

平成 30 年 4 月 17 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04279

研究課題名(和文)AMPA型グルタミン酸受容体のシナプス捕捉機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms for AMPA-type glutamate receptor anchoring at the synapse

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)の神経活動依存的なシナプス後膜への動的移動は、シナプス可塑性の根幹的機構である。本研究では、AMPA受容体機能発現に必須の蛋白質PSD-95のパルミトイル化脂質修飾と蛋白質相互作用に着目して、AMPA受容体のシナプス捕捉制御機構を明らかにすることを目的とした。長らく不明であったPSD-95脱パルミトイル化酵素を見出し、シナプス後膜ドメイン形成の制御機構を明らかにした。またPSD-95と相互作用するてんかん関連リガンド・受容体LG11-ADAM22複合体のシナプス伝達における役割、シナプスにおける存在様式とその生理的意義を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：AMPA-type glutamate receptor (AMPA) mediates most of fast synaptic transmission in the brain. Although AMPAR dynamically enters and exits the postsynaptic membrane in a synaptic activity-dependent manner, the underlying molecular mechanism is still incompletely understood. In this study, we focused on palmitoylation and protein-protein interactions of PSD-95, an essential scaffolding protein for AMPAR. We discovered a novel enzyme, ABHD17, which catalyzes PSD-95 depalmitoylation and thereby plays an important role in the (re)organization of the postsynaptic platform for AMPAR anchoring. We also found that the epilepsy-related ligand/receptor complex of LG11 and ADAM22 regulates AMPAR functions through the direct interaction with PSD-95. Furthermore, we revealed the structural basis of the LG11-ADAM22 protein complex at the synapse and its patho-physiological role in epileptogenesis.

研究分野：神経科学、細胞生物学、生化学

キーワード：シナプス AMPA受容体 グルタミン酸受容体 パルミトイル化脂質修飾 PSD-95 てんかん 脱パルミトイル化 ナノドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

AMPA 受容体の動態制御機構はシナプス可塑性の根幹的機構として捉えられており、国内外の多くの精力的な研究により、サブユニットルール(GluA サブユニットの細胞内領域が AMPA 受容体動態特異性を制御する)を代表とする様々な AMPA 受容体の動態制御モデルが提唱されてきた。一方、研究代表者らなどによる一連の遺伝学および生化学的解析は、AMPA 受容体動態が TARP のような附属サブユニットと足場蛋白質 PSD-95 の結合により主に制御されることを示してきた。ごく最近では、シナプス外細胞膜には AMPA 受容体のリザーブプールが存在し、このプールがシナプス長期増強(LTP) 誘導刺激に応答してシナプス後膜(PSD)で捕捉されることが、LTP 発現の本態であるという説が提唱された。このような背景から PSD における足場蛋白質 PSD-95 の数や機能を時・空間的に制御する分子機構は、PSD の AMPA 受容体捕捉量に直結し、まさにシナプス可塑性や記憶形成の動作原理となると考えられる。

## 2. 研究の目的

PSD-95 は AMPA 受容体を PSD にアンカリング(捕捉)する主要な足場蛋白質であることから、PSD における PSD-95 の数や機能を時・空間的に制御する分子機構は、シナプス可塑性の動作原理となりうると期待される。本研究では、申請者らが独自に発見した、あるいは見出しつつある 1) PSD-95 の PSD 局在を制御するパルミトイル化サイクルと、2) PSD-95 と相互作用し脳病態と密接に関連する LGI1・ADAM22(リガンド・受容体)に着目して、PSD における AMPA 受容体の捕捉制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) PSD-95 パルミトイル化サイクルの分子実体の解明

研究代表者らはこれまで機能が報告されていないセリンヒドロラーゼ遺伝子をゲノムワイドに探索し 38 種類の遺伝子を単離していた。本研究では、それらの中から PSD-95 脱パルミトイル化酵素活性を有するものを単離する。さらに候補遺伝子群から、脳組織、海馬神経細胞に高発現し、神経細胞の細胞膜やポストシナプス膜領域に局在するものを選択する。次にノックダウン実験により、生理的な PSD-95 脱パルミトイル化酵素を同定する。神経細胞で高いノックダウン効率を得るため、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いる(生理研・小林憲太博士との共同研究)。さらに、PSD-95 脱パルミトイル化酵素の PSD ナノドメイン構築における役割と個体レベルの生理機能をノックダウンあるいはゲノム編集法によるノックアウト、ノックイン手法に

より明らかにする。

(2) LGI1・ADAM22 による PSD-95 の捕捉活性調節機構の解明

LGI1・ADAM22 と PSD-95 の結合の生理的意義を明らかにするために、まず ADAM22 KO マウス由来の培養神経細胞および培養海馬組織を用いて、電気生理学的に、シナプス AMPA 受容体量の変化を検討する(UCSF, Roger Nicoll 博士との共同研究)。この実験系に、PSD-95 結合活性を欠失、あるいは LGI1 結合活性を欠失した ADAM22 変異体を発現(分子置換)させ、AMPA 受容体機能が回復するか否かを検討する。また、LGI1-ADAM22 の構造解析やてんかん患者で見られる LGI1, ADAM22 の変異情報に基づき、LGI1-ADAM22 結合、ADAM22-PSD95 結合を阻害する変異を見出し、それら変異を有するマウスを作成してその表現型、病態を観察する。

## 4. 研究成果

(1) 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。とりわけ ABHD17A-C の 3 種類は、神経細胞の樹状突起内小胞膜および樹状突起棘突起に存在し、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、シナプスに存在する PSD-95 さらには AMPA 受容体の量が激減することを見出した。また、これら 3 種類の ABHD17 のノックダウンにより、神経細胞において PSD-95 の脱パルミトイル化が阻害され、パルミトイル化サイクルが遅延することを見出した(Yokoi, Fukata Y et al., J Neurosci 2016; Faculty of 1000, recommended)。長らく不明であった PSD-95 脱パルミトイル化酵素の実体を明らかにし、ABHD17 が神経細胞で脱パルミトイル化酵素として機能することを初めて示したものである。

(2) ADAM22 を欠損させた海馬 CA1 神経細胞において、AMPA 受容体と NMDA 受容体を介したシナプス伝達が減弱すること、そして ADAM22 と PSD-95 との結合がこれらシナプス伝達の制御に必須であることを明らかにした(UCSF Nicoll 博士との共同研究)。さらに、PSD-95 の AMPA 受容体制御機能には LGI1 が必須であることを明らかにした(Lovero, Fukata et al., PNAS 2015; Faculty of 1000, recommended)。一方、私共はエクソーム解析により、痙攣、知的障害と進行性の脳萎縮を呈する患者において、ADAM22 の複合ヘテロ接合型変異を見出した(ヘルシンキ大学、Lehesjoki 博士との共同研究、Muona, Fukata et al., Neurol Genet 2016)。そして、当該患者において見出した 2 種類の変異は ADAM22 の LGI1 との結合を阻害することを見出した。以上の結

果より、ADAM22 もまた LGI1 同様に AMPA 受容体を介したシナプス伝達を制御すること、そして、ADAM22 と LGI1 の結合が阻害されるとヒトにおいて重篤な脳疾患が惹起されることが明らかとなった。

(3) 東京大学、深井周也博士との共同研究により、LGI1-ADAM22 複合体の結晶構造を明らかにした (Yamagata, Miyazaki et al., Nat Commun in press)。LGI1-ADAM22 リガンド・受容体 (ヘテロ二量体) は、別の LGI1-ADAM22 ヘテロ二量体と結合しヘテロ四量体を形成することが明らかになった。ここで生じる LGI1-LGI1 間の結合は、LGI1 の異なるドメイン間でおこるユニークなものであった。さらに、ヒトてんかん家系で報告されている LGI1 変異の中に、この LGI1-LGI1 間結合を阻害する変異を見出し、この変異を導入した変異マウスがてんかん表現型を示すことを明らかにした。これらの知見は、LGI1-ADAM22 リガンド・受容体が脳機能に必須な経シナプス連結装置を形成することを示唆しており、LGI1-ADAM22 による AMPA 受容体制御機構を理解する上で極めて重要な結果である。

#### 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 12 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 Chen IS, Tateyama M, Fukata Y, Uesugi M, Kubo Y. (2017) Ivermectin activates GIRK channels in a PIP<sub>2</sub>-dependent, Gβγ-independent manner, and an amino acid residue at the slide helix governs the activation. J Physiol 595:5895-5912.  
DOI: 10.1113/JP274871  
査読有

④ 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

⑤ 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

⑥ 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

⑦ 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

⑧ Yokoi N<sup>#</sup>, Fukata Y<sup>\*,\*</sup>, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M\*. (2016) Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. J Neurosci 36:6431-6444.

<sup>#</sup>, equally contributed authors.

<sup>\*</sup>, co-corresponding authors

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016

査読有

⑨ 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

⑩ Muona M, Fukata Y, 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

⑪ Lovero 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

⑫ 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

[学会発表] (計 13 件)

① Fukata Y, Yokoi N, Kobayashi K, Fukata M. (2017. 8. 30) Assessment of palmitoylation status and cycles on PSD-95 in neurons and in vivo. 13th International Congress of the Polish Neuroscience Society (Warsaw, Poland) (招待発表)

② Fukata M, Yokoi N, Fukata Y. (2017. 8. 29) Role of local palmitoylation machinery in the postsynaptic nanodomain organization. 13th International Congress of the Polish Neuroscience Society (Warsaw, Poland) (招待講演)

③ Fukata Y, Yokoi N, Kobayashi K, and Fukata M. (2017. 8. 8) Assessment of palmitoylation status and cycles on PSD-95 in neurons and in vivo. 5th Annual iGluR Retreat (New Haven, USA)

④ Fukata Y. (2017. 3. 29) Genetic and acquired brain disorders due to dysfunction of the LGI1-ADAM22 ligand-receptor complex. 第94回日本生理学会大会、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市) (招待講演)

⑤ Fukata Y, Yokoi N, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. (2016. 7. 3) PSD organization regulated by PSD-95 palmitoylation machinery. 10th FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark)

⑥ Fukata M, Yokoi N, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata Y. (2016. 7. 5)

Postsynaptic nanodomains regulated by local palmitoylation machinery. 10<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark) (招待講演)

⑦ Fukata Y. (2016. 7. 11) Genetic and acquired brain disorders due to dysfunction of an epilepsy-related LGI1. Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) (Magdeburg, Germany) (招待講演)

⑧ 深田優子 (2015. 11. 6-7) ケミカルシャペロンによるてんかん原因遺伝子産物 LGI1 構造異常の修復、第10回臨床ストレス応答学会大会 シンポジウム「RNA ストレスとシャペロン療法」東京農工大学(東京都・府中市) (招待講演)

⑨ Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, Fukata M. (2015. 10. 19) Molecular pathogenic mechanisms of epilepsy caused by LGI1 mutations. 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, IL, USA)

⑩ Murakami T, Sekiya A, Fukata Y, Fukata M. (2015. 7. 29) Exploration of depalmitoylating enzymes regulating bi-directional trafficking of small GTPase HRas. 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、神戸国際展示場 (兵庫県・神戸)

⑪ Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Yokoi N, Kobayashi K, Fukata M. (2015. 7. 22) Postsynaptic nanodomains organized by local palmitoylation machinery. FASEB Science Research Conference “Protein lipidation, Signaling, and Membrane Domains” (Saxtons River, VT, USA)

⑫ Yokoi N, Sekiya A, Murakami T, Fukata Y, Fukata M (2015. 7. 22) Stoichiometric analysis of palmitoylation cycles on PSD-95 FASEB Science Research Conference “Protein Lipidation, Signaling, and Membrane Domains” (Saxtons River, VT, USA)

⑬ Murakami T, Sekiya A, Abe M, Sakimura K, Fukata Y, Fukata M. (2015. 7. 22) Characterization of a mouse model with genetic deletion of DHHC2 palmitoyl acyl transferase. FASEB Science Research Conference “Protein lipidation, Signaling, and Membrane Domains” (Saxtons River, VT, USA)

〔図書〕(計 3 件)

① 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

② 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」156-169.

③ 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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)

### (4) 研究協力者

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)

高橋 直樹 (TAKAHASHI, Naoki)

稲橋 宏樹 (INAHASHI, Hiroki)

関谷 敦志 (SEKIYA, Atsushi)

村上 達郎 (MURAKAMI, Tatsuro)

古川 佐千子 (FURUKAWA, Sachiko)

鈴木 由美 (SUZUKI, Yumi)