

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650187

研究課題名（和文）脳内各領域での神経伝達物質受容体翻訳後修飾パターンの同定と応用

研究課題名（英文）Identification and analysis of post-translational protein modifications of neurotransmitter receptors

研究代表者

林 崇 (HAYASHI TAKASHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80547472

研究成果の概要（和文）：本研究は、哺乳類中枢神経系の主要な興奮性神経伝達を担うイオンチャンネル型グルタミン酸受容体について、パルミトイル化等の可逆的な翻訳後修飾に着目し、脳内での時空間的な翻訳後修飾パターンの同定とその変化の解析を行なった。AMPA受容体自体のパルミトイル化に加え、大脳皮質および海馬神経細胞において、AMPA受容体結合タンパク質GRIP1のパルミトイル化による受容体局在制御を見出した。また、海馬神経細胞におけるNMDA受容体のシナプスへの移行が、パルミトイル化依存的に制御される機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the ionotropic glutamate receptors (iGluRs), post-translational protein modifications of AMPA receptors and NMDA receptors modulate these receptor ion channel properties as well as the membrane trafficking of receptors to/from the post-synapses. Through this program, we focused on palmitoylation-dependent regulation of iGluR function. Our findings revealed novel roles of palmitoylation of AMPA receptor-binding protein GRIP1, which regulates dynamic trafficking of AMPA receptors in cortical and hippocampal neurons. In addition, we showed that synaptic delivery of NMDA receptors is controlled by their dual palmitoylation in hippocampal CA1 pyramidal neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学／神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質、グルタミン酸、受容体、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム研究の重要性が指摘される時代にあって、タンパク質の機能を制御する翻訳後修飾機構の研究が重要な意味を持つことは論を俟たない。タンパク質の機能は、単純に遺伝子の指定するアミノ酸配列や発現部位および発現量のみで規定されるもの

ではなく、様々な翻訳後修飾により空間的かつ時間的にダイナミックな制御がなされている。実際、これまでに様々なタンパク質について、リン酸化をはじめとした多くの翻訳後修飾による制御が明らかにされている。

タンパク質翻訳後修飾の重要性は脳神経系においても同様であり、多くのイオンチャ

ンネルや神経特異的受容体がリン酸化等の翻訳後修飾により制御されることが示されている。現在、学習や記憶といった脳の高次機能の分子・細胞レベルの基盤は、神経細胞同士のつながりであるシナプスにおける伝達効率の可塑的な変化（シナプス可塑性）により、主に説明がなされている。そして、シナプス局在タンパク質のリン酸化や脂質付加機構の一種であるパルミトイル化といった、可逆的な翻訳後修飾による制御は、最も考え易いシナプス可塑性の基礎的な分子実体である。

哺乳類中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質は、グルタミン酸である。グルタミン酸作動性シナプスにおいて、興奮性シナプス伝達とシナプス可塑性は、シナプス後膜上のグルタミン酸受容体により担われている。実際に、大脳皮質、海馬あるいは小脳といった幾つかの脳領域内の神経回路で、グルタミン酸受容体およびその結合タンパク質群からなる複合体が、それぞれリン酸化やパルミトイル化修飾を受け、イオンチャンネルとしての機能や神経細胞での局在あるいは輸送過程が制御されることが明らかになってきた。

これまでに研究代表者は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の内、AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)およびNMDA型グルタミン酸受容体(NMDA受容体)自体のチロシンリン酸化(Hayashi T. *et al.* Nature. (1999); Hayashi T. and Huganir R.L. J. Neuroscience. (2004))およびパルミトイル化(Hayashi T. *et al.* Neuron. (2005); Hayashi T. *et al.* Neuron. (2009))の翻訳後修飾による制御機構を明らかにしてきた。しかしながら、それぞれのグルタミン酸受容体複合体を構成する各タンパク質が受けている様々な翻訳後修飾が、脳内各領域の神経細胞内の特定部位で、どの様な分子反応過程を経て行なわれ、また脳全体においてどの様に統合的に制御されて、脳高次機能の調節と関わっているのかと言う問題に関しては、未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は、代表的な神経伝達物質受容体として、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の翻訳後修飾による制御機構に着目した。第一に、脳内各領域の興奮性シナプスにおける、これらグルタミン酸受容体とその結合タンパク質の*in vivo*翻訳後修飾の同定を試みた。更に、翻訳後修飾による時空間的な制御パターンの変動を詳細に解析した。そして、脳神経機能の発現と維持の過程で、神経伝達物質受容体およびその結合分子群の翻訳後修飾による制御機構が如何なる役割を持つかについて、生物学的な意義付けを行なうことを

目的とした。前述の知見をふまえ、特に、脳内各領域におけるAMPA受容体およびその結合タンパク質とNMDA受容体のパルミトイル化修飾を解析の対象とした。

脳の機能変調として精神疾患の発症が起こる。本研究では、従来解析の進んでいなかったパルミトイル化に関わる精神疾患関連遺伝子産物の機能解析という視点からも、新たに研究を進めた。また、現在、技術的な発展が著しいマス・スペクトル法を応用することにより、*in vivo*でのグルタミン酸受容体パルミトイル化の同定を行なった。殊に、以下の三つの具体的目標に焦点を絞り、研究を進めた。

- (1) 精神疾患に関連するパルミトイル化酵素の機能解析を通し、グルタミン酸受容体結合タンパク質のパルミトイル化の意義付けを行なう。
- (2) マス・スペクトル法を応用し、生体脳内におけるグルタミン酸受容体パルミトイル化を同定する。
- (3) 電気生理学的手法により、グルタミン酸受容体のパルミトイル化に伴うシナプス発現の制御機構を明らかにする。

当研究で得られた成果から、哺乳類脳各領域での時空間的なタンパク質翻訳後修飾状態の変化と神経機能との関連性について、理解が深まるものと考えられる。将来的にはこれらの研究成果を基盤として、健常人の学習・記憶過程や意識の変化に応じた、脳全体での翻訳後修飾の時空間的な変化パターンを明瞭にとらえる技法を確立し、更に、それを脳機能の変調としての精神疾患の診断に応用することが期待される。

3. 研究の方法

(1)AMPA受容体結合タンパク質のパルミトイル化による機能制御

シナプス後膜でのAMPA受容体発現は、興奮性シナプス伝達とシナプス可塑性の過程で重要な役割を果たす。神経細胞におけるAMPA受容体の発現制御機構の一つとして、AMPA受容体自体およびAMPA受容体結合タンパク質のパルミトイル化修飾が示されている(Hayashi T. *et al.* Neuron. (2005))。本研究では、AMPA受容体結合タンパク質GRIP1のパルミトイル化による、樹状突起でのAMPA受容体の局在と輸送の制御に関して解析を行なった。

①パルミトイル化を触媒する一群のパルミトイル・アシルトランスフェラーゼは、哺乳類で20種類以上が同定されている。その内、双極性障害および統合失調症にそれぞれ関連するDHHC-5とDHHC-8は、神経系で高発現を示す。DHHC-5/8は、他のパルミトイル・アシルトランスフェラーゼと比較して、長いC

末端細胞内領域を持ち、特にC末端アミノ酸配列は両者に共通で、II型PDZドメインのリガンド配列(EISV)である。ツー・ハイブリッド・スクリーニング法および免疫共沈実験とGST融合タンパク質を用いた結合実験により、DHHC-5/8のC末端部位に会合し得るAMPA受容体結合タンパク質を同定し、その結合様式を解析した。

②次いで、トリチウムラベルしたパルミチン酸によるラベリング法とアシル・ピオチン交換法により、HEK293T細胞に目的タンパク質をトランスフェクションした系で、GRIP1パルミトイル化がDHHC-5およびDHHC-8によって亢進されるかどうかを生化学的に検討した。また、パルミトイル化阻害剤2-プロモパルミチン酸を培養神経細胞の培地中に添加した条件下で、アシル・ピオチン交換法により、GRIP1パルミトイル化の代謝回転速度を決定した。

③同時に、大脳皮質および海馬の培養神経細胞中でのDHHC-5およびDHHC-8の局在を抗体染色法により可視化解析した。また、DHHC-5/8依存的なGRIP1パルミトイル化とタンパク質発現量変化を、②で用いた生化学的ラベリング法およびウエスタンブロット法により解析した。

④海馬培養神経細胞中で、パルミトイル化に伴うGRIP1とGRIP1結合タンパク質との会合変化およびGRIP1の局在変化を免疫共沈法と抗体染色法により解析した。

⑤更に、培養海馬神経細胞に、pH感受性GFPであるpHluorinのタグを付けたAMPA受容体GluA2サブユニット(pH-GluA2)をトランスフェクションし、pH-GluA2の神経細胞表面発現を、蛍光顕微鏡によるライブイメージング法で継時観察した。この実験系を用い、DHHC-5、パルミトイル化GRIP1および非パルミトイル化GRIP1により、AMPA受容体の局在と輸送がどのような制御を受けているかを検討した。

(2) 生体脳内におけるNMDA受容体パルミトイル化の同定

大脳皮質および海馬に発現する機能的NMDA受容体は、GluN1(NR1)サブユニットおよびGluN2A(NR2A)サブユニットあるいはGluN2B(NR2B)サブユニットからなる、ヘテロ・テトラマーとして構成される。生後発症初期には、GluN1(NR1)とGluN2B(NR2B)からなるNMDA受容体が主に発現し、順次、GluN2A(NR2A)を含むNMDA受容体の発現が増加する。

この内、NMDA受容体の基本的構成サブユニットであるGluN1(NR1)は、パルミトイル化修飾を受けない。それに対し、制御サブユニットであるGluN2A(NR2A)とGluN2B(NR2B)は、C末端細胞内領域の共通配列部分にある二ヶ所のシステイン・クラスター部位(システ

イン・クラスターIおよびII)がパルミトイル化される。これら二ヶ所のパルミトイル化部位は、それぞれ、神経細胞での細胞表面発現(システイン・クラスターI)とゴルジ体での局在(システイン・クラスターII)を制御している(Hayashi T. *et al.* Neuron. (2009))。この機構は、大脳皮質培養神経細胞を用いた*in vitro*における知見であるが、本研究において、更に生体*in vivo*におけるNMDA受容体パルミトイル化修飾の同定を試みた。

具体的手法としては、生後初期から発現しているGluN2B(NR2B)サブユニットに対する特異的抗体を用い、成体マウス(10週齢オス)全脳可溶化液からGluN2B(NR2B)を含むNMDA受容体を免疫沈降法で単離した。そして、調整したサンプルをトリプシン処理して小ペプチドに切断し、修飾に伴う分子量変化をマス・スペクトル法で解析し、生体内でGluN2B(NR2B)が受けているパルミトイル化等の翻訳後修飾を検討した。以上の方法により、*in vivo*におけるNMDA受容体パルミトイル化の同定を行なった。

(3) NMDA受容体パルミトイル化のシナプス局在・輸送における意義付け

本研究において、NMDA受容体自体のパルミトイル化修飾により、シナプスでのNMDA受容体の局在と輸送過程がどのように制御されているかを解明し、また、その生理的意義を明らかにするため、電気生理学的手法を用いた解析を行なった。

培養海馬スライスに、電気生理学的標識タグ(N598R)を入れたGluN1(NR1)および蛍光標識であるGFPタグを付けたGluN2A(NR2A)もしくはGluN2B(NR2B)の野生型、あるいはパルミトイル化修飾部位(システイン・クラスターIおよびII)のそれぞれのシステイン残基をセリンに置換して、パルミトイル化修飾を起こらない様に改変した変異体を発現させた。そして、GFP蛍光により、トランスフェクションしたNMDA受容体を発現している海馬CA1領域錐体細胞を同定し、whole cell recordingを行なった。そして、GluN1(NR1) / GFP-GluN2A(NR2A) および GluN1(NR1) / GFP-GluN2B(NR2B)の野生型と非パルミトイル化変異体から記録される反応を比較して、システイン・クラスターIおよびIIの各パルミトイル化がNMDA受容体のシナプス発現に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1)AMPA受容体結合タンパク質のパルミトイル化による機能制御

双極性障害および統合失調症といった精神疾患に関連するパルミトイル化酵素による、AMPA受容体結合タンパク質のパルミト

イル化修飾に関して、上記の方法により解析を行なった。その結果、以下の研究成果を得た。

①パルミトイル・アシルトランスフェラーゼ DHHC-5とDHHC-8が、そのC末端共通アミノ酸配列部分を介し、AMPA受容体結合タンパク質の一種であるPDZドメイン含有タンパク質GRIP1のPDZドメイン4, 5, 6に会合することを見出した。

②GRIP1には、GRIP1aおよびGRIP1bの二種類のN末端スプライシング・バリエーションが存在し、この内、GRIP1bのみがパルミトイル化される。パルミトイル化阻害剤2-プロモパルミチン酸を用いた実験から、神経細胞中でGRIP1bは急速なパルミトイル化と脱パルミトイル化を繰り返しており、その半減期は35分程度と見積られた。この値は、これまでに知られているパルミトイル化タンパク質の中で最も速い代謝回転率であり、GRIP1bが神経機能の動的制御に関わる可能性を示唆する。更に、HEK293T細胞中で、DHHC-5とDHHC-8はそのC末端を介して会合するGRIP1bを基質とし、パルミトイル化を亢進した。shRNAを用いた内在性遺伝子発現ノックダウン実験により、神経細胞においては、特にDHHC-5が主要なGRIP1bパルミトイル化酵素と考えられた。DHHC-5やDHHC-8と異なり、ゴルジ体に局在するパルミトイル・アシルトランスフェラーゼDHHC-3(GODZ)およびDHHC-7には、GRIP1bパルミトイル化への影響は見られなかった。

③神経細胞において、DHHC-8が主にシナプスに局在するのに対し、DHHC-5は樹状突起のエンドソームに存在することを明らかにした。また、大脳皮質培養神経細胞において、GRIP1bの発現は培養5日目から見られた。GRIP1bパルミトイル化は、DHHC-5の発現時期に対応して、培養12-19日目から上昇することを確認した。

④キネシンモータータンパク質KIF5Cは、神経細胞の樹状突起において、AMPA受容体を含む輸送小胞の軸索輸送を制御することが報告されている。培養海馬神経細胞において、DHHC-5依存的なGRIP1bパルミトイル化は、GRIP1bと軸索輸送に関わるKIF5Cとの結合を上昇させた。また、それに伴い、樹状突起でのGRIP1b局在が促進された。

⑤NMDA受容体の活性化により、樹状突起において、細胞膜表面に発現するAMPA受容体の細胞内への取り込みとリサイクリングが起こる。この過程で、DHHC-5によるGRIP1bパルミトイル化が、AMPA受容体の樹状突起の細胞膜表面からリサイクリング・エンドソームへの移行を促進することを見出した。

以上の研究を通じ、DHHC-5/8に触媒されるGRIP1bパルミトイル化が、GRIP1bを樹状突起のエンドソームに局在させ、更にAMPA受

容体の局在と輸送を制御する分子機構が明らかになった。そして、DHHC-5あるいはDHHC-8の異常が、GRIP1パルミトイル化の変化を介してAMPA受容体の輸送に影響を与え、興奮性シナプス制御の変調をもたらし、ひいては双極性障害および統合失調症の様な精神疾患を誘発する可能性が示唆された(Thomas G.M. *et al.* Neuron. (2012))。

(2) 生体脳内におけるNMDA受容体パルミトイル化の同定

生体でのグルタミン酸受容体の翻訳後修飾に関し、マス・スペクトル法を用いた解析を行なった。そして、成体マウス全脳可溶化液から調整したNMDA受容体のGluN2B(NR2B)サブユニットについて、以前に*in vitro*レベルで見出していたパルミトイル化修飾部位が、*in vivo*でもパルミトイル化を受けていることを一部同定した。

(3) NMDA受容体パルミトイル化のシナプス局在・輸送における意義付け

NMDA受容体GluN2A(NR2A)サブユニットおよびGluN2B(NR2B)サブユニットの細胞内に二ヶ所ずつ存在するパルミトイル化部位それぞれに関し、電気生理学的手法を用いた解析を行なった。その結果、GluN1(NR1) / GluN2A(NR2A)からなるNMDA受容体とGluN1(NR1) / GluN2B(NR2B)からなるNMDA受容体は共に、システイン・クラスターIに非パルミトイル化変異があると、シナプスでのNMDA受容体発現量は低下した。このことから、GluN2(NR2)サブユニットのシステイン・クラスターI部位のパルミトイル化により、NMDA受容体の神経細胞表面での発現が上昇するのみならず、シナプス後膜でのNMDA受容体発現も亢進されていると考えられた。また、ゴルジ体局在を制御するシステイン・クラスターII部位の非パルミトイル化変異体は、野生型と比較して、シナプスでのNMDA受容体発現量に関し、有意な差を示さなかった。GluN2(NR2)サブユニットのシステイン・クラスターIIのパルミトイル化により、NMDA受容体はゴルジ体に局在する。また、この部位の脱パルミトイル化により、NMDA受容体はゴルジ体から神経細胞表面に移行し、細胞表面発現が上昇する。今回の実験結果より、システイン・クラスターIIの脱パルミトイル化に伴って細胞表面に輸送されたNMDA受容体がシナプスに組み込まれるには、更に厳密な制御機構が存在することが示唆された。

以上の研究を通じ、NMDA受容体パルミトイル化によるシナプス局在と細胞内輸送過程の詳細な制御機構およびその生理的意義を明らかにした(Mattison H.A. *et al.* PLoS One. (2012))。

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2件)

1. Mattison H.A., Hayashi T., Barria A.
Palmitoylation at two cysteine clusters on the C-terminus of GluN2A and GluN2B differentially control synaptic targeting of NMDARs.

PLoS One. 7, e49089 (2012) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0049089.

2. Thomas G.M., Hayashi T., Chiu S.L., Chen C.M., Huganir R.L.

Palmitoylation by DHHC5/8 targets GRIP1 to dendritic endosomes to regulate AMPA-R trafficking.

Neuron. 73, 482-496 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.021.

[学会発表] (計4件)

1. 林 崇、吉田 知之、三品 昌美
知的障害・自閉症関連蛋白質IL1RAPL1によるRhoAを介した興奮性シナプス制御
第86回日本薬理学会年会 口頭発表、2013年3月23日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

2. George J., Karnam S., Hayashi T., Huganir R.L., Thomas G.M.

PDZ domain-containing proteins are binding partners and substrates for a specific subgroup of palmitoyltransferases.

Biochemical Society Focused Meeting, Regulation of protein trafficking and function by palmitoylation, 2012年8月24日、St. Anne's College, Oxford, UK

3. 林 崇、吉田 知之、三品 昌美
知的障害・自閉症関連蛋白質IL1RAPL1による興奮性シナプスでのAMPA型グルタミン酸受容体局在・輸送機構の調節
第85回日本薬理学会年会 口頭発表、2012年3月16日、国立京都国際会館(京都府京都市)

4. Hayashi T.

Post-translational protein modification and regulation of AMPA receptors and NMDA receptors.

第34回日本分子生物学会年会 シンポジウム発表(招待講演)、2011年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

林 崇 (HAYASHI TAKASHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80547472

- (2) 研究分担者

なし

- (3) 連携研究者

なし