

論文内容の要旨

論文題目

Nonsense-mediated mRNA decay に関与する hSMG-1 の構造活性相関

キナーゼ

氏名 森田 智子

序論

ナンセンスコドンを持つ異常な mRNA (ナンセンス mRNA) は生体内において積極的に分解されている。この現象は NMD (Nonsense-mediated mRNA decay) と呼ばれ、酵母から線虫、ヒトにまで保存されている真核生物に普遍的な機構である。ナンセンス mRNA は、遺伝子上にナンセンス変異が存在する場合、転写のミスが起きた場合、未成熟 mRNA のスプライシングに異常が起きた場合、さらにナンセンス変異を持つ偽遺伝子から転写が起こる場合など様々な場合に生じる。ナンセンス mRNA が翻訳されると細胞毒性を有する可能性のある短縮型タンパク質が生じるが、NMD はこの異常タンパク質の蓄積を mRNA レベルで抑制している。

ホ乳類における NMD 関連分子の解析による結果、hSMG-1 による hUPF1 のリン酸化が NMD を誘導するのに非常に重要であることが明らかになった。hSMG-1 は PIKK (PI3 kinase-related protein kinase) ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであるが (Fig. 1)、その構造解析は全く進んでいない。

本研究において、私は hSMG-1 の構造とキナーゼ活性の関係を主に変異体を作製して解析し、その結果、触媒活性ドメイン (PIKK ドメイン) と一次構造的に非常に離れている N 末端領域と C 末端領域がどちらもキナーゼ活性に必須であるという hSMG-1 の興味深い構造活性相関を明らかにした。さらに hSMG-1 とその基質である hUpf1 の細胞内局在を検討し、ストレス時における特徴的な局在を明らかにした。

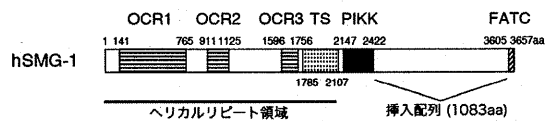


Fig.1 hSMG-1 のドメイン構造

1. 本実験系における hSMG-1 の定量的なキナーゼ活性の確認

本研究におけるキナーゼ活性測定方法の定量性を確認するために、FLAG タグを付加した hSMG-1 の野生型 (WT) とキナーゼ不活性型 (D2331A) を 239T 細胞に発現させ、FLAG 抗体で精製し溶出した。溶出した hSMG-1 タンパク質を銀染色によって定量し、それを 20-300ng 用いて hUpf1 のリン酸化サイトを含む

GST-hUpf1¹⁰⁷²⁻¹⁰⁸⁵ を基質として *in vitro* kinase assay を行ったところ、WT では量依存的なキナーゼ活性が見られたのに対し、D2331A ではキナーゼ活性が見られなかった (Fig. 2)。このことから、本研究におけるアッセイ系の定量性が示された。

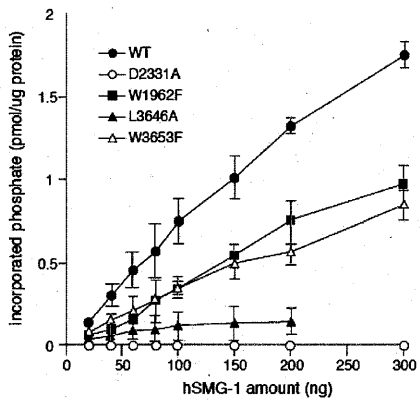


Fig.2 hSMG-1 点変異体の定量的キナーゼ活性

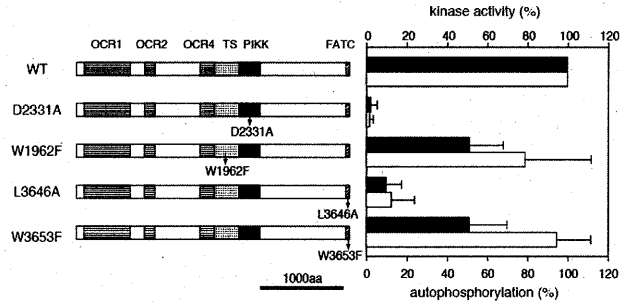


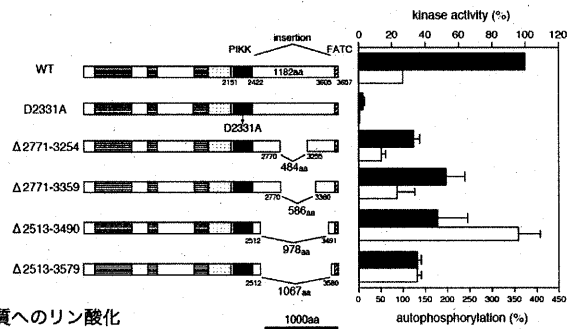
Fig.3 hSMG-1 点変異体のキナーゼ活性
黒：基質へのリン酸化
白：自己リン酸化

2. hSMG-1 の FATC ドメインはキナーゼ活性に必要である

FATC ドメインは PIKK ファミリー間で保存されたドメインである。mTOR では Trp²⁵⁴⁵ が通常状態のキナーゼ活性に必須であり、ATM では Leu³⁰³² と Leu³⁰⁴⁵ が基底状態のキナーゼ活性には影響を及ぼさないが電離放射線に対する活性化上昇に必須であることがわかっている。そこで hSMG-1 の FATC ドメイン内のこれに相当する Leu³⁶⁴⁶ と Trp³⁶⁵³ をそれぞれ Ala, Phe に置換した N 末端に FLAG タグを付けた変異体 (L3646A, W3653F) を作製して精製し、*in vitro* kinase assay を行った。その結果、L3646A 変異体ではキナーゼ活性が大きく減少したが、W3653F 変異体では約半分の活性を保持していた (Fig. 2)。このことから、hSMG-1 の FATC ドメインはキナーゼ活性に必要であり Trp³⁶⁵³ よりも Leu³⁶⁴⁶ の方が活性に大きな影響を及ぼすことが示された。さらにこの結果は、アッセイ系を簡略化し、溶出させずタンパク質をレジンに結合させたまま *in vitro* kinase assay を行っても同様であり (Fig. 3)、これ以降の実験はこの簡略化した系を用いた。

3. hSMG-1 の挿入配列はキナーゼドメインに必須ではない

次に、ヒト SMG-1 に特徴的な構造である PIKK ドメインと FATC ドメインの間に存在する約 1000aa の挿入配列がキナーゼ活性に必須であるかを、同様に欠損変異体を用いて検討した (Fig. 4)。その結果、挿入配列をほぼ欠損させてもキナーゼ活性は約 30% 保持されていた。このことから、挿入配列はキナーゼ活性に影響を与えるが必須ではないことが示された。



黒：基質へのリン酸化
白：自己リン酸化

Fig.4 挿入配列欠損変異体のキナーゼ活性

4. hSMG-1 の N 末端側領域はキナーゼ活性に必要である

hSMG-1 の N 末端側は PIKK ファミリー間で一次構造には相同性は見られないが、 α ヘリックスに富む領域であり、種間で相同性が高い領域も存在する。そこでこの N 末端側がキナーゼ活性に影響を及ぼすかどうかを、同様に欠損変異体を用いて見当した結果、N 末端側から 617aa までを欠損した変異体でキ

ナーゼ活性がほぼ消失した (Fig. 5)。さらに N 末端側 1674aa 以上の領域を小さく欠損させた変異体でも、同様にキナーゼ活性が消失した。このことから、N 末端側の広い領域がキナーゼ活性に必須であることが示唆された。

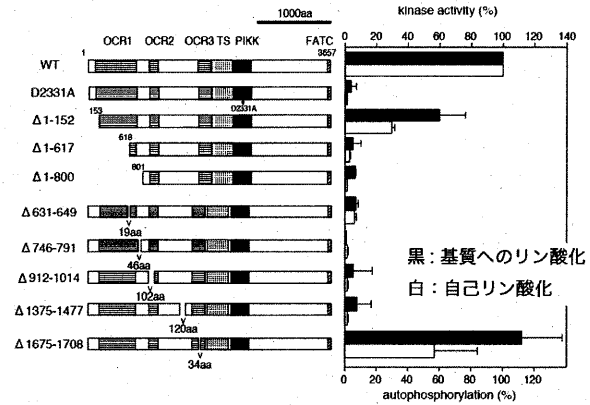


Fig.5 hSMG-1 の N 末端領域欠損変異体のキナーゼ活性

5. hSMG-1 は N 末端側と C 末端側の両方で hUpf1 と相互作用し、N 末端側で hSMG-7 と相互作用する

hSMG-1 変異体キナーゼ活性の消失が、基質である hUpf1 との相互作用によるためなのか、またフォールディングが正常かを調べるために、作製した hSMG-1 変異体と hUpf1 との相互作用をタグの付加した hSMG-1 と hUpf1 との共免疫沈降法により見当した。その結果、全ての変異体において hUpf1 との相互作用が確認された。また、hSMG-1 と相互作用すると報告されている hSMG-7 との相互作用部位を hSMG-1 変異体と内在性 hSMG-7 との免疫沈降法により見当した結果、N 末端側 1-162aa で hSMG-1 は hSMG-7 と相互作用することが示唆された (Fig. 6)。

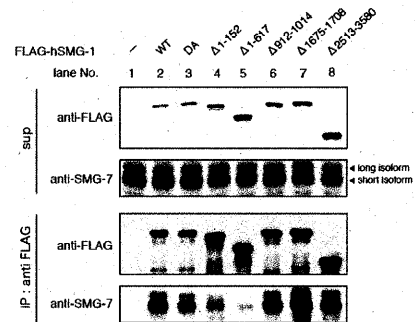


Fig.6 hSMG-1 と hSMG-7 の相互作用

6. hSMG-1 は *in vitro* において分子内または分子間相互作用をする

mTOR では、ヘリックスに富む N 末端領域がダイマー形成に関与していることが示されているため、hSMG-1 でも N 末端側がダイマー形成に関与しているかどうかをタグの異なる hSMG-1 の WT、D2331A、N 末端側、C 末端側を用いて共免疫沈降法により検討した。その結果 hSMG-1 はキナーゼ活性の有無によらず相互作用した。しかし、その相互作用は N 末端同士、C 末端同士、N 末端と C 末端同士でも見られた (Fig. 7)。これは hSMG-1 が分子間相互作用している、もしくは分子内相互作用をしていること示唆していた。

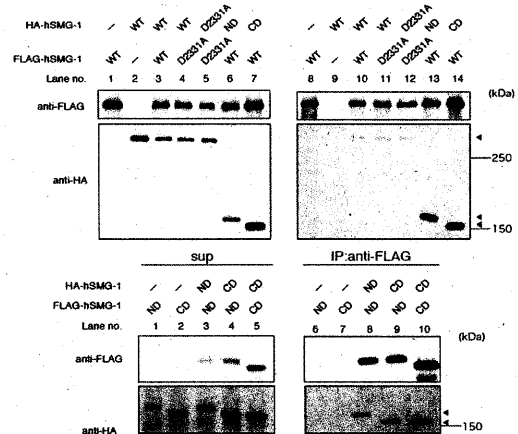


Fig.7 hSMG-1 同士の相互作用

ND: 1-2223aa
CD: 2068-3657aa

7. hSMG-1 は細胞内で P body と stress granule の両方に局在する

hSMG-1 の細胞内局在は現在まで報告されていない。そこでタグを付加した hSMG-1 を HeLa 細胞に発現させ免疫染色を行ったところ、細胞質に主に存在し顆粒を形成した (Fig. 8)。さらにこの顆粒は、mRNA の分解の場と考えられる P body のマーカーである Dcp1a と共局在し、mRNA を蓄積する場と考えられる stress granule (SG) のマーカーである TIA-1 と arsenite ストレス依存的に共局在した。このことから、hSMG-1 は P body と SG の両方に局在することが示唆された。

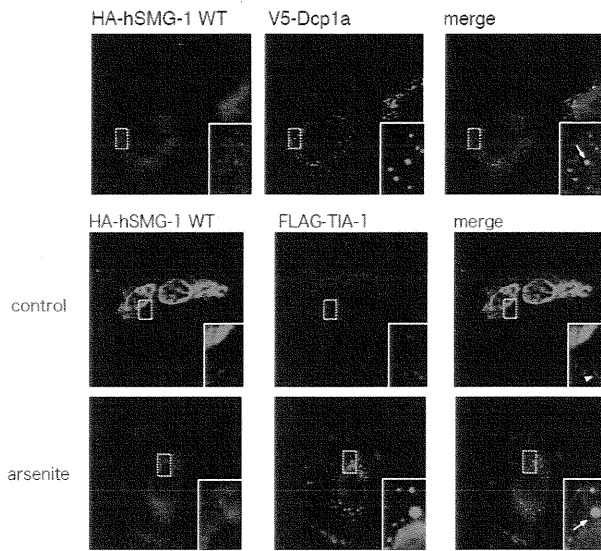


Fig.8 hSMG-1 の細胞内局在

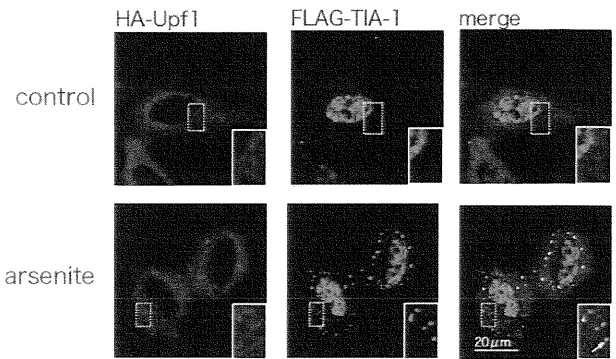


Fig.9 hUpf1 の細胞内局在

8. hUpf1 は刺激依存的に stress granule に局在する

hSMG-1 以外の NMD 関連タンパク質がストレス依存的に SG へ局在するかを見当するために、hUpf-1、hUpf2、hSMG-7 と TIA-1 との局在を見当した結果、hUpf1 のみがストレス依存的に SG へ局在した (Fig. 9)。さらに、hUpf1 は UV や熱ショックのストレスでも SG へ局在した。

総括

本研究において私は、NMD に必須のキナーゼである hSMG-1 の構造と活性との関係についての初めての知見を得た。PIKK タンパク質間で相同性のない N 末端側領域と PIKK タンパク質間で保存されている FATC ドメインがキナーゼ活性に必須であること、さらに hSMG-1 が分子内または分子間相互作用することなどが明らかとなった。この結果は、アッセイ系を考慮すると、hSMG-1 の立体構造由来であると考えられる。同じファミリーに属する DNA-PKcs の立体構造の知見から、hSMG-1 の構造は Fig.10 のようであると示唆され、N 末端領域と C 末端領域が触媒活性領域がとる活性化型コンフォメーションに影響を与えているのではないかと推測された。今後の活性制御機構の解析や NMD インビターのスクリーニングをする上で、本研究における hSMG-1 の基礎的な知見は非常に有用なものである。また、hSMG-1 と hUpf1 はストレス存在下で SG に局在することが明らかとなったが、この結果は、NMD とストレスとの関係、また hSMG-1、hUpf1 の NMD 以外での機能を示唆するもので、非常に興味深いと考えられた。

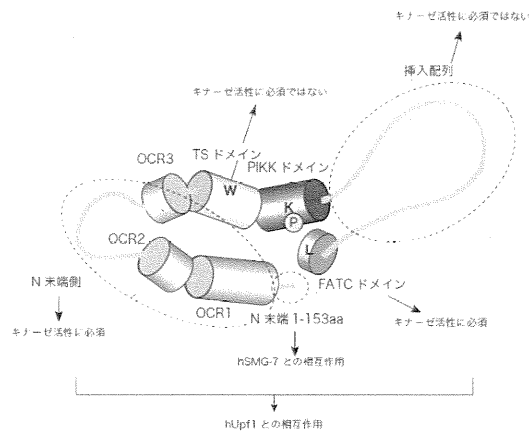


Fig.10 hSMG-1 の構造とキナーゼ活性の模式図