

Title	Mechanisms underlying necdin-induced regulation of PIAS1 SUMO E3 ligase
Author(s)	Gur, Ibrahim
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/54033">https://doi.org/10.18910/54033</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## Abstract of Thesis

Name ( Ibrahim Gur )	
Title	Mechanisms underlying necdin-induced regulation of PIAS1 SUMO E3 ligase ( NecdinによるPIAS1 SUMO E3リガーゼの調節機構 )
Abstract of Thesis	
<p>Necdin is a pleiotropic protein that promotes differentiation and survival of mammalian neurons. Necdin is expressed abundantly in postmitotic neurons and interacts with many nuclear proteins such as E2F family proteins, p53, hypoxia-inducible proteins, Bmi-1, Sirtuin1, and FoxO1. Necdin is a member of MAGE (melanoma antigen) family proteins that share a highly conserved MAGE homology domain. It has previously been reported that several MAGE proteins interact with ubiquitin E3 ligases and modulate their activities. However, it remains unknown whether necdin and its related MAGE family proteins interact with SUMO (small ubiquitin-like modifier) E3 ligases such as PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) family, Nsmce2/Mms21 and Cbx4/Pc2. In the present study, we investigated whether necdin interacts with these SUMO E3 ligases. We first examined whether necdin and other MAGE proteins (necdin-like 2, MAGED1, MAGEF1, MAGEL2) interact with three known SUMO E3 ligases PIAS1, Nsmce2, and Cbx4. Co-immunoprecipitation analysis revealed that necdin, MAGED1, MAGEF1 and MAGEL2 bound to PIAS1 but not to Nsmce2 or Cbx4. These SUMO E3 ligases bound to MAGEA1 but failed to interact with necdin-like 2 (MAGEG1). Necdin bound via its hydrophobic pocket domain to PIAS1 central domains including PINIT (Pro-Ile-Asn-Ile-Thr)-motif and RING (Really Interesting New Gene) domains, which are highly conserved among PIAS family proteins and indispensable for the catalytic activity. We then examined the effects of necdin on the SUMOylation activity of PIAS1. Necdin suppressed PIAS1-dependent SUMOylation of the substrates STAT1 and PML (promyelocytic leukemia protein). Moreover, necdin strongly suppressed the effects of PIAS1 on the transcriptional activities of p53 and PML. In co-transfection assays, PIAS1 protein levels were markedly reduced by co-expressed necdin, and the reduction of PIAS1 levels was relieved in the presence of the proteasome inhibitor MG132. Furthermore, necdin markedly promoted degradation of PIAS1 via the ubiquitin-proteasome pathway. In transfected HEK293A cells, Nand C-terminally truncated PIAS1 mutants bound to necdin but failed to undergo necdin-dependent ubiquitination, indicating that the N- and C-terminal domains intramolecularly regulate ubiquitination. Because the N-terminus of PIAS1 contains the SAP (SAF-Acinus-PIAS) domain that interacts with the nuclear matrix, we examined whether N- and C-terminal deletions of PIAS1 affect its association with the nuclear matrix. Both PIAS1 and necdin were associated with the nuclear matrix, to which the PIAS1 terminal deletion mutants failed to localize, implying that the nuclear matrix is indispensable for necdin-dependent ubiquitination of PIAS1. Furthermore, lentivirus-mediated necdin overexpression in H1299 cells reduced endogenous PIAS1 protein levels and decreased proliferation rates.</p> <p>The present study has demonstrated that necdin suppresses the function of PIAS1 both by inhibiting its SUMO E3 ligase activity and by promoting ubiquitin-dependent degradation. Protein SUMOylation levels are high in neural stem cells, in which PIAS1 expression is upregulated. Expression of necdin is low in neural stem/progenitor cells and upregulated during neuronal differentiation. These findings suggest that necdin suppresses SUMOylation of PIAS1 substrate proteins involved in neuronal differentiation. The present study also provides insights into the involvement of necdin and other MAGE family proteins in PIAS1-mediated events in various types of cells.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( Ibrahim Gur )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 吉川 和明
	副 査 教授 関口 清俊
	副 査 教授 長谷 俊治

## 論文審査の結果の要旨

Necdin は、種々の蛋白質と複合体を形成して、哺乳類ニューロンの分化や生存を促進する多向性蛋白質である。Necdin が属する MAGE(melanoma antigen)ファミリーは、ヒトやマウスなどの哺乳類（真獣類）では 30 種類以上存在する。蛋白質の翻訳後修飾において、ユビキチン化や SUMO(small ubiquitin-like modifier)化は、蛋白質の分解や安定化に重要であることが知られている。MAGE ファミリーの一部は、特異的なユビキチン E3 リガーゼと複合体を形成して基質蛋白質のユビキチン化に影響を与えることが知られている。一方、MAGE ファミリー蛋白質による SUMO E3 リガーゼの活性調節に関しては、これまで研究されていない。

本論文は、Necdin が、代表的な SUMO E3 リガーゼである PIAS1(protein inhibitor of activated STAT)と結合して、基質蛋白質の SUMO 化を抑制する機構を明らかにしたものである。Necdin および Necdin に類似した MAGE ファミリー蛋白質は、既知の SUMO E3 リガーゼの中では PIAS1 と結合する。Necdin は、PIAS1 の E3 リガーゼ活性に必須の領域と結合して、PIAS1 による基質蛋白質の SUMO 化を抑制する。また、Necdin は PIAS1 をユビキチン化することによって、プロテアソーム系での PIAS1 分解を促進する。Necdin-PIAS1 複合体の細胞内局在と Necdin による PIAS1 のユビキチン化は、PIAS1 蛋白質の分子内領域を介して制御されている。このような機構によって、Necdin は PIAS1 の SUMO E3 リガーゼとしての酵素活性を阻害して、基質蛋白質の SUMO 化を抑制することが明らかになった。PIAS1 の基質は、神経系の初期発生において、ニューロンの分化や生存に関わるものが多く、Necdin-PIAS1 複合体によって神経系分化が調節されることが示唆される。

以上のように、Necdin が PIAS1 SUMO E3 リガーゼの制御に関与することを明らかにした本論文は、SUMO 化による蛋白質翻訳後修飾機構の解明に貢献するものと考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。