

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

PICK1 を介した長期抑制制御機構の解明

研究代表者 柳下 聡介 (医学部 薬理学)

緒言

PICK1 (Protein Interacting with C Kinase 1) はシナプスに存在するタンパク質である¹⁾。様々なタンパク質と結合するが、それらの中でも特に重要なものが、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットの一つGluA2である。GluA2とPICK1とが結合すると、GluA2がシナプス膜から除去されることが知られている²⁾。

シナプスにおいては、常に受容体がシナプス膜に挿入されたり除去されたりしており、このバランスが様々な影響を及ぼしていると考えられている。特に、アルツハイマー病においては、GluA2の除去が亢進しているのではないかと考えられており^{3,4)}、受容体除去のメカニズムを理解することは、神経変性疾患の根本的な理解に繋がる。

GluA2とPICK1との結合については、その結合ドメインが同定されているものの、実際の結合・乖離の調節機構の詳細は不明であった。

そこで、私は、GluA2-PICK1間の結合制御機構を明らかにすべく研究に着手した。本学に着任する以前の時点で、以下のことを明らかにしていた。

- PICK1はあるリン酸化酵素に依ってリン酸化される。
- PICK1のリン酸化部位の候補を同定した。
- PICK1のリン酸化は、GluA2との結合を促進し、脱リン酸化は乖離を促す。

しかし、PICK1のリン酸化状態がGluA2との結合状態を決定する仕組みは不明であった。私は本学に着任後、そのメカニズム解明に取り組み、その一端を解き明かした。なお、本研究成果は、現在、論文投稿中である。

材料と方法

(1) DNAコンストラクト

培養細胞内でGluA2およびPICK1を発現するコンストラクトを用いた。PICK1については、生細胞イメージング用にAcGFP1と融合したPICK1を発現するコンストラクトや、mycタグ、flagタグと融合したPICK1を発現するコンストラクトも作製した。また、大腸菌でGST融合GluA2タンパク質を発現するコンストラクトを用いた。これは、Bristol大学Jonathan G. Hanley博士から供与いただいたも

のであり、GluA2のC末端側50アミノ酸残基とGSTとが融合したタンパク質を発現するものである。

実験に用いたコンストラクトとしては、リン酸化部位であるSerをAlaに置換したもの(以下、PICK1 SAと記載)、リン酸化部位であるSerをGluに置換したもの(以下、PICK1 SEと記載)を用いた。

(2) 培養細胞と遺伝子導入

COS7細胞を用いた。遺伝子導入はlipofectamine 2000を用いて実施した。

(3) 共免疫沈降 (Co-immunoprecipitation; Co-IP)

GluA2とPICK1との結合を調べるCo-IPについては、両者を共発現させたCOS7を破碎し、抗PICK1抗体にて免疫沈降した後、抗GluA2抗体によるウェスタンブロットティングにより検出した。Myc-PICK1とflag-PICK1との結合を調べるCo-IPについては、両者を共発現させたCOS7を破碎し、抗myc抗体にて免疫沈降した後、抗flag抗体によるウェスタンブロットティングにより検出した。

(4) ウェスタンブロットティング

Wako社製SuperSep Aceを用いてウェスタンブロットティングを行った。シグナルの検出は、本学共通機器室のChemi-Docを用いた。

(5) 生細胞イメージング

COS7細胞にAcGFP1融合PICK1を発現させた。遺伝子導入の二日後に、本学共通機器室のBIREVO KEYENCE BZ-9000で、生きたまま細胞の観察を行った。

結果

(1) 直接的なGluA2との結合の確認

これまではCOS7細胞にGluA2およびPICK1の両者を発現させ、共免疫沈降法により、結合強度を評価してきた。しかし、それだけでは細胞内に存在する膜などのcompartmentの関与が除去しきれない。そこで、大腸菌で発現させたGST融合GluA2を用いたPull down assayを実施した。PICK1としては、flag-PICK1 WTおよびflag-

PICK1 SA の 2 種類を検討した. その結果, 両者に GST-GluA2 との結合に関しては違いがなかった (Fig. 1).

(2) PICK1-PICK1 間の結合に与える影響

次に, PICK1 どうしの結合に与える影響を解析するため, myc-PICK1 と flag-PICK1 との間の結合を評価した. これに関しても, Fig. 2 に示すように WT, SA の間に違いは見られなかった. (1)(2)の検討結果から, PICK1 における SA 変異は, GluA2 との結合や PICK1 との結合に影響を及ぼすのではないと考えられる.

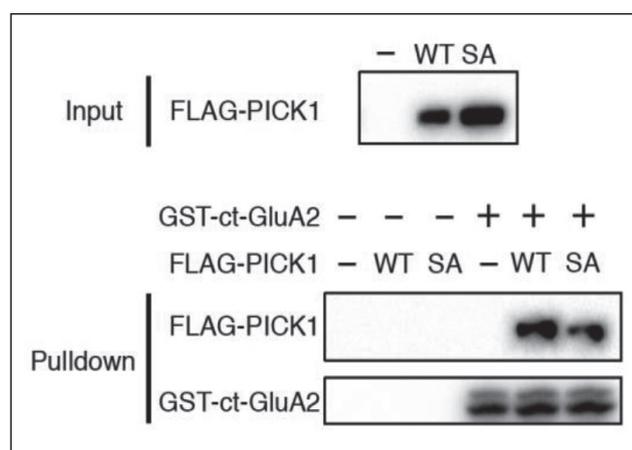


Fig. 1. Pull-down assayによる GluA2 と PICK1 との結合. 大腸菌由来の GluA2 と COS7 細胞由来の flag-PICK1 とを用いて, 両者の直接的な結合の有無を評価した. 代表的なプロットを示す. Pull-down の「-」は大腸菌由来のタンパク質なし, 「+」は有りを示す.

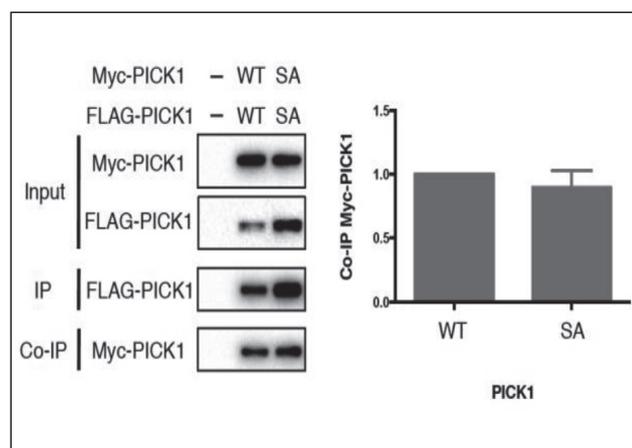


Fig. 2. PICK1 どうしの結合の評価. PICK1 どうしの結合を, 2 種類のタグ (myc, flag) を用いて評価した. 具体的には, flag-PICK1 と共沈降されてくる myc-PICK1 を評価した. グラフは定量結果を示す (mean±S.E.M., n=6).

(3) 細胞内の膜との結合

PICK1 には BAR ドメインと呼ばれる領域があり, これが脂質二重膜との結合を担っていると考えられている. 本研究で着目しているリン酸化部位 (Ser) は BAR ドメインから一次構造ではかなり離れた位置にある. しかし, 最近の研究では, BAR ドメインよりも C 末端にある領域が BAR ドメインの機能を抑制していることが示唆されている⁵⁾. そのため, 本研究で着目している Ser 残基が BAR ドメインに影響を与えて, 細胞内局在を変化させている可能性が考えられた. そこで, AcGFP1 融合 PICK1 を COS7 細胞に発現させ, 生細胞イメージングによってその細胞内局在を評価した. PICK1 WT, SE を発現させたものでは, Fig. 3A に示すように diffuse なシグナルが見られた. しかし, PICK1 SA を発現させた細胞でのみ, Fig. 3B に示すような, 多くのクラスターを有する細胞が出現した. この結果は, SA 変異によって, PICK1 がより膜と結合しやすくなったものと考えられる. また, この変異によって, C 末端領域の BAR ドメイン抑制効果が解除されたとも考えられた.

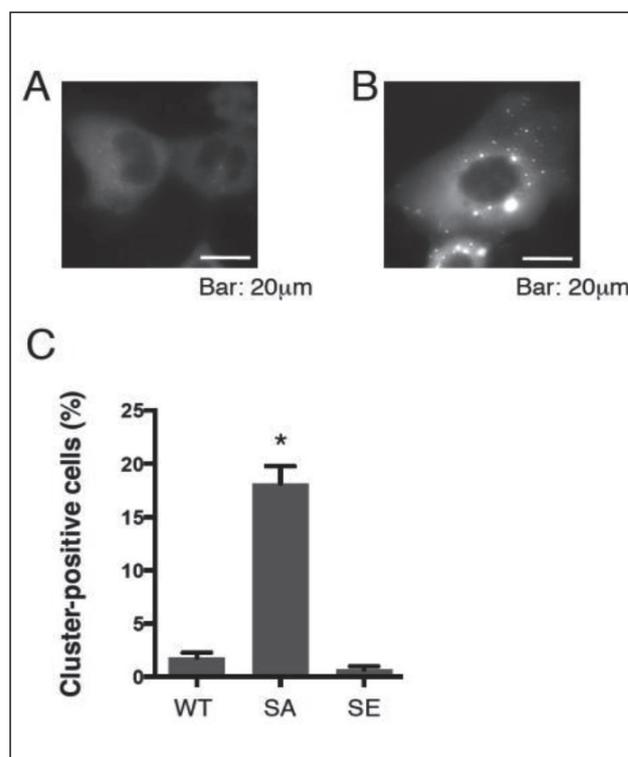


Fig. 3. PICK1 の細胞内クラスター形成解析. PICK1 の N 末端側に AcGFP1 を付加したコンストラクトを発現させ, 細胞内でのクラスター形成を評価した. (A) 多くの細胞ではこのような diffuse なシグナルが観察された. (B) PICK1 SA を発現させた細胞では細胞内に多数のクラスターを有する細胞を認めた. (C) 細胞内に 5 つ以上クラスターを有する細胞の割合を定量した. グラフは各視野における割合を示す. Mean±S.E.M. (WT, n=48; SA, n=54; SE, n=52), *p<0.05

結 語

GluA2 と PICK1 との結合では、PICK1 のリン酸化状態が重要な役割を担っている。PICK1 がリン酸化されると GluA2 と結合する一方、脱リン酸化されると膜との結合が強くなり、GluA2 と乖離する。本成果は、受容体取り込みの機序解明に繋がる。

参考文献

- 1) Staudinger J, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ, and Olson EN. PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol* 1995;128:263-71.
- 2) Hanley JG. PICK1: a multi-talented modulator of AMPA receptor trafficking. *Pharmacol Ther* 2008;118:152-60.
- 3) Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, and Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837-42.
- 4) Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok H, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, Takashima A, and Cho K. Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;369:20130144.
- 5) Madasu Y, Yang C, Boczkowska M, Bethoney KA, Zwolak A, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. PICK1 is implicated in organelle motility in an Arp2/3 complex-independent manner. *Mol Biol Cell* 2015;26:1308-22.

研究成果リスト

論文発表

投稿済み。現在、追加実験及び修正中である。