

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07930

研究課題名(和文)細胞外 - シヌクレインによるS1P受容体シグナル伝達抑制機構の解析

研究課題名(英文) Inhibition of S1P receptor signal transduction by extracellular alpha-synuclein

研究代表者

岡田 太郎 (OKADA, TARO)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80304088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： - シヌクレインはパーキンソン病の原因遺伝子として注目されており、神経細胞外にも存在することが知られていたが、その生理的・病理的意義は不明であった。今回の研究で、神経機能において重要な機能を担っていることが知られているS1P受容体とGタンパク質との共役を細胞外 - シヌクレインが阻害することが見いだされた。 - シヌクレインによる阻害作用はS1P1受容体に特異的なものであり、S1P2受容体とGタンパク質の共役は全く阻害されなかった。今回の結果は、今まで不明であった細胞外 - シヌクレインの特異的作用を初めて明らかにしたものであり、きわめて興味深いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alpha-synuclein (ASN) is considered to be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. ASN is known to be localized outside of neurons but its physiological and/or pathological relevance has not been known. In this study I showed extracellular ASN inhibits S1P1 receptor-G protein coupling for the first time. Interestingly the effect of ASN was specific to S1P1 receptor and S1P2 receptor-G protein coupling was not inhibited by extracellular ASN at all. Majority of S1P1 receptor is localized in raft fraction in the cells and extracellular ASN treatment cause "exit" of S1P1 receptor from the raft fraction. These results are important because specific action of extracellular ASN has not been known and we already reported that S1P1 receptor plays an important role in hippocampal neurons.

研究分野：細胞生物学

キーワード： - シヌクレイン S1P受容体

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -シヌクレイン (ASN) は神経細胞に多く発現している機能不明のタンパク質であり、神経細胞内での凝集・蓄積はパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の原因になると考えられている。最近、この ASN や A $\beta$  などの凝集性タンパク質がエクソソームと呼ばれる小胞に乗って細胞より放出されて他の細胞に取り込まれることで、プリオンの場合のように異常凝集タンパク質伝播による病変拡大が起こるといふモデルが提唱されている。最近、申請者らはエクソソームが生成する場である multivesicular body (MVB) でのタンパク質ソーティングをスフィンゴシンキナーゼ 2 (SPHK2) が制御していることを世界に先駆けて報告した (Kajimoto, T. et al. (2013), Nat. Commun. 4, 2712)。すなわち、SPHK2 をノックダウンした細胞では、エクソソームの「積荷」になるはずのタンパク質がエクソソームに入らなくなる。種々の疾患関連タンパク質はエクソソームの「積荷」タンパク質として注目されていることから、申請者らはいくつかの疾患関連タンパク質のエクソソーム内ソーティングにおける SPHK2 の関与について解析を進めていたが、その過程で、細胞外に放出された ASN が神経細胞の細胞膜に存在する S1P 受容体を機能的に遮断すること、そしてその作用は受容体自身に対するものではなく受容体と 3 量体型 G タンパク質との共役阻害 (アンカップリング) によるものであることを示唆するデータを得た。神経細胞においては細胞内で生成した S1P が細胞外に放出され、オートクライン的に S1P 受容体を刺激することが神経伝達物質放出において重要な役割を果たしていることを、申請者らは以前に見いだしている (Kajimoto, T et al. (2007) Mol. Cell. Biol. 27, 3429) (4 ページ下の図参照)。したがって、今回新たに発見した ASN による S1P 受容体と G タンパク質のアンカップリング現象は、生理学的・病理学的に極めて興味深い。

### 2. 研究の目的

$\alpha$ -シヌクレイン (ASN) はパーキンソン病などの神経変性疾患の原因タンパク質であると考えられている。申請者らは細胞外 ASN の作用について検討する中で、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体と 3 量体型 G タンパク質の共役が ASN により抑制される (アンカップリング) という極めて興味深い現象を見いだした。一方で S1P 受容体は海馬神経細胞における神経伝達物質放出および長期増強 (LTP) において重要な役割を果たしていることを申請者らは最近報告している。以上の背景から本研究では、ASN による S1P 受容体-G タンパク質アンカップリングの特異性を解析し、ASN が直接標的とするタンパク質について同定を試みるとともに、神経活動および LTP における細胞外

ASN の作用について、S1P 受容体の観点から検討する。

### 3. 研究の方法

S1P 受容体と G タンパク質のカップリングについて検討するため、S1P1-CFP あるいは S1P2-CFP と G  $\gamma$ -YFP を細胞に発現させ、S1P での刺激を行った。S1P 刺激により活性化した S1P 受容体は G タンパク質を活性化して解離させる。これにより G と受容体が接近することになり、S1P1-CFP/S1P2-CFP と G  $\gamma$ -YFP との間で Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) が起こる。この FRET を acceptor photobleaching 法により検出することで、S1P 受容体による G タンパク質活性化の程度について定量を行った。また S1P1 受容体のパルミトイル化に関する検討では、S1P1 受容体を免疫沈降後にヒドロキシルアミンにより S-パルミトイル化結合を切断させ、出現した遊離 S H 基を特異的に修飾する試薬を用いてピオチン化することにより、パルミトイル化を検出する Acyl-biotin exchange (A B E) 法を用いた。細胞膜上のラフト画分は常法に従って密度勾配遠心法で単離し、S1P1 受容体の局在について検討した。また、ラフト画分に局在することが知られている flotillin2 に YFP を融合させた flotillin2-YFP と S1P1-CFP を細胞に発現させ、両者の FRET を測定することにより、S1P1 受容体の局在について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞外 ASN が S1P 受容体と G タンパク質の共役を阻害する事から、これが既に検討していた S1P1 受容体に特異的なものか、あるいは S1P2 受容体といった他の S1P 受容体の場合にもあてはまるのかについて検討したところ、細胞外 ASN の効果は S1P1 受容体に特異的なものであり、S1P2 受容体による G タンパク質の活性化は全く阻害されないことが明らかとなった。(図 1)

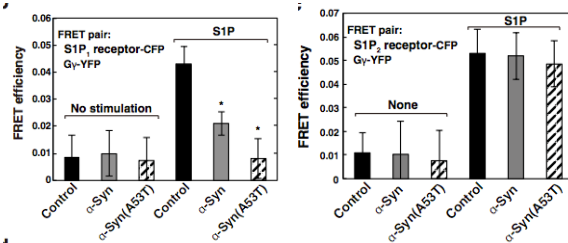


図 1

FRET 法を用いて測定した S1P 受容体と G タンパク質のカップリングに対する細胞外 ASN の効果。左: S1P1 受容体、右: S1P2 受容体。S1P1 受容体、S1P2 受容体共に S1P 刺激で G タンパク質とカップリングしているが、S1P1 の場合のみ ASN ( $\alpha$ -Syn および  $\alpha$ -Syn(A53T)) で阻害されていることがわかる。

(2) ASN がどのようなメカニズムで S1P1 受容体と G タンパク質のカップリングを阻害するのかを検討する中で、細胞膜上でラフト画分に局在している S1P1 受容体が ASN 処理によりラフトから「追い出される」という現象を見いだした。S1P2 受容体もラフト画分に局在しているが、これについては ASN 処理で局在は全く変化しなかった。(図 2、3)  
細胞膜上の様々な受容体はラフトに局在し、それが円滑な情報伝達において重要であることが知られていることから、ASN は何らかのメカニズムで S1P1 受容体をラフトから追い出すことにより、G タンパク質とのカップリングが阻害されるというメカニズムが想定された。

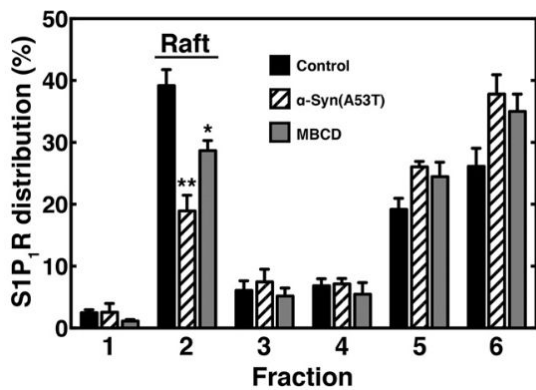


図 2  
S1P1-YFP を発現した細胞より密度勾配遠心法を用いてラフト画分を分画した (Fraction 2 がラフト画分)。Control に対して ASN 処理細胞 (斜線の棒) ではラフト画分での S1P1 受容体量が減少した。コレステロールを引き抜くことによりラフト構造を破壊する MBCD でもラフト画分の S1P1 受容体量は低下している。

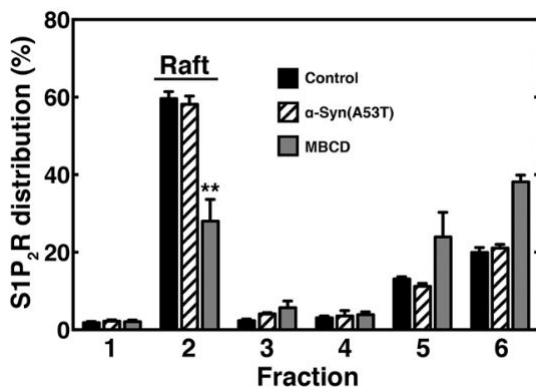


図 3  
図 2 と同様の実験を S1P2 受容体で行ったもの。MBCD では図 2 と同様にラフトでの S1P2 受容体が減少しているにもかかわらず、ASN 処理ではラフト画分における S1P2 量は全く変化しなかった。

(3) S1P1 受容体の G タンパク質とのカップリングやラフトへの局在においては、脂質修飾の一種であるパルミトイル化が重要であることが知られている。S1P1 受容体がパルミトイル化されていることは既に報告されていたが、23 種類あるパルミトイル化酵素(DHHC)のうちどれが S1P1 受容体をパルミトイル化するのかは知られていなかった。しかし各種 DHHC の局在を調べた論文によると、形質膜に局在する DHHC は DHHC5, DHHC20, DHHC21 の 3 種のみであった。そこでこれら 3 種の DHHC 酵素のどれかが S1P1 受容体をパルミトイル化すると考え、検討を行ったところ、DHHC5 が S1P 受容体を特異的にパルミトイル化することを初めて見いだした。(図 4、5)

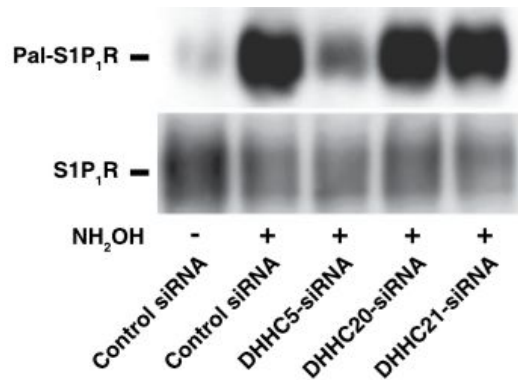


図 4  
ABE 法により S1P1 受容体のパルミトイル化を検出した。Pal-S1P1R がパルミトイル化を示している。またこのアッセイでは NH<sub>2</sub>OH(-) はネガティブコントロールとして用いている。この結果より、DHHC5 siRNA により S1P1 受容体のパルミトイル化は強く抑制され、一方で DHHC20 や DHHC21 の siRNA では全く阻害されていないことがわかる。

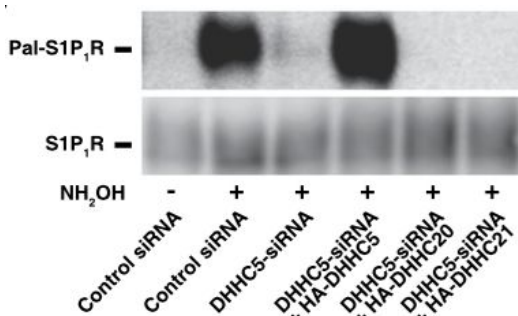


図 5  
DHHC5 siRNA によって阻害された S1P1 受容体のパルミトイル化は siRNA 認識配列に silent mutation を導入した DHHC5 を発現させることでレスキューされた。一方で、DHHC20 や DHHC21 を発現させても S1P1 受容体のパルミトイル化はレスキューされなかった。

(4) S1P1 受容体のパルミトイル化が G タンパク質とのカップリングに必須であることを見いだした。(図 6)

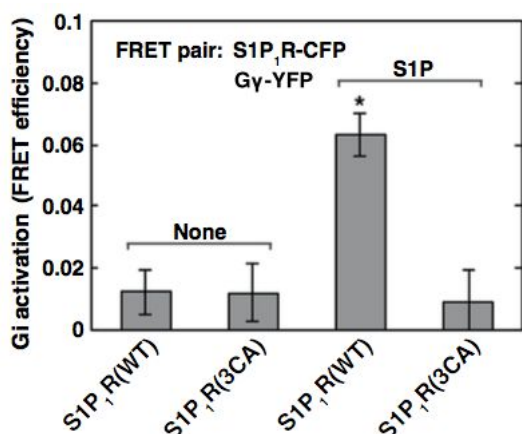


図 6  
野生型 S1P1 受容体は S1P 刺激により G タンパク質とカップリングしたが、S1P1 受容体のパルミトイル化部位として知られている 3 カ所の Cysteine を Alanine に置換した変異体 (S1P1R(3CA)) では、S1P 刺激を行っても G タンパク質とカップリングしていない。

(5) S1P 刺激により S1P1 受容体パルミトイル化に変化が生じるかどうか検討したところ、S1P 刺激により 2 時間以内に S1P1 受容体のパルミトイル化がほぼ完全に阻害されるというきわめて興味深い現象を発見した(図 7)。

すなわち、S1P で刺激された S1P1 受容体は急速に脱パルミトイル化されることで G タンパク質とのカップリングがオフになるとい、これまで知られていなかった受容体-G タンパク質間情報伝達制御が明らかとなった。

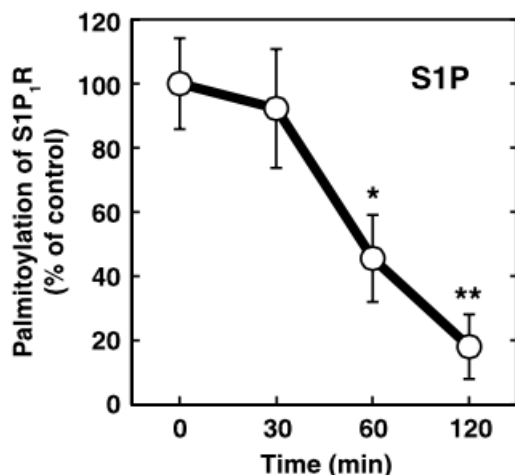


図 7  
ABE 法により測定した S1P1 受容体パルミトイル化を定量した。S1P 刺激後 60 分後にはパルミトイル化の大きな低下が認められ、12

0 分後にはほぼ完全にパルミトイル化が阻害された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Extracellular  $\alpha$ -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling.

Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, Hirase M, Matovelo SA, Nakamura S, Yoshida D, Ijuin T, Nakamura SI.

*J. Biol. Chem.*, 293, 8208-8216. (2018)(査読あり)

(2) Involvement of G subunits of Gi protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes. Kajimoto T, Mohamed NNI, Badawy SMM, Matovelo SA, Hirase M, Nakamura S, Yoshida D, Okada T, Ijuin T, Nakamura SI.

*J Biol Chem.*, 293, 245-253. (2018)(査読あり)

(3) DHH5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling.

\*Badawy SMM, \*Okada T, Kajimoto T, Ijuin T, Nakamura SI.

*Sci Rep.*, 7:16552. (2017), doi: 10.1038/s41598-017-16457-4.

(\*: Equally contributed) (査読あり)

(4) Extracellular  $\alpha$ -synuclein induces sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 uncoupled from inhibitory G-protein leaving  $\beta$ -arrestin signal intact.

\*Zhang, L., \*Okada, T., Badawy, S. M., Hirai, C., Kajimoto, T., Nakamura, S. I.,

*Sci. Rep.*, 7:44248. (2017) (\*: Equally contributed) (査読あり)

(5) Impairment of PDGF-induced chemotaxis by extracellular  $\alpha$ -synuclein through selective inhibition of Rac1 activation. Okada, T., Hirai, C., Badawy, S. M., Zhang, L., Kajimoto, T., Nakamura, S. I.,

*Sci. Rep.*, 6:37810. (2016) (査読あり)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/biochemistry/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 太郎 (OKADA Taro)  
神戸大学医学研究科・准教授  
研究者番号：80304088

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )