

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500347

研究課題名（和文）シナプスタンパク質ユビキチン様修飾系の生理機能と神経疾患への関与

研究課題名（英文）Biochemical analyses of Ufm1-modification of proteins in the synapse

研究代表者

鈴木 龍雄（SUZUKI TATSUO）

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80162965

研究成果の概要（和文）：

脳における Ufm1 修飾系（最も新しい Ubiquitin 様のタンパク質修飾系）について生化学的な解析を行った。Ufm1 及び Ufc1 (Ufm-conjugating E2-like enzyme) 発現タンパク質を抗原として作成した抗 Ufc1 抗体, 抗 Ufm1 抗体を用いて脳内の Ufm1 および Ufc1 タンパク質の存在, 細胞下分画における局在, ラット組織における発現分布を明らかにした。また, ラット神経初代培養細胞を用いて, 神経細胞内の Ufc1-IR および Ufm1-IR の分布を明らかにした。さらに神経細胞内で Ufm1 化修飾を受ける基質の同定を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Ufm1 (Ubiquitin-fold modifier 1) is a most recently identified ubiquitination-like protein modification tag. Using anti-Ufc1 (Ufm-conjugating E2-like enzyme) and anti-Ufm1 antibodies that were produced by us, localization of Ufc1 and Ufm1 in the brain and cultures neurons was identified. The substrate proteins that receive Ufm1-modification were surveyed in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経薬理学

キーワード：シナプス, PSD, シナプス後肥厚部, タンパク質修飾

1. 研究開始当初の背景

Ubiquitin-fold modifier 1修飾系（Ufm1修飾系）は2004年に発見された最も新しい Ubiquitin 様修飾系で, 詳しい解析はほとんど全くなされていなかった（現在でもUfm1系の研究報告はきわめて限定的である）。タンパク質 Ufm1化の生理機能に関しては, オートファジー

との関連性は示唆されているが, 具体的なデータは現在までに報告されていなかった。研究開始時, E1様酵素であるUba5, E2様酵素であるUfc1, 脱Ufm1化酵素であるUfSP1, UfSP2 (Ufm1-specific protease) は同定されていたが, E3様酵素は見つかっていなかった。また, 基質も同定されていなかった。申請者ら

は、ラットシナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) 画中にUfc1(Ufm-conjugating E2-like enzyme) mRNAを同定し、ラットのUfc1cDNA (AB186051, 2004)をクローニングしたことをきっかけとして、脳におけるUfm1修飾系の研究を開始することにした。

2. 研究の目的

脳神経系、特にシナプスにおけるUfm1タンパク質修飾系の役割を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

大脳皮質 cDNA library よりUfc1, Ufm1 の full-length cDNA のクローニングを行った。これらの GST 融合発現タンパク質を兔に免疫して血清を得た。抗体はそれぞれの抗原を用いてアフィニティ精製して実験に用いた。Ufm1 修飾を受けるタンパク質の検索はまず、抗Ufm1抗体を用いたWestern blotting法を用いて行った。Ufm1 化修飾の検定は、Cos7細胞を用いたタンパク質発現系を用いた。つまり、Cos7細胞にUfm1 化修飾される候補タンパク質をFlag-His-Ufm1-HA, Ufc1, Uba5とともに共発現させ、細胞ライセート中のタンパク質の中に、Ufm1 化(実際にはFlag-His-Ufm1 化)を受けるものがあるかどうかを、抗Flag抗体などを用いたWestern blotting や免疫沈降法により検証した。タンパク質の同定にはLC/MS/MS法を用いた。

4. 研究成果

(1) まず、Ufc1 cDNA(AB186051), Ufm1 cDNAの全長クローニング、抗Ufc1抗体、抗Ufm1抗体(ともにウサギ、ポリクローナル)を作成した。これらは、以降の生化学的、分子生物学的解析を行うためのツール作りに必須である。

(2) Western blottingにて、脳内のUfc1タンパク質の存在と細胞下分画における局在を明らかにした。特に、Ufc1はsoluble画分以外にもシナプス画分(シナプトソーム、シナプス膜)にも分布していた。ラット組織におけるUfc1タンパク質の発現分布を明らかにした。

(3) ラット神経初代培養細胞を用いて、神経細胞内のUfc1-IRおよびUfm1-IRの分布を調べ、非特異的でないと考えられるシグナルを得た。

(4) タンパク質Ufm1化を証明するほ乳類細胞系を利用してラット脳およびHEK293細胞中の内在性Ufm1化タンパク質の検出を抗Ufm1抗体を用いたWestern blottingおよび免疫沈降を用いて試み、当初、非常に微量であるが、非特異的と思われた66 kDバンドなど数種のバンドを検出したが、精査により、その

特異性は非常に微妙であると判定するに至った。66 kDaタンパク質に関しては、ほ乳類細胞発現系を用いたタンパク質Ufm1化の検証ではUfm1化はネガティブであった。作成した抗Ufm1抗体は脳内の遊離のUfm1をWestern blotting法で検出したので、その抗体を用いて脳内在性のUfm1化タンパク質の検出を試みたが通常のWestern blotting法では非常に困難であるという結論に至った。つまり、非特異的でない、有意なバンドの検出が非常に難しかった。その理由としては、Ufm1化タンパク質の存在量が非常にわずかである、あるいはUfm1化されたタンパク質は恒常的には存在しておらず、ターンオーバーが非常に早い事などが考えられた。

(5) しかしながら、さらに別の方法でもUfm1化基質の同定を試みた。2種のUfm1結合タンパク質(CDK5RAP3 [CDK5 regulatory subunit-associated protein 3], PRKAB1 [5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1]), 4種のUfc1結合タンパク質(CDK5RAP3, Gsted [glutathion S-transferase, C-terminal domain containing], MEF2C [myocyte-specific enhancer factor 2C], VHL [Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor])にV5-Hisタグを付けた融合タンパク質とFlag-Ufm1, Uba5 (E1 enzyme), Ufc1 (E2 enzyme)をCos7細胞に共発現させて培養を継続したあと、その細胞ライセートをWestern blottingで検定し、これらのタンパク質がUfm1修飾を受けているかどうかを調べた。結果、上記のタンパク質はどれもUfm1修飾を受けていなかった。

(6) 次に、Cos7細胞にFlag-His-Ufm1-HA, Ufc1, Uba5を発現させ、その細胞ライセートから尿素可溶性画分を作成し、Ni-NTAカラムにかけてFlag-His-Ufm1化タンパク質を精製し、Western blottingを行ってUfm1化基質候補蛋白質の絞り込みを行い、質量分析法により数本の候補バンドを同定した。Ufm1化されたUba5, その分解物, Ufm1化されたUfc1の他にもう一つ、25 kDaのバンドが検出された。この25 kDaのバンドをLC-MS/MSにより解析すると、thioredoxin, RPL26L1 (ribosomal protein L26-like 1), Q6DRA9, histone H4が候補であった。これらの候補タンパク質にV5-Hisタグを付けた蛋白とFlag-Ufm1, Uba5, Ufc1をCos7細胞で共発現させてUfm1の基質となり得るかどうかを調べたが、これらがUfm1化修飾を受けている事象は検出できなかった。

(7) 上記でhistoneが候補として同定されたこと、抗Ufm1抗体染色性が核にも見られたこと、また、histoneはユビキチン化

やSUMO化を含む様々な翻訳後修飾を通してその生理機能が制御されていることから、すべてのタイプのhistoneについてUfm1化修飾の可能性を検討した。V5-His タグを付けたhistone H2A, H2B, H3, H4 をFlag-Ufm1, Uba5, Ufc1 とCos7細胞に共発現させUfm1化を調べた。陽性コントロールとしてHA-ubiquitinも共発現させた。その結果、histone H2A, H2Bのモノユビキチン化は確認できたが、histone H2A, H2B, H3, H4のUfm1化を検出することはできなかった。

(8) 細胞溶出液を用いてUfm1基質が検出されなかったため、Ufm1化蛋白質が細胞外に放出されている可能性を検証した。Flag-Ufm1, Uba5, Ufc1をCos7細胞で共発現させてその培養上清を抗Flag抗体で免疫沈降後、Ni-NTAカラムで精製しWestern blotで解析すると、Flag-His-Ufm1-Ufc1のバンドを検出した。この他にはimmunoreactive bandは検出されなかった。このことから、タンパク質Ufm1化修飾が、一般タンパク質の細胞外放出に関わっている可能性はかなり低いと考えている。

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 10 件)
- ① Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ and Sakagami H (2011) SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at postsynaptic specializations of inhibitory synapses. *J. Neurochem.* 116, 1122-1137, 査読有 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07167.x)
 - ② Tatsuo Suzuki, Jingping Zhang, Shoko Miyazawa, Qian Liu, Michael R. Farzan, Wei-Dong Yao (2011) Association of Membrane Rafts and Postsynaptic Density: Proteomics, Biochemical, and Ultrastructural Analyses. *J. Neurochem.* 119: 64-77, 査読有 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07404.x)
 - ③ 鈴木龍雄 (2011) タンパク質合成と可塑性. *Clinical Neuroscience* 29: 763-765(中外医学社), 査読無 (https://www.chugaiigaku.jp/modules/s-hop/index.php?main_page=index&cPath=3)
 - ④ Kathryn A. Skelding, Tatsuo Suzuki, Sarah Gordon, Jing Xue, Nicole M. Verrills, Phillip W. Dickson, John A. P. Rostas (2010) Regulation of CaMKII by Phospho-Thr253 or Phospho-Thr286

Sensitive Targeting Alters Cellular Function. *Cellular Signalling* 22: 759-769, 査読有 (DOI: doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.12.011)

- ⑤ 棚橋 浩, 鈴木龍雄 (2010) LRP4, シナプスをめぐるシグナリング. *生体の科学* 61: 392-393, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)
- ⑥ 鈴木龍雄 (2010) synGAP, シナプスをめぐるシグナリング. *生体の科学* 61:428-429, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)
- ⑦ 鈴木龍雄 (2010) TANC, シナプスをめぐるシグナリング. *生体の科学* 61:500-501, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)
- ⑧ 鈴木龍雄 (2010) p55, シナプスをめぐるシグナリング. *生体の科学* 61:510-511, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)
- ⑨ 鈴木龍雄 (2010) BAALC 1-6-8, シナプスをめぐるシグナリング. *生体の科学* 61:514-515, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)
- ⑩ 鈴木龍雄 (2009) 新規シナプス後部タンパク質の同定と機能の解明: 特にLRP4研究の進展について. *信州医学会誌* 57: 63-70, 査読無 (<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=425>)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Tatsuo Suzuki, Qian Liu (2011) Association of postsynaptic density and membrane raft domain. シナプス後肥厚部-メンブランラフト複合体の解析. 第34回日本分子生物学会年会 (2011. 12. 13, 横浜)
- ② Suzuki T, Liu Q (2011) Analysis of association of PSD with postsynaptic membrane rafts. SFN (Washington, 2011. 11. 13)
- ③ Kato D, Matsukawa N, Kanamori T, Mizuno M, Suzuki T, Ojika K (2011) Colocalization of Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) precursor protein with collapsin response mediator protein (CRMP)-2 at pre synapse in the hippocampus. SFN (Washington, 2011. 11. 12)
- ④ Suzuki, T., Zhang, J-P., Farzan, M. R., Miyazawa, S., Liu, Q., Yao W-D. (2010) Association of membrane rafts

and postsynaptic density: Proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. SFN (San Diego, 2010.11.15)

- ⑤ Suzuki, T., Zhang, J-P., Farzan, M.R., Miyazawa, S., Liu, Q., Yao W-D. (2010) Analysis of postsynaptic membrane rafts and comparison with postsynaptic density prepared from synaptic plasma membrane. APSN2010 (Phuket, Thai, 2010.10.18)
- ⑥ Suzuki, T., Zhang, J-P., Farzan, M.R., Miyazawa, S., Liu, Q., Yao W-D. (2010) Relationship between postsynaptic density and membrane rafts at the postsynaptic sites. シナプス後肥厚部-メンブランラフト複合体の解析, 神経化学/神経科学 (2010.9.3, Kobe)
- ⑦ KA Skelding, J Xue, T Suzuki, NM Verrills, PW Dickson, JAP Rostas (2010) Mechanisms of Phosphorylation-Sensitive CaMKII Targeting. Australian Neuroscience Society meeting (Sydney, January, 2010)
- ⑧ Suzuki T, Zhang J, Farzan MR, Miyazawa S, Qian Liu, Wei-dong Yao (2009) Proteomics analysis of lipid raft prepared from synaptic plasma membrane of rat forebrain. SFN (Chicago 2009.10.19)
- ⑨ Skelding KA, Verrills NM, Suzuki T, Dickson PW and Rostas JAP (2009) CaMKII Binding Partners Vary with Cell Type and Phosphorylation State. ISN 2009. 8 (Bussan)

[図書] (計 1 件)

- ① Suzuki T (2011) Isolation of synapse-subdomains by subcellular fractionation using sucrose density gradient centrifugation in Neuroproteomics “Springer Protocols Neuromethods 57” (Li K.W., eds), pp47-61, Humana Press.

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-kaso/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木龍雄 (SUZUKI TATSUO)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80162965

(2) 研究分担者

棚橋浩 (TANAHASHI HIROSHI)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90236654

(3) 連携研究者

()

研究者番号：