

文章编号: 1000-1336(2012)04-0332-05

蛋白质的棕榈酰化修饰

秦安东^{1,2} 徐林^{1,2}¹遵义医学院免疫学教研室, 遵义 563003²贵州省免疫学研究生教育创新基地, 遵义 563003

摘要: 棕榈酰化修饰是蛋白质翻译后脂质修饰的重要形式, 是调控蛋白质的转运、稳定、定位和功能的重要机制, 同时, 棕榈酰化修饰还参与多种细胞生物学进程, 与许多疾病的发生发展密切相关。本文主要就蛋白质棕榈酰化及其修饰酶与蛋白质功能、相关疾病的关系做一综述。

关键词: 棕榈酰化修饰; 蛋白质酰基转移酶; DHHC蛋白

中图分类号: Q51

蛋白质在具有生物活性功能之前要经过磷酸化、糖基化、泛素化和脂质化等一系列复杂的修饰过程。棕榈酰化修饰是一种最普遍且唯一可逆的翻译后脂质修饰形式, 能增加蛋白质的疏水性, 对蛋白质的转运、细胞器定位和功能具有重要的作用, 赋予蛋白质多样化的生理功能^[1]。蛋白质棕榈酰化修饰通常指16个碳的脂肪酸棕榈酸盐通过不稳定的硫酯键共价结合到蛋白质特定的半胱氨酸残基(cysteine residues, Cys)侧链上; 在一定条件下, 硫酯键发生水解, 棕榈酸盐脱离Cys, 蛋白质实现去棕榈酰化, 因此棕榈酰化修饰是一个可逆的过程。

1. 蛋白质棕榈酰化修饰的类型及机制

蛋白质棕榈酰化修饰是半胱氨酸侧链修饰的结果, 依据其连接方式, 分为两种类型: (1) S型。S端通过不稳定的硫酯键连接到Cys, 可逆, 较多见。(2) N型。N端通过稳定的酰胺键连接到Cys或Gly, 不可逆。由于绝大多数棕榈酰化蛋白质都以S型修饰为主, 所以棕榈酰化修饰通常指S-棕榈酰化。目前, 蛋白质棕榈酰化修饰的具体机制仍不明确, 通常认为

主要存在两种机制:

(1) 酰基辅酶A(酰基-CoA)介导的棕榈酸盐的转移。认为蛋白质的棕榈酰化是一种自生的酰化作用, 酰基-CoA介导棕榈酸盐与半胱氨酸残基的结合。一些证据表明自生的酰化作用可以解释酵母转运蛋白Bet3的棕榈酰化。首先, 在生理浓度的棕榈酰基-CoA和中性pH环境下, Bet3在体外能迅速与棕榈酸盐比例性地结合^[2]。其次, 在无棕榈酰化修饰能力的细菌体内, Bet3仍然能够被棕榈酸盐比例性地修饰^[3]。再者, 在敲除编码棕榈酰化修饰酶基因的酵母菌株体内, Bet3仍然能够发生棕榈酰化修饰^[4]。

(2) 蛋白质酰基转移酶(protein acyltransferase, PAT)介导的棕榈酰基转移。这是一个酶促反应过程, 是目前主要的研究机制。PAT的发现源于对酿酒酵母的研究, 首先被发现具有PAT功能的是Erf2-Erf4复合物和Ark1, 其分别能促进酵母Ras2蛋白和酵母酪蛋白(yeast casein kinase, Yck2)激酶的棕榈酰化修饰^[5,6]。重要的是Erf2和Ark1在半胱氨酸残基聚集域(CRD)都包含一个保守的由51个氨基酸组成, 具有Cys2His2锌指结构特征的DHHC (Asp-His-His-Cys)模体。随后的研究证实, 富含DHHC基序的蛋白质具有PAT活性, DHHC模体不仅对于PAT活性很重要, 同时对于DHHC蛋白自身棕榈酰化也很重要^[7]。

2. 棕榈酰化修饰与蛋白质的转运及定位

棕榈酰化修饰多种重要蛋白质, 包括GTP结合蛋白、各种酶、离子通道蛋白、神经递质受体和突

收稿日期: 2011-12-28

国家自然科学基金项目(30901318); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(C-457); 贵州省科学技术厅资助项目(C-491); 遵义医学院博士启动基金项目(F-329)资助

作者简介: 秦安东(1981-), 男, 硕士, 检验师, E-mail: andongff@163.com; 徐林(1977-), 男, 博士, 教授, 通讯作者, E-mail: xulinzhouya@163.com

触支架蛋白等。常见的棕榈酰化蛋白有：G蛋白 α 亚群(Gas、Gai、Gaq)、小G蛋白家族(H-Ras、N-Ras、RhoB)、一氧化氮合酶(NOS、eNOS)及突触后密度蛋白-95 (PSD-95)等。通常认为棕榈酰化修饰最主要的功能是增强可溶性蛋白与膜的亲和性，从而调控蛋白质的定位和功能。棕榈酰化修饰对蛋白质最重要的两个作用是调控蛋白质的转运及定位。

2.1 棕榈酰化修饰与蛋白质转运

棕榈酰化修饰对蛋白质转运的作用体现在通过棕榈酰化-去棕榈酰化循环使蛋白质在细胞器和细胞膜之间循环穿梭，Ras蛋白是这一作用典型的代表。Rocks等^[8]发现持续的棕榈酰化-去棕榈酰化过程能推动H-Ras/N-Ras在高尔基体和细胞膜之间持续的循环；光活化技术清晰的显示，H-Ras从细胞膜到高尔基体进行逆行转运。这些发现表明高尔基体的H-Ras池和质膜上的H-Ras池之间存在连续的交换，这种连续的循环可以避免Ras的非特异性定位，从而保证其细胞膜-高尔基体特定的区室化过程。然而，有报道称H-Ras/N-Ras稳定的定位和循环不是位于高尔基体，而是位于循环内涵体^[9]。此外，McCormick等^[10]的研究也证实棕榈酰化修饰对于溶酶体蛋白的转运非常重要。

2.2 棕榈酰化修饰与蛋白质定位

许多膜整合蛋白在胞浆近膜处的半胱氨酸残基都发生棕榈酰化修饰——即使那些靶向细胞膜无需棕榈酰化修饰的蛋白质，这提示棕榈酰化修饰对于膜整合蛋白不仅仅是一个简单的膜锚定，越来越多的证据表明它是蛋白质精确靶向脂筏和其他细胞膜亚区的过程。通过定向诱导棕榈酰化修饰的半胱氨酸残基位点突变和用抑制剂使棕榈酰化蛋白质离开脂筏微区，比如破坏NCAM140的棕榈酰化能够阻止其与脂筏的结合^[11]。

因此，棕榈酰化修饰对于蛋白质的意义不仅是简单的转运，更重要的是蛋白质在细胞器之间的循环穿梭和精确的微区定位。

3. DHHC 蛋白家族

富含DHHC结构域的蛋白质组成DHHC蛋白家族，其成员大多数具有PAT活性，目前认为蛋白质棕榈酰化修饰主要依靠DHHC介导。DHHC蛋白广泛存在于从酵母到人类等各种生物体，人类和酵母的DHHC主要位于内质网或高尔基体。

3.1 酵母 DHHC 蛋白

酵母的DHHC蛋白在酵母内膜系统分布广泛，Erf2、Swf1和Pfa4位于内质网；Akr1和Akr2位于高尔基体、Pfa5位于细胞膜；而Pfa3主要在酵母液泡。遗传学和生物化学分析还鉴定出了酵母DHHC蛋白及其作用的底物：Swf1棕榈酰化修饰的底物是酵母SNARE蛋白(Snc1、Syn8、Tlg1)；Pfa3棕榈酰化修饰的底物是液泡蛋白8 (vacuolar protein, Vac8)；Akr1作用于Lcb4；Pfa4对应的棕榈酰化底物则是Chs3。

酰基-生物素置换法(acyl-biotinyl exchange, ABE)是近年来被广泛应用于蛋白质棕榈酰化修饰的研究，此方法首先用NEM (N-乙基顺丁烯二酰亚胺)封闭Cys游离巯基，然后用羟胺(NH₂OH)将棕榈酸盐从Cys棕榈酰化区上切割下来，并用生物素酰化物(biotin-HPDP)标记NEM-羟胺处理后酰化位点暴露的Cys游离巯基，进行检测。此法高度敏感，不仅适用于活细胞，还适用于蛋白提取物，也可以联合探针法标记和质谱法进行分析。Roth等^[4]首先应用ABE法和质谱法鉴定酵母的棕榈酰化蛋白质，共鉴定出35种棕榈酰化蛋白，包括SNARE蛋白家族、氨基酸通透酶和信号蛋白等，当敲除6个或7个DHHC基因，在所分析的30种蛋白质中，29种不再能被ABE法检出。这充分说明，DHHC蛋白家族介导了酵母细胞的绝大部分的棕榈酰化过程，同时也显示DHHC蛋白作用具有重叠性和特异性。

3.2 哺乳动物 DHHC 蛋白家族

在人和鼠的基因组数据库中，已经鉴定出24个DHHC基因，编码24种DHHC蛋白质。随着检测技术的不断发展，对这些基因所编码的DHHC蛋白及其对底物的识别、定位和表达谱的研究取得了较大进展。

Huang等^[12]采用ABE法鉴定出DHHC13、DHHC14的底物为Huntingdon蛋白；DHHC8则催化paralemmin-1蛋白的棕榈酰化。Fernandez-Hernando等^[13]发现，在人的内皮细胞上存在DHHC2、DHHC3、DHHC7、DHHC8、DHHC21共5种DHHC蛋白，同时发现下调DHHC21的表达，eNOS的棕榈酰化水平显著降低，结果表明DHHC21可能是eNOS的PAT。此外，多项研究还揭示了SNAP25蛋白家族的PAT：DHHC3、DHHC7、DHHC15、DHHC17；G_q蛋白的PAT：DHHC3和DHHC7^[14,15]。

3.3 其他生物 DHHC 蛋白

DHHC蛋白在不同的物种间具有遗传保守性。DHHC蛋白还广泛存在于其他多种生物体, 预测线虫具有15个编码DHHC蛋白的基因、果蝇则有22个DHHC基因^[16]。在拟南芥、玉米、马铃薯等植物中也发现了DHHC蛋白^[17]。此外, 在蓝氏贾第鞭毛虫体内也发现了DHHC蛋白的存在。

3.4 DHHC 蛋白的生理功能

对模型生物的遗传学研究揭示了一些DHHC蛋白重要的生理功能。近年来, 大量的研究关注DHHC与突触后支架蛋白和受体的关系。Noritake等^[18]在研究中阻断突触的活动, 发现PSD-95的棕榈酰化水平迅速降低, 同时伴随着PSD-95在突触聚集。进一步的研究表明定位于树突状细胞的DHHC2转位到突触后密度区介导了PSD-95动态的棕榈酰化过程。Li等^[19]发现DHHC5通过与PSD-95的PDZ3区结合, 影响学习和记忆。果蝇的DHHC17/HIP14 (dHIP14)是一种重要的突触传递基因, dHIP14主要定位于突触前终端, dHIP14的缺失会导致棕榈酰化突触前蛋白SNAP-25和CSP发生定位错误, 这提示dHIP14对于体内棕榈酰化修饰这些突触前蛋白及调控它们的突触前定位及功能的重要性^[20,21]。这些研究提示DHHC蛋白能通过调控效应蛋白的棕榈酰化修饰过程影响蛋白质的转运和定位, 从而影响细胞的生理功能。

此外, DHHC蛋白还与组织的发育、机体的新陈代谢相关。在子宫内电转染shRNA特异性沉默DHHC2、DHHC3、DHHC7基因, 降低胚胎神经细胞DHHC蛋白的表达, 会导致NDEL1的棕榈酰化状态改变, 从而使神经元的迁移受到抑制, 影响大脑的发育^[22]。当敲除DHHC2基因后, A431上皮细胞之间不能紧密连接, 呈现松散和零散, 研究表明DHHC2通过作用于tetraspanins CD9和CD151, 从而对A431上皮细胞间的连接发挥重要功能^[23]。DHHC21功能的缺失会延迟毛发干的分化、滤泡间质上皮及皮脂腺增生^[24]。新近的研究表明, DHHC12能调控 β 淀粉样蛋白前体(amyloid β -protein precursor, APP)的新陈代谢和的产生^[25]。

3.5 DHHC 蛋白与疾病

在对生理功能产生重要影响的同时, 特定的DHHC蛋白表达失调则会引发病理改变, 导致疾病的发生发展。DHHC蛋白与神经系统疾病的关系尤为密

切。人类遗传学研究证实DHHC8与精神分裂症具有相关性, DHHC8基因敲除小鼠会出现前脉冲抑制缺陷, 当面对新环境时, 小鼠的探索行为显著减少, 基因敲除小鼠的异常行为提示DHHC8可能是精神分裂症的一个危险因素^[26]。但也有研究认为, DHHC8与精神分裂症之间并没有关联, 而与滑动性跟踪眼球运动相关^[27,28]。DHHC9是催化N-Ras和K-Ras棕榈酰化修饰的一个PAT, 研究发现DHHC9基因突变会导致X-性染色体连锁智力发育迟缓, 表现类似马方综合征^[29]。此外, 也有研究显示, t(X;15)的平衡易位扰乱了DHHC15的转录本, 导致X-性染色体连锁智力发育迟缓的发生^[30]。

此外, Saleem等^[31]的研究表明, DHHC13基因上无义密码子R425X的突变, 可能影响蛋白质的棕榈酰化修饰、亚区定位及 β -折叠, 从而导致小鼠发生脱发、骨质疏松症、系统性淀粉样变等其他多种神经退行性变疾病。另外, DHHC蛋白还被发现与肿瘤的发生发展具有潜在的关系。DHHC11与膀胱癌潜在的高度恶性病变及非小细胞肺癌相关^[32,33]。这些研究充分表明, DHHC引起的蛋白质棕榈酰化修饰异常, 导致蛋白质的浓度、定位及胞内分布的改变足以引起疾病的发生及发展, 对于具体的机制, 目前绝大部分仍不清楚。

4. 蛋白质去棕榈酰化修饰

目前认为蛋白质的去棕榈酰化修饰也是酶促反应, 但对于蛋白质去棕榈酰化修饰及其修饰酶的研究较少。相对于大量的DHHC蛋白, 仅有酰基蛋白硫酯酶1 (acyl protein thioesterase 1, APT1)和棕榈酰基蛋白硫酯酶1 (palmitoyl protein thioesterase 1, PPT1)两种蛋白质棕榈酰基硫酯酶(protein palmitoyl thioesterase, PPT)被认为催化了脂肪酸棕榈酸盐从蛋白质Cys的脱离^[34]。鉴于PAT作用底物的多样性, APT1和PPT1不可能催化了不同细胞器中所有蛋白质的去棕榈酰化, 因此, 对蛋白质去棕榈酰化修饰和PPT的研究来说, 有大量的工作要做。

5. 展望

综上所述, 棕榈酰化修饰对蛋白质的功能、转运、定位具有重要的作用; 蛋白质棕榈酰化修饰机制研究取得了一定的进展; 但是目前在还存在很多挑战: (1)多达几百种的棕榈酰化蛋白缺乏明确的修饰位点, 大大阻碍了对这些蛋白质的功能的研究;

(2) DHHC蛋白家族成员与其底物作用的特异性仍没有完全解决; (3) PPT是否介导了去棕榈酰化修饰这一过程仍不明确; (4)其他具有PAT功能的蛋白质的发现和功能尚待鉴定等等。这些问题在一定程度上阻碍了对蛋白质棕榈酰化修饰更深入的研究。对这些科学问题的进一步研究必将为深入探索蛋白质棕榈酰化修饰机制提供帮助, 并推动棕榈酰化蛋白质组学的发展, 从而为疾病发生机制的阐明和疾病的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Linder ME *et al.* Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 74-84
- [2] Kummel D *et al.* Unique self-palmitoylation activity of the transport protein particle component Bet3: a mechanism required for protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12701-12706
- [3] Turnbull AP *et al.* Structure of palmitoylated BET3 insights into TRAPP complex assembly and membrane localization. *EMBO J*, 2005, 24: 875-884
- [4] Roth AF *et al.* Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell*, 2006, 125: 1003-1013
- [5] Lobo S *et al.* Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 41268-41273
- [6] Roth AF *et al.* The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Krlp is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol*, 2002, 159: 23-28
- [7] Greaves J *et al.* DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho) physiology. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36: 245-253
- [8] Rocks O *et al.* An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science*, 2005, 307: 1746-1752
- [9] Misaki R *et al.* Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis. *J Cell Biol*, 2010, 191: 23-29
- [10] McCormick PJ *et al.* Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic*, 2008, 9: 1984-1997
- [11] Ponimaskin E *et al.* Fibroblast growth factor-regulated palmitoylation of NCAM determines neuronal morphogenesis. *J Neurosci*, 2008, 28: 8897-8907
- [12] Huang K *et al.* A Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity. *FASEB J*, 2009, 23: 2605-2615
- [13] Fernandez-Hernando C *et al.* Identification of Golgi-localized acyl transferases that palmitoylate and regulate endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Biol*, 2006, 174: 369-377
- [14] Greaves J *et al.* Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J Biol Chem*, 2010, 285: 24629-24638
- [15] Tsutsumi R *et al.* Identification of G protein α subunit palmitoylating enzyme. *Mol Cell Biol*, 2009, 29: 435-447
- [16] Bannan BA *et al.* The *Drosophila* protein palmitoylome: characterizing palmitoyl-thioesterases and DHHC palmitoyl-transferases. *Fly (Austin)*, 2008, 2: 198-214
- [17] Hemsley PA *et al.* Multiple roles for protein palmitoylation in plants. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 295-302
- [18] Noritake J *et al.* Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol*, 2009, 186: 147-160
- [19] Li Y *et al.* DHHC5 interacts with PDZ domain 3 of post-synaptic density-95 (PSD-95) protein and plays a role in learning and memory. *J Biol Chem*, 2010, 285: 13022-13031
- [20] Ohyama T *et al.* Huntingtin-interacting protein 14, a palmitoyl transferase required for exocytosis and targeting of CSP to synaptic vesicles. *J Cell Biol*, 2007, 179: 1481-1496
- [21] Stowers RS *et al.* *Drosophila* huntingtin-interacting protein 14 is a presynaptic protein required for photoreceptor synaptic transmission and expression of the palmitoylated proteins synaptosome-associated protein 25 and cysteine string protein. *J Neurosci*, 2007, 27: 12874-12883
- [22] Shmueli A *et al.* Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. *EMBO J*, 2010, 29: 107-119
- [23] Sharma C *et al.* DHHC2 Affects palmitoylation, stability, and functions of tetraspanins CD9 and CD151. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 3415-3425
- [24] Mill P *et al.* Palmitoylation regulates epidermal homeostasis and hair follicle differentiation. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000748
- [25] Mizumaru C *et al.* Suppression of APP-containing vesicle trafficking and production of β -amyloid by AID/DHHC-12 protein. *J Neurochem*, 2009, 111: 1213-1224
- [26] Mukai J *et al.* Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat Genet*, 2004, 36: 725-731
- [27] Shin HD *et al.* Association of ZDHHC8 polymorphisms with smooth pursuit eye movement abnormality. *Am J Med Genet B Neuropsychiatric Genet*, 2010, 153B: 1167-1172
- [28] Xu M *et al.* Testing for genetic association between the ZDHHC8 gene locus and susceptibility to schizophrenia: an integrated analysis of multiple datasets. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatric Genet*, 2010, 153B: 1266-1275
- [29] Raymond FL *et al.* Mutations in ZDHHC9, which encodes a palmitoyltransferase of NRAS and HRAS, cause X-linked mental retardation associated with a marfanoid habitus. *Am J Hum Genet*, 2007, 80: 982-987
- [30] Mansouri MR *et al.* Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13: 970-977
- [31] Saleem AN *et al.* Mice with alopecia, osteoporosis, and systemic amyloidosis due to mutation in *Zdhhc13*, a gene coding for

- palmitoyl acyltransferase. *PLoS Genet*, 2010, 6: e1000985
- [32] Yamamoto Y *et al.* Gain of 5p15.33 is associated with progression of bladder cancer. *Oncology*, 2007, 72: 132-138
- [33] Kang JU *et al.* Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet*, 2008, 182: 1-11
- [34] Zeidman R *et al.* Protein acyl thioesterases. *Mol Membr Biol*, 2009, 26: 32-41

Advances in study of protein palmitoylation

QIN Andong^{1,2}, XU Lin^{1,2}

¹Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

²Immunology Innovation Base of Postgraduate Education, Zunyi 563003, China

Abstract Palmitoylation is a vital form of post-translational modification, which has recently been found to be an important mechanism for modulating protein trafficking, stability, localization and function. Protein palmitoylation plays a pivotal role in numerous cellular processes and has been involved in specific human disorders. This review focuses on protein palmitoylation and the related enzymes and their relationship with protein function and related diseases.

Key words palmitoylation; protein acyltransferases; DHHC protein