

氏 名 (本籍) まえ 前 だ 田 だい 大 すけ 介

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 3 6 4 号

学位授与年月日 平成 17 年 9 月 2 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目

DNA 組み換え誘導における SUMO 修飾の意義

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 榎 本 武 美
教 授 永 沼 章
助教授 倉 田 祥一朗

論文内容要旨

【背景】 - SUMO 修飾 -

タンパク質は翻訳後に様々な修飾を受けることによりその機能が調節される場合が多い。その中で、ユビキチン類似タンパク質の SUMO (small ubiquitin-related modifier) による修飾が知られている。SUMO 修飾の反応機構の素過程は、ユビキチン修飾系のそれとよく似ている (図 1)。すなわち、1) 未成熟の SUMO が SUMO プロテアーゼ (Ulp1 or Ulp2) により C 末側 3 アミノ酸だけ削られて成熟する。2) 成熟した SUMO は、ATP のエネルギーを利用して SUMO 活性化酵素である E1 (Aos1/Uba2) と結合する。3) SUMO 結合タンパク質の E2 (Ubc9) により SUMO リガーゼ E3 (Siz1 or Siz2) の場を利用して、SUMO が標的タンパク質の Lys 残基にイソペプチド結合される。4) 脱 SUMO 修飾酵素 (Ulp1 or Ulp2) により、SUMO は標的タンパク質から解離され、再利用されるという反応機構である (Fig. 1)。このタンパク質修飾機構は、標的タンパク質に SUMO を結合もしくは解離することにより標的タンパク質の細胞内局在の変化や、タンパク質間相互作用の安定化、あるいはタンパク質の活性などに影響を及ぼすと考えられている。

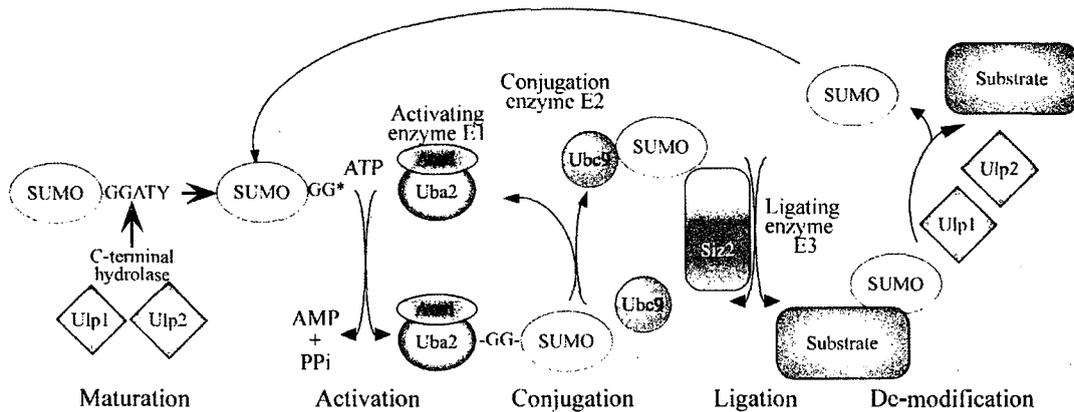


Fig. 1 SUMO 修飾の反応機構

【目的】

当研究室において、ゲノム安定性の維持に関わるウェルナー症候群原因遺伝子産物 WRN やブルーム症候群原因遺伝子産物 BLM がヒト細胞内で SUMO 修飾を受けることが報告されている。しかしながら、その SUMO 修飾の意義については不明のままである。私は、WRN や BLM のみならず多くのタンパク質が SUMO 修飾により制御されうる可能性を考え、出芽酵母をモデル生物として採用し、SUMO 化反応の鍵になる酵素 Ubc9 の温度感受性変異株を用いて解析を行った。その結果、SUMO 化が重要な役割を果たす DNA 修復経路の同定や、幾つかの SUMO 化されうる標的タンパク質の同定に成功した。

【結果】

1) SUMO 修飾は DNA 組み換え修復機構に関与する。

ubc9-1 温度感受性変異株を用いて、準許容温度下で DNA アルキル化剤であるメチルメタンсульフォネート (MMS) に対する感受性を測定した結果、生存率が著しく低下した。そこで、この MMS 感受性が Ubc9 の結合酵素としての酵素活性が低下したために生じたものであるのか、または Ubc9 の立体構造が DNA 修復複合体の一部としてその安定性に関わっているために、その構造が維持できないために生じたものであるのかを決定するため、立体構造を維持したまま SUMO との結合ができなくなるミスセンス変異を導入した遺伝子 (*ubc9-93*) を *ubc9-1* 変異株に形質転換し、その感受性を測定した。その結果 *ubc9-93* 変異遺伝子は、*ubc9-1* 変異株の温度感受性および薬剤感受性を相補できなかった。すなわち、Ubc9 の生存に必須な機能および DNA 修復機能には、Ubc9 の持つ SUMO 化活性が重要であることが明らかとなった。

ubc9-1 変異株の一倍体と二倍体とで各種 DNA 傷害剤に対する感受性を比較したところ、一倍体、二倍体を問わず MMS をはじめ、DNA 合成阻害剤であるヒドロキシ尿素、カンプトテシン、シスプラチン、ゼオシン、マイトマイシン C などに対して感受性を示したが、ほとんどの薬剤に関して、二倍体の方が一倍体よりも高い感受性を示した。以前より、相同組み換え修復に欠損がある変異株では今回の結果と同様に、一倍体よりも二倍体の方が DNA 傷害剤に対してより高い感受性を示すことが報告されている。このことより、Ubc9 が相同組み換え修復に関わる可能性が考えられた。そこで、SUMO 修飾が相同組み換え修復に関わるかを直接調べるため、細胞内で生じる DNA 組み換え頻度を定量的に測定した。

DNA 傷害剤を処理しない場合に自発的に発生する「相同染色体間の組み換え頻度」は、野生株と *ubc9-1* 変異株の間に違いは見られなかった。一方、MMS を処理した場合や紫外線を照射した場合の「組み換え頻度」は野生株において上昇するのに対し、*ubc9-1* 変異株では上昇しなかった。この結果より、Ubc9 による SUMO 修飾が、DNA 傷害時に誘導される相同染色体間の組み換え修復の促進に必須である可能性を初めて示唆することができた。

2) SUMO 修飾タンパク質の探索。

SUMO 修飾が DNA 組み換え修復機構に関わることを明らかにできたので、次にその標的タンパク質の探索を行った。検索するにあたり、SUMO 化タンパク質の検出の感度を高めるために、脱 SUMO 化酵素の一つ Ulp1 の変異株 (*ulp1-333*) を利用することにした。ガラクトースを加えることで、HA タグ付き標的候補タンパク質を *ulp1-333* 株で過剰発現させ、翻訳後修飾の有無を抗 HA 抗体で検出した。DNA 組み換え修復に関わるタンパク質群をスクリーニングしたところ、Rad50, Rad51, Rad52, Rad55, Rad57 については、どのタンパク質も翻訳後修飾は検出できなかった。一方、高等動物細胞における WRN の酵母ホモログ Sgs1, DNA 複製酵素 DNA polymerase δ (Pol δ) の 2 番目のサブユニット Pol31, および染色体の構造の維持に関与すると考えられている Smc6 の 3 つのタンパク質が翻訳後に修飾を受ける可能性を見いだした。

Sgs1, Pol31 については抗 HA 抗体で標的タンパク質を免疫沈降後に、抗 SUMO 抗体を用いて高分子量側にバンドシフトを検出できた。すなわち、Sgs1 と Pol31 が SUMO 化修飾を受けることが明らかとなった。一方 Smc6 については、細胞内で発現する内在性の SUMO をプロテイン A (ProA) タグ付きの SUMO (ProA-SUMO) に置き換えたところ、ProA の分子量に相当する分だけ大きさがシフトした 2 本のバンドが検出された。このことから、少なくとも 2 つの SUMO が Smc6 に付加することが示唆された。もし Sgs1, Pol31, Smc6 の SUMO 化が DNA 組み換え誘導の引き金になるのであれば、これら遺伝子を *ubc9-1* 変異株に過剰発現させることにより変異株の表現型を補える可能性がある。しかし、*POL31*, *SGS1*, *SMC6* を *ubc9-1* 変異株に高発現しても変異株の温度感受性・薬剤感受性を相補できなかった。このことは、今回得た Pol31, Sgs1, Smc6 は SUMO 化はされるが、*ubc9-1* 変異株の表現型とは全く関係のないタンパク質であるか、あるいは *ubc9-1* 変異株の表現型は単一の標的タンパク質の SUMO 化では説明できないと考えられた。

上記タンパク質のうち Pol31 について SUMO 化の標的になる Lys 残基の同定を試みた。各種 Pol31 欠失タンパク質を発現させ、SUMO 化される領域を絞り込み、最終的に 379 番目の Lys 残基を Arg 残基へと変換した変異 Pol31 において SUMO 化修飾が消失した。現在、Pol31 K379R 変異が細胞にどのようなゲノム不安定をもたらすか調べている。

3) *smc6-56* 変異株では DNA 傷害時の相同組み換えが誘導されない。

野生株では DNA 傷害時に相同染色体間の組み換え頻度が著しく上昇するのに対し、SUMO 修飾されることが確認された Sgs1 の変異株では組み換えの誘導が欠損することが報告されている。そこで、Sgs1 と同様に SUMO 修飾を受ける Smc6 がゲノムの安定性に関わるのか否かを検討した。*smc6-56* 変異株は様々な DNA 傷害剤に対し感受性を示した。さらに Smc6 が相同染色体間の DNA 組み換えに関わっているのかを調べたところ、野生株では、MMS や cis-platinum の濃度依存的に組み換え頻度が上昇していたのに対して、*smc6-56* 変異株では、DNA 組み換え頻度の上昇が観察されず、Smc6 は DNA 傷害剤処理による DNA 組み換えの誘導に必要であることが判明した。

【考察】

本研究により、Ubc9 が DNA 傷害時の相同組み換えの誘導に必須であることがはじめて明らかにした。Sgs1, Smc6 は *ubc9* 変異株と同様に、DNA 傷害時の相同組み換えの誘導に必要であり、しかも本研究で両者ともに SUMO 化修飾を受けることを示した。しかし、Sgs1 あるいは Smc6 の SUMO 化の欠損が、*ubc9* 変異株の表現型を表出させる原因であることを示す直接的な証拠を得るには至らなかった。また DNA 傷害時の相同組み換えの誘導に必要な SUMO 修飾の標的は必ずしもひとつとは限らず、複数のタンパク質群が一斉に SUMO 化されることで、組み換え反応が誘導される可能性も否定できない。いずれにしても、Sgs1 や Smc6 の SUMO 化される Lys 残基を同定することで、上記の可能性を検証する実験が可能になるであろう。最後に本研究において、DNA 複製に必須な DNA polymerase δ の小サブユニ

ット Pol31 の SUMO 化される Lys 残基の同定に成功した。Pol31 の SUMO 化の意義を問うことで、今後 *abc9* 株の表現型のひとつである「複製の異常」に、新たな知見を与えることが期待される。

審査結果の要旨

タンパク質は翻訳後に様々な修飾を受けることによりその機能が調節される。このタンパク質の翻訳後修飾の一つとして SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化が知られている。標的タンパク質の SUMO 化により、タンパク質の細胞内局在の変化やタンパク安定化、あるいはタンパク質の活性化などが起こることが知られている。SUMO 化の反応機構の素過程は、ユビキチン化のそれとよく似ていて、まず、SUMO 活性化酵素である E1 に SUMO が結合する。次に、SUMO は E1 から SUMO 結合タンパク質の E2 (Ubc9) に渡され、SUMO リガーゼ E3 の介在のもとで、E2 である Ubc9 が SUMO を標的タンパク質の Lys 残基にイソペプチド結合させる。本論文では SUMO 化反応の鍵になる酵素、Ubc9 の温度感受性変異株を用いて SUMO 化が重要な役割を果たす DNA 修復経路の特定をするとともに、SUMO 化の標的タンパク質の同定を行い、さらに、SUMO 化 標的タンパク質の DNA 組み換え修復への関与の可能性を検討した。

まず始めに、*ubc9-1* 温度感受性変異株を用いて、準許容温度下で DNA アルキル化剤であるメチルメタンスルフォネート (MMS) に対する感受性を調べることにより、DNA 修復機能には、Ubc9 のもつ SUMO 化活性が重要であることを明らかにした。さらに、この変異株の種々の DNA 傷害剤に対する感受性は、二倍体の方が一倍体よりも高かったことから、Ubc9 の相同組み換え修復への関与が想定された。そこで、DNA 傷害時の DNA の組み換え頻度を調べることにより、Ubc9 による SUMO 化が、DNA 傷害時に誘導される相同染色体間の組み換えに必須であることを示唆する結果をえた。

次に、DNA 組み換え修復機構に関わるタンパク質のなかで SUMO 修飾を受ける標的タンパク質の探索を行った。DNA 組み換え修復に関わるタンパク質、Rad50, Rad51, Rad52, Rad55, Rad57 については、どのタンパク質も SUMO 化は検出できなかった。一方、ゲノムの安定維持に関わる RecQ ヘリカーゼである Sgs1, DNA 複製酵素 DNA polymerase δ の 2 番目のサブユニット Pol31, および染色体の構造の維持に関与すると考えられている Smc6 の 3 つのタンパク質が SUMO 化されることを見いだし、Pol31 については、その SUMO 化される Lys も決定した。さらに、SUMO 修飾を受ける Smc6 が実際に組み換え修復に関与するかどうかを *SMC6* の温度感受性変異株を用いて調べ、Smc6 が DNA 傷害時の DNA 組み換えの誘導に必要であることを明らかにした。

以上のように、本研究は、タンパク質の SUMO 化が DNA 傷害時の組み換え修復の誘導に必須であることを明らかにしたものであり、タンパク質の SUMO 化の意義に関する理解を大きく進展させるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。