

Title	SUMO修飾による相分離を介した細胞核構築プログラム
Sub Title	Nuclear organization through SUMOylation-mediated phase separation
Author	村野, 健作(Murano, Kensaku)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2024
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	ゲノムの膨大な領域を占めることから、転移因子 (トランスポゾン) が構築するヘテロクロマチンは細胞核構造・機能の骨格を成す。一方で、転移と増殖を繰り返すため生命の次世代継承にとって脅威である。ショウジョウバエ卵巣におけるPiwi-piRNA複合体は、piRNAの配列情報と相補的なトランスポゾンの新生RNAを認識し、トランスポゾンの周辺にメチル化ヒストンH3 (H3K9me3) を特徴とする高度に凝集したヘテロクロマチンを形成することで転写反応を抑制する。この解析過程で、SUMO(small ubiquitin-like modifier)修飾が極めて重要であることを見出した。SUMOノックダウンによってレトロトランスポゾンmdg1は100倍以上脱抑制することから、SUMO修飾によるトランスポゾン抑制効果は非常に高い。また、SUMO修飾のE3酵素であるSu(var)2-10もトランスポゾン抑制に関与する。しかしながら、トランスポゾン抑制に関わるSUMO修飾の標的タンパク質の多くは不明である。 SUMO修飾を受けるタンパク質の網羅的同定を目指し、3Flag-SUMO-T86Rおよび3Flag-SUMO-T86K変異体をDoxycycline (Dox)によって誘導発現可能な培養細胞株を構築した。86番目のThr残基をArg残基あるいはLys残基に置換したSUMO変異体では、トリプシンやLys-Cによるタンパク質分解によって、SUMO修飾部位を含む枝状ペプチドを生ずる。この枝状ペプチドは質量分析に適した分子量を持つことから、網羅的なSUMO修飾部位の同定が可能となる。タンパク質分解によって生じた枝状ペプチドを抗GGK抗体によって精製し、質量分析を行ったところ、多数のSUMO修飾部位を同定した。生化学的な解析からショウジョウバエのSUMOタンパク質はPoly-SUMO修飾は存在しないとされていた。しかし、我々の質量分析の結果から、SUMOタンパク質自体がSUMO修飾を受けていることがわかった。現在、トランスポゾン抑制におけるPoly-SUMO修飾の役割について解析している。 Due to its extensive presence in the vast regions of the genome, heterochromatin constructed by transposable elements (transposons) constitutes the structural and functional framework of the cell nucleus. Conversely, the repetitive transposition and proliferation pose a threat to the inheritance of life in subsequent generations. In the ovaries of Drosophila, the Piwi-piRNA complex recognizes nascent RNAs from transposons using the sequence information of piRNA. It forms highly aggregated heterochromatin featuring methylated histone H3 (H3K9me3) around transposons, thereby suppressing transcription reactions. In the course of this analysis, the significance of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) modification was found to be crucial. Since retrotransposon mdg1 is de-repressed more than 100-fold by SUMO knockdown, the transposon repression effect of SUMO modification is significant. Su(var)2-10, the E3 enzyme of SUMO modification, is also involved in transposon repression. However, many target proteins modified with SUMO protein related to transposon suppression remain unknown. To achieve comprehensive identification of SUMO-modified proteins, we constructed cultured cell lines inducibly expressing 3Flag-SUMO-T86R or 3Flag-SUMO-T86K mutants by using Doxycycline. The mutants, in which the 86th Thr residue is replaced with Arg or Lys residues, generate branched peptides containing the SUMO modification site upon protein degradation by trypsin or Lys-C. These branched peptides, possessing molecular weights suitable for mass analysis, enable the identification of SUMO modification sites comprehensively. The branched peptides generated by protease treatment were purified by anti-GGK antibodies, followed by conducting mass analysis, revealing numerous SUMO modification sites. Biochemical analysis had previously suggested the absence of Poly-SUMO modification in Drosophila. However, our mass analysis results indicated that SUMO proteins themselves undergo SUMO modification. Currently, we are analyzing the role of Poly-SUMO modification in transposon suppression.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20230001-0045

2023年度 福澤基金研究補助研究成果実績報告書

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	専任講師	補助額	1,500千円
	氏名	村野 健作	氏名（英語）	Kensaku Murano		
研究課題（日本語）						
SUMO修飾による相分離を介した細胞核構築プログラム						
研究課題（英訳）						
Nuclear organization through SUMOylation-mediated phase separation						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
村野健作（Kensaku Murano）		医学部・分子生物学教室・専任講師				
1. 研究成果実績の概要						
ゲノムの膨大な領域を占めることから、転移因子（トランスポゾン）が構築するヘテロクロマチンは細胞核構造・機能の骨格を成す。一方で、転移と増殖を繰り返すため生命の次世代継承にとって脅威である。ショウジョウバエ卵巣におけるPiwi-piRNA複合体は、piRNAの配列情報と相補的なトランスポゾンの新生RNAを認識し、トランスポゾンの周辺にメチル化ヒストンH3（H3K9me3）を特徴とする高度に凝集したヘテロクロマチンを形成することで転写反応を抑制する。この解析過程で、SUMO(small ubiquitin-like modifier)修飾が極めて重要であることを見出した。SUMOノックダウンによってレトロトランスポゾンmdg1は100倍以上脱抑制することから、SUMO修飾によるトランスポゾン抑制効果は非常に高い。また、SUMO修飾のE3酵素であるSu(var)2-10もトランスポゾン抑制に関与する。しかしながら、トランスポゾン抑制に関わるSUMO修飾の標的タンパク質の多くは不明である。 SUMO修飾を受けるタンパク質の網羅的同定を目指し、3Flag-SUMO-T86Rおよび3Flag-SUMO-T86K変異体をDoxycycline（Dox）によって誘導発現可能な培養細胞株を構築した。86番目のThr残基をArg残基あるいはLys残基に置換したSUMO変異体では、トリプシンやLys-Cによるタンパク質分解によって、SUMO修飾部位を含む枝状ペプチドを生ずる。この枝状ペプチドは質量分析に適した分子量を持つことから、網羅的なSUMO修飾部位の同定が可能となる。タンパク質分解によって生じた枝状ペプチドを抗GGK抗体によって精製し、質量分析を行ったところ、多数のSUMO修飾部位を同定した。生化学的な解析からショウジョウバエのSUMOタンパク質はPoly-SUMO修飾は存在しないとされていた。しかし、我々の質量分析の結果から、SUMOタンパク質自体がSUMO修飾を受けていることがわかった。現在、トランスポゾン抑制におけるPoly-SUMO修飾の役割について解析している。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
Due to its extensive presence in the vast regions of the genome, heterochromatin constructed by transposable elements (transposons) constitutes the structural and functional framework of the cell nucleus. Conversely, the repetitive transposition and proliferation pose a threat to the inheritance of life in subsequent generations. In the ovaries of Drosophila, the Piwi-piRNA complex recognizes nascent RNAs from transposons using the sequence information of piRNA. It forms highly aggregated heterochromatin featuring methylated histone H3 (H3K9me3) around transposons, thereby suppressing transcription reactions. In the course of this analysis, the significance of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) modification was found to be crucial. Since retrotransposon mdg1 is de-repressed more than 100-fold by SUMO knockdown, the transposon repression effect of SUMO modification is significant. Su(var)2-10, the E3 enzyme of SUMO modification, is also involved in transposon repression. However, many target proteins modified with SUMO protein related to transposon suppression remain unknown. To achieve comprehensive identification of SUMO-modified proteins, we constructed cultured cell lines inducibly expressing 3Flag-SUMO-T86R or 3Flag-SUMO-T86K mutants by using Doxycycline. The mutants, in which the 86th Thr residue is replaced with Arg or Lys residues, generate branched peptides containing the SUMO modification site upon protein degradation by trypsin or Lys-C. These branched peptides, possessing molecular weights suitable for mass analysis, enable the identification of SUMO modification sites comprehensively. The branched peptides generated by protease treatment were purified by anti-GGK antibodies, followed by conducting mass analysis, revealing numerous SUMO modification sites. Biochemical analysis had previously suggested the absence of Poly-SUMO modification in Drosophila. However, our mass analysis results indicated that SUMO proteins themselves undergo SUMO modification. Currently, we are analyzing the role of Poly-SUMO modification in transposon suppression.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）		発表課題名 （著書名・演題）		発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）		学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）