

## 神経幹細胞における、SUMO 化標的タンパク質の同定と機能解析

## Protein SUMOylation in neural progenitor cells

長谷川 祐太 (Hasegawa Yuta) 指導：榊原 伸一

## 1. はじめに

私は神経幹細胞において、翻訳後修飾タンパク質SUMOが果たす機能について解析を行った。(神経幹細胞と神経系前駆細胞の定義には議論があるが、今回の研究では両者を合わせて神経幹細胞とする)。神経幹細胞とは、発生段階や成体において神経系に関わる全ての細胞を産出する能力を持つ細胞である。これまで、神経幹細胞は神経の発生段階にのみ存在し、成体脳では存在しないと考えられていたが、近年の研究の進歩により、ヒトを含む哺乳類の成体脳でも神経幹細胞は存在し神経新生が起きていることが判明した。しかし、神経幹細胞を制御し、神経新生を調節する詳細な分子メカニズムは未だ判明していない部分が多い。

そこで、私は、神経幹細胞の制御機構を明らかにするために、翻訳後修飾タンパク質の1種であるSUMOに注目した。神経幹細胞における、SUMOの機能を詳細に解析することで、神経新生の制御機構の一端を明らかにしたいと考えている。

## 2. 方法

そこで、私はSUMO化構成要素である、SUMO1、SUMO2/3、Ubc9特異的抗体を用いた免疫ブロット及び、時空間的な免疫組織化学的解析をマウス中枢神経系において行った。さらに、私は胎生13.5日目マウス胎児の終脳を取り出し、neurosphere法monolayer法を用いて選択的に培養した神経幹細胞を用いて蛍光免疫染色を行った。

次に、私はSUMO2/3の神経前駆細胞における機能を明らかにすることを目的として、プロテオーム解析により神経前駆細胞内でSUMO2/3化される標的タンパク質を同定した。私は得られた候補タンパク質の中から $\alpha$ -tubulinに注目し、解析を進めた。そこで、 $\alpha$ -tubulinの細胞内局在を調べるために、in vivoにおいて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。また、in vitroにおいて強制発現を行い、タイムラプス顕微鏡を用いて観察を行った。

## 3. 結果

免疫ブロット法による解析の結果、SUMO化に必須の酵素であるUbc9や高分子SUMO化タンパク質が発生初期で

豊富に存在していた。また、発生段階に従った免疫染色の結果、胎生期では、SUMO化タンパク質はnestin陽性の神経前駆細胞で検出された。発生段階が進むにつれ、SUMO化タンパク質の総量は減少するが、SUMO2/3によるSUMO化はSVZ (subventricular zone) やSGZ (subgranular zone) の神経前駆細胞で検出された。以上の結果から、私はSUMO2/3によるSUMO化が神経前駆細胞の維持において何らかの機能を持つと推測した。

SUMO2/3の神経前駆細胞における標的を明らかにすることを目的としたプロテオーム解析の結果から、27個の細胞内機能に関わるタンパク質を得ることができた。私はその中から $\alpha$ -tubulinに注目し解析した。

$\alpha$ -tubulinの細胞内局在を解析するために行った、強制発現実験と生体脳を用いた免疫染色の結果から、 $\alpha$ -tubulinは細胞質だけでなく、核内に斑点状に存在することが判明した。また、培養細胞では斑点状の発現は1つの細胞に1つだったが、成体脳では複数見られることもあった。

## 4. 考察

本研究から、神経幹細胞においてSUMO2/3によるSUMO化が特異的な機能を持つ可能性が示唆できた。多能性維持に関わる転写因子がSUMO化による調節を受けているという先行研究と合わせて考えると、神経幹細胞における多能性の維持が、SUMO2/3による分子のSUMO化により制御されている可能性を示唆している。

本研究において、翻訳後修飾タンパク質であるSUMOは、 $\alpha$ -tubulinを修飾し、Notchシグナルの調整に関与している可能性が指摘された。しかし、現在のところ $\alpha$ -tubulinがSUMO化されるという直接的な証拠は挙がっておらず、また $\beta$ -tubulinのNotchシグナルへの関与についても未解明の部分が多く確定的な結論を出すに至っていない。

また、 $\alpha$ -tubulinが核内に斑点状に見られたことから、核内構造物で機能を果たしている可能性が示唆できた。追加実験の結果から核小体に存在している可能性が高いが、まだ断言することはできない。