

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26291045  
研究課題名(和文) 真の脱パルミトイル化酵素の同定と生理機能の解明

研究課題名(英文) Identification of depalmitoylating enzymes

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：パルミトイル化修飾は多くのシグナル蛋白質や膜蛋白質にみられる脂質修飾であり、蛋白質の局在や機能を制御する。近年、私共は哺乳動物においてパルミトイル化酵素群を単離し、様々な基質蛋白質に対する責任酵素を同定し、それらの生理機能を明らかにしてきた。一方、パルミトイル化脂質修飾が発見されて35年以上を経ても、“脱パルミトイル化反応”を担う“真の責任酵素”は明らかになっていなかった。本研究では神経シナプスの足場蛋白質PSD-95に対する脱パルミトイル化酵素として、ABHD17sを世界に先駆けて同定することに成功した(Yokoi, Fukata Y et al, J Neurosci 2016)。

研究成果の概要(英文)：Protein palmitoylation, the most common lipid modification, dynamically regulates neuronal protein localization and function. Its unique reversibility is conferred by DHHC-type palmitoyl acyl-transferases (palmitoylating enzymes) and still controversial palmitoyl-protein thioesterases (depalmitoylating enzymes). Here, we identified the membrane-anchored serine hydrolases, ABHD17A, 17B, and 17C, as the physiological PSD-95 depalmitoylating enzyme that regulates PSD-95 palmitoylation cycles in neurons. This study describes the first direct evidence for the neuronal depalmitoylating enzyme and provides a new aspect of the dynamic regulatory mechanisms of synaptic development and synaptic plasticity. In addition, our established APEGS assay, which provides unbiased and quantitative information about the palmitoylation state and dynamics, revealed the distinct regulatory mechanisms for synaptic palmitoylation.

研究分野：神経科学

キーワード：パルミトイル化修飾 シナプス 脱パルミトイル化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

パルミトイル化修飾は多くのシグナル蛋白質や膜蛋白質にみられる代表的な脂質修飾であり、蛋白質を特定の膜ドメインに輸送し、その局在や機能を制御する。パルミトイル化は他の脂質修飾とは異なり可逆的であり、リン酸化修飾と同様に、外界刺激に反応して細胞機能をダイナミックに制御している。近年、私共は哺乳動物においてパルミトイル化酵素群を世界に先駆けて単離し、様々な基質蛋白質に対する責任酵素を同定し、それらの生理機能と制御機構を明らかにしてきた。一方、パルミトイル化脂質修飾が発見されて35年以上を経ても、“脱パルミトイル化反応”を担う“真の責任酵素”は未だ明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、脱パルミトイル化酵素を同定し、パルミトイル化修飾機構の全容解明を目指す。とりわけ、神経シナプス後部膜形成において中心的な役割を担う足場蛋白質 PSD-95 に対する生理的な脱パルミトイル化酵素を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

パルミトイル化反応は蛋白質の特定のシステイン残基に飽和脂肪酸であるパルミチン酸をチオエステル結合により共有結合させる反応である。したがって、脱パルミトイル化酵素はチオエステル結合を加水分解するチオエステラーゼに属すると考えられる。酵素分類学上、チオエステラーゼは代謝性セリン加水分解酵素 (metabolic serine hydrolase) に属することから、これまで明らかかな酵素活性が見出されていないセリン加水分解酵素群の中から脱パルミトイル化酵素を単離、同定することを目指した。

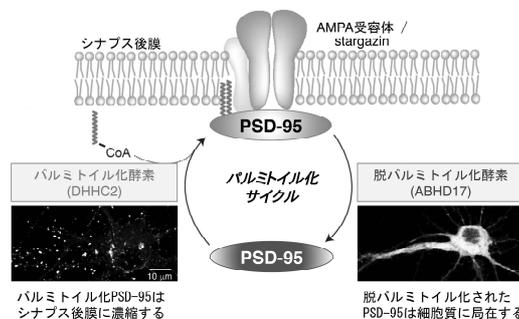
### 4. 研究成果

(1) 私共は、機能がよく分かっていない38種類のセリン加水分解酵素の中から PSD-95 を脱パルミトイル化する活性を有する候補酵素を7種類単離した。中でも ABHD17A, 17B, 17C の3種類は、過剰発現により、内在性 PSD-95 のパルミトイル化レベルを著しく減少させることを見出した。また、これら3種類の ABHD17 のノックダウンにより、PSD-95 の脱パルミトイル化プロセスが神経細胞において、著しく遅延することを見出し、ABHD17 が生理的な脱パルミトイル化酵素であることを示した (Yokoi, Fukata Y et al, J Neurosci 2016)。

(2) また、私共は独自に開発した APEGS 法 (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) により、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。

このように、本研究では、(1) PSD-95 の生理的脱パルミトイル化酵素として ABHD17s を同定し、(2) パルミトイル化状態を客観的に定量できる手法 (APEGS 法) を開発し、当該分野の発展に大いに貢献した (F1000Prime recommended)。



図：パルミトイル化酵素 DHHC2 と脱パルミトイル化酵素 ABHD17 により PSD-95 のパルミトイル化サイクルおよびシナプス局在が制御される。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計16件)

① 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

② 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

③ 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

④ Cho T, Ishii-Kato A, Fukata Y, Nakayama Y, Iida K, Fukata M., Iida H. (2017) Coupling of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel homologue with a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast. *Genes Cells* 22:94-104.  
Doi: 10.1111/gtc.12458  
査読有

⑤ Sugio S, Tohyama K, Oku S, Fujiyoshi K, Yoshimura T, Hikishima K, Yano R, Fukuda T, Nakamura M, Okano H, Watanabe M, 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

⑥ Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M (2016) Local palmitoylation cycles and specialized membrane domain organization. *Curr Top Membr* 77:97-141.

Doi: 10.1016/bs.ctm.2015.10.003

査読有

⑦ 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

⑧ Muona M, Fukata M, Anttonen A, Laari A, Palotie A, Pihko H, Lönnqvist T, Valanne L, Somer M, Fukata M, Lehesjoki A. (2016) Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. *Neurol Genet* 2:e46.

Doi: 10.1212/NXG.0000000000000046

査読有

⑨ Loveroa KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA (2015) The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:E4129-37.

Doi: 10.1073/pnas.1511910112

査読有

⑩ Fukata M, Sekiya A, Murakami T, Yokoi N, Fukata Y (2015) Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles. *Biochem Soc Trans* 43:199-204.

Doi: 10.1042/BST20140238

査読無

⑪ Suzuki M, Murakami T, Cheng J, Kano H, Fukata M, Fujimoto T (2015) ELMOD2 is anchored to lipid droplets by palmitoylation and regulates ATGL recruitment. *Mol Biol Cell*

15:26:2333-2342.

Doi: 10.1091/mbc.E14-11-1504

査読有

⑫ Zhu D, Li C, Swanson AM, Villalba RM, Guo J, Zhang Z, Matheny S, Murakami T, Stephenson JR, Daniel S, Fukata M, Hall RA, Olson JJ, Neigh GN, Smith Y, Rannie DG, Van Meir EG (2015) BAI1 regulates spatial learning and synaptic plasticity in the hippocampus. *J Clin Invest* 125:1497-508.

Doi: 10.1172/JCI74603

査読有

⑬ Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, Takahashi N, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, Fukata M (2015) Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 21:19-26.

Doi: 10.1038/nm.3759

査読有

⑭ Gory-Fauré S, Windscheid V, Brocard J, Montessuit S, Tsutsumi R, Denarier E, Fukata Y, Bosc C, Delaroché J, Collomb N, Fukata M, Martinou J, Pernet-Gallay K, Andrieux A. (2014) Non-microtubular localizations of Microtubule Associated Protein 6 (MAP6). *PLoS One*, 9:e114905.

Doi: 10.1371/journal.pone.0114905

査読有

⑮ Ohkawa T, Satake S, Yokoi N, Miyazaki Y, Ohshita T, Sobue G, Takashima H, Watanabe O, Fukata Y, Fukata M (2014) Identification and characterization of GABA<sub>A</sub> receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis. *J Neurosci* 34:8151-8163.

Doi:10.1523/JNEUROSCI.4415-13.2014

査読有

⑯ Kegel L, Jaegle M, Driegen S, Aunin E, Leslie K, Fukata Y, Watanabe M, Fukata M, Meijer D (2014) Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. *Development* 141:1749-1756.

Doi: 10.1242/dev.107995

査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① Masaki Fukata. (2016. 10. 26) Regulatory mechanisms for AMPA receptors through PSD-95. The 47th NIPS International Symposium “Decoding Synapses”, 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
- ② Masaki Fukata. (2016. 10. 7) Regulators of glutamate receptors and epilepsy. 第50回日本てんかん学会学術集会, グランシップ (静岡県・静岡市) 招待講演
- ③ Masaki Fukata. (2016. 9. 9) The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and disorders. Brain protein aging and dementia control: International workshop 2016, 名古屋大学医学部鶴友会館 (愛知県・名古屋市) 招待講演
- ④ Masaki Fukata. (2016. 7. 11) Postsynaptic nanodomains regulated by local palmitoylation machinery. Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) (Magdeburg, Germany) (国際招待講演)
- ⑤ Masaki Fukata. (2016. 7. 8) Molecular mechanisms of PSD95 (de)palmitoylation. Medizinische Hochschule Hannover, (Hannover, Germany) (国際招待講演)
- ⑥ Masaki Fukata, Norihiko Yokoi, Atsushi Sekiya, Tatsuro Murakami, Kenta Kobayashi, Yuko Fukata. (2016. 7. 5) Postsynaptic nanodomains regulated by local palmitoylation machinery. 10th Forum of Neuroscience (FENS), (Copenhagen, Denmark) (国際招待講演)
- ⑦ Masaki Fukata. (2016. 2. 19) The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and disorders. 第二回 Neuroscience Network Symposium in Kobe, 神戸大学医学部神緑会館 (兵庫県・神戸市) (招待講演)
- ⑧ Masaki Fukata. (2015. 12. 15) Postsynaptic nanodomain regulated by PSD-95 palmitoylation machinery. Pacificchem 2015, (Honolulu, HI, USA) (国際招待講演)
- ⑨ 深田正紀 (2015. 12. 3) Local palmitoylation cycles organize postsynaptic nanodomains. 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市) (招待講演)

⑩ Masaki Fukata. (2015. 7. 30) Role of LGI1-ADAM22 in synaptic function and disorders. 第38回日本神経科学大会, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市) (招待講演)

⑪ Masaki Fukata. (2015. 7. 22) Regulatory mechanism for local palmitoylation cycles on PSD-95. FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains”. (Saxtons River, VT, USA) (主催および国際招待講演)

⑫ Masaki Fukata. (2015. 6. 30) Postsynaptic nanodomains organized by PSD-95 palmitoylation machinery. 第67回日本細胞生物学会大会, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区) (招待講演)

⑬ Masaki Fukata. (2015. 3. 23) Specialized membrane nanodomain organized by lipid modification “Synaptic organization regulated by PSD-95 palmitoylation machinery”. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/大会第92回日本生理学会大会合同大会, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市) (招待講演)

⑭ Masaki Fukata. (2014. 11. 16) Synaptic organization regulated by palmitoylating and depalmitoylating enzymes of PSD-95. 44th annual meeting of Society for Neuroscience. (Washington DC, USA) (国際招待講演)

⑮ Masaki Fukata, Toshika Ohkawa, Norihiko Yokoi, Yuko Fukata. (2014. 10. 3) LGI1 autoantibodies in autoimmune-mediated limbic encephalitis. 第48回日本てんかん学会学術集会, 京王プラザホテル (東京都・新宿区) (招待講演)

⑯ Masaki Fukata. (2014. 9. 12) Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles. Biochemical Society Focused Meeting “Protein Acylation: from Mechanism to Drug Discovery”, (Edinburgh UK) (国際招待講演)

⑰ 深田正紀 (2014. 8. 2) 免疫性脳炎: 自己抗体によるシナプス機能異常. 第44回新潟神経学夏期セミナー, 新潟大学脳研究所 (新潟県・新潟市) (招待講演)

[図書] (計2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」

11 章:157-175.

② 横井紀彦、深田正紀、深田優子(2015) ケミカルシャペロンを用いた蛋白質構造異常の修復はてんかんモデルマウスの上昇したけいれん感受性を軽減する 細胞工学 (秀潤社) 34, 512-513.

[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](http://www.nips.ac.jp/nips_research/2016/06/psd-95.html)

③ 生理学研究所 プレスリリース

[http://www.nips.ac.jp/release/2014/12/post\\_285.html](http://www.nips.ac.jp/release/2014/12/post_285.html)

④ ライフサイエンス新着論文レビュー

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9607>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

関谷 敦志 (SEKIYA, Atsushi)

村上 達郎 (MURAKAMI, Tatsuro)

高橋 直樹 (TAKAHASHI, Naoki)

鈴木 由美 (SUZUKI, Yumi)

渡辺 聖愛 (WATANABE, Mie)