

氏 名 関谷 敦志

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1776 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 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 Development of a Novel Quantitative Method for Protein S-
Palmitoylation and Exploration of Depalmitoylating Enzymes
for PSD-95

論文審査委員 主 査 教授 西田 基宏
教授 深田 正紀
教授 久保 義弘
教授 服部 光治 名古屋市立大学大学院

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Protein *S*-palmitoylation is one of the reversibly regulated post-translational modifications. *S*-palmitoylation is an addition of a lipid palmitate to a specific cysteine residue via a thioester bond and plays a critical role in protein trafficking and function. *S*-palmitoylation modifies various types of proteins such as signaling molecules, ion channels, and scaffolding proteins. Post-synaptic scaffolding protein PSD-95 is one of the most intensively studied *S*-palmitoylated proteins and *S*-palmitoylation of PSD-95 is essential for its post-synaptic targeting. The palmitate cycling on palmitoyl proteins is dynamically regulated by palmitoyl acyltransferases (PATs) and palmitoyl-protein thioesterases (PPTs). Although the DHHC protein family has recently emerged as genetically conserved PATs, PPTs (*i.e.*, depalmitoylating enzymes) remain controversial since 1970s. Thus, the regulatory mechanism of reversible *S*-palmitoylation is incompletely understood. Another important issue in the *S*-palmitoylation research is the lack of the quantitative method to address *S*-palmitoylation stoichiometries of proteins in cells or tissues. Here, I challenged these two fundamental questions. In Chapter 1, I developed a novel method, acyl-PEGyl exchange gel shift (APEGs) assay, which allows quantification of the number of *S*-palmitoylation sites in palmitoylated proteins and their *in vivo* palmitoylation stoichiometries. In Chapter 2, I explored PSD-95 palmitoyl-protein thioesterases (P-PPTs).

The principle of the APEGs assay I developed is that the exchange of palmitates with

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

high-molecular weight polymers, polyethylene glycols (PEGs), at the reversibly palmitoylated thiols induces the mobility shift of *S*-palmitoylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The APEGS assay is composed of four chemical reactions: 1) reduction of intra- and intermolecular disulfide bonds by tris-(2-carboxyethyl) phosphine; 2) blockade of non-palmitoylated cysteine residues with a thiol specific modification reagent, *N*-ethyl maleimide; 3) cleavage of palmitoyl-cysteine thioester bonds with hydroxylamine treatment; and 4) introduction of maleimide-conjugated PEGs into newly exposed cysteines. I first optimized the conditions of individual chemical reactions and demonstrated that the extent of mobility shift observed in the APEGS assay depends on the number of *S*-palmitoylation sites using PSD-95 as a model substrate. Then, I applied this APEGS assay to various *S*-palmitoylated proteins in cultured rat hippocampal neurons and quantified the number of sites and stoichiometries of *S*-palmitoylation of previously reported palmitoyl proteins, including PSD-95, Hras, and G α_q . I for the first time found that about 80% of PSD-95 was di-palmitoylated in neurons and that the rest (~20%) of PSD-95 was not palmitoylated in neurons. I also found that depalmitoylation of PSD-95 was faster than that of Hras in neurons and that two palmitates on PSD-95 were cleaved almost at the same time with a half-life of 1.8 ± 0.4 hours. Furthermore, the mathematical simulation suggests that the palmitoylation reaction of PSD-95 is four times as fast as the depalmitoylation reaction.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

Next, I explored PSD-95 depalmitoylating enzymes, P-PPTs. Because thioesterases mainly belong to huge serine hydrolase superfamily including proteases, esterases, and lipases, I attempted to examine whether members of uncharacterized serine hydrolases have PPT activities. I isolated 38 genes of mouse or rat serine hydrolases and examined their effects on the palmitoylation level of PSD-95 by a metabolic labeling assay with [³H]-palmitate in HEK293T cells. I found that 10 candidates showed activities to reduce PSD-95 palmitoylation levels. Importantly, these candidates belong to a distinct phylogenetic subgroup. I confirmed that these candidates were expressed in cultured rat hippocampal neurons and then investigated their subcellular localization. I found that only three members were uniquely localized at/near the post-synaptic membranes in rat hippocampal neurons, which were referred to as post-synaptic P-PPTs in this study. Since PSD-95 is expected to be depalmitoylated mainly at post-synaptic membranes, I selected post-synaptic P-PPTs for further analysis. I predicted and experimentally verified the catalytic triad amino acid residues of post-synaptic P-PPTs. I found that an ectopically expressed post-synaptic P-PPT directly bound to PSD-95 and dramatically reduced the palmitoylation level of endogenous PSD-95 in neurons. Then, I prepared rat hippocampal neurons in which three post-synaptic P-PPTs or the other candidate proteins were knocked down by using microRNA encoding adeno-associated viruses and investigated their effects on the depalmitoylation process of PSD-95. However, the depalmitoylation process of PSD-95 was not largely changed under the present experimental condition. This result raises three possibilities:

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

1) insufficient knockdown, 2) molecular redundancy of P-PPTs, and 3) existence of other authentic candidates.

In conclusion, I established a novel method APEGS that for the first time provides quantitative information about the number of sites and stoichiometry of *S*-palmitoylation *in vivo*. This method will widely and rapidly spread over the *S*-palmitoylation research. Furthermore, I obtained 10 candidate proteins for PSD-95 depalmitoylating enzymes and characterized post-synaptic P-PPTs. Thus, my study should contribute to elucidating the molecular mechanism for the reversible *S*-palmitoylation in diverse cellular processes.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

蛋白質のパルミトイル化は、蛋白質を細胞膜の特定の場を集積させるための重要な翻訳後修飾である。本論文は、蛋白質パルミトイル化の簡便な定量的解析法を確立し、これを用いてポストシナプス蛋白質PSD-95のパルミトイル化／脱パルミトイル化プロセスの数理モデル構築ならびに脱パルミトイル化候補酵素群を同定した研究である。

蛋白質パルミトイル化は、蛋白質のシステイン残基にパルミチン酸が結合する可逆性が担保された脂質修飾であり、蛋白質の局在や機能を制御する。パルミトイル化は、細胞外情報に応じてパルミトイル化酵素と脱パルミトイル化酵素により制御されると考えられている。近年、出願者が所属する研究室において哺乳動物（マウス）におけるパルミトイル化酵素ファミリー蛋白質が同定され、その性状解析がなされてきたが、脱パルミトイル化酵素は同定されていない。また、パルミトイル化蛋白質のストイキオメトリー（細胞内におけるパルミトイル化蛋白質の割合）に言及しうる定量的解析手法もなかったことから、パルミトイル化修飾の生理的意義は十分に理解されていなかった。

出願者は、神経細胞シナプスにおける代表的なパルミトイル化蛋白質であるPSD-95に着目し、パルミトイル化の新規定量的解析手法の確立と脱パルミトイル化酵素の探索に取り組んだ。4段階の化学反応によりパルミトイル化蛋白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）を交換することで、電気泳動上、パルミトイル化されていた残基数に応じて蛋白質のバンドシフトを誘導する手法（acyl-PEGyl exchange gel shift: APEGS法）を開発した。次に、APEGS法を用いて、ラット培養海馬神経細胞における内在性PSD-95のパルミトイル化レベルを定量的に解析した。その結果、PSD-95の約80%が2カ所パルミトイル化された状態で存在し、残りの20%が非パルミトイル化状態で存在していることを見出した。得られた定量的結果に基づき数理シミュレーションを構築したところ、PSD-95のパルミトイル化が、定常状態では、脱パルミトイル化の約4倍速く進行することを示した。また、神経細胞におけるPSD-95の脱パルミトイル化が半減期約1.8時間で進行すること、および2つのパルミトイル基がほぼ同時に切断されることも明らかにした。

次に、先行研究と脱パルミトイル化酵素がセリン加水分解酵素に属することに基づき、ラットおよびマウスの脳組織から38遺伝子を脱パルミトイル化候補酵素として単離した。まず、 $[^3\text{H}]$ パルミチン酸を用いた代謝ラベル法によりPSD-95に対する脱パルミトイル化酵素活性を評価し、10個のPSD-95脱パルミトイル化酵素候補遺伝子(PSD-95 palmitoyl-protein thioesterase: P-PPTと命名)を得た。PSD-95の脱パルミトイル化は主にシナプス後部膜で起こると考えられているため、ポストシナプス型P-PPTに着目したところ、相同性の高い3つのメンバーがシナプス後部に局在していることを見出した。まず、ポストシナプス型P-PPTの酵素活性中心を明らかにした。次に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてポストシナプス型P-PPTを神経細胞に過剰発現させると、PSD-95のパルミトイル化レベルが減少することをAPEGS法により見出した。最後に、ロックダウン実験により、ポストシナプス型P-PPTおよび他の候補酵素がラット培養海馬神経細胞における生理

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

的なPSD-95脱パルミトイル化を担っているかを検討した。しかし、現在の実験条件下では、PSD-95の脱パルミトイル化プロセスを大きく変化させるような結果は得られなかった。

本研究は極めて優れた内容であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。