

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22735

研究課題名(和文) SBN01による神経幹細胞の増殖・分化スイッチング制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of neural stem cell proliferation and differentiation switching by SBN01

研究代表者

井原 大 (Ihara, Dai)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40884367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々は神経幹細胞におけるニューロン産生を自己複製のスイッチング機能に着目した。我々はSBN01のパートナー分子として、p53の脱ユビキチン化酵素OTUB1を見出している。定常状態の細胞では、p53は発現した後に速やかにユビキチン化されることで分解されている。しかしながら、OTUB1の発現下ではp53のユビキチン化が直ちに解除され、p53タンパク質は分解をまぬがれる。我々はこれをHEK293T細胞を用いた免疫沈降法により確認した。また、神経幹細胞における両タンパク質の発現を解析したところ、共に核に局在を示した。本研究を通してSBN01がp53を制御する仕組みの一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではp53の新規制御機構の解明を通して、神経幹細胞がどのように自己複製とニューロン産生を制御しているのか解析した。正常な神経幹細胞の分裂の破綻は精神疾患の病因となる。精神疾患の診断は客観的な指標が乏しいことから、細胞・分子レベルでの各疾患の病態メカニズムを解明することが求められている。Sbno1は様々な精神疾患に寄与する可能性が報告されている。これらの報告からSBN01がヒトの脳の正常な発達と機能に重要であることは示唆されるがどのように精神疾患の発症に関わっているかは明らかになっていない。本研究は将来的に、精神疾患の客観的な診断方法や治療戦略のための新しい指標を示すことができるであろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on switching function of self-renewal for neuron production in neural stem cells. We focused on SBN01 as a molecule that regulates these neural stem cell functions. p53 is ectopically upregulated in the cerebrum of Sbno1 ko mice. Previous studies have shown that p53 deficiency in neural stem cells causes cortical hypertrophy, suggesting that p53 regulates the number of differentiated neurons. We have identified the p53 deubiquitinating enzyme OTUB1 as a partner molecule of SBN01. In steady state cells, p53 is degraded by ubiquitination quickly after expression. However, when OTUB1 is expressed, ubiquitination of p53 is immediately removed and the p53 protein is spared from degradation. We confirmed this binding by immunoprecipitation. We also analyzed the expression of both proteins in neural stem cells and found that both proteins localized to the nucleus. Through this study, we have elucidated part of the mechanism by which SBN01 regulates p53 via OTUB1.

研究分野：神経発生

キーワード：Sbno1 Otub1 p53 神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳の発生早期の構造である神経管は増殖性の神経上皮細胞からなる。神経管が閉鎖した後に形成される一次脳胞の内部の空所は脳室となり、脳室に面した層(脳室帯)には神経幹細胞が分布する。神経幹細胞が細胞分裂を行い、ニューロンおよびグリア細胞を産生することによって脳が形成されていく。脳の発生過程で幹細胞は対称分裂から非対称分裂へと様式を切り替える。対象分裂では生じた2つの娘細胞はいずれも増殖性を維持し、幹細胞の数が指数関数的に増える。神経幹細胞の非対称分裂では、2つ生じる娘細胞の一方は増殖を停止し神経細胞へ分化を始め、もう一方の娘細胞は神経幹細胞として脳室帯にとどまる。脳の形態形成期の前半には神経幹細胞はニューロンを産生し、後半にはグリア細胞を産生する。脳の発生過程で神経幹細胞の細胞周期はG1期が長くなり、その結果として分裂速度は徐々に遅くなる。分裂速度は神経幹細胞の機能を変化させることが報告されており(Lange et al., 2009)。正常な脳の発生において神経幹細胞の分裂の正確な制御が重要であると考えられる。一方で神経幹細胞のようなDNA合成が盛んな細胞ではゲノムの安定化機構が活発に働くことで、正常なゲノムを持った細胞を分化させることができる。

神経幹細胞の細胞分裂の制御とゲノムの安定化の双方に関与する因子としてp53が考えられる。p53はがん化において最も高頻度に変異が認められる遺伝子であり、がん抑制因子としてよく知られている。p53は細胞増殖を抑制し、細胞ががん化した際には、自律的細胞死を誘導する。

p53欠損は神経幹細胞のゲノムへの変異を高頻度で誘発する。またp53は神経幹細胞の細胞分裂周期に関わる分子の発現を制御している(Xiong et al., 2020)。p53欠損マウスではニューロンの過剰産生によって、脳組織の一部が頭蓋骨の外部へ突出する脳ヘルニアが生じる(Delbridge et al., 2019)。さらに詳細な解析によると、p53欠損マウスでニューロン産生は亢進するが、グリア細胞の産生が抑制されることが示されている(Liu et al., 2013)。また、iPS細胞由来の神経幹細胞においてもp53発現を抑えることによって、神経分化に関わる遺伝子発現が亢進する(Navarro M et al., 2020)。一方で、p53分解に働くMdm2酵素阻害剤で神経幹細胞を処理しp53タンパク質を安定化させると、神経幹細胞のニューロン分化が阻害される(Liu et al., 2017)。これらの報告はp53がニューロン産生を負に制御することを示唆しており、p53は脳の正常な発生に必須な因子であると言える。細胞分裂、細胞分化、さらにゲノムの安定性といった幹細胞の異なる機能に働くためにp53の活性や発現の増減は正常な脳の発生において精密に制御されなくてはならない。しかし、このような脳の発生過程でのp53発現を制御する分子機構はこれまでに明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は脳の発生に関与する新規因子としてSbno1を同定した。Sbno1の欠損によって神経幹細胞でp53タンパク質の過剰な発現が起こることを発見した。つまり、Sbno1は神経幹細胞においてp53の発現の抑制していることを見出している。そこで本研究では、Sbno1がp53を制御する新規分子機構を解明し、この分子機構が神経幹細胞の機能にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### [Sbno1およびO<sub>2</sub>tub1の細胞内局在変化とタンパク質間相互作用の解析]

Sbno1は核因子である。一方で、O<sub>2</sub>tub1は16番目のセリンのリン酸化によって核内へと移行することが報告されている(Herhaus L et al., 2015)。下記の解析によって神経幹細胞におけるO<sub>2</sub>tub1の細胞内局在の変化とそれに伴うSbno1とのタンパク質間結合状態の変化を明らかにする。

1. マウス脳発生初期(胎生12.5日目)、中期(胎生14.5日目)、後期(胎生18.5日目)に大脳皮質を摘出し、1つ1つの細胞に分かれるように組織を処理したのち、培養液に播種し、培養容器に細胞が付着したのち、直ちにホルマリン固定する。培養した細胞は神経幹細胞マーカー分子(Nestin, Pax6)とSbno1もしくはO<sub>2</sub>tub1に対する抗体を用いて二重の免疫染色により培養細胞の中から同定した神経幹細胞内でのSbno1、O<sub>2</sub>tub1タンパク質の細胞内局在を調べる。抗リン酸化O<sub>2</sub>tub1抗体を用い、神経幹細胞の核に局在するO<sub>2</sub>tub1がリン酸化されていることを確認する。
2. U2OS細胞株を用いたO<sub>2</sub>tub1の解析が報告されている(Herhaus L et al., 2015)ので、免疫沈降法によってこの培養細胞でのO<sub>2</sub>tub1とSbno1の結合を確認する。この際、抗リン酸化O<sub>2</sub>tub1抗体を用いてO<sub>2</sub>tub1を検出し、Sbno1と結合しているのがリン酸化されたO<sub>2</sub>tub1であるか調べる。
3. マウス胎生12.5日目の終脳を取り出し、神経幹細胞のコロニーからなるニューロスフィア

を作成する。培養に各種のニューロン分化処理もしくは分化阻害剤を添加し、Sbno1、0tub1 の局在変化を免疫染色によって経時的に観察する。

[Sbno1 と 0tub1 の相互作用による p53 発現制御の解析]

U2OS 細胞を用いて 0tub1 が脱ユビキチン化によって p53 タンパク質を安定化させることが報告されている(Sun et al., 2012)。

1. Sbno1 を U2OS 細胞に強制発現し、0tub1 による p53 の脱ユビキチン化とタンパク質の安定化をウエスタンブロットングにより調べる。
2. Sbno1 が 0tub1 のリン酸化を低下させる可能性について、in vitro キナーゼアッセイで調べる。
3. タモキシフェン誘導型 Sbno1 欠損マウス胚から神経幹細胞を摘出し、培養下で Sbno1 欠損を誘導した際の 0tub1 タンパク質発現への影響を免疫染色とウエスタンブロットによって調べる。同様に p53 発現量が亢進するか調べる。

[Sbno1 と 0tub1 の相互作用の脳皮質発生における働きの解析]

1. Sbno1 の各ドメインを欠損させたタンパク質を培養細胞に発現させ、免疫沈降法により 0tub1 との結合に必須な部位を同定する。
2. 0tub1 結合能を失った変異 Sbno1 は、0tub1 の制御を行うことができないと考えられる。変異 Sbno1 をエレクトロポレーション法によりマウス胚脳皮質に導入し、p53 発現が亢進するか組織免疫染色によって調べる。
3. 0tub1 に対する shRNA をマウス胚脳皮質に導入し、p53 タンパク質発現を低下させた神経幹細胞の挙動やニューロン産生への影響を調べる。

#### 4. 研究成果

本申請研究において、我々は神経幹細胞におけるニューロン産生を自己複製のスイッチング機能に着目した。これらの神経幹細胞機能を制御する分子として、SBN01 に着目し、研究を行った。Sbno1 を欠損させたマウスは脳において p53 の異所的な発現亢進を呈する。既報より神経幹細胞での p53 欠損は脳皮質の肥大を起こすことが知られており、p53 が分化ニューロンの数を制御することが示唆されている。所属研究室では、過去に行ったイーストツーハイブリッドスクリーニングの結果より、SBN01 のパートナー分子として、p53 の脱ユビキチン化酵素 OTUB1 を見出している。定常状態の細胞では、p53 は発現した後に速やかにユビキチン化されることで分解されている。しかしながら、OTUB1 の発現下では p53 のユビキチン化が直ちに解除され、p53 タンパク質は分解をまぬがれる。我々はこれを HEK293T 細胞を用いた免疫沈降法により確認した。また、神経幹細胞における両タンパク質の発現を解析したところ、共に核に局在を示した。本研究を通して SBN01 が OTUB1 を介して p53 を制御する仕組みの一部を明らかにした。現在までに、上記研究成果を第 127 回日本解剖学会で報告した。本研究の論文発表はないが、本申請研究の更なる進行は、SBN01 と OTUB1 による p53 の新規制御機構を提示し、神経発生だけでなく、がんへの応用など多岐に渡ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井原 大
2. 発表標題 神経幹細胞のニューロン産生における p53 の新規制御機構の解明 (10-03-06)
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------