

論文の内容の要旨

論文題目 ナンセンス変異を含む mRNA の分解経路に介在する  
Upf 因子群の新規活性化機構の解析

氏名 高橋 真也

[序]

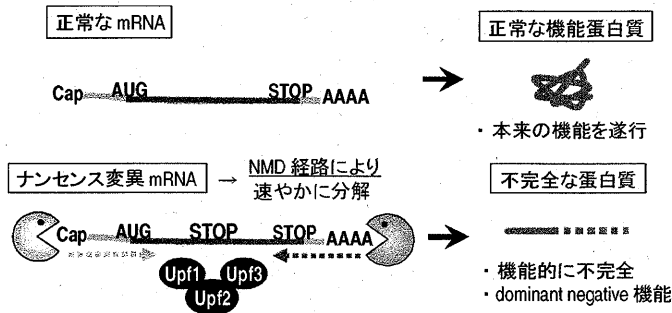


図1 Upf 因子群はナンセンス変異を含む mRNA の分解 (NMD) に寄与する

真核生物は、その恒常性維持や細胞内・外の刺激に対する生体反応を制御するにあたり、自己の遺伝情報を正確に発現することが必須であり、そのために必要な様々な機構を有している。それらの機構の中でも、mRNA 上に生じたエラーを監視する機構 (mRNA サーベランス) は、多様化する遺伝子発現において、初期過程でエラーに対処できるという点で非常に重要な機構であると

言える。mRNA サーベランス機能のひとつとして、転写・複製中のエラーやプライミング時のエラーにより生じる不適切な翻訳終結コドン (ナンセンス変異) を含む mRNA を選択的に分解する NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay) 経路と呼ばれる監視機構の存在が明らかとなってきた。この経路により、本来コードされていたものよりも短い、有害と考えられる蛋白質の生成を抑えることが可能となる。

NMD 経路においては、酵母、線虫を用いた遺伝学的な解析の結果から、Upf 因子群 (Upf1, Upf2, Upf3) が必要であることが明らかとなってきた。Upf 因子群それぞれの破壊細胞では、ナンセンス変異を含む mRNA が特異的に蓄積し、正常な mRNA の分解過程は影響を受けない。また、Upf 因子群を複数破壊した細胞群において、ナンセンス変異を含む mRNA の更なる蓄積が観察されないことや、因子群間で相互作用が論じられていることから、Upf 因子

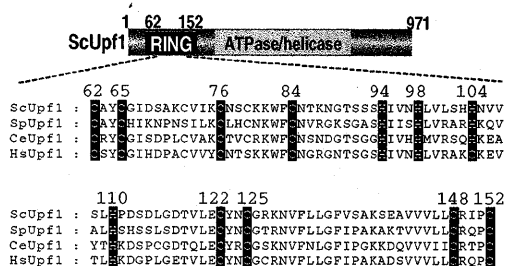


図2 Upf1 は RING ドメイン様領域を有する

群は複合体を形成し、協調的に機能していると考えられている。しかしながら、NMD 経路における Upf 因子群の詳細な分子機能や制御機構に関しては未解明である。

本研究において発表者は、生化学的なアプローチによって Upf 因子群を解析することを目的とした。その結果として、1) Upf1 は RING ドメイン様領域を含み、E3 活性を有すること、2) Upf1 E3 活性は NMD 経路において重要であること、3) Upf1 の E3 活性には Upf3 が重要であること、4) Upf1 は細胞内で Upf3 をユビキチン化することを見出した。これらの結果から、ナンセンス変異を含む mRNA の認識時において引き起こされる、Upf3 ユビキチン化を通じた、NMD 経路活性化メカニズムが想定された。

[結果]

1. Upf1 は E3 活性(自己ユビキチン化能)を有する

Upf 因子群における生化学的特性の手掛りを得るべく、各因子のアミノ酸一次配列に着目したところ、Upf1 の N 末端領域に、種間を越えて保存性が非常に高いシステイン (Cys) とヒスチジン (His) に富む特徴的な配列を見出した(図 1)。これらのアミノ酸配列は、ユビキチン修飾経路において機能する、ユビキチンリガーゼ(E3)の RING ドメインを想起させるものであった。ユビキチン修飾経路とは、標的蛋白質がそれぞれの特異的 E3 によりユビキチン化され、そのユビキチンがシグナルとなりプロテアソームにより分解される、もしくは多様な情報を伝える経路である。そこで、Upf1 が E3 であるか否かを検討するために、E3 の自己ユビキチン化能を指標とし、Upf1 の E3 性を検討することにした。酵母細胞内から精製したリコンビナント Upf1 を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ、自己ユビキチン化を示す Upf1 の高分子側へのシフトが検出された。また、このようなシフトは RING ドメインを欠いた Upf1 では検出されなかった。さらに、RING ドメインを形成していると考えられる、システイン及びヒスチジンに点変異を与えたリコンビナント Upf1 もまた、自己ユビキチン化能を有さないことがわかった(図 3)。これらの結果から、Upf1 RING ドメインは、自身の E3 活性において重要であることが示唆された。

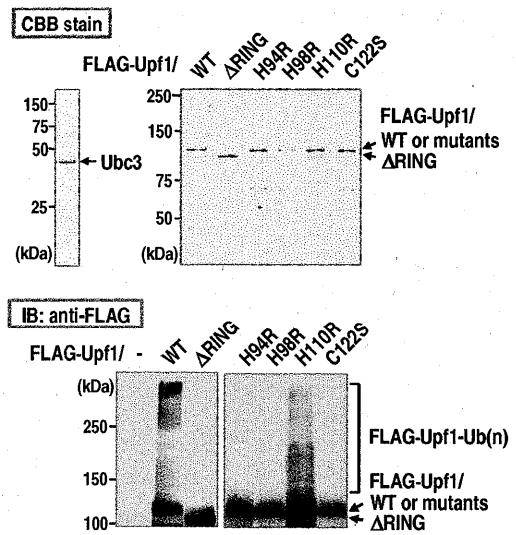


図3 Upf1 RING ドメインは E3 活性を有する  
- *in vitro* ubiquitination assay -

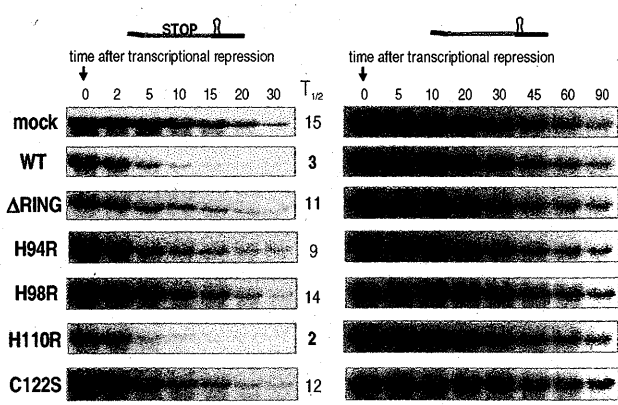


図4 Upf1 RING ドメインは NMD 経路の活性化に重要である  
- Northern hybridization assay -

2. Upf1 RING ドメインは NMD 経路の活性化に重要である

次に、Upf1 の RING ドメインが NMD 経路において必要か否かを、ナンセンス変異を含んだ mRNA の分解動態を検出することにより検討した。内在の Upf1 を欠損させた細胞に、正常及び変異 RING ドメインを有する Upf1 を導入したところ、正常な Upf1 では NMD 経路の欠損が抑制されるのに対し、変異 RING ドメインを有する Upf1 では抑制できなかった(図 4)。以上の結果から、Upf1 の RING ドメイン E3 活性は NMD 経路活

性化に必要であることが強く示唆された。

### 3. Upf1 E3 活性には Upf3 が必要である

Upf1 の E3 活性(自己ユビキチン化能)における他の Upf 因子群の寄与を調べる目的で、UPF2 もしくは UPF3 を欠いた細胞を用いてリコンビナント Upf1 を精製し、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、UPF2 を欠いた細胞から精製した Upf1 は、野生細胞から精製した Upf1 と同等に E3 活性を呈したが、UPF3 を欠いた細胞から精製した Upf1 は E3 活性を示さなかった。さらに、UPF3 を欠いた細胞に、外来のプラスミドで Upf3 の発現を救助した細胞を作製し、この細胞から得たリコンビナント Upf1 を用いて同様のアッセイを行ったところ、Upf1 の E3 性は正常に回復した。これらの結果により、Upf1 の E3 活性には Upf3 の存在が重要であることがわかった。

### 4. Upf1 E3 活性には Upf3 の相互作用が必要である

Upf 因子群は複合体として存在していることが明らかであったが、詳細な結合様式に関しては不明であった。そこで、Upf1-Upf3 間の相互作用を *in vivo* においてさらに検討することにした。免疫沈降法により、Upf1 沈降画分を精製したところ、この画分に Upf3 が認められた(図 5 上段)。また、Upf2 が両者間に存在する可能性を排除するために、*upf2* 破壊細胞を用いて、Upf1 の精製を行ったところ、Upf3 は同様に認められ、Upf1-Upf3 間の物理的相互作用は維持されることがわかった(図 5 中段)。しかしながら、RINGドメインを欠いた Upf1、及び E3 活性を欠く点変異体 Upf1 では、Upf3 との相互作用が完全に抑制されることがわかった。一方で、先に Upf1 と相互作用することが知られている eRF3 については、野生体及び点変異体 Upf1 ともに、相互作用に変化は認められなかった(図 5 下段)。したがって、Upf1 の RINGドメインは Upf3 との相互作用に重要であり、Upf1 E3 活性は Upf3 との相互作用によって、特異的にもたらされる可能性が考えられた。

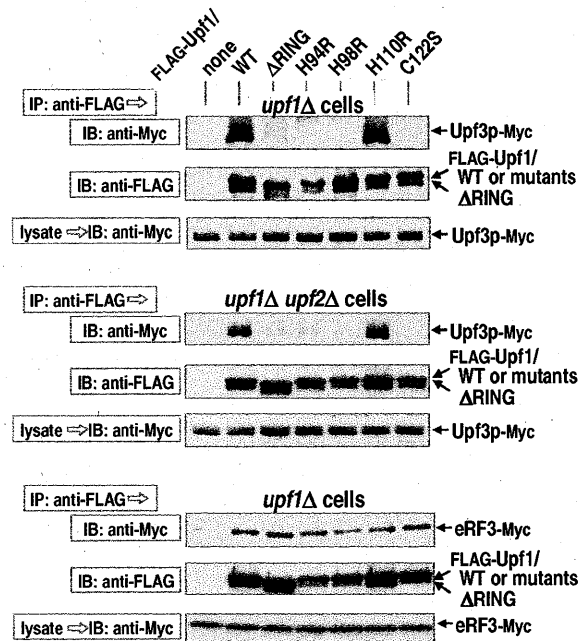


図5 Upf1 RINGドメインはUpf3との相互作用に重要である  
- immunoprecipitation assay -

### 5. Upf1 は Upf3 のユビキチン化に寄与する

Upf1 の E3 活性が NMD 経路において機能するならば、経路活性化時において、実際にユビキチン化される基質の存在が考えられる。先の解析により、Upf1 免疫沈降画分で Upf3 がブロードなバンドとして検出されることから(図 5 参照)、Upf3 自身が Upf1 の基質である可能性を考え、Upf3 のユビキチン化状態を正常細胞及び *upf1* 破壊細胞において検出した。その結果、正常な細胞において認められる、モノユビキチン化された Upf3 が、*upf1* 破壊細胞では検出されることがわかった。以上から、Upf1 は自身の E3 活性に Upf3 を必要とするだけでなく、Upf3 そのものをユビキチン化している可能性が考えられた。

[まとめ]

本研究において得られた知見から、以下のような NMD 経路の活性化メカニズムが考えられる(図 6)。まず、ナンセンス変異の認識時に、Upf1 は翻訳終結因子 eRF3 からのシグナルを受け、Upf3 を誘引する。次に、Upf3 と相互作用した Upf1 は Upf3 自身をユビキチン化し、このシグナルが mRNA 分解酵素群に伝わることにより、NMD 経路を活性化するというモデルである。本研究において得られた知見は、NMD 経路の分子機構の解明において新たな手がかりを与えるものと期待される。

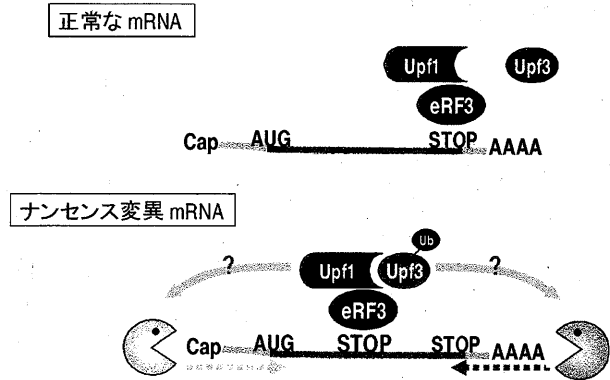


図6 Upf1によるUpf3ユビキチン化を介した NMD 経路活性化の分子モデル