

55. シナプス後膜ナノドメインを生み出す分子基盤の解明

深田 正紀

*自然科学研究機構 生理学研究所 細胞器官研究系 生体膜研究部門

Key words : パルミトイル化修飾, シナプス, ナノドメイン, PSD-95, AMPA 受容体

緒言

神経シナプスを構成するシナプス後膜は、Postsynaptic density (PSD) と呼ばれる特殊化した膜領域を有しており、神経伝達物質の受容体など膜機能素子やその裏打ちタンパク質群などが集積する。近年の研究から、PSD で捕捉される α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の数や機能の変化が興奮性シナプス伝達効率を決定する主要な因子であり、記憶や学習の分子基盤をなすと考えられるようになってきた¹⁾。したがって、PSD 構造がどのように形成、維持、再構築され、その結果として AMPA 受容体の捕捉効率がどう制御されるのかは、シナプス伝達やシナプス可塑性の制御機構を理解する上で極めて重要である。しかし、PSD の構造的微小性と生化学的特殊性のため、従来の光学顕微鏡を用いた解析などでは、その詳細な内部構造や動態、形成メカニズムに迫ることはできなかった。

PSD-95 は PSD の中核的な足場タンパク質として、AMPA 受容体の PSD でのアンカリングに必須な機能を果たすと考えられている。この PSD-95 が PSD に局在するには、パルミトイル化と呼ばれる脂質修飾が必須である²⁾。これまでに、私共は PSD-95 をパルミトイル化する酵素群 (DHHC タンパク質ファミリー) を同定し、その機能解析を通じて AMPA 受容体の制御機構を明らかにしてきた³⁻⁵⁾。さらに、ごく最近パルミトイル化 PSD-95 を可視化するプローブの開発に成功した⁶⁾。この新規プローブ (GFP 融合細胞内抗体として使用) と Stimulated emission depletion (STED) 超解像顕微鏡を組み合わせることにより、シナプス後膜がこれまで知られていなかったさらに小さなナノメートルサイズの構造単位 (PSD ナノドメイン) の集合体として構成されていることを見出した (図 1)。各ナノドメインは AMPA 受容体ナノクラスターを内包しており、PSD の基本単位であると考えられた。同様のナノドメイン構造はほぼ同時期に海外の複数のグループからも報告され、シナプス形成や AMPA 受容体機能制御におけるナノドメインの重要性がにわかに注目を集めている。私共はこのナノドメインでの PSD-95 は持続的にパルミトイル化状態と脱パルミトイル化状態の間をサイクルしており、シナプス膜上で機能するパルミトイル化酵素 DHHC2 が直接 PSD ナノドメイン形成の一端を担うことを明らかにした。本研究では PSD-95 脱パルミトイル化酵素を同定し、PSD ナノドメイン構築を担う分子基盤を解明することを目的とした。

方法および結果

私共は、上述のように PSD-95 を可視化するプローブと超解像 STED 顕微鏡を組み合わせることにより、PSD-95 がナノドメインの集合体としてシナプス後膜に存在していることを明らかにしてきた⁶⁾ (図 1)。本研究では、このナノドメイン形成の一翼を担うと考えられる脱パルミトイル化酵素の同定を試みた。

私共はまず、脱パルミトイル化酵素 (チオエステラーゼ) が酵素分類学上、セリン加水分解酵素に属することに着目して、これまで十分に機能が解明されていないセリン加水分解酵素群を 38 種類単離した。そして HEK293T 細胞および COS7 細胞にこれら遺伝子と PSD-95 を共発現させ、³H パルミチン酸を用いた代謝標識法にて PSD-95 のパルミトイル化レベルを低下させる候補遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、 α/β -hydrolase domain-containing protein (ABHD) 17A、17B、17C が PSD-95 のパルミトイル化レベルを著しく低下させる活性を有することを突き止めた。

*現所属：自然科学研究機構 生理学研究所 分子細胞生理研究領域 生体膜研究部門

次に ABHD17 の海馬神経細胞における細胞内局在を GFP 融合 ABHD17 を用いて検討した。ABHD17 は樹状突起内のリサイクリング小胞と細胞膜上に分布し、一部は樹状突起スパイン内にも局在することを見出した (図 2)。

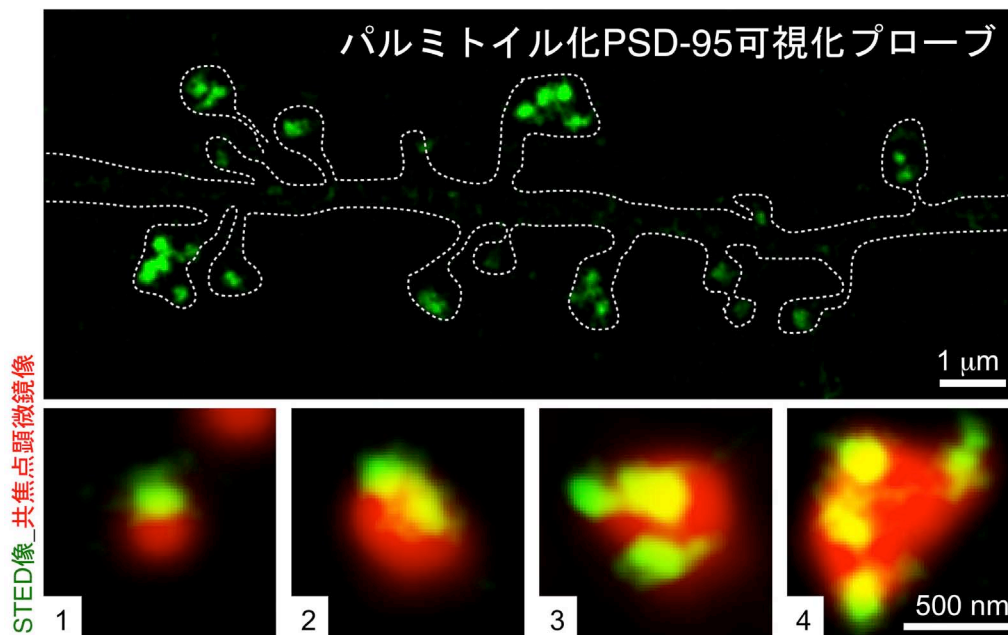


図 1. パルミトイル化 PSD-95 が形成する PSD ナノドメイン

海馬培養神経細胞におけるパルミトイル化 PSD-95 の共焦点顕微鏡像 (赤色) と超解像 STED 顕微鏡像 (緑色)。共焦点顕微鏡では 1 つの塊とみなされていた 1 個のシナプス後膜 (赤色) は、直径 200 nm 前後の PSD ナノドメイン (緑色) の集合体として存在する。

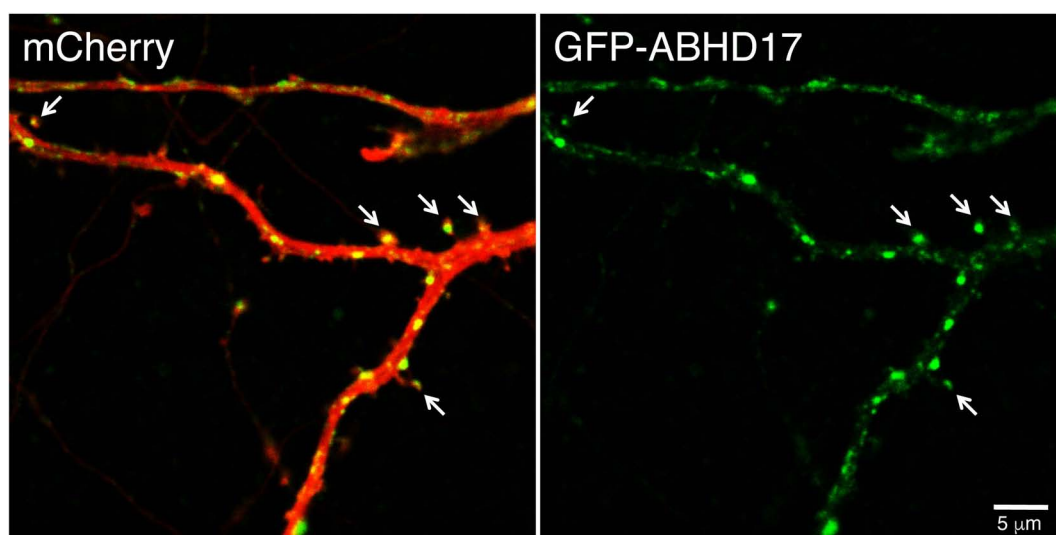


図 2. 海馬培養神経細胞における ABHD17 の局在

海馬培養神経細胞に GFP-ABHD17 と mCherry (fill-in マーカー) を共発現させたところ、ABHD17 は樹状突起内の小胞と細胞膜上に分布し、一部は樹状突起スパイン内にも局在することを見出した (矢印)。

続いて、神経細胞に ABHD17 を過剰発現させた際の、内在性 PSD-95 のパルミトイル化レベルに対する効果を検討した。しかし、従来の $[^3\text{H}]$ パルミチン酸を用いた代謝標識法や Acyl-Biotin-Exchange (ABE) 法では、神経細胞にお

けるタンパク質のパルミトイル化レベルを効率良く測定することは困難であった。そこで、私共は、ABE法とポリエチレングリコール (PEG) スイッチ法を融合させ、acyl-PEGyl exchange gel shift (APEGS) 法を開発した。つまり、パルミトイル化タンパク質のパルミトイル基を高分子ポリマー分子である PEG と置換することにより、タンパク質のパルミトイル化状態 (部位数と量比) を電気泳動上のバンドの移動度の変化として検出するという方法を構築した (図 3A)。

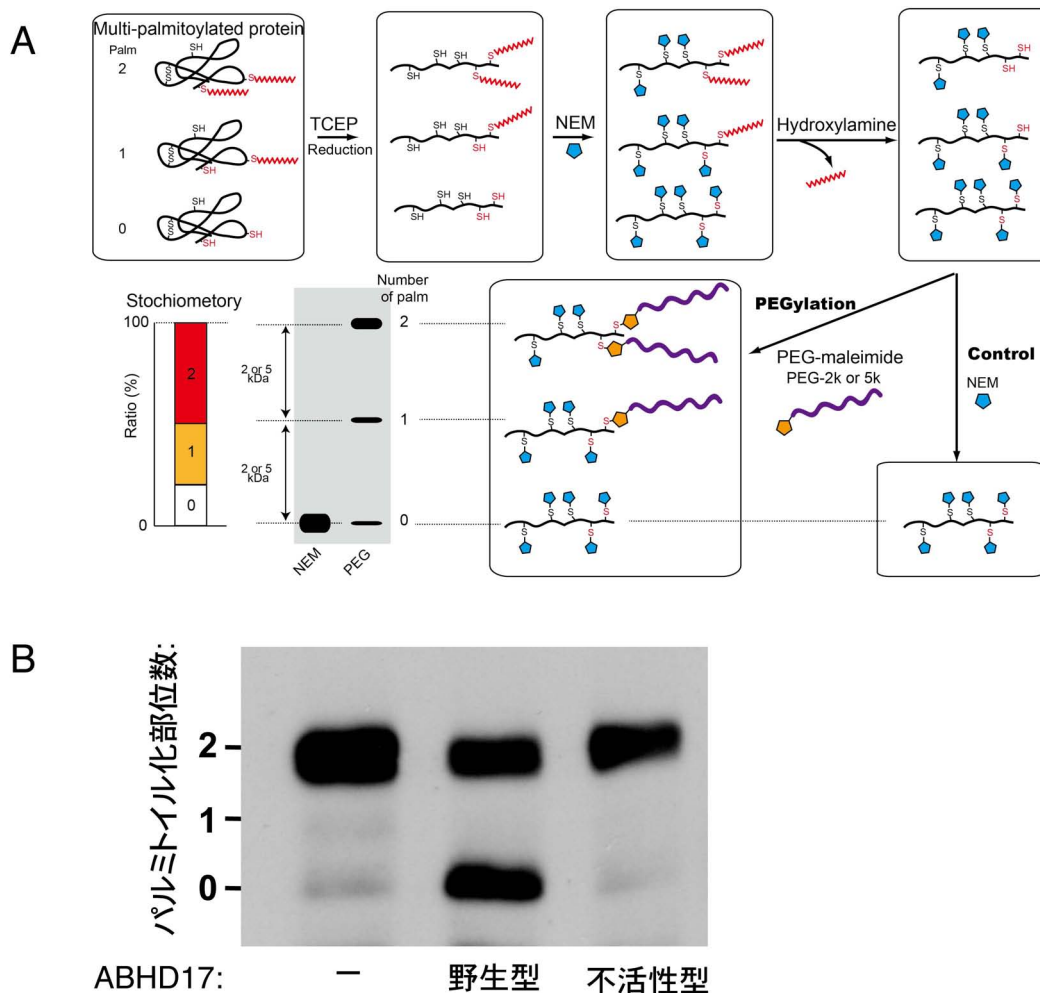


図 3. APEGS 法による神経細胞における ABHD17 の脱パルミトイル化酵素活性

- A) APEGS 法の原理。4 段階の化学反応によりパルミトイル化タンパク質のパルミトイル基と高分子ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) を置換することで、電気泳動上、パルミトイル化されていた残基数に応じてタンパク質の移動度がシフトする。
- B) 海馬神経細胞に ABHD17 を過剰発現させると、2 箇所パルミトイル化される PSD-95 の量が減少し、非パルミトイル化 PSD-95 の量が増加する。この効果 (脱パルミトイル化活性) は不活性型 ABHD17 の過剰発現では認められなかった。

本 APEGS 法により、私共は初めて内在性 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。さらに、ABHD17 を過剰発現させることにより、PSD-95 のパルミトイル化レベルが激減することを明らかにした (図 3B)。また細胞生物学的手法でも同様に、ABHD17 を過剰発現させると、PSD-95 のシナプス局在が大幅に減少することを見出した (図 4)。

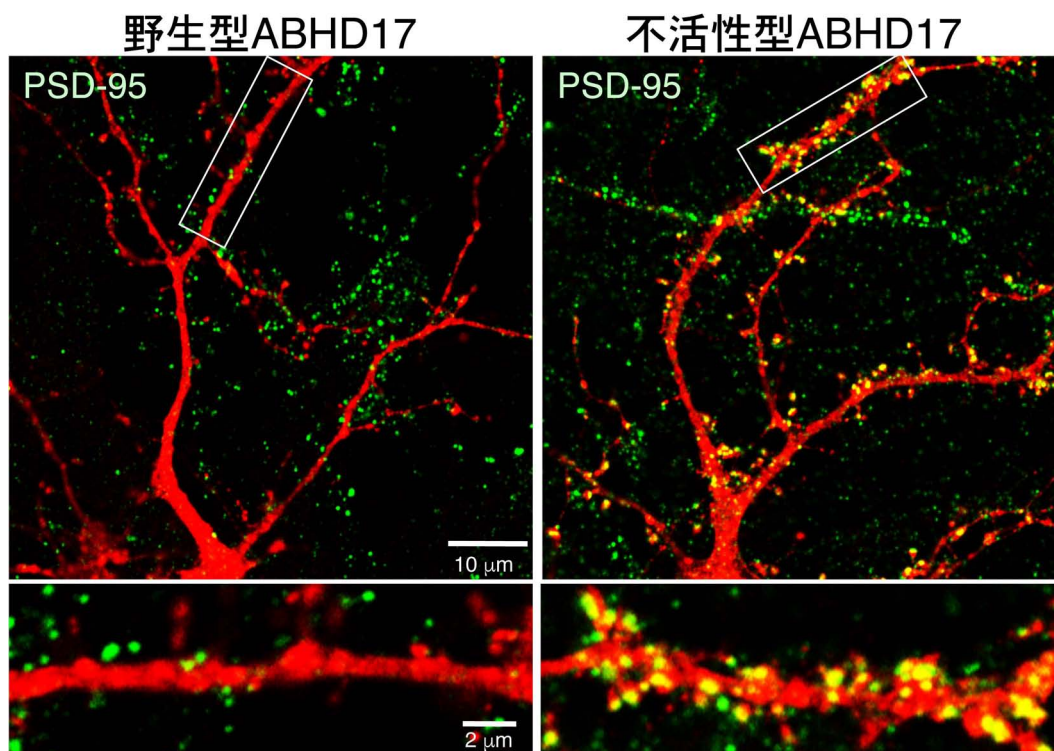


図4. ABHD17を過剰発現させると、PSD-95クラスターが減少する

海馬培養神経細胞にABHD17とmCherry (fill-in マーカー；赤色)を共発現させたところ、PSD-95クラスター(緑色)の輝度と数が大きく減少した(左)。この効果は不活性型ABHD17の発現では認められなかった(右)。

最後に、ABHD17A、17B、17Cのノックダウンを行い、PSD-95の脱パルミトイル化過程が影響を受けるか否かを検討した。その結果、ABHD17のノックダウンにより、PSD-95の脱パルミトイル化の半減期が大きく遅延することを見出した。すなわち、ABHD17酵素群が神経細胞において、PSD-95の脱パルミトイル化酵素として機能していることが明らかになった⁷⁾。

考 察

記憶の根幹をなすと考えられているシナプス可塑性に関する研究はこの約30年間、神経科学分野の最重要課題の一つと位置づけられてきた。近年、興奮性シナプス伝達の大部分を司るAMPA受容体がLong term potentiation (LTP: 長期増強)誘導刺激に応答してシナプス外のリザーブプールからPSDへ流入し、アンカリングされることがLTP発現の本態ではないかという説が提唱された。したがって、DHHC2とABHD17からなるPSD-95のパルミトイル化サイクルが(図5)シナプス伝達やLTPを代表とするシナプス可塑性にどのように関わっているかを検討することは今後の大きな課題と言える。

また、パルミトイル化基質タンパク質にはシナプス機能を制御するPSD-95以外にも癌遺伝子H-RasやGタンパク質共役受容体を代表とする疾患に関わるタンパク質が多く含まれる。したがって、これら基質タンパク質の局在や機能を制御するパルミトイル化酵素や脱パルミトイル化酵素は精神神経疾患やがん等に対する創薬の標的となることが期待される。

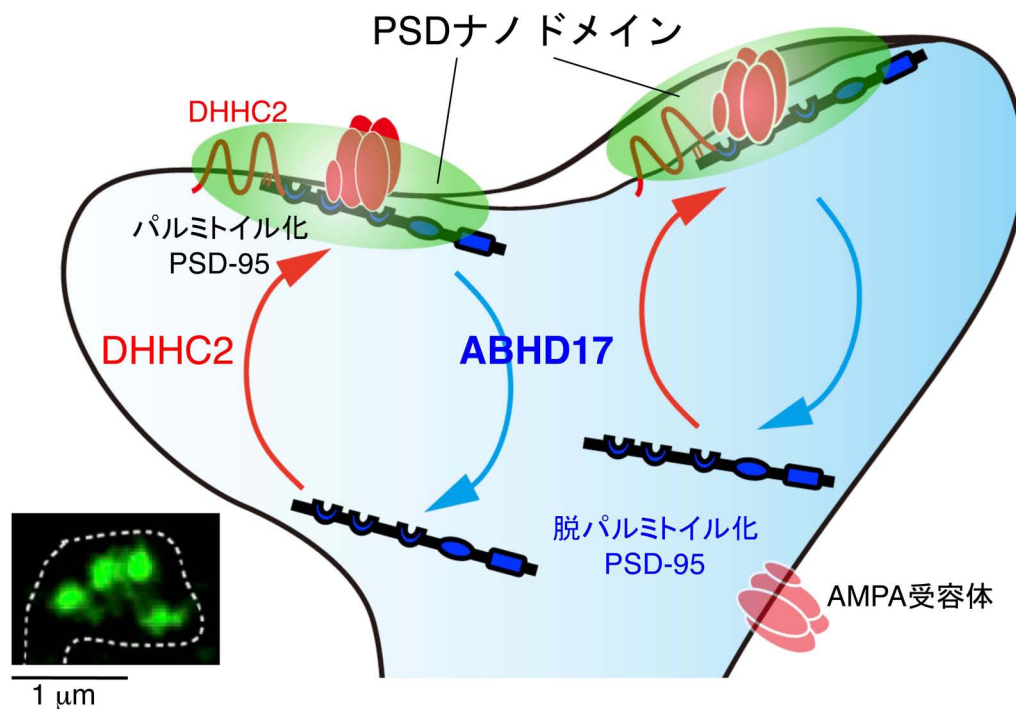


図5. パルミトイル化サイクルによる PSD ナノドメイン形成モデル

PSD-95 は樹状突起スパイン内でパルミトイル化サイクルを受けることにより、PSD 膜と細胞質間を動的に移行し、PSD ナノドメイン（緑）を形成、維持する。外界刺激により、このパルミトイル化サイクルの速度やバランスが変化すると、PSD ナノドメインの大きさや数が変化し、シナプスにおける AMPA 受容体の捕捉量に変化すると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、自然科学研究機構生理学研究所分子細胞生理研究領域生体膜研究部門の横井紀彦、深田優子、関谷敦志、村上達郎、および生理学研究所行動・代謝分子解析センターウイルスベクター開発室の小林憲太である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*. 2013;80(3):704-17. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025. PMID: 24183021.
- 2) Craven SE, El-Husseini AE, Brecht DS. Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron*. 1999;22(3):497-509. PMID: 10197530.
- 3) Fukata M, Fukata Y, Adesnik H, Nicoll RA, Brecht DS. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*. 2004;44(6):987-96. PMID: 15603741.
- 4) Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M. Mobile DHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol*. 2009;186(1):147-60. doi: 10.1083/jcb.200903101. PMID: 19596852.
- 5) Fukata Y, Fukata M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(3):161-75. doi: 10.1038/nrn2788. PMID: 20168314.
- 6) Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol*. 2013;202(1):145-61. doi: 10.1083/jcb.201302071. PMID: 23836932.

- 7) Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. *J Neurosci* 2016;36(24):6431-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016. PMID: 27307232.