

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23790224

研究課題名（和文） 神経・精神疾患発症機構におけるタンパク質スモ化の役割

研究課題名（英文） Involvement of SUMOylation in pathogenesis of neural diseases

研究代表者

松崎 伸介（MATSUZAKI SHINSUKE）

大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号：60403193

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病を中心とした神経変性疾患発症機構におけるタンパク質スモ化の意義を検討する目的で研究を進めた。その結果、神経機能の維持、神経細胞死からの防御機構にスモ化が関与していることを明らかとした。とりわけ、神経変性疾患で認める小胞体ストレス性細胞死経路におけるスモ化の影響を検討した結果、小胞体ストレス経路にスモ化が関与しており、細胞死誘導因子 CHOP の誘導経路にスモ化が関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

In this project, effects of SUMOylation on neural system has been investigated to elucidate the involvement of it in the pathogenesis of neural and neurodegenerative diseases. As results, SUMOylation should play important roles to maintain synaptic functions and protective function against the neural death pathway observed in neurodegenerative diseases, especially ER stress pathway. The data show that SUMOylation regulates CHOP expression, one of inducers of apoptosis. These results suggest that neural SUMOylation should work protectively against ER stress and regulates the synapse function in neural and neurodegenerative disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：SUMO 化、アルツハイマー病、小胞体ストレス、細胞死、神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは神経変性疾患ならびに精神疾患発症機構を解明することを目的に、小胞体ストレス経路がアルツハイマー病(AD)や網膜の変性に関わること、小胞体ストレス経路での細胞死に caspase-4 が関与すること、caspase-4 の活性にカルシウム-calpine 経路が関与していること、虚血経路において見られる細胞死が AD 発症に見られる細胞死と類似の経路を示すこと、等を報告して来た。さら

には、これまで AD 発症に重要とされるアミロイドβタンパク質の毒性は凝集の進行した状況ではなくβシート形成初期のものが重要であること、等も報告した。すなわち、**脳内での小胞体ストレスならびに酸化ストレスによる細胞死、蛋白質凝集の制御が重要であることを示した。**一方で、我々は統合失調症脆弱性因子と呼ばれる DISC1, Dysbindin, PACAP を中心に検討をすすめ DISC1 が Fez1, DBZ, Kendrin といっ

た種々の結合パートナーと相互作用する事で正常な神経回路形成に関与していること、さらに DISC1 は種々の細胞接着因子の発現を制御して神経細胞間のネットワーク形成に関与し、DISC1 の発現障害は接着因子の発現障害を介して神経回路網の未成熟を引き起こすことを示した。Dysbindin が転写因子と協調し MARCKS 等の発現を制御、シナプス形成や神経伝達物質の放出に影響を及ぼすこと、JNK 経路を制御し細胞骨格系に影響を及ぼすこと、さらには Dysbindin ノックアウトマウスが統合失調症様の行動変化を示すこと、等を報告して来た。さらに PACAP シグナルが下流のシグナルに影響し stathmin1 という因子の発現を制御しており、PACAP ノックアウトマウスにおいて stathmin1 発現上昇が生じた結果細胞の分岐に異常を示すこと、等を示して来た。すなわち、**精神疾患発症の基盤として神経回路の異常が存在する可能性を示した。**

タンパク質翻訳後修飾が神経系においても重要であることが近年多数報告されており、ユビキチン化・糖鎖修飾・リン酸化、等多くの修飾が細胞機能の維持に重要であることは多数の報告がなされている。それら翻訳後修飾の1つとして SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) 化が 1990 年代に報告された。SUMO は、ユビキチンと構造が良く似た約 100 アミノ酸残基からなる低分子量タンパク質あり、SUMO-1, 2, 3, 4 が報告されている。機能的には SUMO-1, 2, 3 が SUMO 化に関与することが知られており、SUMO-1 は主に mono-SUMOylation に作用し、SUMO-2, 3 は非常に高い相同性を示し mono-/poly-SUMOylation も関与することが知られている。近年、SUMO 化 (スモ化/SUMOylation) が神経系において重要な役割を果たしており、シナプス形成に関わる因子 MEF2 を調節しシナプス制御に関わること (Shalizi A, et al. 2006 and 2007)、カニン酸受容体の局在に影響し脳の興奮制御に関わること (Martin S, et al. 2007)、虚血状態での細胞死制御 (Lee YJ. et al. 2009)、さらには神経変性疾患発症機構に関わること (Steffan JS, et al. 2004; Shinbo Y, et al. 2006; Zhong N, et al. 2008; Dorval V, et al. 2006, 2007)、等が報告された。そこで、私は脳内での SUMO 化が持つ意義、精神神経疾患への関与に興味を持ち、第一段階として蛋白質 SUMO1 化の意義の検討を開始した。

実験を開始するにあたり SUMO 化と神

経変性疾患発症機構の関与についての報告をしているトロント大学神経変性疾患研究所 Dr. Paul Fraser と共同研究を開始し、実験に必要な SUMO1 抗体、SUMO1 トランスジェニックマウス (以下 TG マウス) の作成を行った。第一段階として SUMO1 抗体のウェスタンブロット (以下 WB)、免疫沈降への有用性を確認した。また、SUMO1 TG マウスにおいて非常に高い SUMO1 発現を確認した。第二段階として SUMO1 TG マウスの脳サンプルを SUMO1 特異的抗体にて免疫沈降し、得られたサンプルを MS 解析し、多くの骨格系蛋白質、シグナル伝達関連因子、神経伝達物質関連因子、細胞死関連因子など神経精神疾患に関わる多くの因子が見いだされた。**そこで、SUMO1 化が脳内に及ぼす意義を検討し、精神神経疾患の発症機構に SUMO1 化が如何に関与するか、また生理的にどのような意義を持つかを検討することが本研究の目的である。**

### 3. 研究の方法

#### 1: 脳内での SUMO1 化が AD モデルマウスに及ぼす影響についての検討

我々は SUMO1 TG マウスを用いた IP-MS により既に 100 個以上の SUMO 化候補因子を得た。それら候補因子の機能から類推すると、とりわけ神経変性疾患 (原因遺伝子、細胞死関連因子等)、精神疾患 (脆弱性因子、細胞骨格関連因子、神経伝達物質関連因子、等) が予想された。

一方、In vitro の研究において、Paul 博士らは Tau, APP,  $\alpha$ -Synuclein の SUMO 化を示している (Dorval V. et. al, 2006, 2007)。そこで、Dr. Hyslop, Dr. Fraser らが有する AD モデルマウス (CRND8 マウス: APP TG マウス) と SUMO1 TG マウスの掛け合わせを行い、in vivo でどのような影響を示すかを以下の項目を中心に検討した。

#### ① AD で知られている病理像に対する影響の検討

はじめに、CRND8 マウスにおける老人斑形成時期を検討するため CRND8 (+/-) -tg マウスにおける老人斑形成時期を検討するため、生後 12, 16, 20, 24, 28, 32 週齢のマウス脳サンプルを PBS にて還流し、右半球と左半球へと分割した。右半球は 10% ホルマリンによる後固定を行った後、パラフィン置換を行い保存、左半球は凍結保存のため -80 度にて保管した。

各パラフィン脳サンプルは矢状断にて等間隔で切片とし、10 切片ごとにサンプルとして抽出し、計 10 枚の切片に対して免疫染

色を行い、アミロイドβタンパク質（以下Aβ）を染色することで老人斑形成を観察した。この結果を基に、12、24週齢のSUMO1 (+/+)・CRND8 (+/-) -tg マウス脳サンプルを用いた老人斑の検出を同様の方法で行った。検出された老人斑は、ImageJを用いた数値化により、その数と面積が産出された。

凍結サンプルについては、各脳サンプルをシュクロースバッファー化でホモジネートし、上清を可溶性サンプル、沈殿はギ酸にて溶解し非可溶性サンプルとして用い、Aβ測定用Elisaキットを用いてAβ1-40並びにAβ1-42の濃度を測定した。

## ② CRND8 (+/-) -tg マウスの示す行動学的変化への影響についての検討

CRND8 マウスにおける行動異常を検討する目的で、電気刺激によるフット刺激を用いた恐怖条件付け記憶テストを行うとともに、実験条件の設定を行った。これらの条件を用いて、野生型マウス、CRND8 (+/-) -tg マウス、SUMO1 (+/+)・CRND8 (+/-) -tg マウスを用いた恐怖条件付け記憶テストを施行した。

## 2: 神経細胞死における SUMO 化の影響についての検討

### ① 小胞体ストレスの SUMO 化の関わる経路に対する検討

小胞体ストレス性神経細胞死に対してSUMO化が関与するか否かを検討する目的で、神経芽細胞種SK-N-SH細胞にサブシナルジン（以下TG）、ツニカマイシン（以下、TM）負荷を行った状態での細胞内SUMO化レベルをanti-SUMO1抗体を用いたWB法にて検討した。

### ② 小胞体ストレス下での細胞死に対する影響の検討

小胞体ストレス性神経細胞死に対してSUMO化が関与するか否かを検討する目的で、神経芽細胞種SK-N-SH細胞に対してsiRNA法を用いたUBC9ノックダウンを行い、小胞体ストレス誘導剤であるTG負荷を行った。細胞死測定方法としてはWST-1法を用いた。また、細胞死にかかわる因子としてBiP並びにCHOPの誘導がSUMO化レベルによりどのように影響を受けるかRT-PCRおよびWB法を用いて検討した。

### ③ SUMO 化の関わる小胞体ストレス経路に対する検討

小胞体ストレス経路で作用する各因子ATF6, PERK, IRE1をノックアウトしたMouse Embryonic Fibroblast (MEF) cell lineにおけるCHOP発現様式へのSUMO化の影響

についてRT-PCR法、並びにWB法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

本研究においては神経変性疾患（とりわけAD）における脳内SUMO化を検討する目的で行動学的、細胞生物学的検討を行ってきた。その結果、以下のことを明らかとした。

### 項目1-①について (図1):

生後12週齢、24週齢のCRND8 (+/-) -tg マウスSUMO1 (+/+)・CRND8 (+/-) -tg マウスSUMO1 TGマウスとCRND8マウスを掛け合せ、CRND8マウスが示す行動異常並びにAD病理像（老人斑形成）がSUMO化により抑制されるか否かを検討したところ、免疫染色・Elisaの結果より初期のAβタンパク質蓄積量を減少させる傾向にあるが示唆された。一方で、高齢マウスでは両マウス群にAβ蓄積に対する改善効果が認められないとの結果を得た。

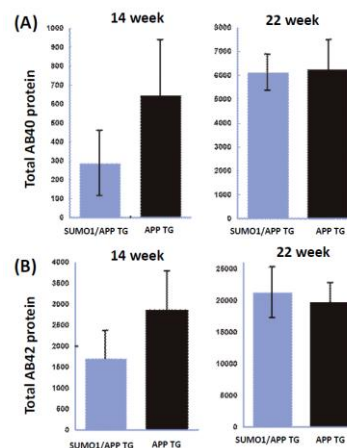


図1: Elisa法によるAβ40、Aβ42の測定

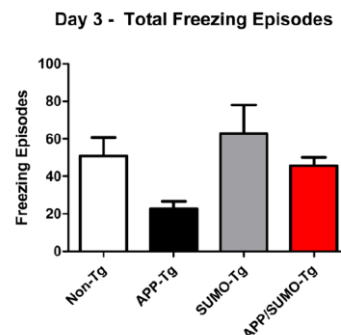


図2: 恐怖条件付け記憶テスト結果

### 項目1-②について (図2):

電気刺激を用いた恐怖条件付け記憶テストにおいて、CRND8 (+/-) -tg マウスは野生型マウスに比してfreezing時間の短縮を示しており、記憶力の低下を示したが、

SUMO1 (+/+)・CRND8 (+/-) -tg マウスは野生型マウスと同等の結果を示した。このことは、AD モデルマウスで認めた記銘力低下を SUMO 1 強制発現により改善したことを示している。

以上のことから、AD モデルマウスの示す記銘力低下に対して脳内 SUMO 化レベルの上昇が改善効果を示す可能性が示された。一方で、その改善の背景に存在すると考えられる A $\beta$  タンパク質の蓄積については初期に軽度の抑制傾向を示すのみであり、後期以降は AD モデル群との間に差を認めないことから、A $\beta$  タンパク質の蓄積そのものに対する効果ではなく、A $\beta$  毒性に対する保護的な作用により、記銘力の維持につながっていると予想された。このことから、シナプス機能の保護・向上に対する SUMO 化の影響を検討する必要性が生じた。そこで、A $\beta$  毒性の一つとして知られており、神経変性疾患で広く認められている小胞体ストレス性細胞死への SUMO 化の影響について検討した。

#### 項目 2-①について (図 3) :

TG, TM 負荷後 0, 1, 2, 4 時間での SUMO 化レベルを検討するため、whole cell lysate を用いた WB を行った結果、TG, TM 負荷後に赤囲みで示すような SUMO 化修飾を受けた蛋白質の増加を認めた。SUMO 化レベルは TG, TM 負荷後 1 時間で既に認めており、2 時間～4 時間後まで上昇していることを明らかとした。

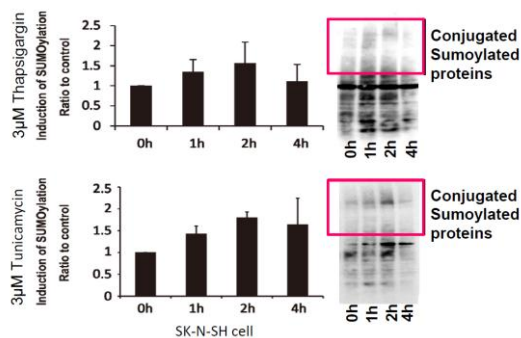


図 3 : 小胞体ストレス下での SUMO 化誘導

#### 項目 2-②について (図 4) :

TG を用いた細胞死アッセイを行ったところ、UBC 9 ノックダウン状態 (SUMO 化抑制状態) では生存率の低下を認めた。すなわち、SUMO 化抑制により、小胞体ストレス性細胞死が増強されることが示された。

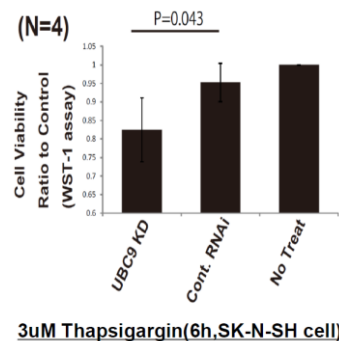
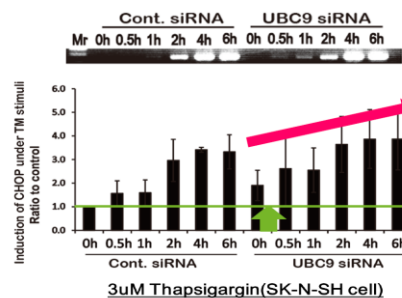


図 4 : UBC9KD による小胞体ストレス性細胞死への影響

#### 項目 2-③について (図 5、図 6) :

SK-N-SH 細胞を用いた検討により、UBC9 ノックダウン状態でベースとなる CHOP 誘導が促進されることが示された。また、その後



の小胞体ストレス刺激により CHOP の発現誘導がかかるため、mRNA, タンパク質両レベルにおいて ER ストレス下での CHOP 誘導が促進されることを明らかとした (図 5)。

図 5 : UBC9 ノックダウン状態における TG 負荷後の CHOP 誘導の変化

また、ER ストレス下で CHOP 誘導に関与するストレスセンサー群の関与を検討するため各種ストレスパスイエをノックダウンした結果、PERK ノックダウン条件下での CHOP 誘導のみが有意に抑制された (図 6)。小胞体ストレス応答の際に誘導される PERK を介した CHOP 誘導がよく知られているが、本件等においても PERK が CHOP の誘導に関与していること、さらには CHOP 誘導に対して SUMO 化が関与している可能性が示唆された。しかしながら、結論を得るには、さらなる検討が必要である。一方で、小胞体ストレス自身が SUMO 化レベルを誘導すること、SUMO 化による ER ストレス保護作用を認めることから本課題により明らかとなったことから AD モデルマウスにおける SUMO 化レベルの上昇が示した記銘力改善には、小胞体ストレスに対する保護効果



が作用していたことが予想される。このことは、他の変性疾患に対する保護作用としてのSUMO化が期待され、今後の継続研究の必要性を示している。

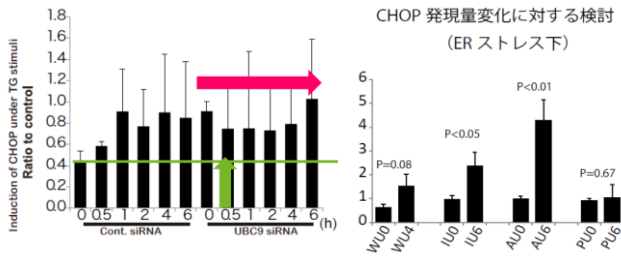


図 6: (左) PERK ノックダウン細胞における小胞体ストレス下での CHOP 誘導に対する SUMO 化抑制の影響、(右) 各種ストレスパスイノックダウン細胞における小胞体ストレス下での CHOP 誘導に対する SUMO 化抑制の影響 (A:ATF6, I:IRE1, P:PERK, W:wild type)

本研究期間では、十分に検討することができなかったが、我々の行ったMS解析では、シナプス関連因子が多数見出されている。また、他グループからもシナプス機能とSUMOの関連性が近年多数報告されている。このことから、ADモデルマウスに対する記憶力改善効果の背景にシナプス機能の改善が存在している可能性は非常に高く、検討を継続が必要である。今後は細胞死、シナプス機能への関与、並びに他の神経変性疾患・精神疾患へのSUMO化の関与を継続して解析し、病態把握・創薬基盤の構築を目指す。

## 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 3 件)

NGF-p75 and neuropsin/KLK8 pathways stimulate each other to cause hyperkeratosis and acanthosis in inflamed skin. Shingaki K, Taniguchi M, Kanazawa S, Matsuzaki S, Maeda T, Miyata S, Kubo T, Torii K, Shiosaka S, Tohyama M. *J Dermatol Sci.* 67(1):71-3, 2012

Anti-inflammatory effect of electroacupuncture in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata. Maeda T, Taniguchi M, Matsuzaki S, Shingaki K, Kanazawa S, Miyata S. *Acupunct Med.* In Press, 2012 Oct 27.

TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression. Takamura H, Koyama

Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. *PLoS One.* 7(12):e51912. 2012

[学会発表] (計 18 件)

(シンポジウム: 国内)

第54回日本神経化学会, DISC1と精神疾患のメカニズム, (石川県加賀市), 2011/9/27, 松崎伸介, 服部剛志, 伊藤彰, 片山泰一, 遠山正彌

第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 中枢神経系におけるstathmin1の機能解析 (山梨県甲府市) 山田浩平, 松崎伸介, 新谷紀人, 橋本均, 馬場明道, 片山泰一, 遠山正彌 2012年3月28日、

(学会発表: 国内ポスター)

第34回日本神経科学大会, TRAP1 regulates mitochondrial dynamics through the fission proteins in neuronal cells. 神経細胞におけるTRAP1によるミトコンドリア形態制御, Hironori Takamura, Shingo Miyata, Kana Takemoto, Yoshihisa Koyama, Shinsuke Matsuzaki, Masaya Tohyama, Taiichi Katayama, 2011/9/15 (奈良県横濱市)

第54回日本神経化学大会, Involvement of TRAP1 in regulation of mitochondrial morphology. ミトコンドリア形態制御におけるTRAP1の役割, Hironori Takamura, Shingo Miyata, Kana Takemoto, Yoshihisa Koyama, Shinsuke Matsuzaki, Masaya Tohyama, Taiichi Katayama, 2011/9/26、(石川県加賀市)

第35回日本神経科学大会・神経系におけるタンパク質スモ化とアルツハイマー病, 松崎伸介, 山田浩平, 高村明孝, 遠山正彌, 片山泰一, Brian Raught, Paul Fraser, 2012年9月18日-21日 (18日) 名古屋

第35回日本神経科学大会・脳発達時におけるKIAA2022の一過性発現と神経突起進展への関与, 石川淑子, 宮田信吾, 小山佳久, 松崎伸介, 山田浩平, 高村明孝, 馬込卓弥, 片山泰一, 遠山正彌, 2012年9月18日-21日 (18日) 名古屋

『第11回アジア太平洋神経化学会大会・第55回日本神経化学会大会合同開催』, KIAA2022 is expressed transiently and regulates neurite outgrowth. Toshiko Ishikawa, Shingo Miyata, Yoshihisa Koyama, Shinsuke Matsuzaki, Kouhei Yamada, Hironori Takamura, Takuya Magome, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama, 2012年9月30日-10月2日、神戸

『第11回アジア太平洋神経化学会大会・第55回日本神経化学会大会合同開催』, Involvement of SUMOylation in ER stress pathway. Toshiko Otoyama Watanabe, Shinsuke Matsuzaki, Hironori Takamura, Kohei Yamada, Paul Fraser, Masaya

Tohyama, Taiichi Katayama, 2012年9月30日-10月2日、神戸

『第11回アジア太平洋神経化学学会大会・第55回日本神経化学学会大会合同開催』、

Involvement of SUMOylation in Plaque and Tangle Pathology.. Shinsuke Matsuzaki,

Kohei Yamada, Nicola St George-Hyslop, Hironori Takamura, Taiichi Katayama,

Masaya Tohyama, Brian Raught, Paul Fraser, 2012年9月30日-10月2日、神戸

第7 回小胞体ストレス研究会、小胞体ストレス性細胞死におけるSUMO化の関与、松崎伸介・片山泰一、2012/11/9、(広島)

第85回日本生化学会大会・マウス

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)の新規isoform  $\Delta E2$ は大脳皮質・海馬においてmRNA発現量が変化する・宮武祐樹, 谷口学, 小山佳久, 服部剛志, 松崎伸介, 遠山正彌, 片山泰一・2012/12/15、マリンメッセ福岡

第118回 日本解剖学会総会・全国学術集会、小胞体ストレス性細胞死におけるSUMO化の関与、松崎伸介, 渡部音哉, 岡村麻美, 高村明孝, 山田浩平, 遠山正彌, 片山泰一、2013年3月28-30日 (28日)、高松

第118回 日本解剖学会総会・全国学術集会、TRAP1による分裂因子Drp1、Mff発現制御とミトコンドリア形態変化、高村明孝, 小山佳久, 松崎伸介, 山田浩平, 服部剛志, 宮田信吾, 遠山正彌, 片山泰一、2013年3月28-30日 (28日)、高松

(学会発表：国内口演)

第38回日本脳科学会、神経系におけるタンパク質SUMO化とアルツハイマー病についての検討、松崎伸介, 遠山正彌, 片山泰一(沖縄県那覇市), 2011/10/8

(学会発表：海外)

Neuroscience 2011, Sumo1 conjugates identified in an over-expressing transgenic mouse model and their links to disease and synaptic function, Nov 16 2011, Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, Shinsuke Matsuzaki, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama, Brian Raught and Paul Fraser

6th Intl Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins: Implications for Human Diseases, Neuronal SUMOylation and Its Contributions to Form, Function and Neurodegenerative Diseases, February 8-11 (10日発表), 2012, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, Shinsuke Matsuzaki, Kohei Yamada, Nicola St George-Hyslop, Brian Raught, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama and Paul Fraser

International Conference on Alzheimer's Disease (AAIC 2012), SUMOylation Connections to Plaque and Tangle Pathology, Shinsuke Matsuzaki, Kohei Yamada, Nicola St. George-Hyslop,

Taiichi Katayama, Masaya Tohyama, Brian Raught and Paul Fraser, July 14-19, 2012 Convention & Exhibition Centre, Vancouver, British Columbia, Canada

Neuroscience2012 (Society for neuroscience 42nd Annual Meeting), Involvement of TRAP1 in morphological changes of mitochondria through the regulation of mitochondrial fission proteins. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. Oct 13-17(13) 2012, New Orleans, USA

[図書] (計3件)

Taiichi Katayama, Shinsuke Matsuzaki, Tsuyosi Hattori and Masaya Tohyama (2011). Molecular Mechanism of the Involvement of the Susceptibility Genes, DISC1, PACAP, TRAP1 and Dysbindin in Major Psychiatric Disorders Such as Schizophrenia, Depression and Bipolar Disease, Psychiatric Disorders - Trends and Developments, Toru Uehara (Ed.), ISBN: 978-953-307-745-1, InTech, 445-466

『多発性硬化症 (MS) と視神経脊髄炎 (NMO) の基礎と臨床 (藤原一男 編)』内、「アストロサイトの構造と機能」株式会社 医薬ジャーナル社 松崎伸介

『脳21』内、「スモイレーション (SUMOylation) が脳をまもる」金芳堂 松崎伸介

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：精神神経系疾患モデル非ヒト動物及びその用途

発明者：遠山正彌、片山泰一、松崎伸介、服部剛志

番号：特願 2011-163236

[その他]

第38回日本脳科学会 奨励賞受賞

演題名：神経系におけるタンパク質SUMO化とアルツハイマー病についての検討

演者：松崎伸介、遠山正彌、片山泰一(那覇), 2011/10/8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 伸介 (Matsuzaki Shinsuke)

大阪大学大学院・連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号：60403193