

ユビキチン類似因子 SUMO-1 による細胞機能変換システム

The analysis of the novel ubiquitin-like protein, SUMO-1, that regulates cell functions

研究代表者 島根大学生物資源科学部生命工学科 助教授 田中 克典

Department of Life and Environmental Science, Shimane University, Associated Professor,
Katsunori Tanaka

要旨

SUMOはユビキチンと構造的に類似した翻訳後修飾因子であり、核機能を制御する多くのタンパク質を修飾することが知られている。ユビキチンが選択的タンパク質分解を誘うための識別分子であるのに対して、SUMOにはタンパク質の分解シグナルとしての機能はこれまで知られていない。我々のこれまでの解析により、分裂酵母ではSUMOが染色体分配やテロメア維持を始めとする核内の多面的機能に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

SUMO 化修飾の生理機能の全貌を明らかにするには、網羅的に SUMO 化基質タンパク質を同定し、その機能を系統的に解析するアプローチが必要である。本研究では、プロテオミクス技術を用いて SUMO 化基質タンパク質を網羅的に解析し、SUMO 化による細胞機能制御機構を明らかにする事を目的とした。その結果として、クロマチン構造制御複合体に関与する重要な因子群が SUMO 化修飾を受けることを見いだした。それらの主なものは、ヒストン脱アセチル化酵素 Clr6、RSC クロマチンリモデリング酵素複合体構成因子 Rsc1, Rsc8、FACT (Spt16-Pob3) 複合体構成因子 Spt16、ヒストンメチル化転移酵素 Set1、及び DNA トポイソメラーゼ I, II であった。これらのクロマチン構造制御複合体因子の SUMO 化修飾は、クロマチン構造制御複合体のダイナミクスを理解する上で極めて重要であると考えられる。

Abstract

SUMO, a small ubiquitin-related modifier, is known to covalently attach to a number of nuclear regulatory proteins such as p53, TopII, and PML. Unlike ubiquitin, SUMO has been shown to be more important for post-translational protein modification than for protein degradation. We have shown that the fission yeast SUMO pathway is required for a number of nuclear events including the control of telomere length and chromosome segregation.

To understand how sumoylations regulate these nuclear events, we have tried to identify SUMO substrates in fission yeast. We purified SUMO-protein conjugates by TAP method and identified the proteins by MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) mass spectrometric analysis. We found the peptide masses that matched those of tryptic fragments predicted for the gene products of *top1*, *top2*, *rsc1*, *rsc8*, *set1*, *spt16*, and *clr6* (HDAC1 homolog). The sumoylation of these proteins were confirmed *in vivo* so far. In view of the facts that these proteins have been implicated in chromatin organization, our findings suggest that sumoylation could play an important role in regulating chromatin structure.

1. 研究目的

タンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質合成終了後のタンパク質の機能、活性、あるいは局在を変換する重要な機構であり、細胞内情報伝達や細胞周期制御においては極めて重要な役割を果たす。ユビキチンはタンパク質

の選択的分解の標的分子として働く。一方、近年ユビキチンと構造的に類似したユビキチンファミリータンパク質の存在が明らかになってきた。ユビキチン、SUMO、NEDD8 といったユビキチンファミリーによるタンパク質の修飾は、ポストゴルジソーティング・核-細

胞質輸送・遺伝子発現・組換え・分配等の細胞機能発現の基盤となるシグナリングを調節することで、増殖・発生・再生・老化などの様々な生命現象に深く関わっている。現在までの研究から、ユビキチンファミリーによる修飾の多くは、基質タンパク質を標識化したタンパク質の移動や複合体形成を制御すると考えられており、一見異なるように見えるそれぞれのシステムの制御機構や作用機作に多くの共通性があることが示唆されている。

クロマチン・染色体、核膜そして様々な核ドメインは、増殖と分化のプロセスの中でダイナミックに遷移する分子集合体として定義できる。近年、こうした核関連の分子集合体の中に SUMO の基質、あるいは SUMO 化・脱 SUMO 化調節因子の存在を示す事例が多数報告されるようになってきた。リン酸化、メチル化、アセチル化といった化学修飾に関わる酵素群も核関連の複合体中に多く認められる。よって、SUMO 化修飾は複数の修飾酵素群、そして細胞外的・内的（エピジェネティック）なシグナルと協調的に働く核構造・機能調節のための重要な支援システムの一つと考えられるようになってきた。

我々のこれまでの遺伝学的解析により、分裂酵母において SUMO が染色体分配やテロメア維持を始めとする細胞の核内を中心とした多面的機能に重要な役割を果たしている事が明らかとなった¹⁾。SUMO 化を受ける基質タンパク質は幾つか同定され、SUMO 修飾の生理機能が推測されつつあるが、基質同定は場当たりのアプローチしかなされていないのが現状である。本研究では、SUMO 化による細胞機

能制御機構の全貌解明を最終目標として、以下の2点を目的とした。

1) 分裂酵母をモデル生物に、プロテオミクス的手法により SUMO の標的タンパク質を網羅的に同定する。

2) 同定した基質タンパク質を SUMO 化修飾の生物学的意義を遺伝学および生化学的に解析することで、SUMO による細胞機能変換機構の普遍性、細胞周期や細胞外環境等との調和、及び生理学的意義を明らかにする。

2. 研究経過

2-1 プロテオミクス法による SUMO 基質候補タンパク質の同定²⁾

多彩な SUMO 修飾システムの全貌を理解する事を最終目標として、分裂酵母をモデル生物に TAP タグ法による SUMO タンパク質の精製、および多次元質量分析 (MudPIT 法) による SUMO 化基質タンパク質の同定を行なった。その結果、クロマチン構造制御複合体に関与する重要な因子群が SUMO 修飾を受けることを見いだした。それらの主なものは、ヒストン脱アセチル化酵素 Clr6、RSC クロマチンリモデリング酵素複合体構成因子 Rsc1, Rsc8、FACT (Spt16-Pob3) 複合体構成因子 Spt16、ヒストンメチル化転移酵素 Set1、および DNA トポイソメラーゼ I, II であった。

2-2 ヒストン脱アセチル化酵素 Clr6 の SUMO 化修飾³⁾

まず、ヒストン H3 の 9 番目のリジンに特異的な脱アセチル化酵素として機能する Clr6 の SUMO 化修飾に着目し、その修飾の生物学的意義を明らかにすることを試みた。分裂酵

母染色体ゲノム上で Clr6 に抗体タグを付加し、分裂酵母細胞内で実際に SUMO 化修飾を受けるかどうか検証した。その結果、分裂酵母細胞抽出液中で Clr6 の SUMO 化修飾の可能性を示すバンドを確認する事ができ、そのバンドは SUMO 破壊株では検出されなかった。

次に、SUMO 化修飾の有無による Clr6 タンパク質の質的な変化を検証するために、SUMO 化修飾部位の同定を試みた。その結果、Clr6 の 397 番目のリジン残基が SUMO 化修飾部位である事がわかった。

さらに、大腸菌を宿主とした *in vivo* 分裂酵母 SUMO 化反応再構成系および *in vitro* 分裂酵母 SUMO 化反応再構成系（横浜市大・岩崎助教授より材料分与）を構築し、Clr6 タンパク質の SUMO 化修飾について詳細に解析した。

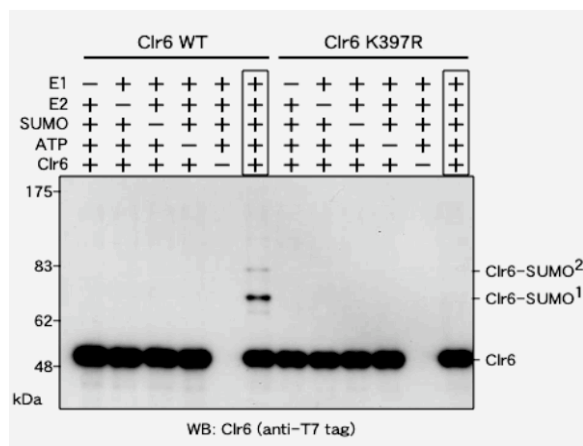


図 *in vitro* SUMO 化反応再構成系による Clr6 タンパク質の SUMO 化の検証

その結果、*in vivo* および *in vitro* のいずれの再構成系においても、Clr6 が 397 番目のリジン残基部位で実際に SUMO 化修飾を受けることを示す結果が得られた (図)。

現在、SUMO 化修飾を受けた Clr6 タンパク

質と SUMO 化修飾を受けていない Clr6 タンパク質の質的な違いを、Clr6 タンパク質のヒストン脱アセチル化酵素活性等を指標とした詳細な解析を行なっている。

2-3 RSC クロマチンリモデリング酵素複合体構成因子の SUMO 化修飾

出芽酵母クロマチンリモデリング RSC (remodeling the structure of chromatin) 複合体は SWI2/SNF2 との相同性により出芽酵母から同定された複合体で、15 個のサブユニットからなり成育に必須である。我々は上述の SUMO 化を受けるタンパク質の精製・同定により、RSC 複合体の構成因子 Rsc1 および Rsc8 の分裂酵母ホモログ SpRsc1, SpRsc8 が SUMO 化修飾を受ける可能性を見いだした。

分裂酵母染色体ゲノム上で Rsc1, Rsc8 に抗体タグを付加し、分裂酵母内で両因子が実際に SUMO 化修飾を受けるかどうか検証した。その結果、Rsc1, Rsc8 の SUMO 化修飾の可能性を示すバンドを分裂酵母細胞抽出液に対するウェスタン解析により確認する事ができた。さらに、これらのバンドは SUMO 破壊株では検出されなかった。以上のことから、RSC 複合体の構成因子 Rsc1 および Rsc8 が、分裂酵母において SUMO 化修飾を受けることがわかった。

次に、SUMO 化修飾の有無による Rsc1 タンパク質の質的な変化を検証するために、SUMO 化修飾部位の同定を試みた。その結果、Rsc1 の 160 番目のリジン残基が主な SUMO 化修飾部位である事がわかった。現在、Rsc1 の全 SUMO 化修飾部位の同定および SUMO 化修飾の生物学的的意義について解析を進めている。

また、大腸菌を宿主とした *in vivo* 分裂酵母 SUMO 化反応再構成系および *in vitro* 分裂酵母 SUMO 化反応再構成系により、Rsc8 タンパク質の SUMO 化修飾について詳細に解析した。その結果、*in vivo* および *in vitro* のいずれの再構成系においても、Rsc8 が実際に SUMO 化修飾を受けることを示す結果が得られた。

3. 研究成果

SUMO 化を受ける基質タンパク質は幾つか同定され、SUMO 化修飾の生理機能が推測されつつある。しかし、基質同定は場当たりのアプローチしかなされていない。我々は多彩な SUMO 化修飾システムの全容を理解する事を最終目標として、分裂酵母をモデル生物にプロテオミクス的手法による SUMO 化基質タンパク質を同定に挑戦してきた。その結果、クロマチン構造制御複合体に関与する重要な因子群が SUMO 化修飾を受ける可能性を見いだした。それらの主なものは、ヒストン脱アセチル化酵素 Clr6、RSC クロマチンリモデリング酵素複合体構成因子 Rsc1, Rsc8、FACT(Spt16-Pob3)複合体構成因子 Spt16、ヒストンメチル化転移酵素 Set1、及び DNA トポイソメラーゼ I, II であった。これらのクロマチン構造制御複合体因子の SUMO 化修飾は、クロマチン構造制御複合体のダイナミクスを理解する上で極めて重要であると考えられる。

4. 今後の課題と発展

あるタンパク質が SUMO 化される場合、そ

のタンパク質と直接あるいは間接的に相互作用する因子の多くが SUMO 化されている例が幾つかある。従って、核ダイナミクスと SUMO 化の関連を考える場合も、ある特定の因子の SUMO 化を念頭に置くだけでなく、それが含まれる複合体全体の SUMO 化状態を考慮する必要がある。今回、研究対象としている SUMO 基質候補タンパク質の幾つかにも、お互いに相互作用する可能性が報告されているものもある。よって、このような観点からの解析は、SUMO 化修飾によるクロマチン構造制御複合体のダイナミクス制御もメカニズムを解明する上で重要なものになると思われる。

5. 発表論文リスト

1. Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, Pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. Tanaka K., Nishide J., Okazaki K., Kato H., Niwa O., Nakagawa T., Matsuda H., Kawamukai M., and Murakami Y. *Mol. Cell Biol.* **1999**, 19, 8660-8672
2. Proteomic analysis of sumoylated proteins in fission yeast. Fujise T., McDonald H., Yate 3rd J., and Tanaka K. (投稿準備中)
3. Fission yeast histone deacetylase Clr6 is modified by SUMO. Iwase H., McDonald H., Yate 3rd J., and Tanaka K. (投稿準備中)