

氏 名 小松 朋子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 812 号

学位授与の日付 平成 16 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Implication of SUMO-1 Modification in Synergistic
Transcription Mediated by Ad4BP/SF-1

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 大隅 良典
教授 高田 慎治
助教授 斎藤 寿仁（熊本大学）

An orphan nuclear receptor, Ad4BP/SF-1, is essential for the development and function of steroidogenic tissues. To examine the transcriptional regulation of Ad4BP/SF-1, two-hybrid screening was performed and the sumoylation (conjugation of a small ubiquitin-like modifier, SUMO) components Ubc9, PIAS1, and PIAS3 were isolated. Sumoylation is a novel posttranslational modification and has been reported to play a crucial role in a variety of cellular processes. Cultured cell and *in vitro* studies revealed that Ad4BP/SF-1 is sumoylated at K119 and K194. PIAS3 and PIAS1 promoted conjugation of SUMO to Ad4BP/SF-1 as E3 ligases. Since K194 lies within the synergy control (SC) motif defined to repress synergistic transcription from promoters containing multiple binding sites, correlation between the functions of the SC motif and sumoylation was investigated. The K194R mutant of Ad4BP/SF-1, which cannot be sumoylated, showed enhanced synergistic transcription from a promoter containing multiple Ad4/SF-1 sites, suggesting that sumoylation is necessary for repression of transcriptional synergy through the SC motif. It has been established that the *Müllerian inhibiting substance (Mis)* gene is transcribed predominantly under the control of Ad4BP/SF-1 and, moreover, its transcription is regulated synergistically with Sox9, Gata4, and Wt1. Interestingly, it was found that all of these factors are sumoylated, and these sumoylation sites occur within SC motifs. Based on the observation that SC motif mutants of Ad4BP/SF-1 and Sox9 resulted in the enhancement of their synergistic transcription, it was concluded that the SC motif regulates synergistic transcription even between distinct types of transcription factors. Considering that both mutants cannot be sumoylated, it is likely that sumoylation is implicated in this regulation. Since it was revealed with an *in vitro* sumoylated Ad4BP/SF-1 that DNA binding activity and interaction with Sox9 were unaffected, the transcriptional suppression by SUMO is suggested to be mediated by other unknown factors. Thus, sumoylation may regulate transcription through affecting selective and cooperative interaction among factors constituting transcriptional complexes.

論文審査結果の要旨

Ad4BP/SF-1は生殖腺や副腎皮質などのステロイドホルモン産生組織に特異的に発現する転写因子として同定された。本論文出願者、小松朋子が所属する研究室においてはAd4BP/SF-1の転写活性調節機構を解明する目的でAd4BP/SF-1と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって検索した結果、PIAS1、PIAS3、UBC9などが単離されていた。これらの因子はタンパク質のSUMO化反応に必要なコンポーネントであったことから、本論文出願者はAd4BP/SF-1の転写調節活性に対するSUMO化の影響を検討した。

培養細胞系ならびに*in vitro*再構成系によって、Ad4BP/SF-1のSUMO化コンセンサス配列内の119番目と194番目のリジン残基がSUMO化修飾を受けることを証明した。次いで、これらの配列のうち194番目の配列が協調的転写活性化調節モチーフと一致することに着目し、SUMO化の協調的転写活性化に対する影響をレポーター遺伝子アッセイによって検討した。通常、協調的転写活性化は異種の因子との間で確認されるが、本実験においてはSox9との協調的転写活性化におけるSUMO化の影響を調べた。その結果、Ad4BP/SF-1のSUMO化が協調的転写活性を抑制していることを示す結果が得られた。さらに、Ad4BP/SF-1と同様にSox9もSUMO化されることを見だし、Sox9のSUMO化もAd4BP/SF-1との協調的転写活性に対し、抑制的に働くことが示された。このようなSUMO化による転写抑制効果の分子メカニズムを明らかにするため、まずSUMO化がAd4BP/SF-1のDNA結合活性やSox9との相互作用の低下をもたらすかを調べた。*In vitro*で合成されたAd4BP/SF-1とSUMO-Ad4BP/SF-1を用いて検討したところ、DNA結合活性とSox9との相互作用はともに低下していなかった。そこで、SUMO化による影響が他のタンパク質の関与のもとに成立すると仮定し、SUMO化コンセンサス配列付近に結合することが知られている抑制性の転写コファクターDP103の関与を検討した。しかしながらDP1103との相互作用ならびに転写抑制活性はSUMO化によって影響を受けないことが明らかになった。

これまでに、多くの転写因子がSUMO化修飾を受けることが明らかになっているが、転写活性に対するSUMO化修飾の意義は不明の点が多い。本研究ではSUMO化が異なる2つの転写因子間の協調的転写活性化を抑制的に調節することを明らかにした。今後、SUMO化されたAd4BP/SF-1に特異的に結合する核蛋白の同定を通じ、その分子メカニズムが明らかになるものと期待される。

試験結果

16年7月16日

本論文出願者、小松朋子に出願論文内容を口頭で20分説明させた。研究内容は良くまとまっており、口頭発表も研究内容の説明を的確に行なうものであった。その後、論文内容に関し30分の質疑を行なった。質疑は本研究分野の基礎的知識を問うものから、極めて専門的な知識を問うものまで様々であったが、いずれの質問に対しても的確な応答がなされた。また、本論文は国際誌に印刷中であること、また学論文は英語でまとめられていたことから、英語に関する能力も備わっていると判断された。以上の結果から、本論文は学位取得に相応しいと判断する。