

氏名	松本英里
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	甲第812号
学位授与の日付	令和3年3月20日
学位論文題目	AMPKの新規基質SRタンパク質の同定とその機能解析
論文審査委員	主査 教授・博士(薬学) 井上 順 教授・博士(農芸化学) 山本 祐司 教授・博士(医学) 高橋 信之 博士(理学) 片岡 直行*

論文内容の要旨

背景・目的

AMP-activated protein kinase (AMPK) はエネルギー欠乏ストレスなどによって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼであり、基質のリン酸化を介してエネルギー産生を伴う異化作用を促進する一方で、エネルギー消費を伴う同化作用を抑制することで細胞内エネルギー恒常性に寄与する。AMPK はヘテロ三量体として機能し、キナーゼ活性を有する触媒サブユニットである α サブユニット、グリコーゲン結合ドメインを持つ β サブユニットおよびATP, ADP, AMPと結合する γ サブユニットの2つの制御サブユニットから構成されている。 α サブユニットのThr172のリン酸化はAMPKのキナーゼ活性化に必須であり、上流のキナーゼであるLKB1やCaMKK β によってリン酸化される。また、細胞が飢餓状態に陥ったとき、増加したAMPが γ サブユニットに結合してAMPKをアロステリックに活性化させる。

これまで報告されているAMPKの基質はエネルギー代謝に関わるものがほとんどであった。しかし、近年になって細胞極性に関わるタンパク質も基質として同定され、AMPKはエネルギー代謝調節以外にも多様な機能を持つことが明らかとなった。本研究室においても、AMPKの新たな機能を明らかにするため、AMPKの新規基質の探索を行ってきた。AMPK基質を同定するために、ヒト胎児腎由来であるHEK293T細胞にアフィニティー・タグ融合型のAMPKを発現させ、タグ特異的に結合するビーズを用いてAMPK-タンパク質複合体を精製し、質量分析によりAMPKと結合するタンパク質を網羅的に解析した。さらに、検出されたタンパク質の中からAMPKによるリン酸化モチーフ配列を持つものを選抜した結果、AMPK新規基質の候補としてRNA結合タンパク質であるserine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1)とSRSF9を見出した。

*東京大学 大学院農学生命科学研究科 准教授

SRSF1, SRSF9 は SR タンパク質ファミリーに属し、主な役割として mRNA 前駆体のスプライシング制御が知られており、ヒトでは 12 種類の SR タンパク質が報告されている。SR タンパク質は 1 つまたは 2 つの RNA recognition motif (RRM) と、アルギニンとセリンに富んだ RS ドメインを 1 つ有する。RRM は RNA との結合に関与し、RS ドメインはタンパク質との結合に関与している。SRSF1 と SRSF9 は RRM1 及び RRM2 を有する。また、RRM2 は RNA 結合に関して配列特異性を持つこと報告されており、特定の mRNA との結合に重要な役割を担う。興味深いことに、AMPK によるリン酸化部位は SRSF1 と SRSF9 共に RRM2 配列内に存在することがリン酸化モチーフ配列を利用した予測結果から見出されている。実験 1 では SRSF1 及び SRSF9 のリン酸化部位の同定を試みた。

SR タンパク質は mRNA 前駆体のエクソン配列と結合し、スプライシング複合体と相互作用し、エクソンの認識を促進させることでスプライシングの制御を行っている。そのため、SR タンパク質は特定のエクソンとの結合の有無によって選択的スプライシングに関与することができる。そこで、本研究の実験 2 では AMPK が SRSF1 をリン酸化することでエクソン配列との結合が変化し、選択的スプライシングに影響を及ぼすか解析することを目的とした。

また、SR タンパク質は主に核に局在しているが、一部の SR タンパク質は mRNA と結合したまま核から細胞質へ移行することで、細胞質内での翻訳にも関与することが報告されている。実際に SRSF9 は標的 mRNA と結合し、タンパク質合成を制御する mechanistic target of rapamycin complex 1(mTORC1)依存的な翻訳を促進する。そこで、実験 3 では AMPK が SRSF9 をリン酸化することで RNA との結合が変化し、SRSF9 を介したタンパク質合成に影響を及ぼすか解析することを目的とした。

実験 1. AMPK 新規基質 SRSF1 及び SRSF9 のリン酸化部位の同定

AMPK は SRSF1 及び SRSF9 の RRM2 に存在するアミノ酸残基をリン酸化することが AMPK によるリン酸化モチーフ配列から予想された。そこで SRSF1 及び SRSF9 が AMPK によってリン酸化されるか検証するために、AMPK 精製標品と AMPK によるリン酸化が予想されたリン酸化部位を含む SRSF1 及び SRSF9 のペプチドを用いて、³²P を利用した *in vitro* kinase assay による解析を行った。その結果、野生型 (WT) のペプチドでは AMPK によるリン酸化が検出されたが、AMPK によるリン酸化を受けると予想された Ser (SRSF1 においては Ser133 が該当し、SRSF9 においては Ser123 が該当する) を Ala に置換した変異体では AMPK によるリン酸化は検出されなかった。したがって、*in vitro* において AMPK は SRSF1 の S133 及び SRSF9 の S123 をリン酸化することが示された。

次に、培養細胞内においても AMPK が SRSF1 及び SRSF9 をリン酸化するか解析するた

めに部位特異的抗リン酸化抗体を作製した。HEK293T 細胞に SRSF1 及び SRSF9, AMPK の各サブユニットを過剰発現させて WB にて解析を行った。その結果, AMPK を共発現することで本抗体によるバンドが検出され, 脱リン酸化酵素を処理することでこのバンドの消失が認められた。よって, 作製した抗体のリン酸化特異性が確認できた。さらに, S133A 及び S123A では AMPK 共発現によるリン酸化の上昇は認められなかった。以上の結果から, この抗体のリン酸化部位特異性が確認でき, 過剰発現系において AMPK は SRSF1 及び SRSF9 をリン酸化することが示された。次に, 内在性においても同様に AMPK による SRSF1 及び SRSF9 のリン酸化が認められるか検証するために, AMPK 阻害剤である Compound C を HEK293T 細胞に添加し, リン酸化を WB により検出した。その結果, Compound C を添加することでリン酸化が低下した。したがって, 過剰発現系および内在性において AMPK は SRSF1 及び SRSF9 をリン酸化することが示された。

実験 2. AMPK 新規基質 SRSF1 を介した選択的スプライシング制御

・結果 2-1 AMPK による SRSF1 のリン酸化が RRM2 特異的に結合する RNA 配列との結合に及ぼす影響の解析

SRSF1 の RRM2 内には RNA と直接結合する SWQDLKD モチーフと呼ばれるアミノ酸配列から名付けられたモチーフが存在し, Ser133 は SWQDLKD の S に該当する。そのため, Ser133 のリン酸化は RNA との結合に影響を与えることが考えられた。また, 過去の報告では, SWQDLKD モチーフを介して 5'-GGA-3'配列と結合することが知られている。そこで, AMPK が SRSF1 をリン酸化することで 5'-GGA-3'配列との結合が変化するか検討した。

まず, 本研究においても SRSF1 が 5'-GGA-3'配列と結合するか確認するために, 5'-GGA-3'配列を含むオリゴ RNA 配列である 5'-CUGAAGGACA-3'の 5'側をビオチン化したプローブと Myc-SRSF1 を過剰発現させた HEK293T 細胞の破砕液を混合し, アビジンビーズによる RNA pull-down assay を行い, ビオチン化 RNA プローブと結合する SRSF1 を WB にて検出した。その結果, Myc-SRSF1 と 5'-CUGAAGGACA-3'との結合が確認でき, 一方, 5'-GGA-3'を 5'-UUA-3'に変異させた 5'-CUGAAUUACA-3'と Myc-SRSF1 との結合は顕著に低下した。よって, 本研究においても SRSF1 は 5'-GGA-3'配列と特異的に結合することが確認できた。

次に, SRSF1 の Ser133 のリン酸化が 5'-GGA-3'と SRSF1 の結合に及ぼす影響について検討するために, まず, SRSF1 のリン酸化を AMPK 共発現によって上昇させたうえで, SRSF1 とビオチン化 RNA プローブとの結合を解析した。その結果, ビオチン化 RNA プローブと結合する Myc-SRSF1 量が AMPK の共発現によって有意に減少した。次に, 疑似リ

ン酸化変異体の S133D と非リン酸化変異体の S133A を用いて前述した実験と同様の解析を行った。その結果、S133D のみならず、S133A においても WT と比較してビオチン化 RNA プローブと結合する Myc-SRSF1 量が顕著に減少した。この要因として Ser133 の側鎖のヒドロキシ基自体が 5'-GGA-3' との結合に直接関与している可能性が示された。以上の結果から、*in vitro* において AMPK は SRSF1 の SWQDLKD モチーフ内にある Ser133 をリン酸化することで 5'-GGA-3' 配列を含む RNA との結合を阻害することが示された。

・結果 2-2 AMPK が SRSF1 と Ron mRNA との結合に及ぼす影響の解析

SRSF1 は様々な腫瘍において過剰に発現しており、標的遺伝子のスプライシングパターンを変化させることで活性が異なる翻訳産物が生成され、これが腫瘍細胞の増殖や浸潤性の増加を引き起こすことが報告されている。その標的遺伝子の一つにマクロファージ刺激タンパク質(MSP)受容体型キナーゼである Ron が存在する。Ron は MSP などと結合することで活性化し、細胞の浸潤に関与する。SRSF1 は Ron mRNA 前駆体のエクソン 12 と結合することで、エクソン 11 のスキッピングを促進することが報告されている。そのため、AMPK が SRSF1 をリン酸化することでエクソン 12 との結合が変化するか検討した。

SRSF1 はエクソン 12 の配列内にある 5'-CGGAGGAAG-3' と直接結合することが報告されている。本研究においても SRSF1 が 5'-CGGAGGAAG-3' と結合するか確認するために、結果 2-1 と同様にプローブを用いた RNA pull-down assay を行った結果、ビオチン化 5'-CGGAGGAAG-3' RNA プローブと SRSF1 との結合が確認され、一方で、このプローブ内における 5'-GGA-3' 配列を変異させた 5'-CGGUUGUUG-3' プローブでは、SRSF1 との結合が顕著に低下した。よって、本研究においても SRSF1 はエクソン 12 の配列と特異的に結合することが確認できた。

次に、SRSF1 の Ser133 のリン酸化がエクソン 12 との結合を低下させるか検討を行った。SRSF1 のリン酸化によってもこのプローブとの結合が低下するか検証するために、SRSF1 のリン酸化を AMPK 共発現によって上昇させたうえで SRSF1 とビオチン化 5'-CGGAGGAAG-3' プローブとの結合を解析した。その結果、このプローブと結合する Myc-SRSF1 量が AMPK の共発現で顕著に減少した。次に、S133D と S133A 変異体を用いてビオチン化 5'-CGGAGGAAG-3' プローブとの結合を解析した。その結果、結果 1-3 と同様に、S133D のみならず、S133A 変異体においても、ビオチン化 5'-CGGAGGAAG-3' プローブと結合する Myc-SRSF1 量が顕著に減少した。以上の結果から、*in vitro* において AMPK は SRSF1 をリン酸化することでエクソン 12 に含まれる配列との結合を阻害することが示された。

続いて、培養細胞内においても AMPK による SRSF1 のリン酸化が Ron mRNA との結合

を低下させるか検討した。Flag-SRSF1 及び Ron ミニ遺伝子 (イントロンを含むエクソン 10 からエクソン 12 の配列) を過剰発現させた HEK293T 細胞の破碎液を用い、これに抗 Flag 抗体を混合し、免疫沈降を行った後、Flag-SRSF1 と結合する Ron ミニ遺伝子由来の mRNA をリアルタイム PCR 法にて検出した。その結果、AMPK によって Ser133 のリン酸化を上昇させた SRSF1 においては Ron ミニ遺伝子由来の mRNA との結合量が減少した。したがって、AMPK は SRSF1 をリン酸化することで Ron mRNA との結合を阻害することが示された。

・結果 2-3 AMPK が SRSF1 依存的な選択的スプライシングに及ぼす影響の解析

近年の報告から、SRSF1 は Ron mRNA 前駆体におけるエクソン 11 のスキッピングに関与することで常時活性型の Δ Ron の生成を促進することが示されている。そこで、本研究では AMPK が SRSF1 を介して Ron mRNA のスプライシングパターンを変化させるか検討した。

まず、AMPK の活性を変化させることで Δ Ron/Ron の比率が変動するか検証するために SRSF1 が高発現しているヒト乳癌由来の MCF7 細胞から RNA を抽出し、Reverse Transcription PCR 法にて Δ Ron/Ron の比率を解析した。その結果、AMPK 阻害剤である Compound C を MCF7 細胞に添加することで Ron が減り、 Δ Ron が増えることによって Δ Ron/Ron の比率は上昇し、一方で、AMPK 活性化剤である A769662 を添加することでこの比率は低下した。よって、AMPK の活性の変化は Ron mRNA の選択的スプライシングに影響を与えることが示された。次に、この変化が SRSF1 を介したものであるか調べるために、shRNA 発現レンチウイルスを感染させた SRSF1 ノックダウン細胞を樹立した。過去の報告と同様に、SRSF1 をノックダウンすることで Δ Ron/Ron の比率が低下することが確認できた。さらに、野生型の MCF7 細胞に A769662 を添加することで認められた Δ Ron/Ron の比率の低下が、SRSF1 ノックダウン細胞では認められなかった。したがって、AMPK は SRSF1 を介することによって Ron mRNA のエクソン 11 のスキッピングを抑制することが明らかとなった。

実験 3. AMPK 新規基質 SRSF9 を介した β -catenin 発現制御

・結果 3-1 AMPK による SRSF9-RNA 結合変化

β -catenin は標的となる遺伝子の転写を活性化することで細胞増殖などを制御する。しかし、細胞質や核内において β -catenin タンパク質が異常蓄積することで標的遺伝子の転写が異常に活性化され、腫瘍化が引き起こされる。これまでに β -catenin のタンパク質量の制御についてはプロテアソームによる分解経路が広く研究されている。一方で、近年の β

-catenin タンパク質の合成経路に関する研究報告から、 β -catenin mRNA と SRSF9 が結合することで mTORC1 依存的な翻訳を促進することが示されている。実際に、SRSF9 も腫瘍細胞において過剰発現しており、 β -catenin の発現量に影響を及ぼすことが認められている。しかし、SRSF9 と β -catenin mRNA との結合がどのように制御されているかについては未だ不明である。そこで、本研究では AMPK が SRSF9 をリン酸化することで β -catenin mRNA との結合が変化するか検討した。

まず、 β -catenin mRNA における SRSF9 結合部位の同定を試みた。既に SRSF9 と結合する RNA モチーフ配列が知られていることから、 β -catenin mRNA 配列上にこの結合モチーフ配列があるか予測ツールを用いて検索を行った。その結果、 β -catenin mRNA のエクソン 8 の配列内にある 5'-GGAUGGA-3'配列が見出され、この配列と SRSF9 が結合することが予想された。そこで次に、細胞内において SRSF9 が β -catenin mRNA と上記の配列を介して結合するか検討した。5'-GGAUGGA-3'に含まれる 5'-GGA-3'を変異させた β -catenin 変異体及び Flag-SRSF9 を過剰発現させた HEK293T 細胞破碎液を用い、抗 Flag 抗体にて免疫沈降し、Flag-SRSF9 と結合する β -catenin mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて検出した。その結果、 β -catenin 変異体においては SRSF9 との結合量が減少したことから、SRSF9 は β -catenin mRNA のエクソン 8 と特異的に結合することが示唆された。

次に、Ser123 のリン酸化が β -catenin のエクソン 8 との結合を低下させるかビオチン化 RNA プローブを用いた RNA pull-down assay による検討を行った。まず、SRSF9 の Ser123 のリン酸化においてもこのプローブとの結合を低下させるか検証した。その結果、AMPK の共発現による SRSF9 のリン酸化によって SRSF9 と前述したプローブとの結合が低下した。次にエクソン 8 内に含まれる SRSF9 結合モチーフをビオチン化した RNA プローブ (5'-GGAUGGA-3') とリン酸化部位変異体である S123D 及び S123A との結合を解析した。その結果、S123D のみならず、S123A 変異体においても、このプローブとの結合が低下した。したがって、*in vitro* において、AMPK は SRSF9 の SWQDLKD モチーフをリン酸化することで β -catenin mRNA のエクソン 8 内に含まれる配列との結合を阻害することが示された。

・結果 3-2 AMPK による SRSF9 を介した β -catenin 発現制御

結果 3-1 から、AMPK が SRSF9 の Ser123 をリン酸化することで β -catenin mRNA との結合が阻害されることが示された。次に、このリン酸化修飾により β -catenin タンパク質の発現量が変化するか検討した。まず、過去の報告と同様に SRSF9 の過剰発現によって β -catenin のタンパク質量が増加するか確認を行った。Myc- β -catenin を発現させた HEK293T 細胞に、Flag-SRSF9 を過剰発現させた結果、Myc- β -catenin の発現量が SRSF9

依存的に増加することが確認できた。次に Ser123 のリン酸化部位変異体によって β -catenin の発現量に変化が生じるか、同様の実験を行った。Flag-SRSF9 S123D と S123A においては、WT で認められた SRSF9 過剰発現による Myc- β -catenin の増加作用は低下した。次に、実際に AMPK が SRSF9 をリン酸化することでも Myc- β -catenin 量が変化するか検討した。まず、SRSF9 依存的に上昇した β -catenin 量が AMPK の過剰発現によって抑制されるか同様に解析を行った、その結果、 β -catenin の mRNA 発現量の変化を伴わずに、 β -catenin タンパク質量は AMPK によって抑制されることが示された。次に、AMPK によるリン酸化修飾を受けない S123A 変異体を用いたところ、AMPK 過剰発現による β -catenin 量のさらなる低下は認められなかった。以上の結果から、AMPK は SRSF9 をリン酸化することで SRSF9 を介した β -catenin タンパク質の合成を抑制することが示唆された。

・結果 3-3 SRSF9-mTORC1 結合

SRSF9 のリン酸化によって β -catenin の mRNA との結合が阻害され、SRSF9 による β -catenin タンパク質合成の促進作用が低下することが結果 3-2 から示された。次に、SRSF9 のリン酸化が mTORC1 との結合をも阻害するか検討した。まず、SRSF9 と mTORC1 が結合するか検討するために、Flag-SRSF9 と mTORC1 複合体を過剰発現させた HEK293T 細胞の破砕液を用いて、抗 Flag 抗体による免疫沈降法を行った。その結果、Flag-SRSF9 の WT と mTORC1 複合体との結合が確認された。次に、疑似リン酸化変異体の S123D を用いて mTORC1 との結合を免疫沈降法にて解析した。その結果、Flag-SRSF9 S123D は WT と同様に mTORC1 と結合した。そのため、SRSF9 のリン酸化によって mTORC1 との結合は変化せず、mRNA との結合を阻害することで翻訳を抑制することが示された。

総 括

本研究によって、AMPK の新規基質として SR タンパク質である SRSF1 及び SRSF9 を見出した。また、AMPK は SRSF1 の Ser133, SRSF9 の Ser123 をそれぞれリン酸化することを示した。さらに、AMPK による SRSF1 及び SRSF9 のリン酸化修飾によって標的 mRNA との結合が阻害され、SRSF1 依存的な選択的スプライシング及び SRSF9 依存的な翻訳の促進が抑制されることを示した。

本研究では、SRSF1, SRSF9 ともに RRM2 内の SWQDLKD モチーフをリン酸化することを示した。過去の報告では、SRSF1 及び SRSF9 の SWQDLKD モチーフは 5'-GGA-3' 配列と相互作用することが示されている。さらに、SRSF1 については RRM2 と 5'-GGA-3' 配列との結合に関する立体構造解析の結果から、SWQDLKD モチーフの Ser133 については Gln135 と側鎖同士で形成する水素結合が 5'-GGA-3' 配列との結合に関与することが示さ

れている。本研究における RNA pull-down assay の結果から、AMPK による SRSF1 のリン酸化によって 5'-GGA-3'配列との結合が低下した。これは、Ser133 の側鎖におけるヒドロキシ基がリン酸基に置き換わることで Ser133 と Gln135 によって形成される水素結合が消失したことが原因と考えられた。実際に、SRSF1 の S133D のみならず、S133A 変異体においても WT と比較して 5'-GGA-3'配列との結合が顕著に減少した。以上の結果から、本研究においても Ser133 のヒドロキシ基が SWQDLKD モチーフと 5'-GGA-3'配列との結合に重要であり、この Ser 残基へのリン酸基の付加によって 5'-GGA-3'との分子間距離が離れることで RNA との結合が阻害されることも考えられる。そのため、AMPK はリン酸化修飾による Ser133 のヒドロキシ基の欠失と併せて、Ser133 残基へのリン酸基付加による立体障害によっても RNA との結合を阻害するものと考えられる。一方で、RNA pull-down assay から、SRSF9 も AMPK によるリン酸化修飾によって 5'-GGA-3'配列との結合が阻害された。これは SRSF1 と SRSF9 の RRM2 配列内における相同性が高いことから、SRSF1 と同様の分子メカニズムと同様に、SRSF9 のリン酸化修飾による RNA との結合が阻害されると考えられる。しかし、SRSF9 と RNA との結合の立体構造はこれまで示されていないため、今後解析が必要である。

AMPK 活性化剤はこれまでに血糖値の低下などによる糖尿病の改善作用のみならず、腫瘍抑制効果も示すことが報告されている。実際に、AMPK は mTORC1 をリン酸化することでタンパク質合成を抑制し、腫瘍細胞の増加を抑制することが報告されているものの、その他の詳細なメカニズムについての解析は未だ不十分である。一方で、これまでに様々な腫瘍細胞において SRSF1 や SRSF9 の発現量の増加が認められていることから、これらはがん原遺伝子であると考えられている。SRSF1 に関しては複数の遺伝子の選択的スプライシングに関与することで抗アポトーシス作用や細胞増殖を促進させ、腫瘍の悪性化を引き起こすことが報告されている。実験 2 において、その標的遺伝子の一つである Ron mRNA のスプライシングについて解析した結果、AMPK は SRSF1 をリン酸化することによって SRSF1 依存的な Ron のエクソンスキッピングを抑制することで、常時活性型となる Δ Ron のスプライシングバリエーション量を低下させた。一方、SRSF9 に関してはこれまでに SRSF9 依存的な β -catenin タンパク質合成の促進によって β -catenin が異常に蓄積し、腫瘍化が引き起こされることが報告されている。本研究によって AMPK は SRSF9 を介した β -catenin タンパク質合成を特異的に阻害することを示した。しかし、AMPK 活性化による腫瘍抑制効果について詳細に明らかにするために、AMPK 活性化によって Δ Ron のタンパク質量が低下するか、また、AMPK による SRSF9 を介した β -catenin タンパク質量の低下に伴う細胞増殖の抑制について解析することが必要である。本研究によって AMPK が SRSF1 及び SRSF9 をリン酸化することで腫瘍の悪性化に関与するスプライシング産物の生成や β -catenin の異常蓄積を抑制する新たな制御経路が示唆された。

本研究によって、AMPKはエネルギー恒常性の調節のみならず、SRSF1をリン酸化することでスプライシングをも制御することが明らかとなった。一方で、AMPKはこれまで知られている非特異的な翻訳抑制に加えて、SRSF9を介して特異的な翻訳制御を行う可能性が示された。今後は今回着目したSRSF1やSRSF9の標的因子以外のスプライシングや翻訳制御について調べることでAMPKのさらなる機能が明らかとなることに期待する。

審査報告概要

本研究は、細胞内のエネルギー恒常性に関与するセリン・スレオニンキナーゼであるAMPKの新規基の探索及びその機能解析を試みた。その結果、RNA結合タンパク質であるSRSF1およびSRSF9をAMPKの新規基質として同定した。さらに、AMPKがSRSF1及びSRSF9をリン酸化することでそれぞれの標的mRNAとの結合が抑制されることを示し、それによりSRSF1依存的な選択的スプライシング及びSRSF9依存的な翻訳の促進が抑制されることを示した。以上の結果から、AMPKはSRSF1及びSRSF9をリン酸化することによってmRNAとの結合能を低下させ、その機能を抑制することが明らかとなった。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士(農芸化学)の学位を授与する価値があると判断した。