

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570151

研究課題名(和文)SUMO転移反応におけるダイナミズムの精密解析と生物種特異性の解明

研究課題名(英文)Roles of Multiple-Binding Sites of Conjugating Enzyme E2 in SUMOylation

研究代表者

山崎 俊正 (Toshimasa, Yamazaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・生体分子研究ユニット・ユニット長

研究者番号：40360458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：様々な細胞機能の調節に重要な役割を担っているSUMO化翻訳後修飾は、3種類の酵素(活性化酵素E1、結合酵素E2、リガーゼE3)によって触媒される。E2は、SUMO、E1、E3及び標的タンパク質と、順次、一過的に相互作用してSUMO化を仲介する中心的役割を担っているが、反応機構の詳細は不明である。本研究では、E2には親和性の異なる2つの独立したSUMO結合部位が存在することを発見するとともに、E1からE2へのSUMO転移反応の分子機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modification of proteins by a small ubiquitin-related modifier (SUMO) regulates many important cellular pathways. SUMOylation requires the sequential action of E1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) and often needs E3 (ligases) that mediate substrate specificity for SUMO conjugation. In this process, the transfer mechanism of SUMO from E1 to E2 has not been well clarified. In this study, to reveal the functional roles of interaction network among E1, E2 and SUMO, we performed structural analyses on E2, SUMO, and E2-binding domain (UFD) of E1 from rice, and identified that E2 has multiple SUMO-binding sites with distinct affinities as well as a single UFD-binding site.

研究分野：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 構造生物学 SUMO化翻訳後修飾 SUMO化酵素

1. 研究開始当初の背景

SUMO は、ユビキチンと構造的に類似した翻訳後修飾に参与するタンパク質で、真核生物に広く保存されている。多岐にわたる標的タンパク質の SUMO 化は、転写制御、細胞周期、DNA 修復、ストレス応答など様々な細胞機能の制御において重要な役割を担っている。

SUMO 化は 3 段階反応によって起こる。ATP 存在下において活性化酵素 E1 (SAE1 と SAE2 のヘテロダイマー) が SUMO の C 末端カルボキシル基を E1 自身の活性部位にチオエステル結合させた後、E1 から結合酵素 E2 へのチオエステル転移反応が起こる。最終段階で、直接あるいはリガーゼ E3 を介して、SUMO の C 末端カルボキシル基が標的タンパク質中の Lys 残基の ϵ -アミノ基とイソペプチド結合を形成する。

E2 は、SUMO、E1、E3、及び、標的タンパク質と順次一過的に相互作用し、SUMO 転移反応機構において中心的役割を担っているが、現在までにその反応メカニズムを解明するための構造生物学的知見は得られていない。よって、E2 と各タンパク質との分子間相互作用を解明することは、SUMO 化の分子メカニズムを理解する上で重要である。

2. 研究の目的

イネ由来の E2、SUMO、及び、E1 の 2 つのサブユニットのうち E2 との相互作用が想定される SAE2 の C 末端ユビキチン様フォールドドメイン UFD について立体構造と分子間相互作用を詳細に解析し、E1 から E2 への SUMO 転移反応の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

構造機能解析に供するタンパク質および変異タンパク質は大腸菌による大量発現により調製した。NMR 解析には安定同位体 (^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) 標識タンパク質を用いた。X 線回折データは高エネルギー研究所放射光施設で測定した。分子間相互作用の解析には、溶液 NMR 法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、等温カロリメトリー (ITC) 法を併用した。

4. 研究成果

(1) $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識したイネ由来 E2 を用いて多次元 NMR 法によりスペクトル帰属を行った。E2 における SUMO の相互作用部位を特定するため、 ^{15}N 標識した E2 に対する SUMO 滴定による ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの化学シフト変化を測定した。その結果、E2 は SUMO に対して結合能の異なる独立した 2 つの結合部位を持つことが示された。いずれの相互作用も fast exchange limit であったが、第 1 群 (第 1 結合部位) はほぼ 2 等量の SUMO の添加で飽和状態に達するのに対して、第 2 群 (第 2 結合部位) は 2 等量を超えてから徐々に変化を示した。E2 の N 末端付近に存在する第 1 結合部位においては、Arg14、Lys15、Arg18、

Lys19 などの塩基性残基が SUMO 結合に関与していた。一方、E2 の活性部位近傍に広がる第 2 結合部位では、Lys75、Ser90、Thr92、Gln131、Tyr135 の残基が SUMO 結合に関与していた (図 1)。第 1 結合部位についてはヒト由来 E2 において既に報告された結果と一致するが、第 2 結合部位の存在はこれまでに報告がなく、イネ由来 E2 が新規の発見である。

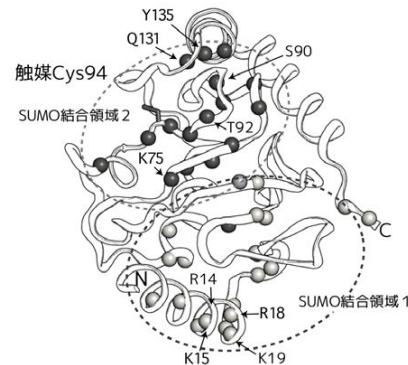


図 1. イネ由来 SUMO 結合酵素 E2 の溶液 NMR 構造。高親和性の第 1 結合部位の SUMO 認識残基 (○) と低親和性の第 2 結合部位の SUMO 認識残基 (●) をマップした。

第 1 および第 2 結合部位に対する正確な解離定数を得るため、第 2 結合部位の結合能を欠損させた E2_{def2} 変異体、および、第 1 結合部位の結合能を欠損させた E2_{def1} 変異体を用いて NMR 滴定実験ならびに ITC 法による相互作用解析を行った。2 つの方法で算出した第 1 および第 2 結合部位に対する解離定数は良く一致し、それぞれ $K_{d1} = 20.3 \mu\text{M}$ および $K_{d2} = 826 \mu\text{M}$ であった。

E2 の第 1 および第 2 SUMO 結合部位の機能的役割を明らかにするため、天然型 E2 と E2_{def2} について、E1 から E2 への SUMO チオエステル転移反応の効率を測定した。その結果、E2_{def2} では転移反応が劇的に阻害されたことから、第 2 結合部位における SUMO 結合の機能的な重要性が証明された。

(2) E2 の第 1 および第 2 結合部位における SUMO 認識の分子機構を解明するため、天然型 E2 と SUMO の複合体、及び、第 1 結合部位の SUMO 結合能を失欠した E2_{def1} 変異体と SUMO の複合体の X 線結晶構造を解析した。第 1 結合部位における E2-SUMO 複合体の構造は、既報のヒト E2-SUMO 複合体構造と良い一致を示した (図 2A)。一方、第 2 結合部位における E2_{def1}-SUMO 複合体の構造については、これまでに報告例のない新規な構造であった (図 2B-D)。第 1 と第 2 部位における E2-SUMO 認識様式を詳細に比較検討した結果、SUMO は同一の分子表面を利用して、E2 の第 1 部位と第 2 部位に結合することが明らかになった。また、第 2 結合部位に対して 2 種類の SUMO 結合様式が観測されたことから、この結合部位における SUMO の結合は高

い柔軟性を有することが示唆された。この柔軟性が、E1 から E2 への SUMO 転移反応に重要な役割を担っているものと推察される。第 1 および第 2 結合部位における E2-SUMO 複合体の構造をもとに構築した SUMO(第 1)-E2-SUMO(第 2)複合体のモデル構造を図 2E-F に示す。

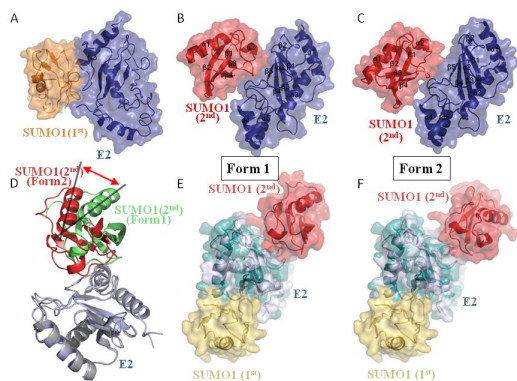


図 2 . イネ由来 E2 と SUMO の複合体構造 : (A)第 1 結合部位に SUMO が結合した天然型 E2-SUMO 複合体の結晶構造。(B と C)第 2 結合部位に SUMO が結合した E2_{def1}-SUMO 複合体の結晶構造。(D)SUMO 分子の結合様式が異なることを示すため、B と C の構造を E2 構造で重ねた構造。(E)A と B を E2 構造で重ねて作成した SUMO(第 1)-E2-SUMO(第 2)複合体のモデル構造。(F)A と C を E2 構造で重ねて作成した SUMO(第 1)-E2-SUMO(第 2)複合体のモデル構造。

(3) E2 における UFD の相互作用部位を特定するため、¹⁵N 標識した E2 に対する UFD 滴定による ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの化学シフト変化を測定した。その結果、E2 と UFD の相互作用は slow exchange limit で、E2 における UFD 結合部位は SUMO の第 1 結合部位と空間的に重複することが明らかとなった。事実、第 1 結合部位の SUMO 結合能を失欠した E2_{def1} 変異体に対して、UFD は結合しないことが ITC 測定により明らかになった。さらに、E2 と SUMO 複合体に UFD を添加すると SUMO は UFD に置換されること、逆に、E2 と結合した UFD は SUMO によって置換されることはないことも示された。これらの結果は、E2 と UFD 複合体の解離定数(0.42 μM)が、第 1 結合部位における SUMO の解離定数(20.3 μM)よりも 50 倍近く小さいことを反映している。

(4) E2 の UFD 認識の分子機構を解明するため、イネ由来 E2-UFD 複合体の X 線結晶構造を解析した(図 3A)。この複合体構造と上記の第 1 結合部位における E2-SUMO 複合体構造を基にして SUMO(第 1)-E2-UFD 複合体のモデル構造を構築すると、SUMO と UFD がクラッシュしてしまい、同一の空間を同時に占有することになる(図 3B)。この結果は、SUMO と

UFD が E2 の第 1 SUMO 結合部位に競合的に結合することを示し、ITC 法による熱力学解析の結果と一致する。一方、第 2 結合部位における E2-SUMO 複合体構造と E2-UFD 複合体構造を基に構築した SUMO(第 2)-E2-UFD 複合体のモデル構造においては、分子間クラッシュは観測されず、この複合体構造は E1 から E2 への SUMO 転移反応の中間体の構造をミミックするものと考えられる(図 3C)。

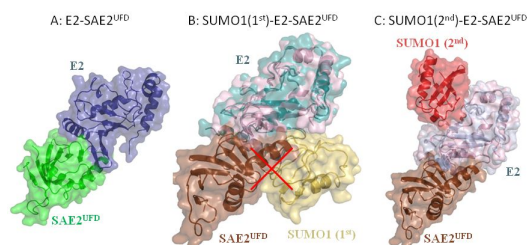


図 3 . (A)イネ由来 E2 と E1 を構成する SAE2 の C 末端のコピキチン様フォールドドメイン UFD の複合体の結晶構造。(B)第 1 結合部位に SUMO が結合した E2-SUMO 複合体と A の構造を E2 構造で重ねて作成した SUMO(第 1)-E2-UFD 複合体のモデル構造。SUMO と UFD がクラッシュしている。(C) 第 2 結合部位に SUMO が結合した E2_{def1}-SUMO 複合体と A の構造を E2 構造で重ねて作成した SUMO(第 2)-E2-UFD 複合体のモデル構造。

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 2 件)

Suzuki R, Tsuchiya W, Shindo H, Yamazaki T (2011) NMR assignments of ubiquitin fold domain (UFD) in SUMO-activating enzyme subunit 2 from rice. *Biomolecular NMR Assignments* 5(2): 245-248. (査読有)

Shindo H, Suzuki R, Tsuchiya W, Taichi M, Nishiuchi Y, Yamazaki T (2012) PHD finger of the SUMO ligase Siz/PIAS family in rice reveals specific binding for methylated histone H3 at lysine 4 and arginine 2. *FEBS Letters* 586(13): 1783-1789. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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

研究者番号：40360458

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

藤本瑞 (FUJIMOTO ZUI)

独立行政法人農業生物資源研究所

研究者番号：20370679

鈴木倫太郎 (SUZUKI RINTARO)

独立行政法人農業生物資源研究所

研究者番号：00399429