

学位論文  
Doctor's Thesis

SUMO 翻訳後修飾による転写因子 Sox2 の DNA 結合阻害  
(Inhibition of DNA binding of transcriptional factor Sox2 by sumoylation)

水流添 周  
Shu Tsuruzoe

熊本大学大学院医学研究科博士課程外科系専攻外科学第一

指導：馬場 秀夫 教授

中尾 光善 教授

2006 年 3 月

## 目次

1. 要旨
2. 参考論文
3. 謝辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
  - 5-1. Sox2 について
  - 5-2. Sox2 と疾患
  - 5-3. タンパク質の SUMO 修飾
  - 5-4. SUMO 修飾と転写因子
  - 5-5. 本研究の目的
6. 実験方法
  - 6-1. プラスミドの作製
  - 6-2. ヒト・マウス培養細胞、トランスフェクション
  - 6-3. リコンビナントタンパク質発現と精製
  - 6-4. 免疫沈降法
  - 6-5. 間接免疫蛍光染色
  - 6-6. ルシフェラーゼアッセイ
  - 6-7. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)
  - 6-8. 本研究で用いた抗体
7. 実験結果
  - 7-1. マウス Sox2 のドメイン構造と SUMO 修飾部位の解析
  - 7-2. 大腸菌内での Sox2 の SUMO 修飾
  - 7-3. マウス胚性幹細胞および AGS 細胞内の内因性 Sox2 の SUMO 修飾状態
  - 7-4. マウス Oct3/4 のドメイン構造と SUMO 修飾部位の解析
  - 7-5. 大腸菌内での Oct3/4 の SUMO 修飾
  - 7-6. 内因性 Sox2 および Oct3/4 の細胞内局在
  - 7-7. SUMO 修飾の Sox2、Oct3/4 の細胞内局在への影響
  - 7-8. Sox2 の転写活性における SUMO 修飾の影響
  - 7-9. Sox2 の DNA 結合性に対する SUMO 修飾の影響 (EMSA 実験系の確立)
  - 7-10. Sox2 と DNA の結合性
  - 7-11. Sox2 を Oct3/4 と共に用いた場合の DNA 結合性
8. 考察
9. 結語
10. 参考文献

## 1. 要旨

【目的】 Sex-determining region Y-box 2 (Sox2) は、ほ乳類発生の胚盤胞期に内部細胞塊で発現し、その未分化能・多分化能の維持に重要である。また胃を含めた消化管の発生分化に関わっている。Small ubiquitin-related modifier (SUMO) は、被修飾タンパク質のリジン残基側鎖にイソペプチド結合する翻訳後修飾因子である。SUMO によるタンパク質修飾は酵母からヒトを含む高等生物まで保存されており、細胞核機能、転写制御への関わりが示唆されてきた。本論文では、Sox2 の機能制御機構と SUMO 修飾との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】 マウス Sox2 を発現させるプラスミドベクターを構築し、SUMO-1 および SUMO 修飾酵素の発現ベクターと共にヒト子宮頸癌細胞 HeLa 内で共発現した。Sox2 の 247 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体と、カルボキシル末端に SUMO-1 を結合した変異体を発現させるベクターを構築した。Sox2、SUMO 修飾酵素、SUMO-1 を大腸菌内で発現させるプラスミドベクターを構築し、これら大腸菌内で共発現した。内因性 Sox2 の SUMO 修飾状態を免疫沈降法で解析した。野生型および変異体 Sox2 のアミノ末端に Green Fluorescent Protein (GFP) を結合させたものを HeLa に発現させ、細胞内局在を解析した。Sox2 の転写活性における SUMO 修飾の影響をルシフェラーゼアッセイで解析した。大腸菌内で発現させたタンパク質を精製し、Sox2 の結合配列を有するオリゴ DNA との結合性を Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) で解析した。

【結果】 SUMO-1 および SUMO 修飾酵素を共発現することで、Sox2 が HeLa 内で SUMO 修飾を受けた。247 番目のリジンをアルギニンに置換した変異体 Sox2 は、SUMO 修飾を受けなかった。野生型 Sox2 を SUMO-1 および SUMO 修飾酵素と共に大腸菌内で発現させると、効率よく SUMO 修飾された。マウス胚性幹細胞およびヒト胃癌細胞 AGS の内因性 Sox2 を免疫沈降法で解析した結果、Sox2 の一部が SUMO 修飾されていた。野生型 Sox2 と SUMO 修飾を受けない変異体の間で、細胞内局在に相違は認めなかった。ルシフェラーゼアッセイにて、SUMO 修飾を受けない変異体は、野生型よりも転写活性が高い傾向を認めた。SUMO をカルボキシル末端に結合した変異体 (SUMO 化 Sox2 に相当) は、有意に低い転写活性を示した。EMSA において、SUMO が付加された Sox2 は DNA への結合性が低下した。

【考察】 Sox2 は 247 番目のリジン残基に SUMO 修飾を受けることが判明した。Sox2 の SUMO 修飾はその転写活性を低下させる可能性があり、その機構として Sox2 の標的 DNA への結合性の低下が関与していることが示唆された。

【結論】 Sox2 の SUMO 修飾は、DNA 結合性の低下を介してその転写活性を負に制御していることが示唆された。転写因子の DNA 結合能と機能制御に SUMO 修飾が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

## 2. 参考文献

### 参考論文

#### ①関連論文 1編 1冊

1. Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., Baba, H., and Nakao, M.  
Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 351(4): 920-926, 2006.

#### ②その他の論文 4編 4冊

1. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. and Nakao, M.  
Methyl-CpG Binding Domain 1 (MBD1) Interacts with the Suv39h1-HP1 Heterochromatic Complex for DNA Methylation-based Transcriptional Repression.  
*J. Biol. Chem.* 278(26): 24132-24138, 2003.
2. Watanabe, S., Ichimura, T., Fujita, N., Tsuruzoe, S., Ohki, I., Shirakawa, M., Kawasuji, M., and Nakao, M.  
Methylated DNA-binding domain 1 and methylpurine-DNA glycosylase link transcriptional repression and DNA repair in chromatin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(22): 12859-12864, 2003.
3. 水流添周, 坂本快郎, 市村隆也, 中尾光善 「がんとクロマチン」  
最新医学, 最新医学社 (大阪), 58(9): 2134-2145, 2003.
4. 水流添周, 内村康寛, 斉藤寿仁 「SUMO 蛋白質修飾システムのヒト疾患関連性」,  
医学のあゆみ, 医歯薬出版 (東京), 21(13): 1076-1077, 2004.

### 3. 謝辞

熊本大学発生医学研究センター器官制御分野の中尾光善教授には、本研究の全体的な御指導を頂きました。実験、論文発表および学会発表についての御指導を頂き、励ましと助言を頂いたことに深く感謝いたします。

同教室の斉藤寿仁助教授および内村康寛博士には、SUMO を用いた実験系に関して直接に御指導頂きました。SUMO 研究の第一人者の斉藤先生、内村先生より直接御指導いただいた事は大変に幸運で、貴重な経験でした。深く感謝いたします。

同教室の石原宏先生には、EMSA などの実験系に関して直接にご指導いただきました。深く感謝いたします。

また、同教室の皆様に深く感謝いたします。優れた教室員の方々に、実際の実験や論文作成、日々の研究生活において非常に多くのご援助をいただくことで本研究が進められました。

心臓血管外科学教授の川筋道雄先生および消化器外科学教授の馬場秀夫先生をはじめとした外科の先生方には、4年間の長きに渡って中尾先生の下での基礎的研究に携わる機会を与えていただき、大変感謝しております。

熊本大学発生医学研究センターおよび生命資源研究・資源センターの皆様には、各種の教育プログラムや DNA 配列解析、RI 実験の支援などでお世話になりました。感謝しております。

文部科学省 21 世紀 COE プログラム「細胞系譜制御研究教育ユニットの構築」におけるジュニア・リサーチ・アソシエイトとして任命していただいたことで、研究面、経済面でのサポートを受けることができました。大変感謝致しております。

東京医科歯科大学の湯浅保仁教授には、本研究上重要な Sox2 の抗体を供与していただきました。厚く御礼申し上げます。

理研 発生・再生科学総合研究センターの丹羽仁史先生には、ルシフェラーゼアッセイ用のレポーターベクターや Sox2、Oct3/4 の発現プラスミドベクターを供与していただきました。また ES 細胞を用いた実験などについての貴重な情報や、本研究の方向性についての重要な示唆を頂き、大変幸運でした。厚く御礼申し上げます。

## 略語一覽

ATP; adenosine 5'-triphosphate

BSA; bovine serum albumine

cDNA; complementary DNA

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

EGFP; enhanced green fluorescent protein

FBS; fetal bovine serum

FITC; fluorescein isothiocyanate

GST; glutathion S-transferase

HEPES; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid

HMG; High Mobility Group

IPTG; isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside

PBS; phosphate buffered saline

PCR; polymerase chain reaction

SDS; sodium dodecyl sulfate

Sox2; Sex-determining region Y-box 2

TAD; transcriptional activation domain

Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1. Sox2 について

Sex-determining region Y-box 2 (Sox2) は、High Mobility Group (HMG) と呼ばれる共通のドメイン構造をもったタンパク質群に属していて、転写の調節やクロマチン構造の調節に重要である (Bianchi et al., 2005)。HMG ドメインは、他の多くのタンパク質が DNA 2 重らせんの Major Groove に結合するのとは異なり、Minor Groove に結合する。そうすることで、DNA 分子に折れ曲がり構造をつくることが知られている (Wilson et al., 2002)。Sox2 は、初期発生段階においていくつもの組織で発現している特徴がある。現在のところ、神経発生や眼のレンズの発生、消化管の発生に関与していることが知られている (Avilion et al., 2003)。これらの場合において Sox2 は、その細胞に特徴的な転写因子と協調して、固有の遺伝子群の発現を調節している (Kamachi et al., 2000)。

パートナーの中でも重要なのが、*POU5* でコードされる転写因子 Oct3/4 である (Niwa et al., 2000; Niwa et al., 2002)。両者は協調して初期発生を制御し、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell : ES 細胞) を含めた多能性の細胞で働いている (Boiani and Scholer, 2005)。

Sox2 と Oct3/4 は、お互い近接したシス作用 DNA 配列に、それぞれの DNA 結合ドメインを介して結合し、DNA 分子との間で 3 者複合体を形成する (Remenyi et al., 2003)。Sox2 が存在することで、Oct3/4 が DNA に結合し、安定化すると考えられている。

マウスの胚発生において、Sox2 と Oct3/4 のヘテロ 2 量体は、種々の下流遺伝子、Fibroblast Growth Factor 4 (*FGF4*) や Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (*Utf1*)、*osteopontin*、さらには *POU5* や Sox2 自身も制御している (Ambrosetti et al., 2000; Nishimoto et al., 1999; Botquin et al., 1998; Chew et al., 2005)。

マウスの胚盤胞における内部細胞塊は、全能性を維持した未分化な細胞の集団であり、その性質が維持されるのに必要ないくつかの Key Regulator が知られている。Sox2、Oct3/4 も、Nanog などとともにその中に含まれている。興味深いことに、*Nanog* の制御配列にも Sox2、Oct3/4 の認識配列が近接して存在し、これら 3 者による制御ネットワークの存在が考えられている。

Sox2 の機能制御については不明な点が多いが、Sox ファミリーに属するほかの分子 (SOX6、SOX10 など) については、近年 SUMO (後述) による翻訳後修飾が報告されている (Fernandez-Lloris et al., 2006; Girard et al., 2006; Savare et al., 2005; Kimberly et al., 2005)。

## 5-2. Sox2 と疾患

5-1. で述べたように Sox2 は生理的に重要であるが、ヒトにおける疾病の病因にも関与している。

ヒト成体の胃において、Sox2 は粘膜で発現している。しかし、慢性胃炎に続発して生じる腸上皮化生や、そこから生じる腸型胃癌の発生の際には発現が低下する (Li et al., 2004)。この過程における Sox2 の発現低下と、胃に特徴的なムチンの MUC5AC、MUC6 の発現低下、さらに腸特異的な Cdx1、Cdx2、MUC2、villin-1 の発現上昇も示されている (Tsukamoto et al., 2004)。

また、膵においては、膵癌の前癌状態と考えられる Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) が進行する過程で、正常膵管上皮では発現していない Sox2 の異所性発現が増加することが示された (Sanada et al., 2006)。

また、Sox2 遺伝子の変異によって、孤発性の眼球異常症や食道閉鎖症が引き起こされることがわかっている (Ragge et al., 2005; Bruner et al., 2005)。

## 5-3. タンパク質の SUMO 修飾

真核細胞には約 100 アミノ酸残基のユビキチンフォールドを有するユビキチン様タンパク質 (Ubiquitin-like protein; UBL) が複数存在している。その一種である SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) は、出芽酵母、分裂酵母から哺乳類に至るまで真核生物一般に保存されており、出芽酵母における SUMO 相同遺伝子 Smt3 は生存に必須な遺伝子である (Li and Hochstrasser, 1999)。

SUMO 修飾系はユビキチン修飾系と類似した酵素タンパク質群による修飾反応系から成り立っている (図 1)。SUMO は前駆体として翻訳された後、C 末端部位の余分なアミノ酸配列が特異的な切断酵素により切断されることで、グリシン残基が露出した成熟型 SUMO となる。成熟型 SUMO は、ATP 依存的にヘテロダイマー E1 酵素 Aos1/Uba2 により活性化される。活性化型中間体として Uba2 (Ubiquitin-activating enzyme 2) のシステイン残基と SUMO の C 末端グリシン残基のチオエステル結合物を形成する。次に E2 酵素である Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9) のシステイン残基に SUMO 分子が受け渡され活性化型中間体を形成する。Ubc9 は SUMO 化コンセンサス配列である  $\Phi$ KX(E/D) を直接認識して、コンセンサス配列リジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基に SUMO のグリシン残基をイソペプチド結合させる。 $\Phi$ KX(E/D) の  $\Phi$  は側鎖の大きな疎水性アミノ酸残基、K は SUMO とイソペプチド結合するリジン残基、X は任意のアミノ酸残基、E/D はグルタミン酸またはアスパラギン酸の酸性アミノ酸残基を示している。Ubc9 は SUMO 修飾系における唯一の E2 酵素であり、ユビキチン修飾において E2 酵素が 10 種以上あることと対照的である。また、Ubc9 が SUMO 化のコンセンサス配列を直接認識することは、ユビキチン修飾における E2 酵素



が基質タンパク質を直接認識することができないことと対照的である。基質タンパク質にイソペプチド結合した SUMO は特異的な脱 SUMO 化酵素により脱 SUMO 化される。現在、いくつかの脱 SUMO 化酵素における基質特異性について報告されている (Gong et al., 2000; Hang and Dasso, 2002; Li and Hochstrasser 1999)。このように、SUMO 修飾は脱着可能な翻訳後修飾でありダイナミックに制御されていると考えられている。

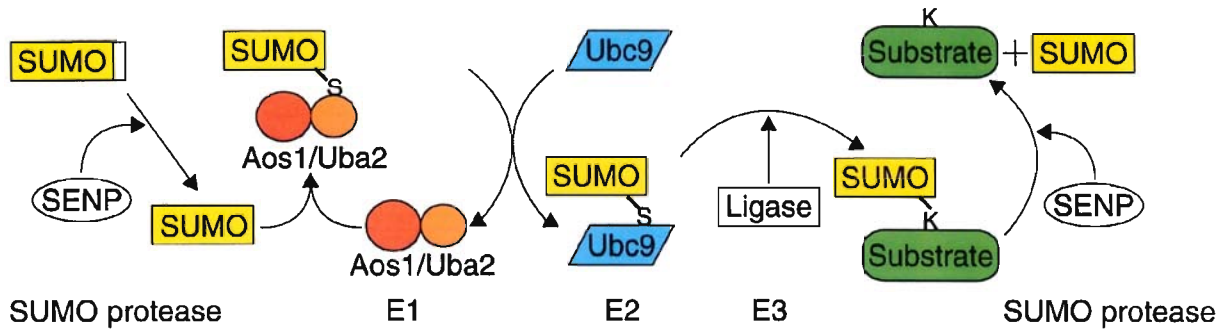


図 1. SUMO 修飾反応系の模式図。

出芽酵母、分裂酵母、ハエ、線虫において、SUMO は 1 遺伝子しか存在しないが、マウスやヒトなどの哺乳類細胞で SUMO は少なくとも 3 遺伝子が存在し、これは SUMO-1 とこれと約 50%のアミノ酸相同性を示す SUMO-2/3 の 2 つのサブファミリーに分類される。SUMO-1 と SUMO-2/3 の機能的な差異については不明な点が多い。

これまでにいくつかの研究グループによって SUMO 化修飾における ‘E3 酵素’ として RanBP2 (Picher et al., 2002)、PIAS (Schmidt and Muller, 2002)、Pc2 (Kagey et al., 2003) 等が報告されている。これらは SUMO 化修飾に必須の因子ではなく、また SUMO 化修飾効率の上昇も数倍であることから、一般的な酵素として考えるよりもアダプターとして機能していると考えた方が良いと思われる。例えば PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) は、E2 酵素 Ubc9 と相互作用する RLD (RING-finger-like zinc-binding domain)、SUMO と相互作用する AD (highly acidic domain) を含む領域に SBM (SUMO binding motif) を有することから、Ubc9 と SUMO を PIAS 上に局在化させることで SUMO 化の反応効率を上昇させるアダプター因子として機能していると考えられる。

#### 5-4. SUMO 修飾と転写因子

Sp3 の SUMO 化 (Ross et al., 2002) や CtBP (C-terminal binding protein) の SUMO 化 (Lin et al., 2003) など多くの転写因子において、SUMO 化修飾による転写抑制が報告されている。これら転写因子においては、SUMO 化リジン残基をアルギニンに変異させるとルシフェラーゼアッセイにより検出される転写活性が上昇する。このことから、転写因子は SUMO 化されることで、転写活性が抑制されると考えられている。C/EBP (CCAAT-enhancer binding protein)、Elk-1 (Ets-like transcription factor 1)、c-Myb、ステロイドホルモンレセプター等の SUMO 化アクセプターとなるコンセンサス配列は、以前から知られていたシナジーコントロール (synergy control, SC) 配列を介した転写不活性化モチーフ配列内に含まれていた (Chuptreta et al., 2005; Holmstorm et al., 2003) (表 1)。2 個やそれ以上の転写因子は、協調的に働くことで単純にそれらの相加的な活性以上の活性を示し、これは、シナジー活性と呼ばれる。シナジーコントロールは、転写因子のシナジー活性に対して負に作用する転写因子に対する制御機構を意味する。シナジーコントロールを受ける転写因子内の配列として、シナジーコントロールモチーフが同定されてきた (Gill, 2003)。

synergy control motif    P-(X)<sub>0-3</sub>-I/V-K-X-E

SUMOylation consensus    Φ-K-X-E/D

表 1. 転写因子に見られるシナジーコントロールモチーフと SUMO 化基質タンパク質に見られる SUMO 化コンセンサス配列。

SUMO 化コンセンサス配列は Φ-K-X-E/D である。Φ は疎水的アミノ酸残基、K は SUMO 化リジン残基、X は任意のアミノ酸残基、E/D はアスパラギン酸やグルタミン酸などの酸性アミノ酸残基である。これに対して、シナジーコントロールモチーフは SUMO 化コンセンサス同等の配列とさらにこれの 1-4 アミノ酸上流に存在するプロリン残基が特徴的である。

また、脱 SUMO 化酵素を過剰発現することにより転写活性が上昇することや、GAL4-SUMO 融合タンパク質を異所的に発現させ、プロモーター部位の近傍にリクルートすることにより、各々の転写因子はトランス作用を受け、転写活性が抑制される (Yang and Sharrocks, 2004)。これらのことから SUMO 修飾が転写抑制複合体をリクルートするという仮説が支持される。また、SUMO を過剰に発現することでルシフェラーゼアッセイの転写活性が上昇することは、過剰に発現した SUMO が、シナジーコントロールモチーフに相互作用する転写抑制に関与するタンパク質を吸着することで、転写抑制がかかりにくくなっていることの影響を見ているのかもしれない。

また、HDAC1 (histone deacetylase 1) や HDAC4 において示されているように、SUMO がヒストン脱アセチル化酵素の活性を制御すること (David et al., 2002; Kirsh et al., 2002) や、ヒストンアセチル化酵素 p300 の HDAC を介した抑制機能において SUMO 修飾が関与することが示されている (Girdwood et al., 2003)。さらには、ポリコームタンパク質 Pc2

が SUMO-E3 酵素活性を有しており、CtBP1 や CtBP2 の SUMO 化活性を促進し、コリプレッサー活性を促進することも報告されている (Kagey et al., 2003)。

抗SUMO抗体でショウジョウバエの多糸染色体のクロモセンタールが染色されることが示されている (Lehembre et al., 2000)。ショウジョウバエにおいて position effect variegation のサプレッサー遺伝子のひとつの Su(var)2-10 が SUMO E3 ligase の PIAS ファミリー遺伝子であったことが示されている (Hari et al., 2001)。PIAS ファミリー遺伝子はもともと転写因子の STAT の活性を抑制させる因子として同定されていた遺伝子である。

ヒストン H4 が *in vitro*、*in vivo* において SUMO 化修飾を受け、ヒト細胞内で転写抑制と関連していることが示されている (Shio and Eisenman, 2003)。このことから、ヒストンの SUMO 化修飾とヘテロクロマチンの形成との関連性に興味を持たれる。

#### 5-5. 本研究の目的

Sox2 は、初期発生や組織発生、さらに成体における正常な胃粘膜の維持に働く重要な転写因子であるにも関わらず、その機能制御機構についての詳細は不明であった。

Sox2 のファミリー分子のいくつかは、SUMO による修飾を受けていることから、Sox2 にも同様の制御機構が存在するのではないかと仮説をたて、SUMO 修飾が Sox2 の機能・とりわけその転写活性にどのような影響を与えるのかということと、その機構を解明することを目的とした。

## 6. 実験方法

### 6-1. プラスミドの作製

pcDNA3 FLAG-Sox2 プラスミドを作成するために、マウス Sox2 を

5'-GTGCTCGAGGAATTCATGTATAACATGATGGAGACGGAGCTG-3'

(フォワード、EcoRI 認識部位 (下線))

5'-TAACTCGAGTCACATGTGCGACAGGGGCAGTGT-3'

(リバーズ、XhoI 認識部位 (下2重線))

のオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法により増幅した。これらの PCR 増幅断片を EcoRI、XhoI 制限酵素で処理し、pcDNA3-FLAG プラスミドの EcoRI、XhoI 部位にサブクローニングした。

Sox2 (K247R) の 1 アミノ酸変異体を発現するプラスミド pcDNA3 FLAG-Sox2 K247R を作製するために、部位特異的突然変異作成法 (site-directed mutagenesis) を行った。

pcDNA3 FLAG-Sox2-SUMO1 プラスミドを作製するために、pcDNA3-FLAG-Sox2no FLAG-Sox2 部分を PCR 法にて増幅し、pcDNA3-myc-SUMO-1 の myc タグの部分にサブクローニングした。

pGEX4T-1 Sox2 プラスミドを作製するために、先の PCR 増幅断片を XhoI 制限酵素で処理し、pGEX4-1 (Amersham Biosciences 社) プラスミドにサブクローニングした。

pEGFP-Sox2、pEGFP-Sox2 K247R プラスミドを作成するために、Sox2、Sox2 K247R 部分を pEGFP ベクターにサブクローニングした。

マウス Oct3/4 を

5'-GGGGTGCTCGAGGAATTCATGGCTGGACACCTGGCTTCAGAC-3'

(フォワード、EcoRI 認識部位 (下線))

5'-CAGTAACTCGAGCTAACCCCAAAGCTCCAGGTTCTC-3'

(リバーズ、XhoI 認識部位 (下2重線))

のオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法により増幅した。

Sox2 の場合と同様の処理を行い、各種のプラスミドを作成した。

Oct3/4 (K118R) の 1 アミノ酸変異体を発現するプラスミドを作製するために、部位特異的突然変異作成法を行った。

その他 SUMO-1 と Ubc9 発現プラスミドおよび大腸菌内で SUMO-1、SUMO 修飾酵素を発現するプラスミドは当研究室で以前より作製されたものを使用した (Tojo et al., 2002; Uchimura et al., 2004)。

## 6-2. ヒト・マウス培養細胞、トランスフェクション

ヒト子宮頸癌細胞 HeLa、ヒト胃癌細胞 AZ-521、AGS を DMEM-F12 培地 (SIGMA 社) に最終濃度 10%の牛胎児血清 (Fatal Bovine Serum, Bio-Whittaker 社)を加えたもので、37℃の 5% CO<sub>2</sub>培養器にて継代培養した。HeLa 細胞には Lipofectamine (Invitrogen 社) でプラスミド DNA をトランスフェクションした。

マウス胚性幹細胞を、ノックアウト DMEM (KO-DMEM、Gibco 社) に最終濃度 0.3%の牛胎児血清と 15% knockout-serum replacement (KSR、Gibco 社)、2mM のグルタミン酸、0.1mM の 2-メルカプトエタノール、1 倍の non-essential amino acids (NEAA、Gibco 社)、leukemia inhibitory factor (LIF) を加えたもので、0.1%ゼラチンコートディッシュの上で継代培養した。

## 6-3. リコンビナントタンパク質発現と精製

SUMO 化 Sox2 は E. coli SUMOylation system (Uchimura et al., 2004) を用いて発現させた。E. coli 株 BL21 (DE3) に pGEX Sox2 または pGEX Oct3/4 発現プラスミドを単独あるいは pT-E1E2S1 とともにトランスフォームした。最終濃度 0.2mM の IPTG にてタンパク質の発現の誘導を行い、25℃で 18 時間発現誘導した。

GST 融合タンパク質にはグルタチオン-セファロースビーズを加え結合させ、十分洗浄した後溶出させた。

## 6-4. 免疫沈降法

AGS細胞とマウス胚性幹細胞を0.1% NP-40、20mM N-ethylmaleimideを含んだPBSで氷上にて10分間処理し、細胞膜を溶解させ、氷冷したPBSで3回リンスした。氷冷したRIPAバッファー(50mM Hepes、pH8.0、150mM NaCl、1% NP-40、0.1% sodium deoxycholate、20mM N-ethylmaleimide、0.1mM dithiothreitol、protease inhibitor)を加えて細胞核を掻き集めた。超音波処理を行った後、10分間遠心した。得られた核抽出液を、あらかじめ抗Sox2抗体を共有結合させたカラム (Seize X Protein G Immunoprecipitation Kit、PIERCE社)に加え、室温で 60 分間反応させ、結合したタンパク質をウエスタンブロット法にて検出した。

#### 6-5. 間接免疫蛍光染色

培養細胞を 4% paraformaldehyde を含む PBS にて室温で 15 分間固定した。0.2% TritonX-100 を含む PBS を用いて氷上で 5 分間処理し、細胞膜と核膜を透過性にした。PBS で 3 回リンスした後、特異的抗体を 1 時間反応させた。1 次抗体 IgG を認識する特異的 2 次抗体 Cy3-conjugated donkey anti-rabbit antibody および Cy3-conjugated donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch 社) を 1 時間反応させた。PBS で 3 回リンスした後、カバーガラスを、DABCO を用いてマウントし、Olympus 社の蛍光顕微鏡 IX71 で観察した。

発現させた GFP 結合タンパク質については、固定の後にカバーガラスをマウントし、観察を行った。

#### 6-6. ルシフェラーゼアッセイ

HeLa細胞に、FGF4のエンハンサー配列を含んだレポータープラスミドと Sox2、Oct3/4の発現プラスミドをともにトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。内部コントロールとして、phRL-tkプラスミド (Promega社) を用いた。ルシフェラーゼの活性の測定には、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社) を用いた。

レポータープラスミドのFGF4-5'enh tk-lucは、理研 発生・再生科学総合研究センターの丹羽仁史先生にご供与いただいた。

#### 6-7. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

*FGF4* 遺伝子のエンハンサー配列内の Sox2 と Oct3/4 の結合配列を含むオリゴ DNA を合成し、放射性同位元素を含んだ $\gamma$ -<sup>32</sup>P アデノシン 3 リン酸にて標識した。結合させるタンパク質として、大腸菌にて発現、精製したリコンビナントタンパク質を用いた。標識したオリゴ DNA とリコンビナントタンパク質を 4°C で 15 分間反応させ、反応物を非変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動が終わったゲルをろ紙の上で温熱真空乾燥し、泳動されたオリゴ DNA をオートラジオグラフィにて検出した。

#### 6-8. 本研究で用いた抗体

抗Oct3/4 (Santa Cruz社) 抗体、抗GMP-1 (SUMO-1) 抗体 (Zymed Laboratories社)、抗FLAG M5 (SIGMA社) 抗体を用いた。

抗 Sox2 抗体は、東京医科歯科大学の湯浅保仁教授にご供与いただいた。

## 7. 実験結果

### 7-1. マウス Sox2 のドメイン構造と SUMO 修飾部位の解析

マウス Sox2 を、実験方法で示したオリゴ DNA をプライマーとして、マウス F9 細胞から調製した cDNA ライブラリをテンプレートとして増幅し、FLAG タグ発現領域を含んだ pcDNA3 にサブクローニングして pcDNA3 FLAG-Sox2 を作成した。シーケンスを、T7 プライマーを用いた PCR で解析し、NCBI の NM\_011443 と相違ないことを確認した。発現されるタンパク質のアミノ酸配列を検討すると、246-249 番目のアミノ酸に SUMO 修飾のコンセンサス配列が存在した (図 2)。

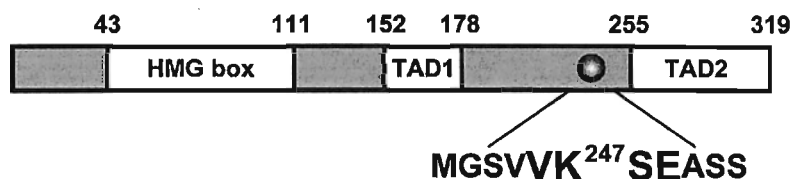


図 2 : マウス Sox2 の構造。

アミノ末端近くに、HMG ボックスと呼ばれる DNA 結合ドメインを有し、中ほどとカルボキシル末端に転写活性化ドメインを持つ。

246-249 番目のアミノ酸配列が、SUMO 修飾標的配列に合致している。

247 番目のリジンが SUMO 修飾の標的と考え、この部分をアルギニンに置換した変異体 Sox2 K247R を発現するプラスミド pcDNA3 FLAG-Sox2 K247R を部位特異的突然変異作成法 (site-directed mutagenesis) にて作成した。DNA 配列を、再び PCR にて解析した。それぞれを、単独あるいは SUMO-1 を発現するプラスミド、SUMO 修飾の E2 酵素である Ubc9 とともに HeLa 細胞内で発現させ、細胞溶解液をポリアクリルアミド電気泳動の上ウエスタンブロット法にて解析した (図 3)。

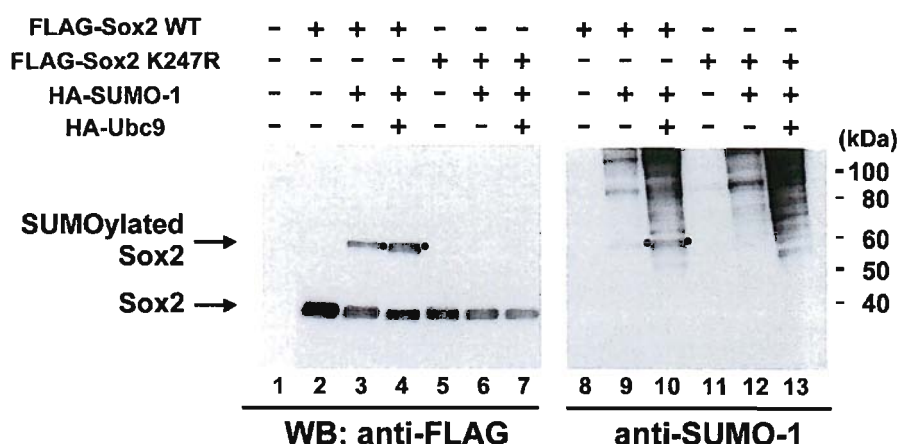


図 3 : HeLa 細胞内過剰発現系における Sox2 の SUMO 修飾。

示したプラスミドを HeLa 細胞内で過剰発現させ、細胞溶解液をウエスタンブロット法で解析。抗 FLAG 抗体（レーン 1-7）と抗 SUMO-1 抗体（レーン 8-13）で検出した。

抗 FLAG 抗体で検出すると、pcDNA3 FLAG-Sox2 を発現させたレーンでは約 37 キロダルトン (kDa) の部位にバンドが観察された (レーン 2)。

さらに、SUMO-1 を共発現したレーン 3 では、レーン 2 で観察されるバンドに加えて約 55kDa の部位にバンドが観察された。抗 SUMO-1 抗体で同じサンプルを解析したレーン 9 にも同じ高さにバンドが観察されることから、このバンドは SUMO-1 が FLAG-Sox2 に共有結合したものによると考えられた。さらに SUMO-1 に加えて Ubc9 を共発現させたレーン 4 およびレーン 10 では、この部位のバンドが増強した。

次に、pcDNA3 FLAG-Sox2 K247R を同様に発現させたレーン 5 でも、レーン 2 と同じ高さにバンドが観察された。

しかし、SUMO-1 を共発現させたレーン 6 や SUMO-1 に加えて Ubc9 を共発現させたレーン 7 では、レーン 3 や 4 で観察されたバンドは認められなかった。

これらの結果より、Sox2 は細胞内で SUMO による修飾を受けうることと、その修飾には 247 番目のリジンが必須であること、すなわち 247 番目のリジンが SUMO 修飾の標的であることが示された。



## 7-2. 大腸菌内での Sox2 の SUMO 修飾

次に、Sox2 の SUMO 修飾が大腸菌内でも再現可能かどうかを検討するため、大腸菌用のプラスミドベクター pGEX 4T-Sox2 を作成し、単独あるいは SUMO 修飾用プラスミド pT-E1E2S1 (Uchimura et al., 2004) とともに大腸菌内に導入した。

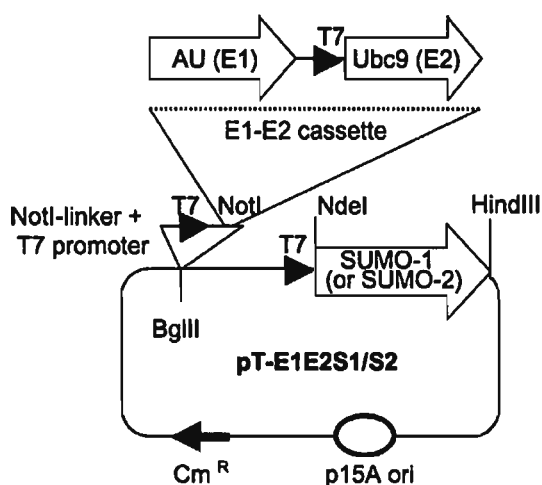


図 4 : 大腸菌内 SUMO 修飾のためのプラスミド pT-E1E2S1 の構造。

SUMO 修飾酵素を発現する E1-E2 cassette と SUMO-1 を発現するユニットを有し、基質タンパク質の発現プラスミドとともに大腸菌に導入することで効率の良い SUMO 修飾系を簡便に構築できる (Uchimura et al., 2004)。

大腸菌を増幅し、IPTG にて発現を誘導した上で大腸菌を回収、破碎した。

破碎液をグルタチオンビーズにて精製し、ウエスタンブロット法で解析した (図 5)。

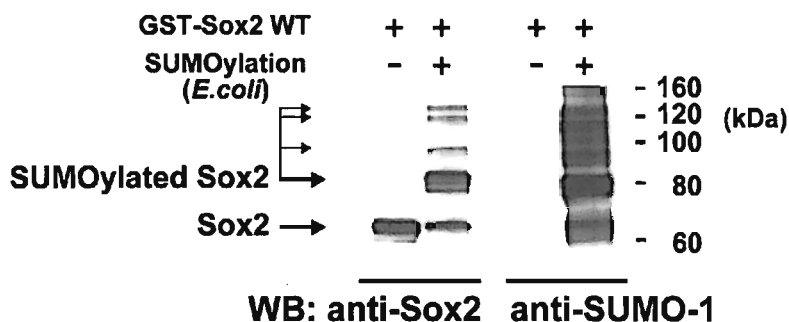


図 5 : 大腸菌内 SUMO 修飾システムによる Sox2 の SUMO 修飾。

GST-Sox2 を発現させるプラスミドを、単独 (レーン 1、3) および SUMO 修飾プラスミドとともに (レーン 2、4) 大腸菌に導入。発現を誘導し、精製したタンパク質を解析した。

抗 Sox2 抗体で検出すると、pGEX 4T-Sox2 を単独で導入したものでは、約 65kDa の部位にバンドが観察された（レーン 1）。

さらに、SUMO 修飾プラスミドをともに導入したレーン 2 では、レーン 1 で観察されるバンドに加えて約 83kDa の部位などにバンドが観察された。抗 SUMO-1 抗体で同じサンプルを解析したレーン 4 にも同じ高さにバンドが観察されることから、このバンドは SUMO-1 が GST-Sox2 に共有結合したものによると考えられた。

これらの結果より、Sox2 は大腸菌内で SUMO による修飾を受けうることが示された。

### 7-3. マウス胚性幹細胞および AGS 細胞内の内因性 Sox2 の SUMO 修飾状態

過剰発現系および大腸菌内での Sox2 の SUMO 修飾が確認されたため、次にわれわれは内因性 Sox2 の SUMO 修飾状態を解析することとした。

Sox2 を通常の培養状態で発現している細胞として、マウスの胚性幹細胞とヒト胃癌細胞 AGS を用いた。

これらの細胞を継代培養し、細胞破碎液の上清を、抗 Sox2 抗体およびコントロールのウサギ IgG を共有結合させたビーズカラムで精製した。

カラムの溶出液を抗 Sox2 抗体と抗 SUMO-1 抗体を用いてウエスタンブロット法にて解析した（図 6）。

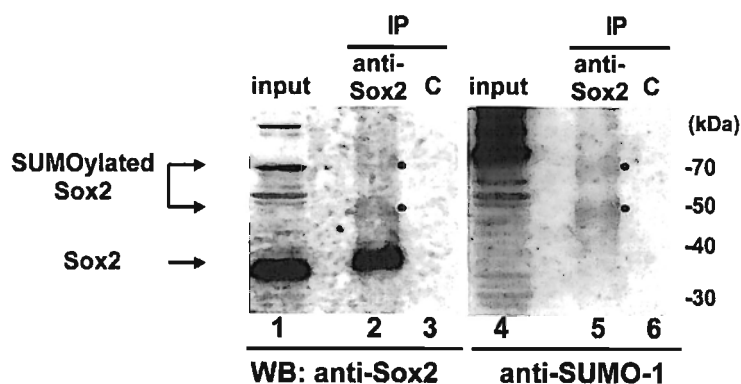


図 6：ヒト胃癌細胞 AGS 内の内因性 Sox2 の SUMO 修飾状態。

AGS 細胞の内因性 Sox2 を免疫沈降にて精製し、抗 Sox2 抗体および抗 SUMO-1 抗体で検出した。10%インプット、抗 Sox2 抗体による沈降物、コントロール IgG による沈降物について解析した。

抗 Sox2 抗体で検出すると、インプット（レーン 1）および抗 Sox2 抗体による沈降物（レーン 2）では、約 35kDa の部位に強いバンドが観察されたが、コントロール IgG による沈降物（レーン 3）ではバンドは観察されなかった。

レーン 2 では、さらに約 50kDa、70kDa の部位に弱いバンドが検出された。

次に同じサンプルを抗 SUMO-1 抗体で検出したところ、抗 Sox2 抗体による沈降物のレーン 5 では、レーン 2 で観察される約 50kDa、70kDa の部位に同様に弱いバンドが観察された。コントロール IgG による沈降物（レーン 6）ではこのバンドは観察されなかった。

これらの結果から、AGS 細胞内には約 35kDa の内因性 Sox2 に加えて、SUMO 修飾を受けた約 50kDa、70kDa の分画も存在することが示された。

マウス胚性幹細胞において同様の実験を行ったところ、約 35kDa の内因性 Sox2 のバンドに加えて、ごく弱い約 50kDa のバンドが観察された。

これらの結果より、AGS 細胞およびマウス胚性幹細胞の内因性 Sox2 の一部は SUMO による修飾を受けていることが示された。

#### 7-4. マウス Oct3/4 のドメイン構造と SUMO 修飾部位の解析

マウス Oct3/4 を、実験方法で示したオリゴ DNA をプライマーとして、マウス F9 細胞から調製した cDNA ライブラリをテンプレートとして増幅し、FLAG タグ発現領域を含んだ pcDNA3 にサブクローニングして pcDNA3 FLAG-Oct3/4 を作成した。シーケンスを、T7 プライマーを用いた PCR で解析し、NCBI の NM\_013633 と相違ないことを確認した。

発現されるタンパク質のアミノ酸配列を検討すると、117-120 番目のアミノ酸に SUMO 修飾のコンセンサス配列が存在した（図 7）。

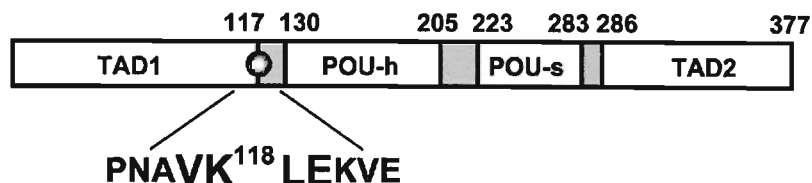


図 7: マウス Oct3/4 の構造。

中央近くに、POU ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを有し、アミノ末端とカルボキシル末端に転写活性化ドメインを持つ。

117-120 番目のアミノ酸配列が、SUMO 修飾標的配列に合致している。

118 番目のリジンが SUMO 修飾の標的と考え、この部分をアルギニンに置換した変異体 Oct3/4 K118R を発現するプラスミド pcDNA3 FLAG-Oct3/4 K118R を部位特異的突然変異作成法 (site-directed mutagenesis) にて作成した。DNA 配列を、再び PCR にて解析した。

それぞれを、単独あるいは SUMO-1 を発現するプラスミド、SUMO 修飾の E2 酵素である Ubc9 とともに HeLa 細胞内で発現させ、細胞溶解液をポリアクリルアミド電気泳動の上ウエスタンブロット法にて解析した（図 8）。

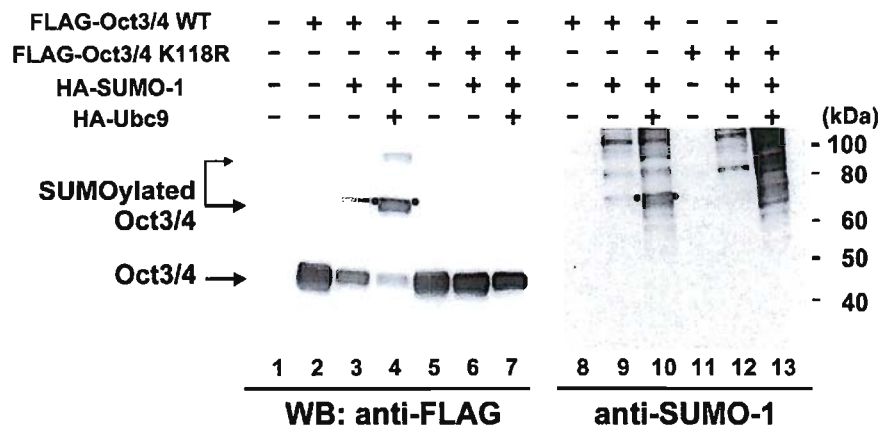


図 8 : HeLa 細胞内過剰発現系における Oct3/4 の SUMO 修飾。

示したプラスミドを HeLa 細胞内で過剰発現させ、細胞溶解液をウエスタンブロット法で解析。抗 FLAG 抗体（レーン 1-7）と抗 SUMO-1 抗体（レーン 8-13）で検出した。

抗 FLAG 抗体で検出すると、pcDNA3 FLAG-Oct3/4 を発現させたレーンでは約 45kDa の部位にバンドが観察された（レーン 2）。

さらに、SUMO-1 を共発現したレーン 3 では、レーン 2 で観察されるバンドに加えて約 70kDa の部位にバンドが観察された。抗 SUMO-1 抗体で同じサンプルを解析したレーン 9 にも同じ高さにバンドが観察されることから、このバンドは SUMO-1 が FLAG-Oct3/4 に共有結合したものによると考えられた。さらに SUMO-1 に加えて Ubc9 を共発現させたレーン 4 およびレーン 10 では、この部位のバンドが増強するとともに約 90kDa の部位にも新たなバンドが観察された。

次に、pcDNA3 FLAG-Oct3/4 K118R を同様に発現させたレーン 5 でも、レーン 2 と同じ高さにバンドが観察された。

しかし、SUMO-1 を共発現させたレーン 6 や SUMO-1 に加えて Ubc9 を共発現させたレーン 7 では、レーン 3 や 4 で観察されたバンドは認められなかった。

これらの結果より、Oct3/4 は細胞内で SUMO による修飾を受けうることに、その修飾には 118 番目のリジンが必須であること、すなわち 118 番目のリジンが SUMO 修飾の標的であることが示された。

## 7-5. 大腸菌内での Oct3/4 の SUMO 修飾

次に、Sox2 と同様の系を用いて、Oct3/4 の SUMO 修飾が大腸菌内でも再現可能かどうかを検討した。

大腸菌用のプラスミドベクター pGEX 4T-Oct3/4 を作成し、単独あるいは pT-E1E2S1 とともに大腸菌内に導入した (図 9)。

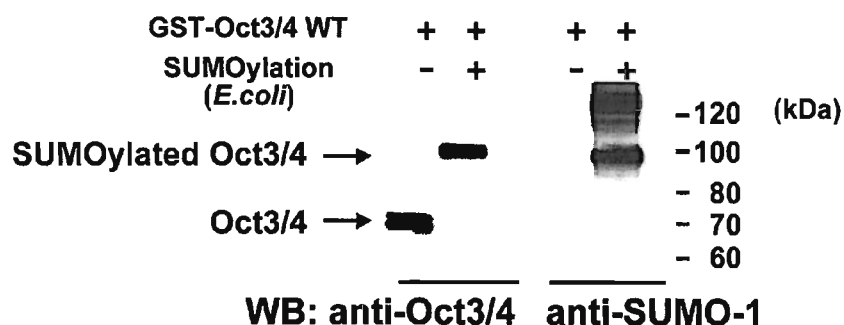


図 9 : 大腸菌内 SUMO 修飾システムによる Oct3/4 の SUMO 修飾。

GST-Oct3/4 を発現させるプラスミドを、単独 (レーン 1、3) および SUMO 修飾プラスミドとともに (レーン 2、4) 大腸菌に導入。発現を誘導し、精製したタンパク質を解析した。

抗 Oct3/4 抗体で検出すると、pGEX 4T-Oct3/4 を単独で導入したものでは、約 70kDa の部位にバンドが観察された (レーン 1)。

さらに、SUMO 修飾プラスミドとともに導入したレーン 2 では、レーン 1 で観察されるバンドに加えて約 95kDa の部位などにバンドが観察された。抗 SUMO-1 抗体で同じサンプルを解析したレーン 4 にも同じ高さにバンドが観察されることから、このバンドは SUMO-1 が GST-Oct3/4 に共有結合したものによると考えられた。

これらの結果より、Oct3/4 は大腸菌内で SUMO による修飾を受けうることが示された。

#### 7-6. 内因性 Sox2 および Oct3/4 の細胞内局在

SUMO 修飾によって細胞内局在が変化するタンパク質が知られている (Ross et al., 2002) ため、Sox2 や Oct3/4 が SUMO 修飾によってその局在に影響を受けるかどうかを解析した。はじめに、内因性 Sox2、Oct3/4 を発現している細胞に関して、蛍光免疫法を用いて細胞内局在を検討した (図 10)。

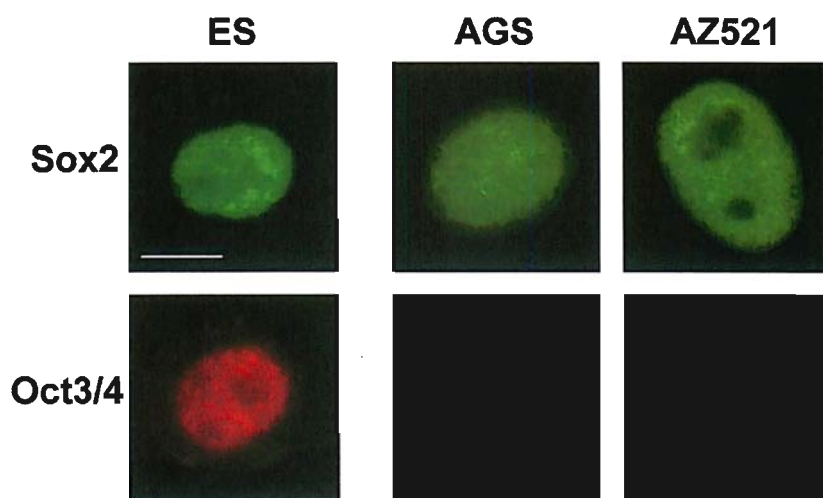


図 10 : マウス胚性幹細胞、AGS、AZ521 胃癌細胞における Sox2、Oct3/4 の局在。それぞれの細胞について抗 Sox2 抗体、抗 Oct3/4 抗体を用いた免疫染色を行った。図中の白線は、 $10\mu\text{m}$ 。

マウス胚性幹細胞では、Sox2、Oct3/4 いずれも発現しており、細胞核内の核小体を除いた部分にび慢性に、顆粒状に局在していた。細胞質には認めなかった。

AGS、AZ521 においては、Sox2 はほぼ同様の局在を示した。しかし Oct3/4 の発現は認めなかった。

#### 7-7. SUMO 修飾の Sox2、Oct3/4 の細胞内局在への影響

次に、Sox2、Oct3/4 の SUMO 修飾が、細胞内局在に影響するかを検討するため、GFP 融合タンパク質を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入し、48 時間後に固定した後に蛍光顕微鏡にて観察を行った (図 11)。

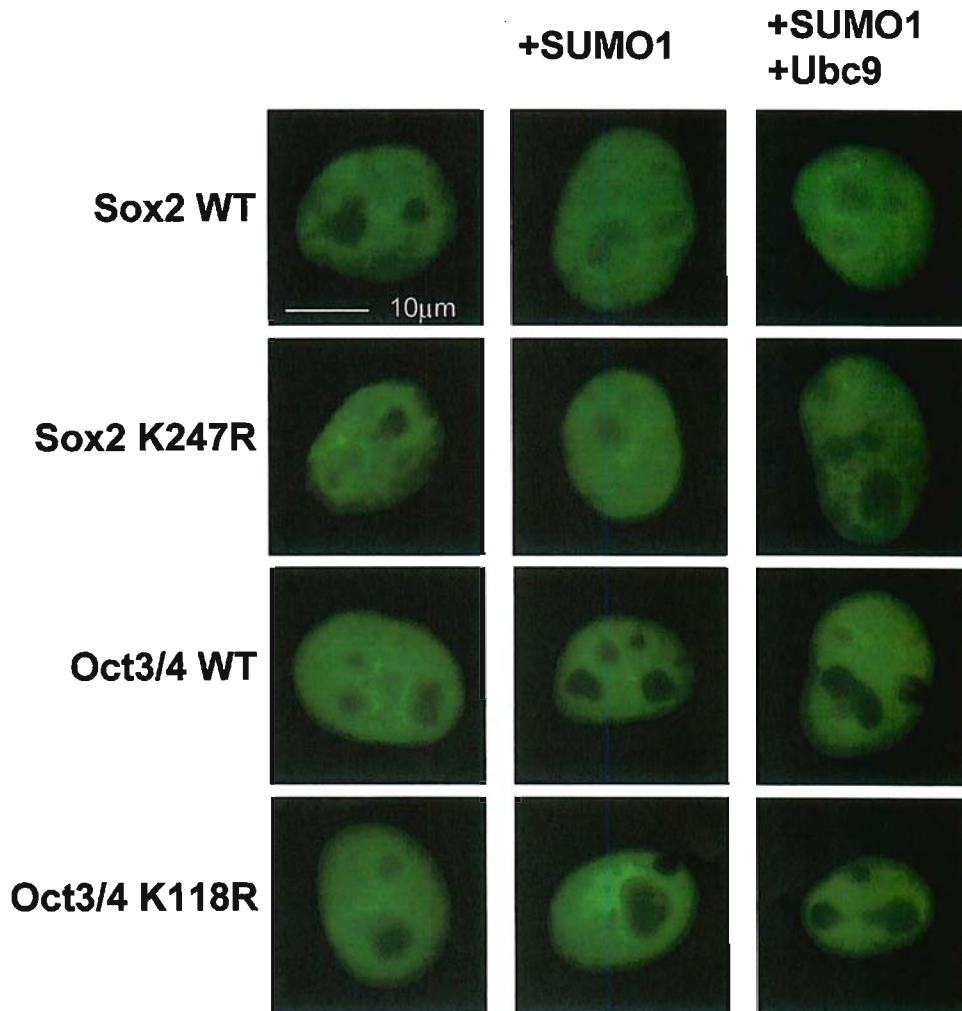


図 11 : SUMO 修飾による Sox2、Oct3/4 の局在への影響。

HeLa 細胞に GFP を結合したそれぞれの発現プラスミドを導入し、細胞内局在を検討した。単独で導入するとともに、図の上で示したように SUMO-1、Ubc9 の発現プラスミドと共発現させ、SUMO 修飾の影響を検討した。

単独で発現させると、GFP-Sox2、GFP-Oct3/4 はいずれも、細胞核内の核小体を除いた部分にび慢性に、顆粒状に局在し、細胞質には認めなかった。これはそれぞれの内因性タンパク質の局在と同様で、GFP 融合による局在変化はないと考えられた。

次に、SUMO-1 および SUMO 修飾 E2 酵素 Ubc9 を図に示したごとく共発現し、Sox2、Oct3/4 の野生型と SUMO 修飾されない変異体の間での局在の相違を検討したが、いずれの場合にも単独で発現した場合とほぼ同様の局在を示した。

このことから、Sox2、Oct3/4 の SUMO 修飾は、それぞれの細胞内局在には影響しないと考えられた。

## 7-8. Sox2 の転写活性における SUMO 修飾の影響

転写因子の中には、SUMO 修飾によって転写活性が制御される例が知られている (Gill, 2003)。Sox2 の転写活性における SUMO 修飾の影響を検討するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。

Sox2 と Oct3/4 によって制御を受ける *FGF4* 遺伝子のエンハンサー領域を組み込んだレポータープラスミド (図 12) を用いて、実験を行った。Oct3/4 も SUMO 修飾を受けることが実験 7-4. で判明した。Sox2 の SUMO 修飾の影響に焦点を当てるため、この系では Oct3/4 K118R を使用した。野生型 Oct3/4 と Oct3/4 K118R の間には、明らかな転写活性の差は認めなかった。

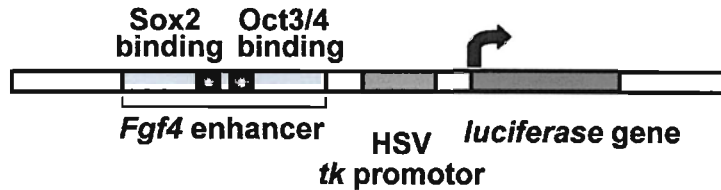


図 12: ルシフェラーゼアッセイに用いたレポータープラスミドの構造

ルシフェラーゼ遺伝子上流に、Herpes Simplex Virus のチミジンキナーゼプロモーターと、*FGF4* 遺伝子のエンハンサー配列を結合したものをを用いた (Niwa et al., 2000)。

まず、野生型 Sox2 と Sox2 K247R を、量を変えながら HeLa 細胞に導入した。

いずれも、Oct3/4 K118R と協調して、転写を活性化した。両者の活性の間に、有意な差は認めなかった (図 13、左の 2 シリーズ)。

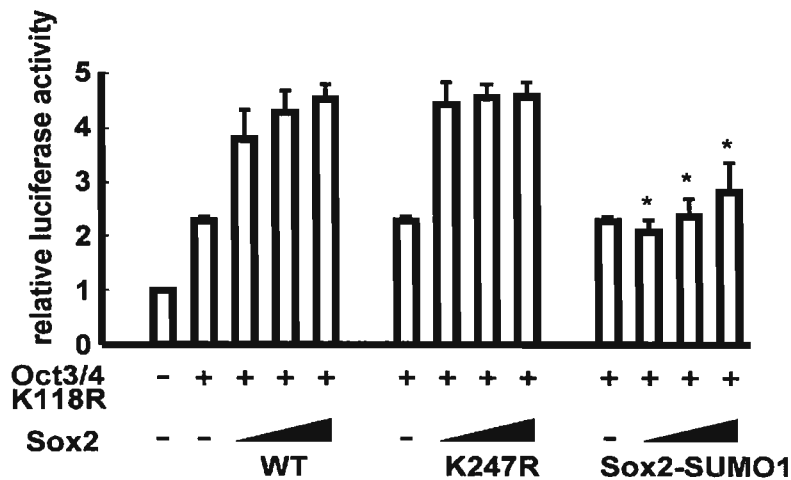


図 13: ルシフェラーゼアッセイの結果 (1)

野生型 Sox2 と Sox2 K247R、さらにカルボキシル末端に SUMO-1 を結合した変異体を、量を変えながら HeLa 細胞に導入した。Oct3/4 K118R も、ともに用いた。



次に、SUMO 修飾の影響を検討するため、図 13 の系に加えて SUMO-1、Ubc9 の発現プラスミドを共発現し、同様の実験を行った (図 14)。

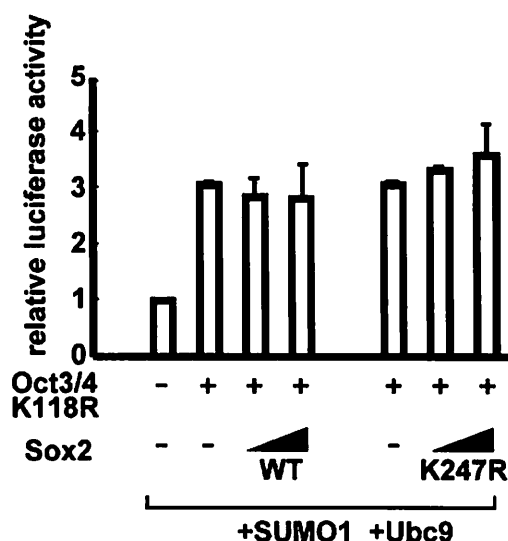


図 14 : ルシフェラーゼアッセイの結果 (2)

図 13 の系に、SUMO-1 および SUMO 修飾 E2 酵素の Ubc9 をともに導入し、HeLa 細胞内で SUMO 修飾が起こりやすい状態で転写活性を検討した。

この状態では、野生型 Sox2 に比べて Sox2 K247R のほうが転写活性が高い傾向を認めた。このことから、SUMO 修飾は Sox2 の転写活性に負の影響を与える可能性が示唆された。

7-1.、7-4 で示したとおり、HeLa 細胞内に SUMO-1、Ubc9 を共発現した場合でも、SUMO 修飾を受ける Sox2、Oct3/4 の全体に占める割合は大きくはなく、大部分は未修飾の状態が存在していた。

SUMO 結合による Sox2 の転写活性への影響をさらに明らかにするため、Sox2 のカルボキシル末端に SUMO-1 を結合した変異体 (Sox2-SUMO1) を作成し、図 13 の系に同様に導入した (図 13、右のシリーズ)。

Sox2-SUMO1 は、野生型 Sox2 および Sox2 K247R に比べて、有意に低い転写活性を示した (ステューデント  $t$  検定、 $P < 0.05$ )

これらの結果から、SUMO の結合は Sox2 の転写活性を負に制御する可能性が示された。

## 7-9. Sox2 の DNA 結合性に対する SUMO 修飾の影響 (EMSA 実験系の確立)

転写因子の中には、SUMO が結合することによってその DNA 結合性が変化するものがある (Anckar et al., 2006)。

Sox2 の転写活性が SUMO 修飾によって負に制御される機構を解明するために、EMSA にて DNA 結合性の変化を検討した。

プローブとして用いるオリゴ DNA には、ルシフェラーゼアッセイのレポータープラスミドと同様に、*FGF4* のエンハンサー配列を 33 塩基長、使用した (図 15)。



図 15 : EMSA に用いた DNA プローブ

ルシフェラーゼアッセイのレポータープラスミド同様、*FGF4* のエンハンサー配列を使用した。

Sox2 の DNA 配列特異的な結合を証明するため、Sox2 認識部分に変異を伴うものもコントロールとして私用した (Fgf4 Sox2Mut)。

アッセイに用いるタンパク質には、大腸菌に発現させたリコンビナントタンパク質を精製して用いた。未修飾の Sox2 (Unmodified(U))、K247 の位置に SUMO 修飾された Sox2 (Modified(U))、さらにカルボキシル末端に SUMO-1 を結合した Sox2 (Fused(F)) を、使用した (図 16)。

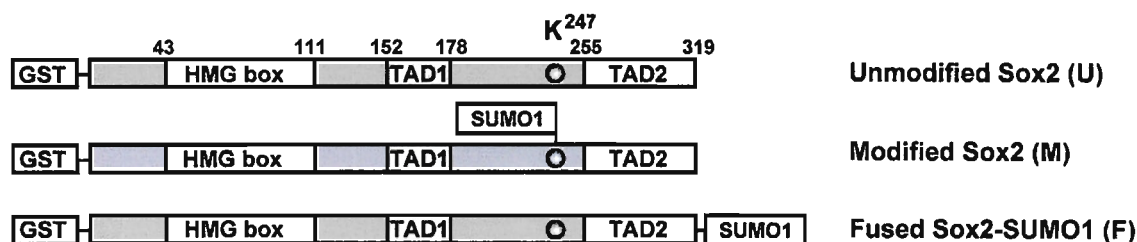


図 16 : EMSA に用いたリコンビナントタンパク質

未修飾の Sox2、大腸菌内で SUMO 修飾した Sox2 に加えて、ルシフェラーゼアッセイの際に作成した、SUMO-1 をカルボキシル末端に結合した変異体も使用した。

## 7-10. Sox2 と DNA の結合性

はじめに U、M、F 3 種類の Sox2 を、野生型の DNA プローブと反応させ、その DNA 結合性を検討した (図 17)。

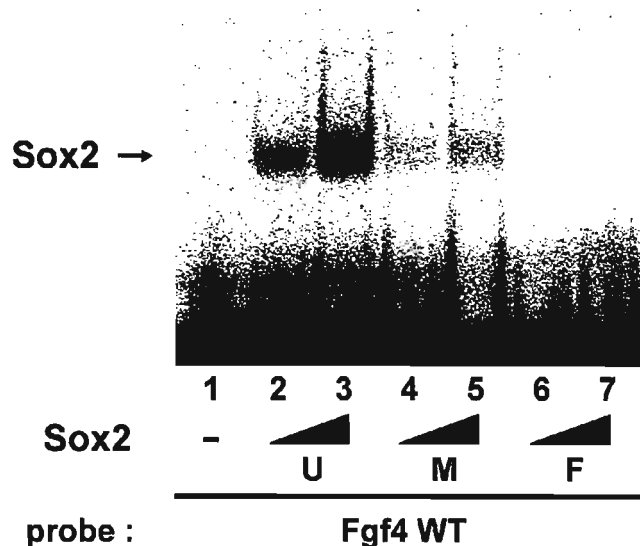


図 17 : Sox2 を単独で DNA プローブと反応させた結果。

U、M、F 3 種類の Sox2 を、それぞれ量を変えて DNA プローブ (野生型) と反応させた後、非変性アクリルアミドゲルで泳動し、オートラジオグラフィで検出した。タンパク質と結合した DNA プローブは、結合していないプローブ (レーン 1) に比べて泳動が遅く、高い位置にバンドが生じる。

リコンビナントタンパク質のうち、U、M を加えたレーンでは、矢印で記した高さにバンドが検出された。

加えるタンパク質を増やすと、バンドは増強した。M は U よりも弱いバンドを示した。

F を加えても、明らかなバンドは検出されなかった。

このことより、未修飾の Sox2 はプローブ DNA に効率よく結合するが、SUMO が結合した Sox2 の結合性は低下すると考えられた。

7-11. Sox2 を Oct3/4 と共に用いた場合の DNA 結合性

次に、Oct3/4 を同時に反応させた場合について検討した (図 18)。

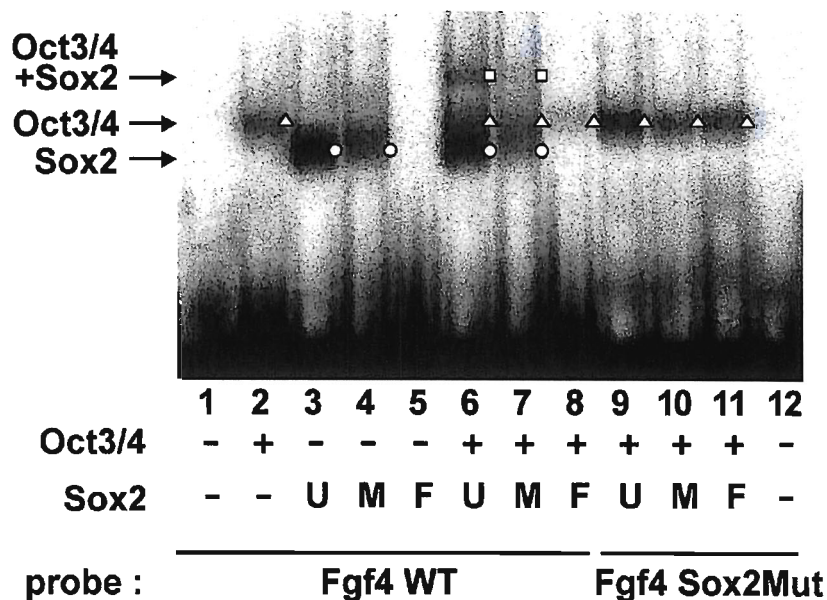


図 18 : Sox2 を Oct3/4 とともに反応させた結果。

U、M、F 3 種類の Sox2 を、Oct3/4 とともに反応させた後に泳動、検出した。

野生型のプローブに加え、Sox2 結合部位に塩基置換を有する変異体プローブも使用した。

未修飾 Sox2 (U) を Oct3/4 とともに野生型プローブと反応させると、Sox2 の結合したバンド (図 丸印) に加えて、Oct3/4 の結合によるバンド (三角印)、さらに Sox2、Oct3/4、DNA の 3 者複合体によるバンド (四角印) が検出された (レーン 6、レーン 2・3 と比較)。変異型プローブを用いると、これらのうち Oct3/4 によるバンドのみが残り、他の 2 本は消失した。このことより、Sox2 の DNA 結合は配列特異的であることと、実験系が適切に働いていることが示された。

SUMO 修飾 Sox2 (M) については、7-10.の結果と同様、U に比較して弱いバンドを検出した。(レーン 7、四角印)

SUMO 結合変異体 Sox2 (F) については、全く結合を認めなかった。(レーン 8)

これらの結果から、SUMO が結合した Sox2 は、Oct3/4 の存在下でも DNA への結合性が低下することが示された。

## 8. 考察

本研究で、細胞内および大腸菌内において、Sox2 が 247 番目のリジンで SUMO 修飾されることを示した。

EMSA の実験から、Oct3/4 の存在下においても、SUMO が結合した Sox2 は DNA 結合性を消失した。すなわち、SUMO 修飾は Sox2 の DNA 結合性を阻害することが明らかになった。

一般的に、転写因子の SUMO 修飾は、その転写活性にいくつかの影響を与える。

- 1) SUMO 修飾によってタンパク質の構造変化が生じる。  
(例：チミン DNA グリコシラーゼ；TDG, Baba et al., 2005)
- 2) SUMO が結合することによって、タンパク質に新しい分子間結合面が生じる。  
(例：Elk-1 が SUMO 修飾され、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 2 を呼び寄せることで転写が抑制される。 Yang et al., 2004)
- 3) SUMO が結合することによって、DNA との結合性を消失する。  
(例：heat shock factor (HSF) 2 Anckar et al., 2006, TDG など)

これらのなかで、HSF2 は、自身の持つ DNA 結合部位そのものに SUMO 修飾を受けることで、その DNA 結合性を失う。この場合、DNA と HSF2 の結合が SUMO 分子によって物理的に直接に阻害されていると考えられる。

一方、今回の Sox2 においては、SUMO が結合するのは DNA 結合部位の HMG ドメインの外であるにもかかわらず、DNA 結合が阻害されている。

このことから、SUMO の結合は、Sox2 に何らかの構造変化を起こすことによって DNA 結合性が失われると推測される。TDG などについてはすでにその構造変化に関して血書構造解析が報告されている。Sox2 についても、同様の解析が待たれるが、その場合に DNA や Oct3/4 との 3 者複合体形成との関連についても考慮が必要であると考えられる。

ある転写因子がすでに DNA に結合していて、SUMO 修飾が新たになされることで DNA から乖離するという事象を考えた場合、その SUMO 修飾の部位が DNA 結合ドメインそのものにあるよりも、今回の Sox2 のようにそれ以外の部分にあったほうが、修飾酵素の結合などの点で自然ではないかと考えられる。

今回、Sox2 の SUMO 修飾に関与する E3 酵素については解析しなかったが、ある生命現象に関わる SUMO 修飾を考える際に、その制御機構は重要と考えられる。

E3 酵素がどういった場合に Sox2 の作用部位にリクルートされ、SUMO 修飾を触媒する

のかは、今後の研究が必要である。

他の既知の転写因子の例と同様、Sox2 のうちのごく一部が SUMO 修飾状態にあった。細胞内の Sox2 のうち、DNA に実際結合しているのはごく一部で、そのうちのさらに一部のみが SUMO 修飾されていると考えられる。

Sox2 が下流の遺伝子を活性化している際には SUMO 修飾を受けずに DNA 結合していて、何らかの機構で Sox2 が不活性化される際に、まず SUMO 修飾によって DNA 結合性が低下し、下流遺伝子の制御配列から乖離すると考えられる。

既知の転写因子の中には、SUMO 修飾を受けることで抑制性の転写因子・転写補助因子をリクルートする例も知られている。Sox2 の細胞内での実際の機構では、DNA 乖離以外にこのような機構が働いている可能性もある。

Sox2 は、Oct3/4、Nanog などと同様、胚性幹細胞の多分化性の主要制御因子である。

Sox2 をコードする *SOX2* 遺伝子上流にも、Sox2・Oct3/4 の結合配列が存在することより、Sox2 の SUMO 修飾による不活性化は、引き続いて Sox2 自身の発現低下による量的抑制を引き起こすことも考えられる。

Oct3/4 や Nanog も Sox2・Oct3/4 による発現制御を受けていることから、Sox2 の SUMO による不活性化がこれら重要因子の発現低下を引き起こす可能性がある。

哺乳類の胚盤胞期には、内部細胞塊にのみ Sox2、Oct3/4、Nanog の発現や未分化性が維持され、周辺の細胞は栄養外胚葉や原始内胚葉に分化していくことが知られている。Sox2 の SUMO 修飾を起こす機構は不明であるが、細胞集団の中である細胞が存在する「場所」の情報が、Sox2 の SUMO 修飾状態を左右し、このような分化の方向付けを行っている可能性がある。

今回の結果や過去の報告から、Sox2 の SUMO 修飾による転写調節機構のモデル図を提案した (図 19)。

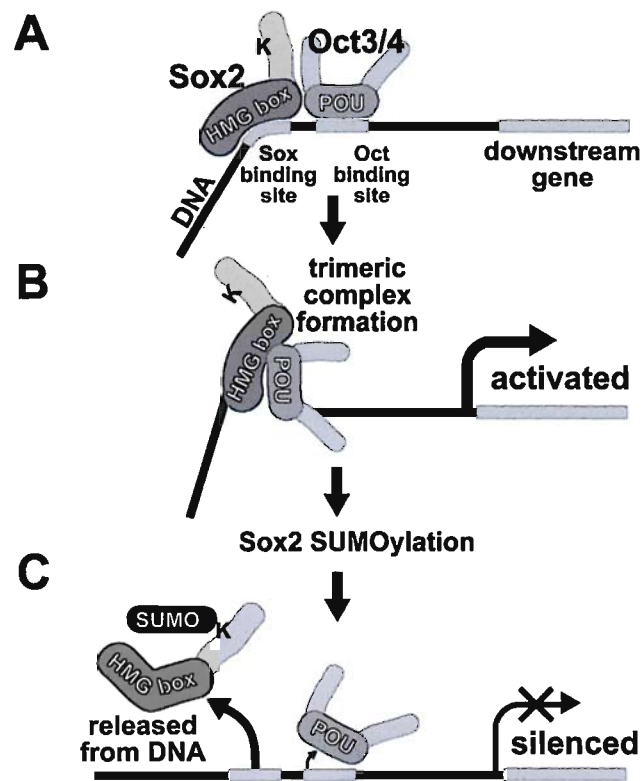


図 19 : Sox2 の SUMO 修飾による転写調節モデル

- (A) Sox2 とそのパートナーの Oct3/4 が、下流遺伝子の調節配列内にある近接した結合サイトに、それぞれの HMG ドメイン、POU ドメインで結合する。
- (B) Sox2 と Oct3/4 との結合が、それぞれの DNA 結合を安定化し、3 者複合体を形成して転写の活性化に働く。
- (C) Sox2 が SUMO 修飾されると、その分子構造が変化し、結果として DNA 結合性が消失する。  
Sox2 の SUMO 修飾は、Oct3/4 の DNA 結合性にも影響する可能性がある。

## 9. 結語

Sox2 の SUMO 修飾は、DNA 結合性の阻害を介してその転写活性を負に制御していることが示唆された。

転写因子の DNA 結合能と機能制御に SUMO 修飾が重要な役割を果たす可能性が示唆された。



## 10. 参考文献

- Ambrosetti, D.C., H.R. Scholer, L. Dailey, and C. Basilico. 2000. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J Biol Chem.* 275:23387-97.
- Anckar, J., V. Hietakangas, K. Denessiouk, D.J. Thiele, M.S. Johnson, and L. Sistonen. 2006. Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol.* 26:955-64.
- Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126-40.
- Baba, D., N. Maita, J.G. Jee, Y. Uchimura, H. Saitoh, K. Sugasawa, F. Hanaoka, H. Tochio, H. Hiroaki, and M. Shirakawa. 2005. Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature.* 435:979-82.
- Bianchi, M.E., and A. Agresti. 2005. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 15:496-506.
- Boiani, M., and H.R. Scholer. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:872-84.
- Botquin, V., H. Hess, G. Fuhrmann, C. Anastassiadis, M.K. Gross, G. Vriend, and H.R. Scholer. 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12:2073-90.
- Brunner, H.G., and H. van Bokhoven. 2005. Genetic players in esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Curr Opin Genet Dev.* 15:341-7.
- Chew, J.L., Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.L. Tam, L.S. Yeap, P. Li, Y.S. Ang, B. Lim, P. Robson, and H.H. Ng. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 25:6031-46.
- Chupreta, S., S. Holmstrom, L. Subramanian, and J.A. Iniguez-Lluhi. 2005. A small

- conserved surface in SUMO is the critical structural determinant of its transcriptional inhibitory properties. *Mol Cell Biol.* 25:4272-82.
- David, G., M.A. Neptune, and R.A. DePinho. 2002. SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem.* 277:23658-63.
- Dohmen, R.J. 2004. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta.* 1695:113-31.
- Fernandez-Lloris, R., N. Osses, E. Jaffray, L.N. Shen, O.A. Vaughan, D. Girwood, R. Bartrons, J.L. Rosa, R.T. Hay, and F. Ventura. 2006. Repression of SOX6 transcriptional activity by SUMO modification. *FEBS Lett.* 580:1215-21.
- Gill, G. 2003. Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr Opin Genet Dev.* 13:108-13.
- Girard, M., and M. Goossens. 2006. Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 580:1635-41.
- Girdwood, D., D. Bumpass, O.A. Vaughan, A. Thain, L.A. Anderson, A.W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N.D. Perkins, and R.T. Hay. 2003. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell.* 11:1043-54.
- Gong, L., S. Millas, G.G. Maul, and E.T. Yeh. 2000. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem.* 275:3355-9.
- Hang, J., and M. Dasso. 2002. Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem.* 277:19961-6.
- Hari, K.L., K.R. Cook, and G.H. Karpen. 2001. The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* 15:1334-48.
- Holmstrom, S., M.E. Van Antwerp, and J.A. Iniguez-Lluhi. 2003. Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15758-63.
- Kagey, M.H., T.A. Melhuish, and D. Wotton. 2003. The polycomb protein Pc2 is a

SUMO E3. *Cell*. 113:127-37.

- Kamachi, Y., M. Uchikawa, and H. Kondoh. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16:182-7.
- Kirsh, O., J.S. Seeler, A. Pichler, A. Gast, S. Muller, E. Miska, M. Mathieu, A. Harel-Bellan, T. Kouzarides, F. Melchior, and A. Dejean. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J.* 21:2682-91.
- Lehembre, F., P. Badenhorst, S. Muller, A. Travers, F. Schweisguth, and A. Dejean. 2000. Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol Cell Biol.* 20:1072-82.
- Li, S.J., and M. Hochstrasser. 1999. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature.* 398:246-51.
- Li, X.L., Y. Eishi, Y.Q. Bai, H. Sakai, Y. Akiyama, M. Tani, T. Takizawa, M. Koike, and Y. Yuasa. 2004. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol.* 24:257-63.
- Nishimoto, M., A. Fukushima, A. Okuda, and M. Muramatsu. 1999. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol.* 19:5453-65.
- Niwa, H., S. Masui, I. Chambers, A.G. Smith, and J. Miyazaki. 2002. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 22:1526-36.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24:372-6.
- Pichler, A., A. Gast, J.S. Seeler, A. Dejean, and F. Melchior. 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell.* 108:109-20.
- Ragge, N.K., B. Lorenz, A. Schneider, K. Bushby, L. de Sanctis, U. de Sanctis, A. Salt,

- J.R. Collin, A.J. Vivian, S.L. Free, P. Thompson, K.A. Williamson, S.M. Sisodiya, V. van Heyningen, and D.R. Fitzpatrick. 2005. SOX2 anophthalmia syndrome. *Am J Med Genet A*. 135:1-7; discussion 8.
- Remenyi, A., K. Lins, L.J. Nissen, R. Reinbold, H.R. Scholer, and M. Wilmanns. 2003. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev*. 17:2048-59.
- Ross, S., J.L. Best, L.I. Zon, and G. Gill. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*. 10:831-42.
- Saitoh, H., and J. Hinchey. 2000. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*. 275:6252-8.
- Sanada, Y.M.Y., Kazuhiro MD, PhD; Ohara, Masahiro MD; Oeda, Mamoru MD; Konishi, Kazuo MD; Tsutani, Yasuhiro MD. 2006. Histopathologic Evaluation of Stepwise Progression of Pancreatic Carcinoma with Immunohistochemical Analysis of Gastric Epithelial Transcription Factor SOX2: Comparison of Expression Patterns between Invasive Components and Cancerous or Nonneoplastic Intraductal Components. *Pancreas*. 32:164-170.
- Savare, J., N. Bonneaud, and F. Girard. 2005. SUMO represses transcriptional activity of the Drosophila SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell*. 16:2660-9.
- Schmidt, D., and S. Muller. 2002. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:2872-7.
- Shiio, Y., and R.N. Eisenman. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13225-30.
- Taylor, K.M., and C. Labonne. 2005. SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation. *Dev Cell*. 9:593-603.
- Tojo, M., K. Matsuzaki, T. Minami, Y. Honda, H. Yasuda, T. Chiba, H. Saya, Y. Fujii-Kuriyama, and M. Nakao. 2002. The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem*.

277:46576-85.

- Tsukamoto, T., K. Inada, H. Tanaka, T. Mizoshita, M. Mihara, T. Ushijima, Y. Yamamura, S. Nakamura, and M. Tatematsu. 2004. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130:135-45.
- Uchimura, Y., M. Nakamura, K. Sugasawa, M. Nakao, and H. Saitoh. 2004. Overproduction of eukaryotic SUMO-1- and SUMO-2-conjugated proteins in *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* 331:204-6.
- Wilson, M., and P. Koopman. 2002. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev.* 12:441-6.
- Yang, S.H., and A.D. Sharrocks. 2004. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell.* 13:611-7.