

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04331

研究課題名(和文) RNA監視機構による遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Post-transcriptional gene expression regulation via mRNA surveillance system

研究代表者

山下 暁朗 (YAMASHITA, AKIO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20405020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ナンセンス変異を有するmRNAからの異常タンパク質の発現を防ぐmRNA監視機構-NMD(Nonsense-mediated mRNA decay)の異常終止コドン複合体初期形成機構の詳細明らかとした。また、SMG1が関わる新たなストレス応答機構について解析を進め、酸化ストレス依存的にSMG1が活性化すること、SMG1が酸化ストレスの中心分子として機能する転写因子NRF2依存的なHO-1発現に必須な役割を果たすことを明らかにした。さらに、SMG1がNRF2を直接リン酸化すること、そのリン酸化部位の同定に成功し、SMG1によるNRF2活性制御機構の解明を進めている。

研究成果の概要(英文)：The nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway it acts to selectively identify and degrade mRNAs that contain a premature translation termination codon (PTC), and hence reduce the accumulation of potentially toxic truncated proteins. SMG1, a member of the PIKK (phosphoinositide 3-kinase related kinases) family, plays a critical role in NMD. According to prevailing models, NMD begins by the assembly of the SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3) complex at the ribosome, followed by UPF1 activation by additional factors such as UPF2 and UPF3. In present study we demonstrated that the interaction between human UPF2 and eukaryotic release factor 3 (eRF3). In addition, we find that UPF2 associates with SURF and ribosomes in cells, in an UPF3-independent manner. In addition, we showed that the existence of a complex comprising SMG1, UPF1 and DHX34, with functioning as a potential scaffold for UPF1 and SMG1.

研究分野：分子生物学

キーワード：NMD mRNA分解 mRNA代謝 翻訳終結 遺伝性疾患 がん

1. 研究開始当初の背景

正常な蛋白質が発現し機能するために、生体にはゲノム情報の伝達、発現の過程で様々な品質管理機構が備わっている。そのシステムの一つが nonsense-mediated mRNA decay (NMD) で、本来の終止コドンよりも 5 側上流の位置に存在する異常な早期終止コドン (premature termination codon : PTC) を有する mRNA (ナンセンス mRNA) を積極的に分解、排除する mRNA 監視機構である。PTC は、ナンセンス変異、塩基挿入や欠損によるフレームシフト変異、スプライシング部位の変異による異常スプライシングに起因して生じるが、遺伝性疾患やがんでは全変異の約三分の一に PTC が認められる。このことから生体は、NMD により異常な構造を持つ蛋白質断片の蓄積を免れていると考えられる。ナンセンス mRNA は、多くの場合正常な mRNA とは 1 塩基の違いしかない。これを見分けている実体として、酵母及び線虫の遺伝学的な解析から、UPF 及び SMG 遺伝子群が同定され、これらを含む仮想的な mRNA 監視複合体の存在が予測されてきた。また、様々な状況証拠から、翻訳装置、翻訳終止因子、EJC(exon junction complex) などの関与が推測されてきたが、その実体は不明であった。我々は 2001 年に、蛋白質リン酸化酵素 SMG-1 の同定とそのヒト NMD における必須な役割を報告して以降、NMD の制御機構 (Yamashita ら, 2001; Ohnishi, Yamashita ら, 2003; Fernández, Yamashita ら, 2011; Melero, Yamashita ら, 2014) と mRNA 分解機構 (Yamashita ら, 2005; Okada-Katsuhata, Yamashita ら, 2012; Nicholson, Yamashita ら, 2014) を解明し、長い間謎であった、細胞が PTC を認識する分子装置の実態とそのメカニズムを世界にさきがけ明らかとするなど (Kashima, Yamashita ら, 2006; Yamashita ら, 2009; Izumi, Yamashita ら, 2010)、この分野を牽引する役割を果たしてきた (総説 Yamashita ら, 2013)。さらに、これらの成果をふまえ、NMD の阻害技術を初めて実現し、身体を守るべき「遺伝子発現の監視役」が、場合によっては「悪さ」をしていることも示してきた。遺伝子変異に起因する遺伝性疾患においては、排除される必要のない mRNA が排除されてしまっている例があり、実際に、NMD の阻害により排除される必要のない mRNA を発現させることにより、細胞の機能回復 (疾患症状の回復の可能性) が可能であることを示すとともに (Usuki, Yamashita ら, 2004; Usuki, Yamashita ら, 2006)、細胞毒性を示さない分子ターゲットの同定に成功した (Usuki, Yamashita ら, 2013)。酸化ストレス下で、ATF4 などの NMD で分解される mRNA について、その翻訳開始が eIF2 α リン酸化依存的に切り替わることで、NMD による分解が抑制される。一方、SMG1 が酸化ストレスに関わることが明らかになってきており、

NMD と統合的ストレス応答との関わりについてその詳細の解明が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では、ナンセンス変異を有する mRNA からの異常蛋白質の発現を防ぐ mRNA 監視機構 - NMD (nonsense-mediated mRNA decay) - の分子機構と生理的意義を、新たな研究手法を用いて明らかとすることを目的とする。具体的には、すべての mRNA が初期翻訳時に品質管理機構により検査され、効率のよい通常の翻訳に移行するという「品質管理機構によるチェックポイント」の存在と NMD 制御因子による制御機構を解明する。さらに、NMD 制御因子による細胞ストレスに応答した、翻訳制御機構を解析することにより、mRNA 監視機構と転写・翻訳といった遺伝子発現の諸過程とのクロストーク、細胞シグナル伝達系とのクロストークを特に細胞のストレス応答の観点から明らかとする。

3. 研究の方法

NMD 分子機構を生化学的、点分子生物学的手法により解析する。同時に、NMD が直接制御する細胞内在性基質の網羅的同定とその具体的な役割の解析：次世代シーケンサーを用いた前立腺がん培養細胞における NMD 生理基質の網羅的同定とその機能を解析する。また、NMD 活性の簡易・正確な検出のため、新しい設計思想のレポーターを開発する。これを用い、細胞ストレス下における NMD 活性の測定を進める。さらに、細胞ストレスにおける SMG1 の役割と NMD 制御とのクロストークについても解析を進める。

4. 研究成果

1) 動物細胞において、NMD は 3' 側の splicing により強く促進される。リボソーム上で形成される異常終止コドンを識別する分子複合体である SMG1-UPF1-eRF1/3 (SURF) 複合体とスプライシング部位の目印となる EJC は UPF2-UPF3 により連結され、Decay inducing complex を形成する。UPF2 については、EJC に UPF3 を介してリクルートされるというモデルが支持されていた。今回、我々は、細胞内において SURF 構成因子や ribosome と UPF2 の複合体形成が、EJC や UPF3 非依存的であることを明らかにした。また、試験管内 splicing 反応依存的に spliced mRNA に UPF3 が結合するのに対し、UPF2 は結合しないことを示した。さらに、UPF2 が 40S と 60S の両方の ribosome サブユニットと複合体を形成することを発見した。これらの結果は 3' 側の intron 非依存的な NMD の際に ribosome を含む異常終止コドン識別複合体がどのように形成されるかを示す物である (NAR 2016)。

2) 1)で明らかとした EJC 非依存的な UPF2 の異常終止コドン識別複合体へのリクルート機構解明のため、UPF2 と UPF1, eRF1, eRF3, UPF3b との分子間相互作用の詳細を解析した。その結果、動物細胞においてこれまで確認されていなかった、UPF2 と eRF3 との直接の分子間相互作用を同定した。Bio-layer interferometry (BLI)を用いた詳細な解析により、UPF2 と UPF3b の K_D が $1-2 \times 10^{-8}$ M であるのに対し UPF2 と eRF3 の K_D は $2-6 \times 10^{-6}$ M であった。さらに、Cryo-EM を用いた構造解析と生化学的から、UPF3b と eRF3 は UPF2 上の非常に近い領域に競合的に結合することが明らかとなった。これらの結果から、3 側の intron 非依存的な NMD の際に、UPF2-eRF3 複合体形成後、UPF3b が eRF3 と入れ替わることで ribosome-SURF-UPF2-UPF3b 複合体を形成するというモデルが考えられる (NAR 2016)。一方、UPF3b と eRF3 についても弱い結合 (K_D : 5×10^{-5} M) が確認された。さらに、SMG1C と UPF3b の相互作用も検出されており、SMG1 キナーゼの活性化に際する分子間相互作用、分子複合体リモデリングの詳細の解明が今後の課題となる。

3) RNA helicase DHX34 は UPF1 を含む mRNP 複合体リモデリングに関わる因子であり、SMG1 による UPF1 リン酸化に関わることが報告されている (2014 Cell Rep.)。DHX34 と UPF1、SMG1 との関わりを明らかとするため、Cryo-EM による構造解析と生化学的・分子生物学的解析を組み合わせることで、SMG1 が DHX34 と複合体を形成すること、DHX34 と UPF1 が SMG1 に同時に結合しうることを明らかにした。さらに、細胞内において、DHX34 と UPF1 の相互作用が SMG1 による UPF1 リン酸化に重要であることを発見した (Nature Comm.)。これまで報告してきた ribosome-SURF-EJC 複合体の形成と DHX34 との関わりを解明を進めることで、NMD の分子機構の詳細が明らかとなることが期待される。

4) 細胞ストレス時には mRNA の翻訳が阻害されるため、翻訳依存的に起こる NMD が細胞ストレス時に阻害されるという報告がなされている (Gardner ら, 2010)。一方で、ストレス時に特異的に翻訳される mRNA が品質管理を受けているかについては解析されていないため実際には NMD がストレス時にも機能している可能性も高い。これについて、ストレス (小胞体ストレス、アミノ酸飢餓、酸化ストレスなど) 時に翻訳が抑制される 5TOP (eEF1A 5' UTR) レポーター、ストレス時に特異的に翻訳されるレポーター (ATF4 5' UTR)、その他 (beta-globin 5' UTR) を作成した。しかし、ストレス付与前の段階で蓄積したレポーターの活性が問題となり、はっきりした結果を得ることが出来なかった。そこで、転写と翻訳の両方を低分子化合

物により誘導することにより、ストレス付与前のレポーターの蓄積をほぼ無くすレポーターを設計した。いくつかの方法を検討した結果、最終的に転写と翻訳を個別に誘導可能なレポーター “InTra²: Inducible transcription-translation system” の開発に成功した。さらに、この方法が NMD だけでなく、microRNA の転写後制御の解析にも応用可能であることを確認した (未発表)。今後、ストレス時の NMD 活性の解析や、NMD 以外のさまざまな転写後制御機構制御剤スクリーニングへの応用が期待される。

5) SMG1 が酸化ストレス依存的なストレスグラニュール形成に関わること、高酸素依存的な p53 活性化に関わることが報告されている。このことから、SMG1 が酸化ストレス依存的な細胞ストレス応答に関わる新たな制御因子として機能している証拠が蓄積してきた。これらの背景から、SMG1 阻害が NMD 抑制によるがん細胞変異遺伝子由来の変異タンパク質の蓄積や、未知の経路による酸化ストレス応答制御異常により、抗腫瘍作用を示す可能性を考え、研究を行った。その結果、SMG1 ノックダウンは、がん細胞増殖抑制やゼノグラフト増殖抑制を示すことを明らかにした。次に、SMG1 の酸化ストレス応答への関与を明らかとするため、新規に同定した SMG1 特異的阻害剤を用い、SMG1 特異的阻害条件下における酸化ストレス応答についての解析を行った。SMG1 阻害剤を用いた解析により、酸化ストレスに対する細胞応答として p53 に加え、活性酸素種による転写因子 NRF2 の活性化を SMG1 特異的阻害剤が抑制することを明らかにした。さらに、SMG1 が直接 NRF2 を特定のリン酸化部位をリン酸化することを明らかにした (未発表)。このリン酸化の生理的意義についてさらなる解析が必要となる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)、全て査読あり

1. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N*: Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. J Hum Genet 60(2): 97-101, 2015

2. Wakui H, Uneda K, Tamura K*, Ohsawa M, Azushima K, Kobayashi R, Ohki K, Dejima T, Kanaoka T, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Haruhara K, Nishiyama A, Yabana M, Fujikawa T, Yamashita A, Umemura S: Renal tubule angiotensin II type 1 receptor-associated protein promotes natriuresis and inhibits salt-sensitive

blood pressure elevation. *J Am Heart Assoc* 4(3): e001594, 2015

3. Melero R, Hug N, López-Perrote A, Yamashita A, Cáceres JF*, Llorca O*: The RNA helicase DHX34 functions as a scaffold for SMG1-mediated UPF1 phosphorylation. *Nat Commun* 7: 10585, 2016

4. López-Perrote A, Castaño R, Melero R, Zamorro T, Kurosawa H, Ohnishi T, Uchiyama A, Aoyagi K, Buchwald G, Kataoka N, Yamashita A*, Llorca O*: Human nonsense-mediated mRNA decay factor UPF2 interacts directly with eRF3 and the SURF complex. *Nucleic Acids Res* 44(4): 1909-1923, 2016

5. Azushima K*, Ohki K, Wakui H*, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Maeda A, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K*: Adipocyte-Specific Enhancement of Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Ameliorates Diet-Induced Visceral Obesity and Insulin Resistance. *J Am Heart Assoc* 6(3): e004488, 2017

6. Ohki K, Wakui H*, Azushima K*, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Maeda A, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K*: ATRAP Expression in Brown Adipose Tissue Does Not Influence the Development of Diet-Induced Metabolic Disorders in Mice. *Int J Mol Sci* 18(3): E676, 2017

7. Kobayashi R, Wakui H*, Azushima K*, Uneda K, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Toya Y, Nishiyama A, Yamashita A, Tanabe K, Maeshima Y, Umemura S, Tamura K*: An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. *Kidney Int* 91(5): 1115-1125, 2017

8. Uneda K, Wakui H*, Maeda A, Azushima K*, Kobayashi R, Haku S, Ohki K, Haruhara K, Kinguchi S, Matsuda M, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Atobe Y, Yamashita A, Umemura S, Tamura K*: Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. *J Am Heart Assoc* 6(8): e006120, 2017

9. Usuki F*, Fujimura M, Yamashita A: Endoplasmic reticulum stress

preconditioning modifies intracellular mercury content by upregulating membrane transporters. *Sci Rep* 7(1):12390, 2017

10. Haruhara K, Wakui H*, Kishio N, Azushima K*, Kurotaki D, Kawase W, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Ohki K, Kinguchi S, Ohsawa M, Minegishi S, Ishigami T, Matsuda M, Yamashita A, Nakajima H, Tamura T, Tsuboi N, Yokoo T, Tamura K*: Angiotensin receptor-binding molecule in leukocytes in association with the systemic and leukocyte inflammatory profile. *Atherosclerosis* 269:236-244, 2018

11. Ohki K, Wakui H*, Kishio N, Azushima K*, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Imajo K, Nakajima A, Tamura K*: Angiotensin II Type 1 Receptor-associated Protein Inhibits Angiotensin II-induced Insulin Resistance with Suppression of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Tissue. *Sci Rep* 8(1):2846, 2018

12. Yamashita A*, Takeuchi O*: Translational regulation by 3' UTR binding proteins. *BMB Rep* 50(4):194-200, 2017

13. Yamashita A*: Serine/Threonine-Protein Kinase SMG1. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, 2nd Edition. Springer. 4855-4893, 2018

〔学会発表〕(計 9件)

1. 山下 暁朗, 藤原 俊伸: 転写後制御を標的とした次世代創薬プラットフォーム. 第38回日本分子生物学会年会・第87回日本生化学会大会 合同大会. 2015年12月, 神戸(ワークショップオーガナイザー)

2. 山下 暁朗: 動物培養細胞を用いた高感度転写後制御モニタリングシステムの構築. 第38回日本分子生物学会年会・第87回日本生化学会大会 合同大会. 2015年12月, 神戸(ワークショップ)

3. Yamashita A: Highly sensitive reporter system for post-transcriptional gene expression regulation. The 21st Annual Meeting of the RNA Society (RNA 2016), Kyoto, 2016, 6.

4. Yamashita A: Molecular mechanism of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Nascent biology and Ribosome*

functions, Kyoto, 2016, 6.

5. 安田 篤史, 山下 暁朗, 青柳 杏子, 中村 良恵, 廣瀬 博子, 黒澤 瞳, 大野 茂男: 新規レポーターシステムを用いた翻訳終結リードスルー分子機構解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市 2016, 11-12.

6. 山下 暁朗, 佐藤 由典, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 中村 良恵, 青柳 杏子, 武石 知子, 安田 篤史, 大野 茂男: PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 による転写後制御. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市 2016, 12.

7. 藤川 由美子, 山下 暁朗, 大貫 哲男, 鈴木 香絵, 青柳 杏子, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 永井 陽子, 上村 博司, 吉田 稔, 大野 茂男: PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 阻害による抗腫瘍効果の解析: SMG1 による NRF2 活性制御の発見. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017, 12.

8. 佐々木 和教, 麴谷 典子, 廣瀬 博子, 吉濱 陽平, 高柳 亜由美, 山下 暁朗, 平野 久, 大野 茂男: 新規 aPKC 結合タンパク p200 による上皮細胞極性の調節機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017, 12

9. 山下 暁朗, 佐藤 由典, 黒澤 瞳, 廣瀬 博子, 青柳 杏子, 永井 陽子, 大野 茂男: PI3 kinase 様タンパク質リン酸化酵素 SMG1 による新たな転写後制御機構の発見. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017, 12.

〔図書〕(計 3 件)

1. 山下暁朗, 竹内 理. mRNA 3'UTR 結合タンパク質による翻訳制御. 細胞工学 34 (8):762-765, 2015

2. 山下暁朗. miRNA による標的制御. 実験医学 33(20): 3244-3255, 2015

3. 山下暁朗. HEK293T 細胞を用いたリコンビナントタンパク質精製. 実験医学 34(18): 3057-3064, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohno/s/Japanese/indexJ.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山下 暁朗 (YAMASHITA, AKIO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号: 20405020