

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830047

研究課題名(和文)ニューロン分化におけるSUMO化制御機構

研究課題名(英文)Remodeling of nuclear transport system in terminal differentiation of cortical neurons

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RanGAP1は、神経前駆細胞からニューロンへ分化する過程において、急速な脱SUMO化と分解を受けた。これにより、核-細胞質間におけるRanGTP-GDPの勾配が変化し核内輸送が阻害された。細胞分裂制御因子であるCdc6の核内移行阻害は、細胞周期の停止を促進した。これらの結果は、RanGAP1を介した核-細胞質間輸送機構の再構築が、ニューロン分化における細胞周期の停止に重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Neuronal terminal differentiation rapidly promoted desumoylation of RanGAP1 and reduced the levels of nuclear pore-associated RanGAP1. Downregulation of RanGAP1 expression impeded the nuclear import of nucleocytoplasmic shuttling proteins including the DNA replication initiation factor Cdc6 and accelerated cell cycle exit of neuronal progenitors. These results suggest that remodeling of the RanGAP1-mediated nuclear transport system plays a key role in cell cycle exit for terminal differentiation of cortical neurons.

研究分野：分子神経細胞生物学

キーワード：ニューロン 分化 RanGAP1 SUMO

1. 研究開始当初の背景

SUMO は約 10kDa の蛋白質であり、真核生物において広く保存されている。SUMO はユビキチンと構造や基質蛋白質への結合方法において類似点が多いが、ユビキチンが主に基質蛋白質の分解を促進するのに対し、SUMO は転写活性、安定性、細胞内局在等の様々な細胞現象に影響を与えることが報告されている。これまでに中枢神経系において多くの SUMO 化基質が同定され、ニューロンの生存や機能に重要であることが明らかになってきた一方、神経前駆細胞や神経分化過程における SUMO 化の機能や制御についてはほとんど研究されていない。このため、この過程における SUMO 化の役割を解明することは、神経分化機構の究明に意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、発達過程におけるマウス胎仔脳を用いた SUMO 化蛋白質の発現を、ウエスタンブロットで検討したところ、脳の発生が進むにつれ、発現が顕著に減少する SUMO 化蛋白質が存在することを発見した。またその蛋白質が、細胞内で最も SUMO 化修飾を受け、安定的に存在する RanGAP1 (RanGTPase activating protein) であることを示唆する結果を得ていた。そこで神経分化過程における SUMO 化基質として RanGAP1 に注目し、ニューロン分化における脱 SUMO 化や、それに伴う発現減少が、核輸送や細胞周期停止に与える影響を検討した。また、中枢神経系における脱 SUMO 化酵素 (Senp) の発現や機能はほとんど報告されていないため、RanGAP1 の脱 SUMO 化に關与する Senp の同定と、その制御メカニズムについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ニューロン分化における RanGAP1 の脱 SUMO 化と分解機構

胎生 14.5 日目マウス脳から神経前駆細胞を単離し、ニューロンへ分化させる分化系を確立した。神経前駆細胞は EGF、bFGF 存在化で培養し、これらの成長因子を取り除くことで、ニューロンへ分化させた。ニューロンへの分化は Sox2、 β -III tubulin の発現で検討し、細胞周期は Ki67、EdU を用いて検討した。RanGAP1 は細胞内で最も SUMO 化される SUMO 化基質であるため、RanGAP1 の SUMO 化と発現レベルは抗 RanGAP1 抗体を用い、ウエスタンブロットにより検討した。RanGAP1 の分解の作用機序は、プロテオソーム阻害剤である MG132 存在下で、ニューロン分化を行い、その後神経前駆細胞を回収し、抗 RanGAP1 抗体で免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体でウエスタンブロットを行った。

(2) RanGAP1 の SUMO 化状態と発現が核-細胞質間輸送に及ぼす作用

ニューロンへ分化誘導を行い、1、6、24 時間後に神経前駆細胞を回収し、抗 Ran 抗体で免疫蛍光抗体染色を行い、細胞内の RanGTP のレベルを Photometric density として測定した。ニューロン分化過程における、核-細胞質間輸送の変化を視覚するためには、SV-40 の核内移行シグナル (vNLS) と HIV rev の核外移行シグナル (vNES)、及び両者を GFP に付加した融合蛋白質 (vNES-vNLS) を *in vitro* エレクトロポレーション法で神経前駆細胞へ発現させ、GFP の細胞局在を検討した。

ニューロン分化における Cdc6 の細胞内局在が、Cdc6 の持つ核内、核外移行シグナルによって影響を受けるのか検討するために、Cdc6 の NLS 部位 (54-107)、NES 部位 (465-479) を蛍光蛋白質である td-Tomato (Tmt) に付加させた融合蛋白質を *in vitro* エレクトロポレーション法で神経前駆細胞に発現させ、ニューロン分化過程における Tmt の細胞内局在を免疫蛍光抗体染色で検討した。RanGAP1 のニューロン分化時における細胞周期への影響を検討するために、*in vitro* エレクトロポレーション法を用いて RanGAP1 特異的 siRNA を神経前駆細胞へ導入した。siRNA の導入時には td-Tomato を共発現させ、td-Tomato 陽性細胞を siRNA 導入細胞とみなし、Ki67 の発現、EdU の取り込みで細胞周期を解析した。また、RanGAP1 の発現抑制が核-細胞質間輸送における作用を検討するために、Cdc6、vNLS-vNES の細胞内局在を検討した。さらに RanGAP1 の発現抑制によるニューロン分化への影響は、 β -III tubulin、Tbr1 による免疫蛍光染色を行うだけでなく、 β -III tubulin、Tbr1、Tbr2、MAP2 を定量的 RT-PCR 法により解析した。

(3) 不可逆的な細胞周期の停止を伴う最終分化に共通する RanGAP1 の制御機構

胎生 13.5 日目マウスから線維芽細胞を単離、培養後、血清飢餓によって細胞周期を停止させ、RanGAP1 の発現をウエスタンブロットと免疫蛍光染色で検討し、ニューロン分化との違いを検討した。同時に vNLS-vNES を *in vitro* エレクトロポレーション法で発現させ、細胞内局在を検討した。また、線維芽細胞の血清飢餓における Cdc6 の発現をウエスタンブロットと免疫蛍光染色で検討した。次に神経前駆細胞をアストロサイトに分化させ、Cdc6 の細胞内局在を検討した。また vNLS-vNES を *in vitro* エレクトロポレーション法で神経前駆細胞に発現させ、細胞内局在を検討した。アストロサイトの分化は藤本らの方法 (Cell Signal, 28, 94-107 2016) にしたがって行った。ニューロン分化以外の不可逆的な細胞周期停止を伴

う分化系での核-細胞質間輸送の変化を検討するために、ICRの8週齢以降の成熟メスマウスから間葉中胚葉系幹細胞を単離、脂肪細胞へ分化させた。分化方法は藤原らの方法(PLoS One, 7,e30948 2012)にしたがった。脂肪細胞分化はPPAR γ によって確認した。分化過程におけるRanGAP1の発現は、ウエスタンプロットにより検討した。Cdc6の細胞内局在とin vitro エレクトロポレーション法で発現させvNLS-vNESの局在は、免疫蛍光抗体染色法により検討した。

4. 研究成果

(1) ニューロン分化におけるRanGAP1の脱SUMO化と分解機構

胎生14.5日目マウス前脳におけるRanGAP1の発現を免疫組織染色で検討したところ、RanGAP1は主にSox2が強く発現している神経前駆細胞の領域で強く発現しており、 β -III tubulinの強く発現しているニューロン層での発現は低かった。次に胎生14.5日目マウス脳から神経前駆細胞を単離し、ニューロンへ分化させたところ、bFGF、EGF除去後6時間以内にSox2は急激に減少し、 β -III tubulin陽性細胞は大きく上昇していた。またKi67の発現も分化誘導後6時間以内に急激に減少していた。このニューロン分化系において、RanGAP1の発現をウエスタンプロットにより検討したところ、RanGAP1の発現は分化誘導後1時間以内に急に減少しており、その後は一定であった。一方核膜孔においてSUMO化したRanGAP1と結合しているRanBP2の発現は、あまり変化していなかった。次にRanGAP1の発現機序を検討するために、プロテオソームでの分解を検討したところ、RanGAP1はニューロン分化後、ユビキチン化による修飾を受け、プロテオソームで分解されていた。分解されたRanGAP1のSUMO化修飾のタイプを検討した結果、主にSUMO2/3化されたRanGAP1の発現が減少していた。SUMO2/3化したRanGAP1は脱SUMO化酵素のSenp2による脱SUMO化を受けるため、ニューロン分化におけるSenp2の発現を検討した。その結果、Senp2は神経前駆細胞において、ユビキチン-プロテオソーム系による分解を受けている一方、ニューロンへの分化刺激後は安定的に存在することが分かった。Senp2をin vitro エレクトロポレーション法により神経前駆細胞に発現させたところ、SUMO1ではなくSUMO2/3によって修飾されたRanGAP1が特異的に減少することが分かった。以上の結果より、RanGAP1はニューロン分化により急速な脱SUMO化を受け分解を受けることが明らかになった。

(2) RanGAP1のSUMO化状態と発現が核-細胞質間輸送に及ぼす作用

ニューロン分化におけるRanGAP1の発現減少が、核-細胞質間輸送における影響を検討

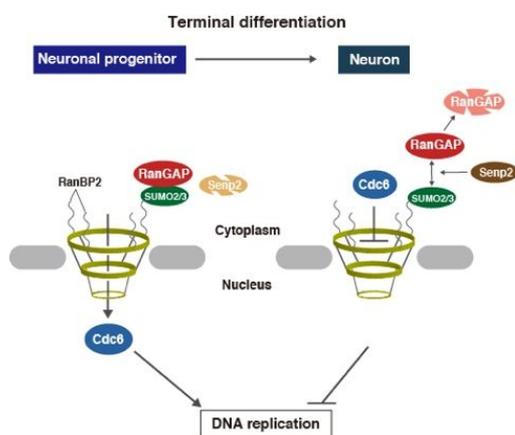
するために、Ranの細胞局在を検討した。その結果、核内のRanレベルはニューロン分化1時間以内に急激に減少していた。次にvNLS、vNES、vNES-vNLSを神経前駆細胞に発現させ、ニューロンに分化させたところ、vNES-vNLSにのみ影響が認められた。神経前駆細胞においてvNES-vNLSは主に核内に存在していたが、分化誘導24時間後のニューロンでは主に核外で存在していた。細胞周期制御因子として機能するCdc6の細胞内局在をニューロ分化において検討した結果、Cdc6は分化に伴い核から細胞質へ移動していた。Cdc6の全長より、NLS、NESを単離し、td-Tomatoに付加した融合蛋白質のニューロン分化における細胞内局在を検討した。その結果、ウイルス由来のNLS、NESを用いた実験結果と同様、NLS、NESを同時に付加した融合蛋白質の細胞内局在のみが影響を受け、核内から細胞質へ移動していた。次にsiRNAにより神経前駆細胞におけるRanGAP1の発現を抑制したところ、EdUの取り込みが減少し、Ki67の発現も減少した。またCdc6と発現させたvNES-vNLSの細胞内局在は核から細胞質へと移動していた。さらに、ニューロンマーカーである、 β -III tubulin、Tbr1、Tbr2、MAP2のmRNA量が上昇し、 β -III tubulin、Tbr1の陽性細胞の増加が免疫染色によって認められた。以上の結果より、ニューロン分化におけるRanGAP1の急速な発現減少は、細胞内のRanGTP-GDPの濃度勾配を減少させ、Cdc6に代表されるNLSとNESを同時に持つ蛋白質の細胞内輸送を阻害し、細胞周期の停止とニューロン分化を促進することが明らかになった。

(3) 不可逆的な細胞周期の停止を伴う最終分化に共通するRanGAP1の制御機構

胎生13.5日目マウス由来の線維芽細胞の細胞周期を血清飢餓によって停止させた。細胞周期の停止はKi67の減少で確認した。免疫蛍光抗体染色の結果によりRanGAP1の発現は、Ki67陽性、陰性細胞で変わらなかった。またvNES-vNLSを導入し、血清飢餓を行ったところ、細胞内局在は血清の有無に関わらず主に核で存在していた。次にCdc6の発現を検討したところ、Cdc6は血清の除去に伴い急激に減少し、血清の再添加により発現は回復した。次に神経前駆細胞から分化させたアストロサイトにおいて、Cdc6の発現を検討したところ、Cdc6は主に核内で発現していた。また発現させたvNES-vNLSの細胞内局在は主に核であった。Cdc6にtd-Tomatoを付加した融合蛋白質をニューロン、アストロサイトに発現させたところ、主な細胞内局在はそれぞれ細胞質、核であった。次に間葉中胚葉系幹細胞を単離し、脂肪細胞へ分化させ、RanGAP1の発現をウエスタンプロットで検討した結果、RanGAP1の発現はニューロン分化同様に、脂肪細胞への分化に伴い減少し

た。内在性 Cdc6 と導入した vNES-vNLS の細胞内局在を検討した結果、未分化の間葉系幹細胞では主に核で発現していたが、Ki67 陰性、PPAR γ 陽性の脂肪細胞ではそれぞれ主に細胞質で発現していた。以上の結果から、RanGAP1 の発現減少とそれに伴う核-細胞質間輸送の変化は、不可逆的な最終分化系においてのみ認められることが明らかになった。

全ての結果をまとめると、RanGAP1 は神経前駆細胞において核膜孔で高度に SUMO 化修飾を受け存在している。ニューロンへの分化誘導刺激は Senp2 の発現を安定させることで RanGAP1 の脱 SUMO 化とユビキチン化による分解を促進する。RanGAP1 の分解は、細胞内の RanGTP-GDP の濃度勾配を減少させ、Cdc6 に代表される NLS と NES の両方を持つ蛋白質の細胞内輸送を阻害する。Cdc6 の発現減少は細胞周期の不可逆的な停止をもたらす（下図残照）。



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）

1. Fujiwara K, Hasegawa K, Oka M, Yoneda Y, Yoshikawa K: Terminal differentiation of cortical neurons rapidly remodels RanGAP-mediated nuclear transport system. 査読有 Genes to Cells 21(11):1176-1194 (2016) DOI: 10.1111/gtc.12434

2. Hasegawa K, Yasuda T, Shiraiishi C, Fujiwara K, Przedborski S, Mochizuki H, Yoshikawa K: Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults. 査読有 Nature Communications 7:10943 (2016) DOI: 10.1038/ncomms10943

3. Fujimoto I, Hasegawa K, Fujiwara K, Yamada M, Yoshikawa K: Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor

cells. 査読有 Cellular Signalling 28:94-107(2016) DOI:10.1016/j.cellsig.2015.11.016

4. Minamide R, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K: Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex. 査読有 PLoS One 9:e84460 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0084460

5. Gur I, Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K: Necdin promotes ubiquitin-dependent degradation of PIAS1 SUMO E3 ligase. 査読有 PLoS One 9:e99503 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0099503

〔学会発表〕（計 2 件）

Fujiwara K, Hasegawa K, Yoshikawa K: Necdin regulates RanGAP1 sumoylation during neuronal differentiation. Neuroscience 2014, 2015 年 11 月 15 日, (Walter E. Washington Convention Center, Washington DC)

藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明:ニューロン分化における Necdin による RanGAP1 の SUMO 化制御 第 88 回日本生化学大会 2015 年 12 月 3 日 (神戸ポートアイランド)

6. 研究組織

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