

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

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

和文アブストラクト

SUMO-1はユビキチンと構造的に類似したタンパク質であり、真核生物間で進化上高度に保存されている。SUMO-1化経路では、ユビキチン経路とは異なった酵素群が働いているが、その修飾機構は非常に類似している。ユビキチンが標的タンパク質の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-1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。SUMO-1修飾の生理機能の全貌を明らかにするには、網羅的にSUMO-1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-1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。今回、分裂酵母においてTop2(DNAトポイソメラーゼII)とClr6(class 1 HDAC)がSUMO-1化を受ける可能性を見出した。

Abstract

Unlike ubiquitin, the ubiquitin-related protein modifier SUMO-1 and its budding yeast homologue Smt3p have been shown to be more important for posttranslational protein modification than for protein degradation. We have shown that fission yeast SUMO-1 is required for a number of nuclear events including the control of telomere length and chromosome segregation.

To understand the mechanisms of regulation by sumoylation, we purified SUMO-protein conjugates by TAP method and identified the proteins by MudPIT mass spectrometric analysis. We found the peptide masses that matched those of tryptic fragments predicted for the gene products of top1, top2, and clr6 (HDAC1 homolog) and could confirm the SUMO-dependent modified form of Top2 and Clr6 proteins, so far. Now we are trying to characterize the sumoylation sites and the physiological roles of sumoylation for Top2 and Clr6 proteins.

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極めて重要な役割を果たす。翻訳後修飾の代表例としてタンパク質のリン酸化が挙げられるが、近年、ユビキチンがタンパク質翻訳後の選択的分解の標的分子と

して働くこと、そしてユビキチン化は細胞周期や細胞外刺激などにより時間的空間的に厳密なコントロールを受けていることが明らかとなってきた。

一方、ゲノム研究の飛躍的な進展により、ユビキチンと類似したタンパク質の存在がここ数年のうちに明らかとなってきた。ユビキチン類似タンパク質 SUMO-1 はその代表例であり、真

核生物間で進化上高度に保存されている。SUMO-1 は標的タンパク質へ可逆的に共有結合する移動性の翻訳後修飾分子で、その付加修飾反応は E1 活性化、E2 結合、E3 連結酵素により協調的に制御される (図 1)。

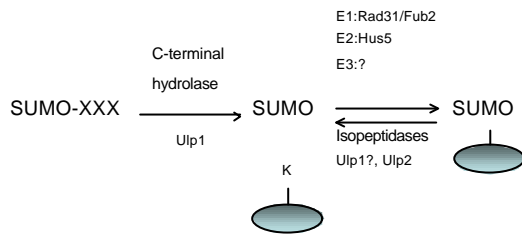


図 1 : 分裂酵母の SUMO-1 翻訳後修飾経路

最近、SUMO-1 による翻訳後修飾 (SUMO-1 化) が細胞の癌化のメカニズムにも密接に関与していることが示唆され、細胞の癌化を初めとした疾患への対処の観点からも、SUMO-1 の普遍的な機能解明が現在急務となっている。

ユビキチンが標的タンパク質の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-1 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。現時点では、SUMO-1 修飾の生理機能という観点から以下に示す 3 つのパターンに分類可能である。1) SUMO-1 化がユビキチン化に対して拮抗的に働くパターン、2) SUMO-1 化により新たな相互作用の形成、3) 現時点では上記の二つのパターンに分類できないもの、である。

我々は遺伝学的解析により分裂酵母 SUMO-1 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を既に明らかにしている¹⁾。

現在、SUMO-1 化を受ける基質タンパク質は幾つか同定され、SUMO-1 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。SUMO-1 修飾の生理機能の全貌を明らかにするには、網羅的に SUMO-1 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-1 化基質タンパク質を網羅的に解析する事で、SUMO-1 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。

2 . 研究経過

2 . 1 SUMO-1 化基質タンパク質の精製

SUMO-1 化標的タンパク質を網羅的かつ集中的に同定するために、TAP タグ法による精製を行う。TAP タグとは、二種類の Affinity タグを用いることで飛躍的に精製度を高める方法である。2 つの Affinity タグと TEV プロテアーゼによる切断部位を直列に繋いだ ProtA-TEV-CaM (TAP) タグを付加した Pmt3 (分裂酵母 SUMO-1) タンパク質を精製に用いた。分裂酵母 10L 培養液より TAP タグを付加した Pmt3 タンパク質の精製を行い、通常の生育条件での SUMO-1 化タンパク質精製及び検出に成功した (図 2)。

標的タンパク質に結合していない遊離の SUMO-1 と共に数多くの特異的なバンドが検出できた。分裂酵母 SUMO-1 抗体による解析により、これらのバンドの多くは実際に SUMO-1 化されているものである事が確認できた。

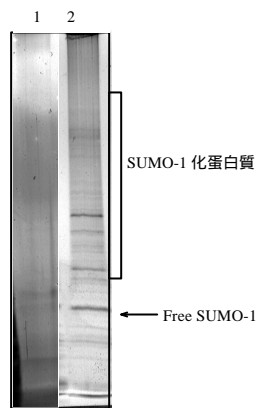


図 2 : TAP 法による SUMO-1 化タンパク質の精製

SDS-PAGE 泳動後の銀染色像。レーン 1 ; TAP タグのみ、レーン 2 ; TAP-SUMO-1 精製

2.2 SUMO-1 化基質タンパク質の質量分析

2.1 で得られた精製 SUMO-1 化タンパク質を TCA 沈澱により回収後、トリプシン消化し、ショットガン的手法による多次元質量分析 (MudPIT : multidimensional protein identification technology) 法により部分アミノ酸配列を決定した。

2.3 SUMO-1 化基質タンパク質の特定

2.2 で得られたペプチド配列情報を基に分裂酵母のゲノム情報データベースを利用して該当タンパク質をコードする遺伝子の特定を行った。その結果、それらのホモログが他の生物で SUMO-1 化修飾される事が報告されている Top2 (DNA トポイソメラーゼ II) や Clr6 (class 1 ヒストンデアセチラーゼ) のペプチド情報が優位に検出された。また、それ以外にも、多数の候補タンパク質が特定することができた。

2.4 SUMO-1 化修飾の検証

2.3 で同定したタンパク質の内、Top2 と Clr6 タンパク質に関して、ゲノム上で抗体タグを付加し、SUMO-1 欠損株と野生株でのタンパク質の性質を比較検討し、実際に SUMO-1 化されるかを検証した。その結果、Top2 と Clr6 のどちらにおいても SUMO-1 修飾の可能性を示すバンドが確認する事ができ、これらのバンドは SUMO-1 破壊株では検出されなかった(図 3)²⁾。今後、SUMO-1 化部位の特定及び SUMO-1 化の有無による標的タンパク質の質的な変化を検証する事で、SUMO-1 化修飾の生理的機能に迫る事が期待できる。

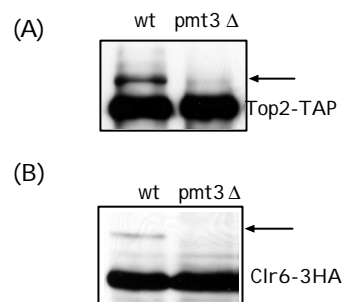


図 3 : ウェスタンブロットによる Top2 (A) 及び Clr6 (B) の SUMO-1 化修飾の検出。矢印で示した位置のバンドが SUMO-1 化されたタンパク質と考えられる。

3. 研究成果

SUMO-1 化を受ける基質タンパク質は幾つか同定され、SUMO-1 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く、今回、プロテオミクス的手法により網羅的な SUMO-1 化基質タンパク質の同定を試み、2つの基質タンパク質を発見

した。それにより、今後 SUMO-1 化の有無による標的タンパク質の質的な変化を検証する事が可能となった。

4 . 今後の課題と発展

生化学的解析により網羅的に SUMO-1 の標的タンパク質を特定できれば、SUMO-1 が何をどの様に修飾制御するのか、又それによってどのように細胞周期に関与しているのかという大きな問題の解明の何らかの手がかりが得られると期待できる。また、分裂酵母の研究から既に得た知見により、この SUMO-1 が真核生物の細胞周期制御において極めて重要な機能を果たしていることが予想できる。具体的には、染色体分配異常やテロメアの異常といった現象から、動物細胞に置き換えれば細胞の癌化、老化といっ

た大きな課題の基礎的且つ普遍的な知見の蓄積及び新たな概念の発見へと期待できると考えている。

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. SUMO modification of Fission yeast histone deacetylase, Clr6. Iwase H., MacDonald H., Yate 3rd J., and Tanaka K. (投稿準備中)