

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21300138  
 研究課題名（和文） Necdin を中核とする蛋白質ネットワークによるニューロンの生存維持機構  
 研究課題名（英文） Mechanisms maintaining neuronal survival via necdin-centered protein interaction networks  
 研究代表者  
 吉川 和明 (YOSHIKAWA KAZUAKI)  
 大阪大学・蛋白質研究所・教授  
 研究者番号：30094452

研究成果の概要(和文)：Necdinは種々のエネルギー代謝関連蛋白質を脱アセチル化する Sirt1 と複合体を形成し、視床下部における転写因子 FoxO1 のアセチル化状態と神経ペプチド作動性ニューロンの活性を制御した。また、Necdin はニューロンにおいて DNA 修復に働く SMC5/6 複合体の構成要素と複合体を形成し、DNA 損傷後の修復能を増強した。これらの知見から、Necdin はエネルギー代謝や DNA 修復に関わる蛋白質ネットワークの中核として、ニューロンの生存を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Necdin interacted with Sirt1, which deacetylates various energy metabolism-associated proteins, and controlled the acetylation levels of the FoxO1 transcription factor and neuropeptidergic neuron activities in the hypothalamus. Necdin also interacted with several elements of the SMC5/6 complex, which is involved in DNA repair, and enhanced its activity after DNA damage in postmitotic neurons. These results suggest that necdin serves as a hub protein in the protein interaction networks that are involved in energy metabolism and DNA repair to promote neuronal survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：Necdin・蛋白質ネットワーク・Sirt1・FoxO1・SMC5/6 複合体・エネルギー代謝・DNA 修復・哺乳類ニューロン

1. 研究開始当初の背景

Necdin は、神経幹細胞から分化するほぼ総てのニューロンに発現している。近年、生化学的解析や Necdin 遺伝子変異マウスを用いた機能研究などによって、Necdin は種々の蛋白質と相互作用をして、ニュー

ロンの分化促進や生存維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。つまり、ニューロンでは、Necdin を中核として蛋白質ネットワークが形成され、分化や生存に関わるシグナル伝達系を統合しているものと考えられる。そこで、

本研究では、Necdin が相互作用をする蛋白質の中でも、特に、エネルギー代謝や DNA 損傷応答に関与する蛋白質グループに焦点を絞って、Necdin とこれらの蛋白質によるネットワークがニューロンの生存維持に及ぼす影響を明らかにする。ニューロンにおける生存シグナル統御の中核としての Necdin に着目した本研究は、脳発達異常症や神経変性疾患の基盤となる分子機構を解明する上でも重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、Necdin の蛋白質間相互作用や遺伝子発現制御に関する情報に基づいて、ニューロンにおける Necdin を中核とする蛋白質ネットワークの機能解析を行う。Necdin はゲノムインプリントによって父性染色体のみから発現している。そこで、父性 Necdin 遺伝子変異マウスの異なる発生段階と脳神経部位から調製した初代培養細胞系（神経幹細胞やニューロン）を用いて、エネルギー代謝変動や DNA 損傷によって起こる細胞死を調べることで、Necdin が関与する生存維持機構を明らかにする。また、ウイルスベクターや RNA 干渉法などを用いて Necdin および Necdin 結合蛋白質の遺伝子発現を変化させ、特定のニューロン集団において、Necdin を中核とする生存維持に関与する蛋白質ネットワークの存在と共に、その機能的意義を明らかにする。Necdin を中核とする蛋白質ネットワークとして、エネルギー代謝や DNA 損傷応答に関与することが推定されている蛋白質脱アセチル化酵素 Sirt1-基質蛋白質系とニューロン発生期における Structural maintenance of chromosome (Smc)5/6 複合体系に重点を置いて検討する。Smc5、Smc6 と 4 つの Non-smc elements (Nse) 1-4 から成る Smc5/6 複合体は、酵母では DNA 修復や相同組換えに重要であり、細胞の生存に寄与すると考えられている。そこで、本研究では Necdin が哺乳類における Nse3 として Smc5/6 複合体の構成要素となる可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1)Necdin-Sirt1-基質蛋白質複合体

生化学的解析として、株化細胞 (HEK293A) を用いて、免疫沈降法による三者の結合、ルシフェラーゼをレポーターとした転写活性測定、アセチル化 FoxO1 を特異的に認識する抗体を用いた脱アセチル化反応測定を行った。生理学的意義を明らかにするため、Necdin 欠損 (KO) マウスを用いて、野生型 (WT) マウスと比較検討した。マウスの視床下部から mRNA 及び蛋白質を回収し、それらの発現量をリアルタイム PCR と Western blot 法により解析した。

エネルギー代謝を包括的に理解する一端として、離乳期前後からの摂食量と体重変化を成体までモニタリングした。血液中の甲状腺ホルモンの測定は ELISA によって行った。

### (2)Necdin-Smc5/6 複合体

Necdin と Nse4 を HEK293A 細胞に共発現させて、免疫沈降法によって相互作用を検討した。また *in vitro* 系でこれらが直接に結合するかを解析した。次に Necdin、Nse1、Nse4 を同様の細胞に発現させ、三者複合体を形成するかを免疫沈降法によって解析した Necdin、Nse1、Nse4 を過剰発現させた HEK293A 細胞の抽出物を Blue-native PAGE 及び二次元 SDS-PAGE で解析を行った。胎児期 (E10、E14.5、E18.5) から生後 (P0、P35、P75) のマウスの脳で Necdin、Nse1、Nse4、Smc5 及び Smc6 の発現を Western blotting を用いて調べた。ニューロンの DNA 損傷に対する感受性や DNA 修復における Necdin の機能について検討した。まず、胎生 14.5 日目の WT マウスと KO マウス由来のニューロンにおける DNA 損傷に対する感受性と DNA 修復について検討するために、過酸化水素処理で DNA 損傷を与えたニューロンを DNA 二重鎖切断の指標となる  $\gamma$ H2AX の免疫細胞化学染色法と、単一細胞の DNA 損傷を定量的に検出するコメット法を用いて解析した。また、Necdin と Nse4 が同じ DNA 修復機構において作用しているのか検討するために siRNA で Nse4 の発現を抑制したニューロンを用いて、 $\gamma$ H2AX の免疫細胞化学染色法による解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Necdin-Sirt1-基質蛋白質複合体

免疫沈降法によって、Necdin が FoxO1 と結合すること、また、Sirt1 は両者と結合することで三者複合体が形成されることが分かった。Necdin 存在下では、Sirt1 と FoxO1 の結合能が増加していた。アセチル化 FoxO1 を特異的に認識する抗体を用いた脱アセチル化反応測定において Necdin は、FoxO1 を効率よく脱アセチル化した。しかし、Necdin 自身には脱アセチル化活性は存在しなかった。次に、FoxO1 が結合するインスリン反応配列をもつプロモーターをルシフェラーゼの上流に付加したプラスミドを用いて、FoxO1 の転写活性を測定した。FoxO1 は転写を効果的に促進したが、Necdin は用量依存的に転写を抑制した。また、Necdin と Sirt1 は相加的に FoxO1 の転写活性を抑制した。さらに、Necdin による転写抑制が Sirt1 に依存するかを検討するために、内在性の Sirt1 を阻害することを目的とした siRNA を用いて検討した。その結果、Necdin による転写抑制は Sirt1 siRNA によつ

て打ち消されたことから、この効果は Sirt1 依存的なものであると考えられる。以上の結果より、Necdin は Sirt1、FoxO1 と三者の安定的な複合体を形成し、Sirt1 の脱アセチル化反応を促進し、FoxO1 の転写活性を抑制していることが明らかとなった。

次に、エネルギー代謝や DNA 損傷応答に関する Sirt1 基質として知られている FoxO1 のアセチル化によるニューロンでの機能調節を中心に検討した。免疫組織化学で調べたところ、Necdin、Sirt1 及び FoxO1 が視床下部の弓状核で共局在していた。また、顕微測光を用いた定量解析により、KO マウスの視床下部の弓状核、室傍核、腹内側核においてアセチル化 FoxO1 陽性シグナルが増加していることが判明した。しかし、視床下部以外の領域、海馬や大脳皮質では有意な差はみられず、この現象は視床下部に特異的であることが明らかとなった。また、視床下部を用いた免疫沈降法により、三者が内在性に結合していること、さらに、FoxO1 の結合配列が存在する agouti-related protein (Agrp) プロモーター領域をターゲットとしたクロマチン免疫沈降法により、三者がこの領域に存在することが明らかとなった。そこで、FoxO1 によって正に転写が制御されている Agrp と neuropeptide Y (Npy) の発現を KO マウスの視床下部から抽出した mRNA を用いて定量的 PCR により解析したところ、有意に発現が増強していた。Agrp 及び Npy は摂食亢進作用だけでなく、視床下部の室傍核に存在する TRH ニューロンを抑制して、熱産生を阻害する。TRH は下垂体の TSH や、甲状腺の T4 及び T3 を介して熱産生を増加させ、体温を上昇させることが知られている。そこで、これらのホルモンを ELISA 法によって測定すると、KO マウスにおいて血清中の量がいずれも減少していた。このことから、KO マウスでは熱産生の異常があることが示唆された。そこで直腸温を測定したところ、WT マウスに対し約 2℃ 有意に低下していた。したがって、KO マウスでは、FoxO1 のアセチル化レベルが増加することによって、甲状腺刺激ホルモン遊離ホルモンニューロンの抑制を介した中枢性甲状腺機能低下症が認められることが明らかになった。

本研究は Necdin-Sirt1 複合体による代謝関連因子のアセチル化修飾の調節と、プラダー・ウィリー症候群 (PWS) をはじめとする肥満や摂食障害におけるエネルギー代謝異常との相関の分子的機序の解明に新しい視点を加えるものである。この現象は 4 週令マウスの離乳期に特異的にみられた。PWS の幼児期には甲状腺機能低下症と共に体温調節の異常がみられることが報告されており、今回の研究結果から、PWS 症状の分子機構が説明できる。

## (2) Necdin-Smc5/6 複合体

Necdin と Nse4 は共発現させた HEK293A 細胞において両者は結合した。また、*in vitro* 系でも、両者が直接結合することも確認した。次に Necdin、Nse1、Nse4 を同様の細胞に発現させ、三者複合体を形成するかを解析したところ、Necdin と Nse4 は Nse1 の存在下で強く結合した。一方、Necdin と Nse4 は、どちらも Nse1 とは結合しなかったが、Necdin と Nse1 および Nse4 と Nse1 の 2 者間の相互作用はそれぞれ Nse4 と Necdin の存在下で著しく増強した。これらの結果は哺乳類細胞中で安定的な Nse1-Necdin-Nse4 複合体が形成されることを示唆する。さらに Nse4 は Necdin 以外の MAGE タンパク質 MAGE-A1、-F1、-G1、L2 と相互作用した。これは Nse4 が MAGE ファミリータンパク質が共通してもつ MAGE homology domain (MHD) と呼ばれる領域を介して相互作用することを示唆する。そこで、Nse4 が Necdin の MHD と結合するかを調べるため、Necdin 変異体 (Necdin 1-100、101-300) と Nse4 の結合を解析すると Necdin の MHD (アミノ酸 116-280) を含む Necdin 101-300 と結合することが判った。哺乳類 Nse4 は、Smc5 の N、C 末端ドメイン両者に結合した。また、Necdin も Smc5 の N、C 末端ドメイン両者と結合した。

次に、Necdin、Nse1、Nse4 を過剰発現させた HEK293A 細胞の抽出物を Blue-native PAGE 及び二次元 SDS-PAGE で解析を行ったところ、Necdin は Nse1 と Nse4 と複合体を形成した。したがって、Necdin が Smc5/6 複合体の構成要素となることが示唆された。次に、内在性の Smc5/6 複合体の各要素の蛋白質レベルでの発現をマウスの脳で調べた。Necdin は E14.5、E18.5 及び P0 で発現が高いが、成体脳で大きく減少した。一方、Nse1 及び Nse4 は胎生期から成体になるにつれて発現は減少した。Smc5 は胎児期から成体期になるにつれて減少するが、翻訳後修飾を受けた Smc5 は増加した。逆に、Smc6 は胎生期から成体になるにつれて増加したが、被修飾型と推定される Smc6 は減少した。これらのことから、Smc5/6 複合体の構成要素はどの時期の脳組織でも発現しているが、各構成要素の経時的な発現パターンは異なることが明らかになった。同様に、E14.5 の脳では Necdin が Nse1、Nse4 及び Smc5 とどのような複合体を形成するのかわかぬ Blue-native PAGE 及び二次元 SDS-PAGE により解析を行った。Smc5/6 複合体の各構成要素の単量体のサイズから予想して、Necdin-Nse4 と Necdin-Smc5 の二量体と推定されるスポットが存在したが、どの構成要素も単量体に対応するスポットは検出できなかった。一方、酵母で報告されているような全構成要素を含む Smc5/6 複合体は検出できなかった。これらの結果から、哺乳類の脳

では、NecdinはSmc5/6複合体の各構成要素と部分的な複合体を形成するが、総ての構成要素を含むような複合体を形成する可能性は少ないものと考えられる。

NecdinはDNA修復に関与するSmc5/6複合体の構成要素であるNse4と複合体を形成することが判明したため、ニューロンのDNA損傷に対する感受性やDNA修復における意義について検討した。胎生14.5日目のWTマウスとKOマウス由来のニューロンにおける過酸化水素処理によるDNA損傷に対する感受性とDNA修復を、 $\gamma$ H2AXの免疫細胞化学染色法とコメット法を用いて解析した。WTとKOマウス由来のニューロンでDNA損傷は、いずれの解析方法においても、差は見られなかった。一方、WTマウス由来のニューロンではDNA損傷後5時間で修復が完了したのに対して、KOマウス由来のニューロンでは修復が完了せず、DNA修復能に異常があることが判った。次に、siRNAを用いてNse4の発現を抑制したニューロンでの $\gamma$ H2AXの免疫細胞化学染色法による解析を行った。WTのニューロンでは、Nse4の発現を抑制すると、KOマウス由来ニューロンと同様に、DNA修復の障害が見られた。ところが、KOマウス由来ニューロンとWTマウス由来ニューロンの間には、Nse4の発現を抑制した場合でもDNA修復活性低下の程度に有意な差が見られなかった。これらの結果から、Necdinは、ニューロンにおいてNse4と複合体を形成してSmc5/6の機能に必要であり、ニューロンの生存能を促進するものと考えられる。

## 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 15 件)

- ① Hasegawa K, Kawahara T, Fujiwara K, Shimpuku M, Sasaki T, Kitamura T, Yoshikawa K. (2012) Necdin controls foxo1 acetylation in hypothalamic arcuate neurons to modulate the thyroid axis. *J Neurosci.* 32: 5562-5572 [DOI: 32/16/5562 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.0142-12.2012] [査読有]
- ② Fujiwara K, Hasegawa K, Ohkumo T, Miyoshi H, Tseng Y-H, Yoshikawa K (2012) Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells. *PLoS One* 7(1):e30948 [DOI: 10.1371/journal.pone.0030948 PONE-D-11-20564 [pii]] [査読有]
- ③ Aizawa T, Hasegawa K, Ohkumo T, Haga S, Ikeda K, Yoshikawa K (2011) Neural stem cell-like gene expression in a mouse ependymoma cell line transformed by human BK polyomavirus. *Cancer Sci* 102:122-129.

[DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01775.x] [査読有]

- ④ Kuwajima T, Hasegawa K, Yoshikawa K. (2010) Necdin promotes tangential migration of neocortical interneurons from basal forebrain. *J Neurosci* 30:3709-3714. [DOI: 30/10/3709 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.5797-09.2010] [査読有]

[学会発表] (計 15 件)

- ①白石千夏、長谷川孝一、吉川和明 視床下部における necdin は甲状腺ホルモンによるエネルギー消費を抑制する 第54回日本神経化学会大会 2011.9.26 石川県加賀市
- ②柏木裕呂樹、長谷川孝一、吉川和明 Necdin は哺乳類脳において Smc5/6 構成要素と多蛋白質複合体を形成する 第54回日本神経化学会大会 2011.9.26 石川県加賀市
- ③長谷川孝一、川原知浩、吉川和明 Necdin enhances Sirt1-dependent deacetylation of FoxO1 to control hypothalamic thermoregulation 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸 2010.12.10
- ④吉田直史、長谷川孝一、吉川和明 Necdin serves as Nse3 in mammalian Smc5/6 complex 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 2010.12.9 神戸
- ⑤Hasegawa K, Yoshikawa K. Necdin regulates FoxO1 acetylation via Sirt1 in mouse hypothalamus Society for Neuroscience 40th Annual Meeting 2010.11.15 San Diego USA

[その他]

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

吉川 和明 (YOSHIKAWA KAZUAKI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 30094452

### (2) 研究分担者

大雲 剛志 (OHKUMO TSUYOSHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号: 50432505  
長谷川 孝一 (HASEGAWA KOICHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号: 20546783