

# 論文審査の結果の要旨

氏名 高橋芳充

本論文は3章からなり、第1章は、出芽酵母 SUMO/Smt3 タンパク質結合経路における新規因子の発見、第2章は、SUMO リガーゼの同定、第3章は、2種の SUMO リガーゼについて *in vivo* と *in vitro* 反応の比較について述べられている。

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、増殖に必要なタンパクであり、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。成熟型 Smt3/SUMO-1 は、ユビキチン化経路と同様に、E1 活性化酵素によって ATP 依存的に活性化され、E2 結合酵素によって基質の  $\varphi$ KxE のリジン残基にイソペプチド結合し、結合体を形成する。本論文ではセプチンの Smt3 化に必要な新規 PIAS ファミリーの SUMO リガーゼを発見した。また、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リガーゼの制御機構について考察した。

## 第1章、セプチンの SUMO 化に関わる因子の同定

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。さらに Nfi1 は Smt3 結合酵素である Ubc9 とも相互作用した。NFI1 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 Ull1/Siz1 というホモログが存在する。Nfi1 はおもに核に局在したが、Ull1/Siz1 は M 期に細胞質分裂面に局在した。これらの破壊株のなかでセプチン Cdc3 の修飾をみたところ、ULL1 が破壊された時に Cdc3 の修飾が検出されなかった。Ull1/Siz1 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、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。

また、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。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。

## 第2章、*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。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とが分った。また、Cdc3 を基質として Nfi1 も E3 活性を有していた。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 変異体タンパクを用いることによって明らかとなった。

## 第3章、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プチンを 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。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。

なお、本論文第2章は、華表友暁、安田秀世、東江昭夫、菊池淑子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。