

平成22年 6月21日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19570115
 研究課題名（和文） SUMOリガーゼPIAS/Sizファミリーのドメイン構造と分子認識機構の解明
 研究課題名（英文） Structures and Functions of the N-terminal Domains of SUMO Ligase PIAS/Siz Family
 研究代表者 山崎 俊正 (YAMAZAKI TOSHIMASA)
 独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット・ユニット長
 研究者番号：40360458

研究成果の概要（和文）：SUMO化翻訳後修飾は被修飾タンパク質の分子認識様式を変化させて広範な細胞機能の制御にかかわっている。SUMO化修飾に必要な3種類の酵素(E1, E2, E3)のうち、標的タンパク質の識別において中心的な役割を果すE3はSUMO化反応で最も重要な酵素といえる。本研究では、動・植物および酵母のRING型SUMOリガーゼE3であるPIAS/SizファミリーのSAPドメインとPHDフィンガーの構造と機能を解析した。

研究成果の概要（英文）：Post-translational modification of target proteins by SUMO regulates a wide variety of cellular functions. Among three enzymes (E1, E2 and E3) involved in the SUMO pathway, SUMO E3 ligases are thought to play important roles to recognize target proteins and facilitate their sumoylation. Here, we studied structures and functions of the N-terminal SAP and PHD of SUMO ligase PIAS/Siz family by NMR spectroscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：生物物理、蛋白質、分子認識、SUMO化翻訳後修飾、SUMOリガーゼ、DNA結合、ヒストン認識

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は翻訳後の多彩な化学修飾により機能や局在の調節を受ける。化学修飾は修飾基の分子量により、(A)リン酸化、アセチル化、メチル化など低分子量官能基によるもの、(B)糖鎖、ポリ(ADP-リボース)など低

分子ユニットが重合したポリマー鎖によるもの、(C)ユビキチン化、SUMO (small ubiquitin-like modifier)化、NEDD8化、RUB化などタンパク質によるものに大別される。タンパク質による修飾は、修飾基が高分子量で特定の立体構造を有する点において、その

他の化学修飾とは明確に異なる[1]。

タンパク質のユビキチン化のような翻訳後の修飾は、真核細胞の細胞周期、アポトーシス、転写制御、タンパク質の品質管理などにおいて中心的役割を果たしている。近年、ユビキチンに類似した、いわゆるユビキチン様タンパク質 (UBL) が次々と発見され、それらに修飾されたタンパク質の機能や宿命について高い関心をもたれている。なかでも SUMO についてもっとも研究が進んでおり、酵母からヒトまですでに多くの SUMO 化標的タンパク質が報告されている。ユビキチン化と同様に、SUMO 化は、酵素 E1, E2 および E3 による 3 段階の反応を経て標的タンパク質のリシン残基と isopeptide 結合を生ずるが、ユビキチン化とは独立の経路で進行する。SUMO 化は被修飾タンパク質の分子認識様式を変化させて、核への局在化、クロマチンなどの核内構造、転写調節、DNA 修復、ストレス応答、細胞周期、染色体の分離、生物時計、細胞膜のイオン透過など広範な細胞機能の制御にかかわっている。SUMO 化経路の最初の 2 段階ではそれぞれ 1 種類の活性化酵素 E1 と結合酵素 E2 が同定されているが、最後の 3 段階目の反応に関与する SUMO リガーゼ E3 として複数の RING 型 SUMO リガーゼが関与している。E3 は SUMO 化修飾反応における標的タンパク質の識別、すなわち特異性を発揮する過程において中心的な役割を果たしており、この点で、SUMO 化反応で最も重要な酵素であるといえる。しかしながら、研究がもっとも進んでいる哺乳類の RING 型 SUMO リガーゼ (PIAS/Siz family) ですら、立体構造に関する知見に乏しく、その標的タンパク質との相互作用の実態も明らかでない。

最近、ヒト癌抑制因子 p53, 癌関連因子 Sp3, c-jun, c-Myb、また、リンパ球 T-cell 特異的転写因子 Lef-1 などが SUMO 化を受けることが示され、これらの標的転写因子は RING 型リガーゼ PIAS を通して SUMO 化され、その転写活性が強い変調 (一般に抑制) を受けることが示された [2, 3]。また、興味あることには、酵母に対する酸化あるいはアルコールによるストレスによって SUMO 化がゲノムスケールで劇的に増加することが示された [4]。さらに、シロイヌナズナにおける SUMO 化に関するごく最近の研究では、これは植物の SUMO 化に関する最初の報告であるが、リン酸の摂取に係わる主遺伝子 *Phr1* がリン酸肥料の欠乏下で SUMO 化を受けることを報告している [5]。

RING 型 SUMO リガーゼ PIAS/Siz ファミリーはマルチドメインタンパク質で、N 末端から順に SAP、PHD フィンガー、RING フィンガードメインを含んでいる。SAP ドメインは DNA 結合や基質結合に関与していることが示唆されているが、認識機構の詳細は明らかでない。

PHD フィンガーについては、相同性の高いヌクレオソームリモデリング因子 NURF や癌抑制タンパク質 ING2 の PHD がメチル化されたヒストンと結合することがごく最近になって報告されたが [6, 7]、SUMO リガーゼの PHD フィンガーの構造と機能に関する知見はない。また、ヒトの PIAS1 と酵母の ScSiz1 には PHD フィンガーが存在しないことから、PHD フィンガーは植物の Siz に固有の機能ドメインと考えられる。SUMO リガーゼの RING フィンガーは E2 の認識ドメインと考えられているが、ユビキチンリガーゼの RING フィンガーとは異なり、2 個の Zn 原子の配位に必要な 8 個の Cys/His 残基のうち 2 つの Cys 残基が置換されていて SP-RING (Siz と PIAS に特異な RING) として区別されており、典型的な RING 構造を形成するか否かは確認されていないし、E2 認識機構の実態も不明である。また、SUMO リガーゼはしばしば自己 SUMO 化を受けるがその機能的役割は明らかでない。

[参考文献]

- ① Seet, B. T. *et al.*, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 473-483 (2006).
- ② Schmidt, D. and Muller, S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2872-2877 (2002).
- ③ Gill, G., *Genes and Development* **18**, 2046-2059 (2004).
- ④ Denison, C. *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* **4**, 3, 246-254 (2005).
- ⑤ Miura, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7760-7765 (2006).
- ⑥ Li, H. *et al.*, *Nature* **442**, 91-95 (2006).
- ⑦ Pena, P. D. *et al.*, *Nature* **442**, 100-103 (2006).

2. 研究の目的

本研究では、動・植物および酵母の RING 型 SUMO リガーゼ E3 である PIAS/Siz ファミリーの各ドメインの構造と機能を解析し、SUMO リガーゼの作用機構を構造生物学的見地から解明することを目指す。具体的には、(1) 酵母、哺乳類 (ヒト) および植物 (イネ) の SUMO リガーゼ E3 PIAS/Siz の N 末端ドメイン (SAP) の立体構造解析と (2) 各 SAP ドメインと DNA との相互作用の解析を行い、SAP ドメイン構造と機能の相関における普遍性と生物種特異性を明らかにする。(3) イネの Siz1 の PHD フィンガーの立体構造解析と (4) メチル化ヒストンとの相互作用の解析を行い、PIAS/Siz ファミリーのうち植物の Siz に固有の PHD フィンガーの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

NMR 構造機能解析に用いた安定同位体 (^{15}N 、および、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) 標識タンパク質、酵母 Siz1 の SAP ドメイン ScSiz1_SAP (1-111 残基)、

及び、イネ Siz1 の SAP ドメイン OsSiz1_SAP (1-105 残基) と PHD フィンガー OsSiz1_PHD (107-172 残基) は大腸菌を利用した大量発現により調製した。

ScSiz1_SAP と OsSiz1_SAP の NMR 解析は、300 mM の NaCl を含む 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.1) に 0.5~0.8 mM のタンパク質を溶解した試料を、OsSiz1_PHD の解析には 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 50 μ M ZnSO₄ を含む 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に 0.5~0.8 mM のタンパク質を溶解した試料を用いた。NMR スペクトルはブルカー-DMX750 装置を用いて測定した。NMR 信号の帰属は異種核多次元 NMR 法を利用する定法に従って行い、¹H-¹H 間の NOE 距離情報、水素結合情報、および、回転角情報に基づく立体構造計算には CYANA を利用した。

SAP ドメインの DNA 結合能と結合領域は、AT に富んだ 16 塩基対からなる合成 DNA (5' -CAAAAATATATTTT-3') を用いた NMR 滴定実験により、タンパク質-DNA 複合体の形成に伴う化学シフト変化を定量的に解析することにより明らかにした。

OsSiz1_PHD とメチル化ヒストンとの相互作用は NMR 滴定法により解析した。実験に利用したヒストンのペプチド断片は、ヒストン H3 の 4 位リシンがトリメチル化された H3K4me3、ジメチル化された H3K4me2、モノメチル化された H4K4me1、非修飾 H3K4me0、H3 の 9 位リシンがトリメチル化された H3K9me3、H3 の 27 位リシンがトリメチル化された H3K27me3、H3 の 36 位リシンがトリメチル化された H3K36me3、H4 の 20 位リシンがトリメチル化された H4K20me3、H3 の 2 位アルギニンがジメチル化された H3R2me2a、および、H3 の 2 位アルギニンと 4 位リシンがともにメチル化された H3R2me2aK4me3 で、いずれも化学合成した。

4. 研究成果

(1) ScSiz1_SAP と OsSiz1_SAP の NMR 構造 :

ScSiz1_SAP の立体構造は、2009 個の NOE 距離情報、53 個の水素結合に基づく 106 個の距離情報、および、197 個の回転角情報を利用して決定した。他方、OsSiz1_SAP の立体構造は、1791 個の NOE 距離情報、43 個の水素結合に基づく 86 個の距離情報、および、139 個の回転角情報を利用して決定した。

ScSiz1_SAP は、5 本の α ヘリックス (α 1, 21-34 残基; α 2, 39-48; α 3, 57-70; α 4, 80-94; α 5, 101-110) で構成されるヘリックスバンドル構造 (図 1a) を形成するのに対して、OsSiz1_SAP は 4 本の α ヘリックス (α 1, 1-14 残基; α 2, 17-27; α 3, 35-47; α 4, 65-79) で構成されるヘリックスバンドル構造 (図 1b) を形成する。

4 本のヘリックスが up (α 1) - down (α 2) -

extended loop -down (α 3) - up (α 4) の特徴的なトポロジーを有する OsSiz1_SAP の 4 本鎖ヘリックスバンドル構造は、以前に我々が決定したヒト PIAS1 リガーゼの SAP ドメイン構造とほぼ同等である (図 2b)。これに対して、ScSiz1_SAP では、 α 1 から α 4 までの 4 本の α ヘリックスはヒトやイネの SAP ドメインと同様の 4 本鎖ヘリックスバンドル構造を形成するが、ヒトやイネの SAP にはない α 5 ヘリックスが α 2 および α 4 ヘリックスと相互作用するために、 α 2 と α 4 ヘリックスの空間配置が顕著に異なる (図 2a)。

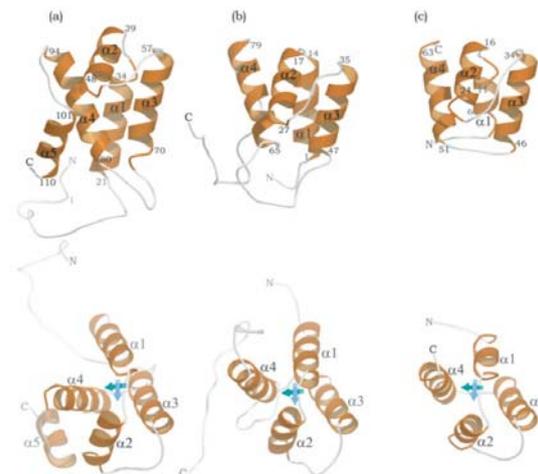


図 1. 酵母 Siz1 (a)、イネ Siz1 (b)、ヒト PIAS1 (c) の N 末 SAP ドメインの NMR 構造。

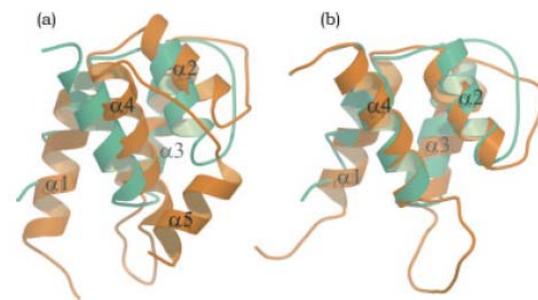


図 2. 酵母 Siz1 (a) およびイネ Siz1 (b) の N 末 SAP ドメイン (オレンジ表示) とヒト PIAS1 の SAP ドメイン (緑色表示) の比較。

(2) ScSiz1_SAP と OsSiz1_SAP の DNA 認識機構の解析 :

AT に富んだ 16 塩基対からなる合成 DNA (5' -CAAAAATATATTTT-3') を用いた NMR 滴定実験により、ScSiz1_SAP と OsSiz1_SAP の DNA 結合領域を特定した。OsSiz1_SAP では (図 3b と 3e)、 α 2 ヘリックス N 末の Ile17, Lys18, Lys21 と α 3 ヘリックス N 末の Lys35 で構成さ

れる狭い領域が DNA 結合に関与し、その DNA 結合様式はヒト PIAS1 の SAP の認識様式(図 3c と 3f)と類似しているものと考えられる。これに対して、ScSiz1_SAP では $\alpha 2$ ヘリックス全体にわたって位置する Val39、Ser40、Leu42、Lys43、Arg47 に加えて、 $\alpha 3$ ヘリックス N 末の Lys57、Ala58 と Ser54、さらには、 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ を連結するループ中の Val53 と Ser54 の広範な領域が DNA 結合に関与することが明らかになった(図 3a と 3d)。ScSiz1_SAP にはヒトやイネの SAP にはない $\alpha 5$ ヘリックス存在するために、DNA 結合に重要な $\alpha 2$ ヘリックスの空間配置が変化したことが主因と考えられる。

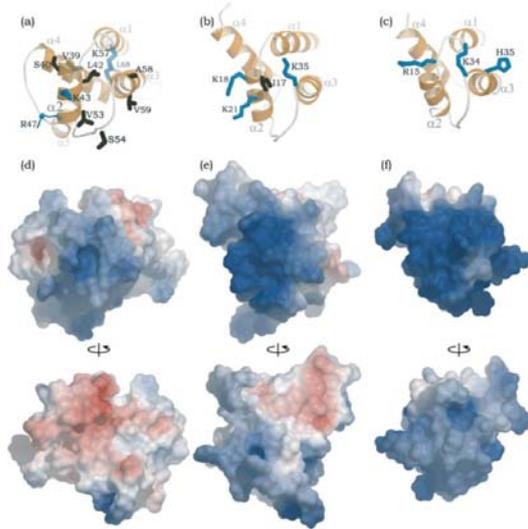


図 3. 酵母 Siz1 (a と d)、イネ Siz1 (b と e)、ヒト PIAS1 (c と f) の N 末 SAP ドメインの DNA 結合領域: (a~c) では DNA 認識残基の側鎖をスティックモデルで表示した。(d~f) は分子表面の静電ポテンシャルを示す。

タンパク質-DNA 複合体の形成に伴う化学シフト変化を定量的に解析することにより、ScSiz1_SAP と OsSiz1_SAP の DNA 結合能を評価した。ScSiz1_SAP および OsSiz1_SAP の解離定数 K_d は、それぞれ 24 残基および 16 残基について観測された化学シフトの滴定曲線を同時にフィットすることにより決定した。この結果、ScSiz1_SAP と DNA の結合比は 1:1 ではなく、DNA1 分子に対してタンパク質 2 分子が結合する 1:2 で、 K_d は 28 μM であることが明らかにされた(図 4a)。これに対して、OsSiz1_SAP の滴定曲線は結合比が 1:1 でも 1:2 でも良好に再現されが、 K_d は前者で 388 μM 、後者で 1327 μM となり(図 4b)、OsSiz1_SAP の DNA 結合能は ScSiz1_SAP の結合能に比べて 10 倍から 50 倍程度低いことが示された。DNA 結合領域の広さの相違を反映しているものと考えられる。

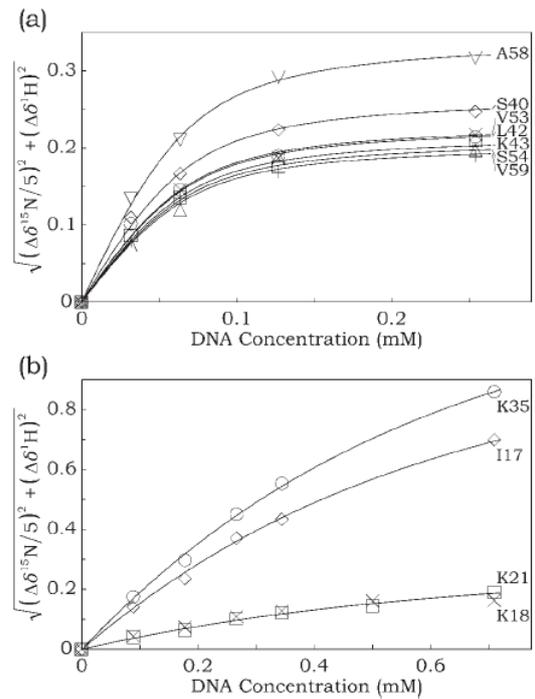


図 4. 酵母 Siz1 (a) およびイネ Siz1 (b) の N 末 SAP ドメインの DNA 結合に伴う化学シフト変化。

(3) OsSiz1_PHD の NMR 構造 :

PIAS/Siz ファミリーのうち植物の Siz に固有の PHD フィンガーの機能を明らかにするために、イネ Siz1 の PHD フィンガー (OsSiz1_PHD) の立体構造を NMR 法により決定した(図 5)。OsSiz1_PHD の立体構造は、3 本の β ストランド ($\beta 1$, 114-115 残基; $\beta 2$, 128-130; $\beta 3$, 138-141) と 2 本のヘリックス ($h1$, 142-145; $h2$, 164-170) で構成される。ストランド $\beta 2$ と $\beta 3$ で構成される逆平行 β シートと 2 本のヘリックスは典型的な PHD コア構造を形成している。PHD コア構造の形成に必要な 2 つの Zn^{2+} 原子は保存性の高い $\text{Cys}_4\text{HisCys}_3$ シーケンスモチーフで配位されて、 β シートの両端に位置しており、両原子間の距離は約 15 \AA である。OsSiz1_PHD の構造的な特徴は、既報の PHD フィンガーにはない $\beta 1$ ストランドが β シートを拡張している点である。

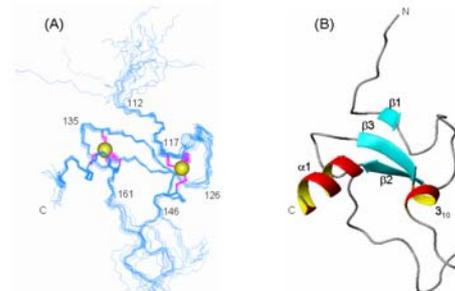


図 5. イネ Siz1 の PHD フィンガーの NMR 構造: (a) 20 構造の重ね合わせと (b) リボン表示。

(4)OsSiz1_PHD のメチル化ヒストン認識機構の解析：

ヌクレオソームリモデリング因子 NURF や癌抑制タンパク質 ING2 の PHD がメチル化されたヒストン(ヒストン H3 の 4 位リシンがトリメチル化された H3K4me3)と結合することが報告されて以来、様々なタンパク質の PHD についてヒストン結合能が解析され、H3K4me3 と選択的に結合する PHD や非修飾の H3K4me0 と選択的に結合する PHD が報告されるに至り、PHD はヒストンの修飾状態を識別する構造因子として重要な役割を担う可能性が示唆されるようになってきた。

そこで、PIAS/Siz ファミリーのうち植物の Siz に固有の PHD フィンガーのヒストン識別能を明らかにするために、OsSiz1_PHD と様々なヒストン断片ペプチドの相互作用を NMR 法により解析した。この結果、OsSiz1_PHD はヒストン H3 の 4 位のリシンがトリメチル化された H3K4me3 に結合することが明らかになった。H3K4 のメチル化率が低下するにつれて結合能も低下していき、非修飾ヒストン H3 にはほとんど結合しない。また、OsSiz1_PHD は、ヒストン H3 の 9 位、27 位、36 位のリシンやヒストン H4 の 20 位のリシンがトリメチル化されたペプチド断片には結合せず、H3K4me3 にのみ選択的に結合することが明らかになった。NMR 法により H3K4me3 認識領域を特定したところ、OsSiz1_PHD は逆平行βシートの分子表面で H3K4me3 と結合することが示された(図 6a)。

ヒストン H3 においては 2 位のアルギニンもメチル化されることが知られている。そこで、OsSiz1_PHD の H3K4me3 結合における 2 位アルギニンのメチル化の影響を検討する目的で、4 位リシンと 2 位アルギニンがともにメチル化された H3R2me2aK4me3 と OsSiz1_PHD の相互作用を解析したところ、H3K4me3 に比べて結合能の顕著な向上が認められた。これは、H3K4me3 の 2 位アルギニンがメチル化されると PHD との結合能が失われるとの既報の結果とは逆の結果である。そこで、2 位のアルギニンのみがメチル化された H3R2me2a を用いて同様の相互作用解析実験を行った結果、OsSiz1_PHD は H3R2me2a に結合すること、さらには、その結合能は H3K4me3 への結合よりも強いことが明らかになった。アルギニンがメチル化されたヒストンを認識する構造モチーフはこれまでに報告例がなく、今回のイネ Siz1 の PHD が初めてである(図 6b)。

酵母においてはクロマチン中のコアヒストンタンパク質が、PIAS/Siz 型 SUMO リガーゼを介して SUMO 化されることが報告されている。本研究の成果と併せて考えると、イネ(植物)の Siz1 は SAP ドメインの DNA 結合と PHD の 2 位アルギニンまたは 4 位リシンがメチル化されたヒストン H3 への結合を介して

クロマチンを認識し、その構造と機能を調節している可能性が示唆される。

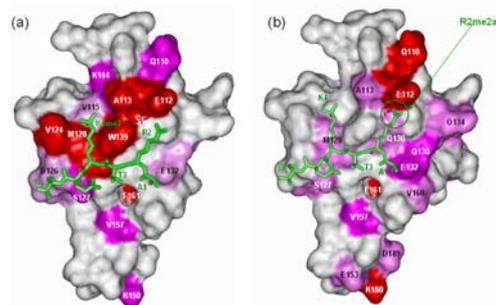


図 6. イネ Siz1 の PHD とメチル化ヒストンの複合体モデル構造：(a) H3K4me3 複合体と (b) H3R2me2a 複合体。

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 1 件)

- ① Suzuki R, Shindo H, Tase A, Kikuchi Y, Shimizu M, and Yamazaki T, Solution structures and DNA binding properties of the N-terminal SAP domains of SUMO E3 ligases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oryza sativa*. PROTEINS, 査読有, 75(2), 2009, 336-347.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山崎俊正, SUMO リガーゼ Siz/PIAS ファミリーの構造と機能に関する研究、第 7 回 SUMO 研究会、2009 年 11 月 22 日、兵庫県三田市
- ② Yamazaki T, Suzuki R, Tase A, Nishiuchi Y, Shindo H, Structure and function of the N-terminal domains of SUMO ligase Siz/PIAS family, The 4th International Peptide Symposium, 2007 年 10 月 24 日, Cairns, Australia
- ③ Suzuki R, Shindo H, Tase A, Yamazaki T, NMR structures and self-sumoylation of the N-terminal SAP domains of SUMO PIAS/Siz family, 第 47 回 NMR 討論会, 2007 年 9 月 13 日, 札幌
- ④ Yamazaki T, Suzuki R, Tase A, Nishiuchi Y, Shindo H, N-terminal SAP and PHD-finger domains of SUMO ligase Siz1 from *Oryza sativa* are essential for recognition of methylated histone as well as DNA binding, 第 47 回 NMR 討論会, 2007 年 9 月 12 日, 札幌

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 俊正 (YAMAZAKI TOSHIMASA)

独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット・ユニット長

研究者番号：40360458

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

神藤 平三郎 (SHINDO HEISABURO)

独立行政法人農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット・外来研究員

研究者番号：80138966