

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310131

研究課題名(和文) ゲノムと核オルガネラの統合的な理解に向けてのSUMO修飾研究

研究課題名(英文) Studies on the SUMO modification system: Towards understanding regulation of the nuclear function and structure

研究代表者

斉藤 寿仁 (SAITOH HISATO)

熊本大学大学院・自然科学研究科・教授

研究者番号：50211925

研究成果の概要(和文): 近年、細胞内で合成の途中あるいは合成された後に生じるタンパク質の修飾(翻訳後修飾)がゲノム情報を管理する上で重要な役割を果たすことが分かってきた。例えば、ヒストンのN末端テールへの多彩な翻訳後修飾によるクロマチン構造の制御は、細胞の分化と増殖のバランスを保つ上で重要な仕組みであり、その破綻がガンをはじめとする様々な疾患の原因となる。本研究はユビキチン様の翻訳後修飾因子 Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO) による翻訳後修飾系がヒトを含む高等動物のゲノムとクロマチンの複製の制御に関わることを示している。

研究成果の概要(英文): The small ubiquitin-related modifier 2/3 (SUMO2/3) can be post-translationally conjugated to a wide variety of proteins constituting chromatin, the platform for genetic and epigenetic regulation. Nevertheless, it is unclear how SUMO2/3 and SUMO2/3 modified proteins are delivered to the chromatin fibers. We report that the largest subunit of chromatin assembly factor 1 (CAF-1), human p150, which, in the context of DNA replication, promotes chromatin assembly, interacts directly and preferentially with SUMO2/3. Our findings suggest an expanded role of p150 as a SUMO2/3-interacting factor, and raise the intriguing possibility that p150 plays a role in promoting delivery of SUMO2/3 or SUMO2/3 modified proteins (or both) on chromatin fibers during replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：翻訳後修飾・SUMO・エピゲノム・クロマチン

1. 研究開始当初の背景

細胞内において、タンパク質や核酸(DNA・RNA)といった生体高分子は合成の途中あるいは合成された後に様々な修飾を受ける。近年になり、こうした生体分子の修飾(以下で

は「分子修飾」と呼ぶ)がゲノムの機能制御の骨子として様々な生命現象に関わるものが分かってきた。例えばヒストンやクロマチン関連因子の多彩な修飾によるゲノム上の遺伝子発現制御や、半保存的なDNAのメチル

化修飾とクロマチン構造の維持(クロマチン記憶)の制御における分子修飾の役割は極めて重要で、この数年の間に、欧米での研究層は飛躍的に厚くなり、ゴードンカンファレンス、コールドスプリングハーバー会議、キーストーン会議、FASEB会議、EMBO会議等、先端的な国際学会の多くで関連するテーマが定期的に取り上げるようになってきている。こうした国際的な動向は、分子修飾に関する研究がゲノム科学の枢要課題として世界的に注目されていることを客観的に示すものであり、本邦における本格的な研究体制の構築と人材育成プログラムの整備の必要性を示している。

さて、本研究計画では、分子修飾の中で、特に「スモ(SUMO)修飾」と呼ばれるユビキチン様タンパク質によるタンパク質の翻訳後修飾の制御とこの修飾によるゲノムの機能制御に焦点を当てる。SUMOは酵母からヒト、動物および植物に至る多くの生物種で観察される低分子量のユビキチンに類似のタンパク質翻訳後修飾因子である。SUMO修飾の発見は1990年代後半で比較的新しく、発見当初は特定の基質のみを対象とする限定的な修飾システムと考えられていた。しかしながら、近年のSUMO基質のプロテオミクス解析の結果から、SUMO修飾はユビキチン修飾に次ぐ第2の規模を持つユビキチンファミリーとして認められるようになってきており、加えてSUMOとSUMOに相互作用するSIM(Sumo-Interacting Motif)と呼ばれる配列を持つ分子群の存在が明らかとなったことで、SUMO化タンパク質とSIM領域を持つ因子間でのSUMO-SIM相互作用によるシグナリングの基盤が細胞の中に存在することも分かってきた。現在、SUMO-SIMによる相互作用は、クロマチン・染色体形成・核構造の制御、あるいはゲノム機能の制御の中で重要な役割を果たしていることを示すレポートが数多く報告されるようになり、ゲノムの機能制御に関わる様々なシグナル伝達系に影響を及ぼす重要なシグナリングネットワークの一つと考えている。メチル化、アセチル化、ユビキチン化といったその他の分子修飾系に関する研究と連動しつつ、SUMOによるゲノムの機能制御についての研究は、国内外で益々活発化する兆候にある。

2. 研究の目的

申請者は長年にわたり、分子修飾、とりわけSUMO修飾と高等動物のゲノム・クロマチン・染色体・核の構造の研究領域において多くの業績を上げてきた。

本研究では、平成19年から平成21年度の3年間の研究期間を設定し、以下の3つのプロジェクトを並列的に推進した。

A: SUMOによるゲノム制御

B: SUMO修飾を用いた核制御

C: メダカにおけるSUMO因子の探索

3. 研究の方法

A: SUMOによるゲノム制御: 酵母2ハイブリッド法によるSUMO結合タンパク質の探索とその機能解析

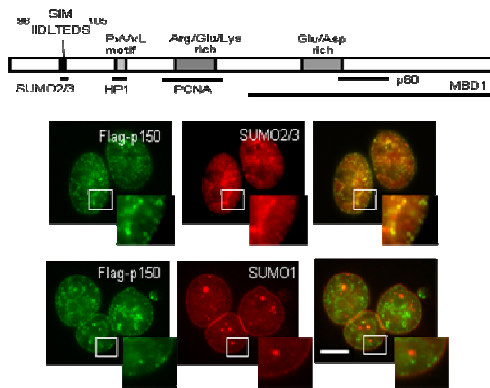
B: SUMO修飾を用いた核制御: in situ SUMO化法の改良と阻害剤による核構造の解析

C: メダカにおけるSUMO因子の探索: メダカcDNAよりSUMOパラログのクローニングとその機能的な発現

4. 研究成果

A: SUMOによるゲノム制御(Uwada et al., 2010, 論文発表済) The small ubiquitin-related modifier 2/3 (SUMO2/3) can be post-translationally conjugated to a wide variety of proteins constituting chromatin, the platform for genetic and epigenetic regulation. Nevertheless, it is unclear how SUMO2/3 and SUMO2/3 modified proteins are delivered to the chromatin fibers. We report that the largest subunit of chromatin assembly factor 1 (CAF-1), human p150, which, in the context of DNA replication, promotes chromatin assembly, interacts directly and preferentially with SUMO2/3. Amino acid residue of 98-105 in p150 is essential and sufficient for SUMO2/3 interaction. p150-SUMO2/3 interaction coincided with regions that replicate chromatin fibers, because accumulation of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) were detected at foci co-stained with both anti-p150 and -SUMO2/3 antibodies during the S-phase in a cell line expressing epitope-tagged p150. Although inhibition of SUMO2/3 expression had only a small effect on p150 deposition on the replication sites, depletion of p150 led

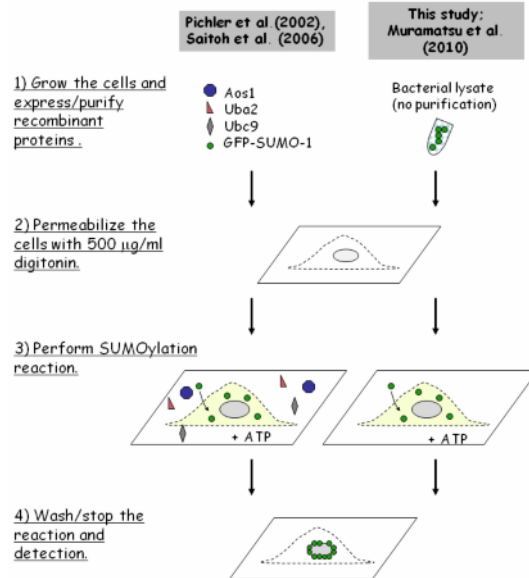
to delocalization of SUMO2/3 from the replication foci. Furthermore, p150 mutants deficient in SUMO2/3-interaction, caused a major reduction of SUMO2/3 at the replication foci. Thus, our findings suggest an expanded role of p150 as a SUMO2/3-interacting factor, and raise the intriguing possibility that p150 plays a role in promoting delivery of SUMO2/3 or SUMO2/3 modified proteins (or both) on chromatin fibers during replication.



B : SUMO修飾を用いた核制御 (Muramatsu et al., 2010, 論文発表) Pichler et al. and Saitoh et al. demonstrated that when a yellow fluorescent (YFP) or green fluorescent (GFP) protein fused to SUMO-1 was incubated with permeabilized cells in the presence of ATP and recombinant SUMO-E1 and -E2 enzymes, YFP/GFP-SUMO-1 was efficiently conjugated to nuclear pore associated factors, including RanBP2/Nup358 and RanGAP1, thereby enabling the visualization of SUMOylation inside permeabilized cells. This assay can detect the SUMOylation reaction *in situ*, and is, therefore, referred to as the *in situ* SUMOylation assay. As shown in Fig. 1, this assay appears relatively simple. However, the preparation of the recombinant proteins required, including a heterodimer of Uba2 and Aos1 for SUMO-E1, Ubc9 for SUMO-E2 and YFP/GFP-SUMO-1, is time-consuming and the purification of these recombinant proteins requires specialized equipment and trained skills.

To provide a SUMOylation assay that can be performed by researchers without experience of recombinant technologies and protein purification, we simplified and improved the *in situ* SUMOylation assay. Our new procedure is schematically represented in Fig. 1. This method requires only cultured cells and crude bacterial lysate containing GFP-SUMO-1.

In sum, we develop an *in situ* cell-based SUMOylation method which is simpler, cheaper and more rapid than previously described assays. The assay described here will be more easily performed by researchers and may be particularly useful in large-scale screening approaches for the identification of drug(s) that can inhibit or enhance SUMOylation, thereby contributing to the development of therapeutic drugs.



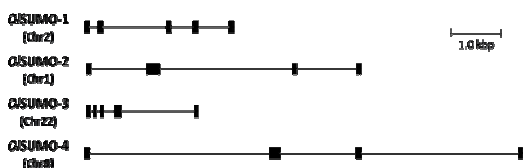
Muramatsu et al., Figure 1

C : メダカにおける SUMO 因子の探索

At least four paralogs of the small ubiquitin-related modifier (SUMO) exist in humans, but there is limited information about SUMO paralogs from other vertebrate species. We isolated the four cDNA encoding proteins, similar to human SUMOs, from the medaka fish, *Oryzias latipes*: *O*SUMO-1, *O*SUMO-2, *O*SUMO-3, and *O*SUMO-4. The amino acid sequences of *O*SUMO-2, *O*SUMO-3 and *O*SUMO-4 are 89–94% identical, but they share only 45% identity with *O*SUMO-1. Phylogenetic analysis, transient expression of *O*SUMOs in cultured cells and *in vitro* binding of *O*SUMOs with two different SUMO-interacting proteins demonstrated that the medaka SUMO paralogs can be grouped into two subfamilies, *O*SUMO-1 and *O*SUMO-2/3/4, respectively. Furthermore, this is the first report of all four *O*SUMO transcripts being expressed in medaka embryos, implying that they have a role in fish development. The study will improve

understanding of the relationship between structural and functional diversity of SUMO paralogs during vertebrate evolution.

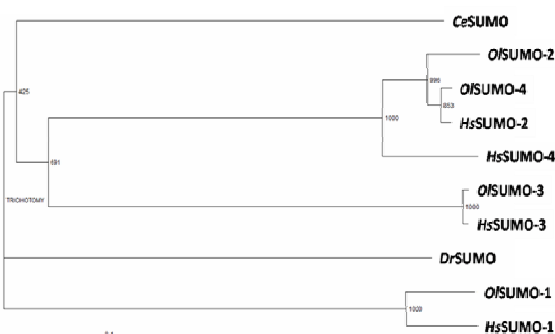
A



B



C



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. K. Saito, W. Kagawa, T. Suzuki, H. Suzuki, S. Yokoyama, H. Saitoh, S. Tashiro, N. Dohmae and H. Kurumizaka, "The putative nuclear localization signal of the human RAD52 protein is a potential sumoylation site", *Journal of Biochemistry*, in press, (2010) 査読有
2. N. Tanaka and H. Saitoh, "A real-time SUMO-binding assay for the analysis of the SUMO-SIM protein interaction network", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, in press (2010) 査読有
3. D. Seki, S. Obata, T. Shirozu, T. Kitano, and H. Saitoh, "Identification of four SUMO paralogs in the medaka fish, *Oryzias latipes*, and their classification into two subfamilies", *Biochemical Genetics*, in press (2010) 査読有
4. M. Muramatsu, J. Uwada, N. Matsumoto, and H. Saitoh, "A simple *in situ*

cell-based SUMOylation assay with potential application to drug-screening", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, in press (2010) 査読有

5. J. Uwada, N. Tanaka, Y. Yamaguchi, Y. Uchimura, K. Shibahara, M. Nakao and H. Saitoh, "The p150 subunit of CAF-1 causes association of SUMO2/3 with the DNA replication foci", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 391, pp.407-413, (2010) 査読有
6. I. Fukuda, A. Ito, G. Hirai, S. Nishimura, H. Kawasaki, H. Saitoh, K. Kimura, M. Sodeoka and M. Yoshida, "Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate", *Chemistry & Biology*, Vol. 16, pp.133-140, (2009) 査読有
7. H. Saitoh, J. Uwada and A. Kawasaki, "Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in *Escherichia coli*", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 497, pp. 211-221, (2009) 査読有
8. I. Fukuda, A. Ito, M. Uramoto, H. Saitoh, H. Kawasaki, H. Osada and M. Yoshida, "Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation", *Journal of Antibiotics*, Vol. 62, pp.221-224, (2009) 査読有
9. N. Sekiyama, K. Arita, Y. Ikeda, K. Hashiguchi, M. Ariyoshi, H. Tochio, H. Saitoh and M. Shirakawa, "Structural basis for regulation of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45", *Proteins*, Epub ahead of print, (2009) 査読有
10. 斉藤寿仁, "SUMO化", *実験医学*, Vol. 56, pp.1089, (2008) 査読無
11. 宇和田淳介, 斉藤典子, 中尾光善, 斉藤寿仁, "SUMO 修飾による核構造モジュレーションと細胞のがん化", *生体の科学*, Vol. 59, pp.352-353, (2008) 査読無
12. N. Sekiyama, T. Ikegami, T. Yamane, M. Ikeguchi, Y. Uchimura, D. Baba, M. Ariyoshi, H. Tochio, H. Saitoh and M. Shirakawa, "Structure of the SUMO-interacting motif of MBD1-containing chromatin-associated factor 1(MCAF1) bound to SUMO-2", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, pp.35966-35975, (2008) 査読有
13. M. Ihara, H. Koyama, Y. Uchimura, H.

Saitoh, A. Kikuchi. Noncovalent binding of small ubiquitin-related modifier (SUMO) protease to SUMO is necessary for enzymatic activities and cell growth. *J. Biol. Chem.*, 282, 16465-16475, 2007. 査読有

[学会発表](計 27 件)

1. 齋藤寿仁: SUMO/ユビキチン修飾に関わる酵素反応を用いたタンパク質と細胞の機能操作 [シンポジウム: タンパク質を修飾する酵素反応の活用と新展開] 農芸化学会 (東京大学) 2010 年 3 月 30 日
2. K. Hashiguchi, D. Saitoh, M. Goto, H. Saitoh "Molecular cloning of cDNAs encoding new mammalian SUMO-interacting proteins." Poster #20 5th International Conference "SUMO, Ubiquitin, Ubl proteins: Implications for Human Diseases at The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX. 2010 年 2 月 10 13 日
3. J. Uwada, N. Tanaka, Y. Yamaguchi, Y. Uchimura, K. Shibahara, M. Nakao, H. Saitoh "The p150 subunit of CAF-1 causes association of SUMO2/3 with DNA replication foci." Poster #47 5th International Conference "SUMO, Ubiquitin, Ubl proteins: Implications for Human Diseases at The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX. 2010 年 2 月 10 13 日
4. 宇和田淳介、田中新菜、山口祐太郎、内村康寛、柴原慶一、中尾光善、齋藤寿仁 The p150 subunit of CAF-1 causes association of SUMO2/3 with DNA replication foci. [ワークショップ口頭発表+ポスター発表] 日本分子生物学会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 12 月 9 12 日
5. 田中新菜、笹野貴司、川崎梓、安武友里、齋藤寿仁 Investigation of Centrin-1 as a calcium-dependent SUMO-interacting protein and its potential roles at the nuclear pore complex and in microtubule formation. [ポスター発表] 日本分子生物学会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 12 月 9 12 日
6. 藤光由佳、笹野貴司、岩井一宏、齋藤寿仁 SUMO 化タンパク質特異的ユビキチンリガーゼ RNF4 の基質探索 [ポスター発表] 日本分子生物学会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 12 月 9 12 日
7. 南早紀、稲熊裕、齋藤寿仁 マウス精巣から同定した SUMO2/3 特異的相互作用タンパク質 TTRAP の解析 [ポスター発表] 日本分子生物学会 (横浜・パシフィコ横浜) 2009 年 12 月 9 12 日
8. 齋藤寿仁、村松みゆき、田中新菜、笹野貴司、藤光由佳、安武友里、廣田冨香、小幡晋平、関大亮 SUMO 修飾と核膜孔 [シンポジウム] 日本生化学会 (神戸・神戸ポートアイランド) 2009 年 10 月 21 24 日
9. 小幡晋平、関大亮、北野健、齋藤寿仁 システインプロテアーゼ Senp1 の活性中心部位を用いた細胞内 SUMO 修飾システムの包括的および局所的な不均衡化 [ポスター発表] 日本生化学会 (神戸・神戸ポートアイランド) 2009 年 10 月 21 24 日
10. 村松 みゆき、齋藤寿仁 核膜孔への集積を指標にした SUMO1 変異体の作製とその核膜孔機能への影響 [ポスター発表] 日本生化学会 (神戸・神戸ポートアイランド) 2009 年 10 月 21 24 日
11. 宇和田淳介、田中新菜、山口祐太郎、柴原慶一、中尾光善、齋藤寿仁 Identification and Characterization of SUMO-Interacting Motif in the p150 Subunit of Chromatin Assembly Factor 1 in the Context of DNA Replication. 日本エピジェネティクス研究会 (東京) 学術総合センター, 2009 年 5 月 22-23 日 [ポスター発表]
12. 宇和田淳介、田中新菜、山口祐太郎、柴原慶一、中尾光善、齋藤寿仁 ヒストンシャペロン CAF-1 p150 サブユニットと翻訳後修飾因子 SUMO との相互作用およびその DNA 複製制御との関連性 [ポスター発表] 日本分子生物学会・春季シンポジウム (宮崎・シーガイア) 2009 年 5 月 11 12 日
13. 関大亮、小幡晋平、北野健、齋藤寿仁. メダカ初期発生における 4 つの SUMO パラログの解析 [ポスター発表] 日本分子生物学会・春季シンポジウム (宮崎・シーガイア) 2009 年 5 月 11 12 日
14. 橋口耕太郎、河崎梓、笹野貴司、松元信太郎、齋藤寿仁 SUMO 相互作用因子である RENi ファミリータンパク質 Nip45 のドメイン機能と細胞内局在の解析 [ポスター発表] 日本分子生物学会・春季シンポジウム (宮崎・シーガイア) 2009 年 5 月 11 12 日
15. 宇和田 淳介、関 大亮、田中 新菜、橋口 耕太郎、笹野 貴司、河崎 梓、藤光由佳、小幡 晋平、北野 健、岩井 一宏、齋藤 寿仁 SUMO 修飾によるクロマチン

- とエピゲノム制御 [シンポジウム、口頭発表] 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会(神戸・神戸ポートアイランド)2008年12月9-12日
16. 田中新菜, 斉藤寿仁 ヒストン H3K9 トリメチル化酵素 SETDB1 と SUMO の相互作用の解析: クロマチンの構造制御における SUMO-SIM 相互作用ネットワークの解明に向けて [ポスター発表] 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会(神戸・神戸ポートアイランド)2008年12月9-12日
 17. 笹野貴司, 藤光由佳, 岩井一宏, 斉藤寿仁 SUMO 修飾とプロテアソームを介在する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 の解析 [ポスター発表] 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会(神戸・神戸ポートアイランド)2008年12月9-12日
 18. 橋口耕太郎, 河崎梓, 笹野貴司, 松元信太郎, 斉藤寿仁 SUMO 相互作用因子である RNF1 ファミリータンパク質 Nip45 のドメイン機能と細胞内局在の解析 [ポスター発表] 第31回日本分子生物学会年会, 第81回日本生化学会大会合同大会(神戸・神戸ポートアイランド)2008年12月9-12日
 19. Sasano, T., Hashiguchi, K., Fujimitsu, Y., Uwada, J., Seki, D., Obata, S., Iwai, K., Saitoh, H. (Invited Speaker) The SUMO Signaling in the Regulation of Epigenome and Nuclear Functions: SUMO2/3 as a Signal for Protein Degradation? ZOMES 国際シンポ (横浜) 2008年11月11-14日
 20. Fujimitsu, Y., Sasano, T., Hashiguchi, K., Tanaka, N., Uwada, J., Iwai, K., Saitoh, H. (Poster presentation) Regulation of Nuclear Function by the SUMO-SIM Interactions, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function, Cold Spring Harbor CSHL ミーティング (NY, USA) 2008年9月17-22日
 21. Saitoh, H. (Invited Speaker) The SUMO Signaling in the Regulation of Epigenome and Cell Functions: Involvement of SUMO-SIM Interaction in MBD1 and MCAF1 Mediated Heterochromatin Formation, 4th International Conference on Ubiquitin, Ubiquitin-like proteins and Cancer (TX, USA) 2008年2月7-9日
 22. Tanaka, N., Saitoh, H. (Poster) Development of Real-time SUMO-binding Assay and Analysis of SUMO-interacting Motif in SETDB1/ESET, a Histone H3-K9 Methyltransferase, 4th International Conference on Ubiquitin, Ubiquitin-like proteins and Cancer (TX, USA) 2008年2月7-9日
 23. Uwada, J., Uchimura, Y., Nakao, M., Saitoh, H. (Poster) Insights into Regulation and the Role of SUMO Modification of MBD1, a Member of the Methyl CpG DNA-binding Protein Family, 4th International Conference on Ubiquitin, Ubiquitin-like proteins and Cancer (TX, USA) 2008年2月7-9日
 24. 河崎梓, 笹野貴司, 橋口耕太郎, 斉藤寿仁 invitro および大腸菌システムを用いた精巢における新規クロマチン基質の検索とポリ SUMO 化反応制御の解析 [ポスター発表] 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会・合同大会(横浜)2007年12月11-15日
 25. 村松みゆき, 松元信太郎, 斉藤寿仁 セミンタクト細胞を用いた SUMO パラログ及び SUMO 変異体の核内における局在性の解析 [ポスター発表] 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会・合同大会(横浜)2007年12月11-15日
 26. 田中新菜, 斉藤寿仁 Development and application of real-time SUMO-binding assay; toward understanding SUMO-SIM interaction network in the eukaryotic cell nucleus. [ポスター発表] 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会・合同大会(横浜)2007年12月11-15日
 27. 関大亮, 白水剛, 北野健, 斉藤寿仁 “メダカ初期発生における4つの SUMO パラログの量的および質的変動の解析.” [ポスター発表] 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会・合同大会(横浜)2007年12月11-15日
- [その他]
ホームページ等
<http://www.sumo-modification.jp/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
斉藤 寿仁 (SAITOH HISATO)
熊本大学大学院・自然科学研究科・教授
研究者番号: 50211925
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者