

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14583

研究課題名(和文)新規SUMO化動態制御機構を介したシナプス伝達調節

研究課題名(英文)Control of synaptic transmission by a novel mechanism regulating SUMOylation

研究代表者

秋山 博紀(Akiyama, Hiroki)

早稲田大学・人間科学学術院・講師(任期付)

研究者番号：40568854

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):SUMO化とは、SUMO (small ubiquitin-like modifier) の付加によって標的タンパク質の機能を制御する可逆的な翻訳後修飾の一種であり、近年、神経変性疾患との関連が指摘され始め注目を集めている。タンパク質のSUMO化状態はSUMOの付加と除去を担う酵素の活性バランスによって決定されると考えられてきた。しかし、研究代表者らが同定した脱SUMO化酵素SEN5の新規アイソフォームは、酵素活性を失っており、さらに、他の脱SUMO化酵素と競合することでSUMO化を亢進した。すなわち、本研究課題は酵素活性に依存しない新規のSUMO化制御機構の存在を証明することに成功した。

研究成果の概要(英文):Covalent conjugation of small ubiquitin-like modifiers (SUMOs) or SUMOylation is a reversible post-translational modification that regulates the stability and function of target proteins. Numerous studies have implicated SUMOylation in various physiological and pathological processes in cells and organs; however, SUMOylation-regulating machinery remains elusive. The balance between ligase-mediated conjugation and protease-mediated deconjugation is regarded as a determinant of SUMOylation state of target proteins. We identified a novel isoform of sentrin/SUMO-specific protease 5 (SEN5, referred to as SEN5S) that lacks the catalytic domain. Expression of SEN5S increased the amount of SUMOylated proteins, likely by competing with endogenous SEN5. This finding demonstrates a novel mechanism by which SUMO-interacting molecule like SEN5S can modulate SUMOylation state of target proteins in an enzymatic activity-independent manner.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：SUMO SENP

## 1. 研究開始当初の背景

SUMO 化とは、SUMO (small ubiquitin-like modifier) の付加によって標的タンパク質の細胞内局在や安定性などを制御する翻訳後修飾の一種である。近年、SUMO 化異常とアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連が指摘され始めており、注目を集めている。脊椎動物では SUMO1-4 の 4 種類の SUMO の存在が確認されている。このうち SUMO4 は標的タンパク質に結合することが難しいと推測されており、実質的には SUMO1-3 が SUMO 化に関わると考えられている。SUMO2 と SUMO3 はその相同性の高さから SUMO2/3 と呼ばれる。SUMO2/3 は自身の配列内に SUMO 化標的配列を持つため、SUMO 分子が長く繋がった polySUMO チェーンと呼ばれる構造をとることが知られている。これに対して SUMO1 は SUMO 化標的配列を持たないため、標的タンパク質に直接結合した場合は、単 SUMO 化となり、また、polySUMO チェーンの終端に結合し鎖の伸長をとめる役割があると考えられている。

SUMO 化の過程は可逆的であり、リガーゼによる標的タンパク質への SUMO の付加とペプチダーゼによる除去のバランスによって SUMO 化状態が決定されると考えられてきた。哺乳類では 6 種類のペプチダーゼ (SEN1-3, および SEN5-7) の存在が確認されている。このうち SEN1, 2, 5 は、SUMO を標的タンパク質から解離させる isopeptidase 活性に加えて、SUMO 前駆体の一部を切断し、標的タンパク質に結合可能な成熟型へと変える endopeptidase 活性をもつ。すなわち、SUMO 化、脱 SUMO 化どちらの過程にも関わる重要な酵素である。

研究代表者らは、成体マウス脳切片を用いて、SEN5 の局在解析を行ったところ、シナプスへの局在を示唆するデータが得られた。In vitro の実験系を用いた研究では、SUMO 化によるシナプス局在タンパク質の機能制御とそれによる伝達効率への影響が報告されており、申請者らの結果は、in vivo においても SUMO 化によるシナプス伝達調節が行われている可能性を支持するものである。

また、研究代表者らは、SEN5 の新規アイソフォームの同定に成功した (新規アイソフォームを SEN5S、従来型を SEN5L と表記する)。この新規アイソフォームは、活性中心を含む C 末端側を欠失しているため、ペプチダーゼ活性がないものと予想された。加えて、SUMO-interacting motif は保持していることから、他の SENP と競合することで SUMO 化サイクルを調節する可能性が考えられた。このような、リガーゼによる SUMO の付加とペプチダーゼによる除去に依存しない形での SUMO 化サイクルの調節は報告例がなく、これが明らかになれば、全く新規のメカニズムに基づく SUMO 化制御

を提唱することができ、SUMO によるタンパク質機能調節の理解を大きく前進させる成果となると期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、SEN5S によるリガーゼ/ペプチダーゼに依らない SUMO 化サイクルの制御の存在を証明し、さらに、その新規 SUMO 化制御機構がシナプス伝達を制御する可能性を検討することを目的とした。このために、以下を行うこととした。

- (1) 細胞内タンパク質 SUMO 化状態への SEN5L および SEN5S の強制発現による影響の解析
- (2) シナプス伝達への SEN5L および SEN5S 強制発現の影響解析

## 3. 研究の方法

- (1) SEN5L および SEN5S による細胞内タンパク質の SUMO 化状態への影響を検討するため、以下のプラスミドを構築した。

- ・ pEGFP-SEN5L
- ・ pEGFP-SEN5S
- ・ pEGFP-SEN3
- ・ pcDNA3-HA-SUMO3 (Addgene より分与)

- ・ pcDNA3-HA-SUMO3GG

これらのプラスミドおよびコントロールとして pEGFP を、電気穿孔法によって Neuro2a 細胞に導入した。2 日間の培養後、Sample buffer を用いてタンパク質サンプルを調製した。これを SDS-PAGE によって分離し、抗 HA 抗体と HRP 標識抗体によって検出することで、細胞内タンパク質の SUMO 化状態を解析した。

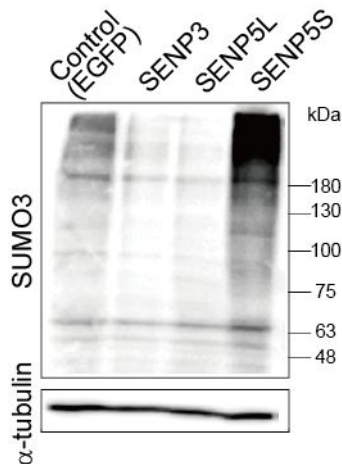
- (2) SEN5L および SEN5S によるシナプス伝達への影響を検討するため、以下のプラスミドを構築した。

- ・ pIRES2-mCherry-SEN5L
- ・ pIRES2-mCherry-SEN5S
- ・ sypHy (Addgene より分与)

胎生 16 日齢の ICR マウスから調製した皮質神経細胞を 11 日間分散培養し、上記のプラスミドおよびコントロールとして pmCherry を、付着細胞用電極を用いた電気穿孔法によって導入した。2 日間培養した後、細胞外液へ高カリウム溶液を投与 (終濃度 50 mM) した際のプレシナプス部における開口放出を全反射照明蛍光顕微鏡法によってとらえ、SEN5L および SEN5S の影響の解析を試みた。

## 4. 研究成果

- (1) SEN5L, SEN5S および SEN3 とコントロールとして EGFP を発現させた Neuro2a における、細胞内の SUMO 化状態を解析したところ、次ページに示す図のような結果を得た。



**図 . SENP5L/S による SUMO 化状態への影響**  
株化細胞に EGFP, EGFP-SEN3, EGFP-SEN5L, EGFP-SEN5S を発現させ、タンパク質への SUMO3 結合量を解析したところ、SEN5S の発現による脱 SUMO 化の阻害が確認された。

コントロール群(EGFP 導入群)に比べて、SEN3 および SEN5L 導入群でタンパク質の SUMO 化量が少なくなっている、すなわち、脱 SUMO 化が亢進していることが確認できる。これはペプチダーゼ活性を持つ SEN3 および SEN5L が予想通りの働きをしたことを示している。これに対して、SEN5S 導入群では、コントロール群に比べてより多くのタンパク質 SUMO 化が見られた。これは SEN5S が内在性の SENP と競合し、脱 SUMO 化を阻害したことによると考えられる。これをさらに検証するため、成熟型である SUMO3GG を用いて実験を行った。結果、前駆型の SUMO3 と成熟型の SUMO3GG 導入群でタンパク質の SUMO 化量に差は認められなかった。すなわち、SEN5S は、SUMO の成熟は阻害せず、標的タンパク質からの脱 SUMO 化を阻害することが明らかとなった。一連の実験により、SEN5S によるリガーゼ/ペプチダーゼに依らない SUMO 化サイクルの制御という、全く新規のメカニズムによって細胞内のタンパク質 SUMO 化が制御されていることを証明できた。

(2) 分散培養系においては、神経細胞間に機能的なシナプスが形成されるにはおよそ 2 週間程度の培養が必要と考えられているため、10 日間培養した皮質神経細胞に開口放出を可視化するためのプローブ sypHy を発現させ、さらに 3 日間培養したサンプルを用いた。基質直上の蛍光強度変化を効率よく捉えることのできる全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、高カリウム(終濃度 50 mM)による脱分極刺激により惹起されるシナプス小胞の開口放出を観察することに成功した。コントロールとして、mCherry を発現させた細胞においては、上述の通り

開口放出を可視化することができた。しかし、pIRES2-mCherry-SEN5L および pIRES2-mCherry-SEN5S を、付着細胞用電極を用いた電気穿孔法によって効率よく細胞に導入することができず、これらの発現によるシナプス伝達の影響を解析するには至らなかった。今後、遺伝子導入用試薬等を用いた導入方法および効率の検討・改善が必要となる。

(3) SENP5L および SENP5S は、胎生期のマウスでも発現していることから、当初計画では予定していなかったものの、神経細胞の発生過程への SENP5 の影響を検討した。神経細胞の発生に関与することが証明できれば、成体におけるシナプスを介した情報伝達にも影響を及ぼすと考えたためである。胎生 16 日齢の ICR マウスから調製した皮質神経細胞に SENP5 をノックダウンするための shRNA およびターゲットタンパク質の無いコントロール shRNA を導入し、3 日間培養した。通常、3 日の培養期間を経ると、多数の未成熟突起の中から 1 本が軸索となる、神経細胞の極性化が起こることが知られている。コントロール群に比べて、SENP5 ノックダウン群では、極性化している細胞の割合が有意に低下していた。すなわち、SENP5 は神経突起の発達制御を介して、神経細胞の情報伝達課程に影響を与える可能性が示唆された。この知見を基に、平成 30 年度より、基盤研究 C の補助のもと、SENP5 による神経突起発達制御メカニズムの詳細を解明するための研究をスタートさせた。

#### <引用文献>

- Henley J.M. et al. (2014), *Physiol. Rev.*, 94(4):1249-1285  
 Owerbach, D et al., (2005), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337(2), 517-520  
 Hickey, C. M. et al., (2012), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(12), 755-766  
 Girach, F. et. al., (2013), *Cell Rep.*, 5(5), 1294-1301

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- Akiyama H, Nakadate K, and Sakakibara S. Synaptic localization of the SUMOylation-regulating protease SENP5 in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 526(6):990-1005. 2018  
 DOI: 10.1002/cne.24384

[学会発表](計 5 件)

- 秋山 博紀, 中館 和彦, 榊原 伸一. 脱

SUMO 化酵素 SENP5 の新規アイソフォームの機能解析．第 40 回日本分子生物学会年会．神戸コンベンションセンター（兵庫）．2017年12月

武正 夏実，秋山 博紀，榊原 伸一．  
-tubulin の SUMO 化による微小管動態の制御．第 40 回日本分子生物学会年会．神戸コンベンションセンター（兵庫）．2017年12月

山田 晴也，秋山 博紀，榊原 伸一．STAND ファミリー新規遺伝子 NWD1 の中枢神経系における局在・機能解析．第 40 回日本分子生物学会年会．神戸コンベンションセンター（兵庫）．2017年12月

秋山 博紀，野村 美琴，中舘 和彦，榊原 伸一．中枢神経系における SENP5 の局在解析．第 39 回日本神経科学大会，パシフィコ横浜（神奈川），2016年7月

岩崎 優美，秋山 博紀，榊原 伸一．新規遺伝子 inka2 の神経系における発現局在と細胞動態に対する機能解析．第 39 回日本神経科学大会，パシフィコ横浜（神奈川），2016年7月

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

秋山 博紀（Akiyama, Hiroki）

早稲田大学

人間科学学術院

講師（任期付）

研究者番号：40568854