

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06738

研究課題名(和文) 神経変性疾患に關与する転写因子のSUMO化による機能変換の解析

研究課題名(英文) Analysis of functional exchange of the transcriptional factors involved in neurodegenerative diseases by SUMO modification.

研究代表者

西田 有 (NISHIDA, Tamotsu)

三重大学・地域イノベーション推進機構・助教

研究者番号：50287463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Parkinの基質として同定された転写因子PARISがSUMO化されることを発見し、その機能とパーキンソン病発症へのSUMO化の関与を解析した。その結果、PARISのSUMO化依存的な転写活性調節を明らかにした。さらにPARISのSUMO化はそのユビキチン化も制御していることを明らかにした。さらにPARISのSUMO化を制御する因子を同定し、それらがPARISの転写活性やユビキチン化に与える影響を明らかにした。本研究の成果はパーキンソン病発症メカニズムにおけるSUMO化の重要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：PARIS is identified as a substrate of the ubiquitin ligase, parkin, a gene associated with Parkinson's disease. PARIS represses the expression of the transcriptional co-activator PGC-1, although the mechanism that controls its repressive activity and function are largely unknown. We have shown that PARIS can be modified by SUMO and that SUMOylation of PARIS regulates its transcriptional activity. We have also shown that SUMOylation of PARIS also controls its ubiquitination. The proteasome inhibitor treatment accumulated SUMO-2/3 conjugates of PARIS. The SUMOylated PARIS was more effectively ubiquitinated than the non-SUMOylated form of PARIS. The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 promoted the ubiquitination of SUMOylated PARIS. These results suggest that RNF4-mediated ubiquitination of PARIS regulates its transcription function. We believe the present study results may improve our understanding of the role of SUMOylation in neurodegeneration in Parkinson's disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質翻訳後修飾 SUMO化 ユビキチン化 神経変性疾患 パーキンソン病 転写因子

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾は、標的タンパク質の活性や、機能制御の鍵となる他のタンパク質との相互作用などを、急速に、特異的、局所的に変換させる特異的機構である。

SUMO はユビキチン類似タンパク質であり、真核生物において種を越えて広く保存されている。ユビキチン同様、そのC末端グリシン残基を介して基質タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合する。しかし、SUMO化はユビキチン化とその機能的役割が異なり、転写因子の活性制御、エピジェネティック制御、DNA複製・修復など広範囲な核内プロセスを制御していると考えられている。さらに近年は核外タンパク質のSUMO化も報告されており、シグナル伝達、エネルギー代謝など細胞内における様々なタンパク質の機能に重要な役割をもつことが明らかとなった。

SUMO化は一過性の翻訳後修飾と考えられ、標的タンパク質への結合はユビキチン化と類似した一連の特異的酵素群により行われる。一方、SUMO特異的プロテアーゼ(脱SUMO化酵素)によりSUMOは基質から切り離される。このようにある基質のSUMO化状態はSUMO化の亢進と脱SUMO化反応のバランスにより常に変化すると考えられる。

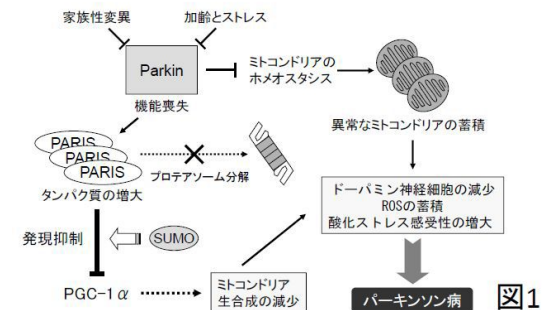
我々はこれまでにSUMO修飾の基質特異的認識に重要な働きをするSUMOリガーゼの活性を持つ因子としてPIASを同定し(Kahyo et al. Mol Cell 2001)、PIASがSUMO化を介して転写因子の転写活性を制御することを明らかにした(Nishida et al. J Biol Chem 2002, Nishida et al. Biochem Biophys Res Commun 2006)。また脱SUMO化酵素についてもSUMO研究を開始した当初からその存在に注目し、哺乳動物細胞で現在知られる6種の内、2種を先駆けて同定し(Nishida et al. Eur J Biochem 2000, Nishida et al. J Biol Chem 2001)、脱SUMO化酵素がタンパク質のリン酸化におけるホスファターゼのように基質タンパク質の機能変換の制御に重要であることを明らかにした。

細胞内の広範囲かつ重要なプロセスにおいてSUMO化が関与する制御機構が明らかにされるにつれ、SUMO化の異常が様々な疾患に関与していることが推定された。実際、SUMO化の欠損を伴う変異がヒト疾患と関連する症例の報告もある。p53など重要な癌抑制遺伝子産物がSUMO化されることが明らかにされ、発癌への関与が解析されている。またSUMO化経路に関わる因子(E2酵素UBC9, SUMOリガーゼPIASや脱SUMO化酵素SENPなど)の異常発現が発癌へ関与することも示唆されている。近年、ユビキチン化の異常に由来する神経変性疾患についての研究が急速に進展したが、最近SUMO化の関与を示唆する研究結果も報告されている。多くの神経変性疾患の患者の脳病変部位に観察

される神経封入体はユビキチンやプロテアソームの構成因子だけでなくSUMOでも免疫染色される。さらに神経変性疾患に関わるいくつかのタンパク質(huntingtin(ハンチントン病)、Ataxin-1(1型脊髄小脳失調症)、Tau, アミロイド前駆体タンパク質(APP)(アルツハイマー病)、 α -synuclein, DJ-1(パーキンソン病)など)がSUMO化されることが明らかにされた。しかし、これらの神経変性疾患に関わる因子のSUMO化の機構、神経変性に対する役割、疾患発症との関係などSUMO化の機能はほとんど明らかにされていない。

パーキンソン病は神経変性疾患の中で最も頻度の高い疾患の一つであり、これまでにいくつかの原因遺伝子が同定され世界中で活発に研究が行われているが、その発症メカニズムは完全に解明されていない。本研究はパーキンソン病原因遺伝子産物とその関連因子、特に転写制御関連因子の機能がSUMO化により制御されている可能性を探り、パーキンソン病やその他の神経変性疾患の発症機構の基礎的知見を得ることを目的にして開始した。

家族性パーキンソン病の原因遺伝子parkinの産物であるユビキチンリガーゼParkinの新規基質として同定された(Shin et al. Cell 2011)KRAB-Znフィンガー転写因子PARIS/ZNF746はヒトのパーキンソン病患者の脳に蓄積し、転写コアクチベーターPGC-1とその標的遺伝子の発現を抑制する



ことによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示された(図1)。

我々はこれまでPARISとSUMO化の関係について研究を進め、PARISがSUMO化されることを見出し、SUMO化がその転写活性を複雑に制御していることを明らかにした。さらにPARISのSUMO化を制御するSUMOリガーゼと脱SUMO化酵素を同定するとともにPARISと相互作用する因子を同定し、それらの機能、SUMO化との関係を解析している。またミトコンドリア障害、酸化ストレス、小胞体ストレスなどの応答に関わる他の転写関連因子についてSUMO化による制御を受けている可能性も考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では未だ説明されていない

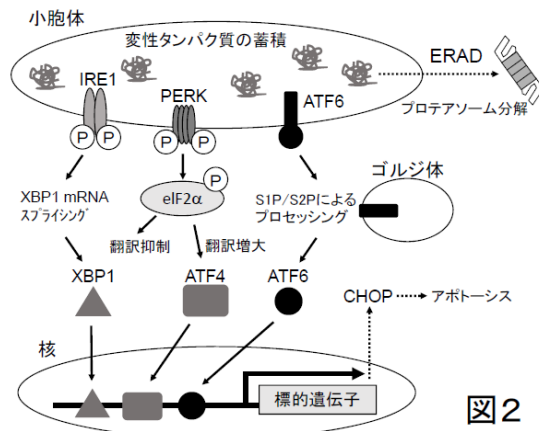


図2

PARISの機能制御機構をSUMO化による機能変換に注目して解析する。さらにパーキンソン病等の神経変性疾患の主要成因のひとつである小胞体ストレス応答(図2)に関する転写関連因子についてもSUMO化の関与を解析し、以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) PARISのSUMO化機構がどのように制御されているかを相互作用する因子による影響を解析して明らかにする。

(2) PARISの転写活性制御機構をヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)などの転写関連因子とSUMOリガーゼPIASyによる抑制の関係を調べて明らかにする。

(3) SUMO化がPARISのユビキチン化とプロテアソーム分解に与える影響を解析する。

(4) 酸化ストレスなどの小胞体ストレス応答を引き起こす様々なストレスがPARISのSUMO化やユビキチン化へ与える影響を明らかにする。

さらに小胞体ストレス応答に関わる転写因子(ATF4, ATF6等)のSUMO化を解析しその役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PARISのSUMO化を制御する因子あるいは相互作用する因子の機能解析を行うために、酵母2-ハイブリッド法によりPARISと相互作用する因子の検索し、相互作用が確認された因子について培養細胞での発現系を構築し、PARISのSUMO化へ与える影響を解析した。

(2) SUMO化またはユビキチン化へ与える様々な影響は、培養細胞発現系を用いたSUMO化アッセイシステムまたはユビキチン化アッセイシステムにより解析を行った。

PARISの転写活性への影響は培養細胞発現系を用いたレポーターアッセイシステムにより解析した。

(3) PARISのSUMO化はポリSUMO鎖を形成するSUMO2/3によっても起こる。特にSUMO2/3化はSUMOリガーゼPIASyにより顕著に亢進する現象を見出した。そこでRNF4などのSUMO化依存型ユビキチンリガーゼがPARISのユビキチン化に關与するかを培養細胞発現系で検証した。

(4) 培養細胞発現系において、神経変性に關与する酸化ストレスや小胞体ストレス応答を引き起こす様々な薬剤で細胞を処理し、PARISのSUMO化とユビキチン化への影響を調べた。

さらにATF4, ATF6について細胞培養発現系におけるSUMO化を調べた。

4. 研究成果

(1) PARISと相互作用する因子のSUMO化と転写活性制御

酵母2-ハイブリッド法によりPARISと相互作用する因子の検索し、相互作用が確認された因子を複数同定した。それらの内の一つであるZNF451は最近他の研究グループによりそのisoform1がSUMO2/3特異的なSUMOリガーゼとして機能することが報告された。我々が同定した因子はZNF451 isoform3であったが、isoform1とともにPARISのSUMO化への影響を調べたところ、PARISのSUMO化の促進やタンパク質安定性へ顕著な影響は認められなかった。またその他のPARISと相互作用を示した因子についてもSUMO化や転写活性への影響を調べたが顕著な影響を与えるものはなかった。現在もこれらの因子についての解析は継続中である。

(2) PARISの転写活性制御における脱アセチル化酵素の関与とSUMOリガーゼPIASyの転写抑制メカニズム

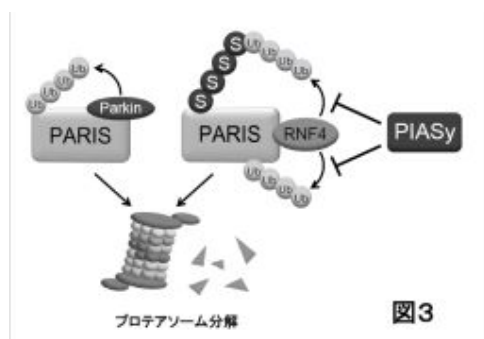
ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤trichostatinA(TSA)で培養細胞を処理することにより、PARISのPGC-1遺伝子プロモーターにおける転写活性抑制は顕著に脱抑制された。しかしSUMO化を促進するPIASyを介した転写抑制はTSA処理により脱抑制されなかった。

以上の結果はPIASyによるPARISのSUMO化促進はPARISの転写活性抑制機構に一部關与している可能性はあるものの、HDACの關与するPARIS抑制機構とPIASyによる抑制機構は独立した異なる分子メカニズムによってPGC-1遺伝子の発現を制御していると考えられた。

(3) PARISのSUMO化はユビキチン化を促進する

PARISのSUMO化はプロテアソームの阻害によって変化することを見出した。SUMO化されないPARISと比較してSUMO3化されたPARISは顕著にユビキチン化が亢進し、このユビキ

チン化は SUMO 化依存型ユビキチンリガーゼ RNF4 の活性に依存して亢進した。RNF4 は PARIS に結合し、結合は PARIS の SUMO 化や RNF4 の SUMO-interacting motif (SIM) の有無に依存しなかった。



以上の結果は、PARIS のユビキチン化にはこれまでに報告されている Parkin の他、新たなユビキチンリガーゼとして RNF4 が機能していると考えられた。PIASy は PARIS の SUMO 化を促進する一方、SUMO 化依存的なユビキチン化を阻害した。(図3)

(4) PI3K-Akt 経路と PARIS のユビキチン化
様々なストレス応答を引き起こす薬剤処理による PARIS の SUMO 化とユビキチン化への影響を調べた結果、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸キナーゼ(PI3K)の阻害剤である wortmannin と LY294002 がユビキチン化を顕著に阻害することを見出した。

以上の結果より、酸化ストレス応答に関与する PI3K を介するシグナル伝達経路によりユビキチン化が制御されている可能性が示唆された。現在、シグナル伝達系とユビキチン化の関係について詳細な解析を進行している。

(5) ATF4, ATF6 の SUMO 化
両転写因子について組換えタンパク質発現系を構築し、培養細胞内における SUMO 化の可否を検討したところ、我々が行った SUMO 化アッセイシステムにおいては、いずれも顕著な SUMO 化は検出できなかった。しかし ATF6 については最近 SUMO 化される報告があり、再検討する必要がある。

(6) 結論
本研究によって PARIS の SUMO 化は転写活性制御と SUMO 化依存型ユビキチンリガーゼを介したユビキチン化に関与し、さらにユビキチン化はストレス応答性シグナル伝達系により制御されることを示唆する結果を得た。今後は PARIS の SUMO 化と、それに続くユビキチン化が、酸化ストレス、小胞体ストレス、その他オートファジーなどに関与する因子により制御されるのか、またそれらのストレスに応答したシグナル伝達系による制御メカニズムを明らかにする必要がある。
さらに PARIS の SUMO 化やユビキチン化を制御することにより、神経変性の進行にどの

ような影響を与えるかについて解析を進めたい。

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 1 件)
Nishida T, Yamada Y.
SUMOylation of the KRAB zinc-finger transcription factor PARIS/ZNF746 regulates its transcriptional activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 473:1261-1267, (2016) 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.051

〔学会発表〕(計 3 件)
西田 有, 山田 芳司
SUMO 化を介したパーキンソン病関連転写因子 PARIS のユビキチン化制御
第 40 回 日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月

西田 有, 山田 芳司
SUMO 化を介したパーキンソン病関連転写因子 PARIS の活性制御
日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017 年 3 月

西田 有, 山田 芳司
PIASy による SUMO 化を介したパーキンソン病関連転写因子 PARIS の活性制御
第 38 回 日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lsrc.mie-u.ac.jp/human/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
西田 有 (NISHIDA, Tamotsu)
三重大学・地域イノベーション推進機構・助教
研究者番号：50287463

(2) 連携研究者
榊原 伸一 (SAKAKIBARA, Shin-ichi)
早稲田大学・人間科学学術院・教授
研究者番号：70337369