

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06491

研究課題名(和文)新規SUMO化調節機構による神経突起発達制御

研究課題名(英文)Control of neurite development by a novel SUMOylation-regulating mechanism

研究代表者

秋山 博紀(Akiyama, Hiroki)

早稲田大学・人間科学学術院・その他(招聘研究員)

研究者番号：40568854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後修飾のひとつであるSUMO化(標的タンパク質へのsmall ubiquitin-like modifier [SUMO]の付加)の異常はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連が指摘されているものの、発生期の神経細胞における役割は不明であった。本研究では、我々が新規に同定した、ペプチダーゼ活性を持たないSUMO-specific protease 5 (SEN5S)と従来型SEN5 (SEN5L)によるDrp1の競合的なSUMO化状態制御によって発生期神経細胞のミトコンドリア動態が調節されること、この調節が正常な大脳発生に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった、『神経系発生過程におけるSUMO化の機能的役割とは何か』という問いに答えをさせた本研究により、翻訳後修飾の生理機能、神経系の発生機構の理解が大きく進んだ。特筆すべきは、同一分子(SEN5)のアイソフォーム間の競合的なSUMO化制御という新しいメカニズムを発見し、この新規メカニズムによる制御をつけ、神経系発生過程へ関与する分子を同定したことである。大脳皮質発生は様々な疾患との関連が示されており、本研究から得られた知見はこれらの疾患の病因解明の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Drp1, a key molecule in the mitochondrial fission machinery, undergoes various post-translational modifications including conjugation to the small ubiquitin-like modifier (SUMO). However, the functional significance of SUMOylation/deSUMOylation on Drp1 remains controversial. SUMO-specific protease 5 (Semp5L) catalyzes the deSUMOylation of Drp1. We revealed that a splicing variant of Semp5L, Semp5S, which lacks peptidase activity, prevents deSUMOylation of Drp1 by competing against other Senps. The altered SUMOylation level of Drp1 induced by Semp5L/5S affects mitochondrial morphology. A dynamic SUMOylation/deSUMOylation balance controls neuronal polarization and migration during the development of the cerebral cortex. These findings suggest a novel role of post-translational modification, in which deSUMOylation enzyme isoforms competitively regulate mitochondrial dynamics via Drp1 SUMOylation levels, in a tightly controlled process of neuronal differentiation and corticogenesis.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：SUMO SEN5 神経細胞 大脳発生 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾のひとつである SUMO 化(標的タンパク質への small ubiquitin-like modifier [SUMO] の付加) の異常はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患との関連が指摘され、本研究開始当初から注目を集めていた[1]。また、シナプスに存在する様々なタンパク質が SUMO 化の標的分子として同定され、SUMO 化状態によってシナプス伝達効率が調節されることが明らかになってきた [2-5]。申請者らは、免疫組織化学的手法および免疫電子顕微鏡法を用いて、成体マウス脳において脱 SUMO 化酵素である SUMO-specific protease (SEN5) が脳全域に分布すること、シナプス前部および後部に存在することを明らかにしており [6] (H28-H29 挑戦的萌芽研究の成果)、これは、SUMO 化による広範な生理・病理機能調節を支持するものである。このように、申請者らを含む多くの研究者によって、成体神経系における SUMO 化の生理・病理的意義が解明されつつあった。

しかしながら、SUMO 化および SEN5 が発生期の神経系に及ぼす影響については未解明な部分が多く残されている状況であった。申請者らは、SEN5 のペプチダーゼ活性ドメインを欠失した新規アイソフォーム (SEN5 short) を同定しており、この SEN5 short が従来型 SEN5 (SEN5 long) による脱 SUMO 化を競合的に阻害すること、神経系の発生段階に依存して発現量が変動すること (SEN5 long は生後 4 週目までほぼ一定量の発現を示し、成体ではほとんど見られなくなるのに対し、SEN5 short は胎生後期から発現し始め、生後 2 週目頃まで急激に増加し、成体では優性型となる) を明らかにした (研究開始当初 未発表)。そこで、申請者らは本研究の予備実験として、胎生後期のマウスから調製した大脳皮質神経細胞で SEN5 をノックダウンし、その影響を解析した。結果、神経突起の発達阻害が確認された (研究開始当初 未発表)。上述のように、胎生後期では SEN5 long/short 双方の発現が見られること、および申請者らの予備実験の結果から「SEN5 long/short による拮抗的な SUMO 化状態調節」によって神経突起の発達が制御されている可能性を考えた。さらに、SEN5 による SUMO 化の標的タンパク質のいずれが突起発達調節を担っているかも明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では『神経系発生過程における SUMO 化の機能的役割とは何か』という問いに答えるべく、脱 SUMO 化酵素 SEN5 long/short アイソフォームによる神経突起発達制御機構の詳細に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 皮質神経細胞分散培養系を用いた SEN5 long/short の神経突起発達への影響解析
胎生後期のマウスから調製した大脳皮質神経細胞に SEN5 をノックダウンする shRNA, SEN5 long, SEN5 short, 神経突起可視化用の RFP または mCherry を電気穿孔法により導入し、1-3 日間分散培養を行う。その後、SMI312 による免疫染色によって軸索を標識し、神経細胞の極性化、突起伸長に対する SEN5 の影響を解析した
- (2) SEN5 long/short の神経突起発達制御を担う分子の探索
ミトコンドリアの分裂を担う Drp-1 は SUMO 化されることが知られており [7]、SUMO 化に必要なリジン残基をアルギニンに置換した Drp-1 4KR は Dr. C. Guo (The University of Sheffield, UK) より供与いただいた。
EGFP 標識した SEN5 long/short と HA-SUMO, YFP または Myc 標識した Drp1 wt, Drp1-4KR を HEK293T 細胞に発現させ、HA 抗体による免疫沈降と Western blotting を行い、Drp1 の SUMO 化が SEN5 long/short による拮抗的な制御を受けるかを解析した
EGFP 標識した SEN5 long/short と HA-SUMO または HA 標識した Drp1 wt, Drp1-4KR, ミトコンドリア標識用の pMT-mkO1 を HeLa 細胞に発現させ、SEN5 long/short および Drp-1 の SUMO 化によるミトコンドリア形態の影響を解析した
- (3) SEN5 long/short によるマウス大脳発生への影響解析
胎生 14.5 日目のマウス脳室内に SEN5 shRNA または SEN5 long/short を投与し、電気穿孔法によって神経幹細胞に導入した。胎生 17.5 日目に脳スライス切片を調製し、神経細胞の Radial migration への影響を解析した。ミトコンドリア形態は抗 Tom20 抗体の免疫染色によって可視化した。

4. 研究成果

- (1) 皮質神経細胞分散培養系を用いた SEN5 long/short の神経突起発達への影響
胎生 16 日のマウス脳より調製した皮質神経細胞に SEN5 shRNA を導入し、3 日間分散培養を行ったところ、軸索を獲得し極性化したステージ (stage 3) の細胞の割合が Control shRNA を導入した細胞よりも有意に少なく、神経突起の数も有意に少なかった (図 1 B, C)。また、SEN5 long/short いずれのアイソフォームを強制発現させた細胞においても、コントロールと比較して極性化した細胞の割合が有意に少なく、神経突起数も有意に少なかった (図 1 E, F)。これらの結果は、皮質神経細胞の極性獲得には SEN5 long/short のバランスのとれた発現が必要であることを示唆している。

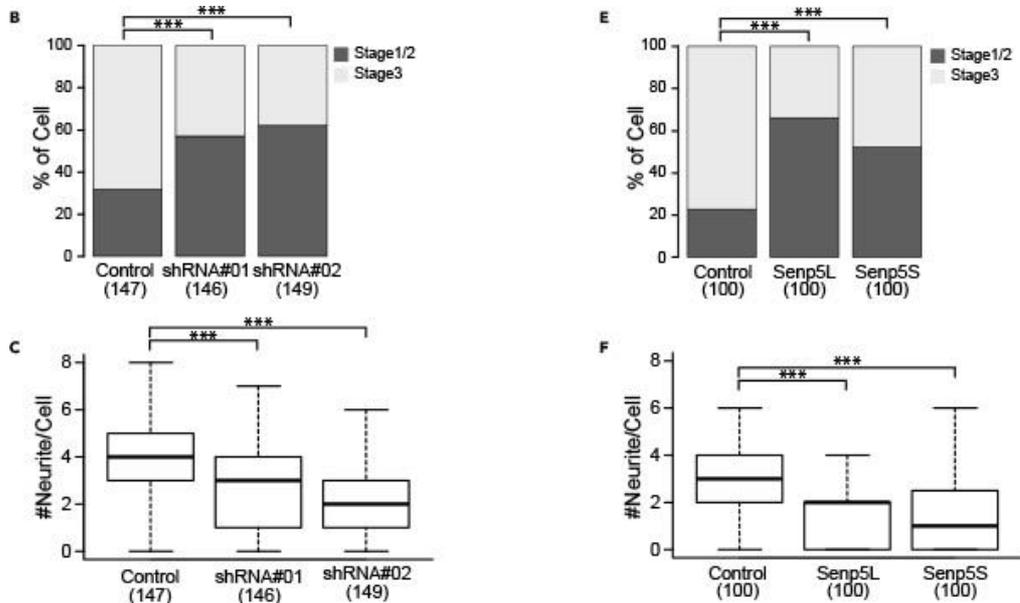


図 1 皮質培養神経細胞における SENP5 の gain/loss of function の影響

(2) Drp1 を介した SENP5 long/short によるミトコンドリア動態制御

HA-SUMO および SENP5 long/short, Myc-DRP1 を発現させた HEK293T 細胞から調製したサンプルを用いて, HA 抗体による免疫沈降を行った。EGFP コントロールを発現したサンプルと比較して, SENP5 long を発現したサンプルでは SUMO 化した Drp1 が少なく, SENP5 short を発現したサンプルでは SUMO 化した Drp1 が多かった(図 2 B)。すなわち, SENP5 long/short は Drp1 の SUMO 化状態を制御することが明らかとなった。

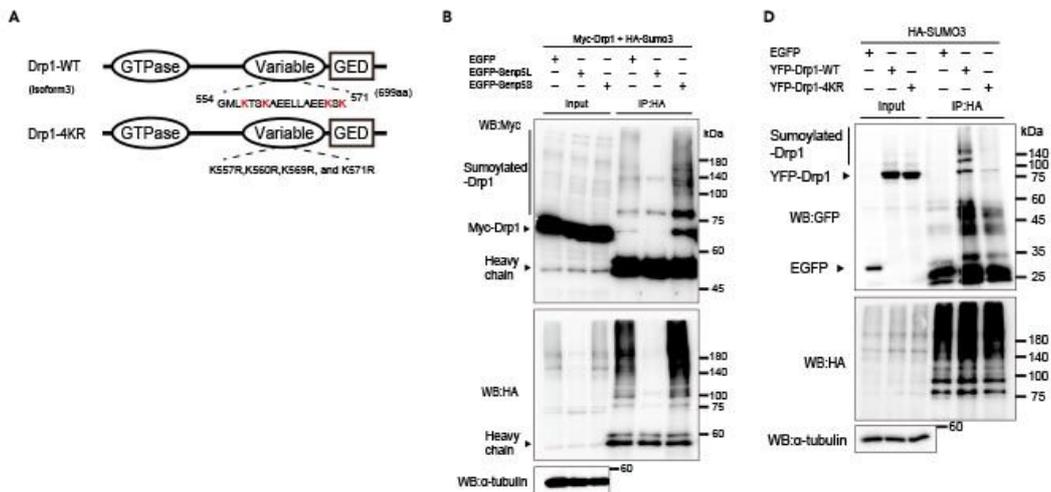


図 2 SENP5 long/short による Drp-1 の SUMO 化制御

ミトコンドリア動態への SENP5 long/short の影響を検討するため, HeLa 細胞に pMT-mK01 および SENP5 long/short を発現させた。細胞内のミトコンドリア長は SENP5 long により伸長し, SENP5 short によって短縮した(図 3 A)。この SENP5 によるミトコンドリア動態調節への Drp1 SUMO 化状態の関与を検討するため, Drp1-4KR を用いた。図 2 A に示す通り, Drp1 の SUMO 化に必要なリジン残基をアルギニンに置き換えた SUMO 化不全体が Drp1-4KR である。実際, 免疫沈降により Drp1-4KR では SUMO 化が起こらないことを確認した(図 2 D)。Drp1 WT を発現させた細胞においては, SENP5 long/short によってそれぞれミトコンドリア長が伸長, 短縮した。一方, この SENP5 long/short によるミトコンドリア長への影響は, Drp1-4KR を発現した細胞では全く見られなかった(図 3 C)。これらの結果は, SENP5 long/short が Drp1 の SUMO 化状態を調節することでミトコンドリア動態を制御することを示唆している。

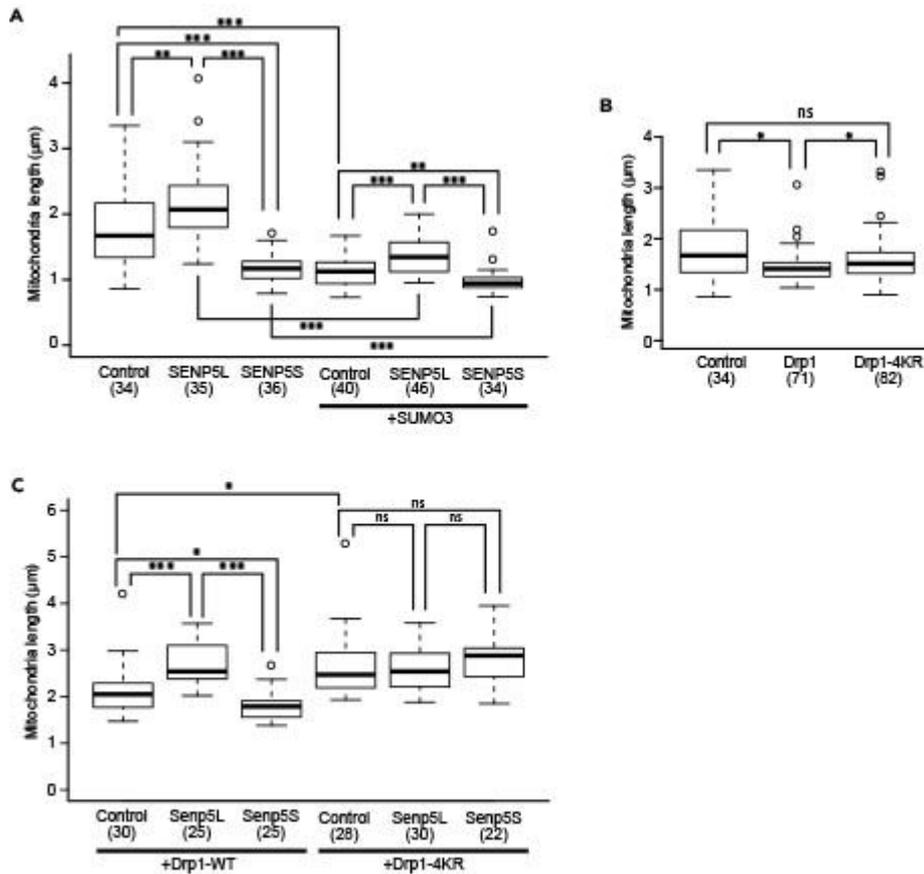


図3 SENP5 long/short および Drp1-WT/-4KR によるミトコンドリア長への影響

(3) SENP5 long/short によるマウス大脳発生への影響

SENP5 long/short によるミトコンドリア動態制御の大脳発生への影響を検討するため、胎生 14.5 日目のマウス脳室に SENP5 long/short, SENP5 shRNA, Drp1-WT/-4KR を投与し、電気穿孔法により神経幹細胞に導入した。Drp1 の発現により、Intermediate zone に存在する神経細胞内のミトコンドリア長は有意に短縮した。この効果は Drp1-4KR 発現神経細胞では見られなかった (図 4 A)。SENP5 shRNA によって神経細胞の Radial migration は抑制された (図 4 B)。SENP5 long によって生じた Migration の抑制は SENP5 short では見られなかったが、これは SENP5 short の発現量が極端に少なかったことが原因ではないかと考えられる。Drp1-WT による Migration 抑制は Drp1-4KR の発現ではみられなかった。これらの結果は、正常な大脳発生には SENP5 および Drp1 によるミトコンドリア動態制御が必要とされることを示唆している。

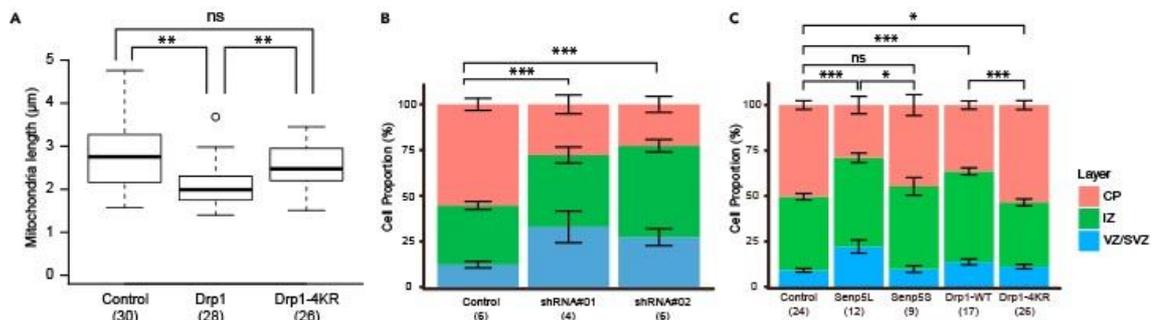


図4 SENP5 long/short および Drp1-WT/-4KR による大脳発生への影響

一連の実験を通して、SENP5 long/short による新規 SUMO 化調節機構が、DRP1 の SUMO 化とそれに続くミトコンドリア動態の制御を介して、大脳発生に関与することを明らかにした。

< 引用文献 >

1. Henley J.M. et al. (2014), *Physiol. Rev.*, 94(4):1249-1285; 2. Girach et al. (2013), *Cell Rep*, 5(5), 1294-1301; 3. Matsuzaki et al. (2015), *Sci Rep*, 5, 10730; 4. Martin et al. (2007), *Nature*,

447(7142), 321-3258; **5.** Jaafari et al. (2013), PLoS One, 8(1), e52345; **6.** Akiyama et al. (2018), J Comp Neurol, 526(6):990-1005; **7.** Figueroa-Romero et al., FASEB J. 23, 3917–3927; **8**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Seiya, Sato Ayaka, Ishihara Naotada, Akiyama Hiroki, Sakakibara Shin-ichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Drp1 SUMO/deSUMOylation by Senp5 isoforms influences ER tubulation and mitochondrial dynamics to regulate brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103484 ~ 103484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama H, Iwasaki Y, Yamada S, Kamiguchi H, and Sakakibara S.	4. 巻 380(3)
2. 論文標題 Control of cell migration by the novel protein phosphatase-2A interacting protein inka2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 527-537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03169-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤彩佳, 山田晴也, 秋山博紀, 榊原伸一
2. 発表標題 発生段階および成体マウス中枢神経系における脱SUMO化酵素SENP5の局在解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤彩佳, 山田晴也, 秋山博紀, 榊原伸一
2. 発表標題 脱SUMO化酵素SENP5による神経分化制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山 博紀, 岩崎 優美, 榊原 伸一
2. 発表標題 Inka2による接着構造動態制御を介した細胞移動の調節
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山 博紀, 岩崎 優美, 山田 晴也, 上口 裕之, 榊原 伸一
2. 発表標題 Inka2による接着斑動態の調節と細胞移動の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	榊原 伸一 (Sakakibara Shin-ichi) (70337369)	早稲田大学・人間科学学術院・教授 (32689)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------