

# 知識天地

## 揭示 SUMO 蛋白質修飾化 (sumoylation) 抑制轉錄因子活性的分子機制

施修明 (生醫所副研究員)

近 20 年來，科學家投注了許多心力研究細胞如何調控基因的表現。細胞內基因的正確表現與生物體的健康息息相關；許多疾病的發生，都是因為基因表現異常所致。隨著外在環境的改變，細胞藉由各式各樣的轉錄因子與輔因子來調控基因的表現。而這些因子活化或抑制基因表現的能力常常會受到其本身的蛋白質修飾所影響。因此本實驗室致力於研究新穎的輔因子以及蛋白質修飾對於某些轉錄因子與輔因子調節基因表現能力的影響。

Small ubiquitin-like modifier (SUMO) 是近年來被發現數種與 ubiquitin 相類似的蛋白質之一。它可經由類似 ubiquitination 的過程而與目標蛋白質上特定的 lysine 支鏈形成共價鍵，而修飾目標蛋白質，這個過程稱為 SUMOylation。多種基因轉錄因子、訊息傳遞分子及病毒蛋白已被證實會被 SUMO 修飾；與 ubiquitination 不同的是，SUMOylation 不會促進其目標蛋白質的降解。已知 SUMOylation 的功能包括：1. 影響蛋白質間的交互作用。2. 改變蛋白質於細胞內座落的位置。3. 增加蛋白質的穩定性。在哺乳動物的系統中，有許多參與基因表現的蛋白質 (包括 transcriptional activators、repressors、coactivators 與 corepressors) 被報導會被 SUMO 修飾；SUMO 修飾上述蛋白質後，大多會抑制基因的轉錄。至於 SUMO 修飾究竟如何去抑制基因的轉錄，仍有待進一步的研究與釐清。

本實驗室近幾年專注於研究 Daxx 這個新穎的輔因子。它最初被認為是一個參與細胞凋亡的訊息傳遞分子，後來又被發現具有抑制基因表現的能力，是一個基因轉錄輔因子。本實驗室最近發現 Daxx 會與被 SUMO 修飾後的 androgen receptor、Smad4 與 CBP 相結合，並且參與 SUMO 修飾所造成的抑制現象。這些研究，對於 SUMO 修飾如何抑制基因轉錄提供了一些解釋，以下將詳細說明 Smad4 及 CBP 兩項研究的內容。

### Daxx 參與 SUMO 修飾 Smad4 調控 TGF- $\beta$ 訊息傳導的分子機制

TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) 可以調控細胞增生、細胞分化、細胞移動及細胞凋零等功能。Smad 蛋白家族之角色是細胞內負責將 TGF- $\beta$  刺激所產生的訊息傳遞至細胞核的訊息傳遞者，當細胞膜上的 TGF- $\beta$  接受器在接收刺激後，將 Smad 蛋白加以磷酸化，而磷酸化後的 Smad 蛋白便將 TGF- $\beta$  之訊息從細胞膜傳遞入細胞核內，進而引發下游基因之運作。Smad 蛋白家族中共有八個成員，每一成員在傳遞 TGF- $\beta$  所發出之訊息中各自擔負其特有的角色；其中，Smad4 因為可以和其他的 Smad 蛋白形成複合體，有效地達成傳遞任務，而居關鍵性地位。在人類的癌症研究中發現，若 Smad4 基因發生突變，將伴隨著癌症的發生，因此 Smad4 被視為抑癌基因，大約 49% 的胰臟癌、22% 的大腸直腸癌和 13% 的肺癌顯示，其與 Smad4 的突變有關。因此，若調節 Smad4 蛋白在細胞中的功能，便可以進一步抑制癌症的生成。

我們由細胞內或細胞外的實驗中證明了 Smad4 蛋白的 Lys<sup>159</sup> 與 Lys<sup>113</sup> 位置可以被 SUMO 蛋白修飾，而如果 SUMO 蛋白修飾在 Lys<sup>159</sup> 上，將抑制 TGF- $\beta$  訊息傳導所調控基因的表達，因此可以清楚地知道在 TGF- $\beta$  訊息傳導中，Smad4 蛋白的 SUMOylation 扮演了抑制的角色。由螢光染色分析中發現，Smad4 蛋白的 SUMOylation 所造成對 TGF- $\beta$  訊息傳導之抑制，並非導因於 Smad4 蛋白無法進入細胞核執行功能，而是因為 Daxx 蛋白藉由其 C 端與 Smad4 蛋白作用，並造成對 TGF- $\beta$  訊息傳導的抑制。由各種實驗的分析讓我們了解到，Smad4 蛋白的 Lys<sup>159</sup> 位置是否被 SUMO 蛋白修飾，是決定 Smad4 蛋白能否與 Daxx 蛋白作用的重要因子；因此，當我們將 Lys<sup>159</sup> 置換成 Arg 時，因為 SUMO 蛋白無法在此位置進行修飾，進而造成 Daxx 蛋白無法與 Smad4 蛋白相結合，使得 Daxx 蛋白對 TGF- $\beta$  訊息傳導無法產生抑制效果，我們更進一步地藉由核染色質免疫沉澱分析 (ChIP assay) 及 RNA 干擾技術 (RNA interfering) 降低 Daxx 蛋白的表現，證實 Daxx 蛋白是藉由與被 SUMO 蛋白修飾的 Smad4 蛋白作用，進而達到抑制 TGF- $\beta$  訊息傳導的功能。

綜合言之，我們的發現提供了一個經由調節 Smad4 蛋白的 SUMO 蛋白修飾作用，來達成調控 TGF- $\beta$  訊息傳導的分子機制。

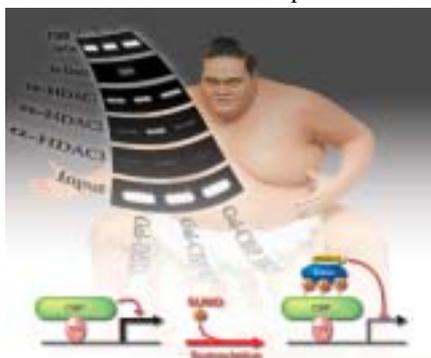
## Daxx 參與 SUMO 修飾 CBP 所造成的抑制現象

CREB-binding protein (CBP) 是一個具有多重功能的 transcriptional coactivator。最初 CBP 被發現是 CREB 的 coactivator, 當 CREB 這個轉錄因子被 PKA 磷酸化後, CBP 與 CREB 的結合力會變強, 因而被 CREB 徵召到 promoter 附近, 並增進 CREB 所活化的基因的表現。後來, 陸陸續續發現 CBP 還是許多重要的轉錄因子, 如 p53、STAT1、p65 的 coactivator。已知 CBP 會被磷酸基與甲基所修飾, 而且這兩種蛋白質修飾都會影響 CBP 活化基因表現的能力。由於 SUMOylation 是一個較為新穎的蛋白質修飾的機制, 因此我們很好奇, CBP 是否也會被 SUMO 修飾, 而 SUMO 修飾又會如何影響 CBP 的活性。

首先, 我們觀察到由細胞萃取液中純化得到的 CBP 在試管中會被純化的 SUMOylation machinery 所修飾; 這項實驗結果顯示, CBP 確實具有被 SUMO 修飾的能力。我們進一步利用可專一性辨認 SUMO-1 的抗體, 在 Western 的實驗中證實, 由細胞萃取液中純化得到的 CBP 有一部分的 CBP 蛋白是被 SUMO-1 所修飾的; 這顯示細胞中的 CBP 確實是會被 SUMO-1 所修飾的。接著, 我們運用點突變的策略, 嘗試尋找 CBP 上的哪些 lysine residues 會被 SUMO-1 修飾。我們發現 Lys<sup>999</sup>、Lys<sup>1034</sup>、Lys<sup>1057</sup> 是 CBP 主要的 SUMOylation 位置。得到了這些 CBP 的 SUMOylation mutants 後, 我們於報導基因( Reporter gene assay )及 quantitative RT-PCR 的實驗中證實 SUMOylation 會抑制 CBP 本身活化基因表現的能力, 也會抑制 CBP 去 coactivate 其他轉錄因子 (如 STAT1) 活化基因的能力。

由於我們實驗室之前的研究顯示, Daxx 具有與 SUMO 或被 SUMO 所修飾的蛋白質相結合的能力, 因此我們很想瞭解 Daxx 是否會與被 SUMO 所修飾的 CBP 相結合, 並且在 SUMOylation 所造成的抑制現象中扮演角色。我們運用數種實驗方法, 包括 yeast two-hybrid assay、mammalian two-hybrid assay、in vitro pull-down assay 以及 ChIP assay, 結果都顯示 Daxx 只有在 CBP 被 SUMO 修飾後, 才會與 CBP 相結合。由於已知 Daxx 具有抑制某些轉錄因子的能力, 我們也想瞭解 Daxx 是否會抑制 CBP 的活性。報導基因( Reporter gene assay )的實驗結果證實, Daxx 確實會抑制 CBP 的活性, 而 CBP 的 SUMOylation mutant 則不會被 Daxx 所抑制。這顯示 Daxx 在 SUMOylation 抑制 CBP 活性的過程中扮演了重要的角色。

細胞核中的 DNA 藉由纏繞於組蛋白上, 得以形成較為緻密與有組織的結構。由於 DNA 與組蛋白這種密切的關係, 組蛋白上的蛋白質修飾在基因表現的調控上也扮演重要的角色。一般而言, 若 promoter 附近的組蛋白乙醯化的程度較高, 則該部位的結構較為鬆散, 有利於基因的表現。換言之, 若 promoter 附近的組蛋白乙醯化的程度較低, 則該部位的結構較為緻密, 不利於基因的表現。有許多蛋白質具有對組蛋白進行去乙醯化的能力, 如 HDAC1、HDAC2 與 HDAC3, 他們具有降低組蛋白乙醯化程度的能力, 因此被認為是 transcription corepressor。Daxx 透過何種機制抑制 CBP 的活性呢? 我們以 ChIP assay 的方法來探討這個問題, 看看 Daxx 是否可能徵召某些 HDAC 蛋白到 CBP 附近的 promoter。在我們觀察的三種 HDAC 蛋白中, 只有 HDAC2 被徵召到 CBP 附近的 promoter 是與 Daxx 有關的, 而其他兩種 HDAC 蛋白則不受 Daxx 的影響。綜合上述的實驗結果, 我們認為 SUMO 修飾 CBP 被後, 可藉由 Daxx 徵召 HDAC2 到 promoter 附近而抑制其活性 (圖一)。



圖一、CBP 本身不具有 DNA binding domain, 但是它會被許多不同的轉錄因子 (TFs) 徵召而來到 promoter 附近, 並協助基因表現的活化。CBP 被 SUMO 修飾後會與 Daxx 相結合, 透過 HDAC2 的作用活化基因表現的能力因而降低。

Publication:

1. Chang, CC, Lin, DY, Fang, HI, Chen, RH, and Shih, H.-M. "Daxx mediates the SUMO-dependent transcriptional repression of Smad4", 2005, J. Biol. Chem. 280: 10164-10173.
2. Kuo, HY, Chang, CC, Jeng, JC, Hu, HM, Lin, DY, Maul, GG, Kwok, RPS, and Shih, H.-M. "SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-Binding Protein via the recruitment of Daxx", 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 16973-16978.