

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15273

研究課題名(和文) AMPKがSRSF1を介して選択的スプライシングに及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) AMPK regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1

研究代表者

鈴木 司 (SUZUKI, Tsukasa)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20714588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：AMPKは、同化作用を抑制し異化作用を活性化することで、細胞内のエネルギー恒常性を調節するキナーゼである。本研究では、スプライシングを制御するタンパク質であるSRSF1をAMPKの新規基質として同定し、AMPKはSRSF1のSer133を直接リン酸化することを明らかにした。また、このリン酸化修飾により、SRSF1と特定のRNA配列との相互作用を抑制することが示され、実際に、AMPKはSRSF1を介してマクロファージ刺激性タンパク質受容体であるRonの選択的スプライシングを制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPKが関与するSRSF1の新たな翻訳後修飾を明らかにしたことによって、SRSF1依存的な選択的スプライシング制御をより詳細なレベルで理解することができる。これにより選択的スプライシングの破綻による疾病の発症機序の理解、そして遺伝性疾患において、変異したエクソンをスキップさせて正常に近いタンパク質を発現させる、エクソンスキッピングと呼ばれる治療法に対する新しいアプローチにもつながる。また、これらの疾患にAMPK活性化剤や阻害剤、そして栄養状態の管理などの手法を用いる応用研究にもつながる。

研究成果の概要(英文)：AMPK regulates cellular energy homeostasis by inhibiting anabolic processes and activating catabolic processes. Recent studies have demonstrated that metformin, which is an AMPK activator, modifies alternative pre-mRNA splicing. However, no direct substrate of AMPK for alternative pre-mRNA splicing has been reported. In this study, we identified the splicing factor SRSF1 as a novel AMPK substrate. AMPK directly phosphorylated SRSF1 at Ser133 in an RNA recognition motif. Ser133 phosphorylation suppressed the interaction between SRSF1 and specific RNA sequences without altering the subcellular localization of SRSF1. Moreover, AMPK regulated the SRSF1-mediated alternative pre-mRNA splicing of Ron, which is a macrophage-stimulating protein receptor, by suppressing its interaction with exon 12 of Ron pre-mRNA. The findings of this study revealed that the AMPK-dependent phosphorylation of SRSF1 at Ser133 inhibited the ability of SRSF1 to bind RNA and regulated alternative pre-mRNA splicing.

研究分野：栄養生化学

キーワード：AMPK SRSF1 選択的スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

pre-mRNA スプライシングにおいて、本研究で着目する SR タンパク質は pre-mRNA のエクソン配列に結合し、スプライソソームを 5' と 3' のスプライス部位に引き寄せ、正しいスプライス部位での切断を制御する働きを持つ(図1)。

一方、SR タンパク質がリン酸化修飾を含む何らかの翻訳後修飾を受け、標的エクソン配列との結合が促進・阻害されるとスプライス部位での切断が変化する。これにより、標的エクソン配列が成熟 mRNA に移行したりしなかったりと、いわゆる選択的スプライシングにつながる。それゆえ、選択的スプライシングの制御や、その翻訳産物が細胞に与える影響を理解するためには、SR タンパク質の翻訳後修飾の解明が重要なポイントとなる。

申請者はこれまでに、栄養状態を感知して細胞内のエネルギー恒常性を制御するキナーゼである AMPK について、その結合タンパク質を網羅的に解析することで AMPK を制御する因子の探索を行ってきた。解析した結合タンパク質の中から AMPK によりリン酸化修飾を受ける可能性がある新規因子を抽出したところ、SR タンパク質である SRSF1 を見出した。

興味深いことに、AMPK 活性化剤であるメトホルミンを培養細胞に添加することによって、選択的スプライシングが変化する事が報告されているが、AMPK がどのような基質を介して選択的スプライシングに関与するかなどの分子メカニズムについては不明である。

そのため、図2のように AMPK による SRSF1 のリン酸化が SRSF1 と pre-mRNA のエクソン配列との結合に影響を与えることによって、AMPK が選択的スプライシングに影響を及ぼしていることが考えられる。

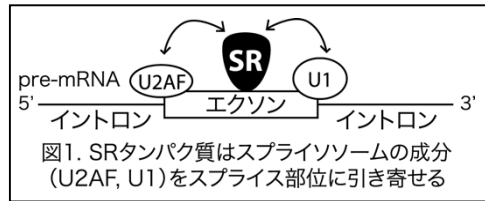


図1. SRタンパク質はスプライソソームの成分(U2AF, U1)をスプライス部位に引き寄せる

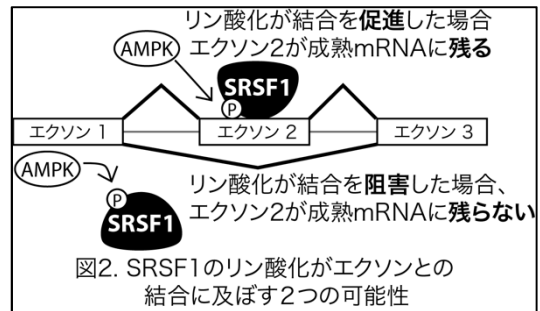


図2. SRSF1のリン酸化がエクソンとの結合に及ぼす2つの可能性

2. 研究の目的

本研究では、まず、AMPK が SRSF1 をリン酸化し、標的のエクソン配列との結合が変化する事で、その選択的スプライシングに及ぼす影響を明らかにする。このために、以下の3項目を明らかにすることを本研究の目的とした(概略図を右に示した)。

(1) in vivo において SRSF1 は AMPK によりリン酸化されるか?

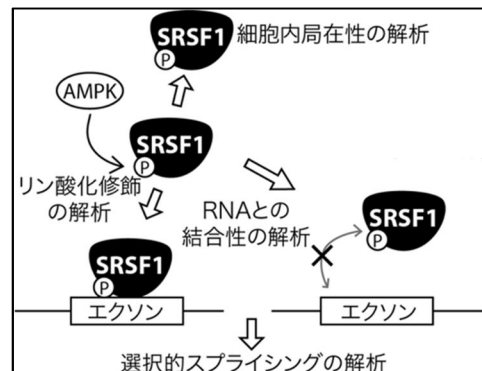
申請者が見出した SRSF1 のリン酸化部位は、in vivo においてリン酸化されることが報告されているが、キナーゼについての報告はない。そこで AMPK がこの部位をリン酸化するかを明らかにする。また、細胞内で AMPK がどの程度このリン酸化修飾に寄与しているかも明らかにする。

(2) SRSF1 のリン酸化がエクソン配列との結合、SRSF1 の細胞内局在性に影響を及ぼすか?

本研究で着目する SRSF1 のリン酸化部位は RNA 認識モチーフに位置する。それゆえ、この部位がリン酸化することでエクソン配列との結合に変化が生じるか明らかにする。この他に、SRSF1 は細胞質と核内を行き来することで、選択的スプライシングのタイミングを制御する。そのため、リン酸化修飾が SRSF1 の細胞内局在性を変化するかを明らかにする。

(3) AMPK が SRSF1 をリン酸化することで、選択的スプライシングに影響を及ぼすか?

RNA 認識モチーフが認識するエクソン配列には特異性があり、このため SRSF1 依存的な選択的スプライシングが発生する。そこで、AMPK による SRSF1 のリン酸化が、SRSF1 依存的な選択的スプライシングに変化を与えるかを明らかにする。



3. 研究の方法

AMPK による SRSF1 のリン酸化修飾の解析

[³²P]ATP を用いた in vitro kinase assay を行い、AMPK が SRSF1 を直接リン酸化するか解析を行う。また、それと同時に、そのリン酸化部位も同定を行う。さらに、in vivo における目的部位のリン酸化修飾を検出するために、抗リン酸化 SRSF1 抗体を用いた western blotting を行う。目的の抗体が市販されていないため、抗体を作成する。作成した抗体が目的部位のリン酸化修飾を検出できるか確かめる。そのために、野生型(WT)または目的部位のアミノ酸をアラニンに変異させた変異体(A変異体)の SRSF1 をそれぞれ 293T 細胞に発現させ、SRSF1 のリン酸化を検出する。さらに、脱リン酸化酵素を用いてリン酸化修飾が消失することを確かめる。

次に、検出されたリン酸化修飾が AMPK によるものか調べる。そのために、培養細胞に AMPK の

活性化剤や阻害剤を処理したりすることで、リン酸化の増減が認められるか確認する。

リン酸化 SRSF1 の細胞内局在性の解析

SRSF1 は、細胞質と核内を行き来する性質がある。そのため、目的部位のリン酸化修飾が SRSF1 の細胞内局在性に影響を及ぼすか蛍光顕微鏡を用いて観察する。SRSF1 の WT もしくは A 変異体を 293T 細胞に導入し、AMPK の活性化剤を処理して SRSF1 の細胞内局在性を観察する。

リン酸化 SRSF1 と pre-mRNA との結合性の解析

SRSF1 がリン酸化を受けることで、pre-mRNA との結合に変化が生じるか調べる。細胞内における SRSF1 と pre-mRNA の結合性を解析するために、SRSF1 が結合することが報告されている RNA モチーフにビオチンを付加させたオリゴ RNA を用いて、SRSF1 と RNA との結合の解析を行う。細胞に AMPK 活性化剤や阻害剤を処理したり、SRSF1 のリン酸化部位の変異体を発現させたりすることで、リン酸化修飾が pre-mRNA との結合に与える影響を調べる。

リン酸化 SRSF1 が選択的スプライシングに及ぼす影響の解析

最後に、SRSF1 が関与する既知の選択的スプライシングを対象とし、SRSF1 がリン酸化されることで、成熟 mRNA のエクソン構成に変化が起きるか調べる。細胞に AMPK 活性化剤や阻害剤を処理し、成熟 mRNA の標的エクソンをリアルタイム PCR や RT-PCR にて測定し、選択的スプライシングがどのように変化するか調べる。細胞内において、目的の pre-mRNA 転写量が低いため測定できない場合は、標的エクソンとその前後のイントロンとエクソンを含めた DNA 配列を発現ベクターにクローニングし、これを 293T 細胞に導入する。これにより、目的の pre-mRNA 転写量を上昇させ、測定を行う。本研究では、マクロファージ刺激タンパク質受容体である Ron 遺伝子が SRSF1 によって選択的スプライシングが制御されることが報告されていることから、Ron 遺伝子の選択的スプライシングを中心に解析を行う。

4. 研究成果

AMPK による SRSF1 のリン酸化修飾の解析

AMPK リン酸化モチーフのコンセンサス配列をもとに、SRSF1 のアミノ酸配列を解析した結果、SRSF1 の Ser133 の周囲のアミノ酸配列のみが AMPK リン酸化モチーフのコンセンサス配列と一致した。AMPK が Ser133 を直接リン酸化するか調べるために、大腸菌から精製した Ser133 を含むポリペプチドを基質として in vitro キナーゼアッセイを行った結果、AMPK は SRSF1 野生型ポリペプチドをリン酸化したが、Ser133 をアラニンに変異させると (S133A) AMPK によるリン酸化は完全に阻害された。そのため、AMPK が SRSF1 の Ser133 を直接リン酸化することが in vitro で示された。培養細胞において AMPK が SRSF1 をリン酸化するかどうかを確認するために、p-Ser133 SRSF1 抗体 (pS133-SRSF1) を作製し、これを用いて解析を行った。その結果、AMPK 過剰発現は野生型 SRSF1 の Ser133 リン酸化を促進したが、このリン酸化は脱リン酸化酵素で処理することで完全に消失した。さらに、AMPK が内因性 SRSF1 をリン酸化するかどうかを調べた結果、AMPK 阻害剤である化合物 C は SRSF1 の Ser133 位でのリン酸化を抑制したが、AMPK 活性化剤である A769662 はリン酸化レベルを上昇させた。

リン酸化 SRSF1 の細胞内局在性の解析

SRSF1 は様々な翻訳後修飾を受けて細胞内局在を変化させ、その機能を変化させている。そこで SRSF1 の Ser133 のリン酸化修飾が細胞内局在性に影響を与えているか解析を行った。その結果、MCF7 細胞における SRSF1 の細胞内局在性は、AMPK 活性化剤 A769662 で処理しても変化は認められなかった。また、SRSF1 の Ser133 を変異させた変異体の細胞内局在性も同様に観察した結果、同様に、SRSF1 の細胞内局在性は Ser133 の変異によって影響を受けなかった。したがって、AMPK による SRSF1 のリン酸化が SRSF1 の細胞内局在性に影響を及ぼさないことが示唆された。

リン酸化 SRSF1 と pre-mRNA との結合性の解析

SRSF1 は pre-mRNA の特異的な配列と結合し、スプライシングを制御する。これまでに SRSF1 の RNA 結合モチーフである RRM2 ドメインが 5' -GGA-3' モチーフの RNA と直接相互作用することが知られていた。興味深いことに、Ser133 は RRM2 に位置しているため、SRSF1 の Ser133 リン酸化が SRSF1 とモチーフ RNA との相互作用に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、SRSF1 と 5' -ビオチン化 RNA プローブとの間の相互作用は、S133D および S133A 変異の両方によって減少した。リン酸化模倣体および、脱リン酸化模倣体の両方において結合が減少したことから、SRSF1 Ser133 の側鎖が RNA 結合の調節に直接関与している可能性が示唆された。次に、AMPK による Ser133 リン酸化が SRSF1 の RNA 結合能に影響を与えるか調べた結果、AMPK でリン酸化された SRSF1 は、5' -ビオチン化された RNA プローブへの結合が減少することが示された。

リン酸化 SRSF1 が選択的スプライシングに及ぼす影響の解析

SRSF1 は、マクロファージ刺激タンパク質受容体である Ron の pre-mRNA の選択的スプライシングを制御する。SRSF1 は Ron のプレ mRNA と相互作用し、Ron エクソン 11 をスキップすること

でエクソン 11 が排除された転写産物である Ron の産生を促進し、細胞の運動性や浸潤性を高める。そこで、AMPK による SRSF1 を介した Ron エクソン 11 の選択的スプライシングの制御を解析した。その結果、AMPK 阻害剤である Compound C 処理による AMPK の阻害は、Ron エクソン 11 のエキソンスキップを促進し、一方 AMPK 活性化剤である A769662 処理による AMPK 活性化は Ron エクソン 11 のエキソンスキップを抑制させた。AMPK が SRSF1 を介して Ron スプライシングに影響を与えるかどうかを確認するために、SRSF1 欠損細胞を用いて同様の解析を行った結果、SRSF1 欠損細胞では、A769662 処理を行っても Ron エクソン 11 スキップはさらに抑制されなかった。これらの結果から、AMPK が SRSF1 を介して Ron エクソン 11 のスプライシングを変化させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Eri, Akiyama Kaho, Saito Takuya, Matsumoto Yu, Kobayashi Ken-Ichi, Inoue Jun, Yamamoto Yuji, Suzuki Tsukasa	4. 巻 -
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1042/BCJ20190894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木 司、松本 英里、松本 雄宇、井上 順、山本 祐司
2. 発表標題 AMPKがSRSF1を介して選択的スプライシングに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eri Matsumoto, Ryo Sato, Kaho Akiyama, Yuji Yamamoto, Yu Matsumoto, Tsukasa Suzuki
2. 発表標題 AMPK affects alternative splicing via SRSF1 phosphorylation.
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 英里、鈴木 司、井上 順、山本 祐司
2. 発表標題 AMPKによるSRSF1のリン酸化を介した選択的スプライシング制御機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eri Mastsumoto, Ryo Sato, Hazime Fukuda, Kaho Akiyama, Yuji Yamamoto, Yu Matsumoto, Tsukasa Suzuki
2. 発表標題 Effect of AMPK-induced SRSF1phosphorylation on alternative splicing
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaho Akiyama, Takuya Saito, Masaki Saito, Yuka Otuka, Tsukasa Suzuki, Yu Matsumoto and Yuji Yamamoto
2. 発表標題 Effect pf AMPK-induced DDB1 phosphorylation on DNA damage repair.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----