

# SUMO 化によるたんぱく質の機能調節の構造学的基盤

## Structural basis for functional regulation of a protein by SUMO modification

白川昌宏

京都大学大学院工学研究科

Masahiro Shirakawa

Graduate School of Engineering

Kyoto University

### 1. はじめに

生体反応の主要な役割である蛋白質は様々な化学修飾を受けることで、その機能や局在が調節されている。こういった翻訳後修飾 (Post-translational modification) は、リン酸基、アセチル基、メチル基といった低分子量官能基のみならず、ユビキチンや SUMO (small ubiquitin-like modifier) といった分子量 8000 以上の蛋白質の付加によっても起こる。これらのユビキチン様修飾因子 (ubiquitin-like modifier) は既に数種類見つかっているが、最もよく研究されているのはユビキチンである[1-3]。

ユビキチンは1分子として、またはポリユビキチン鎖として、細胞内たんぱく質のリジン残基の側鎖ε-アミノ基にイソペプチド結合を介して付加する。ポリユビキチン鎖はひとつのユビキチンの末端のカルボキシル基がもう一つのユビキチン分子のリジン残基側鎖と結合することで形成されるが、そのリジン残基の違いによって、Lys 48 リンク、Lys 63 リンク、Lys 29 リンクといった異なる結合様式のポリユビキチン鎖が存在する[2]。これらのポリユビキチン鎖はそれぞれ異なる細胞内現象に関与する。Lys 48 リンクのポリユビキチン鎖が付加した細胞内たんぱく質はプロテアソームによる分解を受ける。一方、Lys 63 リンクのポリユビキチン鎖はプロテアソームによる分解に依存せずに、DNA 修復や細胞のストレス応答、リボソーム機能調節に関与する。

ユビキチン様修飾因子の一つである SUMO は、遺伝子転写、DNA 修飾や染色体構造、細胞質-核間の蛋白質輸送といった主に核を舞台とする細胞現象の制御に関与することが明らかになっている[4-7]。しかし最近になって細胞膜のイオンチャンネルの活性制御にも関わることが見つかっている[8]。SUMO はユビキチン同様、標的たんぱく質のリジン側鎖にイソペプチド結合を介して付加し、一般的に標的たんぱく質のたんぱく質-たんぱく質相互作用、たんぱく質-DNA 相互作用を変化させると考えられている。

ユビキチンが判っている限りの生物種で一種類ずつしか存在しないのに対して、哺乳動物には SUMO-1 から 4 の4つの SUMO アイソフォームが存在することがわかっている[9,10]。このうち SUMO-1 から 3 がたんぱく質修飾因子として機能すると考えられているが、SUMO-2 と SUMO-3 の配列は極めて似通っており、同一のサブグループを形成していると考えられている。しかし SUMO-1 と SUMO-2/3 の機能上の違いはまだあまり明らかになっていない。

## 2. SUMO 化によるチミン DNA グリコシラーゼの活性制御

SUMO 化の標的たんぱく質は核内、核膜孔局在因子を中心に数多く見つかっている。DNA 修復因子と考えられているチミン DNA グリコシラーゼ (thymine DNA glycosylase, 以下 TDG) もその一つである。TDG はチミン-グアニン, ウラシル-グアニンといったミスマッチ塩基対を持つ DNA からチミン塩基, ウラシル塩基を除去する酵素活性を有する[11]。これによりこれらのミスマッチ部位の塩基除去修復を開始する可能性が考えられている。TDG が酵素として興味深いのは生成物阻害を受ける点である。TDG はミスマッチ塩基除去によって生成する脱塩基部位を持つ DNA に強く結合する。この生成物阻害により TDG は試験管内では酵素回転を示さない。これは細胞内では TDG が脱塩基部位に結合することによって、これが露出することで生じる DNA 上での好ましからぬ反応を防ぐためであると考えられている。それでは細胞内では TDG はどのように酵素回転を行っているのだろうか。

Hardeland らは TDG が SUMO 化を受けること, SUMO 化を受けた TDG は脱塩基部位を持つ DNA に結合しないことを報告した[12]。このことから DNA 上の脱塩基部位に結合した TDG は SUMO 化によって DNA から解離する機構が提案された。また解離した SUMO 化 TDG は細胞内の SUMO プロテアーゼの消化によって SUMO から解離し, DNA 結合活性を再獲得することで, 酵素回転を示すという可能性が指摘された。我々は SUMO 化による TDG の DNA 結合活性の調節機構に興味を持ち, SUMO 化を受けた TDG の立体構造解析に取り組んだ。

## 3. SUMO-1 化 TDG の立体構造

ヒト TDG は DNA グリコシラーゼである MUG との間でよく保存された触媒コアドメイン

(catalytic core domain; 残基 123-300) とあまり保存されていないアミノ末端, カルボキシ末端領域を持つ全長 410 残基のたんぱく質である(図 1)。我々は SUMO-1 化を受けた TDG の残基 112-339 の領域(以降、中央領域と呼ぶ)の結晶中での立体構造を解析した[13]。この中央領域は触媒コアドメインと SUMO 化部位であるリジン 330 を含む。

解析を進める上で重要な点の一つは SUMO-1 化を受けた TDG 中央領域(以下、SUMO1-TDG と呼ぶ)の調製である。これには斉藤らの開発した大腸菌内 SUMO 化システムを利用した[14]。これは組み換え DNA 技術を使って大腸菌で SUMO 化に必要な酵素である SUMO 活性化酵素, SUMO 結合酵素を, SUMO 及び標的たんぱく質と共に発現させ, 大腸菌の細胞内で SUMO 化反応を行うことで, SUMO 化たんぱく質を産生させる系である。これにより構造解析に必要な量の SUMO-1 化または SUMO-3 化された TDG 中央領域を得ることができた。

図 2 に SUMO1-TDG の結晶構造の模式図を示す[13]。図の右側に TDG の触媒コアドメインが, 左側に SUMO-1 が位置し, TDG の残基 301-330 の領域

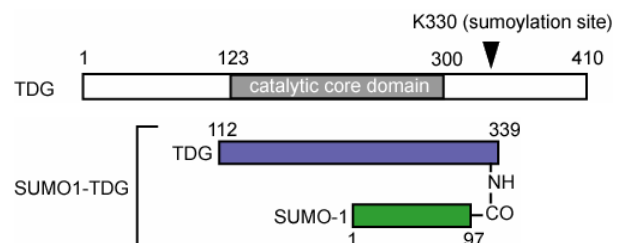


図 1 チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) と SUMO-1 された TDG 中央領域の構成

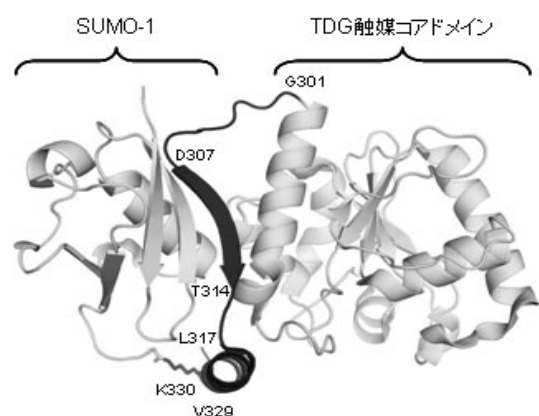


図 2 SUMO-1 された TDG 中央領域の立体構造

(以下、C末端領域と呼ぶ、図中で黒で表示)がSUMO-1に巻きついた構造を持ちその末端に位置するリジン330の側鎖がSUMO-1のカルボキシル末端と共有結合を介して繋がっている。このC末端領域がTDGにおけるSUMO-1との主な相互作用面を形成している。特にTDGの残基307-314はSUMO-1と $\beta$ シートを形成することで密接な相互作用を行っている。

既知の構造との比較から、SUMO-1の付加に伴いTDGの触媒コアドメインとSUMO-1に立体構造変化は起こっているか否かを考察した。SUMO1-TDG中のTDG触媒コアドメインは、Pearlらによって報告された大腸菌G:T/Uミスマッチ特異的DNAグリコシラーゼ(G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: MUG)の結晶構造(PDB 1MUG) [15]と良く似ている。同様にSUMO1-TDG中のSUMO-1の立体構造は、報告されているSUMO-1単独の溶液中での構造(PDB 1TDZ) [16]と似ている。これらからTDG触媒コアドメインとSUMO-1はSUMO化に伴って大きな立体構造変化が起こさないことが示唆される。

一方、SUMO1-TDG中のTDGのC末端領域はSUMO-1に巻きつくように伸びきった構造をとっている。この領域はSUMO-1と残基307-314で非共有結合的相互作用を、残基330で共有結合を取ることで、SUMO-1と強く相互作用をしている。C末端領域がSUMO1-TDGで見られる立体構造を取るには、これらのSUMO-1との相互作用が必要であると推察される。従ってTDGのC末端領域はSUMO化により何らかの構造変化を起こしている可能性が考えられる。このTDGのC末端領域のSUMO-1との2箇所の相互作用領域に挟まれた領域(残基317-329)は分子表面から突出した $\alpha$ ヘリックスを形成している。この突出ヘリックスはTDGの触媒コアドメインの触媒ポケットと思われる部分の近傍に位置する。

前述のようにSUMO1-TDG中のTDG触媒コアドメインとMUGの立体構造が似通っていることから、既報のMUG-DNA複合体の立体構造[17] (PDB 1MWI)を基に、SUMO1-TDGと脱塩基部位を持つDNAとの複合体の立体構造の推定モデルを作成した(図3) [13]。モデルではTDGのC末端領域の持つ突出ヘリックス部分がDNAのリン酸骨格部分と立体衝突を起しうる位置にある。

SUMO-1とTDG間の非共有結合性の相互作用がSUMO化によるTDGの脱塩基部位を持つDNAとの結合活性喪失に必要なかを調べるために、我々はTDGの変異体解析を行った[13]。野生型の配列を持つTDGの残基112-339の部分はSUMO-1と結合するが、Arg 281→Ala, Glu310→Gln, Phe315→Alaといった点変異を持つとSUMO-1と結合しない。興味深いことにこれらの変異体はSUMO-1化を受けても脱塩基部位を持つDNAとの結合活性を失わない。これはSUMO-1とTDG間の非共有結合性の相互作用がSUMO化によるTDGの脱塩基部位を持つDNAとの結合活性喪失に必須であることを示唆する。

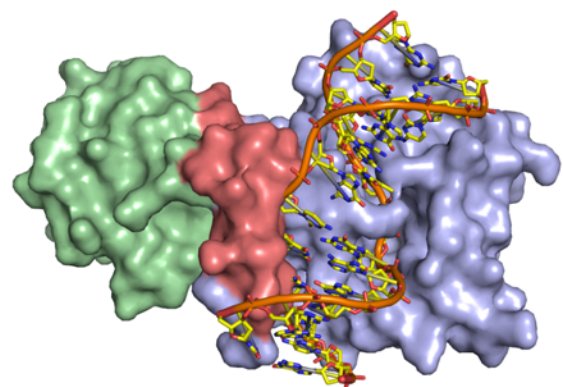


図3 SUMO1-TDGと脱塩基部位を含むDNAとの結合モデル

#### 4. おわりに

ここで紹介したSUMO1-TDGの結晶構造解析は、SUMO化に伴うTDGとの非共有結合的相互作用によってTDGのC末端領域に立体構造変化が誘起される可能性を示す。その実証には今後の研究が待

たれる。また SUMO 化による TDG の N 末端側の構造変化を示す報告もある[18].

SUMO 化を受けたたんぱく質の立体構造解析としては、SUMO-1 化 E2-25K[19], SUMO-1 化 RanGAP1-Ubc9-RanBP2 三者複合体[20]の報告がある。これらの報告では SUMO 化による標的たんぱく質の大きな立体構造変化は議論されていない。また最近我々は SUMO-3 化された TDG 中央領域の立体構造を報告した[21]。これは SUMO1-TDG と極めて似通った構造であった。

#### 謝辞

SUMO1-TDG の立体構造解析における共同研究者の皆様に感謝します。特に大学院生だった馬場大地博士(現 第一三共製薬), 熊本大学 斉藤寿人教授, 理化学研究所 菅澤薫博士に謝意を表します。また図を提供してくださった馬場大地博士, 関山直孝氏に感謝します。

#### 参考文献

- [1]Pickart, C. M. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**, 544-548 (2000).
- [2]Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-178 (2001).
- [3]Marx, J. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science* **297**, 1792-1794 (2002).
- [4]Johnson, E. S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82 (2004).
- [5]Gill, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Development* **8**, 20046-2059 (2004).
- [6]Seeler, J. S. & Dejean, A. SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* **20**, 7243-9 (2001).
- [7]Panse, V. G., Hardeland, U., Werner, T., Kuster, B. & Hurt, E. A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem* **279**, 41346-51 (2004).
- [8]Rajan, S., Plant, L. D., Rabin, M. L., Butler, M. H. & Goldstein, S. A. Sumoylation silences the plasma membrane leak K<sup>+</sup> channel K2P1. *Cell* **121**, 37-47 (2005).
- [9]Kim, K. I., Baek, S. H. & Chung, C. H. Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol* **191**, 257-68 (2002).
- [10]Vertegaal, A. C. et al. A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem* **279**, 33791-8 (2004).
- [11]Hardeland, U. et al. Thymine DNA glycosylase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 235-53 (2001).
- [12]Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. & Schar, P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* **21**, 1456-64 (2002).
- [13]Baba, D. et al. Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* **435**, 979-82 (2005).
- [14]Uchimura, Y., Nakamura, M., Sugasawa, K., Nakao, M. & Saitoh, H. Overproduction of eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated proteins in Escherichia coli. *Anal Biochem* **331**, 204-6 (2004).
- [15]Pearl, L. H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res* **460**, 165-81 (2000).
- [16]Bayer, P. et al. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**, 275-86 (1998).
- [17]Barrett, T. E. et al. Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions. *Cell* **92**, 117-29 (1998).
- [18]Steinacher, R. & Schar, P. Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* **15**, 616-23 (2005).

- [19]Pichler, A. et al. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 264-9 (2005).
- [20]Reverter, D. & Lima, C. D. Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* **435**, 687-92 (2005).
- [21]Baba, D. et al. Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *J Mol Biol* **359**, 137-47 (2006).