

## 論文内容の要旨

# 論文題目 Molecular Biological Studies on Ubiquitin-like SUMO Protein Conjugation System

(ユビキチン様タンパクSUMO結合経路の分子生物学的研究)

氏名 高橋芳充

### <序論>

ユビキチンは基質タンパクに結合しプロテアソームによる分解へと導くことが知られている。出芽酵母Smt3はユビキチンと18%相同性を有し、増殖に必須なタンパクであり、哺乳類のSUMO-1 (small ubiquitin-related modifier) のホモログである。SUMO/Smt3はさまざまなタンパクと可逆的に共有結合し、多くの生命現象を制御している新しいタイプの翻訳後修飾システムと考えられる。C末端のプロセッシングを受けた成熟型Smt3/SUMO-1は、ユビキチン化経路と同様に、E1活性化酵素 (Uba2/Aos1) によってATP依存的に活性化され、E2結合酵素 (Ubc9) によって基質の $\phi$ KxEのリジン残基にイソペプチド結合し、結合体 (conjugates) を形成する。SUMO-1の標的タンパクとしてRanGAP1, PML, Sp100, I $\kappa$ B, p53などが同定されているが、出芽酵母ではSmt3の標的タンパクは報告がなく、機能解析には至っていなかった。私は修士課程においてSmt3の基質がセプチンCdc3であることを初めて同定し、さらに基質よりSmt3をはずす酵素との関連について研究を行った。博士課程において、セプチンのSmt3化に必須なE3 SUMOリガーゼを同定した (図1)。そのE3は哺乳類の転写因子STATの阻害タンパクとして知られていたPIASファミリーの一員であった。その後E3依存的SUMO化反応の *in vitro* 再構成系を開発し、ポリ化反応の意義やE3の制御機構について考察した。

### <結果と考察>

#### 1、セプチンのSUMO化に関わる因子の同定

Smt3/SUMO-1化経路にはユビキチンリガーゼに相当するE3因子が存在しないと考えられてきた。それは *in vitro* 系において、E1とE2のみでSUMO-1化できるからである。Smt3をbaitとしたtwo-hybridスクリーニングで単離されたNfi1はSmt3の基質Cdc3とも相互作用することがわかった。結合ドメインはCdc3のP-loopを含む領域であった。さらにNfi1はSmt3結合酵素であるUbc9とも相互作用した。しかし、E1酵素であるUba2、ハイドロラーゼであるUlp1, Smt4とは相互作用がみられなかった。NFIIは酵母から哺乳類まで広く保存されていて、出芽酵母にはYDR409Wというホモログが存在する (図2、図3)。NFII, YDR409W 両遺伝子の破壊株は生育可能であるが、二重破壊株の生育率は低

かった。Nfi1は間接蛍光抗体法やGFPを用いた観察によりおもに核に局在した。それはC末端にNLSが存在することによると思われる。一方、Ydr409wは間接蛍光抗体法で染色したところ、M期に細胞質分裂面に局在した(図4)。これらの破壊株のなかでセブチンCdc3の修飾をみたところ、YDR409Wが破壊された時にCdc3の修飾が検出されなかった(図5A)。YDR409Wはユビキチンリガーゼによくあるモチーフであるリングフィンガー様のドメインを有しており(図3)、そのドメインのシステイン残基に変異(C377S)を入れると破壊株同様、Cdc3がSmt3によって修飾されなくなった(図5B)。またセブチンのもうひとつの構成因子Cdc11も同様であった(図5C)。このことによりYdr409wはSmt3を基質Cdc3やCdc11に結合させる因子であり、リングフィンガー様のドメインに依存していることがわかった。そこで、ULL1(ubiquitin-like protein ligase)と名づけた。また、Ull1はM期にリン酸化をうけている(図6)。さらに、これらの*in vivo*の結果が直接的にUll1が関わっているという証明をするために、Smt3、E1酵素(Uba2, Aos1)、E2酵素(Ubc9)、E3(Ull1)、基質(Cdc3)を大腸菌発現系やバキュロウイルス発現系により調製し*in vitro*再構成系を開発した(図7(安田らとの共同研究))。そして実際に*in vitro*で結合反応を再構成することに成功した。このことより、Ull1はSmt3化を促進するE3ライゲースであることが証明された。これはすべての生物種で初めてのSUMO E3ライゲースの報告となった。

## 2、*in vitro* SUMO結合反応再構成系

すべてのタンパクを大腸菌発現系より精製し(図9)さらに効率のよい*in vitro*系を開発したところ、しばしばSmt3にSmt3がイソペプチド結合したものが観察された(図10、11)。これはSmt3自身が標的認識配列を持つためである(図8)。ポリユビキチンはプロテアソームによる認識標識になると考えられているが、ポリSmt3化の生物学的意義については分かっていないので、ポリ化サイトの同定を試みた。Smt3のN末に3つ存在するコンセンサスサイト(K11, K15, K19)の3つのリジン残基を同時にアルギニン残基に変換したものを作製し大腸菌発現系によって精製した(図9)。この精製蛋白質を用いて反応を行なうとSmt3のポリ化がおこらなくなった(図12)。さらにK11, K15, K19それぞれの単独変異体を作ったところK15Rの変異では(K11R, K15R, K19R)同様、ポリ化がおこらなくなっていた。よって、主に15番目のリジン残基を介してポリ化が行なわれている。これらのポリSmt3化サイトを欠いたSmt3をsmt3破壊株で発現させた株について表現型の観察を行なったが、現在のところ、野生型と比べて違いは見いだされなかった。今後さらなる解析が必要であろう。

Ull1のホモログであるNfi1は*in vivo*での基質がわからないため、E3として証明できていなかったが、大腸菌より精製したタンパクを用いて*in vitro*での活性を調べてみた(図13)。基質としてはUll1の基質であるCdc3を用いた。図13にあるようにCdc3のSmt3化はNfi1の量に依存して促進され、Ull1同様に、Nfi1もE3活性を有していることが明らかとなった。*in vivo*ではCdc3を基質とできないにもかかわらず*in vitro*でE3となりうることは、*in vitro*反応系のみで基質を特定できないことを示している。今後は*in vivo*でどのような基質をもっているかが焦点になる。またNfi1やUbc9自身もSmt3によって修飾されていることがわかった(図10、14)。Nfi1の複数あるバンドは複数のサイトにSmt3が結合していて、Smt3にSmt3が結合するポリ化によるものではないことが、Smt3(K11R, K15R, K19R)変異体タンパクを用いることによって明らかとなった(図14)。このような自己修飾はユビキチンのE2s(Ubc)やE3s(ユビキチンライゲース)でしばしば観察されており、なんらかの制御を行なっている可能性がある。

## 3、E3の制御機構

Ull1の制御機構のひとつとして局在の制御が考えられる。Ull1はM期になるとバッドネックに局在しセブチンをSmt3化する。このバッドネック局在はUll1のC末端440 a.aを削ることによって失われ、核に蓄積した。それと同時にCdc3のSmt3化もみられなくなった(図15)。しかし、このC末端を削ったUll1( $\Delta$ C440)を大腸菌で発現させると*in vitro*系でCdc3のSmt3化を促進した。このことより、C末端を欠いたUll1( $\Delta$ C440)はE3活性は有しているが、*in vivo*ではCdc3をSmt3化できないことがわかった。これはUll1の局在化の制御がなされていないためと考えられる。

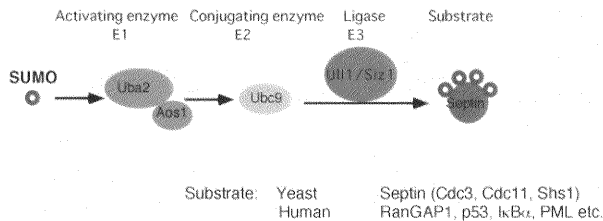


図1 SUMO1/Smt3経路における新たな E3 因子  
SUMO/Smt3はヒドロラーゼによって成熟型になり、そのC末グリシン残基がUba2/Aos1ヘテロダイマーによって活性化され（Uba2のシステイン残基とチオエステル結合をつくる）、次にUbc9とチオエステル結合し、E3(Ull1/Siz1)の助けをかりて基質（セブチン）のリジン残基にインペプチド結合する。

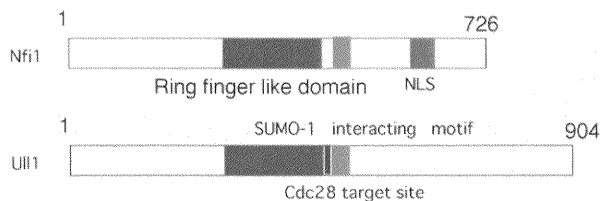


図2 Ull1とNfi1の模式図  
リングフィンガー様ドメインは青色で示す。

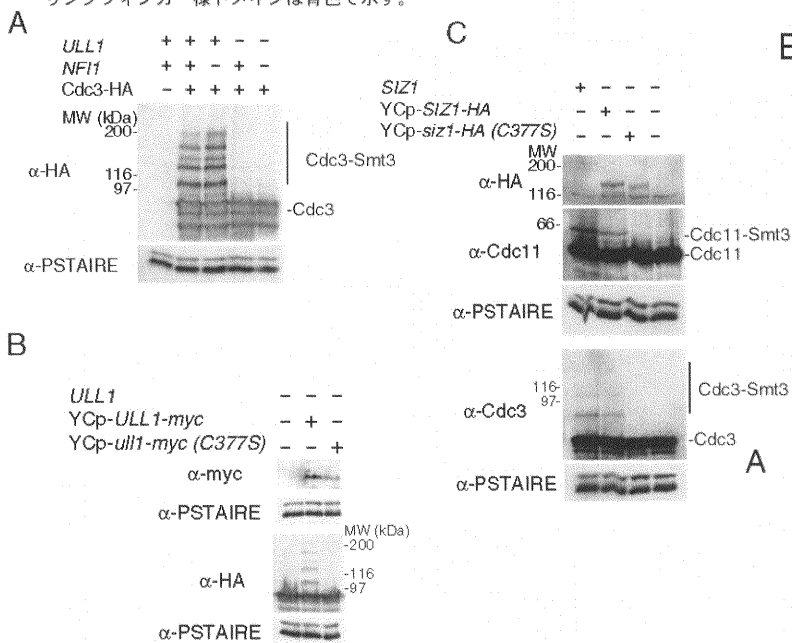


図5 Cdc3の Smt3化は *ull1* の破壊株で起こらない  
出芽酵母 *ull1*, *nfi1* 単独破壊株および *ull1nfi1* 二重破壊株より細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE した後、Cdc3を抗 HA 抗体で検出した。B, C 野生型 Ull1 を発現させると Cdc3 の Smt3 化が回復する。しかしリングフィンガードメインの変異 (C377S) は相補できない。抗 PSTAIRE 抗体で Cdc28 を検出してタンパク量が一定であることを示している。

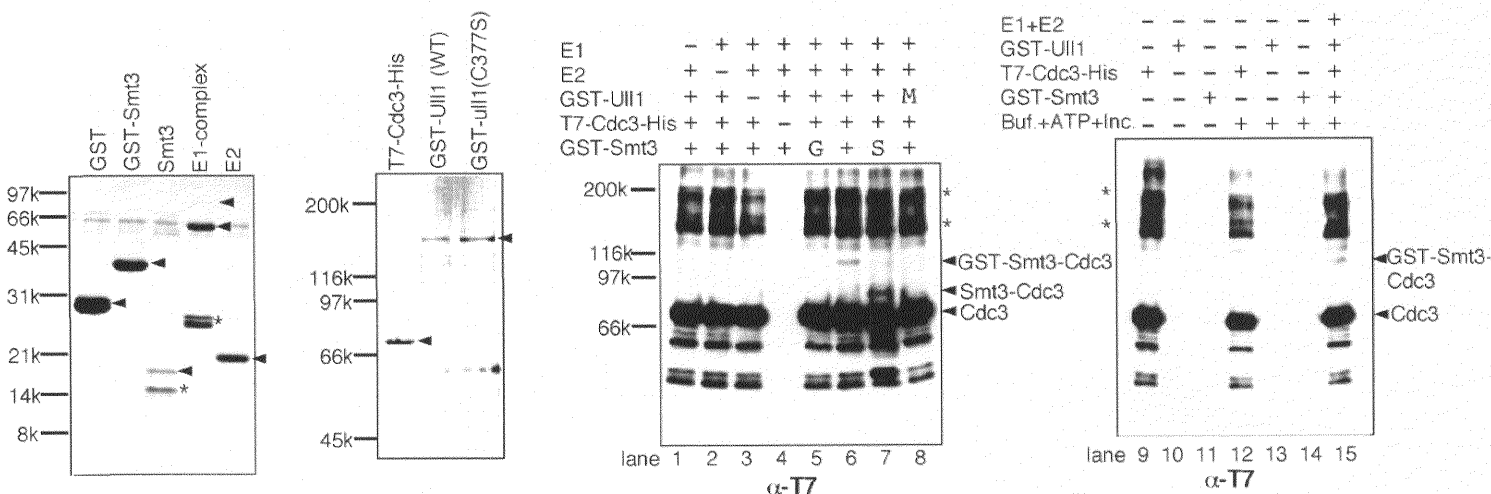


図7 *in vitro* Smt3結合反応  
A, 使用したタンパクのクーマシー染色。矢印はそれぞれの蛋白質の位置を示す。星印は分解産物によるバンドを示す。  
B, それぞれ+で示したものを混ぜて25°C 40 min 反応させた。GはGSTをSはトロンピン処理後の Smt3 を示す。

Ull1 (S.c) 352 TTSTIMSLQCPISYTRMKYPSKSNCKRLQCFDALWFLHSQIQIPTWQCPCVQCIDIAL 409  
Nfi1 (S.c) 329 TTSTVLSLQCPISCTRMYKPKARDQCKHIQCFDASAFLEMNKQTPSNMCPVCASHIQF 386  
SPAC1687.05p (S.p) ATSTDISLRCPISFRSISLPVRSVFCRHIQCFDASAFLEMNKQTPSNMCPVCASHIQF  
zimp (D.m) TTMLKVSLLNCPILGKMRMLLPICRSTCSHLQCFDASLYLQMNERRKPTWNCPCVCDKPAIY  
CG7958 (D.m) ISLRCPITKSRIRLPLARGHECKRIVQCFDLEAYLMIINSERGSWRCPCEKSAIT  
PIA83 (H.s) TTSLRVSLLMCPILGKMRMLTVPICRALTCAHLQSFDAALYLQMNERRKPTWNCPCVCDKPAIY  
Brcal (R.n) LECPIQLELIKEPVST-QCDHFQKPKMLKLLNQKKGPS-QPLCKNEITK

図3 Ull1 (ubiquitin-like protein ligase) のリングフィンガー様ドメイン Ull1/Siz1 及びそのホモログのリングフィンガー様ドメインのアミノ酸配列。重要なシステイン残基とヒスチジン残基は赤で示してある。注意すべきところは、このファミリーではいくつかのシステインがセリンまたはアスパラギン酸に置き換わっているところである。

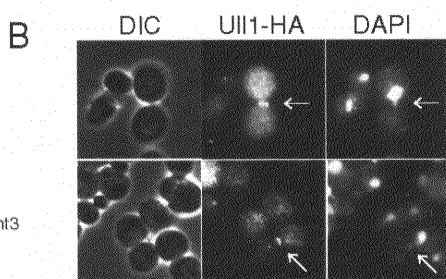
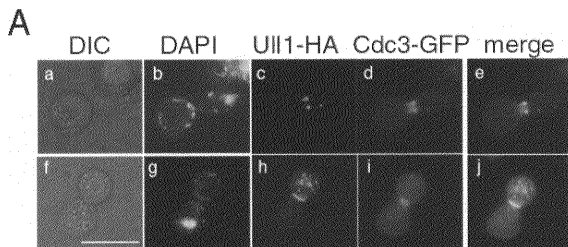


図4 Ull1 はバッドネックで Cdc3 と共局在する。  
A, ノコダゾールによって M 期に同調させた細胞を間接蛍光抗体法によって染色した。スケールバーは 10µm。B, 非同調な細胞を間接蛍光抗体法によって Ull1 の局在を調べた。矢印は Ull1 のネック局在を示す。

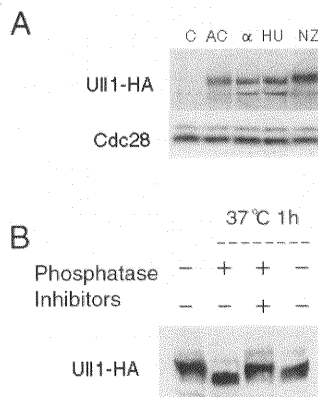


図6 Ull1 は M 期にリン酸化される  
A, α-ファクターによって G1 期、ヒドロキシウレアによって S 期、ノコダゾールによって M 期に同調させた細胞より抽出液を集め Ull1 を HA 抗体によって検出した。  
B, 37°C 1 時間 Phosphatase 処理によってバンドシフトする。Phosphatase 阻害剤によってシフトは起こらない。

Consensus  $\psi$ KXE

Smt3	K11	AKPE
	K15	VKPE
	K19	VKPE
Cdc3	K4	LKEE
	K11	IKQD
	K30	IKQE
	K63	VKVE
Cdc11	K412	IKQE
Shs1	K426	IKQE
	K437	IKTE

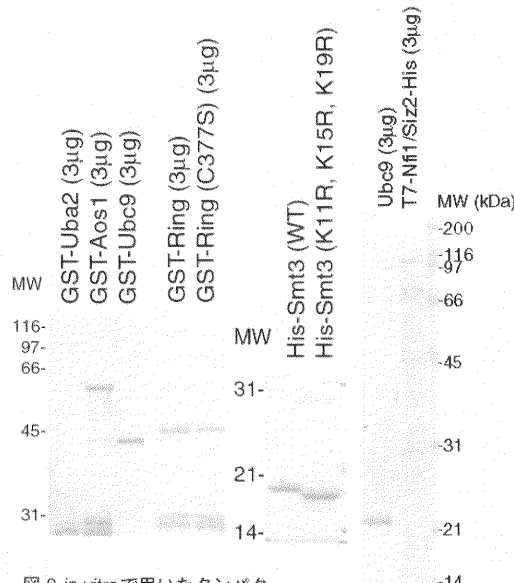


図8 Smt3化コンセンサスサイト  
Smt3, Cdc3, Cdc11, Shs1のSmt3化サイトを  
示す。赤で示したリジンが予想される結合サイト  
である。

図9 *in vitro*で用いたタンパク  
大腸菌より精製した蛋白質をそれぞれ3µgずつ  
SDS-PAGEにより分離後クーマシー染色した。

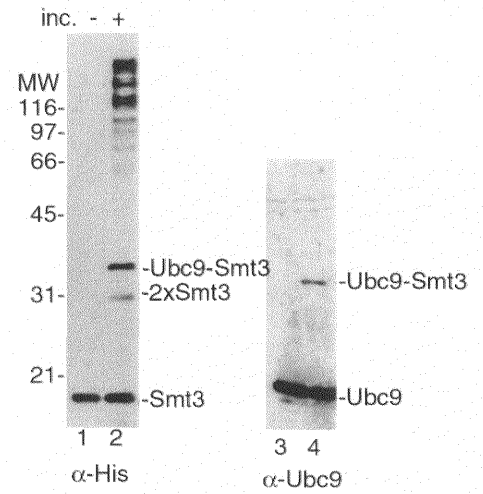


図10 *in vitro* Smt3化  
大腸菌より精製した Uba2/Aos1, Ubc9, Smt3を ATP とともに  
37 °C 90min 反応させ抗 His 抗体によって Smt3 を検出した。  
Ubc9は抗 Ubc9 抗体で検出した。レーン1とレーン3、  
レーン2とレーン4は同じサンプルである。

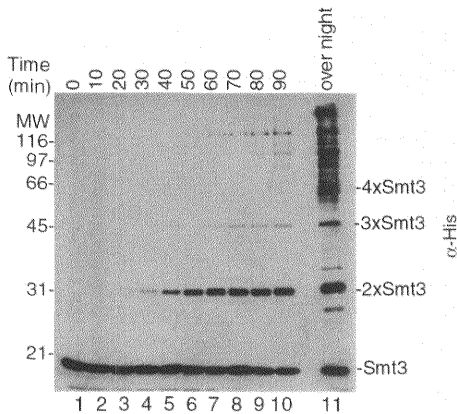


図11 *in vitro* Smt3化反応の経時変化  
図10同様 Uba2/Aos1, Ubc9, Smt3を ATP とともに  
37 °C 90min 反応させ抗 His 抗体によって検出した。  
10minごとにサンプリングした。レーン11は一晚  
反応させた。

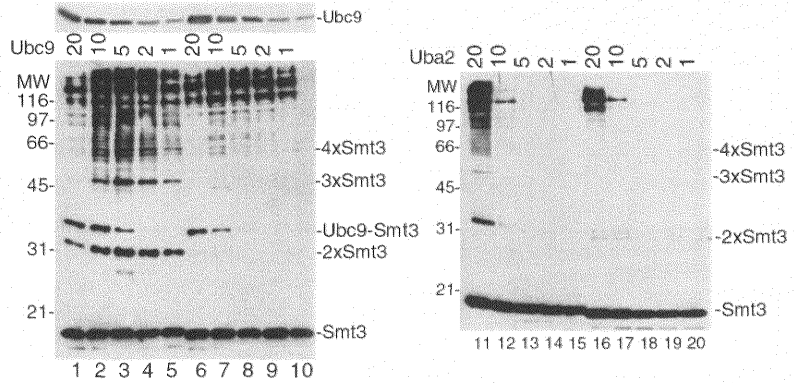


図12 ポリ Smt3化サイトの同定  
大腸菌より精製した Uba2/Aos1, Ubc9, Smt3 (レーン1-5, 11-15)または  
Smt3 (K11R, K15R, K19R) (レーン6-10, 16-20)を ATP とともに 37 °C 90min  
反応させ抗 His 抗体によって検出した。Ubc9, Uba2/Aos1の蛋白量をそれぞれ  
変化させた。

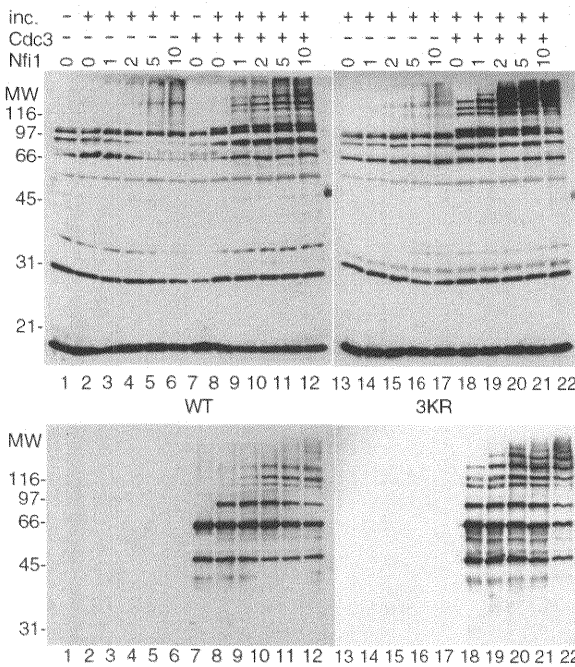


図13 Nfi1は *in vitro*で Cdc3の Smt3化を促進する  
大腸菌より精製した Uba2/Aos1, Ubc9, Smt3または  
Smt3 (K11R, K15R, K19R) を ATP とともに 37 °C 90 min  
反応させ、Cdc3を抗 Cdc3抗体、Smt3を抗 Smt3抗体  
によって検出した。Nfi1の蛋白量を変化させた。  
レーン1とレーン7は未反応サンプルである。

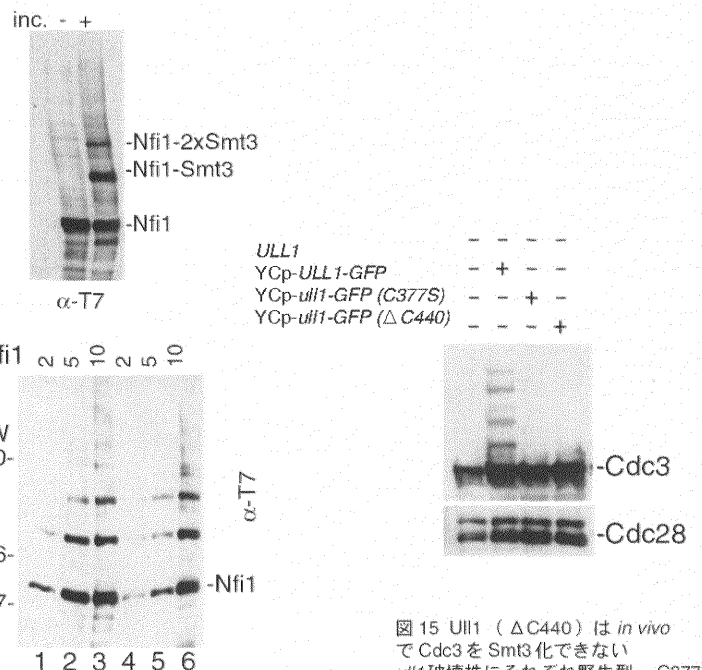


図14 Nfi1は *in vitro*で複数のサイトが Smt3化される  
上段は反応前後の Nfi1 のバンド。下段は Nfi1 の量を変えて  
上段同様の反応を行なった。レーン1, 2, 3は野生型、  
レーン4, 5, 6は K11R, K15R, K19R の Smt3 を用いている。

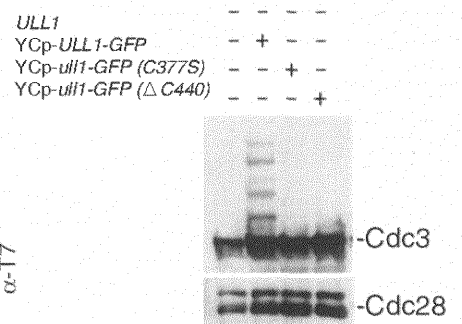


図15 Ull1 (ΔC440) は *in vivo*  
で Cdc3を Smt3化できない  
ull1破壊株にそれぞれ野生型、C377S、  
ΔC440の Ull1を発現させた細胞を  
M期に同調させ、抽出液を集めた。  
SDS-PAGE後、抗 HA 抗体によって  
Cdc3を検出した。