博士(薬学) 細野秀崇

学位論文題名

修飾分子および非修飾分子としての SUMOの機能に関する研究

学位論文内容の要旨

SUMO (small ubiquitin-related modifier) はE1、E2、E3からなる酵素群の働きにより、基質分子に共有結合することでタグとして機能する。この翻訳後修飾は、リン酸化、アセチル化、糖鎖修飾、ユビキチン化などと並び、タンパク質の機能制御において非常に重要な役割を果たしている。現在までに同定された基質は数十を超え、その機能解析から、ユビキチン化との競合による安定化、局在変化、転写因子や酵素活性の制御などに関与することが明らかになっている。ユビキチン様タンパク質(Ubl)の機能は多岐に渡り、ISG15やUbi-Lなどは基質タンパク質への修飾のみならず、細胞外に分泌されてサイトカイン様機能を持つことが報告されている。

SUMO化における基質タンパク質の認識を担うのはリガーゼとして働くE3である。そこで、本研究において、SUMO化の新規基質タンパク質を探索すべく、E3として知られるPIAS1のN末端領域をベイトとした酵母two-hybridスクリーニングを行い、Chk2 (checkpoint kinase 2) を新規基質タンパク質の候補として同定した。なお、Chk2は、DNA損傷チェックポイントを制御するキナーゼであり、DNA損傷時においてセンサーとして働くATMやATRにより活性化された後、p53、PML、Cdc25A/Cなどを活性化することにより細胞周期やアポトーシスを制御する。

一方、SUMOはI型Ublタンパク質であり、基質タンパク質に結合することにより機能制御を行うが、本研究において、培養細胞の培地中に分泌型SUMOが検出された。この発見は、ISG15やUbi-Lの場合と同様に、SUMOが細胞外に分泌されてサイトカイン様機能を有することを示唆している。

(1) 初めに、PIAS1とChk2の結合および、結合に関与するドメインを同定するために、それぞれを293T細胞に過剰発現させて免疫沈降実験を行った。その結果、Chk2とPIAS1の結合が確認された。また、Chk2はPIAS1の100-200アミノ酸領域と結合していることが明らかになった。次に、Chk2のSUMO-1化修飾について解析を行い、Chk2は、PIAS1のRING-fingerドメイン依存的にSUMO-1化修飾を受けることから、新規SUMO-1化修飾タンパク質であることが明らかになった。

(2) Chk2はDNA損傷チェックポイントを制御する因子であり、DNA損傷時に速やかに活性化し、細胞周期を停止させる。この時、Chk2は、DNA損傷部位において活性化された後、その部位およびクロマチン画分から遊離され、下流のエフェクター分子を活性化することが報告されている。そこで、この機能に対するSUMO化の影響を解析した。その結果、SUMO-1化修飾を受けたChk2は主にクロマチン画分に集積していることが明らかになった。また、Chk2のC末端にSUMO-1を融合させた融

合タンパク質を作成し、Chk2の局在を解析したところ、SUMO-1化修飾を受けたChk2の場合と同様に、クロマチン画分への集積が上昇していた。このことは、SUMO-1化がChk2の活性化を正に制御している可能性を示している。そこで、Chk2が活性化するp53の転写活性を指標としたルシフェラーゼアッセイを行い、SUMO-1の融合の効果を検討したが、有意な結果は得られなかった。Chk2のDNA損傷部位への集積は、ヒストンH2Bとの融合によって亢進するが、Chk2が損傷部位から遊離できないために、結果としては下流のエフェクター分子を効率よく活性化できないことが報告されているので、Chk2とSUMO-1との融合の場合も同様のことが起こり、p53の活性化に対し影響を与えなかったと考えられる。

（3）ISG15やUbi-Lは細胞外に分泌されてサイトカイン様分子として機能することが報告されている。そこで、SUMOも同様の機能を持っている可能性を考え、SUMOの細胞外分泌について解析を行った。HeLa細胞にFLAGタグを付加したSUMO-3を過剰発現させ、培養後、培地に存在するSUMO-3を測定した。その結果、培地中にSUMO-3の存在が確認された。一方、共発現させたFLAGタグを付加したGFPの場合は培地中に検出されなかった。これらの結果から、細胞からのリークではなく、分泌が起こったと考えられる。また、修飾能を欠損したΔGG変異体および、SUMO鎖形成能を欠損したK11R変異体でも同様に培地中に検出されたことから、分泌がそれぞれの機能に依存しないことが明らかになった。SUMO-3はシグナル配列を持たないので、一般的な分泌タンパク質の機構であるER/Golgiを介した経路とは異なる経路を介して分泌されている可能性が考えられる。事実、ER/Golgiを経由する分泌を阻害するbrefeldin AはSUMO-3の分泌に影響を与えなかった。

細胞外に分泌されたSUMO-3は、細胞内に存在するSUMO-3と比べ、わずかに小さい分子量として検出された。SUMOは未成熟なタンパク質として翻訳された後、SENP（sentrin-specific protease）などによりC末端領域がプロセシングされ、Glyモチーフが突出することにより成熟型となる。過剰発現させたSUMO-3はN末端にFLAGタグが付加した成熟型であることから、分泌の際にC末端領域において未知の切断を受ける可能性が考えられる。そこで、任意にC末端領域を欠損させた変異体を作成し、分泌されるか否かを解析したところ、84番目のアミノ酸残基以降を欠失させた変異体では分泌が検出されなくなった。この結果から、SUMO-3の分泌にC末端領域が必須であることが明らかになった。

（4）SUMO-3が細胞外に分泌されることから、SUMO-3はサイトカイン様機能も持っている可能性が考えられる。ISG15の場合では、リコンビナントタンパク質がT細胞からのIFN-γの分泌を亢進することが報告されている。そこで、SUMO-3のリコンビナントタンパク質を作成し、それを用いて細胞の処理を行った。その結果、NIH3T3細胞において細胞増殖を亢進させる作用が観察された。この結果から、SUMOに対する受容体がNIH3T3細胞に存在し、これを介して細胞内へと増殖シグナルが伝えられたと考えられる。そこで、FLAGタグを付加したリコンビナントSUMO-3を作成し、NIH3T3細胞を処理した。その結果、SUMO-3の細胞への結合が観察され、この結合はリコンビナントSUMO-3により競合的に拮抗された。これらの結果から、SUMO-3は細胞外に分泌された後、細胞表面に発現する未知の受容体を介して細胞増殖を制御していることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　横　沢　英　良
副　査　教　授　有　賀　寛　芳
副　査　准教授　松　本　健　一
副　査　准教授　川　原　裕　之

学位論文題名

修飾分子および非修飾分子としての
ＳＵＭＯの機能に関する研究

ユビキチン様タンパク質の１つであるSUMO（small ubiquitin-related modifier）は、ユビキチンの場合と同様に、E1/E2/E3からなる酵素系の触媒作用により標的タンパク質に共有結合することでタグとして機能する。このSUMOによる翻訳後修飾は、ユビキチン化との競合による安定化、局在性の変化、転写因子や酵素活性の制御など、タンパク質の機能制御において重要な役割を果たしている。一方、翻訳後修飾のみならず、細胞外へ分泌されてサイトカイン様作用を示すユビキチン様タンパク質も存在する。

本論文提出者は、翻訳後修飾分子としてのSUMOに焦点をあて、SUMOの翻訳後修飾分子及び非修飾分子としての機能に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

（１）SUMO-1化において、リガーゼとして働くE3酵素が標的タンパク質の認識を担う。SUMO-1化の新規標的タンパク質を探索するために、E3酵素であるPIAS1のN末端領域をベイトとして用いて酵母two-hybridスクリーニングを行い、Chk2（checkpoint kinase 2）をSUMO-1化の新規標的タンパク質候補分子として同定した。そして、PIAS1とChk2の結合と、結合に関与するドメインを解析し、Chk2はPIAS1の100-200アミノ酸の領域において結合することを明らかにした。さらに、Chk2がPIAS1のRING-fingerドメイン依存的にSUMO-1化されることも明らかにした。以上の結果から、Chk2がSUMO-1化の新規標的タンパク質であると結論した。

（２）Chk2はDNA損傷チェックポイントを制御する因子であり、DNA損傷時に活性化され、DNA損傷部位及びクロマチン画分から遊離し、下流のエフェクター分子を活性化する。この過程におけるChk2のSUMO-1化の役割を調べるために、核内におけるChk2の局在性を解析し、SUMO-1化されたChk2が主にクロマチン画分に集積していることを明らか

にした。また、Chk2 の C 末端に SUMO-1 を融合させた Chk2- SUMO-1 融合タンパク質を作成して、その核内局在性を解析し、SUMO-1 化された Chk2 の場合と同様に、Chk2-SUMO-1 融合タンパク質がクロマチン画分に集積することを明らかにした。以上の結果から、SUMO-1 化により、Chk2 はクロマチンに集積し、その活性化が正に制御されていると提案した。

（3）細胞外に分泌されるユビキチン様タンパク質の場合と同様に、SUMO-3 も細胞外に分泌されることを発見した。そして、この分泌が小胞体やゴルジ体を介さない経路で起こることを明らかにした。また、翻訳後修飾能を欠損した SUMO-3 変異体でも、ポリ SUMO-3 鎖の形成能を欠損した SUMO-3 変異体でも分泌されることを明らかにした。さらに、SUMO-3 の C 末端領域を欠損させた変異体を作成して分泌の有無を解析し、SUMO-3 の分泌に C 末端領域が必須の役割を果たしていることを明らかにした。

（4）リコンビナント SUMO-3 タンパク質を作成して培養細胞の増殖促進作用と細胞表面への結合を解析し、SUMO-3 が細胞増殖促進作用を示し、細胞表面に結合することを明らかにした。この結果から、細胞外に分泌された SUMO-3 がサイトカイン様作用を示すと結論した。

以上の新知見及びそれらを得るために用いた新研究方法は、ユビキチン様タンパク質 SUMO による翻訳後修飾や SUMO の分泌現象の理解にとどまらず、広く他のユビキチン様タンパク質による翻訳後修飾や分泌現象の意味を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士（薬学）の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。