

宮坂 信彦

(独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・
シナプス分子機構研究チーム)

Roles of chemokine signaling during development of the olfactory system

Nobuhiko Miyasaka (Laboratory for Neurobiology of Synapse, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan)

タンパク質 S-パルミトイル化酵素

1. はじめに

多くのタンパク質はリン酸化、糖鎖修飾、ユビキチン化あるいは脂質修飾など、いわゆる「翻訳後修飾」によって動的な機能、局在および安定性などの制御を受ける。このような個々のタンパク質の翻訳後修飾による制御は、細胞周期の進行や細胞運動など、細胞の機能において非常に重要であり、その制御機構の解明は現代の細胞生物学の大きなテーマの一つとなっている。

パルミトイル化は翻訳後脂質修飾の一種で、飽和脂肪酸であるパルミチン酸を基質タンパク質に付加する反応である。グリシン/システイン残基にアミド結合によって付加する不可逆的な N-パルミトイル化、ならびに、システイン残基にチオエステル結合によって付加する可逆的な S-パルミトイル化が知られており、前者はおもにソニックヘッジホッグ (Shh) ファミリー等の細胞外分泌タンパク質、後者はおもに細胞内あるいは膜タンパク質で見られる。S-パルミトイル化は細胞内において多数のタンパク質に見られる一般的な修飾であり、基質タンパク質の局在・動態制御に非常に重要な役割を果たしていることが指摘されている。しかし、S-パルミトイル化を触媒する酵素の有無をはじめ、細胞内タンパク質のパルミトイル化制御機構の詳細は、約 30 年間不明なままであった。最近、酵母遺伝学からタンパク質パルミトイル化酵素が見出され、タンパク質 S-パルミトイル化の制御機構の解明が様々な種で本格化しつつある。本稿では S-パルミトイル化触媒酵素の発見とその展開について解説する。以降、S-パルミトイル化を「パルミトイル化」と称する。

2. タンパク質パルミトイル化

これまでに、パルミトイル化を受ける基質タンパク質として、三量体 G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$; $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$), 低分子量 G タンパク質 (H-Ras, N-Ras, RhoB), NO 合成酵素 (NOS; eNOS, iNOS), チロシンキナーゼ (Fyn, Lck), 各種受容体 (β_2 アドレナリン受容体, CD4) や各種足場タンパク質 (PSD-95, Cbp/PAG) など情報伝達に重要なタンパク質が多数報告されている¹⁾。パルミトイル化脂質修飾の結果、基質タンパク質の疎水性が増大し、細胞膜や細胞内小器官等の膜構造への親和性が亢進すると考えられている。例えば、野生型 $G\alpha_q$ は通常細胞膜直下に集積しているが、パルミトイル化をうけるシステイン残基をセリン残基に変異させたパルミトイル欠損型 $G\alpha_q$ は細胞質に一様に局在する (図 1A)。基質タンパク質によってはパルミトイル化により ER・ゴルジ装置間 (GAD65), 核・細胞膜間 (R7BP) やゴルジ装置・細胞膜間 (H-Ras, N-Ras) など細胞内小器官・細胞膜間を移動するものが知られている^{1,2)}。これらのことから、タンパク質の機能におけるパルミトイル化依存的な局在制御が果たす役割が注目されている。さらに、細胞膜上における情報伝達のホットスポットである脂質ラフトへの情報伝達分子の集積にパルミトイル化が関与していることが指摘されている (図 1B)³⁾。

パルミトイル化はミリストイル化などの他の脂質修飾とは異なり可逆的で、パルミトイル化反応と脱パルミトイル化反応からなるパルミトイル化サイクルの存在が示唆されている (図 1B)。興味深いことに、 $G\alpha_s$ や PSD-95 など、いくつかの基質タンパク質において外界刺激依存的なパルミトイル化レベルの変化が報告されており^{4,5)}、外界刺激依存的なパルミトイル化サイクルの変動による基質タンパク質の動的な局在・機能制御が行われていることが予想される。パルミトイル化サイクルには、タンパク質リン酸化におけるリン酸化酵素と脱リン酸化酵素に相当するパルミトイル化酵素 (PAT, palmitoyl-acyl transferase) および脱パルミトイル化酵素 (PPT, palmitoyl-protein thioesterase) の関与が想定され、これら酵素の外界刺激依存的な活性制御機構の存在が期待されてきた。しかし、これらの酵素は存在の有無すら長年不明であったため、細胞内タンパク質のパルミトイル化調節機構の詳細は明らかとなっていなかった。

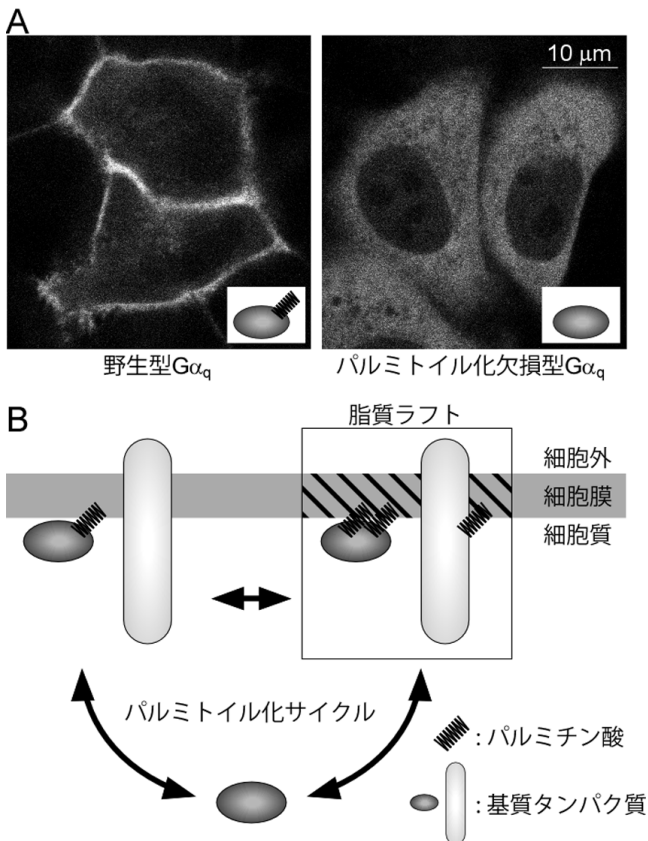


図1 パルミトイル化依存的な細胞内タンパク質の局在制御
(A) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた野生型 $G\alpha_q$ およびパルミトイル化を受けるシステイン残基 C9, C10 にセリン残基への変異を導入したパルミトイル化欠損型 $G\alpha_q$ をそれぞれ HeLa 細胞に異所性発現させ、細胞内局在を観察した。野生型 $G\alpha_q$ は細胞膜に集積するのに対し、パルミトイル化欠損型 $G\alpha_q$ は細胞質に拡散する。このことから、 $G\alpha_q$ はパルミトイル化依存的に細胞膜に局在すると考えられる。尚、緑色蛍光タンパク質融合 $G\alpha_q$ の発現ベクターは C.A. Berlot 博士 (Weis Center for Research) より分与頂いた。(B) パルミトイル化サイクルによる基質タンパク質の細胞内局在制御。細胞内タンパク質や膜タンパク質など多数のタンパク質がパルミトイル化を受ける。これら基質タンパク質の細胞内局在はパルミトイル化・脱パルミトイル化により可逆的に制御され、基質タンパク質は細胞質、細胞膜、さらには脂質ラフト間をダイナミックに移行すると考えられている。

3. 酵母 DHHC ファミリーの発見

生化学的手法による PAT の精製は長年困難であったが、近年、酵母遺伝学から Erf2/Erf4 (effect on Ras function 2/4) および Akr1 (ankyrin repeat containing 1) がそれぞれ Ras2 および Yck のパルミトイル化を触媒していることが明らかになった^{6,7)}。Erf2 および Akr1 は共にシステインに

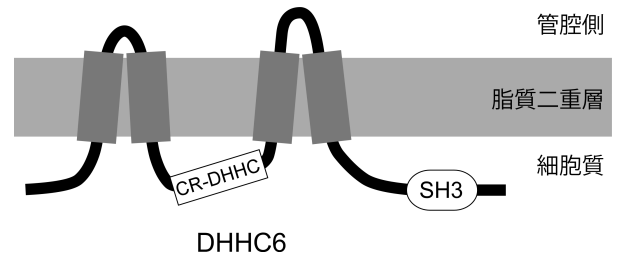


図2 DHHC タンパク質の構造

一例として DHHC6 の模式図を示す。DHHC ファミリーは 4-6 回の膜貫通ドメインおよび細胞質側にシステインに富む領域とそれに引き続く DHHC モチーフ (CR-DHHC) をもつ。一部の DHHC タンパク質は N 端や C 端にアンキリンリピート、SH3 ドメインや PDZ ドメイン結合配列等の機能ドメインをもつ。

富む領域 (CR 領域) とそれに引き続く DHHC (アスパラギン酸-ヒスチジン-ヒスチジン-システイン) モチーフをもち (CR-DHHC ドメイン)、ホモロジーサーチにより得られた他の 5 種類のタンパク質とともに酵母 DHHC ファミリーを構成する。この DHHC モチーフは酵素活性に必須であり、モチーフ中のシステイン残基に変異を導入すると PAT 活性を消失する。また、DHHC ファミリーは 4-6 回膜貫通ドメインをもち、DHHC ドメインが細胞質側に位置する構造をとる (図2)。

Roth らは、ABE (acyl-biotinyl exchange) 法と呼ばれるパルミトイル化タンパク質の精製法を確立し、質量分析法と組み合わせることにより細胞内パルミトイル化タンパク質の網羅的同定法を樹立した⁸⁾。7 種類の DHHC ファミリー遺伝子のうち、6 種類を欠失させた酵母のパルミトイル化タンパク質を解析したところ、検出に用いた 30 種類のパルミトイル化基質タンパク質のうち 29 種類のパルミトイル化が消失した。パルミトイル化は酵素を介さない反応である可能性も示唆されてきたが、上記の結果から、少なくとも酵母では細胞内タンパク質のパルミトイル化はほぼ全てが DHHC ファミリーを介したものであることが明らかになった。

4. 哺乳類における DHHC ファミリー

DHHC ファミリーは酵母から線虫、ショウジョウバエ、哺乳類そして植物まで広く保存されている酵素で、マウスやヒトのゲノム上にはそれぞれ 23 種類がコードされている (表)。

2004 年、我々を含むいくつかの研究室から哺乳類 DHHC ファミリーに属するタンパク質が細胞内で PSD-95⁹⁾、GABA_A 受容体 γ サブユニット¹⁰⁾、SNAP-25 および

表 哺乳類 DHHC ファミリー

DHHC ファミリー	基 質	機能ドメイン・相互作用タンパク質	疾病との関連
DHHC1			
DHHC2 (REAM)	PSD-95, GAP-43, CKAP4/p63, CD9, CD151		結腸直腸がん
DHHC3 (GODZ)	GABA _A 受容体 γ サブユニット, G α , SNAP-25, PSD-95, GAP-43, CSP, CLICK-III, GluR	PDZ ドメイン結合配列	
DHHC4			
DHHC5			
DHHC6		SH3 ドメイン	
DHHC7 (SERZ- β)	GABA _A 受容体 γ サブユニット, G α , SNAP-25, PSD-95, GAP-43, CSP		
DHHC8			統合失調症
DHHC9	N-Ras, H-Ras	GCP16 と相互作用	X 連鎖精神発達遅滞, 結腸直腸がん
DHHC10			
DHHC11 (NIDD)			膀胱がん
DHHC12			
DHHC13			
DHHC14			
DHHC15	PSD-95, GAP-43		X 連鎖精神発達遅滞
DHHC16		c-Abl, JAB1 と相互作用	
DHHC17 (Hip14)	SNAP-25, CSP, Huntingtin	アンキリンリピート, Huntingtin と相互作用	ハンチントン舞蹈病
DHHC18	N-Ras, H-Ras		
DHHC19			
DHHC20			
DHHC21	Fyn, Lck, eNOS		
DHHC22		アンキリンリピート	
DHHC23			

GAD65^{9,11})に対するパルミトイル化活性を有することが相次いで報告され, DHHC ファミリーが進化上保存された PAT であることが証明された. 当研究室では, クローニングした 23 種類のマウス DHHC ファミリー遺伝子を用いて, 網羅的なスクリーニングによる PAT 同定法を考案しており^{9,12}, PSD-95, eNOS, GABA_A 受容体 γ サブユニット, SNAP-25, シャペロンタンパク質 CSP, G α ¹³, Lck や GAP-43 等を基質とする PAT を同定した¹⁴). スクリーニングにより得られた PAT の候補を起点として, 組織における発現パターンや RNA 干渉などによる機能抑制により生理的 PAT の迅速かつ正確な同定が可能となった. 他研究室からも, DHHC ファミリーから H-Ras および N-Ras, CKAP4/p63, CD9 および CD151 を基質とする PAT が同定されている.

このように基質側からのアプローチにより特異的 PAT の同定が進みつつあるが, 既知のパルミトイル化タンパク質全体に比べればごく少数である. 今後は DHHC 側から

のアプローチ, すなわち DHHC ファミリーの発現抑制あるいはノックアウトマウスによる基質タンパク質の網羅的同定が期待される.

5. DHHC ファミリーの基質特異性と細胞内局在

DHHC ファミリーの基質となりうるパルミトイル化タンパク質は多種にわたり, また, DHHC ファミリー自体も 23 種類という比較的多数のタンパク質を有する. Rothらの報告並びに前述した当研究室でのスクリーニングの結果, DHHC ファミリー内でそれぞれの基質特異性が見られることが明らかとなってきた (表)^{8,14}). DHHC ファミリーのうち, DHHC3 および 7 は比較的広範な特異性を持ち, PSD-95, eNOS, GABA_A 受容体 γ サブユニット, SNAP-25, CSP, G α や GAP-43 など様々な基質に対するパルミトイル化活性を有する. 一方, DHHC2 や DHHC15 は PSD-95 や GAP-43 に対して, DHHC21 は Lck や eNOS に対して, DHHC9 および DHHC18 は H-Ras に対してそれ

ぞれ高い特異性をもつ。

哺乳類 DHHC タンパク質は膜貫通ドメイン・CR-DHHC ドメインの他に SH3 ドメイン (DHHC6), アンキリンリピート (DHHC17, 22) や PDZ ドメイン結合配列 (DHHC3) などタンパク質間相互作用に関わる既知の機能ドメインをもつものがある (表)。これらは機能ドメインを介して基質や制御サブユニットあるいは足場タンパク質と相互作用し、基質との親和性を獲得していることが推測される。また、DHHC21 は Lck, Fyn および eNOS など、ミリスチル化脂質修飾を同時に受けるタンパク質のパルミトイル化を亢進することから、基質側の他の翻訳後修飾により PAT の特異性が決定される可能性も考えられる。

大野らの報告によると、培養細胞に EGFP 融合型 DHHC タンパク質を異所性発現させると、ほとんどがゴルジ装置および ER に局在し、一部の DHHC タンパク質は小胞や細胞膜で観察された¹⁵⁾。したがって、一部を除き DHHC ファミリーは概ね同じ場所に存在しており、局在の特異性はあまりないと推測される。しかし、内在性 DHHC ファミリーの発現量は極めて微量であり、特異的抗体の作成が困難であったため、大半の DHHC タンパク質の局在が確定されていないのが現状である。特異抗体を用いた我々の実験結果では内在性 DHHC3 は異所性発現させた際と同様にゴルジ装置への局在が観察されたが、内在性 DHHC2 は異所性発現させた際とは異なる局在を示すデータを得ている (則竹ら, 未発表データ)。これらのことは DHHC ファミリータンパク質が互いに異なる細胞内局在をとり、細胞内での基質への相互作用を規定している可能性を示すものである。

6. DHHC タンパク質の活性制御機構

タンパク質パルミトイル化レベルはリン酸化等と同様に外界刺激に反応して動的に制御されている。パルミトイル化は可逆的であることからパルミトイル化と脱パルミトイル化のバランスにより基質タンパク質のパルミトイル化レベルが規定されていると考えられる。

後シナプスにおいて α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサザール-4-プロピオン酸 (AMPA) 型グルタミン酸受容体の局在を調節する足場タンパク質 PSD-95 のパルミトイル化はグルタミン酸刺激により低下する。このとき、放射性同位体を含むパルミチン酸を用いたパルスチェイス法により、グルタミン酸刺激時に PSD-95 のパルミトイル化の半減期が短縮されることから、脱パルミトイル化が亢進していることが明らかとなった⁵⁾。PSD-95 のパルミトイル化

は AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプスへの輸送に重要であり、刺激依存的なパルミトイル化レベルの変化は何らかのシナプス可塑性に関与していると予想される。また、 G_{α} は β_2 アドレナリン受容体への刺激によりパルミトイル化および脱パルミトイル化の両者が亢進することが示されている¹⁾。さらに、最近、Fernández-Hernando らは eNOS の PAT である DHHC21 の活性がカルシウムと ATP により活性化する可能性を示した¹⁶⁾。これらのことから、外界刺激依存的に PAT および PPT の両者が制御されており、基質タンパク質のパルミトイル化レベルの決定に重要であることが示唆される。ただし、基質タンパク質によっては刺激依存的なパルミトイル化・脱パルミトイル化の変化が見られないものもあることから、DHHC ファミリー間および PPT 間で異なる制御機構が存在していると考えられる。個々の DHHC タンパク質は、リン脂質、cAMP や金属イオン等のセカンドメッセンジャーによって、リン酸化、ニトロシル化や自己パルミトイル化などの翻訳後修飾によって、あるいは、未知の制御サブユニットによって活性が調節されると推定されるが、詳細は明らかになっていない。また、刺激依存的な小胞輸送などによる DHHC タンパク質の細胞内局在の変化が基質タンパク質のパルミトイル化レベルの変動に寄与している可能性も想定される。

7. おわりに

現在、多くの基質タンパク質のパルミトイル化酵素が DHHC ファミリーから同定されており、この新規酵素群が細胞内で行われるほぼ全てのタンパク質パルミトイル化の生理的な責任酵素として機能していることは確実視されている。パルミトイル化を受ける基質タンパク質が多岐にわたることから、個々の DHHC ファミリータンパク質の機能不全により様々な病変が引き起こされる可能性が考えられ、現在のところ、ヒトではある種のがん、X 連鎖精神発達遅滞、ハンチントン舞踏病および統合失調症との関連が指摘されている (表)¹⁴⁾。ノックアウトマウス解析などによる DHHC ファミリー、ひいてはパルミトイル化の生理的役割の解明が今後の大きな課題となる。

また、細胞内におけるタンパク質パルミトイル化を理解するためには、もう一方の酵素である PPT の同定が必須である。現在候補として APT1 (acyl protein thioesterase 1) とそのファミリー分子が挙げられているが、詳細は未だ不明である。今後、生理的な脱パルミトイル酵素の同定が待たれる。

- 1) Resh, M.D. (2006) *Sci STKE*, 359, re14.
- 2) Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., & Bastiaens, P.I. (2005) *Science*, 307, 1746–1752.
- 3) Prior, I.A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R.G., & Hancock, J.F. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 368–375.
- 4) Wedegaertner, P.B. & Bourne, H.R. (1994) *Cell*, 77, 1063–1070.
- 5) El-Husseini, Ael-D., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R.A., & Brecht, D.S. (2002) *Cell*, 108, 849–863.
- 6) Bartels, D.J., Mitchell, D.A., Dong, X., & Deschenes, R.J. (1999) *Mol. Cell Biol.*, 19, 6775–6787.
- 7) Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., & Davis, N.G. (2002) *J. Cell Biol.*, 159, 23–28.
- 8) Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates, J.R. 3rd, & Davis, N.G. (2006) *Cell*, 125, 1003–1013.
- 9) Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., & Brecht, D. S. (2004) *Neuron*, 44, 987–996.
- 10) Keller, C.A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M.L., Alldred, M., Sassoè-Pognetto, M., & Lüscher, B. (2004) *J. Neurosci.*, 24, 5881–5891.
- 11) Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R.R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C.A., Hayden, M.R., & El-Husseini, A. (2004) *Neuron*, 44, 977–986.
- 12) Fukata, Y., Iwanaga, T., & Fukata, M. (2006) *Methods*, 40, 177–182.
- 13) Tsutsumi, R., Fukata, Y., Noritake, J., Iwanaga, T., Perez, F., & Fukata, M. (2009) *Mol. Cell Biol.* In press.
- 14) Tsutsumi, R., Fukata, Y., & Fukata, M. (2008) *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 456, 1199–1206.
- 15) Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T., & Igarashi, Y. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 474–483.
- 16) Fernández-Hernando, C., Fukata, M., Bernatchez, P.N., Fukata, Y., Lin, M.I., Brecht, D.S., & Sessa, W.C. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 369–377.

堤 良平¹⁾, 深田 優子^{1),2)}, 深田 正紀^{1),2)}

¹⁾自然科学研究機構 生理学研究所
細胞器研究系 生体膜研究部門,

²⁾科学技術振興機構 さきがけ

Protein palmitoylating enzymes

Ryouhei Tsutsumi¹⁾, Yuko Fukata^{1),2)}, and Masaki Fukata^{1),2)}

¹⁾Division of Membrane Physiology, Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan; ²⁾PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Chiyoda, Tokyo 102-0075, Japan)

STIM1 によるカルシウム応答の制御機構

1. はじめに

レセプターに対するリガンドの結合により誘導される細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の変化は細胞機能の調節と深く関連する事象である。この過程はプロテインキナーゼの活性化により始動され、ホスホリパーゼ C (PLC) によるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (InsP_3) の生成と InsP_3 の小胞体膜上 InsP_3 レセプター (InsP_3R) への結合により小胞体内に貯蔵された Ca^{2+} の細胞内遊離が促される。小胞体の容量から容易に想像されるように、貯蔵・遊離される Ca^{2+} は少量であり一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすのみである。一例を挙げれば、NF- κ B, JNK などは一過性の Ca^{2+} の上昇により活性化され、その後の遺伝子発現が誘導されるが、NFAT (nuclear factor of activated T cells) 依存性の遺伝子の転写は一過性の Ca^{2+} の上昇では十分に活性化されず、持続的に Ca^{2+} レベルが上昇することが必要である。従って、細胞内 Ca^{2+} レベルの増加を維持するためには細胞外からの Ca^{2+} 流入が求められ (細胞外 $[\text{Ca}^{2+}]$: $\sim 10^{-3}\text{M}$, 細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 定常状態: $\sim 10^{-7}\text{M}$, 活性化状態: $\sim 10^{-6}\text{M}$)、これを司る機構がストア作動性カルシウム流入 (SOCE: store-operated calcium entry) である。SOCE は小胞体における Ca^{2+} の枯渇を感知して形質膜 Ca^{2+} チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入を促す。小胞体内 Ca^{2+} 濃度に依存するこの現象は容量性 Ca^{2+} 流入 (capacitative calcium entry: CCE) あるいはカルシウム遊離活性化 Ca^{2+} 流入 (calcium-release-activated calcium entry: CRAC entry) とも呼ばれ、上述のように持続的な Ca^{2+} シグナルを担うメカニズムとして重要である。実際、機能的な SOC チャネルを欠損する免疫不全症患者由来の T 細胞 (ある程度は B 細胞においても) においてリンパ球活性化の重篤な不全が認められ、SOCE の重要性を示している¹⁾。最近同定された STIM1 (stromal interaction molecule 1) はこの過程において小胞体 Ca^{2+} レベルの低下を感知するセンサーとしての機能、および形質膜型 Ca^{2+} チャネルと考えられる Orail (別称 CRACM1) を活性化する機能を持つ²⁾。

2. SOCE のメカニズムと STIM1

SOCE のメカニズムに関して多くのモデルが提唱されて