

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30年 5月 1日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 熊本大学大学院先端科学研究部
職 名 教授
研 究 代 表 者 名 斉藤寿仁

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281017)

1. 共同利用研究 課題名	SUMOーユビキチン連携シグナルによるゲノムとプロテオームの品質管理機序の解明 II			
2. 共同利用研究 目的	化学物質や放射線で染色体ゲノムの全体あるいは広域のタンパク質領域に損傷を誘導し、その際に生じる SUMO 化とその後のユビキチン修飾をヒト細胞で解析する。 ゲノムとプロテオームの広域損傷と修復に関わるシグナル伝達の分子基盤と生化学的基盤を明らかにすることで、新規の細胞ストレス応答の制御原理を理解し、保健医療分野における診断や治療技術の開発に貢献する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29年 4月 1日 ～ 平成 30年 3月 31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 斉藤寿仁	熊本大学先端科学研究部	教授	研究の立案・実施・統括	
(分担研究者) 該当なし				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路・ ゲノム機能制御	氏 名	菅澤 薫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281017)

6. 共同利用研究計画

ユビキチン類似の SUMO は、他のタンパク質に架橋することで標的となるタンパク質機能を制御する。化学物質や放射線で刺激した際に頻繁に観察されるタンパク質修飾である。近年、SUMO 化タンパク質が細胞内に蓄積すると、その領域が液体相分離 (phase-separation) で隔離されて、液体ドロップレット様の構造体が形成されることも明らかになっている。

本申請では、「グループ SUMO 化」あるいは「グローバル SUMO 化」と呼ばれる広域損傷に対する SUMO 化反応系に着目する。グループ SUMO 化は、これまでに知られている基質特異性に基づく一般的な SUMO 化反応とは異なり、比較的広範な領域に存在するタンパク質が見かけ上特異性のない形で修飾される反応である。欧米の研究グループが酵母のゲノム DNA に対する化学物質や放射線刺激で研究しているものの、ヒトを含む高等動物細胞での解析は十分なされていない。特に、グループ SUMO 化により損傷部位の相分離やあるいは液体ドロップレット化がどのように生じるのか、その生化学的あるいは細胞生物学的な制御基盤の詳細はほとんど明らかにされていない。加えて、グループ SUMO 化が生じた後には通常ユビキチン化が誘導され、プロテアソームのリクルートが起こるが、こうした SUMO 修飾系とユビキチン-プロテアソーム系の連携機序についても不明な点が多く残されている。

本共同研究では、広範かつ強い外部刺激がどのように受容され、その後、グループ SUMO 化を介してユビキチン-プロテアソーム系に至る SUMO/RNF4/ユビキチン (SRU) 連携シグナルの制御基盤を分子レベルで明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

研究開始の当初は以下の 2 つの実験系 1) および 2) を用いて SUMO/RNF4/ユビキチン (SRU) の細胞内での動態制御の解析を進めていたが、本年度は主に実験系 2) に力を入れて解析を行なった。

1) 化学物質や放射線によって生じる M 期染色体 DNA 損傷におけるグループ SUMO 化と SRU 経路の制御

2) アミノヌクレオシド系抗生物質 Puromycin (Puro) 処理した細胞内における未成熟ポリペプチド鎖の蓄積とグループ SUMO 化と SRU 経路の制御

研究代表者は puromycin の類似体 O-propargyl-puromycin (OP-Puro) を click chemistry で可視化する技術を用い、MG132 の存在下と非存在下で Puro 新生鎖 (未成熟ポリペプチド鎖) の細胞内制御を解析した。その結果、Puro 化新生鎖が SRU 経路の活性化を伴って PML-核内ボディー (PML-NBs) に蓄積することを見出した。PML-NBs の形成にはグループ SUMO 化反応が関わり、PML-SUMO によるタンパク質の集合体形成が、液体ドロップレット形成による液体相分離現象を引き起こすと考えられている。このため、Puro 化未成熟ポリペプチド鎖の PML-NBs への集積にもグループ SUMO 化やその後の液体相分離が関与する制御モデルが考えられた。一方で、PML タンパク質には複数のサブタイプ (スプライシングバリエーション I-VI) が存在することから、これらのどれが未成熟タンパク質の制御に関与するのかを明らかにする必要がある。そのため、サブタイプを過剰発現させた HeLa 細胞を Puro-MG132 で処理することで PML-NBs の形態変化と数の変化について解析をして、どれが未成熟ポリペプチド鎖の集積に関わるのかを解析した。また、核内における変性タンパク質の集積がアミロイド形成を誘導することが指摘されたことから、Puro 化タンパク質が蓄積することでアミロイド形成が誘導される可能性も考えた。このため、アミロイドに特異的な染色試薬により Puro 化タンパク質および PML-NBs の検出を試みた。こうした実験の多くは現在も進行中であるが、本年度においては、Puro 化未成熟タンパク質の検出法を確立して、PML-NBs と SUMO 化との相関、そしてアミロイド形成の可能性を着想して、それに対する検証実験を複数回行い、SRU 経路が関わる新たなシグナル経路を解析できたと考えている。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを 1 部提出してください。)

該当無

*共同研究者の菅澤博士との共著として現在、論文を執筆中

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

前年度からの 2 年間に及ぶ当該研究助成による研究成果をもとに科学研究費基盤 B に申請したところ、平成 29 年度に採択された (研究代表者: 斉藤寿仁)。