

平成 23 年 6 月 4 日現在

機関番号：74415

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770246

研究課題名(和文) SUMO 化による網膜幹細胞・未分化前駆細胞の増殖制御機構の解析

研究課題名(英文) The role of sumoylation in retinal progenitor proliferation

研究代表者

寺田 晃士 (TERADA KOJI)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・発生生物学部門・研究員

研究者番号：70342722

研究成果の概要(和文)：我々は、タンパク質の Sumo 化に必須である酵素 Ubc9 とクロマチン因子である hmgb3 との共発現が、アフリカツメガエルの眼の巨大化を引き起こすことを見出し、その分子機構を解析した。Ubc9 と hmgb3 の共発現により、cell cycle inhibitor である p27 の発現が抑制されることを見出した。この研究により、hmgb3 と Ubc9 は発生中の網膜前駆細胞の増殖の制御に共同的に機能し、細胞周期を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Precisely controlled progenitor proliferation is essential for normal development. However, molecular mechanisms, which control the correct timing of cell cycle withdrawal during development, have been poorly understood. We show here that *ubc9*, a sumo-conjugating enzyme, controls the cell cycle exit of retinal progenitors. We found that *ubc9* is highly expressed in retinal progenitors and stem cells in *Xenopus* embryos. Ubc9 physically and functionally associates with *Xenopus* hmgb3, which is required for retinal cell proliferation, and prolonged expression of *ubc9* and hmgb3 results in suppression of the cell cycle exit of retinal progenitors in a sumoylation-dependent manner. Overexpression of *ubc9* and hmgb3 decreased expression of the cell-cycle inhibitor *p27^{Xic1}*. Furthermore, progenitor proliferation is regulated, at least in part, by sumoylation of transcription factor Sp1. These results suggest a significant role of sumoylation for cell cycle regulation in retinal progenitors

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Ubc9, sumo, *Xenopus*, retina, cell cycle, progenitor

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

神経発生研究において、中枢神経系で発生初期に見られる細胞増殖の制御、細胞分化の機構は重要な研究課題のひとつであり、神経幹細胞の自己複製、神経幹細胞の全能性維持の仕組み、神経前駆細胞の細胞分裂能力の制限の仕組み、神経前駆細胞の分化能力の制限の機構など、解明されていないことが多く残されている。神経幹細胞は、一部が成体幹細胞として残るが、ほとんどは神経前駆細胞となって種々の神経細胞に分化して、脳構造の形成に寄与する。網膜幹細胞も未分化前駆細胞になり、網膜神経細胞に分化する。発生が進むにつれて、未分化前駆細胞の分化可能な細胞種数は減少するが、その仕組みは完全には明らかにされていない。また、未分化前駆細胞は分裂能力に制限があり、未分化前駆細胞が増殖可能な未分化細胞として残ることはないと考えられているが、その分裂の回数かどのような機構により調節されているかは明らかにされていない。マウスで beta-カテニンを神経前駆細胞で強制発現させると脳の細胞数が増大することが報告されている。また、ニワトリの系でも、Wnt2b が網膜幹細胞・未分化前駆細胞の増殖を維持することが報告されている。一方、Notch-Delta の系が神経、網膜前駆細胞の未分化状態の維持に関わることは以前より知られていた。

網膜未分化前駆細胞を用いた研究で、細胞外因子の影響を受けない環境でも、細胞が内部のプログラムに従って決まった時期に分化することも報告されている。外部からのシグナル、内部プログラムの両方の制御が考えられているが、内部プログラムについては不明な点が多い。

神経系発生の過程における細胞増殖の制御機構は、神経系構築の仕組みの理解には重要であるが、完全には明らかにされていない。

2. 研究の目的

転写因子 *rax* は、網膜幹細胞と未分化前駆細胞に発現している転写因子をコードし、眼の初期発生に必須であることが知られている。また、*rax* は網膜幹細胞ならびに網膜未分化細胞の細胞増殖に必要であることが知られていることから、*rax* の細胞増殖機構における作用機序の解析は、網膜幹細胞・未分化前駆細胞に内在する細胞増殖、分化のプログラムの理解につながると期待される。このような観点から、我々は *rax* の下流で機能する因子をスクリーニングし、アフリカツメガエルの系を用いて *Xenopus high mobility group B3* (*xhmgb3*) を単離し、クロマチン結合タンパク質 *xhmgb3* が実際に網膜幹細胞・未分化前駆細胞の細胞増殖に重要な役割をもつことを生体レベルで明らかにしてきた。*hmgb* タ

ンパク質は 2 つの DNA 結合ドメイン以外には既知のドメインは見つかっていない。そのため、*hmgb3* による網膜幹細胞・未分化前駆細胞の増殖の調節には、他のタンパク質と協同して機能することが推測された。そこで、*hmgb3* と結合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法で探索し、SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化酵素である Ubc9 を同定した。最近、SUMO によるタンパク質の修飾が、転写制御、タンパク質の細胞内局在の調節など、種々の細胞機能に重要な役割をもつことが示されていた。

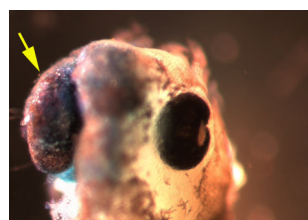
我々は、Ubc9 と *hmgb3* の網膜幹細胞、あるいは、網膜未分化前駆細胞の細胞周期の調節における機能に着目し、神経発生期における細胞増殖調節機構のさらなる理解を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

アフリカツメガエルの受精卵に興味ある遺伝子の mRNA を注入し、発生させた。その後、適当な発生段階において解析に用いた。解析は、注目する部位の大きさや形態における表現型の解析。発現させた遺伝子の、注目する部位の細胞の性質への影響、細胞分裂への影響などの、免疫組織学的手法による解析。発現させた遺伝子の、注目する部位の細胞の性質への影響、細胞分裂への影響などの遺伝子発現解析による評価。主に、以上の方法を組み合わせることによって解析した。

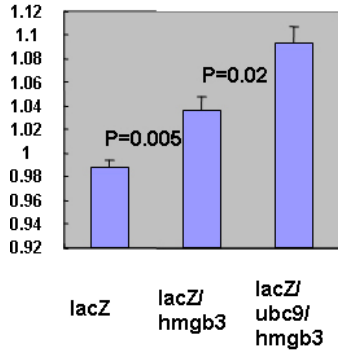
4. 研究成果

アフリカツメガエルに Ubc9 と *hmgb3* を共発現させると、眼の巨大化が引き起こされることを見出した(下図)。

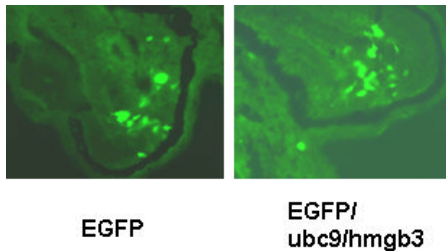


左側の、黄色い矢印で示した眼は、Ubc9 と *hmgb3* を共発現させた。右は正常な眼。

これらは、*hmgb3* 単独強制発現の場合と比較しても有意に眼の巨大化を引き起こしていた。さらに、Ubc9 と *hmgb3* の網膜未分化前駆細胞への強制発現により、前駆細胞でのクロンレベルでの分裂回数の増加が観察された(次のグラフ)。

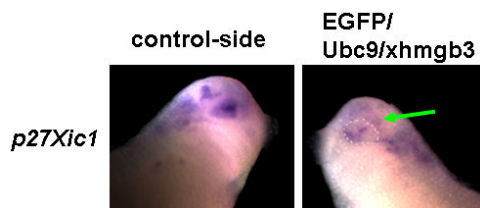


上のグラフは、アフリカツメガエルの片側の眼にグラフの下に示したタンパク質を発現させ、発現させていない眼の直径との比を計算して縦軸とした。hmgb3 の発現はコントロールとして lacZ を発現させた場合に比較して眼の巨大化を引き起こしたが、Ubc9 との組み合わせは、その効果を増大させた。各、約 100 匹を解析した。



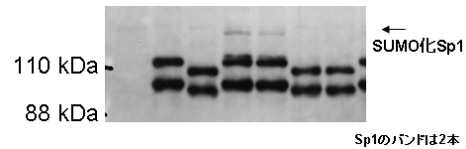
上の各写真は、アフリカツメガエルの成熟した眼の一部を示している。緑色のシグナルは、1 つ 1 つが網膜神経細胞を示す。緑色で示されている神経細胞は、網膜前駆細胞に EGFP 遺伝子を導入後、1 つの前駆細胞が分裂してできたもの。EGFP だけ導入した場合(左)と比較して、Ubc9 と hmgb3 を共導入した場合は、細胞数が増加している。これは、網膜未分化前駆細胞の分裂回数が増加した結果であると考えられる。

次に、どのように分裂回数に影響を与えるのか検討した。その結果、Ubc9 と hmgb3 の網膜未分化前駆細胞への強制発現は、細胞周期阻害因子である p27 の遺伝子発現を抑制した(下図)。



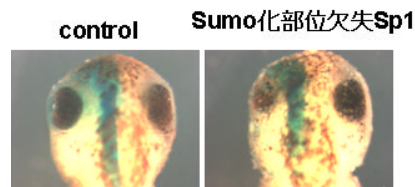
左下の写真は、アフリカツメガエル胚における p27 の mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検出した写真。左目に Ubc9 と hmgb3 を発現させ(右の写真)、右目をコントロールとして(左の写真)、p27 の発現を比較した。緑の矢印は、p27 の発現が現弱している部分を指し示している。

転写因子 Sp1 は Sumo 化修飾により、転写活性が影響を受けることが知られている。そこで、アフリカツメガエルの Sp1 オートログを単離した。マウス、ヒトで Sumo 化される部位の lys 残基を保存していたので、Sumo 化されるかどうか培養細胞を用いて検討した。その結果、Sumo 化され得ることを見出した(下図)。

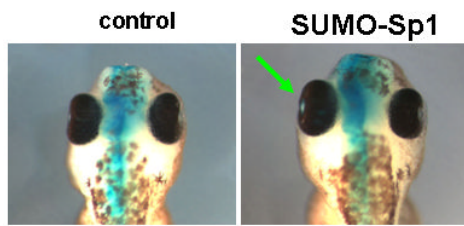


293T 細胞に Sp1、あるいは Sp1 と Sumo を発現させた。Sumo と発現させた時に Sp1 は、SDS-PAGE での泳動が遅くなり、特異的抗体を用いたウェスタンブロットで、上にシフトしたバンドが認められた(左から 3、4 番目)。このシフトしたバンドは、Sumo 化 lys を欠失した Sp1 では、Sumo との共発現でも認められなかった(左から 5、6 番目)。

さらに、Sumo 化部位を欠失させた Sp1 を発現させたり、Sumo ポリペプチドと Sp1 との融合タンパク質を発現させたりして(Sumo 化を模倣した変異タンパク質としてよく用いられる手法)、p27 の遺伝子発現や、アフリカツメガエルの眼発生における、それら変異 Sp1 タンパク質の与える影響を検討した。その結果、Sumo 化部位欠失の Sp1 は、眼発生において負に作用し、反対に、Sumo 融合 Sp1 は、眼を巨大化させ、網膜未分化前駆細胞の増殖を活性化させた。



Sumo 化部位欠失 Sp1(右)の発現は、眼の正常な発生を阻害した。左は、コントロール。



Sumo 融合タンパク質の発現(右)は、発現させた眼(左目)で眼の巨大化を引き起こした。コントロール(左)では、左右で眼のサイズに変化は認められなかった。緑の矢印は、巨大化した眼を示す(右写真)。

本研究では、hmgb3 と Ubc9 の機能的な関係を解析し、Ubc9/hmgb3 複合体が Sumo 修飾を介して転写因子 Sp1 の活性を抑制し、それにより細胞周期阻害因子 p27 の発現を抑制することによって未分化細胞の増殖を維持するという、新たな転写調節カスケードを明らかにした。すなわち、Sumo 修飾を介した転写の ON、OFF により細胞増殖の維持や停止を決定するという、発生中の組織における未分化前駆細胞の増殖の、新しい細胞周期制御機構を見出した

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 4 件)

①Okada I., Hamanoue H., Terada K., Tohma T., Megarbane A., Chouery E., Abou-Ghoch J., Jalkh N., Cogulu O., Ozkinay F., Horie K., Takeda J., Furuichi T., Ikegawa S., Nishiyama K., Miyatake S., Nishimura A., Mizuguchi T., Niikawa N., Hirahara F., Kaname T., Yoshiura K., Tsurusaki Y., Doi H., Miyake N., Furukawa T., Matsumoto N. and Saitsu H. *SMO1* Is Essential for Ocular and Limb Development in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 30-40. 2011 査読有り

②Terada K. and Furukawa T. Sumoylation controls retinal progenitor proliferation by repressing cell cycle exit in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 347, 184-190. 2010 査読有り

③Katahira T., Nakagiri S., Terada K. and Furukawa T. Secreted factor FAM3C (ILE1) is involved in retinal laminar formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 301-306. 2010 査読有り

④Kanamoto T., Mizuhashi K., Terada K.,

Minami T., Yoshikawa H. and Furukawa T. Isolation and characterization of a novel plasma membrane protein, osteoblast induction factor (obif), associated with osteoblast differentiation. *BMC Developmental Biology*, 9:70 2009 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

①Koji Terada, Takahisa Furukawa Sumoylation activity of Ubc9 is essential for retinal stem/progenitor cell proliferation The 49th of Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB), December 5-9, 2009, San Diego Convention Center, San Diego, California

②Koji Terada and Takahisa Furukawa Sumoylation activity of Ubc9, a SUMO-conjugating enzyme, is essential for retinal stem/progenitor cell proliferation Okinawa Institute of Science and Technology International Workshop, The Retina: Neural Stem Cells and Photoreceptor degeneration November 9-12, 2009, Okinawa, Japan

③寺田 晃士、古川 貴久 SUMO 結合酵素 Ubc9 は網膜幹細胞・未分化前駆細胞の増殖を制御する 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 21 日-24 日 (神戸)

④寺田 晃士、古川 貴久 網膜幹細胞・未分化前駆細胞の増殖における SUMO 結合酵素 Ubc9 の役割 第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16 日-18 日 (名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 晃士 (TERADA KOJI)

(財) 大阪バイオサイエンス研究所・
発生生物学部門・研究員

研究者番号 : 70342722

