

# 研 究 報 告 書(公開)

## 「RNA 品質管理機構を介した遺伝子発現制御」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：山下 暁朗

### 1. 研究のねらい

ヒトの遺伝性疾患および癌における変異のうち約 1/3 は異常な早期終止コドンを生じますが、mRNA 品質管理機構により変異 mRNA が排除されます。本研究では、異常な終止コドンを有する mRNA 品質管理機構の分子メカニズムを基に、異常終止コドン認識過程を阻害し、認識複合体を濃縮することにより、変異 mRNA およびその構造を簡易に明らかにする方法の確立を目指します。この技術は、癌および遺伝性疾患の診断、治療の基盤技術となることが期待されます。

### 2. 研究成果

#### 1) 異常終止コドン識別機構に関する研究成果

正常なタンパク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) である。このシステムは、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、遺伝性疾患やガンでは全変異の約三分の一に PTC が認められる。生体は、NMD により異常な構造を持つタンパク質断片の蓄積を免れている。ナンセンス mRNA は、多くの場合正常な mRNA とは 1 塩基の違いしかなく、細胞がどのようにしてこれを見分けているのかについては長い間謎であった。動物細胞では、スプライシングを受けた mRNA が NMD の基質となり、終止コドンと最後のエキソン連結部位が NMD のシス配列として機能する。エキソン連結部位に結合するタンパク質複合体 Exon-junction complex (EJC) が PTC を識別する“ダウンストリームマーカー”として機能する。一方で、異常終止コドンを識別する分子複合体の実態は解明されておらず、本研究からは、その生化学的な同定を目指し解析を行った。

本研究における解析により動物細胞では、初期翻訳時にリボソームが終止コドンに遭

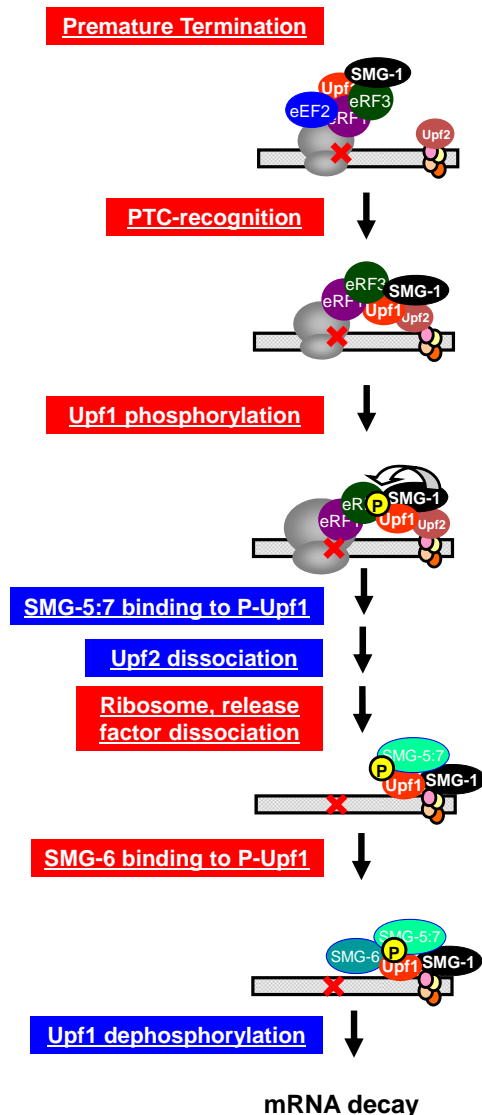


図1: NMD の分子機構



遇すると、NMD 制御因子 (SMG-1、Upf1) と翻訳終結因子 (eRF1、eRF3) からなる SURF (SMG-1:Upf1:eRF1:eRF3) 複合体がリボソーム上で形成されることを明らかにした。さらに、リボソーム:SURF 複合体よりも 3'側に“ダウストリームマーカ―”EJC が存在した場合、リボソーム:SURF 複合体と EJC が Upf2:Upf3 を介して結合し、Decay inducing complex (DECID: リボソーム:SURF:EJC 複合体) が mRNA 上で形成され、PTC が認識されることを解明した。この結果は、異常終止コドンを見分けている分子複合体を初めて生化学的に同定したものである(図1)。分子複合体の生化学的同定は、NMD 制御因子の不活性化により、連続したタンパク質複合体のリモデリングにより担われる異常終止コドンの識別から mRNA を分解する過程を停止することによりもたらされた。同様の方法を用い、終止コドン識別後、mRNA 分解にいたる過程についても解析を行い、SMG-1 による Upf1 リン酸化依存的に SMG-5:SMG-7 複合体がリクルートされること、SMG-5 依存的にリボソームが解離すること、SMG-5:SMG-7 複合体とは異なる Upf1 リン酸化部位に SMG-6 がリクルートされることを明らかにした(図1)。

さらに、新たに高精度細胞内タンパク質複合体精製法を樹立し、新規の SMG-1 結合タンパク質の同定をおこなった。その結果、AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーに属する2つのタンパク質 RuvB-like (RUVBL) 1、RUVBL2、新規分子である SMG-10、RNA polymerase 構成因子である RPB5 を同定した(図2)。これらの分子の NMD への関与について解析したところ、いずれの機能障害も SMG-1 による Upf1 のリン酸化を抑制し、NMD を強く抑制することが明らかとなった。さらに RUVBL1 の機能障害により、PTC の mRNA 認識を成立させる DECID 複合体の形成が抑制されることを見いだした。また、予想を超えた発見として、RUVBL1、RUVBL2 が PIKK ファミリー全体を制御していることを見いだした(図2)。SMG-1 を含む PIKK ファミリーの分子群は、ゲノム安定性や正確な遺伝子発現を保障する役割を担っており、PIKK の適切な制御は生物学的、また医学的見地から極めて重要である。この成果は、NMD にとどまらず、PIKK の関わるさまざまな細胞ストレス応答制御の理解の基盤となるとともに、ガンや遺伝性疾患の治療へ向けた医学応用研究への発展も期待される。

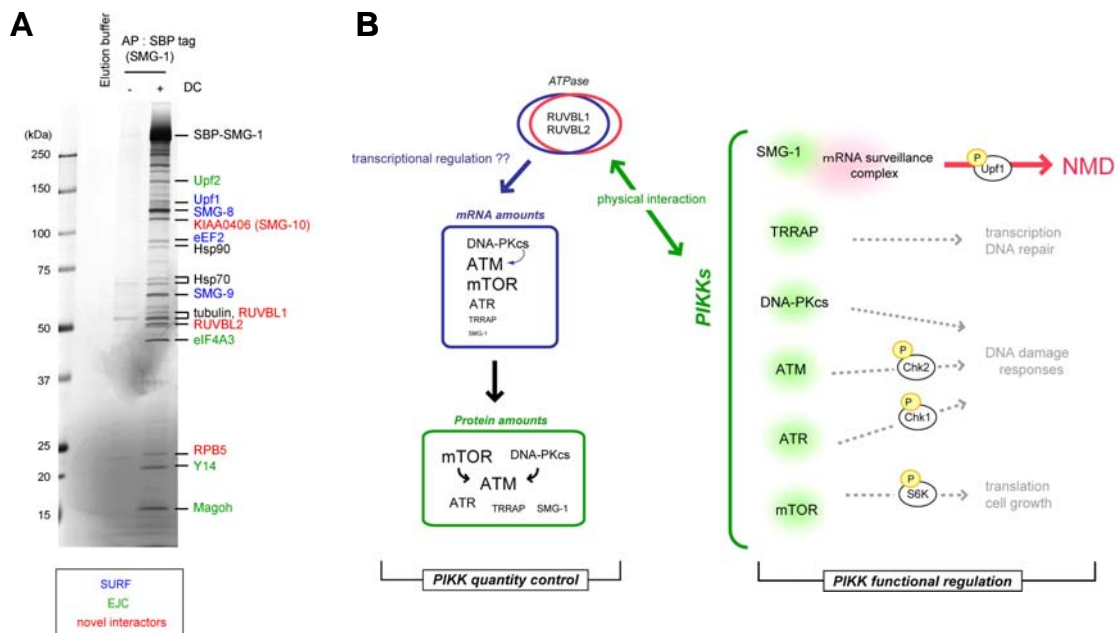


図2:SMG-1 新規結合タンパク質 RUVBL1/2 は PIKK を統御する。

A:新たに樹立した方法による SMG-1 結合タンパク質の精製

B:RUVBL1/2 による PIKK 制御機構(模式図)

## 2) SMG-1 の活性制御機構に関する研究成果

NMDにおいてSMG-1によるUpf1のリン酸化はナンセンス mRNAの分解を決定づける律速反応である。しかしどのようにしてSMG-1の活性が制御されているのかは明らかになっていなかった。SMG-1制御機構を明らかにするために、細胞内在性のSMG-1を免疫沈降法により精製し、SMG-8、SMG-9を同定した。SMG-1、SMG-8、SMG-9はタンパク質リン酸化酵素複合体(SMG1C: SMG-1 complex)を形成しており、触媒活性を有するSMG-1とその活性を制御するSMG-8、SMG-9により構成されることを明らかにした。SMG-8は、通常SMG-9とともにSMG-1と安定な複合体を形成しSMG-1の酵素活性を抑制しており、NMDにおいてはSMG-1:SMG-8:SMG-9複合体を、SMG-1活性化の場であるEJCヘリクルートすることでSMG-1の活性化に寄与するSMG-1の活性制御因子であることを解明した。SMG-9はN末端側に天然変性タンパク質領域を、C末端側にNTPase様領域を有するタンパク質で、細胞内でホモ二量体としても存在しており、SMG1C形成に必須の役割を果たすことを明らかにした。

さらに、動物細胞からタンパク質複合体を大量調整する方法を独自に樹立し、クライオ電子顕微鏡法による構造解析を共同研究により行った。具体的には、SMG-1:SMG-8:SMG-9複合体、SMG-1:SMG-9複合体、SMG-1単体を行ったが、SMG-1:SMG-9複合体、SMG-1単体については、細胞内在性のSMG-8、SMG-9の混入が問題となった。そのため、1)内在性タンパク質のsiRNAによる発現抑制、2)特異抗体を用いた精製後のSMG-8、SMG-9の除去という新たな方法を考案し、高精度の複合体取得を行い、クライオ電子顕微鏡法単独使用においては高解像度の立体構造取得に成功した(図3)。3つの分子複合体の比較と生化学的解析によりSMG-8が、SMG-1:SMG-9複合体の構造を大きく変えることにより、SMG-1の酵素活性を抑制していることを解明した。

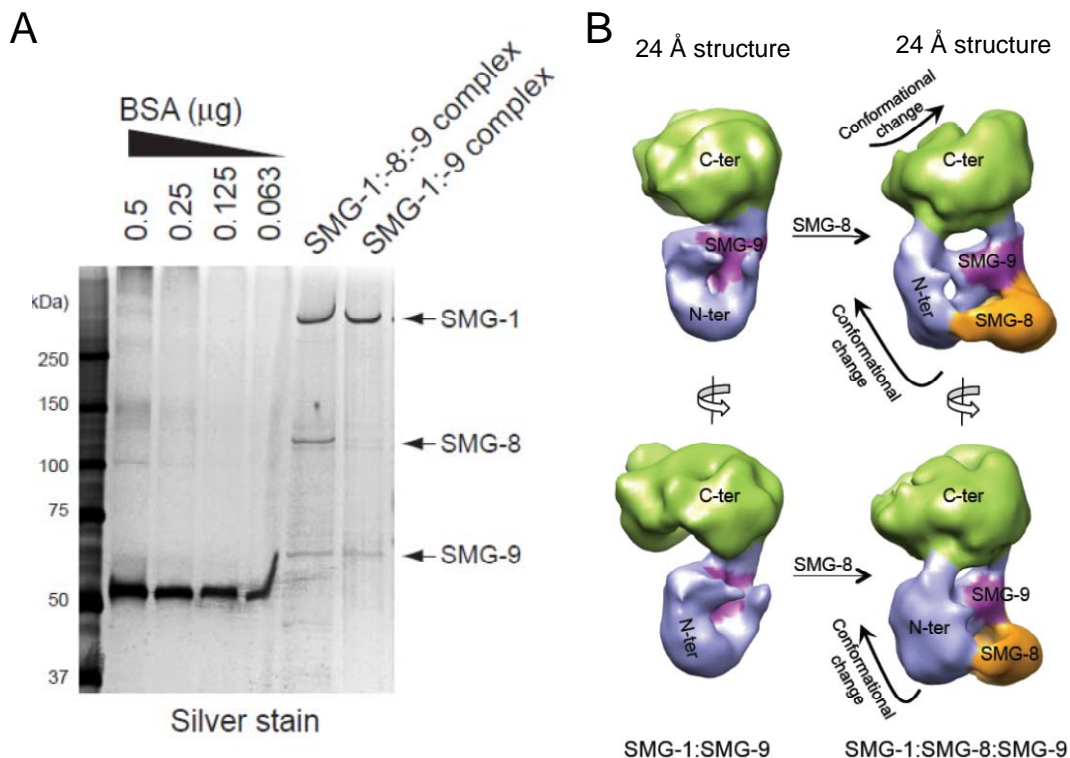


図3: SMG-1 複合体の精製とその構造。

A: SMG-1:SMG-8:SMG-9 複合体、SMG-1:SMG-9 複合体の精製

B: SMG-1:SMG-8:SMG-9 複合体、SMG-1:SMG-9 複合体の立体構造

### 3) RNA 品質管理機構による遺伝子発現制御に関する研究成果

本研究において解明した、mRNA 品質管理機構の分子メカニズムにより、PTC 認識複合体および、PTC 認識後の複合体が明らかとなった。この、PTC 認識複合体を NMD を阻害することで蓄積させ、そこに含まれる mRNA を次世代シーケンサー (Illumina GAIIx) により解析するという PTC-mRNA Trap 法を考案した。研究の結果、複数の遺伝子について PTC を生じる変異が同定されている大腸がん由来 HCT116 細胞を用いて、異常終止コドン認識複合体を SMG-1 ノックダウンにより蓄積させ、そこに含まれる mRNA を解析することで NMD により直接制御される mRNA を同定可能なことを見いだした。解析の結果、NMD 制御因子群の多くが NMD により発現調節を受けるフィードバック制御がなされていることが明らかとなった。

一方で、異常終止コドン認識複合体には、微量の mRNA しか含まれておらず、定法では定量的な解析が難しいことも明らかとなった。このため、シーケン斯拉イブラリー作成法の改善を行い、0.5ng 以下の RNA から library を作成することに成功した。

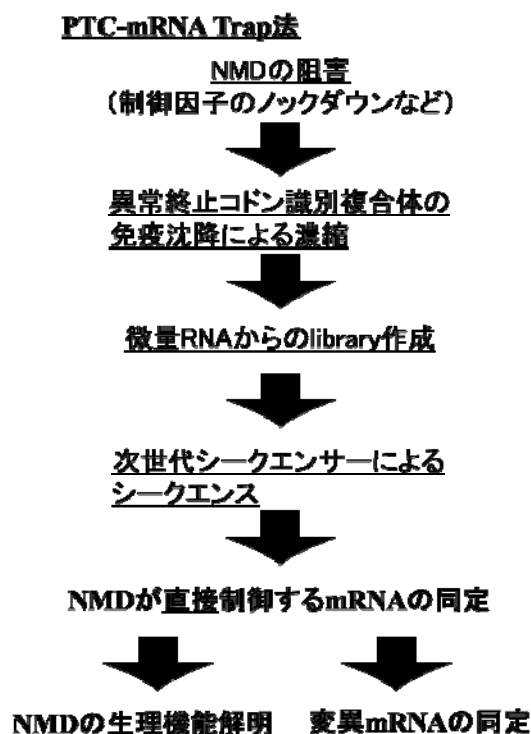


図4: PTC-mRNA Trap 法。

### 3. 今後の展開

本研究では、目標に向けて研究を進めるに当たり、既存の方法を改良し、今後の研究にも使用可能な、様々な、新たな実験プロトコルを樹立した。これらを用いて(1)PTC 認識複合体の全体構造解析、(2)PTC 認識機構の解明に基づいた NMD 制御剤の開発、(3)NMD 制御剤を用いた遺伝性疾患治療、(4)PTC-Trap 法を発展させ、変異 mRNA 同定法を確立、(5)NMD が直接制御する mRNA 産物の解析による、がん細胞・幹細胞における NMD の生理機能の解明といった新しいテーマに向けて挑戦していきたい。

### 4. 自己評価

異常終止コドンを識別する分子複合体を生化学的に同定するという目的と、NMD の分子機構解析に対しては、本研究により大きな進展を達成できたと考えている。また、RNA 監視機構による遺伝子発現制御を介した生理的意義を解明するという目的に対しても、次世代シーケンサーを用いて異常終止コドン認識複合体に含まれる mRNA を網羅的に解析する方法を樹立できた。さらに、生理的意義に関してもモデル動物を用いた解析により一定の成果を上げることができ、当初目標にかなり近づくことができたと考えている。一方で、RNA 監視機構の“制御遺伝子群”と“生理機能”を融合させるという目標については研究期間内には一部しか達成できていない。現在精力的に解析を行っているが、今後も解析を続け、RNA 監視機構による遺伝子発現制御の全体像を明らかにしていきたいと考えている。

## 5. 研究総括の見解

変異 mRNA の中の多くのものは、異常な終止コドンが生じている。このような変異 mRNA を排除する機構、すなわち NMD システムの分子機構を担う分子複合体を同定することに成功した。NMD 研究にとって大きな貢献である。さらに、NMD 研究が、広く細胞機能の制御につながる重要な研究であることも示した。NMD 複合体に含まれる mRNA の種類を解析する方法の構築にも成功し、現在、NMD の生理的意義の解析を行っているが、がんや遺伝性疾患の治療に応用できる可能性があり、今後の成果に大きな期待が寄せられる。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Arias-Palomo E, <u>Yamashita A (co-first author)</u> , Fernández IS, Núñez-Ramírez R, Bamba Y, Izumi N, Ohno S, Llorca S: Nonsense-Mediated mRNA Decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. <i>Genes and Development</i> . 25(2):153-164. 2011.
2. Usuki F, <u>Yamashita A</u> , Fujimura M: Post-transcriptional Defects of Antioxidant Selenoenzymes Cause Oxidative Stress under Methylmercury Exposure. <i>J. Biol. Chem.</i> 2011 286: 6641-6649.
3. Fernández SI, <u>Yamashita A (co-first author)</u> , Arias-Palomo E, Bamba Y, Bartolomé RA, Canales MA, Teixidó J, Ohno S, Llorca O: Characterization of SMG-9, an essential component of the nonsense-mediated mRNA decay SMG1C complex. <i>Nucleic Acids Research</i> . 39(1):347-358. 2011. (Epub 2010 Sep 3)
4. Izumi N, <u>Yamashita A (corresponding author)</u> , Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P, Ohno S: AAA+ family ATPases, RUVBL1 and RUVBL2, coordinate PIKK family and play critical roles in Nonsense-mediated mRNA decay. <i>Science Signaling (Science姉妹誌)</i> . 3: ra27. 2010.
5. <u>Yamashita A (corresponding author)</u> , Ohno S. Analysis of Nonsense-mediated mRNA decay by the monitoring of mRNA half lives in mammalian cells. <i>CSH protocol</i> . (2):pdb.prot5386. 2010.
6. Yamashita A (corresponding author), Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Kurata R, Hachiya T, Hirano H, Anderson P, Ohno S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. <i>Genes and Development</i> . 23(9): 1091-1105. 2009.

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### 著作物

1. 山下暁朗, 臼杵扶佐子. mRNA surveillance の分子機構と生命現象、疾患との関わり. *実験医学*. 2010, 28(10): 1606-1613、羊土社
2. 臼杵扶佐子, 山下暁朗. NMD と疾患. *細胞工学*. 2010, 29(2):155-160、秀潤社
3. 山下暁朗, 臼杵扶佐子. mRNA 品質管理システムと疾患. *タンパク質核酸酵素*. 2009, 54(16):2219-2225、共立出版

#### 受賞

平成 23 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞受賞 平成 23 年 4 月 20 日  
平成 22 年度横浜市立大学医学会賞受賞 平成 23 年 4 月 16 日

#### 招待講演

1. 山下暁朗: mRNA サーベイランス機構による変異 mRNA 排除と疾患, 日本環境変異原学会第 39 回大会, 筑波, 2010. 11.

#### シンポジウム

1. 山下 暁朗、Ernesto Arias-Palomo、Israel S. Fernández、番場由美、星野耕二、上村博司、Oscar Llorca、大野茂男: mRNA 品質管理機構制御因子 SMG-1 の構造と生理機能, BMB2010-第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2010. 12.
2. Yamashita A, Izumi N, Okada-Katsuhata Y, Kutsuzawa K, Muramatsu R, Saari B, Iwamatsu A, Hirano H, Hirahara F, Anderson A, Ohno S: THE REMODELING OF MRNA SURVEILLANCE COMPLEX DURING NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY. 2009 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic mRNA Processing, New York, 2009. 8.
3. Yamashita A, Izumi N, Kashima I, Katsuhata Y, Muramatsu R, Ohno S: TRANSLATION TERMINATION COMPLEX DURING NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY. 2008 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Translational Control, New York, 2008. 9.
4. 山下暁朗, 泉奈津子, 鹿島勲, 森田智子, 村松玲子: 翻訳依存的な mRNA 監視複合体形成および再構成が Upf1 リン酸化を誘導する, BMB2007-第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007. 12.