

関西学院大学 研究成果報告

2023年 9月29日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：山本孝治

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	分裂酵母におけるSUMOタンパク質による環状染色体の維持機構の解明
研究実施場所	理工学研究科 田中克典研究室
研究期間	2023年 6月 1日 ~ 2023年 9月30日 (4ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

真核生物のテロメアは、テロメアDNAとそれに結合するタンパク質複合体によって構成されており、染色体末端の分解や融合を防ぐ働きがある。テロメアDNAはグアニンに富んだ反復配列であるG鎖とその相補鎖であるC鎖からなり、その最末端ではG鎖が一本鎖として突出している。テロメアDNAに結合するタンパク質複合体の一つにシェルタリンが知られている。分裂酵母のシェルタリンは6つのタンパク質から構成されていて、テロメアDNAの二本鎖部分に結合するTaz1、テロメアDNAの一本鎖部分に結合するPot1、Taz1とPot1を架橋するRap1、Poz1、Tpz1、そしてTpz1と結合してテロメラーゼをリクルートするCcq1から成る。*pot1*⁻欠損(*pot1Δ*)株では、テロメアDNA配列が完全に消失して全ての染色体が自己環状化した細胞が出現することが知られている。分裂酵母では、他にもテロメア維持に関わる遺伝子の欠損株において染色体の自己環状化が起こることが知られており、環状染色体の生成過程やその維持機構についての研究が進められている。

SUMO (small ubiquitin-like modifier)は、ユビキチンと類似した構造を持つ分子量12 kDa程度のタンパク質であり、標的タンパク質の特定のリジン残基の側鎖にイソペプチド結合することによって標的タンパク質を修飾する。このSUMOによる標的タンパク質の修飾はSUMO化と呼ばれる。分裂酵母において、SUMOは*pmt3*遺伝子によってコードされており、標的タンパク質の一つはシェルタリンのTpz1であることが明らかとなっている。これまでに田中

教授の研究室では、SUMOは環状染色体の生成過程には必要ではないが、生成された環状染色体の維持に重要な役割を果たしていることを示唆する知見が蓄積されていた。しかし、SUMOがどのようにして環状染色体の維持に関わるのか分かっていないため、SUMOによる環状染色体の維持機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

これまでに、*pot1⁺*と*pmt3⁺*の二重欠損(*pot1Δ pmt3Δ*)株は生育不能であることを見出していた。このため、環状染色体を持つ*pot1Δ*株が生育するためには、多数あるSUMOの標的タンパク質のいずれかがSUMO化される必要があると考えられた。そこで、BioID法と呼ばれるタンパク質間の相互作用を検出可能な手法を用いてSUMOの標的タンパク質の同定を試みた。BioID法の概要は以下のとおりである。

まず、ビオチン化酵素を付加したSUMOを細胞内で発現させ、SUMOの近傍に存在するタンパク質をビオチン化させた。次に、細胞から総タンパク質を抽出し、タンパク質分解酵素によってタンパク質をペプチドへと断片化させた。そして、ビオチンと結合するタマビジンを使ってビオチン化したペプチド断片を精製し、質量分析によってどのタンパク質がビオチン化されたのかを同定した。なお、ビオチン化酵素としてはビオチン化活性が高いTurboIDを、タンパク質分解酵素としてはトリプシンを使用した。また、総タンパク質抽出後の操作は外部の研究機関に委託した。

質量分析によって得られたプロテオームデータを解析した結果、736個のタンパク質が同定できた。この中には、SUMO自身とSUMOの標的タンパク質であるTpz1が含まれていたため、本手法が上手くはたらいっており、本手法によってSUMOの標的タンパク質を同定できることが確かめられた。続いて、遺伝子オントロジーエンリッチメント解析を行ったところ、様々なタンパク質複合体にエンリッチしていることが明らかとなり、同定されたタンパク質の多くはタンパク質複合体として機能することが分かった。今回の手法においては標的タンパク質の近傍に存在するタンパク質もビオチン化をうけるため、SUMO化された標的タンパク質が複合体を形成する場合、標的タンパク質と複合体を形成するタンパク質もビオチン化されて同定されている可能性がある。そのため、今回同定できた736個のタンパク質すべてがSUMOの標的タンパク質であるわけではないことが予想された。そこで、分裂酵母のデータベースを検索したところ、SUMO化されると記述されている559個のタンパク質のうち250個が本手法において同定できていた。このことから、今回同定できた736個のタンパク質のうち少なくとも250個はSUMOの標的タンパク質である可能性が高いが、残りの486個については標的タンパク質かどうか今後精査する必要がある。

今回は研究期間が4か月と短かったため、研究課題としていたSUMOによる環状染色体の維持機構の解明までには至らなかった。SUMOの標的タンパク質をコードする遺伝子の欠損は、環状染色体を持つ株において致死となる可能性があるため、今後は今回同定できたタンパク質をコードする遺伝子の欠損が環状染色体を持つ株において致死となるかどうかを調べる必要がある。

その他に実施したこととして、質量分析によって得られたプロテオームデータの解析方法が研究室で確立されていなかったため、今後解析を行う研究室のメンバーたちのために解析手順を書き留めた。そして、その手順書にしたがって田中教授を含むメンバー数名に解析方法を伝授した。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。