

タンパク質の翻訳後修飾

タンパク質は生合成された後、リン酸化、糖鎖付加、脂質付加、メチル化、アセチル化などによって翻訳後修飾され、これらの修飾によってタンパク質の機能や活性が調節されている。高等生物では、遺伝子配列に基づき合成されたタンパク質が直接機能を発揮することは少なく、その多くは前述したような種々の翻訳後修飾を受けることでそのタンパク質の機能に多様性が生まれる。また近年では、ユビキチンや SUMO のようなポリペプチドによるタンパク質への修飾が、タンパク質分解、DNA 修復、翻訳調節、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わることが明らかになってきている。

ユビキチン[1]

ユビキチンはアミノ酸 76 個からなる真核生物において進化的に保存性の高いタンパク質で、長短 2 個の α ヘリックス構造と 5 個の β シート構造が $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ の順に配位した立体構造を持つ。ユビキチンによる翻訳後修飾は、E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)及び E3(ユビキチンリガーゼ)の連続的な酵素反応により、標的タンパク質のリシン残基にユビキチンが共有結合(ユビキチンの C 末端のカルボキシル基と標的タンパク質中のリシン残基の ϵ -アミノ基間のイソペプチド結合)することによって起こる。さらに、上記の酵素反応によって、ユビキチンのリシン残基に新しいユビキチンが結合、この反応の繰り返しによってユビキチンが鎖状につながったポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチンには 7 つの Lys 残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)が存在し、これら全ての残基からポリユビキチン鎖を形成することができる。特に K48 を介したポリユビキチン鎖はもっとも有名で、被修飾タンパク質は選択的にプロテアソームによって分解される。この他にも、K63 を介したポリユビキチン鎖はエンドサイトーシス、DNA 修復、キナーゼの活性化などに関与することが知られている。一方でモノユビキチン化は、リソソーム、液胞への細胞内輸送や、ヒストンにおける転写制御等に関わっている。このように、ユビキチンの生体内での働きはミスフォールドタンパク質や不要となったタンパク質などの分解を始めとして、多岐にわたっている。

ユビキチン化システム[1]

1. ユビキチン活性化酵素(E1)

ユビキチンの E1 は分子量約 110kDa の単量体であり、すべての真核生物において 1 種類だけ存在する。この E1 は、ATP 依存的にユビキチン C 末端の Gly76 のカルボキシル基と E1 の活性中心 Cys 残基との間に高エネルギーチオエステル結合を形成する。

2. ユビキチン結合酵素(E2)

E1 によって活性化されたユビキチンは、その活性中心の Cys 残基に E1 からユビキチンが転移され、E1 と同様にチオエステル結合を形成する。E2 は出芽酵母で 13 種、ヒトでは約 30 種存在し、その分子量は約 15-30K である。

3. ユビキチンリガーゼ(E3)

ユビキチンと結合した E2 は E3 の活性中心と結合し、ユビキチンは E3 と結合している標的タンパク質の Lys 残基と結合する。この E3 はその活性中心の特徴から、HECT 型、RING 型、U ボックス型に大別できると考えられる。HECT 型 E3 はユビキチンと E2 を結合する HECT ドメインと、基質と結合するタンパク質-タンパク質結合ドメインが存在し、HECT ドメインを介してユビキチンを基質へ転移させる。その他の型では、E3 は E2 と標的タンパク質の双方に結合し、両者を近傍に配置することでユビキチンの E2 から標的タンパク質への移動を触媒すると考えられている。また、RING 型 E3 には単量体型と、Cullin 型 E3 とよばれるような複合体を形成する一群がある。このように、E3 は E1, E2 と比較して非常に多くの種類が存在するため、E3 がユビキチンの多様な役割を保証する鍵因子であると考えられている。

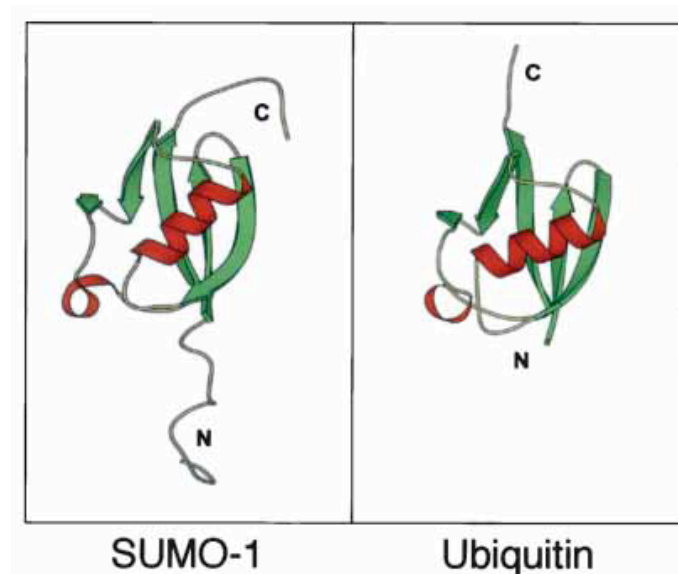
4. 脱ユビキチン化酵素

上述したように、E1, E2, E3 によって一連のユビキチン化反応がおこるが、この逆反応を触媒する酵素が存在し、脱ユビキチン化酵素と呼ばれている。脱ユビキチン化酵素はこれまで、UCH, UBP/USP の 2 つのグループに分類されてきた。UCH は前駆体ユビキチンから成熟型ユビキチンを生成する。一方で、UBP/USP は UCH と同じ活性に加え、ユビキチン化タンパク質からユビキチンを外したり、フリーのポリユビキチン鎖をユビキチン分子へと戻したりする活性を持つと考えられている。最近では、これらの他にも新たに 3 つの脱ユビキチン化酵素のグループが見つかってきており、脱ユビキチン化酵素の生体内での機能の多彩さを示唆している。

SUMO[2, 3]

SUMO(Small ubiquitin-related modifier)とは、真核生物において高度に保存されている、ユビキチンの構造によく似たタンパク質修飾因子である。しかしながらそのアミノ酸配列の相同性は約 20% しかなく、分子の表面電荷も大きく異なる。また、機能もユビキチンとは異なり、ユビキチン化されたタンパク質は主にプロテアソームによって分解される一方、SUMO によるタンパク質の修飾は、標的タンパク質の核への局在やその安定化、クロマチン構造制御、転写調節、DNA 修復など、被修飾タンパク質に応じて様々な細胞機能調節を引き起

こすことが示されている。



SUMO とユビキチンの構造([2]より引用)

ヒト SUMO1 とユビキチンの立体構造を示す。お互いに非常によく似た構造を持っているが、ユビキチンにない SUMO の特徴として N 末端側のアミノ酸の伸長があげられる。

SUMO ファミリー[4-7]

前述したように、SUMO とは、ユビキチンと構造が類似している、約 10kDa のタンパク質である。真核生物には SUMO が高度に保存されており、酵母や線虫、ショウジョウバエでは 1 種類、ヒトでは 4 種類(HsSUMO1-4)、そしてシロイヌナズナでは 8 種類(AtSUMO1-8)の SUMO 遺伝子がコードされている。また、これらの SUMO アイソフォームには、個体内で一様に発現しているものや、器官・部位特異的に発現するものが存在することが明らかとなっており、それぞれの SUMO アイソフォームの使い分けや機能差が示唆されている[8-10]。

SUMO 化修飾

SUMO 化修飾は、RanGAP1 と呼ばれる核膜孔を構成するタンパク質で初めて報告された[11]。この RanGAP1 とは、RanGTPase の活性化因子であり、核膜孔を介したタンパク質輸送に必須である Ran の活性を制御する。このタンパク質輸送のため、RanGAP1 は RanBP2 と相互作用し、核膜孔複合体の細胞質側に局在化するが、この局在に RanGAP1 の SUMO 化が必須であることが明らかとなった[1]。また、DNA 中の G-T、G-U ミスマッチ変異を修復するチミン DNA

グリコシラーゼ(TDG)と SUMO との結合は、TDG の構造を変化させることで DNA からの解離に働き、修復反応を終了させるために必要であることが報告されている[12]。これらの他にも、SUMO 基質タンパク質は数百件報告されており、SUMO 化修飾による基質タンパク質の局在変化や構造変化、それに伴う機能の変化などの意義や重要性が理解されてきている[2, 3]。

SUMO 化システム[2-4, 6, 7]

1. SUMO 活性化酵素(E1)

SUMO 化経路における E1 は 2 つのサブユニット、SAE1 及び SAE2 のヘテロダイマーからなる。まず、E1 は ATP 依存的に SUMO の C 末端 Gly 残基のカルボキシル基をアデニル化する。その後、このカルボキシル基は SAE2 の Cys 残基の SH 基とチオエステル結合を形成する。

2. SUMO 結合酵素(E2)

SAE と結合した SUMO は、次に E2 である SCE の Cys 残基と結合する。他のユビキチン様タンパク質の E2 にはない SUMO の E2 の特徴は、基質を認識し、基質と結合させることができるということであり、SCE-SUMO 間のチオエステル結合は SUMO の C 末端カルボキシル基と基質のリシン残基の ϵ -アミノ基との間でイソペプチド結合を形成させることができる。この SUMO と結合する Lys 残基は SUMO 化コンセンサス配列内にあることが多い ψ KxE。しかしながら、このように SUMO 化コンセンサス配列の存在は明らかになっているものの、すべてのタンパク質が SUMO 化コンセンサス配列で SUMO 化されるわけではなく、この配列が絶対的なものではない。

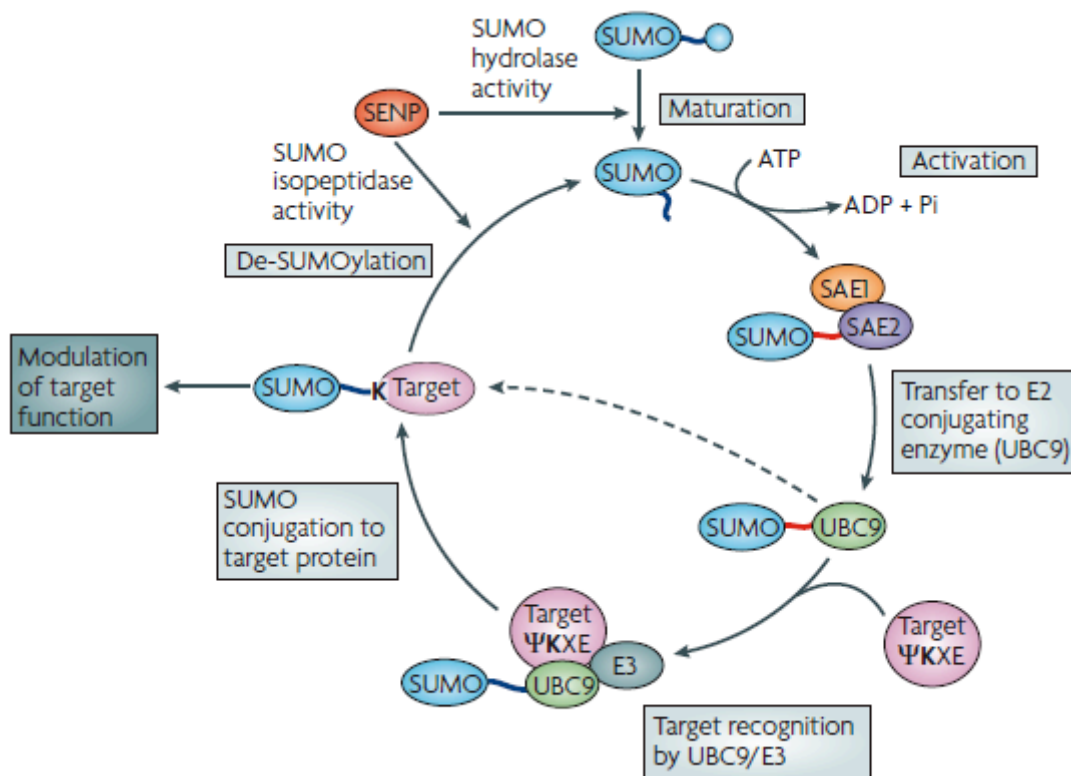
3. SUMO リガーゼ(E3)

上述したように、タンパク質の SUMO 化修飾は E1 及び E2 のみで行われることが示されていたため、SUMOE3 リガーゼの存在は明らかになっていなかった。しかし、E1, E2 以外に SUMO 化システムを構成する物質、SUMOE3 リガーゼが存在することが発見された。初めて SUMO リガーゼとして発見されたのが Siz タンパク質である。この Siz タンパク質の変異体では、SUMO 化が大きく減少した。更に、ヒトにおける *in vitro* の研究では、SUMO2、SUMO3 は E1 及び E2 のみでポリ SUMO 鎖が形成されるが、SUMO1 は E3 リガーゼが存在しないとポリ SUMO 鎖の形成はおこらないことが報告されている。また E3 リガーゼは、SUMO 化の促進だけではなく、コンセンサス配列内にはない Lys 残基の認識と SUMO 化を行っているとも考えられ、基質の SUMO 化の促進や認識に重要な働きをしていると考えられる。

4. SUMO 特異的プロテアーゼ

他のユビキチン様タンパク質と同様、SUMO は前駆体として合成され、C

末端側のペプチドが切り出され、Gly 残基が露出して初めて基質タンパク質と結合できる成熟型となるが、このプロセッシングは、ペプチダーゼ活性を持つ SUMO 特異的プロテアーゼが行っている。また、SUMO 化は可逆的な修飾であり、基質から SUMO を脱修飾する場合にもイソペプチダーゼ活性を持つ SUMO 特異的プロテアーゼが働いている。この SUMO 特異的プロテアーゼは酵母に 2 つ存在し、それぞれ Ulp1, Ulp2 と呼ばれている。また、哺乳類には SENP1-7 の 7 つが存在している。これらの SUMO 特異的プロテアーゼはそれぞれ局在が異なり、Ulp1 は核膜孔、Ulp2 は核内、また、SENP1, 3 は核内、SENP2 は細胞質、核内、核膜孔に存在する。Ulp1, Ulp2 のどちらかを欠損させた酵母株を用いた実験では SUMO 化修飾のパターンが異なるという結果が出ている。これらのことから、それぞれの SUMO 特異的プロテアーゼは別々の基質を認識し、脱修飾する SUMO 化タンパク質の選択に重要な働きをしていると考えられている。



SUMO 化経路([7]より引用)

生物によってさまざまな種類の SUMO アイソフォームが存在するが、全て前駆体の形で発言する。これらの前駆体はまず SUMO 特異的プロテアーゼのペプチダーゼ活性により C 末端側が切断され、成熟型となる。その後、ATP 依存的に活性化され、SAE と結合する。続いて活性化された SUMO は SCE と結合する。SCE は直接標的タンパク質を認識し、SUMO を標的タンパク

質のリシン残基への結合を触媒することができる。また、SCEがE3リガーゼと結合し、共同して標的タンパク質を認識し、SUMOを標的タンパク質に結合する経路も存在する。最後に、標的タンパク質のSUMO化修飾の必要がなくなった時には、SUMOはSUMO特異的プロテアーゼのイソペプチダーゼ活性によって標的タンパク質と分離される。

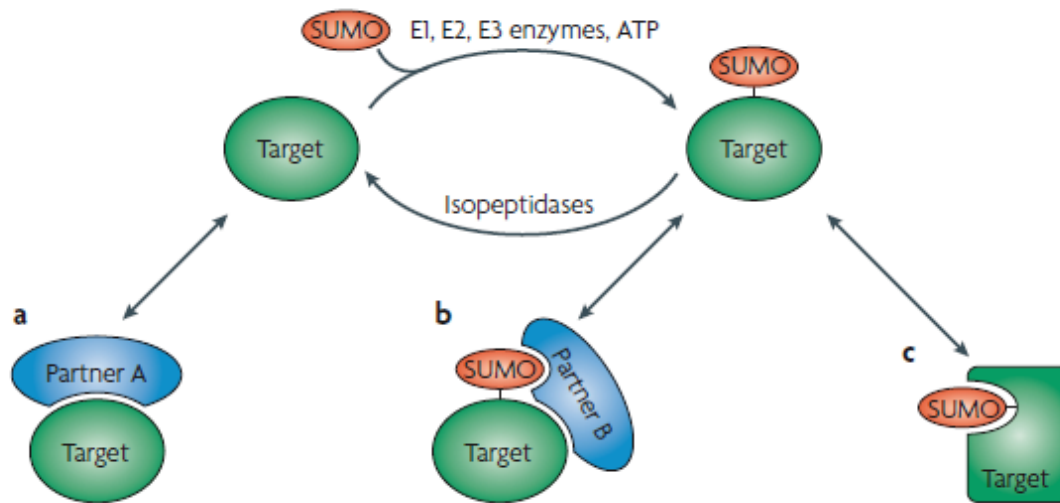
SUMO interacting motif [2, 6, 7, 13, 14]

前述したように、TDGのDNAとの結合能の消失はTDGの構造変化によるものであるが、この構造変化はTDGへのSUMO化と共に、SUMOとの非共有結合が調節していることが示された。近年、このようなSUMOと非共有的に結合するタンパク質に、疎水性の短い配列が存在することが明らかとなった。この配列はSUMO interacting motif(SIM)と呼ばれ、TDGのようにSUMOとの共有結合と共にSIMを介した結合によって、SUMO依存的な機能の変化が起きたり、ほかのタンパク質との新たな相互作用を生みだしたりするものだと考えられている。

現在、SIMは哺乳類と出芽酵母において4種類が報告されている。現在までに発見されているSIMには疎水性アミノ酸コアが含まれ、そのN末端側やC末端側に酸性アミノ酸残基やSer残基が隣接していることが多く、この酸性アミノ酸残基はSUMOとの相互作用に、Ser残基はリン酸化を通してSUMOとの結合を調節していると考えられている。また、SUMOは α 1-helixに存在するフェニルアラニンやイソロイシンと β 2-strandに存在するロイシン等の疎水性アミノ酸残基が主にSIMとの相互作用に関与している。また、 α 1-helixと β 2-strandとの間のターン構造中には正電荷を帯びたアミノ酸が存在しており、SIMの酸性アミノ酸残基と相互作用している。

- A**
1. [V/I]-[V/I]-S-X-[S/T]-[D/E]-[D/E]-[D/E]
 2. [V/I]-X-[V/I]-[V/I]-[V/I]
 3. K-X₍₃₋₅₎-[I/L]-[I/L]-[I/L]-X₃-[D/E/Q/N]-[D/E]-[D/E]

B



SIM と SUMO 化/SIM を介した結合による標的タンパク質への影響([6]より引用)

A. 現在までに報告されている SIM。バリン残基やイソロイシン残基等の疎水性アミノ酸が集中しているほか、アスパラギン酸やグルタミン酸が多く隣接している。

B. SUMO による標的タンパク質の修飾の意義。 a.SUMO による標的タンパク質の修飾によって、標的タンパク質に結合する因子(Partner A)との結合が阻害される。この図では標的タンパク質がSUMO化されていないため、標的タンパク質と Partner A が相互作用している。 b.逆に、SUMO による標的タンパク質の修飾によって標的タンパク質と相互作用する因子(Partner B)との相互作用を導く場合もある。この図では、標的タンパク質がSUMO化された後、SIM を介してSUMO と Partner B とが相互作用しその結果標的タンパク質と Partner B とが相互作用している。 c.また、SUMO による修飾が標的タンパク質の構造変化を引き起こす場合がある。標的タンパク質がSUMO とSUMO化及びSIM を介した結合をすることによって(2か所で結合することによって)、構造に変化が起きる。

シロイヌナズナについて[15, 16]

シロイヌナズナはユーラシア原産の冬期一年生のアブラナ科植物であり、日本を含む世界中の温帯および亜寒帯に分布している。シロイヌナズナは、ゲノムサイズが小さく、また、実験室内で栽培可能な小型の植物であること、生活環が1~2ヶ月と短いこと、形質転換が容易であることなど、遺伝学、分子生物学におけるモデル植物として扱いやすい。また、2000年には高等植物で初めて全ゲノム塩基配列の解読が完了するとともに遺伝子破壊株や完全長 cDNA など研究基盤となるリソースの整備が進んでおり、研究材料として際立った優位性を持つに至っている。表にモデル植物としてのシロイヌナズナの特徴をまとめた。

表 モデル植物としてのシロイヌナズナ

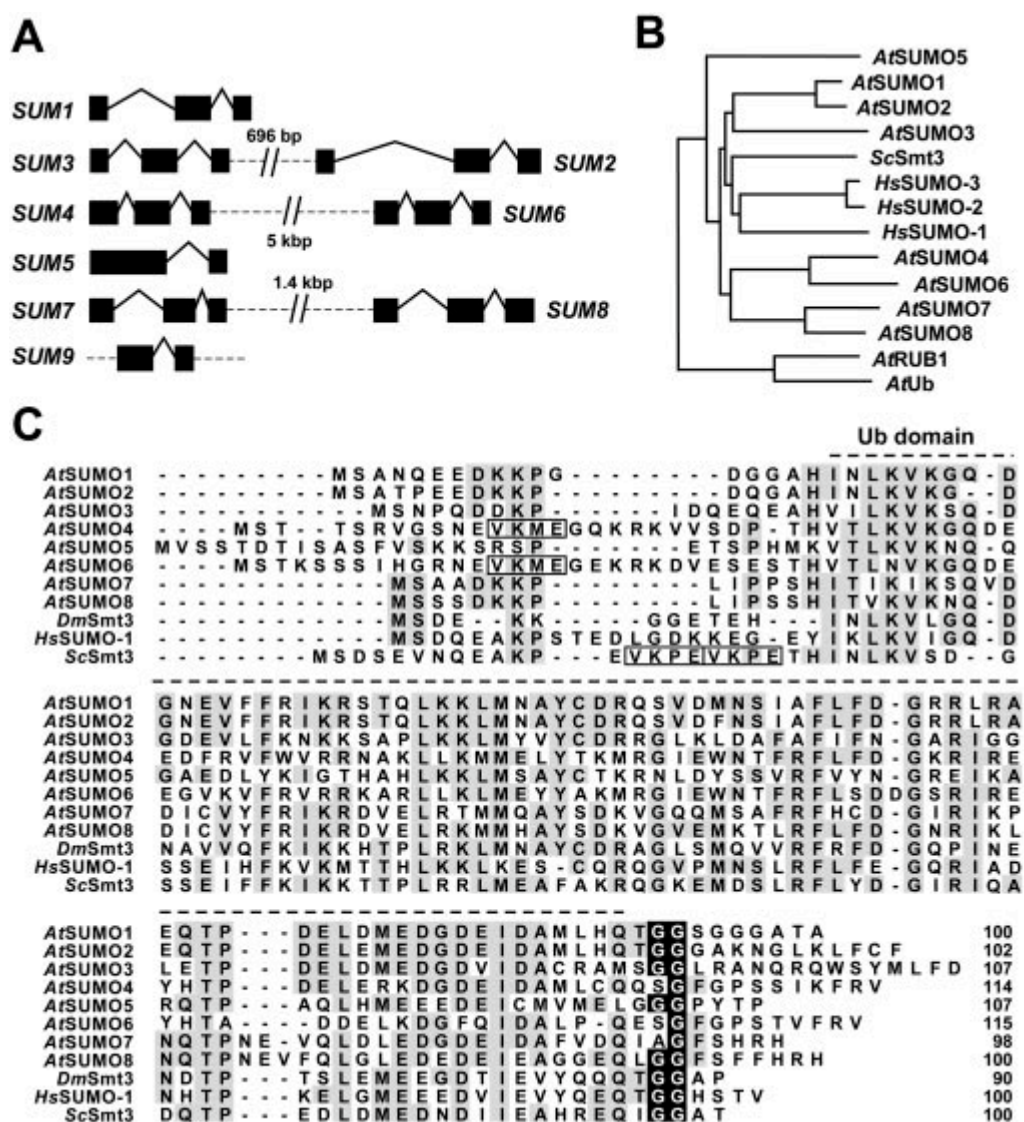
分類	アブラナ科 双子葉
染色体数	2n=10
ゲノムサイズ	125 Mb
推定遺伝子数	27000
世代時間	1~2ヶ月

シロイヌナズナにおける SUMO

植物においても SUMO は存在しており、シロイヌナズナでは 8 つの遺伝子がコードされているが (AtSUMO1-8)、この数は調べられている限り他のどの生物よりも多い[4]。例えば、酵母では 1 つ、ヒトでは 4 つの SUMO 遺伝子がコードされているのみである[17]。また、SUMO1,2 はポリ SUMO 化がみられるほか、AtSUMO4 及び AtSUMO6 には N 末端付近に SUMO 化コンセンサス配列を持ち、ポリ SUMO 化する可能性が示唆されている[5, 18]。これらのシロイヌナズナにおける SUMO ファミリーの多さや、ポリ SUMO 化の可能性、また、各 SUMO の発現量の違いなどから、それぞれの SUMO 分子の特異性について興味を持たれる。また、SUMO 活性化酵素 (SAE) においても他の生物にはない特徴がある。SAE はユビキチン E1 の N 末端側・C 末端側にそれぞれ相同性を持つ SAE1, SAE2 の 2 つのサブユニットからなるが、シロイヌナズナ以外の生物では SAE1 遺伝子は 1 つしかコードされていないのに対し、シロイヌナズナでは SAE1a, SAE1b の 2 つの遺伝子がコードされており、SUMO 化修飾経路や、活性化する SUMO 分子に対する選択性を持っている可能性もある。

シロイヌナズナにおいては SUMO 化修飾や、標的タンパク質についての報告は非常に少ない。しかし、SUMO による修飾や脱修飾が植物ホルモン、開花制御、ストレス応答などを調節しているという多くの報告がある[4]。たとえば、シロイヌナズナの芽生えを用いた実験では、熱、過酸化水素、エタノールなど

のストレスを与えると、SUMO1,2によるタンパク質の修飾が劇的に上昇する[5]。中でも熱ストレスに対する SUMO 化修飾は 2 分以内に始まることから、SUMO1,2 によるタンパク質の修飾は熱ストレスに対する早期応答の一つであると考えられる。また、E3 リガーゼである AtSIZ1 を不活化させると、アントシアニンの蓄積や主根の成長抑制などのリン酸飢餓状態の表現型を示すことが報告されている[19]。このように、植物における SUMO は、ストレス応答やシグナル伝達において重要な役割を果たすことが分かってきているが、実際にそれらのメカニズムが SUMO 化修飾によってどのような影響を受けているのか未解明な部分が非常に多い。



シロイヌナズナにおける SUMO ファミリーの比較([5]より引用)

A. シロイヌナズナ遺伝子中に存在する SUMO 遺伝子ファミリーの模式図。それぞれ、SUM1,

SUM7, *SUM8*, *SUM9* は第 4 染色体上に、*SUM2*, *SUM3*, *SUM4*, *SUM6* は第 5 染色体上に、*SUM5* は第 2 染色体上に存在している。これらのうち、*SUM9* は偽遺伝子であることがわかっている。また、*SUM2* と *SUM3*, *SUM4* と *SUM6*, *SUM7* と *SUM8* は隣接している。

B. シロイヌナズナ *SUMO1-8*, *Rub1*, *Ub* 及びヒト *SUMO1-3*、酵母 *Smt3* のアミノ酸配列を基にした系統樹。この図から、シロイヌナズナにおいては、*AtSUMO1-AtSUMO2*、*AtSUMO4-AtSUMO6*、*AtSUMO7-AtSUMO8* 間のアミノ酸相同性が高いことがわかる。

C. 各タンパク質のアラインメント。□で囲んだ配列は *SUMO* 化コンセンサス配列に類似した部位を示す。シロイヌナズナでは、*SUMO4* 及び *SUMO6* の N 末端側にその配列が存在する。

▲で示した部位はプロテアーゼによって切断されると予想される部位である。図のように、切断後はほとんどの分子で *Gly-Gly* 配列が露出するが、*AtSUMO4* 及び *AtSUMO6* では *Ser-Gly*, *AtSUMO7* では *Ala-Gly* 配列が露出する。

参考文献

1. 田中啓二 and 大隈良典, ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー -作働機構と病態生理. 蛋白質 核酸 酵素. 2006.
2. Gill, G., *SUMO* and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 2004. **18**(17): p. 2046-59.
3. Hay, R.T., *SUMO*: a history of modification. *Mol Cell*, 2005. **18**(1): p. 1-12.
4. Novatchkova, M., et al., *SUMO* conjugation in plants. *Planta*, 2004. **220**(1): p. 1-8.
5. Kurepa, J., et al., The small ubiquitin-like modifier (*SUMO*) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of *SUMO1* and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 6862-72.
6. Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior, Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(12): p. 947-56.
7. Martin, S., et al., Emerging extranuclear roles of protein *SUMOylation* in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(12): p. 948-59.
8. 高村裕介, 卒業論文 シロイヌナズナ新規 *SUMO* 遺伝子の同定及び発現様式の解析, in 理工学部 生命科学科. 2006 年度, 関西学院大学.
9. 野田耕, 卒業論文 シロイヌナズナにおける *SUMO* 遺伝子群の組織特異的発現様式の解析, in 理工学部 生命科学科. 2006 年度, 関西学院大学.
10. Saracco, S.A., et al., Genetic analysis of *SUMOylation* in *Arabidopsis*: conjugation of *SUMO1* and *SUMO2* to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol*, 2007. **145**(1): p. 119-34.
11. Matunis, M.J., E. Coutavas, and G. Blobel, A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the *Ran-GTPase-activating protein RanGAP1* between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1457-70.

12. Baba, D., et al., Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature*, 2005. **435**(7044): p. 979-82.
13. Song, J., et al., Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(40): p. 14373-8.
14. Hecker, C.M., et al., Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*, 2006. **281**(23): p. 16117-27.
15. 島本功, 岡田清孝, and 田畑哲之, 改訂 3 版 モデル植物の実験プロトコール. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ. 2005: 秀潤社.
16. The Arabidopsis Information Resource (TAIR). [cited; Available from: <http://www.arabidopsis.org/>].
17. Lapenta, V., et al., SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics*, 1997. **40**(2): p. 362-6.
18. Colby, T., et al., SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2006. **142**(1): p. 318-32.
19. Miura, K., et al., The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(21): p. 7760-5.