

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 森田 智子

細胞内において、ナンセンスコドンを持つ異常な mRNA (ナンセンス mRNA) は転写ミスなど様々な場合に生じる。ナンセンス mRNA が翻訳された場合、細胞毒性を有する可能性の高いトランケート型タンパク質が生じる。しかし、実際、細胞内では NMD (nonsense-mediated mRNA decay) という機構により、ナンセンス mRNA は特異的かつ積極的に分解され、トランケート型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、SMG-1 による UPF1 のリン酸化が NMD において非常に重要であることが明らかになった。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 SMG-1 のキナーゼ活性制御は、NMD の制御において重要であると考えられるが、解析はほとんど進んでいない。

本論文では、ヒト SMG-1 (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、hSMG-1 の構造活性相関を明らかにした。さらに本論文では、hSMG-1 とその他の NMD 関連分子の細胞内局在について検討し、ストレス時における hSMG-1 と hUpf1 の特徴的な局在を明らかにした。

本論文の内容は、以下のようにまとめられる。

hSMG-1 の構造とキナーゼ活性の関係を調べるために、hSMG-1 と他の PIKK ファミリータンパク質との構造を比較し、それを元に様々な hSMG-1 変異体を作製して *in vitro* におけるキナーゼ活性を測定した。まず、キナーゼ活性測定方法の定量性を確認した。FLAG タグを付加した hSMG-1 の野生型 (WT) とすでに報告のあるキナーゼ不活性型 (D2331A) を 239T 細胞に発現させ、FLAG 抗体で精製し溶出し、hUpf1 のリン酸化サイトを含む GST ペプチド基質を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。この結果、WT ではキナーゼ量依存的に基質へのリン酸化が増加し、アッセイ系の定量性が示された。

次に、hSMG-1 の C 末端側に存在する FATC ドメインがキナーゼ活性に重要であるかを検討した。PIKK ファミリーに属する ATM、mTOR では、FATC ドメインの Leu³⁰⁴⁵、Trp²⁵³⁵ がキナーゼ活性に影響を及ぼす事が報告されている。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 に置換した変異体 (L3646A、W3653F) を作製して精製し、キナーゼ活性を測定した。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 変異体ではキナーゼ活性を半分ほど保持していた。このことから、hSMG-1 の FATC ドメインはキナーゼ活性に重要であり、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。

hSMG-1 の触媒活性ドメイン (PIKK ドメイン) のすぐ上流には mTOR と相同性の高い領域 (TS ドメイン) が存在する。mTOR で、は TS ドメインの Trp²⁰²⁷ がキナーゼ活性に必須である事が報告されている。そこで、hSMG-1 でこれに相当する Trp¹⁹⁶² を Phe に置換した変異体 (W1962F) を作製してキナーゼ活性を測定した。その結果、W1962F 変異体のキナーゼ活性は 50%程度保たれており、キナーゼ活性に必須なアミノ酸は mTOR とは異なることが示された。

ホ乳類 SMG-1 には、PIKK ドメインと FATC ドメインの間に特徴的な 1081 アミノ酸の挿入配列が存在する。この配列がキナーゼ活性に必須であるかを、欠損変異体を用いて検討した。その結果、挿入配列を 90%以上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。

hSMG-1 の N 末端側は、他の PIKK ファミリーとアミノ酸の相同性は見られないが、PIKK ファミリー間で共通してみられる α ヘリックスリピートに富む領域が存在する。また、種間で相同性が高い領域 (OCR1-3) も存在する。N 末端側の様々な欠損変異体を用いてキナーゼ活性を見当した結果、N 末端側 1674 アミノ酸以上の領域の配列を小さく欠損させた全ての変異体で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。

以上の *in vitro* における hSMG-1 変異体の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調べるために、作製した hSMG-1 変異体と hUpf1 との相互作用を共免疫沈降法により検討した。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、変異体におけるキナーゼ活性消失は基質との相互作用ができないためではないことが示唆された。

ATM では分子間相互作用がキナーゼ活性に重要であることが報告されているため、異なるタグを付加した hSMG-1 を用いて免疫沈降法により相互作用を検討した。その結果、SMG-1 どちらの相互作用が見られ、さらに N 末端側、C 末端側の両方で相互作用した。このことから、hSMG-1 は細胞内で分子間、または分子内相互作用をしていることが示唆された。

さらに、hSMG-1 と相互作用すると報告されており、hUpf1 の脱リン酸化に関与する hSMG-7 と hSMG-1 の相互作用部位を hSMG-1 変異体と内在性 hSMG-7 との共免疫沈降法により検討した結果、N 末端側 1-162 アミノ酸の領域で hSMG-1 は hSMG-7 と相互作用することが示唆された。

以上の結果から、hSMG-1 において、触媒ドメインから遠く離れた N 末端側領域と C 末端側領域がキナーゼ活性に重要であることが明らかになった。同じファミリーに属する DNA-PKcs の立体構造の知見と比較すると、hSMG-1 の N 末端領域と C 末端領域は立体構造的に触媒ドメインの近傍に位置し、触媒活性ドメインのコンフォメーションに重要であると考えられた。さらに、hSMG-7 が hSMG-1 の N 末端側と相互作用することにより hSMG-1 のコンフォメーションが変化し、hSMG-1 のキナーゼ活性が制御されるのではないかと考えられた。

さらに本論文では、hSMG-1 を始めとする NMD 関連タンパク質の細胞内局在を検討している。その結果、NMD 関連タンパク質のうち hSMG-1 と hUpf1 は酸化ストレス依存的に stress granules と呼ばれる構造体に局在することが明らかとなった。Stress granules は翻訳の止まった mRNA が貯蔵される場所と考えられており、NMD 以外にも hSMG-1、hUpf1 が mRNA の動態について役割を担う可能性が考えられた。

以上、本論文は hSMG-1 の構造とキナーゼ活性の相関関係を明らかにし、hSMG-1 の立体構造モデルを予測している。さらに細胞内において、hSMG-1 とその基質である hUpf1 が酸化ストレス依存的に stress granules に局在するということを明らかにしている。本研究から得られた hSMG-1 の構造活性相関の基礎的なデータは、今後 hSMG-1 の活性制御、さらには NMD の制御の研究に十分に貢献するものと考えられ、また細胞内局在の結果は、hSMG-1 や hUpf1 の NMD 以外の機能を示唆する興味深い知見である。従って、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するに相応しいと認定した。