

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500406

研究課題名(和文)SUMO化によるパーキンソン病関連転写因子の機能制御の解析

研究課題名(英文)Regulation of the transcriptional factors involved in Parkinson's disease by SUMO modification.

研究代表者

西田 有(NISHIDA, Tamotsu)

三重大学・生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：50287463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Parkinの基質として同定されたKRAB-Znフィンガー転写因子PARISがSUMO化されることを発見し、その機能とパーキンソン病発症へのSUMO化の関与を解析した。その結果、PARISのSUMO化依存的、非依存的な転写抑制活性を明らかにした。またPARISは潜在的な転写活性化能を有し、SUMO化はその活性化能にも関与し、PARISの転写活性の正負はプロモーターや細胞種に依存することも明らかにした。さらにPARISのSUMO化を制御する因子を同定しそれらがPARISの転写活性に与える影響を明らかにした。以上の本研究の成果はパーキンソン病発症メカニズムにおけるSUMO化の重要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：PARIS/ZNF746, a member of the family of KRAB zinc-finger proteins transcriptional factors, is recently identified as a substrate of the ubiquitin E3 ligase, parkin, a gene associated with autosomal recessive juvenile parkinsonism. PARIS represses the expression of the transcriptional co-activator, peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 (PGC-1), although the mechanism that controls its repressive activity and function are largely unknown. In this study, we show that PARIS can be modified by the small ubiquitin-related modifier (SUMO) both in vivo and in vitro. Furthermore, mutational analysis reveals that two lysine residues (K189 and K286) are the major sumoylation sites on human PARIS protein. Replacement of sumoylation site lysines with arginine decreases the repression ability of the native PGC-1 gene promoter in neuroblastoma SH-SY5Y cells. These results strongly suggest a correlation between PARIS transcriptional activity and its sumoylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質翻訳後修飾 SUMO化 ユビキチン化 パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

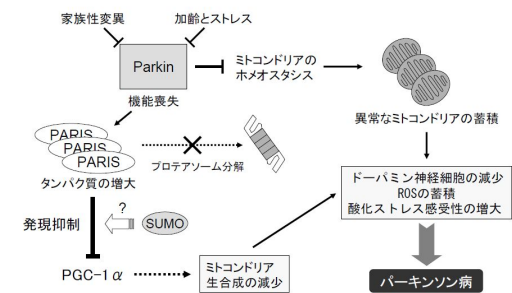
翻訳後修飾は標的タンパク質の活性や機能制御の鍵となる他のタンパク質との相互作用などを急速に、特異的、局所的に変換させる特異的機構である。SUMO はユビキチン類似タンパク質であり、真核生物において種を越えて広く保存されている。ユビキチン同様、そのC末端グリシン残基を介して基質タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合する。しかし、SUMO 化はユビキチン化とその機能的役割が異なり、転写因子の活性制御、エピジェネティック制御、DNA 複製・修復など広範囲な核内プロセスを制御している。さらに近年、核外タンパク質の SUMO 化も報告されており、シグナル伝達、エネルギー代謝など細胞内における様々なタンパク質の機能に重要であると考えられる。SUMO 化は高度に一過的な翻訳後修飾であり、標的タンパク質への結合はユビキチン化と類似した一連の特異的酵素群が SUMO - 基質複合体を形成し行われる。一方、SUMO 特異的プロテアーゼ (脱 SUMO 化酵素) により SUMO は SUMO 化基質から切り離される。このようにある基質の SUMO 化状態は SUMO 化の亢進と脱 SUMO 化反応のバランスにより常に変化すると考えられる。申請者はこれまでに SUMO 修飾の基質特異的認識に重要な働きをする SUMO リガーゼの活性を持つ因子として PIAS を同定し(Kahyo et al. Mol Cell 2001)、PIAS が SUMO 化を介して転写因子の転写活性を制御することを明らかにした(Nishida et al. J Biol Chem 2002, Nishida et al. Biochem Biophys Res Commun 2006)。また脱 SUMO 化酵素についても申請者が SUMO 研究を開始した当初からその存在に注目し、哺乳動物細胞で現在知られる 6 種の内、2 種を先駆けて同定し(Nishida et al. Eur J Biochem 2000, Nishida et al. J Biol Chem 2001)、脱 SUMO 化酵素がタンパク質のリン酸化におけるホスファターゼのように基質タンパク質の機能変換の制御に重要であることを明らかにしてきた。

細胞内の広範囲かつ重要なプロセスにおいて SUMO 化による制御が関与していることが明らかにされるにつれ、SUMO 化の異常が様々な疾患に関与していることが推定された。実際、SUMO 化の欠損を伴う変異がヒト疾患と関連する症例の報告もある。p53 など重要な癌抑制遺伝子産物が SUMO 化されることが明らかにされ、発癌への関与が解析されている。また SUMO 化経路に関わる因子 (E2 酵素 UBC9, SUMO リガーゼ PIAS や脱 SUMO 化酵素 SENP など) の異常発現が発癌へ関与することも示唆されている。近年、ユビキチン化の異常に由来する神経変性疾患についての研究が急速に進展したが、最近 SUMO 化の関与を示唆する研究結果も報告されている。多くの神経変性疾患の患者の脳病変部位に観察される神経封入体はユビキチンやプロテアソームの構成因子だけでなく

SUMO でも免疫染色される。さらに神経変性疾患に関わるいくつかのタンパク質 (huntingtin (ハンチントン病)、Ataxin-1 (1 型脊髄小脳失調症)、Tau, アミロイド前駆体タンパク質 (APP) (アルツハイマー病)、 α -synuclein, DJ-1 (パーキンソン病) など) が SUMO 化されることが明らかにされた。しかし、これらの神経変性疾患に関わる因子の SUMO 化の機構、神経変性に対する役割、疾患発症との関係など SUMO 化の機能はほとんど明らかにされていない。

パーキンソン病は神経変性疾患の中で最も頻度の多い疾患であり、これまでにいくつかの原因遺伝子が同定され世界中で活発に研究が行われているが、未だその発症メカニズムは解明されていない。本研究ではパーキンソン病原因遺伝子産物とその関連因子の機能が SUMO 化により制御されている可能性を探り、発症機構の基礎的知見を得るための研究を行う。

最近、家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の産物であるユビキチンリガーゼ Parkin の新たな基質として KRAB-Zn フィンガー転写抑制因子 PARIS/ZNF746 が同定された(Shin et al. Cell 2011)。PARIS はヒトのパーキンソン病患者の脳に蓄積し、転写コ



アクチベーター PGC-1 とその標的遺伝子の発現を抑制することによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示された (図)。既に KRAB-Zn フィンガーファミリー転写因子について SUMO 化による制御の報告があることから、我々は PARIS の転写抑制活性が SUMO 化によって制御されているのではないかと考え研究を開始し、培養細胞内での SUMO 化を見出した。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では未だ解明されていないパーキンソン病関連転写抑制因子 PARIS の機能制御を SUMO 化による機能変換について解析し、以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) SUMO 化部位の同定と SUMO 化による細胞内局在変化を明らかにする。
- (2) SUMO 化の分子機構を特に SUMO リガーゼと脱 SUMO 化酵素を同定し明らかにする。

(3) SUMO 化が Parkin を介したユビキチン化とプロテアソーム分解に与える影響を明らかにする。

(4) PGC-1 α 遺伝子プロモーターの転写活性抑制における SUMO 化による制御機構を抑制に関わる他の因子を同定し明らかにする。

(5) 新たな活性制御機構を明らかにするため、Parkin 以外の新規結合タンパク質をスクリーニングし、その機能を解析する。

(6) PARIS の SUMO 化が神経変性へ与える影響を、培養細胞系を使用した解析と遺伝子改変マウスを作成して明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PARIS の SUMO 化部位を SUMO 化部位予測プログラムで解析し、実際に予測されたリジン残基をアルギニン残基へ置換した変異体を作製し、その SUMO 化を解析することにより同定した。さらに SUMO 化されない変異体の細胞内における局在変化細胞免疫染色により解析した。

(2) PARIS 特異的 SUMO リガーゼの同定
既知の多くの SUMO 化基質に対して SUMO リガーゼ活性を示す PIAS、RanBP2 の他、最近 SUMO リガーゼ活性の報告のある HDAC4,6 等について PARIS との相互作用と SUMO 化促進活性の有無を、培養細胞発現系を使用した *in vivo* アッセイ法と精製タンパク質を使用した *in vitro* アッセイ法により調べた。

(3) SUMO 化された PARIS から SUMO を切り離す脱 SUMO 化酵素の同定
SUMO 化の制御には修飾の促進だけでなく、脱 SUMO 化酵素による逆反応が重要な役割を果たしている。現在知られている 6 種の哺乳類脱 SUMO 化酵素 (SEN1,2,3,5,6,7) について相互作用と SUMO 化促進活性の有無を上記の SUMO リガーゼの同定と同様の方法で調べた。

(4) PARIS の SUMO 化が Parkin によるユビキチン化に与える影響の解析
野生型 PARIS または SUMO 化されない変異体 PARIS と Parkin の相互作用を培養細胞発現系と免疫沈降法により解析した。またプロテアソーム阻害剤による野生型と SUMO 化されない変異型 (2KR) の細胞内の蓄積の変化、ユビキチン化されたタンパク質の変化、さらにシクロヘキシミドチェイス実験によるタンパク質安定性の変化を解析した。

(5) SUMO 化による PARIS 転写抑制活性の制御機構の解析
PARIS の転写抑制制御における SUMO 化の役割を明らかにするために、PGC-1 遺伝子

プロモーターあるいは LexA-VP16 により活性化される LexA-GAL4 プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより調べた。PARIS の SUMO 化制御と関係性が認められた SUMO リガーゼ、脱 SUMO 化酵素が PARIS 転写抑制活性へ与える影響を同様にルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。

(6) PARIS の新規活性制御因子の探索
PARIS の新規結合タンパク質のスクリーニングは酵母 two-hybrid 法により行った。同定された結合タンパク質について SUMO 化または転写抑制制御への関与を上記と同様な方法で行った。

(7) PARIS の SUMO 化が神経変性へ与える影響
酸化ストレスによる神経変性作用に対する応答に PARIS の SUMO 化が関与しているかを調べるため、野生型または SUMO 化されない変異型 (2KR) を発現するヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞を神経毒 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) で処理した後に細胞の生存率を測定した。
またマウス個体における SUMO 化の機能を解析するために、SUMO 化されない変異体を発現するノックインマウスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) PARIS の SUMO 化部位とその変異による細胞内局在変化
PARIS の SUMO 化部位は KRAB ドメインに隣接した中央ドメインの 2 ヶ所 (K189 と K286) に同定した。野生型と SUMO 化されない変異型 (2KR) の細胞内局在を調べたところ、どちらも核内に局在し大きな違いは認められなかった。しかし培養細胞において SUMO-1 と共発現させると SUMO 化部位依存的に核内スペckルに共局在した。以上に結果、PARIS の SUMO 化は核内における局在や他の核内因子との相互作用に重要な役割を持つことが考えられた。

(2) PARIS の SUMO 化を促進する SUMO リガーゼ
既知の SUMO リガーゼが PARIS の SUMO 化を促進するかどうかを調べたところ、PIAS ファミリータンパク質 PIASy とポリコーム群タンパク質 Pc2/CBX4 が顕著な SUMO 化促進活性を示した。特に PIASy は SUMO2/3 化を顕著に亢進する活性を示した。またヒストン脱アセチル化酵素 HDAC4 も SUMO 化の促進が認められた。さらに免疫沈降法により PIASy と PARIS の相互作用を解析したところ結合を確認できた。PARIS のドメイン欠失変異体を作製し結合領域を調べた結果、SUMO 化部位に隣接する中央ドメインに PIASy の結合領域を同定した。さらにこの結合は PARIS の SUMO 化と PIASy の SUMO

リガーゼ活性を必要としなかった。

(3) PARIS から SUMO を切り離す脱 SUMO 化酵素

既知の哺乳類脱 SUMO 化酵素 について SUMO 化促進活性の有無を調べた結果、培養細胞発現系において SENP1, SENP2 により脱 SUMO 化が認められた。

(4) PARIS の SUMO 化とユビキチン化

野生型と SUMO 化されない変異型(2KR)の培養細胞内での分解速度に違いは認められなかった。さらに培養細胞においてユビキチン化を解析したところ 2KR は野生型と同様にユビキチン化された。この結果は SUMO 化の有無はユビキチン化と無関係であること示しているが、培養細胞内で認められたユビキチン化が Parkin のユビキチンリガーゼ活性によるものかどうかは明らかでなく Parkin 特異的なユビキチン化への影響はさらなる詳細な検証が必要である。

(5) PARIS の SUMO 化による転写活性制御
ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞において 2KR 変異型 PARIS は野生型に比べ PGC-1 α 遺伝子プロモーターの転写活性抑制効果が減少することを明らかにした。つまり PARIS の SUMO 化は転写抑制に機能していることが示唆された。H1299 細胞、HepG2 細胞などにおいても同様な結果が得られた。一方、HEK293 細胞において野生型はむしろ転写活性化に働き、2KR 変異型は転写抑制を示した。

次に転写レポーターシステムに LexA-GAL4 プロモーターと GAL4 - PARIS を使用した解析を行った。その結果、解析を行った全ての細胞種において野生型は転写抑制に働き、2KR 変異型は転写を亢進した。

さらに KRAB-Zn フィンガーファミリー転写因子における転写抑制ドメインとして知られる KRAB ドメインの機能を解析したところ、解析を行った全ての細胞種において KRAB ドメインの欠損により PGC-1 α 遺伝子プロモーターの転写は顕著に活性化された。この結果は PARIS の KRAB ドメインは転写抑制に機能する一方、PARIS は潜在的な転写活性化能を有すると考えられた。興味深いことに、この転写活性化は非 SUMO 化変異型 PARIS では起こらなかった。また脱 SUMO 化酵素 SENP1 の共発現によっても活性化能は失われた。しかし、LexA-GAL4 プロモーターと GAL4 - PARIS を使用した解析では KRAB ドメインの欠損は転写に影響を与えなかった。以上の結果は PARIS の転写活性はプロモーター配列と細胞種に依存し、SUMO 化は正負両方の活性調節に機能していることを示唆している。

さらに SH-SY5Y 細胞における SUMO リガーゼ PIASy のノックダウンは PGC-1 α 遺伝子プロモーターの転写を亢進し、PIASy の過

剰発現はこれを強く抑制した。

(6) PARIS の新規活性制御因子の探索

PARIS 結合タンパク質を、マウス胎児 cDNA ライブラリーを使用した酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングを行った。その結果、SUMO E2 酵素である Ubc9 の他、いくつかの転写関連因子、シグナル伝達に關与する分子、ミトコンドリアタンパク質などが相互作用する分子の候補として得られた。それらのいくつかについては組み換えタンパク質を発現させ免疫沈降法による結合を確認した。さらに PARIS の転写活性に与える影響を解析した。しかし現在までにこれらの因子が PARIS の SUMO 化制御、SUMO 化による機能調節に堅調な影響を与える結果は得られておらず、今後さらなる解析が必要である。

(7) PARIS の SUMO 化と神経変性

野生型または SUMO 化されない変異型(2KR)を発現する SH-SY5Y 細胞を神経毒 6 - ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)で処理した後に細胞の生存率を測定した。その結果、顕著な生存率の相違は認められなかった。しかし SH-SY5Y 細胞における PARIS の発現が低いため 2KR の効果が表現形として十分現れなかった可能性も考えられ、今後新たなアッセイシステムでさらに検討する必要がある。また研究開始当初の目的であったマウス個体での解析は研究期間内に研究を終えることができなかった。

(8) 結論

PARIS は PGC-1 α とその標的遺伝子の発現を抑制することによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示唆されていたが、PARIS の転写抑制の制御機構は明らかでなかった。我々は PARIS が SUMO 化されること、さらに SUMO 化を制御する因子を同定した。PARIS の SUMO 化はそのユビキチン - プロテアソーム系による分解に影響は与えなかったが、転写因子である PARIS の転写活性を調節し、PARIS の SUMO 化を促進する SUMO リガーゼとして機能する PIASy も PGC-1 α プロモーターの転写制御に關与していることを明らかにした。以上の結果は Parkin-PARIS-PGC-1 α 経路によるパーキンソン病発症機構における SUMO 化の重要性を示唆している。しかしながら本研究においてその生理的機能の解明には至らなかった。今後の研究ではより詳細な SUMO 化による制御機構、酸化ストレスや小胞体ストレスなどの細胞応答に SUMO 化がどのように關与しているかを本研究で得られた知見を踏まえて明らかにしていきたい。

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 1 件)

Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development.

J Comp Neurol. 522:3020-3036 (2014) 査読有

DOI:10.1002/cne.23563

〔学会発表〕(計 2件)

西田 有、山田芳司

SUMO リガーゼ PIASy によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS の転写活性調節

日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学津島キャンパス、岡山県岡山市、2015 年 3 月 27 日

西田 有、山田芳司

SUMO 化によるパーキンソン病関連転写因子 PARIS(ZNF746)の転写抑制活性の調節

日本農芸化学会 2014 年度大会、明治大学生田キャンパス、神奈川県川崎市、2014 年 3 月 28 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lsrc.mie-u.ac.jp/human/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 有 (NISHIDA, Tamotsu)

三重大学・生命科学研究センター・助教

研究者番号：50287463

(2)研究分担者

榊原 伸一 (SAKAKIBARA, Shin-ichi)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：70337369