

氏 名 奥 慎一郎

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1463 号

学位授与の日付 平成 23 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Identification of palmitoyl substrate-enzyme pairs
in neurons through *in silico* proteomics

論文審査委員 主 査 教授 重本 隆一
教授 深田 正紀
教授 久保 義弘
教授 服部 光治（名古屋市立大学）

論文内容の要旨

Posttranslational modifications, including phosphorylation, ubiquitination, glycosylation and lipidation, provide proteins with additional regulatory systems beyond genomic information. Protein palmitoylation is the most common reversible lipid modification and plays significant roles in protein trafficking and function. Palmitoylation modifies numerous classes of proteins including signaling proteins, synaptic scaffolding proteins, and various transmembrane proteins. Identification of palmitoyl substrates is important for elucidating physiological roles of protein palmitoylation. Recently, a large family of 23 DHHC proteins has emerged as mammalian palmitoylating enzymes, and several enzyme-substrate pairs have begun to be reported. Also, the recent development of the palmitoyl-proteomic methods has identified a lot of novel substrates. However, the conventional proteomic analysis depends on the biochemical property of the target proteins and thereby may omit important substrates to understand whole “palmitome.”

Here, to systematically identify novel palmitoyl substrates, the author performed *in silico* whole-genome screening using CSS-Palm 2.0 program, which is a free software for palmitoylation site prediction. The author lined up about 60,000 mouse protein sequences from UniProt database according to the CSS-Palm scores, and selected 17 candidates as novel palmitoyl substrates, which accumulate at the specific membrane domains like synaptic membranes, and cell-to-cell and cell-to-substratum junctions. Then, the author experimentally verified their palmitoylation. The author investigated by the metabolic labeling method whether these candidate proteins are actually palmitoylated by a general palmitoylating enzyme, DHHC3, in HEK293 cells and found that DHHC3 palmitoylated 10 candidates. These proteins included: a presynaptic protein, Syd-1; postsynaptic proteins, transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARP) γ 2, TARP γ 8, cornichon-2, CaMKII α and neurochondrin (Ncdn); a focal adhesion protein, zyxin; transient receptor potential (TRP) channels, M8 and C1; and G-protein coupled receptor, orexin receptor type2. Of these novel substrates, the author selected four proteins, Syd-1, Ncdn, TARP γ 8 and CaMKII α , and confirmed that all tested endogenous proteins were palmitoylated in hippocampal neurons by the acyl-biotinyl exchange (ABE) method. By the subsequent screening of 23 DHHC proteins, the author found that Ncdn was robustly palmitoylated by the DHHC1/10 subfamily, whose palmitoylating activity has not yet been reported, and the DHHC3/7 subfamily. Therefore, the author focused on this novel substrate-enzyme pair, Ncdn and DHHC1/10. Ncdn is a neuron-specific cytosolic protein and regulates neurite-outgrowth and mGluR-related synaptic plasticity. Also, genetic evidence using the knockout mouse indicates that Ncdn associates with epileptic seizure and schizophrenia.

As predicted by CSS-Palm 2.0, Ncdn was palmitoylated at the amino-terminal cysteine residues (at positions 3 and 4), which were shared with both DHHC1/10 and DHHC3/7 subfamilies. DHHC3 palmitoylated many proteins including Ncdn as well as previously reported palmitoyl substrates, GluA2 and G α q, whereas DHHC10 palmitoylated only Ncdn. DHHC1/10 subfamily, but not DHHC3/7 subfamily, was co-purified with Ncdn from the brain lysate indicating the physical interaction between DHHC1/10 subfamily members and Ncdn. Overexpression of DHHC1/10

subfamily specifically relocalized Ncdn near peri-nuclear structures in a palmitoylation-dependent manner in COS7 cells. Thus, DHHC3/7 subfamily and DHHC1/10 subfamily may differently recognize Ncdn as a palmitoyl substrate.

The author found that Ncdn expression was increased during dendrite development in cultured neurons and that Ncdn protein was biochemically fractionated into both cytosolic and membrane fractions of the brain tissue. Ncdn was specifically localized at somato-dendritic regions in hippocampal neurons and partly co-localized with HA-tagged DHHC1/10 subfamily in dendritic shafts and dendritic spines. Palmitoylation-deficient mutant of Ncdn delocalized from dendritic membrane structures in hippocampal neurons. Furthermore, knockdown of DHHC1, but neither DHHC3 nor DHHC10, significantly reduced dendritic localization of Ncdn, indicating that DHHC1 is a physiological palmitoylating enzyme to regulate the specific Ncdn localization in neurons. Future functional studies on DHHC1-mediated Ncdn palmitoylation will clarify how this novel substrate-enzyme pair is involved in neuronal differentiation and functions such as dendrite development.

Finally, the author systematically screened mouse whole-genome for palmitoyl-substrates through computational prediction (*in silico* proteomics), and found that Ncdn is the first substrate for the DHHC1/10 subfamily, and that DHHC1 plays a critical role in proper localization of Ncdn to dendrites in neurons. Thus, this study indicates that *in silico* approach is useful for the discovery of novel palmitoyl substrates and complementally functions with previous experimental methods. Increased information of palmitoyl substrate-enzyme pairs will be the solid foundation for understanding molecular mechanisms and regulatory roles of protein palmitoylation in the dynamic cellular functions, and will importantly reveal consensus sequences for palmitoylation based on the DHHC subfamily-specific rules for substrate recognition.

蛋白質の翻訳後修飾は細胞が外界刺激に応答し様々な生理機能を遂行するための主要なメカニズムである。パルミトイル化修飾は多くの蛋白質にみられる代表的な翻訳後脂質修飾であり、蛋白質を細胞膜に輸送し、その活性や機能を制御する。最近、DHHC 蛋白質ファミリーがパルミトイル化酵素として報告され、また、プロテオミクス手法により新規のパルミトイル化基質蛋白質が次々と報告されている。しかし、プロテオミクス手法は蛋白質の生化学的性質に依存するため、パルミトイル化基質蛋白質の全容解明には十分とは言えない。そこで申請者は CSS-Palm 2.0 というパルミトイル化部位予測プログラム（オンライン公開ソフト）を利用して、*in silico* 解析によりパルミトイル化基質蛋白質をゲノムワイドに探索した。申請者はパルミトイル化蛋白質がシナプス膜や細胞接着部位といった特殊な細胞膜ドメインに濃縮することを考慮し、予測プログラムのスコアが高い 17 種類の蛋白質を新規基質の候補として挙げた。次に、これら候補蛋白質が実際に細胞内でパルミトイル化酵素により修飾されるか否かを [³H]パルミチン酸を用いた代謝ラベル法にて検討し、プレシナプス蛋白質 Syd1、ポストシナプス蛋白質 TARPs ($\gamma 2$, $\gamma 8$)、Cornichon-2、CaMKII α 、Neurochondrin、そして TRPM8、TRPC1、Orexin receptor、Zyxin を新規のパルミトイル化基質として見出した。さらに、Syd1、TARPs、CaMKII α 、および Neurochondrin に関しては初代培養神経細胞において実際に内在性蛋白質がパルミトイル化されていることを確認した。続いて、23 種類からなる DHHC パルミトイル化酵素ライブラリーを用いて責任酵素を探索し、Syd1、TARPs、CaMKII α は DHHC3/7 サブファミリーによってパルミトイル化されるのに対し、Neurochondrin は DHHC3/7 サブファミリーのみでなく DHHC1/10 サブファミリーによってもパルミトイル化されることを見出した。DHHC1/10 はこれまで酵素活性が報告されていなかった DHHC サブファミリーであり Neurochondrin は初めての基質となるため、申請者は DHHC1, 10 による Neurochondrin のパルミトイル化の役割に着目して解析を進めた。Neurochondrin は代謝型グルタミン酸受容体と結合し、その細胞膜表面での発現量を規定し、シナプス可塑性を制御しうることが報告されている。

過剰発現実験系における結合実験と初代培養神経細胞における免疫染色実験から、DHHC10 は Neurochondrin と安定に結合していると考えられ、また DHHC1/10 サブファミリーと Neurochondrin は海馬神経細胞の樹状突起内とスパインで部分的に共局在していた。さらに、これら DHHC 酵素が Neurochondrin の樹状突起での局在を制御しているかどうかを調べるために、DHHC1, 10, 3 のノックダウン実験を行った。その結果、DHHC1 をノックダウンした際に樹状突起における Neurochondrin 染色性が有意に減少することを見出した。一方、DHHC10 および DHHC3 のノックダウンでは有意な変化は認められなかった。したがって、神経細胞において DHHC1 は Neurochondrin のパルミトイル化を介して、Neurochondrin の樹状突起における局在を制御していることが明らかとなった。

このように、本研究では *in silico* 解析により新規のパルミトイル化基質蛋白質を見出し、これまで活性が報告されていなかった DHHC1, 10 の酵素活性を見出した。本解析はこれまでのプロテオミクス手法と相補的に機能し、新たなパルミトイル化基質・酵素ペアの同定、およびパルミトイル化修飾の機能解析に大いに貢献すると考えられる。よって、本研究が学位論文としてふさわしいものであるとして、審査委員全員の意見が一致した。