka, Roma Krishna, Lauren De Giorgio, Yun-Cai Liu, Masaki Fukata, Amnon Altman, Impaired Activation and Localization of LAT in Anergic T Cells as a Consequence of a Selective Palmitoylation Defect, *Immunity*, 513-522 (2006)
2. Fernandez-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Bredt, D.S., Sessa, W.C., Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase, *J. Cell Biol.*, vol. 174, 369-377 (2006)
3. Yuko Fukata, Hillel Adesnik, Tsuyoshi Iwanaga, David S. Bredt, Roger A. Nicoll, Masaki Fukata, Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission, *Science*, vol. 313, 1792-1795 (2006)
4. Yuko Fukata, Tsuyoshi Iwanaga, Masaki Fukata, Systematic screening for palmitoyl-acyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells, *Methods*, vol. 40, 177-182, (2006)
5. Fang, C., Deng, L., Keller, C.A., Fukata, M., Fukata, Y., Chen, G., Luscher, B., GODZ-mediated palmitoylation of GABA-A receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses, *J. Neurosci.*, vol. 26, 12758-12768 (2006)
6. Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itohn N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N., Kaibuchi, K., IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth, *J. Cell Sci.*, vol. 120, 567-577 (2007)
7. Yamamoto N, Fukata Y, Fukata M, Yanagisawa K, GM1-ganglioside-induced Abeta assembly on synaptic membranes of cultured neurons, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1768, 1128-1137 (2007)
8. Tsutsumi, R., Fukata, Y., Fukata, M., Discovery of protein-palmitoylating enzymes, *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.*, vol. 456, 1199-1206 (2008)
9. Greaves, J. Salaun, C., Fukata, Y. Fukata, M., Palmitoylation and Membrane Interactions of the Neuroprotective Chaperone Cysteine-string Protein, *J. Biol. Chem.*, vol. 283, 25014-25026 (2008)
10. Evgeni Ponimaskin, Galina Dityateva, Mika O. Ruonala, Masaki Fukata, Yuko Fukata, Fritz Kobe, Fred S. Wouters, Markus Delling, David S. Bredt, Fibroblast Growth Factor-Regulated Palmitoylation of the neuronal cell adhesion molecule Determines Neuronal Morphogenesis, *J. Neurosci.*, vol. 28, 8897-8907 (2008)
11. Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake J., Iwanaga, T., Perez, F., Fukata, M., Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme, *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, 435-447 (2009)
12. Kulandaivelu S. Vetrivel, Xavier Meckler, Ying Chen, Phuong D. Nguyen, Nabil G. Seidah, Robert Vassar, Philip C. Wong, Masaki Fukata, Maria Z. Kounnas, Gopal Thinakaran, Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts, *J. Biol. Chem.*, vol. 284, 3793-3803 (2009)
13. Jennifer Greaves, Gerald R. Prescott, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Christine Salaun,

Luke H. Chamberlain, The Hydrophobic cysteine-rich domain of SNAP25 couples with downstream residues to mediated membrane interactions and recognitions by DHHC palmitoyl transferases, *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20, 1845-1854 (2009)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. Masaki Fukata, Synaptic function regulated PSD-95 palmitoylating enzymes, The 9th Membrane Research Forum, Kyoto, Japan (2006/3/16)
2. 深田正紀、岩永剛、深田優子、シナプス伝達を制御する新規リガンド・受容体、日本分子生物学会 2006 フォーラム～分子生物学の未来～(名古屋)(2006年12月7日)
3. Yuko Fukata, Hillel Adesnik, Tsuyoshi Iwanaga, David S. Bredt, Roger A. Nicoll, Masaki Fukata, Novel epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission, The 46th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, San Diego, USA (2006/12/9-13)
4. Jun Noritake, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Activity-dependent Regulation of PSD-95 Palmitoylation by P-PAT, The 46th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, San Diego, USA (2006/12/9-13)
5. Ryohei Tsutsumi, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Identification of G Palmitoyl Acyl Transferase, The 46th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, San Diego, USA (2006/12/9-13)
6. Masaki Fukata, Novel regulators of AMPA receptor function、第84回日本生理学会大会(大阪)(2007年3月22日)
7. 深田正紀、則竹淳、堤良平、深田優子、PSD-95 パルミトイル化酵素による AMPA 受容体の動態制御機構、第54回中部日本生理学会・第100回近畿生理学談話会合同大会(津)(2007年10月19日)
8. Jun Noritake, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Regulatory Mechanism of PSD-95 Palmitoylation through P-PAT, The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA (2007/11/3-7)
9. Ryouhei Tsutsumi, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Regulation of Ga palmitoylation by DHHC family proteins, The 47th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Washington, USA (2007/12/1-5)
10. 深田優子、深田正紀、新規リガンド LGI ファミリーの神経系における機能、BMB2007(横浜)(2007年12月14日)
11. 深田正紀、PSD-95 パルミトイル化酵素の活性制御機構の解明、BMB2007(横浜)(2007年12月15日)
12. 深田正紀、AMPA型グルタミン酸受容体の動態制御機構、第44回脳の医学・生物学研究会(名古屋)(2008年2月2日)
13. Fukata, M., Synaptic activity regulates PSD-95 palmitoylating enzymes, Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons:Physiology and Disease, US-Japan Brain Research Collaborative Program, Pacific Grove, USA (2008/2/24-27)
14. Fukata, M., Novel regulators of AMPA receptor functions, The 36th SEIRIKEN Conference“Stock and Flow of functional molecules in synapse”, Okazaki, Japan (2008/3/17-19)
15. Fukata, M., Noritake, J., Tsutsumi, R., Fukata, Y., Synaptic activity regulates PSD-95 palmitoylating enzymes, The 8th Human Frontier Science Program Awardees Meeting, Berlin, Germany (2008/7/6-9)

16. Jun Noritake, Yuko Fukata, Naoki Hosomi, Tsuyoshi Iwanaga, Ryouhei Tsutsumi, Hideki Tani, Hiroko Iwanari, Yasuhiro Mochizuki, Yoshiharu Matsuura, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, and Masaki Fukata, Activity-Dependent Regulation of the PSD-95 Palmitoylating Enzyme, 第 31 回日本神経科学大会(横浜)(2008 年 7 月 9 - 1 日)
 17. Masaki Fukata, Jun Noritake, Tsuyoshi Iwanaga, Ryouhei Tsutsumi, Yuko Fukata, Synaptic palmitoylation of PSD-95 mediates AMPA receptor homeostasis, The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA (2008/12/13-17)
 18. Yuko Fukata, Atsushi Watanabe, Tsuyoshi Iwanaga, Masaki Fukata, Physiological role of epilepsy-related ligand LGI1 in synaptic function, The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA (2008/12/13-17)
 19. 岩永剛、深田優子、深田正紀、シナプス伝達修飾分子 LGI ファミリーの性状解析、BMB2008(神戸)(2008 年 12 月 9 - 12 日)
 20. 堤良平、深田優子、深田正紀、G α パルミトイル化酵素の同定と性状解析、BMB2008(神戸)(2008 年 12 月 9 - 12 日)
 21. Yuko Fukata, Masaki Fukata, In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1, 11th International Neurochemistry Winter Conference, Solden, Austria (2009/3/31-4/4)
 22. Masaki Fukata, Yuko Fukata, Synaptic palmitoylation of PSD-95 mediates AMPA receptor homeostasis, 11th International Neurochemistry Winter Conference, Solden, Austria (2009/3/31-4/4)
- (B) 受賞
1. 国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム Young Investigator Grant Award (2006 年 3 月 29 日)
 2. 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008 年 4 月 15 日)
- (C) 著作物
1. 深田優子、深田正紀, パルミトイル化脂質修飾をつかさどる新規 DHHC 蛋白質ファミリー-PSD-95 のパルミトイル化によるシナプス機能の制御, 蛋白質核酸酵素 vol. 50, 1666-1673 (2005)
 2. Yuko Fukata, David S Bredt, Masaki Fukata, Protein palmitoylation by DHHC protein family, The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology, 81-87 (2006)
 3. 深田優子、岩永剛、深田正紀, てんかん関連蛋白質 “LGI1 と ADAM22” はリガンド/受容体としてシナプス伝達を制御する, 細胞工学, vol. 25, 1438-1439 (2006)
 4. 深田優子、岩永剛、深田正紀, てんかん関連蛋白質 LGI1 はシナプス伝達を制御する, 蛋白質核酸酵素 vol. 52, 449-455 (2007)
 5. 則竹淳、深田優子、深田正紀, PSD-95 パルミトイル化脂質修飾酵素による AMPA 受容体動態制御メカニズム, 蛋白質核酸酵素増刊号「神経の分化、回路形成、機能発現」, vol. 53, 430-435 (2008)
 6. 深田優子、岩永剛、深田正紀, AMPA 型グルタミン酸受容体の動態制御機構, 日本神経薬理学会雑誌, vol. 28, 131-134 (2008)
 7. 堤良平、深田優子、深田正紀, タンパク質 S-パルミトイル化酵素, 生化学, vol. 80, 1119 (2008)
 8. Tsuyoshi Iwanaga, Ryouhei Tsutsumi, Jun Noritake, Yuko Fukata, Masaki Fukata, Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling, Progress in Lipid Research, in press