

別紙様式 8

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 核内タンパク質 Nip45 による SUMO 修飾システムの制御に関する研究

熊本大学大学院自然科学研究科

専攻 理学専攻

講座 生命科学コース

(主任指導 齊藤寿仁 教授)

論文提出者 橋口耕太郎

(by Kohtaro Hashiguchi)

主論文要旨

《本文》

Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 2 interacting protein, NFATc2ip (Nip45) は、ヒトやマウスの細胞内で、転写・クロマチン修飾因子やシグナル伝達因子と相互作用することで、免疫応答や細胞の分化制御に関わることが知られているタンパク質である。Small ubiquitin-related modifier (SUMO) は標的タンパク質に架橋 (SUMO 化) し、標的の構造と機能を変化させ、局在や安定性を制御するタンパク質性の翻訳後修飾因子である。Nip45 のカルボキシル末端には SUMO に類似する SUMO-like domain 1 (SLD1) と SLD2 が 2 つ直列して配置し、SLD2 は *in vitro* で SUMO 結合酵素 ubiquitin conjugating enzyme 9 (Ubc9) と相互作用することでポリ SUMO 化と呼ばれる SUMO 分子の重合反応を阻害することが示されている。しかし、Nip45 が細胞内で SUMO 修飾とどのように関わり、細胞の機能や生理をどのように制御するかは不明な点が多い。

マウス精巢の cDNA ライブラリー中から SUMO-3 と相互作用する遺伝子産物を酵母 2 ハイブリッド法で探索したところ、Nip45 の全長をコードする cDNA が検出された。これが端緒となり、Nip45 と SUMO 修飾システムの関連性についての分子レベルでの研究を開始することとなった。まず、大腸菌内で発現させた Nip45 と SUMO のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験で解析したところ、アミノ末端を含む 1~257 アミノ酸領域が SUMO-3 およびポリ SUMO-3 鎖に親和性が高いことが示され、Nip45 が SUMO と直接相互作用する性質を持つことが明らかになった。SLD2 と Ubc9 との相互作用については *in vitro* およびヒト培養細胞内の 2 つ実験系で解析し、いずれにおいても相互作用が確認された。しかしながら、Nip45 の全長と Ubc9 の相互作用は、*in vitro* では検出されたもの

の、細胞内では観察されなかった。これらの結果は、少なくとも標準的な培養条件下においては、定常的に Nip45 が Ubc9 と相互作用して SUMO 化反応を負に制御する可能性が低いことを示している。

Nip45 の細胞内における SUMO 修飾との関わりを解析するために、マウス Nip45 のアミノ末端に DYKDDDDK (FLAG タグ) 配列を融合した FLAG- mNip45 を human embryonic kidney (HEK293) で恒常的に発現する細胞株が樹立された。この細胞株では内在性のヒト型 Nip45 の約 13 倍の FLAG-mNip45 が発現していた。FLAG 抗体を用いて細胞内での局在を観察したところ、大部分のシグナルが核内に検出された。一方、SUMO 化タンパク質の量をウエスタンブロット法で解析したところ、FLAG-mNip45 発現細胞における SUMO 化タンパク質の量は HEK293 のそれと同等で、Nip45 の過剰発現が SUMO 化タンパク質の総量を制限することはないことを示していた。

FLAG-mNip45 発現細胞と HEK293 細胞を SUMO 抗体で染色したところ、抗体で検出される細胞核内シグナルのドットの数に HEK293 のそれよりも有意に多いことが観察された。多くの動物細胞において、SUMO が局在する核内ドットは promyelocytic leukemia bodies (PML ボディー) に一致することを勘案すると、FLAG-mNip45 の過剰発現が SUMO 化タンパク質の PML ボディーへの集積機序、あるいは PML ボディーの形成機序に影響を与えることが示唆された。PML ボディーへの SUMO 化タンパク質の集積に Nip45 が関わる可能性については、プロテアソーム阻害剤である N- (benzyloxycarbonyl) leuciny l leuciny l leucinal (Z-Leu-Leu-Leu-al; MG132) を用いた実験からも示唆された。MG132 はユビキチン化タンパク質ならびに SUMO 化タンパク質の分解を阻害することが知られていることから、この薬剤で処理をすることで SUMO 化タンパク質が細胞内で過剰に蓄積する状況を実験的に作り出すことができる。FLAG- mNip45 発現細胞を MG132 で処理したところ、PML ボディーの多くに FLAG- mNip45 が集積することが観察された。この結果は、細胞内における SUMO 化タンパク質の局在および (あるいは) PML ボディーの形成の制御に Nip45 が関与することを示唆すると考えられた。一方、RNA 干渉法を用いた Nip45 ノックダウンを試みたところ、コントロールの細胞に比べてノックダウン細胞で有意に PML ボディーの形成が阻害することが観察された。これらの結果は、PML ボディー形成の制御に Nip45 が関与する可能性を示唆している。

以上、本研究では機能解析がほとんどなされていなかった哺乳類の Nip45 が、SUMO 化されたタンパク質と相互作用し、SUMO 化タンパク質の細胞内局在や PML ボディーの形成に関与することを明らかにした。こうした Nip45 の新機能は、現在までに報告されてきた多様な Nip45 の生理作用を部分的にはあるが分子レベルで説明することを可能にする。また、実験の過程で樹立された FLAG-mNip45 の恒常的な発現細胞は、今後 Nip45 の機能解析を推進する上で有用な実験材料となることに加え、未だ細胞の増殖やがん化との関連性が十分に説明されていない PML ボディーの形成機序の研究に貢献する。