

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616004

研究課題名(和文)SUMOとユビキチン複合鎖によるエピゲノム制御

研究課題名(英文)Regulation of epigenome by the SUMO and ubiquitin modification systems

研究代表者

斉藤 寿仁(Saitoh, Hisato)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：50211925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチンおよび類似タンパク質SUMOによる翻訳後修飾は核やクロマチン構造変換に関わることが知られているが、エピゲノム制御との関わりは不明な点が多い。チミンDNAグリコシラーゼ(TDG)は、シトシン(C)の修飾塩基5fCや5caCを認識し消去するDNAの脱メチル化反応に関わる塩基除去修復酵素である。本研究では、特に、細胞周期におけるTDGのSUMO化とユビキチン化と、SUMO修飾を認識してユビキチン化するE3リガーゼRNF4とSUMO化TDGの相互作用の解析に力を入れて解析を行った。その結果、エピゲノム情報の書き換えにおけるSUMOとユビキチン修飾の役割の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Thymine DNA glycosylase (TDG) is a base excision repair (BER) enzyme that interacts with the small ubiquitin-related modifier (SUMO)-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 and functions in the active DNA demethylation pathway. Here we found that the majority of TDG was SUMOylated in cells undergoing mitosis, while both SUMOylated and non-modified TDG were eliminated in cells arrested at S phase. In vitro and in vivo binding analyses revealed that TDG interacted with RNF4 in a SUMOylation-independent manner. In RNF4-depleted cells, both forms of TDG were efficiently degraded, suggesting that RNF4 was not the primary E3 ligase for controlling TDG stability. Our findings would not only be important for understanding posttranslational regulation of TDG but also provide implications for the TDG-RNF4 interaction in BER-driven active DNA demethylation during cell cycle progression.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：SUMO ユビキチン TDG RNF4 塩基除去修復 DNA脱メチル化 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) リジン残基を標的とする翻訳後修飾因子として、ユビキチンとそれに類似する SUMO が知られている。前者はエネルギー依存的タンパク質分解系の一部として発見され、多くの生命現象の制御系として機能し、その発見者たちに 2004 年ノーベル化学賞が与えられた。一方、後者の SUMO は細胞核内タンパク質に架橋することで、クロマチンや核の構造と機能を変換することが知られている (Melchior, Nat Rev Mol Cell Biol, 2007)。申請者は SUMO の発見当初から一貫して SUMO 修飾が関与する生命現象に着目した研究を展開してきた。

(2) 本研究で着目する Ring Finger 4 (RNF4) は真核生物で高度に保存されている RING 型ユビキチンリガーゼで、ヒトやマウスでは精巣と脳で高発現している。SUMO 化タンパク質をユビキチン化し、その安定性を制御すると考えられている (Hay et al., Nat Cell Biol, 2008; Martin et al., EMBO J, 2009)。申請者は、この因子を SUMO-2/3 をベイトとしたマウス精巣ライブラリーの酵母 2 ハイブリッド解析から独自に得て、その機能解析を行ってきた。ごく最近、このタンパク質が Thymine DNA glycosylase (TDG) と複合体を形成し、ゲノムワイドの DNA 脱メチル化に関わることが報告された (Hu et al., PNAS, 2010)。DNA のメチル化修飾は、転写制御やゲノムインプリンティングおよび発生分化の調節に深く関わり、その破綻はエピゲノム制御系を攪乱し、がんや発達障害を促す (Reik, Nature, 2007; Feinberg, Nature, 2007)。動物細胞では、DNA メチル化は CpG 配列の 5C で生じ (5mC)、メチル基を転移する酵素群 (DNMTs) によるメチル化反応とメチル基を離脱させる脱メチル化反応により、5mC の量と質(場所)が厳密に制御される (Esteller, Nat Rev Genet, 2007)。こうした酵素群の活

性調節の研究はエピゲノム制御の理解に重要で、動物細胞では、DNMTs に関する研究が大きく貢献している (Goll et al., Trends Genet, 2009; Wu and Zhang, Nature Rev, 2010) があるが、DNA 脱メチル化制御についての統一的な見解は得られていないのが現状である。ごく最近、米国の Schultz と Wu の研究グループにより、ヒト細胞を用いて、メチル化プロモーター活性の解除を指標とした DNA 脱メチル化因子の大規模なスクリーニングが行われ、前述した RNF4 ユビキチンリガーゼと TDG の複合体がその候補因子として同定された (Hu et al., PNAS, 2010)。これにより、国内外で、RNF4-TDG と 5mC 特異的な因子とが協調する G:T 不対塩基の導入と、それを除去する反応系、およびその反応系を中核とするエピゲノム制御ネットワーク(ヒストン修飾や転写・複製との関わり)に焦点が集まっている。

2. 研究の目的

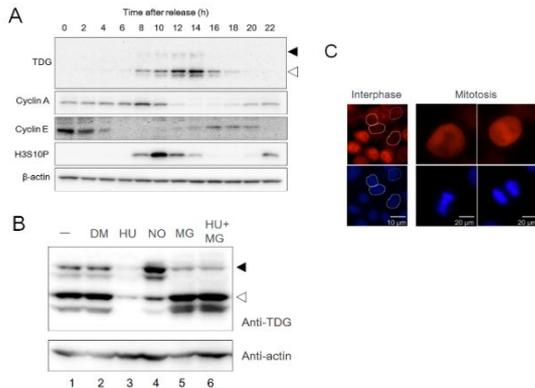
自身の研究実績と国内外の研究状況から、RNF4 の機能解析と TDG の SUMO 修飾、および RNF4-TDG 複合体の研究は時機を得たものであり、研究の遂行は急務と考えた。そこで、I) TDG の SUMO とユビキチン修飾による機能制御、II) RNF4-TDG 相互作用の制御解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

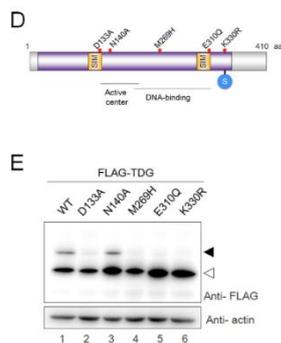
申請者の研究室ですでに確立している分子生物学 (遺伝子クローニングと塩基配列の改変による変異体の作製、大腸菌体内における離婚美男とタンパク質の発現、ヒト培養細胞内での過剰発現による Gain-of-Function の解析と siRNA による Loss-of-Function の解析) や生化学的手法 (プルダウン法とプロテオミクス解析)、および細胞イメージング等の手法を用いた。

4. 研究成果

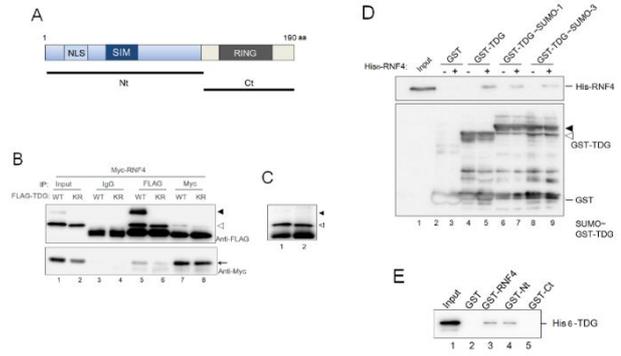
細胞周期における TDG の量的および質的な変動を解析して、S 期においてユビキチンプロテアソームシステムにて分解されることを明らかにした。また、M 期においては SUMO 化 TDG の蓄積が観察され、細胞周期における TDG の制御の一端を明らかにした。



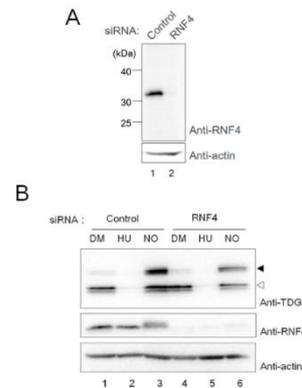
TDG の変異体を作製して細胞内での SUMO 化の状態を解析したところ、各ドメインの変異体に特徴的な SUMO 化の様子が観察された。このことは TDG の SUMO 化がクロマチンとの相互作用に関連することを示唆するものと考えられた。



RNF4 と TDG の相互作用を in vitro と in vivo において解析したところ、これらの 2 者のタンパク質が SUMO に非依存的に相互作用していることが明らかとなった。



最後に、RNF4 の siRNA ノックダウン細胞を用いて TDG の分解および SUMO 化の状態を解析したところ、RNF4 の有無によらずに TDG の安定性と SUMO 化が観察された。このことから、TDG の分解および SUMO 化に RNF4 が関与する可能性が低いことが示唆された。



* 紙面の都合上、詳細は省いてある。研究成果のほとんどはすでに Moriyama et al. BBRC, 2014 に発表しているのので、詳細はそちらを参照のこと。

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] (2 件)

SUMO-modification and elimination of the active DNA demethylation enzyme TDG in cultured human cells. Moriyama T, Fujimitsu Y, Yoshikai Y, Sasano T, Yamada K,

Murakami M, Urano T, Sugasawa K, Saitoh H.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 May
9;447(3):419-24. doi:
10.1016/j.bbrc.2014.04.004. (査読あり)

Role of RNF4 in the ubiquitination of Rta of
Epstein-Barr virus. Yang YC, Yoshikai Y, Hsu
SW, Saitoh H, Chang LK. J Biol Chem. 2013
May 3;288(18):12866-79. doi:
10.1074/jbc.M112.413393. (査読あり)

[学会発表] (11 件)

分子生物学会 (神戸ポートアイランド)
2013 年 12 月 03-06 日 2P-0151 森山 大
志, 浦野 健, 菅澤 薫, 斉藤 寿仁 :
DNA 脱メチル化酵素 TDG の SUMO 化
修飾による機能制御

分子生物学会 (神戸ポートアイランド)
2013 年 12 月 03-06 日 2P-0152 梶田
実紗妃, 森山 大志, 村上 真隆, 斉藤
寿仁 : 塩基除去修復反応で DNA 脱メチ
ル化を制御する DNA グリコシラーゼ
TDG の機能ドメインの解析

第 7 回日本エピジェネティクス研究会
(奈良県新公会堂) 2013 年 05 月 30-31
日 P-54: DNA 脱メチル化因子 Thymine
DNA Glycosylase (TDG) の SUMO 修飾
による機能制御 : 森山大志、浦野健、
菅澤薫、斉藤寿仁

Taishi Moriyama, Masayuki Saito, Yushi
Yoshikai, Koji Yamada1, Kotaro
Hashiguci, Takeshi Urano, Kaoru
Sugasawa, and Hisato Saitoh :

Characterization of epigenetic chromatin
regulators that interact with SUMO:

Toward elucidating roles of SUMO
modification in 3R、The 8th 3R

Symposium, Nov. 25-28, 2012、淡路国際
会議場

第 85 回日本生化学会(福岡国際会議場、

マリンメッセ福岡) 2012 年 12 月 14-16
日 3P-221(3T18-04) 吉開 裕司, 森山
大志, 藤光 由佳, 笹野 貴司, 立石 智,
菅澤 薫, 浦野 健, 岩井 一宏, 斉藤 寿
仁 : SUMO 認識型ユビキチンリガーゼ
RNF4 による TDG グリコシラーゼを含
む DNA 脱メチル化酵素複合体の機能
制御 Elucidation of a linkage between
Ubiquitin E3 Ligase RNF4 and a
component of the Thymine DNA
Glycosylase TDG-containing DNA
demethylation complex

第 85 回日本生化学会(福岡国際会議場、
マリンメッセ福岡) 2012 年 12 月 14-16
日 3P-740 森山 大志, 浦野 健, 菅澤
薫, 斉藤 寿仁 : DNA メチル化酵素
Thymine-DNA Glycosylase (TDG) の
SUMO 化修飾による機能制御

Regulation of the DNA-Demethylation
Enzyme Thymine-DNA Glycosylase
(TDG) by SUMO

第 35 回日本分子生物学会(福岡国際会
議場、マリンメッセ福岡) 2012 年 12
月 11-14 日 1P-0182 : DNA 脱メチル
化因子 Thymine-DNA Glycosylase
(TDG) の SUMO 修飾による機能制
御: 森山 大志, 浦野 健, 菅澤 薫, 斉藤
寿仁

第 6 回日本エピジェネティクス研究会
(東京学術総合センター) 2012 年 05
月 14-15 日 PB22 森山大志、菅澤薫、
浦野健、斉藤寿仁「脱メチル化因子 TDG
の SUMO 化修飾と分解による機能制
御」

第 84 回日本生化学会(京都国際会
館)2011 年 9 月 21 - 24 日 4T16p-6 (ポ
スター4P0396) : 吉開裕司、藤光由佳、
笹野貴司、立石智、菅澤薫、浦野健、
岩井一宏、斉藤寿仁「SUMO 認識型ユ
ビキチンリガーゼ RNF4 による TDG を

含む DNA 脱メチル化複合体の解析」
第 34 回日本分子生物学会 (パシフィコ
横浜)2011 年 12 月 13 - 16 日 森山 大志,
浦野 健, 菅澤 薫, 斉藤 寿仁

「Regulation of active DNA
demethylation enzyme, the thymine DNA
glycosylase TDG, by SUMOylation and
ubiquitinylation」演題番号 4T6pI-3 (16
日) and 3P-0066 (15 日)

第 5 回日本エピ研 (KKR ホテル熊本)
2011 年 5 月 19 - 20 日 藤光由佳, 笹野
貴司, 立石 智, 菅澤 薫, 浦野 健, 岩
井 一宏, 斉藤 寿仁 “SUMO 認識型ユビ
キチンリガーゼ RNF4 による TDG グリ
コシラーと DNA 脱メチル化の制御”

〔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

<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

該当なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者

菅澤 薫 (SUGASAWA Kaoru)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教
授

研究者番号 : 70202124