

研究主論文抄録

論文題目 DNA複製部位における Chromatin Assembly Factor 1 の p150 サブユニットと SUMO2/3 の相互作用に関する研究

(The p150 subunit of CAF-1 Causes Association of SUMO2/3 with the DNA Replication Foci)

熊本大学大学院自然科学研究科 理学 専攻 生命科学 講座
(主任指導 齊藤 寿仁 教授)

論文提出者 宇和田 淳介
(by Junsuke Uwada)

主論文要旨

Small ubiquitin-related modifier (SUMO) はユビキチン様の翻訳後修飾因子である。SUMO は基質タンパク質にイソペプチド結合すると共に、他のタンパク質と非共有結合的に相互作用することで、局在性や複合体形成といったタンパク質間相互作用ネットワークの形成に寄与している。現在、ヒトを含む高等動物では SUMO1 と、お互いに高い相同性のある SUMO2 と SUMO3 の3つのサブファミリーが知られている。

Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) は、p150、p60、p48 の3つのサブユニットからなり、DNA複製過程と共役してヒストン H3-H4 を DNA 上に運び込むことでクロマチンの再構築に関与するヒストンシャペロンである。その中でも p150 サブユニットは DNA ポリメラーゼの補助因子である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に加え、ヘテロクロマチン構成因子の heterochromatin protein 1 (HP1)、メチル化 DNA 結合タンパク質の methyl-CpG-binding domain protein 1 (MBD1) とも相互作用することでヘテロクロマチン高次構造の維持にも関与する高等多細胞生物の発生に必須の分子である。

当研究室で行われた SUMO3 をベイトとした酵母2ハイブリッド法による SUMO 相互作用因子の探索において CAF-1 の p150 サブユニットが見出された。SUMO 修飾とクロマチン構造の関わりについては近年盛んに研究されているが、CAF-1 の制御する DNA 複製後のクロマチン再構築における SUMO 修飾の意義についてはこれまで明らかになっていなかった。そこで SUMO 修飾とクロマチン複製を関連付ける因子として CAF-1 p150 に注目し研究を進めた。

はじめに、CAF-1 p150 と SUMO との相互作用について *in vitro* の結合実験を行った。その結果、SUMO1 に比べ、SUMO2/3 に高い特異性があることが明らかとなった。続いて、SUMO2/3 との相互作用に必須な領域、SUMO interacting motif (SIM) が CAF-1 p150 の N 末端 98~105 アミノ酸であることを特定した。この領域は分裂酵母からヒトに至る真核

生物間で広く保存されており、p150 と SUMO2/3 の相互作用の機能的な重要性が示唆された。次に、CAF-1 p150 を恒常的に発現するヒト胎児腎組織由来 293S 細胞 (NFH-p150 293S 細胞) を使用し、SUMO2/3 が CAF-1 p150 と S 期を通して DNA 複製部位で共局在すること、更に免疫沈降法により、複数の SUMO 化タンパク質が CAF-1 p150 と相互作用していることを確認した。また、CAF-1 p150 を siRNA 発現プラスミドでノックダウンした NFH-p150 293S 細胞では、DNA 複製部位における SUMO2/3 の局在が消失することを示し、SUMO 相互作用領域の変異体 CAF-1 p150 (I99A) を発現させた細胞でも同様の結果を得た。これらは、*in vivo* における p150 と SUMO2/3 の相互作用を示すもので、細胞内で CAF-1 p150 が SUMO-SIM 相互作用を介して SUMO 化タンパク質を DNA 複製部位に運び込んでいることを示唆している。

CAF-1 p150 の SIM 依存的に DNA 複製部位に運び込まれるタンパク質を探索したところ、SUMO の E3 リガーゼとして知られる zinc finger MIZ domain-containing protein 1 (Zimp10) を見出した。更に Zimp10 は自身が SUMO 修飾を受け、N 末端 138 アミノ酸を欠失すると SUMO 化を受けなくなる特性があることを示し、この SUMO 化を受けない変異体では CAF-1 p150 との共局在が見られなくなることを明らかにした。このことから CAF-1 p150 と Zimp10 を介して DNA 複製と連動した SUMO 修飾が起こっている可能性が示唆された。また、SUMO 化基質である MBD1 や SUMO 相互作用タンパク質のヘテロクロマチン関連タンパク質 MCAF1 (MBD1-containing chromatin-associated factor 1)、ヒストン H3K9 メチル化酵素 SETDB1 (SET domain bifurcated 1) が CAF-1 p150 と共局在することも観察した。更に、脱 SUMO 化酵素 SENP2 を過剰発現させることで核内の SUMO 化を非 SUMO 化状態に不均衡化した場合、CAF-1 p150 と共局在する SUMO2/3 の量が減少し、S 期後期のヘテロクロマチンの複製の進行に遅延が見られることが分かった。これらの結果から、DNA 複製の際、メチル化 DNA とヒストン H3 メチル化の豊富なヘテロクロマチン構造の維持に、SUMO と CAF-1 p150 の相互作用が深く関わることが考えられた。

DNA 複製の際、遺伝情報と共に、遺伝子発現の長期的制御に重要なクロマチン構造も適切に複製されることは、個体の発生に必須であり、その破綻は細胞の老化やガン化に繋がる。本研究はヒトを含む高等動物の DNA 及びクロマチン構造の複製制御における翻訳後修飾因子、SUMO の重要性を示し、その分子基盤を理解することに大きく貢献するものと考えられる。