

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07017

研究課題名(和文) 翻訳後脂質修飾によるHCNチャネルの新たな制御機構

研究課題名(英文) S-palmitoylation as a novel regulatory machinery for HCN channels

研究代表者

伊藤 政之 (Itoh, Masayuki)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・科研費研究員

研究者番号：20442535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により神経や心ペースメーカー細胞において自発発火特性の制御を担う過分極誘発陽イオンチャネル(HCNチャネル)であるHCN1, HCN2, HCN4が実際にパルミトイル化を受けていることが明らかになった。HCN1, HCN2についてはパルミトイル化する責任酵素(Zdhhcタンパク質)の同定も行った。特に、HCN2についてはZdhhc3, Zdhhc7が細胞膜への移行には関与せず、既に細胞膜上に存在するチャネルの活性を調節している可能性を示唆する結果を得た。また、KCNHチャネルファミリーのKv10.1, Kv11.1, Kv12.2の3種のイオンチャネルがパルミトイル化を受けていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that among hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel family (HCN1-4), HCN1, HCN2 and HCN4, but not HCN3, are the targets of S-palmitoylation. Further, we identified palmitoylating enzymes that regulate the palmitoylation of HCN2 channel. Multiple Zdhhc-family of palmitoylating enzymes significantly increased the palmitoylation of HCN1 and HCN2 proteins. Especially, 5 Zdhhc proteins (Zdhhc2, Zdhhc3, Zdhhc7, Zdhhc15, and Zdhhc20) augmented the palmitoylation of HCN2 protein approximately over 10-fold of control level. When Zdhhc3 and Zdhhc7 were co-expressed with HCN2 in *Xenopus* oocytes, these enzymes reduced the current amplitude of HCN2 without affecting transport of HCN2 to plasma membrane. In addition, we found that among KCNH voltage gated K⁺ channel family, Kv10.1, Kv11.1 and Kv12.2 are novel targets of S-palmitoylation.

研究分野：分子生理学

キーワード：HCNチャネル パルミトイル化 翻訳後修飾 KCNHチャネル

1. 研究開始当初の背景

パルミトイル化 (S-パルミトイル化) はタンパク質のシステイン残基に炭素鎖 16 の飽和脂肪酸 (パルミチン酸) が結合する翻訳後脂質修飾の一つで、生化学的な手法により古くから知られてきた (Fukata M and Fukata Y, Nat Rev Neurosci 11: 161, 2010)。このパルミトイル化は、修飾に必要な明確なモチーフを持たず、その修飾が可逆的で細胞外シグナル等により調節を受けるといった特徴的な性質を持つ。三量体 G タンパク質の α サブユニットや低分子量 G タンパク質等の膜貫通部位を持たない膜表在性のタンパク質において、パルミトイル化は標的タンパク質の細胞膜への親和性を調節し、細胞膜 - 細胞内コンパートメントや細胞膜 - 細胞膜ドメイン (ラフトやカベオラ等) のシャトリングに関わり、標的タンパク質の機能制御に重要な役割を果たす。

更に近年、このパルミトイル化はイオンチャネルのような膜タンパク質においても新たな制御機構の一つとして注目され始めている (Shipston, JBC 286: 8709, 2011)。電位依存性 K⁺チャネルの Kv1.1, Kv1.5, BK チャネル、リガンド作動性イオンチャネルの AMPA 受容体、NMDA 受容体、ニコチン型アセチルコリン受容体等、イオンチャネルのパルミトイル化による制御が既に数多く報告されている。すなわちパルミトイル化はイオンチャネルのような膜貫通タンパク質においても細胞膜への移行に積極的に関与し、これに加え膜貫通部位ではない細胞内領域を細胞膜にアンカーさせチャネル機能を制御していることも明らかとなってきた。

2. 研究の目的

そこで本研究で我々は神経や心筋のペースメーカー細胞等の自発発火特性を有する細胞において重要な働きを担う HCN チャネル (HCN1-HCN4) にまずは注目し、パルミトイル化がこれらのチャネルの制御に関与している可能性について検証することを目的とした。以上の目的のため主に以下の 3 点に焦点を絞り実験を行った。

- (1) HCN チャネルはパルミトイル化されるのか?
- (2) HCN チャネルのどこがパルミトイル化サイトなのか?
- (3) HCN チャネルのパルミトイル化酵素または脱パルミトイル化酵素の同定

また、翻訳後修飾によるイオンチャネルの機能制御の更なる研究の進展のため以下の二点についても併せて実験を行った。

- (4) HCN チャネルの新たな翻訳後修飾の探索
- (5) パルミトイル化される新たなイオンチャネルの探索

3. 研究の方法

(1) ABE 法による HCN チャネルのパルミトイル化の検出

ABE (Acyl-biotinyl exchange) 法 (Driscoll RC and Green WN, Biotechniques 36: 276, 2004) はパルミトイル化タンパク質のシステインとパルミチン酸の結合 (チオエステル結合) がヒドロキシルアミンにより化学的に切断される性質を利用している。ヒドロキシルアミン処理により遊離したシステイン残基をシステイン反応性のビオチン化試薬によりラベルし、ストレプトアビジンを用いたウエスタンブロット法によりパルミトイル化タンパク質を検出する。

HEK293 細胞にトランスフェクション法により FLAG タグを付加した HCN チャネルを発現させ、細胞から全抽出液を調整し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降法により粗精製した後、ABE 法によりパルミトイル化タンパク質を検出する。

(2) ABE 法による HCN チャネルのパルミトイル化サイトの同定

in vitro mutagenesis により HCN チャネルの細胞内システインをアラニンに置換した変異体を作製する。(1) の実験と同様に、ABE 法によりパルミトイル化が消失する変異体を探索し、パルミトイル化サイトを生化学的に同定する。

(3) クリックケミストリー法による HCN チャネルのパルミトイル化酵素、脱パルミトイル化酵素の同定

2009 年に Tsutsumi らは、クローニングされた全 23 種のパルミトイル化酵素 (Palmitoyl acyltransferase; 以下 PAT) の cDNA を用いて三量体 G タンパク質 α サブユニットのパルミトイル化酵素を網羅的にスクリーニングし、同定した (Tsutsumi ら, MCB 29: 435, 2009)。一方、脱パルミトイル化酵素 (Palmitoyl protein thioesterase; 以下 PPT) は現在までに APT1, APT2, LYPLA1, PPT1 の 4 種類のみが同定されている。本研究でも同様のストラテジーを利用し HCN チャネルのパルミトイル化サイクルに関わる酵素の同定を目指す。すなわち HEK293 細胞に HCN チャネルと、PAT 全 23 種または PPT4 種を共発現させ、クリックケミストリー法 (Martin BR and Cravatt BF, Nat Methods 6: 135, 2009) により HCN1 及び HCN2 のパルミトイル化を増強または抑制する酵素を探索する。

(4) 免疫沈降法による HCN チャネルの SUMO 化の検出

HEK293 細胞にトランスフェクション法により FLAG タグを付加した HCN チャネルを発現させ、細胞から全抽出液を調整し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降法により粗精製した後、抗 SUMO 抗体を用いたウエスタンブロット法により SUMO 化タンパク質を検出する。

(5) ABE 法による K⁺チャンネルのパルミトイル化の検出

HEK293 細胞にトランスフェクション法により FLAG タグを付加した K⁺チャンネルを発現させ、細胞から全抽出液を調整し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降法により粗精製した後、ABE 法によりパルミトイル化タンパク質を検出する。

4. 研究成果

(1) HCN チャンネルはパルミトイル化されるのか？

哺乳類の HCN チャンネル HCN1-4 の 4 種の分子種について ABE 法によりパルミトイル化を受けるとどうか実験を行った。結果、HCN3 以外の 3 種の分子種 HCN1, HCN2, HCN4 が実際にパルミトイル化を受けていることが明らかになった (伊藤ら, JPS 2016)。

(2) HCN チャンネルのどこがパルミトイル化サイトなのか？

パルミトイル化される HCN チャンネルのうち HCN2 に着目しパルミトイル化サイトの同定を試みた。結果、HCN2 の N 末端細胞内領域に存在する 5 個のシステイン残基すべてがパルミトイル化されることがわかった (伊藤ら, JPS 2016)。

(3) HCN チャンネルのパルミトイル化酵素または脱パルミトイル化酵素の同定

クリックケミストリー法により HCN2 のパルミトイル化を促進する分子種を探索し、パルミトイル化酵素 Zdhhc タンパク質の全 24 種中 13 種の分子種が HCN2 のパルミトイル化を促進することが明らかになった。HCN1 についてもほぼ同様の分子種によってパルミトイル化されることがわかった。更に定量的な実験を行ったところ、Zdhhc2, Zdhhc3, Zdhhc7, Zdhhc15, Zdhhc20 が HCN2 のパルミトイル化を 10 倍以上促進することが分かった。この中でも特に活性の高い Zdhhc3 と Zdhhc7 について詳細に実験を進め、表面ビオチン化法による実験を行うと、これら 2 種の Zdhhc タンパク質は HCN2 の細胞膜への移行に影響を与えなかった。しかし、Zdhhc3 および Zdhhc7 はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた HCN2 チャンネル電流を有意に抑制した。以上の結果から、Zdhhc3, Zdhhc7 による HCN2 のパルミトイル化はチャンネルタンパク質の細胞膜への移行には関与せず、既に細胞膜上に存在するチャンネルタンパク質の活性を調節している可能性が示唆された。

一方、脱パルミトイル化酵素については現在既知の 4 種の分子種いずれも HCN2 のパルミトイル化を抑制できず、酵素の同定には至らなかった。

(4) HCN チャンネルの新たな翻訳後修飾の探索
種々の翻訳後修飾のうち SUMO 化に着目し、

HCN チャンネルが SUMO 化される可能性について検証を行った。免疫沈降法により HCN チャンネルが SUMO 化されるかどうか実験を行ったが、現時点で HCN チャンネルの SUMO 化を示唆する実験結果を得ることは出来なかった。

(5) パルミトイル化される新たなイオンチャンネルの探索

HCN チャンネル以外のイオンチャンネル (主に電位依存性 K⁺チャンネル) についてパルミトイル化の標的となる分子について探索を行ったところ、HCN チャンネルと比較的構造の類似した KCNH チャンネルファミリーの Kv10.1, Kv11.1, Kv12.2 の 3 種のイオンチャンネルが新たにパルミトイル化を受けていることが明らかになった。一方、内向き整流性 K⁺チャンネル Kir2.1 や電位依存性 K⁺チャンネル Kv4.2 および Kv7.1 はパルミトイル化を受けないことがわかった。

今後、HCN チャンネルおよび KCNH ファミリーチャンネルについてパルミトイル化のみならず、他の翻訳後修飾についてもその可能性について検証を行い、翻訳後修飾によるイオンチャンネルの機能制御についての網羅的な解明につなげたい。

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 4 件)

Nakahira, K., Itoh, M., Oshita, K., Takano, M., Sakaguchi, Y., and Ishihara, K.

The Local anesthetics bupivacaine and lidocaine differentially inhibit human Kir2.x inward rectifier K⁺ channels.

Anesth. Analg. 122, 1038-47 (2016) 査読有

Itoh, M., Ishihara, K., Nakashima, N., and Takano, M.

The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels contain multiple S-palmitoylation sites.

J Physiol Sci. 66, 241-8 (2016) 査読有

Itoh, M., Kaizuka, T., and Hayashi, T. Evolutionary acquisition and divergence of vertebrate HCN2 palmitoylation Neurotransmitter 4, e1603 (2017) 査読有

Kozasa, Y., Nakashima, N., Ito, M., Ishikawa, T., Kimoto, H., Ushijima, K., Makita, N., and Takano, M.

HCN4 pacemaker channels attenuate the parasympathetic response and stabilize

the spontaneous firing of the sinoatrial node.

J Physiol. 596, 809-25 (2018) 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

伊藤政之, 山下真梨子, 奥野浩行, 阿部学, 山崎真弥, 夏目里恵, 崎村建司, 星野幹雄, 三品昌美, 林崇

AMPA 受容体パルミトイル化による興奮性シナプスの機能維持とその異常に伴うてんかん発作

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月

伊藤政之, 山下真梨子, 奥野浩行, 阿部学, 山崎真弥, 夏目里恵, 崎村建司, 星野幹雄, 三品昌美, 林崇

パルミトイル化による AMPA 型グルタミン受容体の制御とその異常に伴うてんかん発作

第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月

伊藤政之, 山下真梨子, 山田大輔, 奥野浩行, 阿部学, 山崎真弥, 夏目里恵, 金子雅規, 貝塚利恵, 崎村建司, 関口正幸, 和田圭司, 星野幹雄, 三品昌美, 林崇

パルミトイル化サイト欠失型 AMPA 受容体ノックインマウスにおける興奮性神経活動の亢進と発作感受性の上昇

第 40 回日本神経科学大会, 2017 年 7 月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 政之 (ITO, Masayuki)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部・科研費研究員

研究者番号: 20442535

(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 ()