

論文内容の要旨

申請者氏名 Nur Ayunie Binti Zulkepli

SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)化修飾は基質タンパク質の活性や細胞内局在に変化を与えることで多様な生命現象に關与する。Protein Kinase A (PKA)はGタンパク質共役受容体(GPCR)-ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質 (Gタンパク質)の下流で活性制御されるリン酸化酵素である。当研究室の先行研究で、哺乳動物細胞内においてPKAの活性化が全体的なSUMO化修飾の亢進を引き起こすことが示されたが、具体的な基質タンパク質やSUMO化修飾がもたらす影響は不明であった。本研究では、PKAシグナル依存的にSUMO化修飾されるタンパク質として cyclase associated actin cytoskeleton regulatory protein 1 (CAP1)を同定し、PKA依存的なCAP1のSUMO化が細胞の遊走を促進することを見出した。

まず初めに、哺乳動物細胞においてPKAの活性化によりSUMO化修飾されるタンパク質を質量分析法により網羅的に探索した。その結果、PKA依存的にSUMO1、SUMO3修飾されるタンパク質候補群が数百個同定され、その中の一つであるCAP1を解析した。過剰発現、及び内在性CAP1がSUMO化修飾されることを確認し、SUMO3よりSUMO1修飾されやすいことが分かった。一方、CAP1上の348番目のリシンをアルギニンに置換した変異体 (K348R)は殆どSUMO化されなかった。これらの結果から、CAP1は348番目のリシン残基にSUMO1修飾を受けることが示唆された。

次に、PKA依存的なCAP1のSUMO化修飾機構を解析した。アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンの処理や活性型PKAの発現によりCAP1はSUMO化修飾されるが、酵素活性欠失型PKAはSUMO化を促進しなかった。また、PKA阻害剤処理はPKAによるCAP1のSUMO化を抑制した。さらに、抗PKAリン酸化認識抗体を用いて、PKAの活性化によりCAP1のリン酸化が亢進することが分かった。これらの結果から、PKAがCAP1をリン酸化しSUMO化修飾を促進することが示唆された。

次に、SUMO化CAP1の機能的な役割を調べた。CAP1は細胞遊走に介在するアクチンの動態を制御することから、SUMO化CAP1が細胞の遊走能に及ぼす影響を検討した。その結果、PKAによりSUMO化されたCAP1はヒト子宮頸がん由来HeLa細胞の遊走を促進することが分かった。一方、CAP1/K348R変異体は遊走を促進しなかった。また、PKAによりSUMO化されたCAP1は細胞膜近傍へ局在し、そこにF-アクチンを集積させることが分かった。さらにPKA依存的にSUMO化されたCAP1はG-アクチンからF-アクチンへの転換を促進し、F-アクチンと相互作用することが示された。

以上の結果から、PKAによりリン酸化されたCAP1はSUMO1化修飾を受けて、細胞膜近傍でF-アクチンの動態を制御し、細胞の遊走を促進することが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Nur Ayunie Binti Zulkepli

翻訳後修飾の一つである SUMO 化は、修飾されるタンパク質の構造、機能、細胞内局在を変えることで細胞が内外の環境変化に適応する一端を担っており、現在までに多くのターゲットタンパク質が同定されている。PKA は G タンパク質シグナルの下流で働くリン酸化酵素であり、基質タンパク質群を介して様々な生命現象に介在する。しかし、PKA と SUMO 化の関係は不明であり、PKA シグナルによる SUMO 化修飾制御機構の解明は、新規の細胞内シグナルネットワークの発見に繋がる。

申請者は、哺乳動物細胞において PKA シグナルにより SUMO 化修飾されるタンパク質を網羅的に探索し、CAP1 を同定した。その後、過剰発現及び内在性 CAP1 が SUMO 化修飾を受けること、CAP1 には SUMO3 より SUMO1 が付加され易いこと、CAP1 の 348 番目のリシン残基が SUMO 化修飾を受けることを示した。これらの結果は、CAP1 の 348 番目のリシン残基に SUMO1 が付加されることを示唆する。

また申請者は、PKA 依存的な CAP1 の SUMO 化修飾機構を解析し、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンの処理や活性化型 PKA の発現が CAP1 の SUMO 化修飾を促進するが、PKA 阻害剤処理は PKA による CAP1 の SUMO 化を抑制することを示した。さらに、PKA のリン酸化基質を認識する特異抗体を用いて、PKA が CAP1 をリン酸化することを示した。これらの結果は、PKA が CAP1 をリン酸化し、その SUMO 化修飾を促進することを示唆する。

さらに申請者は PKA 依存的に SUMO 化修飾された CAP1 が細胞機能に及ぼす影響を調べた。CAP1 が細胞遊走に介在するアクチンの動態を制御するという知見を元に、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いてアクチン動態と細胞の遊走を検証した。その結果、PKA 依存的に SUMO 化された CAP1 は細胞膜近傍へ局在し F-アクチンを集積させること、さらに細胞遊走を促進することを見出した。また、SUMO 化された CAP1 が G-アクチンから F-アクチンへの重合を促し、F-アクチンと相互作用することを示した。

これらの結果から申請者は、PKA によりリン酸化された CAP1 が SUMO1 化修飾を受けることで細胞膜近傍へ移動し、そこで F-アクチンと結合してその動態を制御し、結果として細胞の遊走を促進するというモデルを提唱した。本研究により、PKA シグナルと SUMO 化修飾という二つの翻訳後修飾の新たなクロストークが示された。また、本研究で提示された PKA シグナル依存的な細胞遊走の新たな分子機構は今後のがん細胞の遊走メカニズムの解明に向けて重要な知見となる。

以上のように、本論文は G タンパク質-PKA シグナルが CAP1 の SUMO 化修飾を制御するという新規の知見を提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。