HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

# A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain



| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-29<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 鈴木, 俊顕<br>メールアドレス:<br>所属: |
|---|---|
| URL | http://hdl.handle.net/10271/1599 |

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

| | | | |
|---|---|---|---|
| 学位記番号 | 医博論第　３２２号 | 学位授与年月日 | 平成１２年　３月２３日 |
| 氏　　名 | 鈴　木　俊　顕 | | |
| 論文題目 | A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain<br>(ウシ脳における新規 30 キロダルトンのユビキチン類似蛋白質 SUMO-1 加水分解酵素) | | |

博士(医学)　鈴　木　俊　顕

**論文題目**

A new 30－kDa ubiquitin－related SUMO－1 hydrolase from bovine brain

(ウシ脳における新規30キロダルトンのユビキチン類似蛋白質SUMO－1 加水分解酵素)

## 論　文　の　内　容　の　要　旨

〔はじめに〕

最近、SUMO－1と呼ばれるユビキチン類似蛋白質が発見され、ユビキチンと同様に修飾分子として機能することが明らかとなった。その後、SUMO－1は様々な蛋白質に共有結合して、核輸送・情報伝達・細胞周期等の制御に関わることが示されている。我々はSUMO－1が前駆体として合成された後プロセシングを受けること、その修飾反応がおそらく可逆性であることに注目し、SUMO－1前駆体のプロセッシングおよび脱修飾反応を触媒する酵素があると考えた。そこで、細胞内においてこれらの反応を触媒すると思われる酵素(脱SUMO－1酵素)について生化学的な解析を行った。

〔方法〕

SUMO－1前駆体プロセシング活性を調べるための基質としてSUMO－1のC末端にPESTcと名付けた約20のアミノ酸残基からなるペプチドを繋いだ基質(SUMO－1－gsPESTc)をつくり、また脱修飾を調べるための基質として、GST－SUMO－1化RanGAP1をつくった。これら基質を用いてウシ脳抽出液中の脱SUMO－1酵素を検出し、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。また、各種プロテアーゼ阻害剤や基質等を用いてその性質を検討した。

〔結果〕

SUMO－1－gsPESTc切断活性は可溶性画分にほぼ単一の活性として検出された。一方、GST－SUMO－1－RanGAP1切断活性は可溶性画分、不溶性画分のいずれにも検出され、可溶性画分の活性の少なくとも一つは、SUMO－1－gsPESTc切断活性と異なる画分に観察された。このうち、細胞質画分のSUMO－1－gsPESTc切断活性を持つ酵素を高度に精製した。この酵素はゲル濾過クロマトグラフィーにより分子量約30kと見積もられた。基質特異性に関しては、ユビキチンやNEED8という二つのSUMO－1と構造的に類似した修飾蛋白質には活性を示さなかった。また、阻害剤を用いた実験からシステインプロテアーゼと考えられた。さらにこの酵素には、GST－SUMO－1化RanGAP1からGST－SUMO－1をはずす活性も検出された。

〔考察〕

脱SUMO－1酵素はほ乳類細胞に複数存在すること、そのうち一つは約30kDaのシステインプロテアーゼであることが証明された。一方、ごく最近出芽酵母のSUMO－1ホモログであるSmt3のプロセッシングおよび脱修飾を担う酵素としてUlp1が同定され、さらにUlp1と構造的に類似したUlp2が報告された。しかし、これらはいずれも70kDaを超えると予想される大きな蛋白質であり、我々が精製した酵素とは別の酵素と考えられる。また、Ulp1と構造が類似した蛋白質をコードしていると予想されるcDNAはヒトにも少なくとも5種類は存在しているので、これら脱SUMO－1を担う酵素はファミリーを形成して

いると推定される。

蛋白質のSUMO－１化修飾を担う酵素系は、現在１種類しか知られていない。このことは100種は越えると予想されているユビキチン修飾経路との大きな違いとなっている。一方、SUMO－１の脱修飾酵素は複数存在することが我々の実験から明らかになった。SUMO－１化修飾を受ける蛋白質が、核輸送に関わるRanGAP１、シグナル伝達に関わるIκBα、細胞質分裂に関わるセプチン等多岐にわたっていることを考えると、脱修飾酵素が複数存在していることは重要な意味を持つと考えられる。

〔結論〕

本研究において、複数のSUMO－１脱修飾活性とひとつの主要なSUMO－１前駆体プロセシング活性がウシ脳に見い出された。このうちSUMO－１前駆体プロセシング活性を持つ酵素は分子量約30kと見積もられ、SUMO－１脱修飾活性も示した。SUMO－１化修飾を受ける蛋白質は多岐にわたった細胞機能に関与している。複数の脱修飾酵素の存在はSUMO－１化修飾の調節を考える上で重要な意味を持つと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

合成された蛋白の翻訳後修飾の代表はリン酸化や糖鎖付加であり、少数例には硫酸化などがある。しかし、近年蛋白質の蛋白質による修飾が見出された。その代表がユビキチン化である。ユビキチン化された蛋白はプロテオソームといわれる巨大蛋白質分解装置に認識され、分解される。最近、SUMO－１やRub１といったユビキチン様蛋白が発見され、ユビキチンと同様に修飾分子として機能することが明らかになった。SUMO－１は様々な蛋白質に共有結合して、核輸送、情報伝達、細胞周期などの細胞機能制御に関わることが示唆されている。

ユビキチン化を触媒する酵素としては、Ｅ１、Ｅ２、Ｅ３が知られており、それぞれ活性化、結合活性、リガーゼ活性の機能を果たしている。申請者は蛋白のSUMO－１化にも同様の酵素が存在することを仮定して、牛脳抽出液からSUMO－１切断酵素と脱SUMO－１酵素の生化学的精製を試みた。方法としては、まずQ－Sepharoseではflow through画分に両活性が見出され、次いで50－75％硫安沈殿画分に回収された。溶解した画分をS－Sepahroseカラムで精製したところ、0.2M NaClと0.4M NaClで溶出される活性を得た。前者は強いSUMO－１切断活性と弱い脱SUMO－１活性をもち、後者は弱いSUMO－1切断活性と強い脱SUMO－１活性を有していた。申請者は、前者を、さらにハイドロキシアパタイトカラムやヘパリンセファロースカラムでさらに精製をかさね、強くSUMO－１切断活性を示す標品を得た。この画分は同時に脱SUMO－１活性を示したことから、一つの酵素がSUMO－１切断活性と脱SUMO－１活性を合わせ持っていることが明らかになった。このようにして精製したSUMO－１切断酵素の分子量を推測するために、Superdex200－pgカラムにかけた結果、分子量は約30kダルトンであることが判明した。また、どのようなタイプの蛋白分解酵素かを検討し、N－ethylmaleimideでは酵素活性が阻害されるが、PMSFやEDTAでは阻害されないことから、thiol proteaseに属するのではないかと推測した。

申請者は、SUMO－１化に関わる酵素の完全精製および遺伝子クローニングの前段階の研究として、牛でSUMO－１切断酵素の存在を明らかにしたこと、また脱SUMO－１酵素は哺乳類に複数存在すること、を示した。これらの成果はSUMO－１化による細胞機能の制御解明への第一歩として高く評価できる。

また、申請者の生化学的研究の進め方は着実であり、信頼性の高いものであると評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

1）SUMO－1化を受ける蛋白質にはどんなものがあるか。
2）一つの酵素でSUMO－1切断活性と脱SUMO－1活性を合わせ持っている意味は何か。
3）酵母で報告されている酵素と異なる根拠は何か。
4）Q－Sepharoseカラムの0.4M NaCl溶出画分をどのように考えるか。
5）今後の予定として、何をするか。

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　三浦直行
副査　小出幸夫　副査　宮嶋裕明