

【別紙1】

論文の内容の要旨

SUMO-1 Conjugation to Intact DNA Topoisomerase I Amplifies Cleavable Complex Formation Induced by Camptothecin

カンプトテシン誘導クリーバブル複合体形成に於ける

トポイソメラーゼIとSUMO-1結合の意義

指導教官 矢野 哲助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

生殖腫瘍学専攻

堀江 弘二

(序論)

DNA topoisomerase I (Topo1) は核内に於いて DNA 複製や転写の際生ずる「ねじれ (topologic change)」を調節する重要な酵素の一つである。Topo1 はATP非依存性にsupercoilした二重鎖 DNA のうち一方の DNA 鎖に切れ目を入れてこのねじれを解消するが、この時生ずる Topo1-DNA 結合体は cleavable complex と呼ばれ、Camptothecin (CPT)に代表される Topo1 inhibitors の target であることが明らかとなっている。CPT は核内に於いて Topo1 と作用して DNA 障害を起こすため、細胞に於ける Topo1 の質的・量的変化は細胞の CPT 感受性に大きく寄与すると考えられ、実際 CPT 耐性細胞の多くで Topo1 活性及び量の低下が認められている。近年 CPT に曝された細胞の核内では ubiquitin-

proteasome 系を介した Topo1 分解が誘導されることが明らかにされ、CPT の DNA 障害に対する修復機構として Topo1-down-regulation の機構が存在すると考えられてきている。

一方 Ubiquitin 様蛋白である SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier-1) は、UBC9 を含む酵素群により活性化されて様々な蛋白を修飾(sumoylation)することで、それぞれの蛋白の核内移行、転写能、核内分布、他蛋白との結合能や安定化といった生物学的機能を修飾する蛋白である。CPT により細胞内で Topo1 は急激且つ強く SUMO-1 による修飾(sumoylation)を起こす現象が認められているが、その生物学的意義については明らかでない。本研究では Topo1 の主要な SUMO-1 修飾部位を同定し、さらにその部位及び複数の point mutant-Topo1 を用いることで細胞内に於ける CPT 誘導 Topo1 sumoylation の意義について検討した。

(方法と結果)

1. CPT 処理による Topo1 ubiquitinylation 及び sumoylation

HT1080細胞及び293T細胞のcell lysateまたは核抽出物では、CPT 処理後のみ Topo1 の sumoylation 及びユビキチン化(ubiquitinylation)が認められることを Topo1 抗体による免疫沈降、SUMO-1 抗体及び ubiquitin 抗体によるウェスタンブロットで確認した。これらの細胞に FLAG-tag 付きの Topo1, HA-tag 付きの SUMO-1 及び ubiquitin を transfection し共発現させると、FLAG-Topo1 は HA-SUMO-1/ubiquitin と結合し、CPT による sumoylation 及び ubiquitinylation の増強を認めた。

更にこの Topo1-sumoylation は、SUMO-1 修飾を担う酵素である UBC9 の dominant negative mutant である UBC9cs mutant を共発現させることでほぼ完全に消失することを確認した

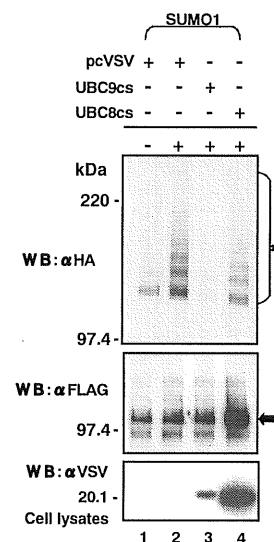


図1. Sumoylation of exogenously expressed Topo1 depending on UBC9. HT1080 cells に FLAG-Topo1, HA-SUMO-1 と共に pcVSV, VSV-UBC9cs (UBC9cs), UBC8cs (UBC8cs) を発現させ、1 μ g/ml of CPT または DMSO 30 min 処理、等量の cell lysate を anti-FLAG 抗体で免疫沈降し、anti-HA (上段)、anti-FLAG (中段) で western blot した。下段は等量の cell lysate を anti-VSV 抗体で western blot した。*; SUMO-1- or ubiquitin-conjugated Topo1, ◄; unconjugated Topo1.

(図1)。

2. 主要なTopo1のSUMO-1結合部位としてのK117の同定とY723F mutantによるCPT非依存性Topo1-sumoylationの発見

Topo1に於いてSUMO-1修飾のconsensus sequence (I/L/V)KX(E/D)に該当するlysineとして117番目及び153番目のリジンを見出し、point mutant Topo1であるK117R, K153R, K117,153R-Topo1を作成、SUMO-1との共発現に於いてTopo1-sumoylationを検討した。その結果WT-Topo1との比較するとCPTにより誘導されるsumoylationはK117Rで著しく減弱していることを見出した(図2)。K153もまたwestern blotに於けるhigh molecular band数の減少及びK117,153R(double mutant)の結果からSUMO-1結合部位の一つであることが示唆された。同様の結果はKR mutant Topo1と内在性SUMO-1との間にも認められた(図2)が、ubiquitinとの共発現あるいは内在性ubiquitinの間には変化を認めなかった。これらの結果からTopo1に於いてはK117,K153がSUMO-1結合部位であり、K117を主要な結合部位としていることが強く示唆された。さらに同じmutant Topo1のsumoylation実験に於いて、Topo1の活性中心である723番目のチロシンのpoint mutantであるY723F-Topo1が、CPT非依存性にSUMO-1修飾を強く受けることを見出した(図2)。活性中心のmutantはtopoisomeraseとしての活性を失うことから、topoisomerase活性消失自体がTopo1-sumoylationの契機となっている可能性が示唆された。

3. Topo1-sumoylation のCPT 依存性 cleavable complex形成における意義

Wild-type Topo1とK117R mutantについて、in-vitroの系に於いてDNA relaxation活性及

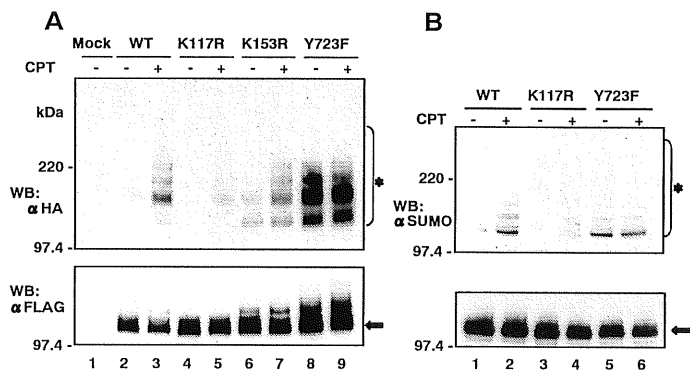


図2. Identification of K117 of Topo1 as the major sumoylation site. (A) HT1080細胞にFLAG-wild-type (WT), K117R, K153R, Y723F Topo1をHA-SUMO-1と共発現させ、図1同様CPT処理、anti-FLAG抗体にて免疫沈降、anti-HA (上段)及びanti-FLAG抗体(下段)にてwestern blotした。(B) HT1080細胞にFLAG-wild-type (WT), K117R, Y723F Topo1を発現させ、(A)同様にCPT処理、免疫沈降後、anti-SUMO-1(上段)及びanti-FLAG抗体(下段)にてwestern blotした。
* ; SUMO-1-conjugated Topo1, ← ; unconjugated Topo1.

びCPTによるDNA relaxation活性阻害を検討したところ両者に差を認めなかった。

次にIn-vivo Conjugation of Topoisomerase (ICT) bioassay、すなわち一定量の細胞DNAに結合するTopo1量を抗体を用いて測定する実験系に於いて、CPT依存性cleavable complex形成に於けるTopo1-sumoylationの意義を検討した。293T細胞に発現させたK117R mutant Topo1はwild-type Topo1に比べ、CPT処理後に形成されるcleavable complex量のpeakを迎える時間が遅く、またpeak levelも低い結果が得られた(図3A)。同様の結果はHT1080細胞でも得られた(図3B)。またwild-type

Topo1のcleavable形成量は、sumoylationを担う酵素であるUBC9の dominant negative mutantであるUBC9cs mutantを共発現させると減少し(図3C)、逆にSUMO-1を共発現させると増大する(図3D)ことが明らかとなった。これらの結果からTopo1のsumoylationはCPTにより誘導されるcleavable complex形成に促進的に作用することが示された。

(考察及び総括)

本研究により Topo1 に於ける主要な SUMO-1 蛋白修飾部位が K117 であり、K153 を含む複数箇所での sumoylation を制御している可能性が強く示唆された。またこれら SUMO-1 蛋白修飾部位の mutant を用いた検討から、Topo1 sumoylation は従前に示唆されていたような ubiquitinylation 同様の CPT による DNA damage 修復機構ではなく、in-vivo における Topo1 の DNA への recruitment を制御し、cleavable complex 形成に促進的に作用して CPT 感受性を増強しうる機構であることが明らかとなった。これによって Topo1 の sumoylation 及び ubiquitinylation は Topoisomerase inhibitors による DNA damage をそれぞれ正と負に制御し得る機構を担っており、同種の薬剤の抗腫瘍活性を検討するにあたり重要な要因であることが示唆された。

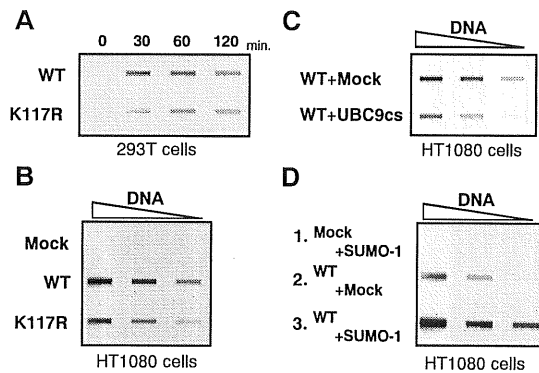


図3. Sumoylation-dependent enhancement of Topo1-DNA covalent complex formation after CPT treatment. Transfection後24時間の細胞をCPT (1 μg/ml) で処理、ICT bioassay法により等量の細胞DNAをmembraneにプロット後抗FLAG抗体でプローブした。(A) 293T細胞にFLAG-WT(WT)またはK117R Topo1(K117R)をHA-SUMO-1と共発現、CPT処理後0.5 μg DNAをプロット (B) HT1080細胞にcontrol vector (Mock), FLAG-WT(WT), K117R-Topo1(K117R)をHA-SUMO-1と共発現、CPT処理30分後のDNAをプロット(左から1, 0.5, 0.25 μgずつ) (C) HT1080細胞にFLAG-WT(WT)とcontrol vector(Mock)またはVSV-UBC9cs(UBC9cs)を共発現、CPT処理15分後のDNAをプロット(左から6, 3, 1.5 μgずつ) (D) HT1080細胞にFLAG-WT(WT)またはcontrol vector(Mock)とHA-SUMO-1(SUMO-1)またはcontrol vector(Mock)を共発現、CPT処理15分後のDNAをプロット(左から6, 3, 1.5 μgずつ)