

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18700376

研究課題名（和文） 神経シナプスにおける新規膜蛋白質ネットワークの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of novel membrane protein network at the synapse

研究代表者

深田 優子 (FUKATA YUKO)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号：40416186

研究成果の概要：膜蛋白質は細胞外シグナルを正確に認識し、細胞内に情報を伝達する。膜蛋白質は単独で機能するのではなく、様々な蛋白質と複合体を形成して、その機能、局在が正確に制御されている。本研究では神経シナプス膜において重要な役割を担う足場蛋白質 PSD-95 を含む新規シナプス膜蛋白質複合体として、てんかん関連リガンド・受容体 LGI1・ADAM22 を発見し、新たなシナプス伝達制御機構を明らかにした (Fukata Y et al, Science 2006)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：神経科学、生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学/神経薬理学

キーワード：膜蛋白質、蛋白質複合体、神経シナプス、神経科学、生化学、てんかん、質量分析

1. 研究開始当初の背景

全蛋白質の約30%を占める膜蛋白質(受容体、イオンチャネル、接着分子など)により細胞は細胞外シグナルを正確に認識し、細胞内に情報を伝達する。膜蛋白質は単独で機能するのではなく、制御膜蛋白質や細胞質の足場蛋白質(スキャフォールドリング)、シグナル蛋白質、細胞骨格などと複合体(ネットワーク)を形成して、その機能、局在が正確に制

御されている。したがって、生理的な膜蛋白質複合体を同定し、その機能を解析することは生体の恒常性を理解する上で重要であるばかりでなく、様々な疾患の病態理解や治療にもつながることが期待される。実際、現在開発されている薬剤の約半分が膜蛋白質に作用することが知られている。私は最近、神経シナプス可塑性の根幹を成すと考えられている AMPA 型グルタミン酸受容体複合体を

生化学的に脳組織より精製し、構成分子を同定することに成功した (Fukata Y et al, J. Cell Biol. 2005)。定量的解析の結果、AMPA 受容体は脳組織において制御膜蛋白質 stargazin (TARP) と足場蛋白質 PSD-95 を主要構成分子として存在していることが明らかとなった。これまで Yeast-two hybrid スクリーニングや pull down 法により数多くの AMPA 受容体結合蛋白質 (GRIP, PICK など) が同定されているが、膜蛋白質の生理機能を理解するうえで複合体構成分子の定量的かつ相対的解析が必要であることを示した。

2. 研究の目的

本研究では、生化学的、細胞生物学的、遺伝学的手法により、PSD-95 が裏打ちする新規膜蛋白質複合体の機能を解析する。PSD 蛋白質の 2% をしめる主要な足場蛋白質でありながら、その主要な機能がいまだに不明である PSD-95 に新たな視点でアプローチすることで、シナプス形成機構、シナプス可塑性機構の中心的な分子メカニズムを明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

私は数種類の抗体を用いて脳組織 (とりわけシナプス画分) より免疫沈降法を用いて PSD-95 を含む生理的蛋白質複合体を精製し、高感度で同定的中率の高い質量分析法によりその構成分子を同定した。また、細胞生物学的手法と生化学的手法によりこれら構成蛋白質の結合様式を明らかにした。さらに、組織化学的解析により複合体構成蛋白質の発現部位を同定し、電気生理学的手法により、その生理的意義を見出した。

4. 研究成果

私は上述のように PSD-95 を中心とする蛋白質複合体をラット脳より精製し、PSD-95 複合体の主要構成分子として ADAM22、LGI1 および stargazin を同定した。極めて興味深いことに、これら 3 つの蛋白質はいずれも、マウスおよびヒトの遺伝学的知見からシナプス伝達異常が原因と考えられる“てんかん”に関連していた。この複合体の機能解析により、1) 細胞外分泌蛋白質 LGI1 は膜蛋白質 ADAM22 のリガンドであること、2) 海馬において LGI1 は ADAM22 と結合することにより AMPA 受容体を介したシナプス伝達を促進することを見出した (図 1、Fukata Y et al, Science 2006)。この知見は細胞外から AMPA 受容体機能を制御する新たなシステムを発見したのみならず、てんかんなどシナプス伝達の異常が一因と考えられる脳神経疾患の病態生理を理解する上でも重要であり国際的にも高く評価されている (Faculty of 1000, F1000 Factor

6.5; Snyder, Science 2006)。

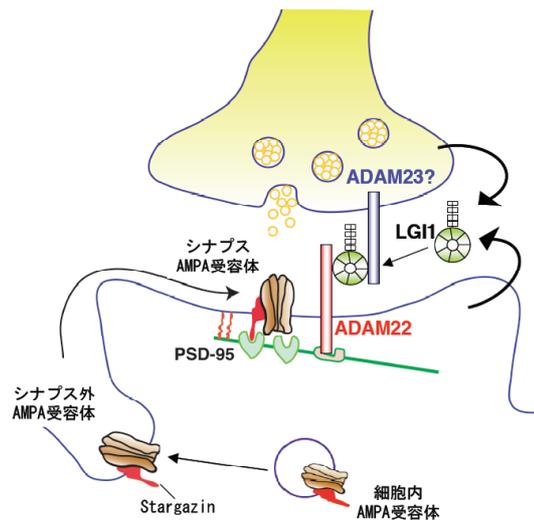


図 1 新規 AMPA 受容体制御因子。

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)

(査読有のみ記載)

① Iwanaga, T., Tsutsumi, R., Noritake, J., Fukata, Y. and Fukata, M. Dynamic protein palmitoylation in cellular signaling. *Prog Lipid Res.* (2009) in press

② Greaves, J., Prescott, G. R., Fukata, Y., Fukata, M., Salaun, C. and Chamberlain, L. H. The Hydrophobic cysteine-rich domain of SNAP25 couples with downstream residues to mediated membrane interactions and recognitions by DHHC palmitoyl transferases. *Mol. Biol. Cell*, 20, 1845-1854, (2009)

③ Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake, J., Iwanaga, T., Perez, F. and Fukata, M. Identification of G-protein alpha subunit palmitoylating enzyme. *Mol. Cell. Biol.* 29, 435-447, (2009)

④ Tsutsumi, R., Fukata, Y., and Fukata, M. Discovery of protein-palmitoylating enzymes. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* 456, 1199-1206, (2008)

⑤ Ponimaskin, E., Dityateva, G., Ruonala, M., Fukata, M., Fukata, Y., Kobe, F., Wouters, F., Dellling, M., Brecht, D., Schachner, M., and Dityatev, A. Fibroblast Growth Factor-Regulated Palmitoylation of NCAM Determines Neuronal Morphogenesis. *J. Neurosci.* 28, 88897-88907, (2008)

⑥ Greaves, J., Salaun, C., Fukata, Y., Fukata, M., and Chamberlain, L.H. DHHC proteins regulate stable membrane binding of the molecular chaperone cysteine-string protein. *J. Biol. Chem.* 283, 25014-25026, (2008)

⑦ Yamamoto, N., Fukata, Y., Fukata, M., and Yanaigiswa, K. GM1-ganglioside-induced A β assembly at synaptic sites of cultured neurons. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1128-1137, (2007)

⑧ Tomita, S., Shenoy, A., Fukata, Y., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. Stargazin interacts functionally with the AMPA receptor glutamate-binding module. *Neuropharmacology* 52: 87-91, (2007)

⑨ Fang, C., Deng, L., Keller, C., Fukata, M., Fukata, Y., Chen G., and Lüscher, B. GODZ-mediated palmitoylation of GABA-A receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory

synapses. *J Neurosci.* 26, 12758-12768, (2006)

⑩ Fukata Y., Adesnik H., Iwanaga T., Brecht D. S., Nicoll R. A., and Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission. *Science* 313, 1792-1795, (2006)

⑪ Fukata, Y., Iwanaga, T., and Fukata, M. Systematic screening for palmitoyl transferase activity of the DHHC protein family in mammalian cells. *Methods* 40, 177-182, (2006)

⑫ Fernandez-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P. N., Fukata, Y., Lin, M. I., Brecht, D. S., and Sessa, W. C. Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J. Cell Biol.* 174, 369-377, (2006)

[学会発表] (計 19 件)
筆頭発表のみ記載

① Fukata, Y., In vivo function of epilepsy-related ligand LGI1. 11th International Neurochemistry Winter Conference (2009/3/31) Solden, Austria

② Fukata, Y., Physiological role of epilepsy-related ligand LGI1 in synaptic function
The 48th American Society for Cell Biology Annual Meeting, (2008/12/13-17) San Francisco, USA

③ Fukata, Y., Identification of the epilepsy-related LGI1 multiprotein complex. The 36th SEIRIKEN Conference "Stock and Flow of functional molecules in synapse" (2008 3.17-19) Okazaki, Japan

④ 深田優子, 新規リガンド LGI ファミリーの神経系における機能。第 30 回日本分子生物学会年回、第 80 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2007, (2007, 12 月 14 日)、横浜

⑤ 深田優子, 新規リガンド・受容体 LGI1/ADAM22 によるシナプス機能制御。生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子の基盤」(2007 年 6 月 21-22 日)、岡崎

⑥ Fukata, Y., Novel epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulates synaptic transmission. The 46th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, (2006/12/9-13) San Diego, USA

[図書] (計 6 件)

① 堤良平、深田優子、深田正紀 Short Review 「タンパク質 S-パルミトイル化酵素」日本生化学会「生化学」80:1119-1123 (2008)

② 深田優子、深田正紀「AMPA 型グルタミン酸受容体の動態制御機構」日本神経薬理学会雑誌 28:131-134, (2008)

③ 則竹淳、深田優子、深田正紀 (2008) 「PSD-95 パルミトイル化脂質修飾酵素による AMPA 受容体動態制御メカニズム」蛋白質核酸酵素 増刊号「神経の分化、回路形成、機能発現」(共立出版) 53(4), 430-435, (2008).

④ 深田優子、岩永剛、深田正紀 Short Review 「てんかん関連蛋白質 LGI1 はシナプス伝達を制御する」蛋白質核酸酵素 (共立出版) 52:449-455, (2007)

⑤ 深田優子、岩永剛、深田正紀 細胞工学: Hot Press 「てんかん関連蛋白質 “LGI1 と ADAM22” はリガンド/受容体としてシナプス伝達を制御する」羊土社 2006 年 12 月号 25: 1438-1439, (2006)

⑥ Fukata, Y., Brecht, DS., and Fukata, M. Protein palmitoylation by DHHC protein family. The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology. CRC Press pp81-88, (2006)

[その他]

<http://www.nips.ac.jp/fukata/>

新聞発表

日本経済新聞 (平成 18 年 9 月 22 日朝刊) 「脳神経制御するたんぱく質発見」など

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深田 優子 (FUKATA YUKO)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授
研究者番号: 40416186

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。