

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 6 月 15 日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770071

研究課題名（和文） 成体視細胞の生理機能における SUMO 化の作用機序の解明

研究課題名（英文） The physiological role of SUMOylation in mature photoreceptors

研究代表者

大西暁士（ONISHI AKISHI）

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究員

研究者番号：70569102

研究成果の概要（和文）：1つの蛋白質より多彩な機能を発揮させる分子メカニズムの一つとして翻訳後修飾が重要な役割を担う。SUMO 化は標的蛋白質に 10kD 程度の SUMO（Small Ubiquitin-like Modifier）蛋白質を結合するが、生体視細胞の光受容伝達における SUMO 化の役割は不明であった。そこで、SUMO E2 リガーゼを成体視細胞に成長後に欠損する時期特異的欠損マウスを作製した。免疫組織化学的・電気生理学的解析を行った結果、いずれも野生型と同様であることが分かった。この結果は成体のマウス視細胞において SUMO 化が分化決定に関与する一方、光情報伝達や維持には関与が少ない事を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Post-translational modification (PTM) plays a crucial role in switching activities of the target proteins. Since SUMOylation, one of PTMs, is responsible for photoreceptor specification, we studied the functional role of SUMOylation of mature photoreceptors by using mice in which SUMO E2 ligase was conditionally disrupted. As a result, these conditional knockout mice were normal in immunohistochemical studies and electrophysiological recording, suggesting that SUMOylation is more important in specification and maturation, but not in phototransduction in photoreceptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：網膜 視細胞 SUMO 化 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類において網膜は唯一の光受容組織であり、明暗を感じる杆体視細胞と、青色（Short-wavelength）・緑色（Middle-wavelength）感受性の2種類の錐体視細胞を持つ。外界の視覚（光）情報は視

細胞の過分極応答により電気信号に変換される。即ち、暗所では視細胞外節側面のイオンチャンネルを介した内向き電流が流れることによって脱分極した状態にあるが、外節ディスク膜上の光受容蛋白質（オプシン）が光を受容すると G 蛋白質を介して、イオンチャ

ンネルを閉口させる。これにより過分極した視細胞シナプスからの神経伝達物質放出量が減少することで二次ニューロンへ光情報が伝達される。正常な視覚情報伝達には光受容細胞である視細胞が正しいサブタイプに分化し正常に機能する事が必須であり、これまでに多くの視細胞特異的な転写因子および光受容伝達因子が同定されてきた。

申請者は E3 SUMO リガーゼの一つである転写制御因子 Pias3 (Protein Inhibitor of Activated Stat3) が視細胞のサブタイプの決定に重要である事を明らかにした。SUMO 化とは標的蛋白質の SUMO 結合モチーフ配列 (ΨKxD/E) のリジン残基に SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) 蛋白質を結合させる翻訳後修飾の一つで、その機能は転写制御・蛋白輸送・アポトーシスなど多岐に渡る。申請者は杆体視細胞において、SUMO 化された核内受容体 Nr2e3 (Nuclear Receptor subfamily 2, group E, member 3) が錐体視細胞特異的遺伝子の転写を抑制する事を示し、Nr2e3 の SUMO 結合モチーフの変異は網膜変性疾患の一つである S 錐体増強症候群 (S cone enhanced syndrome) を引き起こす事を報告した (Onishi et al. Neuron. 61, 234, 2009)。

SUMO 化蛋白質は生体においてユビキタスに発現し、分化後の網膜で高く発現している。また、光情報伝達蛋白質の一つであるフォスデューシンが SUMO 化される事が報告され、視細胞の光情報伝達における SUMO 化の関与が示唆された。

2. 研究の目的

視細胞は光を受容する外節部分と細胞体と応答を 2 次ニューロンに伝達するシナプスから形成される。翻訳後修飾の一つである SUMO 化は視細胞特異的な転写因子の活性を制御して視細胞の分化決定に関与するが、成体での視細胞の機能 (視細胞外節における光受容応答や、シナプス伝達過程など) における SUMO 化の役割は不明である。

光情報伝達に関与する蛋白質の一つであるフォスデューシンや、シナプス形成因子である Cask は視細胞でも発現し、SUMO 化が報告されている。そこで、本研究では、成体視細胞において SUMO 化を欠損するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製し、(1) 視細胞の形態・構造の維持 ならびに (2) 光情報伝達 における SUMO 化の関与を明らかにし、SUMO 化の関与が認められた場合、(3) SUMO 化蛋白質のプロテオミクス解析を試みる。

3. 研究の方法

SUMO 化はユビキチン化と同様に E1 (活性化), E2 (結合), E3 (連結) の 3 ステップから成るが、E1, E3 リガーゼが多様であるのに対し E2 リガーゼは 1 種類である。そこで、E2 リガーゼの Flox マウスを作製した。

このマウスに視細胞特異的遺伝子 Crx プロモータ制御下でタモキシフェン誘導型 Cre を発現するトランスジェニックマウス

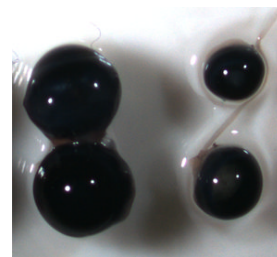
(Crx-CreERT2) を掛け合わせた。成体 (4 週齢) でタモキシフェンを投与し、成体視細胞特異的に SUMO 化カスケードを欠失させた

(Ubc9 CKO マウス)。このマウスを用いて、SUMO 化を阻害した場合の視細胞の形態異常および電気生理応答をコントロールと比較した。CKO マウスの解析と平行して、既知の視細胞で発現する既知の SUMO 化蛋白質 (Cask, mGluR8) の SUMO 化部位の変異蛋白質を電気穿孔法により導入し、局在および形態を比較した。

4. 研究成果

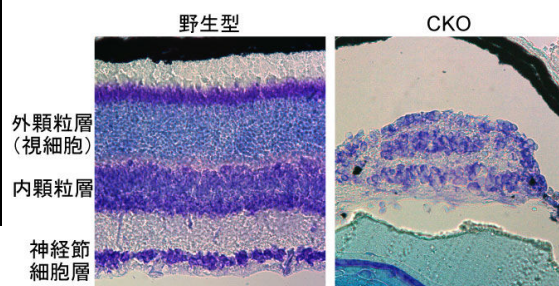
まず、網膜発生における SUMO 化の作用を追試するため、Flox マウスを網膜幹細胞特異的に Cre を発現するマウス (Chx10-Cre) と掛け合わせた。アフリカツメガエルにおいて、SUMO 化が発生中のも不磨区前駆細胞の増殖の制御に機能することが報告されており、Chx10-Cre による CKO マウスでは、網膜幹細胞の増殖が阻害される事が予想される。実際に CKO マウス網膜は、野生型と比して眼球は小さく網膜の細胞数も少ない表現型を示し、作製した Flox マウスの SUMO 化が部位特異的に阻害される事を確認した (下図)。

P21 における眼球写真。



右側は野生型のマウス、左側は CKO マウスの眼球。

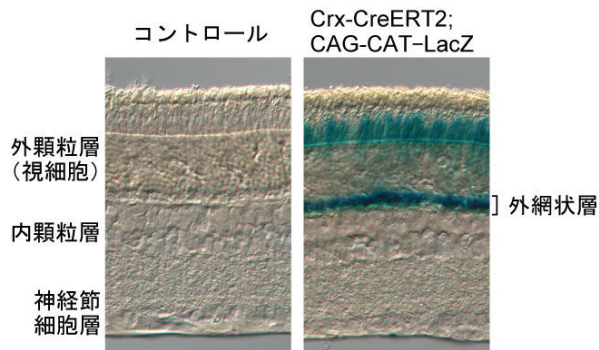
P21 におけるトルイジンブルー染色写真。



野生型は網膜の層構造が観察されるが、CKOでは細胞が少なく、層構造が確認出来ない。出生直後（P2）網膜でも同様の表現型が観察された。

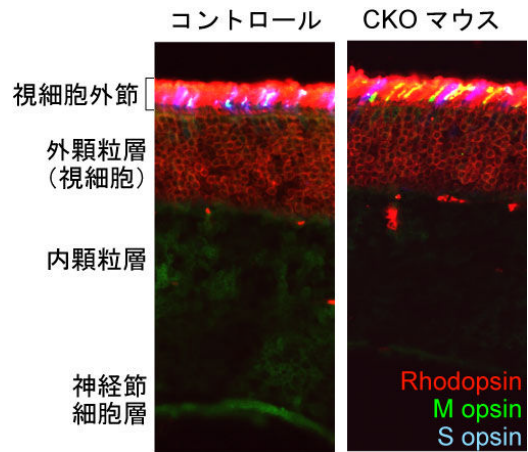
次に、成体の視細胞特異的に SUMO 化カスケードを停止するマウスの表現型を解析した。4週齢のCKOマウスにタモキシフェンを投与し、4週間（1ヶ月）後に網膜の形態を野生型と比較した。

まず、Crx-CreERT2 と CAG-CAT-lacZ の掛け合わせマウス（4週齢）でタモキシフェン投与後1週間でLacZ染色すると、視細胞特異的にLacZのシグナルが観察される事より、誘導型Creの視細胞特異性を確認した（下図）。

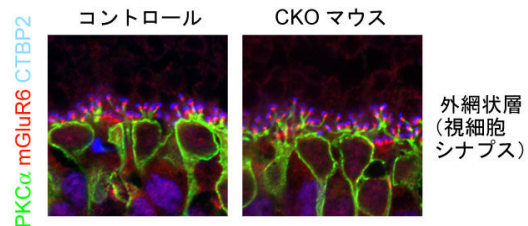


CKOマウスにおいて、外節の光受容蛋白質（杆体および錐体オプシン）、シナプス形成因子など視細胞の分子マーカーの発現パターンを比較した結果、外節の長さや核の位置やシナプスの形態などにおいて特筆する変化は観察されなかった。また、分子マーカーの異所的な発現および視細胞に接続する双極細胞の視細胞への投射にも大きな変化は観察されなかった。同様の解析を投与後6ヶ月後のマウスについても行ったが、大きな変化は観察されなかった。

下図は外節ディスク膜に発現する杆体の光受容蛋白質であるロドプシン（赤色）と錐体オプシン（Mオプシン；緑色 Sオプシン；青色）の3重染色である。外節の長さや外顆粒層（視細胞層）の厚さには有意な差は観察されなかった。また、発生期の視細胞におけるSUMO化の破綻により杆体視細胞でSオプシンの異所的発現が引き起こされるが、成熟後の視細胞でSUMO化を欠損させた場合ではオプシンの異所的な発現は観察されなかった。



下図は外網状層（外顆粒層と内顆粒層の間の視細胞・双極細胞・水平細胞がシナプスを形成する部分）における免疫染色を示す。PKC α （緑色：杆体双極細胞の細胞体に局在）、mGluR6（赤色：ON型双極細胞の先端に局在）、CtBP2（青色：視細胞軸索終末のリボンシナプス部分局在）抗体により視細胞～双極細胞の接続を比較し、有意な差は観察されなかった。



次に、上記のマウスを用いて網膜電図測定による光情報伝達能を比較した。暗順応下（杆体視細胞由来）および明順応下（錐体視細胞由来）の網膜電図を記録した結果、視細胞由来の応答であるa波および脱分極型双極細胞由来の応答であるb波の応答はCKOマウスにおいて野生型と同等であった。また、SUMO化による制御が報告されている分子で視細胞での発現が報告されている分子（mGluR8, Cask）について、SUMO化修飾を受けるリジン残基の変異体を電気穿孔法で導入したが、導入蛋白質の局在や視細胞の形態に明確な差は認められなかった。

これらの結果は、視細胞におけるSUMO化は視細胞の分化決定に大きく関与し、光情報伝達や維持には関与が低い事を示している。また、視細胞の分化決定期におけるSUMO化カスケードの欠損は錐体オプシンの杆体における異所的な発現を引き起こしたが、CKOマウスではこの現象は認められなかった事

より、視細胞の成熟期ではメチル化など別の分子機構が視細胞サブタイプ特異的な遺伝子発現制御に機能している可能性が高い。

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 5 件)

①Katoh, K., Omori, Y., Onishi, A. (代表), Sato, S., Kondo, M., Furukawa, T. (2010) Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci*, 30 (19), 6515-6526. 査読有り doi: 10.1523/JNEUROSCI.0771-10.2010

②Onishi, A. (代表), Peng, G.H., Poth, E.M., Lee, D.A., Chen, J., Alexis, U., de Melo, J., Chen, S., Blackshaw, S. (2010) The orphan nuclear hormone receptor ERR beta controls rod photoreceptor survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (25), 11579-11584. 査読有り doi: 10.1073/pnas.1000102107

③Onishi, A. (代表), Peng, GH., Chen, S., Blackshaw, S. (2010) Pias3-dependent SUMOylation controls mammalian cone photoreceptor differentiation. *Nature Neurosci*, 13 (9), 1059-1065. 査読有り doi:10.1038/nn.2618

④Omori, Y., Katoh, K., Sato, S., Muranishi, Y., Chaya, T., Onishi, A. (代表), Minami, T., Fujikado, T., Furukawa, T.. (2011) Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the *Otx2*-deficient retina. *PLoS One*, 6 (5), e19685. 査読有り doi:10.1371/journal.pone.0019685

⑤Sanuki, R., Onishi, A. (代表), Koike, C., Muramatsu, R., Watanabe, S., Muranishi, Y., Irie, S., Uneo, S., Koyasu, T., Matsui, R., Chérasse, Y., Urade, Y., Watanabe, D., Kondo, M., Yamashita, T., Furukawa, T. (2011) miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through *Lhx2* suppression. *Nature Neurosci*, 14 (9), 1125-1134. 査読有り doi: 10.1038/nn.2897

[学会発表] (計 1 件)

大西暁士 (代表) Pias3-dependent SUMOylation directs photoreceptor subtype specification. 日本神経科学学会 2010 年度年会 2010 年 09 月 03 日 神戸

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西暁士 (ONISHI AKISHI)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究員

研究者番号: 70569102

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: