

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14560

研究課題名(和文) パルミトイル化修飾の光操作によるシナプス膜ドメイン構築機構の解明

研究課題名(英文) Optogenetic manipulation of protein palmitoylation for synapse organization

研究代表者

深田 正紀 (Masaki, Fukata)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授

研究者番号：00335027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経シナプスは特殊化した細胞膜ドメインの接着部位からなり、これら膜ドメインのダイナミックな変化はシナプス可塑性に重要な役割を果たす。これまでに、私共はパルミトイル化脂質修飾関連酵素の細胞膜局所における動的活性変化が、シナプス膜ドメイン構築の基盤的機構の一つであることを見つけてきた。本研究では、パルミトイル化酵素や脱パルミトイル化酵素の活性を光遺伝学的に人工操作するプローブの開発を試みた。具体的にはLight-Oxygen-Voltage sensing (LOV2)やCRY2-CIB1、LOVTRAP、Zdk1-iLIDシステムを検討し、これらの中から酵素活性を光操作するための手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：The neuronal synapse comprises specialized membrane domains and their dynamic remodeling plays an important role in synaptic plasticity. So far, we proposed that the dynamic change in (de)palmitoylating enzyme activity at local synapses is a critical factor for reorganization of synaptic membrane domains. In this study, we aimed at creating the optogenetic probes that spatio-temporally manipulate the (de)palmitoylating enzyme activity. Taking advantage of LOV2, CRY2-CIB1, LOVTRAP and Zdk1-iLID systems, we got a promising clue.

研究分野：神経科学、細胞生物学、生化学

キーワード：タンパク質 光科学 LOV2 ABHD17 酵素 シナプス LOVTRAP Zdk1-iLID

1. 研究開始当初の背景

神経シナプス後部の細胞膜領域は、グルタミン酸受容体などの膜蛋白質が集積し機能するために特殊化しており、Postsynaptic density (PSD) と呼ばれている。この PSD 領域は静的で均一なものではなく、神経活動依存的にその構造や質 (構成成分) がダイナミックに改変される。例えば、シナプス可塑性のモデルであるシナプス伝達の長期増強 (LTP) 時には、PSD 領域の改変が起こり、シナプス外細胞膜 (非 PSD 領域) に存在するリザーブプールの AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) が PSD でより効率的に捕捉され、PSD における AMPA 受容体密度が上昇すると考えられている (Granger ら Nature 2014)。しかし、PSD 構造の超微小性 (<1 nm サイズ) と生化学的特殊性のため、PSD 構築改変とシナプス可塑性との因果関係は十分に実証されていない。

PSD-95 は PSD 構成蛋白質の約 2% を占め、PSD 構造のコア (核) となるだけでなく、足場蛋白質として AMPA 受容体を PSD で捕捉する。重要なことに、膜貫通領域を有さない PSD-95 が PSD に局在するには、パルミトイル化と呼ばれる脂質修飾が必須である。私共は PSD-95 をパルミトイル化する酵素群 (DHHC 蛋白質) を同定し、その機能解析を通じて AMPA 受容体の制御機構を明らかにしてきた (深田ら Neuron 2004; 則竹ら J Cell Biol 2009; 深田ら Nat Rev Neurosci 2010)。また、パルミトイル化 PSD-95 を可視化する分子プローブの開発に成功し、超解像 STED 顕微鏡を組み合わせて、PSD 膜がナノメートルサイズの構造単位 (PSD ナノドメイン) の集合体であることを発見した (深田ら J Cell Biol 2013)。興味深いことに、PSD ナノドメインの PSD-95 は持続的にパルミトイル化状態と脱パルミトイル化状態の間をサイクルしており、シナプス膜上のパルミトイル化酵素 ZDHHC2 活性が直接 PSD ナノドメインを形成、維持することが強く示唆された。このように、PSD 構築にはパルミトイル化修飾による動的な制御が関与することが示唆されるようになってきた。

2. 研究の目的

上述のように、私共はパルミトイル化脂質修飾関連酵素 (パルミトイル化および脱パルミトイル化酵素) の細胞膜局所における動的活性変化が、PSD 構築の基盤的機構の一つであることを見出してきた。本研究では、パルミトイル化酵素や脱パルミトイル化酵素の活性を光遺伝学的に人工操作するプローブを開発し、PSD 膜ドメインを時空間的に改変することを目的とする。本研究により、パルミトイル化酵素と脱パルミトイル化酵素を特定の細胞膜で自在に活性化することが可能となれば、これら膜ドメインにおけるパルミトイル化修飾の普遍的な役割が解明されることが期待される。

3. 研究の方法

パルミトイル化・脱パルミトイル化酵素の光操作プローブを開発するために、PSD-95 パルミトイル化酵素 ZDHHC2 と脱パルミトイル化酵素候補 ABHD17 に、さまざまなパターンで LOV2 (Light-Oxygen-Voltage sensing) ドメインを融合させたコンストラクト・ライブラリーを作成する。酵素活性が遮光条件下 (暗状態) で抑制され、光刺激下 (明状態) で復活するコンストラクトを生化学的、細胞生物学的に評価し、ライブラリーから単離する。

4. 研究成果

本研究では、パルミトイル化酵素や脱パルミトイル化酵素の活性を光遺伝学的に人工操作する手法の開発を試みた。

(1) まず、PSD-95 の脱パルミトイル化酵素として ABHD17 ファミリー (ABHD17A、ABHD17B、ABHD17C) を同定した。そして、ABHD17 を海馬神経細胞に過剰発現させると、PSD における PSD-95 や AMPA 受容体が激減し、スパインの数も減少することを見出した (横井、深田ら J Neurosci, 2016)。これらの知見は、シナプス局所におけるパルミトイル化・脱パルミトイル化酵素の活性が、シナプス膜の足場タンパク質の量を調節することで、シナプス機能を制御することを示唆する。また、私共は独自に蛋白質のパルミトイル化のストイキオメトリーを評価できる手法 (Acyl-PEGyl exchange gel Shift method: APEGS 法) を開発し、初めて内在性 PSD-95 の大部分が 2 カ所でパルミトイル化修飾を受けていることを見出した。本手法を駆使して、新規のパルミトイル化基質として mGluR5 や vGlut1 を同定するとともに、既知のパルミトイル化基質蛋白質のパルミトイル化部位数とストイキオメトリーを網羅的に明らかにした。

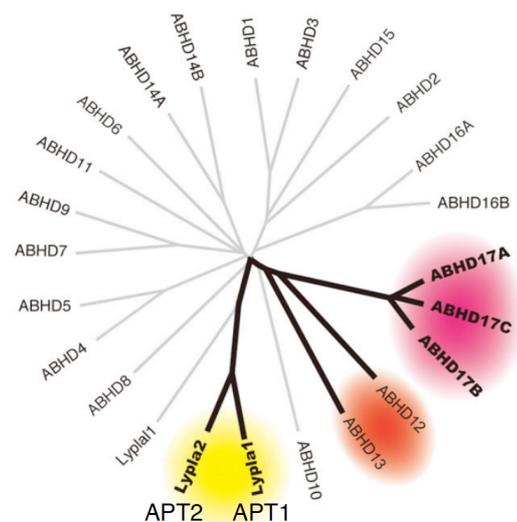


図: PSD-95 脱パルミトイル化酵素活性を示すセリン加水分解酵素群中でも ABHD17 は最も強い酵素活性を示し、神経シナプス膜に局在する。

(2) 続いて、新たに同定した脱パルミトイル化酵素 ABHD17 に様々なパターンで Light-Oxygen-Voltage sensing (LOV2) ドメインを融合させたコンストラクト・ライブラリーを作成した。しかし、これまでのところ、LOV 融合 ABHD17 コンストラクトの中で、ABHD17 の酵素活性が光照射依存的に制御可能なプローブの単離には至っていない。平行して、青色光の照射依存的に 2 量体化を引き起こすことができる CRY2-CIB1 コンストラクトも複数作成し、光照射依存的に特定の細胞内領域に ABHD17 をリクルートすることに成功した。しかし、これらのコンストラクトでも光照射依存的に効率良く酵素活性を再構築するには至らなかった。そこで、新たに LOVTRAP システム (Wang H ら Nat Methods 2016) や Zdk1-iLID システム (Guntas ら PNAS 2015) を導入し、各種コンストラクトを作成し、その性状解析を進めた。これらシステムでは、非常に効率良く ABHD17 を光照射依存的に特定の細胞膜にリクルートすることができるようになった。酵素活性の評価には、細胞生物学的手法と生化学的手法の両方を用いて検討している。未だ目的のプローブを開発するには至っていないが、ABHD17 の酵素活性を光操作するための有望な手がかりを得たと言える。さらに、PSD-95 のパルミトイル化酵素 ZDHHC2 に対しても同様に各種コンストラクトを作成した。さらなる改変の余地は残っているが、本研究の基礎的な目的は果たせたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Yamagata A, Miyazaki Y, Yokoi N, Shigematsu H, Sato Y, Goto-Ito S, Maeda A, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Shirouzu M, Fukata Y, Fukata M, Fukai S. Structural basis of epilepsy-related ligand-receptor complex LGI1-ADAM22. Nat Commun *in press*
査読有
- ② Fukata M, Yokoi N, Fukata Y. (2018) Neurobiology of autoimmune encephalitis. Curr Opin Neurobiol 48:1-8.
DOI: 10.1016/j.conb.2017.07.012
査読有
- ③ 平田 哲也、深田 優子、深田 正紀 (2018) パルミトイル化修飾酵素を軸とした神経機能研究、生化学 90:1-13.
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.90
査読有
- ④ Tortosa E, Adolfs Y, Fukata M, Pasterkamp RJ, Kapitein LC, Hoogenraad CC. (2017) Dynamic palmitoylation targets MAP6 to the axon to promote microtubule stabilization during neuronal polarization. Neuron 94:809-825.
DOI: 10.1016/j.neuron.2017.04.042
査読有
- ⑤ Ogino H, Hisanaga A, Kohno T, Kondo Y, Okumura K, Kamei T, Sato T, Asahara H, Tsuiji H, Fukata M, Hattori M. (2017) Secreted metalloproteinase ADAMTS-3 inactivates Reelin. J Neurosci 37:3181-3191.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3632-16.2017
査読有
- ⑥ Uemura T, Shiroshima T, Maeda A, Yasumura M, Shimada T, Fukata Y, Fukata M, Yoshida T (2017) In situ screening for postsynaptic cell adhesion molecules during synapse formation. J Biochem 162:295-302.
DOI: 10.1093/jb/mvx030
査読有
- ⑦ Fukata Y, Fukata M. (2017) Epilepsy and synaptic proteins. Curr Opin Neurobiol 45:1-8
DOI: 10.1016/j.conb.2017.02.001
査読有
- ⑧ Fukata Y, Yokoi N, Miyazaki Y, Fukata M. (2017) The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. Neurosci Res 116:39-45.
DOI: 10.1016/j.neures.2016.09.011
査読有
- ⑨ Cho T, Ishii-Kato A, Fukata Y, Nakayama Y, Iida K, Fukata M, Iida H. (2017) Coupling of a voltage-gated Ca²⁺ channel homologue with a plasma membrane H⁺-ATPase in yeast. Genes Cells 22:94-104.
DOI: 10.1111/gtc.12458
査読有
- ⑩ Sugio S, Tohyama K, Oku S, Fujiyoshi K, Yoshimura T, Hikishima K, Yano R, Fukuda T, Nakamura M, Okano H, Watanabe M1, Fukata M, Ikenaka K, F Tanaka K. (2017) Astrocyte-mediated infantile-onset leukoencephalopathy mouse model. Glia 65:150-168.
DOI: 10.1002/glia.23084
査読有
- ⑪ Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. (2016)

Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. *J Neurosci* 36:6431-6444.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016
査読有

[学会発表] (計 13件)

① Masaki Fukata. 局所パルミトイル化サイクルによるシナプス・ナノドメイン構築 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (2017.12.8.)、神戸商工会議所 (兵庫県・神戸) 招待講演

② Yuko Fukata, Norihiko Yokoi, Kenta Kobayashi, Masaki Fukata. Assessment of palmitoylation status and cycles on PSD-95 in neurons and in vivo. 13th International congress of the Polish Neuroscience Society (2017.8.30.) (Warsaw, Poland)

③ Masaki Fukata. Role of local palmitoylation machinery in the postsynaptic nanodomain organization. 13th International congress of the Polish Neuroscience Society. (2017.8.29.) (Warsaw, Poland) 国際招待講演

④ Masaki Fukata. Local palmitoylation machinery in the postsynaptic nanodomain organization. 5th Annual iGluR Retreat (2017.8.9.) (New Haven, Connecticut, U.S.A.) 国際招待講演

⑤ Yuko Fukata, Norihiko Yokoi, Kenta Kobayashi, Masaki Fukata. Assessment of palmitoylation status and cycles on PSD-95 in neurons and in vivo. 5th Annual iGluR Retreat (2017.8.8.) (New Haven, Connecticut, USA)

⑥ Masaki Fukata. Pathophysiological role of epilepsy-related LGI1 and ADAM22 in hippocampal synaptic development. Spring Hippocampal Research Conference (2017.6.14.) (Taormina, Sicily, Italy) 国際招待講演

⑦ Masaki Fukata. Regulatory mechanisms

for AMPA receptors through PSD-95. The 47th NIPS International Symposium “Decoding Synapses” (2016.10.26.) 岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市) 主催および講演

⑧ Masaki Fukata. Regulators of glutamate receptors and epilepsy. 第50回日本てんかん学会学術集会 (2016.10.7.) グランシップ (静岡県・静岡市) 招待講演

⑨ Masaki Fukata. The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and disorders. Brain protein aging and dementia control: International workshop 2016 (2016.9.9.) 名古屋大学医学部鶴友会館 (愛知県・名古屋市) 招待講演

⑩ Masaki Fukata. Postsynaptic nanodomains regulated by local palmitoylation machinery. Invited Lecture at Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) (2016.7.11.) (Magdeburg, Germany) 国際招待講演

⑪ Masaki Fukata. Molecular mechanisms of PSD95 (de)palmitoylation. Invited Lecture at Medizinische Hochschule Hannover, (2016.7.8.) (Hannover, Germany) 国際招待講演

⑫ Masaki Fukata, Norihiko Yokoi, Atsushi Sekiya, Tatsuro Murakami, Kenta Kobayashi, Yuko Fukata. Postsynaptic nanodomains regulated by local palmitoylation machinery. 10th Forum of Neuroscience (FENS) (2016.7.5.) (Copenhagen, Denmark) 国際招待講演

⑬ Yuko Fukata, Norihiko Yokoi, Atsushi Sekiya, Tatsuro Murakami, Kenta Kobayashi, Masaki Fukata. PSD organization regulated by PSD-95 palmitoylation machinery. 10th Forum of Neuroscience, (2016.7.3.) (Copenhagen, Denmark)

[図書] (計 1件)

① 深田優子、横井紀彦、宮崎裕理、深田正紀 (2016) 記憶・学習とメンブレントラフィック 化学同人「メンブレントラフィック」 pp156-169 総ページ数 264
ISBN: 9784759817232

[その他]

ホームページ等

① 生理学研究所 生体膜研究部門
<http://www.nips.ac.jp/fukata/>

② 生理学研究所 研究報告

http://www.nips.ac.jp/nips_research/2016/06/psd-95.html

6. 研究組織

(1) 深田 正紀 (FUKATA, Masaki)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・教授
研究者番号：00335027

(4) 研究協力者

深田 優子 (FUKATA, Yuko)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・准教授

研究者番号：40416186

横井 紀彦 (YOKOI, Norihiko)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教
研究者番号：50710969

平田 哲也 (HIRATA, Tetsuya)

生理学研究所・分子細胞生理研究領域・特任助教

研究者番号：90780651

稲橋 宏樹 (INAHASHI, Hiroki)

京 卓志 (KANADOME, Takashi)

鈴木 由美 (SUZUKI, Yumi)

渡辺 聖愛 (WATANABE, Mie)