

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890104

研究課題名(和文) SUMO化によるニューロンの生存促進機構

研究課題名(英文) Sumo regulates neuronal survival and differentiation

研究代表者

藤原 一志郎 (Fujiwara, Kazuhiro)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：80638495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Neuron保護作用を持つNecdin蛋白質自身のSUMO化と、Necdin結合蛋白質のSUMO化調節機構について解析を行った。Necdinは、in vitro SUMO化反応系でSUMO化され、RanBP2のE3 ligase部位によりSUMO化はさらに亢進した。またNecdinは、神経幹細胞の核膜孔においてRanBP2、RanGAP1と複合体を形成し、RanGAP1の脱SUMO化を促進することが分かった。これらの結果はNecdinは自身がSUMO化されるだけでなく、RanGAP1のSUMO化を制御することで、核膜孔を介した輸送等に関する重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated necdin sumoylation and necdin-mediated sumoylation. Necdin is sumoylated in vitro and E3 ligase domain of RanBP2 promoted necdin sumoylation. Necdin interacted with RanBP2 and RanGAP1 at nuclear pore in neural stem cells. Furthermore, enforced coexpression of necdin and sumo protease decreased sumoylated RanGAP1 levels in the presence of RanBP2. These results suggest that necdin regulates sumoylation of RanGAP1 to control the nuclear pore complex-mediated transport in neuronal differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：Necdin SUMO RanBP2 Neural stem cell

### 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞から分化した神経細胞(ニューロン)は、新たに分裂を行うことなく長期的に生存する。したがって、ニューロンは低酸素症や虚血などの外的ストレスや活性酸素などによる細胞内ストレスに常に曝されている。近年、これらのニューロン障害の防御機構として、蛋白質翻訳後修飾が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本研究では、特にユビキチン関連蛋白質である SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化に焦点を絞り、ニューロンにおける SUMO 化とそれに関連する因子の機能解析を行い、ニューロンの生存と防御機構を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、未分化幹細胞がニューロンに分化する際に誘導される因子として同定された Necdin に注目して研究を行う。これまでに中枢神経系において、Necdin が様々な蛋白質と相互作用することで、ニューロンの分化促進や生存維持に重要な役割を果たすことが明らかになってきたが、Necdin 自身の細胞内局在や翻訳後修飾についてはほとんど研究されていない。そこで本研究では、特に翻訳後修飾の中でも、細胞内局在や蛋白質の安定性に重要な機能を持つ SUMO 化に焦点を絞り、ニューロンの生存における Necdin の SUMO 化修飾の役割を明らかにする。また Necdin は様々な蛋白質と結合し、その蛋白質の機能を制御することから、Necdin 自身の SUMO 化が他の蛋白質との相互作用や機能にどのような影響を与えるのか検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Necdin 自身の SUMO 化

培養細胞に Necdin、SUMO、SUMO 化 E1、E2 酵素を発現させ、免疫沈降により Necdin の SUMO 化を検討した。In vitro SUMO 化反応系では、Necdin を無細胞合成系で作製し、SUMO、SUMO 化 E1、E2 酵素を反応させた。SUMO 化の検出はウエスタンブロッティングにより行った。また、Necdin と SUMO を培養細胞に過剰発現させ、細胞内のどの部分で共局在するのか共焦点レーザー顕微鏡により検討した。Necdin の SUMO 化 E3 ligase の同定は、in vitro SUMO 化反応系を用い、Ring 型 SUMO E3 ligase の代表である PIAS-1 と Ring を持たない RanBP2 の SUMO 化 E3 ligase 部位を加え、Necdin の SUMO 化が亢進するのか検討した。SUMO 化修飾部位の解析は SUMO 化コンセンサスリジンである 288 番目のリジンをアルギニンに変異させた Necdin を無細胞合成系で作製し、in vitro SUMO 化反応系により検討した。検出はウエスタンブロッティングにより行った。

#### (2) Necdin を介した SUMO 化メカニズム

まず発達過程の脳において、Necdin がどのよ

うな SUMO 化蛋白質と相互作用するのか検討した。そのために、胎生 14.5 日のマウス前脳を用い、抗 Necdin 抗体で免疫沈降を行い、抗 SUMO 抗体により検出を行った。次に、胎生 14.5 日のマウス大脳皮質において免疫組織染色を行い、Necdin と SUMO がどの細胞、領域で共発現するのか共焦点レーザー顕微鏡により検討した。さらに胎生 14.5 日のマウス大脳皮質から単離培養した神経幹細胞とニューロンを用いて免疫細胞染色を行い、免疫組織染色の結果と一致するのか検討した。RanGAP1 の脱 SUMO 化への影響の検討は、培養細胞に Necdin、脱 SUMO 化酵素を過剰発現させ、内在性 RanGAP1 の SUMO 化と発現レベルをウエスタンブロッティングにより検討した。Necdin 欠損マウス由来の神経幹細胞における RanGAP1 の発現を検討するために、胎生 14.5 日のマウス大脳皮質から神経幹細胞を単離し、ウエスタンブロッティングを行い野生型と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) Necdin 自身の SUMO 化

Necdin は大腸菌を用いた大量培養系においては作製が困難であったため、昆虫細胞から抽出した無細胞蛋白質合成系を用いたところ、可溶化画分に十分な Necdin を得ることに成功した。この合成した Necdin を用いて in vitro SUMO 化反応を行ったところ、Necdin は SUMO 化されていた。さらに Necdin の SUMO 化 E3 ligase を同定するために、Ring 型 SUMO 化 E3 ligase の PIAS-1 と Ring を持たない RanBP2 の E3 ligase 部位を加え in vitro SUMO 化反応を行った結果、Necdin は RanBP2 の E3 ligase 部位を加えた場合のみ SUMO 化が亢進していた。さらに Necdin の SUMO 化修飾リジンを同定するために、SUMO 化コンセンサス配列に該当する 288 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体を無細胞蛋白質合成系により作製し、in vitro SUMO 化反応を行った結果、288 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体では SUMO 化の減少が認められた。しかし完全に SUMO 化が消失しなかったことから、288 番目以外のリジンも SUMO 化を受ける可能性が示唆される。次に Necdin、SUMO1、SUMO 化 E1、E2 酵素を培養細胞へ過剰発現させ、Necdin 抗体により免疫沈降を行ったところ、Necdin の SUMO 化と思われるバンドを検出することが出来た。また、このバンドは、288 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体では in vitro SUMO 化反応系と同様に減少したが、やはり完全には消失しなかった。次に RanBP2 は核膜孔複合体構成因子であることから、Necdin が SUMO1 と共に核膜に局在するのか検討した。培養細胞に Necdin を過剰発現させ、免疫細胞染色を行った結果、Necdin の一部は核膜に局在し、SUMO1、RanBP2 と共局在していた。以上のことから、Necdin は in vivo、in vitro の両方で SUMO 化され、SUMO 化リジンは SUMO

化コンセンサスを満たす 288 番のリジンを含む複数存在することが分かった。さらに E3 ligase として核膜孔複合体構成因子の RanBP2 が候補として考えられ、Necdin と SUMO1、RanBP2 は核膜孔で相互作用することが分かった。

#### (2)Necdin を介した SUMO 化メカニズム

Necdin を介した SUMO 化を検討するために、まず胎生 14.5 日のマウス前脳を免疫組織染色したところ、Necdin は幹細胞が多く存在する脳室周辺の細胞において、主に核膜と細胞質に局在していた。一方分化したニューロン層では Necdin は核に強く局在しており、核膜から移動していた。この結果は神経幹細胞をマウス胎仔から単離培養し、ニューロンへ分化させ、免疫細胞染色を行った結果と一致していた。さらに免疫沈降の結果から、Necdin は神経幹細胞において核膜孔複合体構成因子である RanBP2、RanGAP1、そして SUMO と複合体を形成していることが分かった。RanGAP1 は SUMO 化基質として最初に同定された蛋白質であり、細胞内で最も SUMO 化している基質であると考えられている。また RanGAP1 は核輸送だけでなく、細胞分裂の制御にも非常に重要な役割を果たしている。また RanGAP1 はこれまでにどのような条件においても脱 SUMO 化を受けないことが報告されている。しかし、神経幹細胞をニューロンへ分化させ、その分化過程における発現をウエスタンブロッティングで検討した結果、RanGAP1 は脱 SUMO 化を受け分解されることが分かった。そこでこの脱 SUMO 化と分解に Necdin が関与するのか検討するために、培養細胞に Necdin と脱 SUMO 化酵素を発現させ、ウエスタンブロッティングを行うと、RanGAP1 は Necdin 存在下でのみ脱 SUMO 化を受け分解された。さらに Necdin 欠損マウス由来の神経幹細胞における RanGAP1 の SUMO 化レベルは野生型よりも上昇していた。これらの結果は Necdin が神経幹細胞の核膜孔において、RanBP2、RanGAP1 と複合体を形成し、RanGAP1 の SUMO 化を制御する可能性を示唆している。また in vitro SUMO 化反応系により Necdin の SUMO 化は RanBP2 の E3 ligase 部位により促進することから、Necdin の SUMO 化が RanGAP1-RanBP2 との相互作用に重要である可能性も考えられる。これらの結果は Necdin が RanGAP1 の SUMO 化を制御することで、ニューロンへ分化する際に必要な細胞分裂の停止や、転写因子等の核輸送に寄与する重要な知見であると考えられる。

#### 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 2 件)

Minamide R, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K. (2014) Antagonistic

interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex. PLoS One. 2014 Jan 2;9(1):e84460 [DOI:10.1371/journal.pone.0084460][査読有]

Hung Z, Fujiwara K, Minamide R, Hasegawa K, Yoshikawa K. (2013) Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner. J Neurosci. 33 (25): 10362-10373 [DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5682-12.2013] [査読有]

[学会発表](計 9 件)

藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明 Necdin による RanGAP1 の SUMO 化制御 (Necdin regulates RanGAP1 sumoylation) 第 86 回日本生化学大会 横浜 2013.9.12

藤本泉、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明 Necdin 天然変性領域の機能解析 (Functional analyses of the intrinsically disordered domain of necdin) 第 86 回日本生化学大会 横浜 2013.9.12

長谷川孝一、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明 Necdin による PGC-1 を介したニューロン内ミトコンドリア機能の促進 (Necdin promotes PGC-1-mediated mitochondrial function in neurons) 第 86 回日本生化学大会 横浜 2013.9.12

Ibrahim Gur, Kazushiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa. Necdin suppresses PIAS1 SUMO E3 ligase activity by promoting ubiquitin-dependent degradation 第 86 回日本生化学大会 横浜 2013.9.12

片山雄太、藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明 神経発生における哺乳類 Smc5/6 複合体要素の発現と安定性 (Expression and stabilization of mammalian Smc5/6 complex elements in neurogenesis) 第 86 回日本生化学大会 横浜 2013.9.12

南出良平、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明 Necdin と Bmi1 の拮抗的相互作用による神経幹細胞の増殖制御 (Regulation of neural stem cell proliferation via antagonistic

interplay between necdin and Bmi1)  
Neuro 2013 京都 2013.6.23

長谷川孝一、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明 Necdin による PGC-1 の安定化を介したニューロン内ミトコンドリア合成の促進 (Necdin promotes mitochondrial biogenesis via PGC-1 stabilization in neurons) Neuro 2013 京都 2013.6.23

藤原一志郎、長谷川孝一、江連徹、吉川和明 In vitro SUMO 化反応系による Necdin の SUMO 修飾解析 第 85 回日本生化学大会 福岡 2012.12.15

長谷川孝一、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明 Necdin による PGC-1 を介したニューロン内ミトコンドリア合成の促進 第 85 回日本生化学大会 福岡 2012.12.15

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能学研究部門 神経発生制御研究室

ホームページ

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index\\_jap.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index_jap.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原一志郎 (FUJIWARA KAZUSHIRO)

大阪大学 蛋白質研究所・助教

研究者番号：80638495