

# シナプス機能における S-アシル化動態の時空的解析

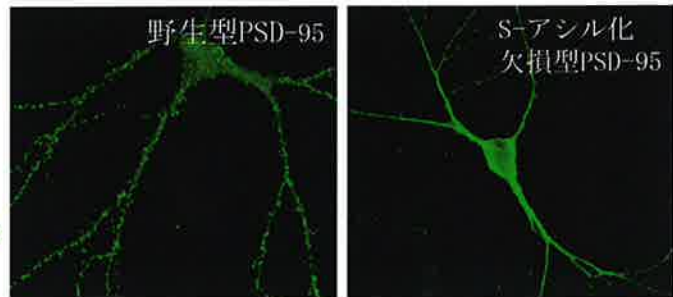
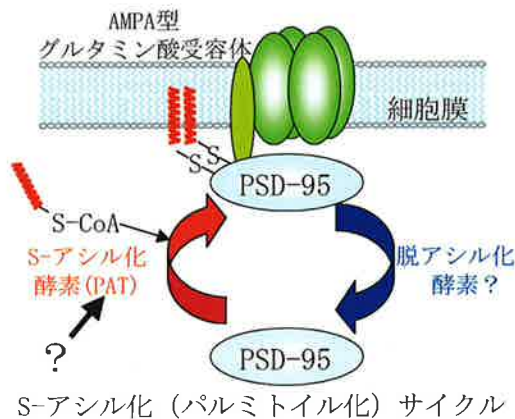
深田 正紀

自然科学研究機構 生理学研究所

## 1. 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。

## 2. 研究成果

### I) 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。

### 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

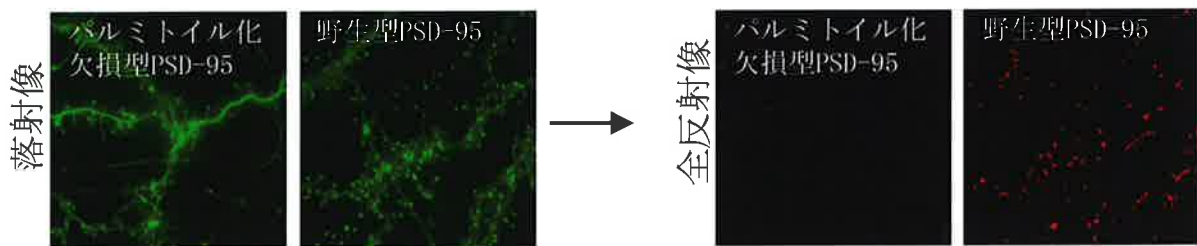
ごく最近、酵母を用いた解析から酵母細胞内のパルミトイル化蛋白質を精製する手法として ABE 法が他のグループにより報告された。私は ABE 法に改良を加え、海馬培養神経細胞から再現性良くパルミトイル化蛋白質を特異的かつ網羅的に精製する技術を確認した。この手法により神経機能蛋白質のパルミトイル化レベルを簡便にモニタリングすることが可能となった。驚くべきことに、シナプスの約 2% を占める足場蛋白質 PSD-95 のパルミトイル化レベルは神経活動を遮断した際に、大きく (stoichiometrical) 上昇し、これが新しいパルミトイル化反応によることを見出した。一方、他のパルミトイル化蛋白質である 3 量体 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニット  $G\alpha_q$  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  $G\alpha_q$  など多くの基質をパルミトイル化し、DHHC2, 15 はより選択的に PSD-95 をパルミトイル化する。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。本手法と質量分析法を組み合わせれば、生体内のパルミトイル化代謝産物を網羅的に解析することが可能となる。まず、本研究では PSD-95 と  $G\alpha$  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

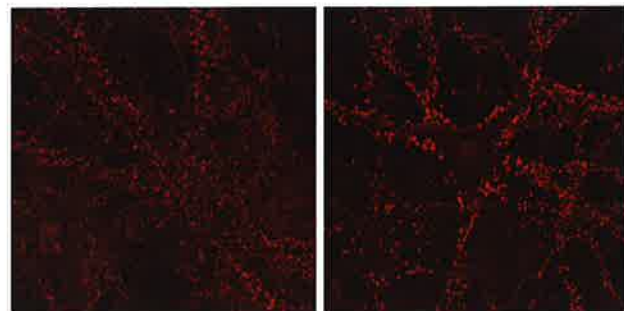
上述の代謝ラベリング法や ABE 法によりパルミトイル化蛋白質の時間的変動を生化学的に検出することが可能となったが、細胞内の空間的位置情報には言及できず十分とは言えない。そこで、私はパルミトイル化の時間的、空間的ダイナミクスを明らかにするために、全反射顕微鏡を用いてパルミトイル化動態の可視化を試みた。全反射顕微鏡はスライドガラス面から 100-200 nm という極めて細胞膜に近接した領域のみを励起することができる。野生型の PSD-95-GFP を発現させた海馬培養神経細胞を観察してみると、細胞膜近傍 (主にシナプス後部膜) に存在する PSD-95 を落射蛍光像に比べて高い S/N 比で可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 の移行が増加することが明らかとなった。



### 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 を抗原として調整した。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。

これまでの生化学的解析から PF11 はパルミトイル化された PSD-95 をより強く認識することが明らかとなった。また、この抗体を用いることにより神経活動遮断時の内在性の PSD-95 のシナプス部位への集積を明瞭に検出できた (右図)。さらに、PF11 を GFP 融合蛋白質として発現させることにより、生神経細胞内の内在性 PSD-95 のパルミトイル化反応を可視化することが可能となりつつある (深田ら、投稿準備中)。

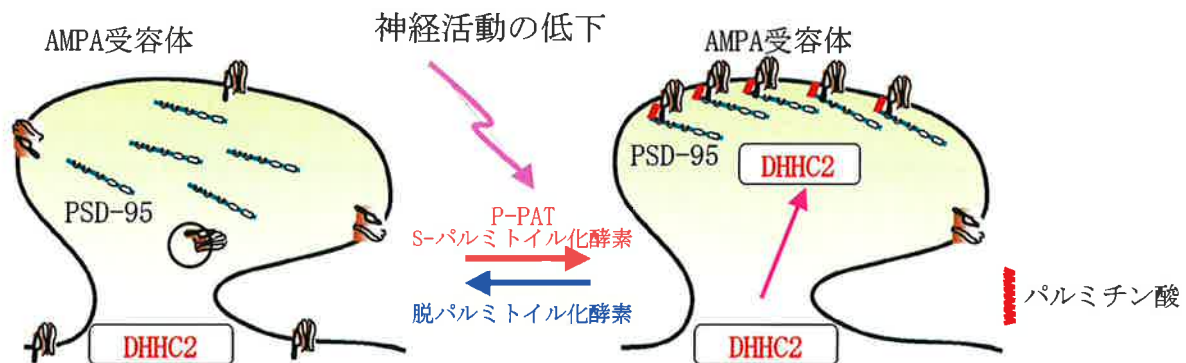


コントロール TTX (神経活動遮断時)  
抗パルミトイル化 PSD-95 抗体 (PF11) による染色

## I I) 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

上記のパルミトイル化蛋白質の測定法や可視化技術を用いることにより、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することが明らかになった。そこで、この神経活動遮断時の 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、DHHC2 の特異的モノクローナル抗体をバキュロウイルスディスプレイ法により作成した（東大、浜窪教授、児玉教授との共同研究）。興味深いことに、DHHC2 は樹状突起およびシナプス近傍に存在していた。さらに、DHHC2 は神経活動の低下に伴い、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 はゴルジ装置に局限して存在し、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異なる制御をうけていること、2) パルミトイル化酵素群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 4）。

### 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  $\alpha$  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 DHHC ファミリーから  $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{i2}$  をパルミトイル化する酵素を独自のスクリーニング法（下記 4）により探索し、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  $\alpha_{1A}$  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 1）。



#### 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3、5)。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DHHC21はミリストイ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1、2、6等)。

#### (まとめ)

以上の結果から、G $\alpha$ のようなある種のパルミトイル化蛋白質は細胞膜に静的にあるのではなく、パルミトイル化と脱パルミトイル化からなるパルミトイル化サイクルに依存して細胞内小器官と細胞膜の間を双方向性にサイクルしていることが明らかとなった。一方、PSD-95は神経活動という特殊な外界刺激によりパルミトイル化レベルが精密に制御され、シナプス可塑性を制御していることが明らかになった。すなわち、パルミトイル化は酵素と基質の組み合わせにより多様な制御を受け、細胞機能を動的に調節していることが示唆される。本研究はS-アシル化(パルミトイル化)という蛋白質の翻訳後修飾を解析するためのモデルケースを提供するとともに、解析が困難であったS-アシル化分野に新たな手法を確立したものである。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。

### 3. 主な発表 論文

- (1) Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake, J., Iwanaga, T., Perez, F. and Fukata, M. Identification of G-protein  $\beta$  subunit palmitoylating enzyme. *Mol. Cell. Biol.* in press
- (2) Ponimaskin, E., Dityateva, G., Ruonala, M., Fukata, M., Fukata, Y., Kobe, F., Wouters, F., Delling, M., Brecht, D., Schachner, M., and Dityatev, A. Fibroblast Growth Factor-Regulated Palmitoylation of NCAM Determines Neuronal Morphogenesis. *J. Neurosci.* 28, 8897-88907 (2008)
- (3) Tsutsumi, R., Fukata, Y., Fukata, M. Discovery of protein-palmitoylating enzymes. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiol.* 456, 1199-1206 (2008)
- (4) Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., Fukata, M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission. *Science* 313, 1792-1795 (2006)
- (5) Fukata, Y., Iwanaga, T., Fukata, M. Systematic screening for palmitoyl-acyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells. *Methods* 40, 177-182, (2006)
- (6) Fernandez-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Brecht, D.S., Sessa, W.C. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J. Cell Biol.* 174, 369-377 (2006)

#### 招待講演

- 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)

#### 4. 受賞

- 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)