

## 最近の研究から

### SUMO-1 修飾された Thymine-DNA Glycosylase(TDG) の結晶構造： TDG における SUMO 修飾依存性の DNA 解離機構

馬場大地<sup>1,2</sup>, 真板宣夫<sup>3</sup>, Jun-Goo Jee<sup>4</sup>, 内村康寛<sup>5</sup>, 斉藤寿仁<sup>5</sup>  
菅澤薫<sup>6</sup>, 花岡文雄<sup>6,7</sup>, 朽尾豪人<sup>1</sup>, 廣明秀一<sup>1</sup>, 白川昌宏<sup>2,8,9</sup>

<sup>1</sup>横浜市・院総合理, <sup>2</sup>京大・院工, <sup>3</sup>九大・院システム生命, <sup>4</sup>NIH/NIDDK, <sup>5</sup>熊本大・発生医研セ・器官制御,  
<sup>6</sup>理研・細胞生理, <sup>7</sup>大阪大・院生命機能, <sup>8</sup>理研・GSC, <sup>9</sup>CREST/JST

### Crystal structure of Thymine-DNA Glycosylase, TDG conjugated to SUMO-1: Mechanism of SUMOylation-dependent TDG dissociation from DNA

Daichi BABA<sup>1,2</sup>, Nobuo MAITA<sup>3</sup>, Jun-Goo JEE<sup>4</sup>, Hiroyasu UCHIMURA<sup>5</sup>, Hisato SAITOH<sup>5</sup>,  
Kaoru SUGASAWA<sup>6</sup>, Fumio HANAOKA<sup>6,7</sup>, Hidehito TOCHIO<sup>1</sup>, Hidekazu HIROAKI<sup>1</sup>, Masahiro SHIRAKAWA<sup>2,8,9</sup>

<sup>1</sup>Yokohama City Univ., Gra. Sch. Integr. Sci., <sup>2</sup>Kyoto Univ., Grad. Sch. Eng., <sup>3</sup>Kyushu Univ., Gra. Sch. Systems Life Sci.,  
<sup>4</sup>LNIH/NIDDK, <sup>5</sup>Kumamoto Univ., Inst. of Embryology and Genetics, Dept. of Regeneration Med., <sup>6</sup>Riken, Discovery Res. Inst.,  
Cell. Phys. Lab., <sup>7</sup>Osaka Univ. Grad. Sch. of Frontier Biosciences, <sup>8</sup>RIKEN, GSC, <sup>9</sup>CREST/JST

#### 1. はじめに

SUMO (Small ubiquitin-like modifier) はユビキチン類似蛋白質の一つであり、ユビキチン化とよく似た一連の酵素反応により標的蛋白質のリシン残基に共有結合を介して付加される。つまり、SUMO とは蛋白質の蛋白質翻訳後修飾因子の一つである。高等哺乳動物では、SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, SUMO-4 の4つのアイソフォームが存在していることが報告されており、ユビキチンに非常によく類似した立体構造を形成している。一方、SUMO-1 はユビキチンと18%の配列相同性しか示さず、表面電荷やSUMOに特異的に存在するN末端テイルなど、その蛋白質表面の性質は大きく異なる。SUMOは標的蛋白質の蛋白質-蛋白質相互作用、蛋白質-DNA相互作用、細胞内局在などを変化させることで、核輸送、転写制御、染色体分離など様々な核内現象に関与している。ユビキチンは主に標的蛋白質を蛋白質分解へと向かわせるマーカーや細胞内輸送のタグとして機能しており、SUMOとの機能重複は知られていない[1-3]。

ユビキチンではUIM, UBAなどのユビキチン結合ドメインを介した蛋白質間相互作用の獲得によって標的蛋白質の機能制御が説明されるのに対して、SUMOでは標的蛋白質ごとに制御様式が多様であることから、SUMO化が被修飾蛋白質の構造変化を介して機能変換を行う可能性が示唆されていたが、仮説の域にとどまっていた。標的蛋白質が数多く報告されているにも関わらず、機能制御機構の解析が困難な理由には、細胞内で特定蛋白質がSUMO化されている割合が低いことが挙げられる。従って、SUMO化による蛋白質の機能変換を解析するには、SUMO化された蛋白質を使った生化学的、構造学的解析が不可欠であ

ると考えた。我々は、大腸菌内あるいは *in vitro* SUMO化系により、大量のSUMO化蛋白質を調製し、その生化学的、構造学的解析を通じてSUMO修飾に伴う機能変化機構を分子レベルで明らかにすることを試み、その解析対象にはTDG (Thymine-DNA glycosylase) を選択した。

TDGは、ゲノムDNA中に生じたG-T(U)ミスマッチを修復する塩基除去修復を開始する酵素として知られている[4]。G-Tミスマッチはメチル化シトシンの脱アミノ化反応によって、生体中で一定の割合で自然発生しており、DNA複製を経てCからTへの変異(C to T transition)を誘起するため、これを修復することは非常に重要となる。TDGはミスマッチ部位の不对塩基を除去するDNAグリコシラーゼ活性を有しており、この活性によってDNAにはAP部位(apurinic / apyrimidinic site)と呼ばれる塩基欠落部位が生じる。*in vitro*に再構築したG-T(U)ミスマッチ修復反応系では、TDGは反応産物であるAP部位に結合して解離しないため、生体中ではTDGをAP部位より脱離させるための機構が存在することが示唆されていた。近年になって、TDGはSUMO-1およびSUMO-2/3による修飾を受けることが報告されており、SUMO修飾されたTDGでは、AP部位への結合活性が著しく減少していた[5]。従って、生体中ではTDGのSUMO修飾は、TDGのDNAからの脱離に機能していると考えられるが、その分子機構の詳細は明らかにされていない。本研究において、我々はSUMO化に伴うTDGの機能変換のメカニズムを分子レベルで明らかにするため、SUMO-1修飾されたTDGのX線結晶解析を行った[6]。

## 2. 実験

### 2.1 蛋白質の発現・精製と結晶化

TDG は、全長では試料の調製と結晶化が困難であったため、プロテアーゼ限定分解によって構造的に安定な領域として残基番号 112-339 までの領域 (以下、TDG 中央領域) を同定し、SUMO 修飾に用いた。また、SUMO-1 化された TDG の調製には大腸菌内 SUMO 化系を使用した [7]。大腸菌内で発現させた SUMO-1 化 TDG は、TDG の N 末端に融合した GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) に対するアフィニティー精製後、プロテアーゼで GST タグを切断した。さらに、陽イオン交換、ゲルろ過カラムによって精製し、結晶化に用いた。

ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化条件のスクリーニングを行った。温度 293K において 25% PEG3350, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M HEPES (pH 8.5) を沈殿剤として使用することで、SUMO-1 化 TDG の結晶が得られた。

### 2.2 結晶構造解析

X 線回折強度データの収集には、PF のビームライン BL-6A ( $\lambda=1.0\text{\AA}$ ) を使用し、分解能 2.1 $\text{\AA}$  のデータを  $R_{\text{merge}}=0.088$  の精度で測定した。SUMO-1 修飾された TDG の構造は、MUG (PDB code: 1MUG) と Smt3 (PDB code: 1EUV) をサーチモデルとした分子置換法で決定した。その後、構造精密化を行い、最終モデルの結晶学的  $R$  値は 20.5% であった。その他の精密化の各統計値は Table 1 に示した。

Table 1 Data collection and model refinement statistics.

	SUMO-1-TDG
Data collection <sup>1</sup>	
Wavelength ( $\text{\AA}$ )	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell dimensions ( $\text{\AA}$ )	$a=42.2, b=70.4, c=106.4$
Resolution ( $\text{\AA}$ )	40-2.1 (2.2-2.1)
No. of observed reflections	366,242 (53,244)
Redundancy	19.0 (19.4)
Completeness (%)	100 (100)
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$	8.0 (2.5)
$R_{\text{sym}}^2$	0.088 (0.35)
Model refinement	
Resolution ( $\text{\AA}$ )	15-2.1
No. of reflections (work / test)	18,182 / 931
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}^3$	0.205 / 0.245
Average $B$ -factor ( $\text{\AA}^2$ )	18.9
Rmsd bond ( $\text{\AA}$ )	0.005
Rmsd angles ( $^\circ$ )	1.24

1. The number in parentheses is for the outer shell.

2.  $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ , where  $I$  is the observed intensity, and  $\langle I \rangle$  is the average intensity from multiple observations of symmetry-related reflections.

3.  $R_{\text{work}} = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ , where  $F_o$  and  $F_c$  are the observed and calculated structure factors, respectively. 5% of the reflections were excluded from the working set for calculating the  $R_{\text{free}}$  value.

## 3. 結果と考察

### 3.1 SUMO-1 修飾された TDG の立体構造

SUMO-1 修飾された TDG 中央領域 (以降、SUMO-1-TDG と略称する) の構造は大きく分けて、2 つ領域から構成されていた (Fig. 1)。一つは、TDG の触媒活性部位を含むコア領域であり、もう一つは SUMO-1 と TDG の C 末端領域から成る SUMO 領域である。SUMO-1-TDG の構造中、SUMO-1 の N 末端テイル 18 残基の電子密度は観察することができず、disorder していた。このため SUMO に特徴的に存在する N 末端テイルの機能を SUMO-1-TDG の構造から推測することは出来なかった。SUMO-1-TDG の構造中で、最も顕著な特徴は SUMO-1-TDG の分子表面に突出する形で、TDG の C 末端領域に形成された  $\alpha$  ヘリックスである。この TDG の C 末端領域は、共有結合と非共有結合を介して SUMO-1 との分子間相互作用に関与していた。

### 3.2 TDG-SUMO-1 間の分子間相互作用

TDG の SUMO 修飾部位は C 末端領域に存在しており、Lys330 と SUMO-1 の C 末端 Gly97 とがイソペプチド結合によって連結している (Figs. 2 and 3)。一方、TDG の C 末端領域の残基 307-314 は SUMO-1 との非共有結合に関与しており、SUMO-1 の  $\beta 2$  と分子間逆平行  $\beta$  シートを形成していた (Fig. 3a)。この領域には、SUMO との結合に関与することが報告されている SBM (SUMO-Binding Motif) に

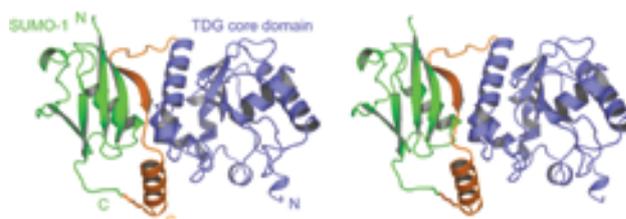


Figure 1 Stereo ribbon diagram of the structure of TDG conjugated to SUMO-1 (SUMO-1-TDG). The catalytic core domain and the C-terminal segment of TDG are shown in blue and orange, respectively; SUMO-1 is shown in green.

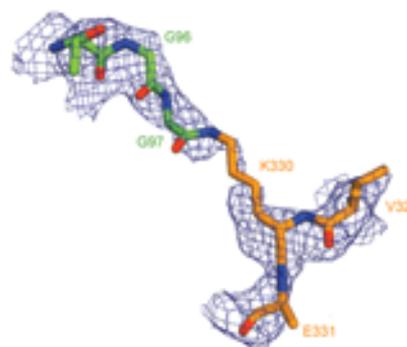
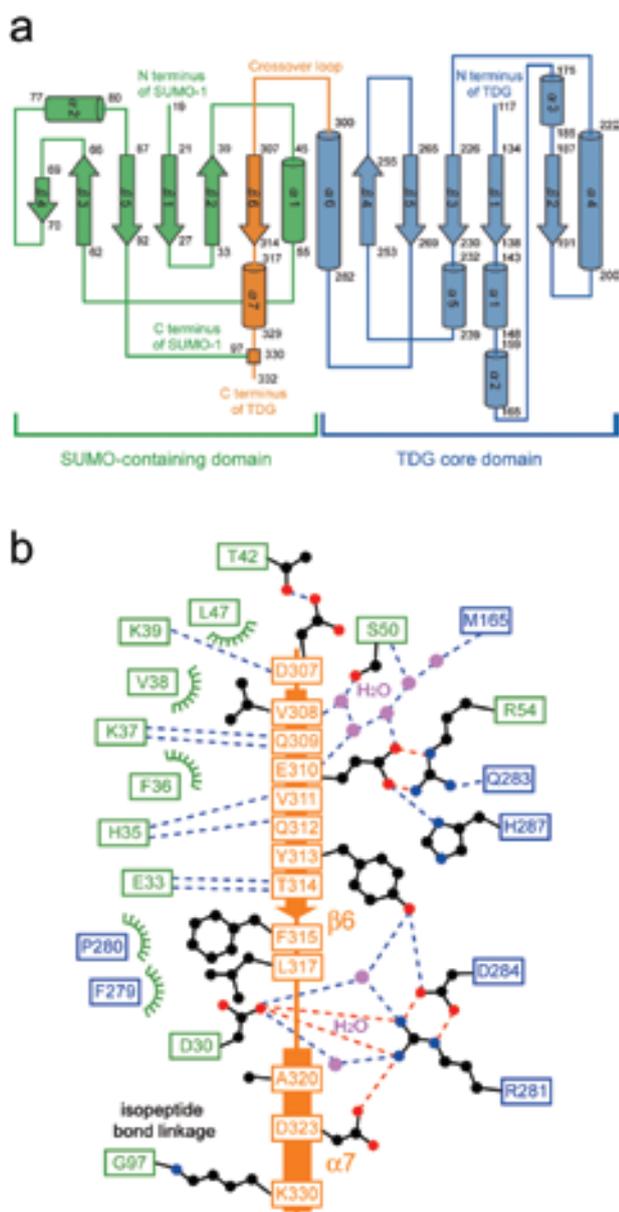


Figure 2 Electron density map of SUMO-1-TDG. Electron density around the SUMO-1 conjugation site of TDG. The  $2F_o - F_c$  electron density map, calculated using the diffraction data to 2.5  $\text{\AA}$ , is contoured at 0.5  $\sigma$ . The refined model is also superimposed.



**Figure 3**  
 Intermolecular interaction between TDG and SUMO-1. (a) Topology diagram of SUMO-1-TDG. Residues numbers and the N and C-terminus of TDG and SUMO-1 are indicated. The catalytic core domain and the C-terminal segment of TDG are shown in purple and orange, respectively; SUMO-1 is shown in green. (b) Schematic summary of contacts in SUMO1-TDG. Hydrophobic, hydrogen-bond and electrostatic interactions are shown in green, blue and orange, respectively. Protein residues are coloured as in (a).

類似した配列が存在していた [8, 9]。SBM を特徴付けている相互作用は、TDG の SBM 類似配列と SUMO との相互作用でも保存されており、TDG は SBM を介して SUMO と結合していることが分かった。また、TDG の C 末端領域に形成された突出  $\alpha$  ヘリックス  $\alpha 7$  は、その両末端を TDG, SUMO-1 間の共有結合と、TDG の R281, D284, Y313, D323 と SUMO-1 の D30 から形成される水素結合ネットワークとによって固定されることで、SUMO-1-TDG の分子表面に位置を固定されていると考えられる (Fig. 3b)。また、TDG の  $\beta 6$  を形成している残基の側鎖は、SUMO-1 の

$\beta 2, \alpha 1$  を形成する残基との疎水的あるいは静電的相互作用にも関与しており、SUMO-1-TDG 間の特異的結合に寄与している。

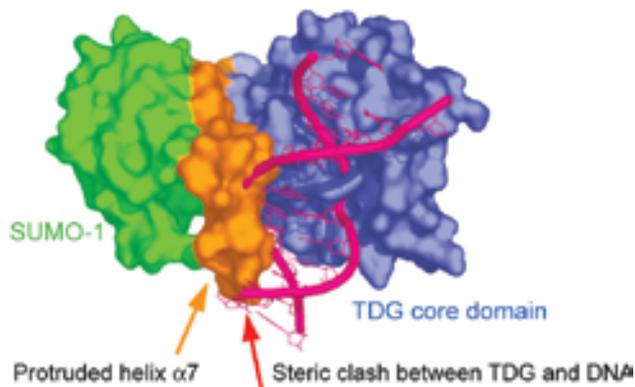
**3.3 SUMO-1 修飾による TDG の DNA 解離機構**

*in vitro* において、TDG は反応産物 DNA に結合して解離しない。また、SUMO 修飾は TDG の DNA からの解離に機能することが報告されている。実際、我々が今回結晶化に用いた TDG 中央領域も、SUMO 非修飾下では G-U ミスマッチおよび AP 部位を含む DNA に強く結合するが、SUMO-1 または SUMO-3 修飾されることで DNA への結合活性を失う。SUMO 修飾による TDG の DNA 結合活性変化の分子機構を明らかにするため、すでに構造の決定されている TDG の大腸菌オルソログ MUG と基質 DNA との複合体構造を基に、SUMO-1-TDG と DNA との複合体のモデルを作製した (Fig. 4)。

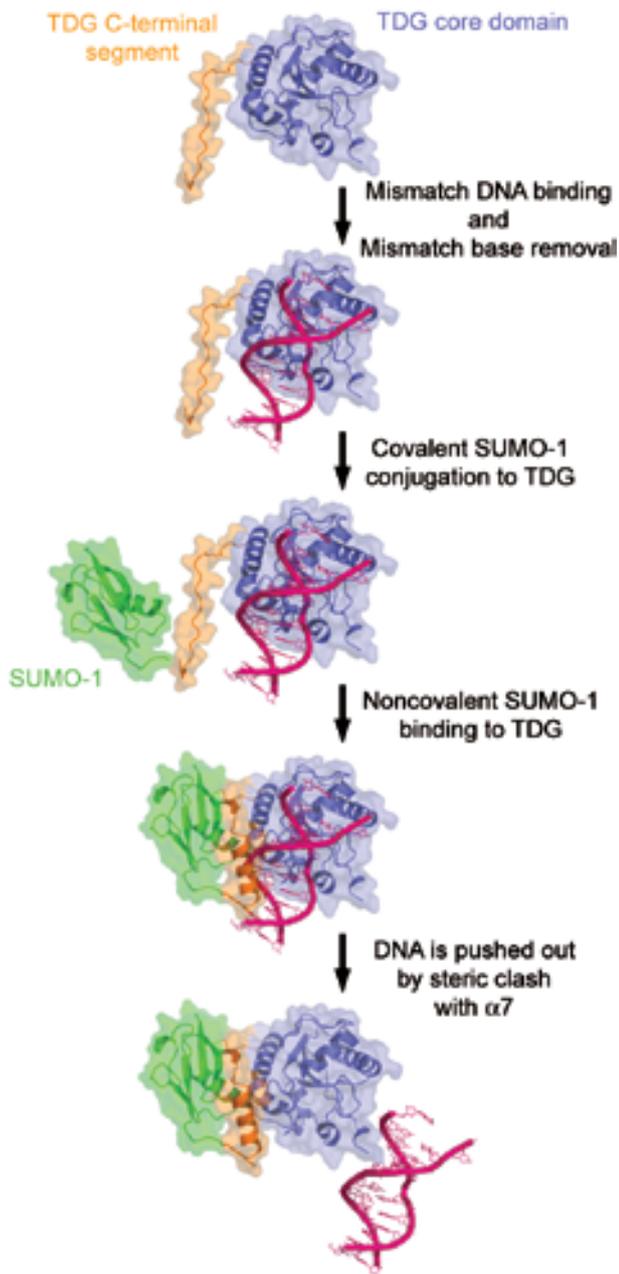
Fig. 4 に作製した SUMO-1-TDG と DNA との複合体のモデルを示す。SUMO-1-TDG と DNA との複合体モデル中では、SUMO-1-TDG の分子表面に突出した  $\alpha 7$  は、TDG と結合した DNA の糖-リン酸骨格と立体衝突を起こしていた。MUG との構造比較から DNA と結合している TDG のコア領域の構造は SUMO 修飾の前後で変化しないと考えられることから、分子表面に突出した  $\alpha 7$  と DNA 骨格との衝突によって SUMO-1-TDG と DNA の結合は阻害されると考えられる。また、SUMO-1-TDG の構造からは、この  $\alpha 7$  はその N 末端を分子間  $\beta$  シートを含む SUMO-1, TDG 間の非共有結合によって固定され、C 末端領域は SUMO-1, TDG 間の共有結合によって固定されていると推測され、TDG が DNA から解離するためにはこの双方の結合が必要であると考えられた。

**4. まとめ**

本研究では SUMO-1 修飾されたヒト TDG 中央領域の結晶構造を決定し、SUMO 修飾依存的な TDG の DNA からの解離機構を分子レベルで明らかにした。TDG は



**Figure 4**  
 Structural model of SUMO-1-TDG and DNA complex. The model was constructed by superimposing the structure of SUMO-1-TDG on that of MUG-DNA complex (PDB code 1MWI).



**Figure 5**  
Hypothetic model of SUMOylation-dependent TDG dissociation from DNA.

SBM(SUMO-binding motif) を介して SUMO-1 と結合しており、SUMO-1 と分子間  $\beta$  シートを形成していた。SUMO-1 との非共有結合と共有結合を介した相互作用によって、TDG の C 末端領域に  $\alpha$  ヘリックスの形成が誘起されることが示唆された。この  $\alpha$  ヘリックスは TDG のコア領域に結合した DNA と立体衝突を起こすことで TDG を DNA から解離させる (Fig. 5)。本研究は、SUMO 化が被修飾蛋白質の構造変化を介して機能変換を行うという新規の調節機構を示唆する最初のものであると思われる。なお 2005 年になって、我々のを含めて、3 つの SUMO 化蛋白質の立体構造が解析されている。今後の研究の進展が楽しみな分野である。

## 引用文献

- [1] Hay, R.T. *Mol. Cell* **18**, 1-12 (2005).
- [2] Johnson, E.S. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 355-382 (2004).
- [3] Gill, G. *Genes Dev.* **18**, 2046-2059 (2004).
- [4] Hardeland, U., Bentele, M., Lettieri, T., Steinacher, R., Jiricny, J., and Schar, P. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**, 235-253 (2001).
- [5] Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., and Schar, P. *EMBO J.* **21**, 1456-1464 (2002).
- [6] Baba, D., Maita, N., Jee, J.G., Uchimura, Y., Saito, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. *Nature* **435**, 979-982 (2005).
- [7] Uchimura, Y., Nakamura, M., Sugasawa, K., Nakao, M., and Saitoh, H. *Anal. Biochem.* **331**, 204-206 (2004).
- [8] Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 14373-14378 (2004).
- [9] Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. *J. Biol. Chem.* **280**, 40122-40129 (2005).

(原稿受付：2006 年 1 月 4 日)

## 著者紹介

馬場大地 (Daichi BABA)

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 特別研究学生

〒 615-8510 京都市西京区京都大学桂キャンパス

TEL : 075-383-2537

FAX : 075-383-2541

e-mail:baba@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

白川昌宏 (Masahiro SHIRAKAWA)

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 教授

〒 615-8510 京都市西京区京都大学桂キャンパス

TEL : 075-383-2535

FAX : 075-383-2541

e-mail:shirakawa@moleng.kyoto-u.ac.jp