

mRNAの品質監視機構

～分子機構とその操作技術の生物学・医学への展開～

横浜市立大学大学院 医学研究科 分子細胞生物学 大野 茂男

【目的】

酵母や線虫などの遺伝学的な解析をきっかけとして、タンパク質をコードする mRNA の品質（塩基配列の異常）が翻訳に先だってチェックされ、ナンセンスコドンを含む異常な mRNA は特異的に分解・排除されるという驚くべき機構があることが明らかとなってきた。この機構は、mRNA の品質監視機構（mRNA サーベイランス）（NMD, nonsense-mediated mRNA decay）と呼ばれ、遺伝子の変異や発現過程の誤作動から細胞を守る防御機構の一環であると考えられる。

本研究は、私たちがタンパク質リン酸化酵素の活性モニタリング法の開発の過程で見出した SMG-1 というプロテインキナーゼが、mRNA サーベイランスの主要な役割を演じているとの発見に端を発している。本研究では、その役割の解析を通じて mRNA サーベイランスにおける異常 mRNA の認識の分子機構の解析を進めると同時に、その成果をもとにして、mRNA サーベイランスを操作する方法を開発する。さらに、その操作技術を利用して、ヒト遺伝性疾患における、mRNA サーベイランス機構の位置づけや、診断・治療への可能性、新規疾患関連遺伝子の検索や診断への応用の可能性を探ることを目的とする。

mRNA の品質監視機構（mRNA サーベイランス）とは？

ナンセンス変異やフレームシフト変異などに代表される遺伝子変異の 1/4 から 1/3 は、結果的に mRNA 上の異常な位置に終止コドン（ナンセンスコドン）が生じるタイプの変異であると言われている。このような mRNA はナンセンス mRNA と呼ばれ、途中で途切れたトランケート型のタンパク質をコードする。このようなタンパク質は、一般に生体にとって有害である。最近の研究から、真核生物がこのような異常タンパク質をコードするナンセンス mRNA を特異的に識別し、分解・排除する機構を備えていることが明らかとなってきた。これは mRNA サーベイランス（mRNA の品質監視機構）、或いはナンセンス依存 mRNA 分解（NMD, nonsense-mediated mRNA decay）と呼ばれている。ナンセンス mRNA は、遺伝子変異以外にも、転写ミスやスプライシングのミスなどによっても生じる。mRNA の品質監視機構は、遺伝子発現過程が正常に機能していることを監視する機構のひとつとも言える。さらに、生理的な遺伝子発現調節機構としての役割も推測されている。

何がわかっていなかったのか？

mRNA の品質監視機構の解析は、これまで酵母や線虫の遺伝学と哺乳動物培養細胞を用いた生化学的な解析が行われてきたが、もっとも根源的な疑問である異常 mRNA の認識の機構は不明である。また、哺乳動物におけるその生理的な意義や疾患との関わりを解明するには、mRNA を操作する技術の開発が必要であるが、変異体の利用以外には調べる手だてがなく、生理的な意義や疾患との関わりはほとんど不明といってよい。

【5年間の成果】(何がわかったのか?何が可能となったのか?)

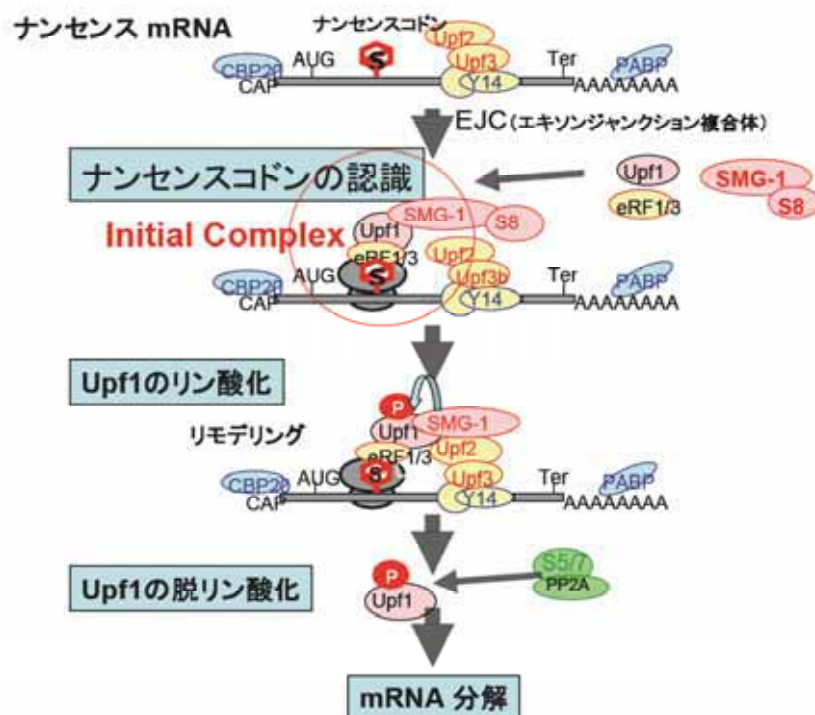
1. 異常 mRNA 認識の分子機構の解明

リン酸化が mRNA サーベイランスに必須である (SMG-1 というキナーゼが UPF1 の特異的な部位をリン酸化する)

これまでに、mRNA サーベイランスに関わる真核生物 (ヒト) hSMG-1 の cDNA 及びタンパク質を初めて同定し、配列と機能を決定した。さらに、hSMG-1 が hUPF1 の特定部位をリン酸化することが、mRNA サーベイランスに必須であることを証明した。リン酸化部位を認識する一群のモノクローナル抗体を作成し、これを用いて簡便に mRNA サーベイランスの状況をモニターすることが可能となった。

このリン酸化反応は、スプライシングを受けた mRNA 上でリボソームがナンセンスコドンを認識した時に起きる

これまでの解析から、mRNA サーベイランス系におけるナンセンスコドン認識 (ナンセンスコドンを有する異常 mRNA の認識) の過程に関わる仮想的なサーベイランス複合体の存在が予想されている。hSMG-1 と結合するタンパク質の解析から、SMG-1 が翻訳終結因子、EJC (exon junctional complex)の構成員などと相互作用すると同時に、これらとの結合が SMG-1 による UPF1 のリン酸化反応に必須であることを見出した。その他の結果も含め、SMG-1 による UPF1 のリン酸化は、まさに上述のサーベイランス複合体上でナンセンスコドン認識の際に起きることを示している。(論文準備中)



ナンセンスコドン認識の分子機構

リン酸化をサポートする新規タンパク質の発見

SMG-1 と強固に結合している新規分子 SMG-1-BP1 (SMG-8 と命名) を同定し、配列を決定した。SMG-8 は進化的に保存しており、その線虫ホモログの RNAi 法による機能阻害実験から、mRNA サーベイランスへの関与が示された。SMG-8 はナンセンスコドン認識の際に、SMG-1 の働きを助ける作用をしていると考えられる。(論文準備中)

UPF1 のリン酸化は、仮想的なサーベイランス複合体のリモデリングを引き起こし、脱リン酸化酵素 PP2A をリクルートする

ヒト SMG-5, SMG-7 の同定と解析から、UPF1 のリン酸化が SMG-5, SMG-7 などの分子の会合を惹起することを見出すと同時に、リン酸化と脱リン酸化の過程で UPF1 を中心としたサーベイランス複合体のリモデリングが起きることを見出した。

PP2A による UPF1 の脱リン酸化も、mRNA サーベイランスに必須である

SMG-1 によりリン酸化された、hUPF1 が hSMG-5, hSMG-7 さらには PP2A の働きにより脱リン酸化されることが、mRNA サーベイランスに必須である。UPF1 の SMG-1 によるリン酸化と PP2A による脱リン酸化されることの両方が、mRNA サーベイランスに必須である。

2. mRNA サーベイランスの特異的阻害技術の開発

上記の分子機構解析の過程で、hSMG-1 という巨大なプロテインキナーゼが PIKK ファミリーに属し、Wortmannin や caffeine により阻害されることを見いだしている。さらに、hSMG-1 や hUPF1 の変異体を発現することにより、特異的に mRNA サーベイランスを抑制できることを示してきた。これらの方法を用いて mRNA サーベイランスを抑制することにより、実際に、本来合成されないナンセンス変異を有する遺伝子産物を、合成させることに初めて成功している。さらに、上記に加え、SMG-1 の RNAi による発現抑制法を開発した。

これまではタンパク質合成阻害剤のみが、mRNA の品質監視機構の阻害法として知られていたが、その利用範囲は大きく限られていた。我々が開発したいくつかの手法を用いることにより、様々な疾患における mRNA の品質監視機構の役割を初めて明確に評価することが可能となった。

3. mRNA サーベイランスの特異的阻害技術を用いた、疾患との具体的な関わり の 解明

遺伝性疾患の 1/4 から 1/3 は、mRNA 上の異常な位置に終止コドン (ナンセンスコドン) が生じるタイプの変異であると言われている。この中には、ナンセンスコドンによりトランケートされたタンパク質分子が残存活性を有する場合もあるが、多くの場合、mRNA サーベイランス系により mRNA レベルで分解排除されてしまい、タンパク質は合成されない。このような場合には、mRNA サーベイランス系は生体に害を及ぼしている事となる。このような状況が期待されるケースとして、私たちは重篤な筋ジストロフィー症の一種である Ullrich 病の患者さんに着目した。この患者さんでは、3本鎖構造を有するコラーゲン鎖の1本が上記の理由で合成されない為に、ある種のコラーゲン繊維が合成されず、結合組織の異常が起きている。これを反映して、この患者さんの線維芽細胞は基質への接着能が低下している。私たちは、この患者さんの線維芽細胞を用いて、mRNA サーベイラ

ンス系の阻害により本来合成されないコラーゲン分子が合成できること、細胞の接着能が一部回復することを示した。

この種のケースは、様々な遺伝子について少数ながらあることが容易に想像される。つまり、mRNA サーベイランスの阻害が、時として創薬の標的となる可能性を実際に検証することに成功した事となる。

4. mRNAの品質監視機構の特異的なモニター法の開発

mRNA サーベイランスの生理的、病理的な役割の解析には、その作動状況を的確に把握する方法論の開発も必要である。これまでは、mRNA の分解速度を直接測定する方法しかなかったが、これは煩雑な操作を必要とする。我々は既に、hSMG-1 による hUPF1 のリン酸化が、その有用な指標となることを見出すと同時に、リン酸化部位特異的なモノクローナル抗体を作成して来た。そして、これを用いることにより、極めて簡便にmRNAの品質監視機構の作動状況をモニターすることが可能となった。

本年度は、これらに加え、mRNAの品質監視機構の阻害剤の大規模スクリーニングなどに利用できる簡便な検定システムを開発した。

【フェーズIIIでの取り組み】

1. SMG-1 阻害剤の開発

Wortmannin や caffeine を用いることにより、簡単に mRNA サーベイランスとの関わりを解析することが可能となった。しかし、これらは、SMG-1 の類縁のキナーゼ群に作用するという点で問題を抱えている。SMG-1 特異的な阻害剤が必要である。それを検索する事を目的として、本研究の過程で得られた SMG-1 の発現系をさらに改良して、既に大量発現系を構築している。今後、これを利用して、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを予定している。

2. mRNA サーベイランス阻害剤の開発

本研究の過程で、mRNA サーベイランスを簡便にモニターできる新しい手法を開発した。これを用いることにより、上述の SMG-1 阻害剤とは異なった原理に基づく mRNA サーベイランス阻害剤をスクリーニングできる。今後、これを利用して、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを予定している。

3. mRNA サーベイランス複合体の立体構造解析

本研究により、mRNA サーベイランス複合体の実体が明らかとなり、立体構造の解明を含めた解析が可能となった。今後、その立体構造の解析を進める予定である。

4. 様々な生理機能や疾患における mRNA サーベイランスの役割の具体的な解析

本研究の最大の成果は、mRNA サーベイランスの分子機構の解明により、その意義を様々な状況で調べる事が可能となった点にある。Ullrich 病における意義の解明はその一例である。今後、様々な分野の研究者との共同で、その解析を進める予定である

mRNA サーベイランスを操作するとどのような事が可能となるのか？

mRNA サーベイランスは第一義的には細胞の防御機構であり、生体機能に必要である局面のあることがまず予想される。しかし、一方において、免疫系が時として生体に害を及ぼすことがあるように、本来細胞の防御機構である mRNA サーベイランスが時として生体に害を及ぼしている場合がある。実際に、いくつかの遺伝性の疾患では、mRNA サーベイランスにより症状が増悪しているケースが報告されている。そのような場合には、mRNA サーベイランスを抑制することが疾患症状を緩和する全く新しい方法となる。個人に応じた医療が大きく展開していくことが予想されるが、各々のケースに応じて必要な情報を把握した後に、mRNA サーベイランスの阻害剤や活性化剤を用いた遺伝子発現の操作技術を用いるべきかどうかを予測できるようになることが大いに期待できる。

一方、mRNA サーベイランスは遺伝子変異の発現を抑制する機構であるので、ある状況ではこれを抑制することにより、隠れた遺伝子変異を顕在化する方法論となりうる。線虫の遺伝学の基本的なツールの一つとなっている。マウスなどにもこれを応用できる可能性がある。

参考文献

- 1) Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, Ohnishi T, Shiraishi T, Osame M, Ohno S. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol*, 55(5), 740-744, 2004
- 2) Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K. R., Grimson, A., Hachiya, T., Matthias W. Hentze, M. W., Anderson, P., and Ohno, S. : Phosphorylation of hUPF1 Induces Formation of mRNA Surveillance Complexes Containing hSMG-5 and hSMG-7. *Molecular Cell*, 12 (5), 1187-1200, 2003.
- 3) Yamashita, A, Ohnishi, T, Kashima, I, Taya, Y and Ohno, S.: Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay, *Genes Dev*, 15, 2215-28., 2001.
- 4) 山下暁朗、鹿島勲、大野茂男：hUPF1 のリン酸化と脱リン酸化による mRNA 監視複合体リモデリング。 *実験医学*, Vol.22 (4), 522-525, 2004
- 5) 山下暁朗, 大西哲生, 大野茂男：mRNA サーベイランス, *蛋白質・核酸・酵素*, 47(2), 101-112, 2002.

(一連の研究は、主に横浜市立大学大学院医学研究科分子生物学教室において行われたものである。)