

博士論文

**AMPK の新規基質 SR タンパク質の同定と**

**その機能解析**

**—AMPK-dependent phosphorylation**

**of SR proteins and analysis of their functions**

2021 年

東京農業大学大学院  
農学研究科 農芸化学専攻 栄養生化学研究室

松本 英里

## 目次

第一章 序論.....	4
第二章 実験方法.....	12
第三章 AMPK による SRSF1 のリン酸化と機能制御.....	22
第一節 SRSF1 のリン酸化	
・ 緒言.....	23
・ 結果.....	24
第二節 SRSF1 の細胞内局在	
・ 緒言.....	32
・ 結果.....	33
第三節 AMPK による SRSF1-RNA 結合変化	
・ 緒言.....	36
・ 結果.....	37
第四節 AMPK による RNA スプライシング制御機構	
・ 緒言.....	40
・ 結果.....	41
第五節 考察.....	50

第四章	AMPK による SRSF9 のリン酸化と機能制御.....	54
第一節	SRSF9 のリン酸化	
・緒言.....		55
・結果.....		56
第二節	AMPK による SRSF9-RNA 結合変化	
・緒言.....		60
・結果.....		61
第三節	AMPK による SRSF9-mTORC1 結合変化	
・緒言.....		65
・結果.....		66
第四節	SRSF9 を介した AMPK による翻訳制御機構	
・緒言.....		68
・結果.....		69
第五節	考察.....	73
第五章	総括.....	77
英文要旨.....		80

引用文献.....	87
原著論文.....	96
謝辞.....	97

# 第一章 序論

## 【はじめに】

AMP-activated protein kinase (AMPK) は、酵母からヒトまで真核生物において高度に保存されているセリン・スレオニンリン酸化酵素であり、細胞内のエネルギー代謝の調節に重要な役割を担っている [1]。AMPK はエネルギー代謝制御だけでなく、細胞極性、細胞増殖、アポトーシスなどの多彩な細胞機能調節に関与することが明らかとなってきた [2-4]。さらに AMPK は糖尿病の代謝疾患、癌などの疾患への関与も指摘されており、創薬の標的分子としても注目されている [4]。本研究では AMPK による新たな制御経路を見出し、その意義を明らかにすることを目的とした。

## 【AMPK の構造と活性制御機構】

AMPK は 3 つの異なるサブユニットから構成されるヘテロ三量体として機能する [5]。キナーゼ活性を有する触媒サブユニットである  $\alpha$  サブユニット、細胞内 ATP、ADP、AMP と結合する  $\gamma$  サブユニットと、グリコーゲン結合ドメインを持つ  $\beta$  サブユニットの 2 種類の調節サブユニットから構成されている [6]。 $\alpha$  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 liver kinase B1 (LKB1) [7-9] や calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK $\beta$ ) [10-12] によってリン酸化される。また、AMP/ADP が  $\gamma$  サブユニットに結合することによって AMPK がアロステリックに活性化される [13]。

AMPK 活性化剤として使用されている 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) は細胞内で adenosine kinase によるリン酸化を受け、monophosphate 体 (ZMP) として AMP とほぼ同様に作用することにより AMPK を活性化する [14]。AICAR に代わる活性化剤として報告された thienopyridone 誘導体、A769662 は AMP と同様にアロステリック効果と Thr172 のリン酸化状態の安定化を介して AMPK 活性化作用を示す [15]。一方、経口血糖降下薬であるメトホルミンはミトコンドリアの呼吸鎖を阻害し、AMP/ATP バランスを増大させることで間接的に AMPK を活性化する [16]。

## 【AMPK 活性化による代謝変動】

AMPK はエネルギー欠乏ストレスなどによって活性化され、エネルギー産生を伴う異化作用を促進し、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を維持している (Figure 1-1) [1]。以下では AMPK による糖・脂質代謝および mRNA の翻訳制御について言及する。

### ・ AMPK による糖・脂質代謝制御

糖代謝において AMPK はグルコースの取り込みを促進する。細胞外のグルコースは glucose transporter 4 (GLUT4) が細胞膜上へ移行することで細胞内に取り込まれる [17]。AMPK の活性化によって TBC1 domain family, member 1 (TBC1D1) がリン酸化されると GLUT4 が細胞膜上へ移行し、糖の取り込みが促進される [18]。脂肪酸合成に関与する酵素である acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) はアセチル CoA からマロニル CoA への炭酸化反応を触媒する。AMPK が ACC1 をリン酸化することで ACC1 の活性が低下し、脂肪酸合成酵素の基質であるマロニル CoA の産生量が低下することによって脂肪酸合成が抑制される。さらに、AMPK は histone deacetylases (HDACs) や sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) など、糖・脂質代謝に関わる転写因子をリン酸化することによっても転写を調節し代謝状態を制御している [19]。

### ・ AMPK による mRNA の翻訳制御

mRNA の翻訳を制御している mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は AMPK の基質であり、mTORC1 の構成因子である Raptor がリン酸化を受けると mTORC1 のキナーゼ活性が低下し、mRNA の翻訳が抑制される [20]。

## 【AMPK 新規基質のスクリーニング】

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や癌に関わるタンパク質が基質として同定され、AMPK は多彩な機能を持つことが明らかとなった [21]。そこで、機能が多岐にわたっている AMPK シグナル経路のより詳細な機能を明らかにするため、AMPK の新規基質の探索、およびその基質の機能解析を目的とし、当研究室において研究が行われてきた。

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。その結果、非特異的な結合因子も含め、530 因子が検出された。検出された結合因子について、AMPK のリン酸化モチーフと phosphoproteomics データベース (<https://www.phosphosite.org>) を用いてそれら因子の配列を解析した結果、基質となりうるタンパク質が複数挙げられた。基質候補として、微小管関連タンパク質、DNA 修復タンパク質、スプライシング関連タンパク質などが見出された。本研究では、これまでに AMPK によるリン酸化の解析がなされていないスプライシング関連タンパク質 serine-arginine (SR) タンパク質である SRSF1 及び SRSF9 に着目した (Figure 1-2)。

## 【SR タンパク質の構造】

SR タンパク質はアルギニン・セリンの繰り返し配列を有し、主に mRNA 前駆体のスプライシングを制御する RNA 結合タンパク質であり、これまでにヒトでは 12 種類が報告されている (Figure1-3)。SR タンパク質は 1 つまたは 2 つの RNA 結合ドメイン (RNA recognition motif: RRM) とアルギニン・セリンに富んだ RS ドメインをもつ [22]。RRM は RNA への結合に関与し、RS ドメインはタンパク質との結合に関与している [23]。SR タンパク質の中で、SRSF1、SRSF4、SRSF5、SRSF6、SRSF9 は RRM を 2 つ有しており、RRM2 は RNA 結合に関して配列特異性が高いことが報告されており [24, 25]、特定の mRNA との結合に重要な役割を担っている。

## 【SR タンパク質の機能】

### ・ SR タンパク質によるスプライシング制御

mRNA 前駆体のスプライシングは真核生物の遺伝子発現に必須な過程である。選択的スプライシングとは転写後制御の一つである。選択的スプライシングでは、複数のイントロンを持つ 1 種類の mRNA 前駆体から、異なるパターンでのスプライシングにより複数種類の成熟 mRNA が生成される [23]。少なくとも 74% のヒト遺伝子が選択的スプライシングを受けると報告されている [26]。選択的スプライシングの多くは組織・細胞特異的、または発生段階依存的に制御されている [27]。

SR タンパク質は恒常的なスプライシングに重要であるが、選択的スプライシングにおいては特異的な配列への結合によってスプライシング部位の選択を調節していることが考えられる。エクソン内に存在し、プリン残基に富んだ配列を持ち、スプライシングを促進する exonic splicing enhancer (ESE) 配列に SR タンパク質が結合することでスプライシングが促進される [22]。ESE 配列や SR タンパク質の突然変異によるスプライシング異常やスプライシング不全が生じると本来発現するはずのタンパク質が発現しなくなり、疾患が発症する [27]。ヒトにおける疾患の約 15%がスプライシング異常によるものであると考えられている [28]。

### ・ **AMPK 活性化による選択的スプライシング変化**

筋強直性ジストロフィー-type 1 (DM1)は成人で最も頻度の高い筋ジストロフィー症であり、骨格筋・平滑筋のみならず、心臓、内分泌系や中枢神経などをも侵す多臓器疾患である [29]。

DM1 は第 19 番染色体に存在するミオトニプロトニンキナーゼ (DMPK) 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する CTG/CCTG 反復配列の異常な伸長が原因である [30]。DM1 患者の細胞の核内において伸長した CUG/CCUG 反復配列とスプライシング制御因子である muscleblind like splicing regulator 1(MBNL1)が共局在することが明らかとなっている [31]。したがって、MBNL1 がこの伸長した反復配列に捕捉されることで MBNL1 の活性が低下することでスプライシング障害が引き起こされると考えられている。

DM1 患者のインスリン抵抗性の治療法として AMPK 活性化剤であるメトホルミンが有効であることが報告されている [32]。さらに、近年の研究により DM1 原因遺伝子のスプライシング異常がメトホルミンによって改善されることが明らかとなった [33]。しかし、AMPK がどのような基質を介してスプライシングに影響を及ぼすかについては明らかとなっていない。

### 【**AMPK による $\beta$ -catenin 発現制御**】

$\beta$ -catenin はカドヘリン結合タンパク質として同定され、細胞接着に重要な役割を担うと同時に、胚発生や臓器の恒常性に維持に関与する Wnt シグナル経路内で遺伝子の発現を制御している [34]。多くのがんにおいて、 $\beta$ -catenin が細胞質や核に異常に蓄積しており、これが原因となって腫瘍細胞の増殖や浸潤能に関わっている [35]。

Wnt による刺激のない状態においては細胞質の  $\beta$ -catenin が Axis inhibition protein (AXIN), Adenomatous polyposis coli (APC), Glycogen synthase kinase 3 $\beta$



(GSK3 $\beta$ )からなる Axin 複合体によるリン酸化を受ける [36]。リン酸化された  $\beta$ -catenin は E-3 ユビキチン化酵素である  $\beta$ -Transducin repeat Containing Protein ( $\beta$ -TrCP)によってユビキチン化されてプロテアソームによって分解されることで発現が低く保たれている [37, 38]。Wnt が受容体である Frizzled または共役受容体である Low-density lipoprotein-related receptors 5/6 (LRP5/6) と結合すると dishevelled (Dvl)が細胞膜へとリクルートされる結果、Axin 複合体の機能が抑制され、 $\beta$ -catenin は安定化して核へ移行する [39]。核に移行した  $\beta$ -catenin は Tcf/Lef と結合し、Cyclin D1 や c-Myc 遺伝子などの発現を促進することによって細胞の増殖や分化を制御している [40]。

AMPK が活性化することで Dvl3 の発現量が減少し、 $\beta$ -catenin 発現量が減少することが報告されている [41]。しかしながら、AMPK が基質を介してどのようにこれを制御しているかについてはその分子機構を含め未だ明らかとなっていない。

### 【SR タンパク質による $\beta$ -catenin 発現制御機構】

SR タンパク質は多くが核に存在しているが、一部は mRNA と結合したまま細胞質にも存在しているため [42, 43]、SR タンパク質は翻訳にも関与する可能性が考えられる。このような考え方と一致して、SRSF1 はポリリボソームと結合し、ESE 配列を含んだ mRNA の翻訳を促進することが報告されている [44]。

このような SRSF1 による翻訳の促進にはスプライシング依存的あるいは非依存的な制御による mTORC1 シグナル経路の活性化が関与している [45, 46]。SRSF1 によるスプライシングによって ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)の short isoform が生成されることが報告されている [47]。これが mTORC1 と結合することで mTORC1 が活性化され、Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1)のリン酸化が上昇し、翻訳が活性化する [45]。また、スプライシング非依存的な制御として、SRSF1 は mTORC1 の構成因子である mTOR と直接結合することでその基質である ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1) や Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) のリン酸化が上昇し、翻訳が活性化されることが報告されている [46]。

Wnt シグナル経路において重要な役割をもつ  $\beta$ -catenin は SR タンパク質によってその翻訳が活性化されることが報告されている [48]。SRSF1 と SRSF9 は  $\beta$ -catenin mRNA と結合することで mTORC1 による  $\beta$ -catenin の翻訳を促進させる [48]。しかし、SR タンパク質と  $\beta$ -catenin mRNA の結合が制御されるメカニズムについては未だ不明な点が多い。

## 【研究目的】

本研究では AMPK による SRSF1 及び SRSF9 の新規リン酸化修飾を介したこれらのタンパク質の機能制御機構の解明を目的とした。

第三章では、AMPK が SRSF1 のリン酸化を介して選択的スプライシングを制御するのではないかと考えた。そのため、SRSF1 の RRM 配列中にある Ser133 が AMPK によってリン酸化修飾を受けることによる SRSF1 と mRNA の結合変化と、このリン酸化を介した SRSF1 依存的なスプライシング制御について解析を行った。

第四章では、 $\beta$ -catenin の AMPK による発現制御機構をより詳細に明らかにするために、SRSF9 の RRM 配列中にある Ser123 が AMPK によってリン酸化されることによる mRNA との結合変化と、SRSF9 のリン酸化を介した  $\beta$ -catenin mRNA の翻訳制御について解析を行った。

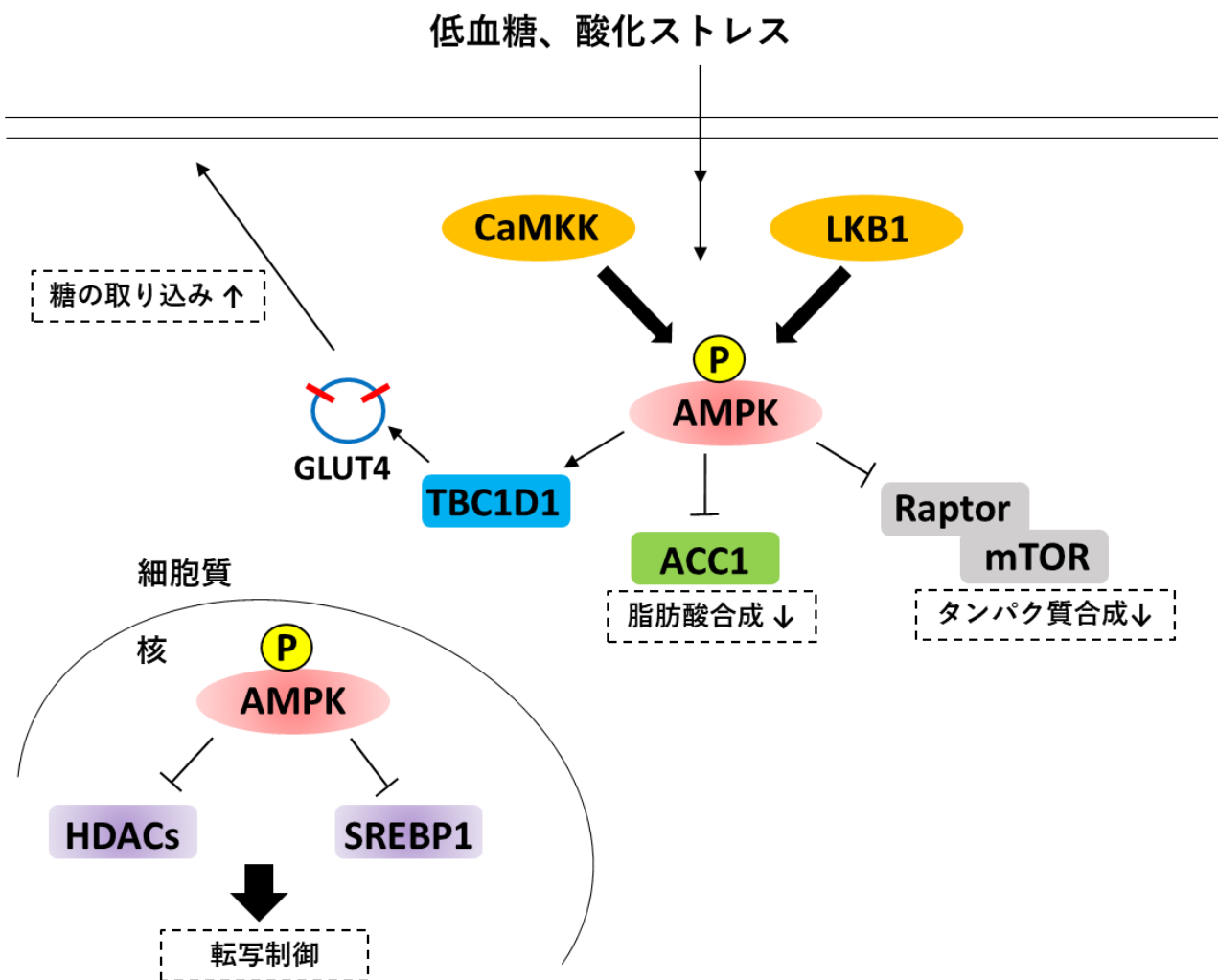


Figure 1-1 AMPK による基質のリン酸化

AMPK はエネルギーストレスに応答して LKB1 や CaMKK によってリン酸化され、活性化する。AMPK は基質のリン酸化を介して様々な代謝を制御している。

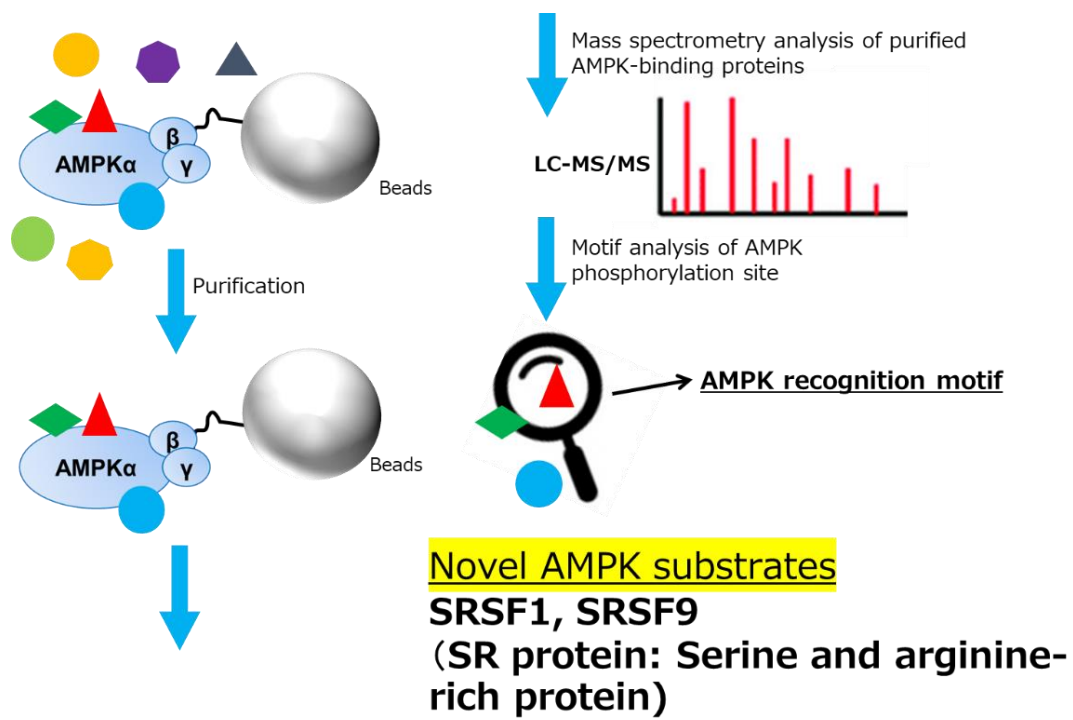


Figure 1-2 新規 AMPK 基質の探索の概略図

## 第二章 実験方法

### 【クローニング】

#### ・ タンパク質発現プラスミド

ヒト細胞由来の cDNA を鋳型として Table 1 にあるプライマーを用いて PCR を行った。これをそれぞれ線状化させたベクターに組み込んだ。

#### ・ ミニ遺伝子発現プラスミド

Human genomic DNA (プロメガ) を鋳型として Ron のエクソン 10 からエクソン 12 までのイントロンを含む配列を以下のプライマーを用いて PCR によって増幅し、pcDNA3.1+ベクター内にある HindIII、BamHI サイトに組み込んだ。

##### Ron nt.2507-2990 primers

Forward, 5'-ATAAGCTTTTCCTGAATATGTGGTCCGAG-3';

Reverse, 5'-ATGAATTCCTAGCTGCTTCCTCCGCC-3'

### 【発現プラスミドへの変異導入】

発現プラスミドに部位特異的な導入をするために PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) のプロトコルに従い変異導入用プライマーを設計した。Table 2 にあるプライマーとターゲット領域を含むプラスミド DNA を用いて PCR を行った。PCR 産物 50 $\mu$ l に DpnI 1  $\mu$ l 加え、37°C、1 時間インキュベートした後、大腸菌に形質して変異導入体を得た。

### 【細胞培養】

HEK293T 細胞はヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に SV40 ウイルス由来 T-large 抗原遺伝子を組み込んだ細胞株である。10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Wako) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM; Wako) を基本培地として、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。MCF7 細胞はヒト乳癌由来細胞株である。10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液 (Wako) を含む DMEM-high glucose をを基本培地として、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

## 【Western Blotting (WB)】

### ・ 細胞からのタンパク質抽出

6-well plate で培養した細胞に Triton X-100 buffer r (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 1% Triton-X100, 2 mM EDTA, 10 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Set III DMSO Solution; Wako)を 1 ウェルあたり 300  $\mu$ l ずつ加えた。細胞を回収し、4°C、15000 rpm で 5 分間の遠心後、上清を適量 1.5 ml チューブに移し、SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl バッファー (pH6.8), 2% SDS, 5% スクロース、0.005% Bromo phenol blue, 50 mM DTT)を加え、65°Cで 10 分間加熱処理した。

### ・ SDS-PAGE

ミニスラブ泳動槽にゲルをセットし、ゲル板の外側と内側を泳動バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS)で満たした。サンプルを 5  $\mu$ l アプライして定電流で濃縮ゲルまではゲル 1 枚につき 20 mA で泳動し、分離ゲルにサンプルが到達してからはゲル 1 枚につき 40 mA で泳動した。

### ・ ブロットニング

タンク式ブロットニング装置でブロットニングを行った。PVDF メンブレンをメタノールに 1 分間浸し、トランスファーバッファー (100 mM Tris, 192 mM Glycine, 5%メタノール)に 2 分程度浸した。ゲルホルダーカセットの透明な面上にファイバーパッド、濾紙、PVDF メンブレン、ゲルの順にセットした後、100V の定電圧で 1 時間 30 分ブロットニングした。

### ・ 抗体反応、検出

ブロットニングしたメンブレンを 5%スキムミルク/TBS-T バッファーに 1 時間振盪してブロッキングした。TBS-T で数回洗浄した後、Table 3 にある一次抗体を 5%スキムミルク/TBS-T バッファーで希釈し、これにメンブレンを浸して抗原抗体反応を室温で 1 時間、または 4°Cで 12 時間以上行った。メンブレンを取り出して TBS-T バッファーで数回洗浄した後、HRP 標識二次抗体を 5%スキムミルク/TBS-T バッファーで希釈し、室温で 30 分間振盪させた後、TBS-T バッファーで数回洗浄した。洗浄後、メンブレンを発色試薬に浸し、発光検出装置でシグナルを検出した。

## 【トランスフェクション (PEI MAX)】

トリプシン処理によってディッシュから剥がした細胞を 6-well プレートに撒いた。その 24 時間後に PEI MAX - Transfection Grade Linear Polyethylenimine Hydrochloride (Polyscience, Inc)を用いて遺伝子導入を行った。PEI MAX mix 250  $\mu$ l (5  $\mu$ l、Opti-MEM 245  $\mu$ l)と DNA mix 250  $\mu$ l を等量ずつ混合し、20 分間室温で静置した後、FBS 入り培地を加えて細胞に滴下した。18~24 時間後に培地交換、27~36 時間後に細胞を回収した。

## 【ウイルス導入 (shRNA レンチウイルス)】

### ・ shRNA 発現プラスミドの作製

以下にあるオリゴヌクレオチドをアニーリングした後、pLKO.1 ベクター内にある EcoRI、AgeI サイトに組み込んだ。

SRSF1 sense,

5'-CCGGGCACCACGAAACCTGTAATACTCGAGTATTACAGGTTTCGTGGTTGCTTTTTTC-3'

SRSF1 antisense:

5'-ATTGAAAAAGCAACCACGAAACCTGTAATACTCGAGTATTACAGGTTTCGTGGTTGC-3'

### ・ ウイルス作製

pLKO.1 shRNA ベクターとレンチウイルスパッケージングプラスミド (psPAX2, pMD2) をリン酸カルシウム法でトランスフェクションし、48 時間後にウイルスを回収した後、超遠心法で濃縮した。

### ・ 細胞へのウイルス感染

MCF7 細胞に shRNA レンチウイルスを感染させ、24 時間後に終濃度が 2  $\mu$ g/ml になるようにピューロマイシンを滴下し、7 日間セレクションを行った。

## 【*In vitro* GST pulldown assay】

GST 融合タンパク質発現プラスミド (pGEX-KG)を導入して大腸菌を形質転換し、カルチャー後、1 mM IPTG を加えて 30°C で 4 時間培養した。4°C、15000 rpm で 1 分間遠心して集菌後、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM EDTA, Glycerol 10%, IGEPAL 0.5 ml, 50 mM NaCl) 1 ml を加えて再懸濁した。氷上で Lysis buffer に懸濁された菌体が半透明になるまでソニケーターによって破碎した。13000 rpm、15 分間遠心後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、Glutathion Sepharose beads (GE Healthcare) を 20  $\mu$ l 加えて 4°C で 1 時間回転混和した。13000 rpm で 1 分間遠心した後、上清を除去し、PBS 1 ml で 3 回洗浄した。

HEK293T 細胞に AMPK サブユニットをそれぞれ過剰発現させ、TritonX-100 buffer 800  $\mu$ l で回収した。そのうちの 10  $\mu$ l を分注し、Input のサンプルとした。残りを GST、GST-SRSF1 pulldown 用に半量ずつ分けた後、4°C で 18 時間以上回転混和した。PBS 1 ml で 5 回洗浄し、SDS サンプルバッファーを加え、98°C で 5 分間加熱処理した。

### 【*In vitro* kinase assay and kinetic analysis】

GST 融合ペプチドを大腸菌から精製し、これを基質として用いた。GST-SRSF1 と AMPK  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1/ $\gamma$ 1 リコンビナントタンパク質 (Carna Biosciences) をキナーゼ反応用 mix (18 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M cold ATP, 1 mM DTT, 1 mCi [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP) 内で反応させた。これを SDS-PAGE に供し、オートラジオグラフィーで検出した。カイネティクス測定では、反応液を Whatman Regenerated Cellulose Membrane (GE Healthcare) に滴下して 100 mM のリン酸バッファー (pH 7.0) で 6 回洗浄し、液体シンチレーション装置で測定した。

### 【Immunoprecipitation (免疫沈降法)】

Triton-X100 buffer で細胞を回収し、抗体と Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) または anti-FLAG Affinity Gel (Sigma Aldrich) で免疫沈降を行った。

mTORC1 と SRSF9 との結合を解析する場合には、CHAPS buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 60 mM NaCl, 0.15% CHAPS, 0.5 mM EDTA, 10 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, and EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Set III DMSO Solution) で細胞を回収し、anti-FLAG Affinity Gel (Sigma Aldrich) で免疫沈降を行った。免疫沈降は以下の通りに行った。

6-well plate に培養した細胞を溶出バッファー 800  $\mu$ l で細胞を回収した。4°C、15000 rpm で 20 分間遠心し、上清を回収した。そのうちの 20  $\mu$ l を分注し、input のサンプルとした。700  $\mu$ l 分注したものに抗体 5  $\mu$ g または anti-FLAG Affinity Gel を 20  $\mu$ l 加え、4°C で 18 時間以上回転混合した後、抗体を加えた方には Protein G Sepharose 4 Fast Flow 20  $\mu$ l 加え、さらに 2 時間回転混合した。4°C、8000  $\times$  g で 1 分間遠心し、上清を除去した。ビーズに溶出バッファー 1ml を加え、4°C、8000  $\times$  g で 1 分間遠心し、上清を除去した。これを 5 回繰り返した。1  $\times$  サンプルバッファーを 40  $\mu$ l 加えて 65°C、10 分間加熱処理し、これを IP のサンプルとした。

### 【Immunofluorescence (免疫蛍光染色法)】

4-well plate に撒いた細胞を PBS で洗い、4% paraformaldehyde で固定、0.1% Triton X-100 in PBS で透過処理した。PBS で洗った後、2% BSA in PBS で 30 分間



ブロッキングし、PBS 洗浄後、一次抗体と二次抗体でそれぞれ 90 分間室温インキュベートした。その後 PBS で洗浄し、DAPI 入り封入剤で封入し、共焦点顕微鏡で検出した。

### **【In vitro RNA-protein pull-down assay】**

Table 4 にあるビオチン化 RNA オリゴヌクレオチドを FASMAC に依頼して合成し、これを用いた。ストレプトアビジンビーズ(Agilent Technologies)、ビオチン化 RNA プローブ、RNA capture buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 M NaCl, 1 mM EDTA) を混合し、室温で 15 分間静置した。HEK293T 細胞を Triton X100 buffer で回収し、15%グリセロール、protein-RNA-binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.1% Igepal)と混合し、これに RNA 結合ビーズを加えて 4°Cで 30 分間回転混和した。RNA-タンパク質複合体を Wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM NaCl, and 0.1% Igepal) で洗い、WB にて RNA プローブと結合した SRSF タンパク質量を解析した。

### **【Reverse transcription PCR (RT-PCR)】**

MCF7 細胞の Total RNA を RNA isoPlus (Takara Bio) で回収し、qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を用いて cDNA 合成した。合成した cDNA 、 プ ラ イ マ ー (forward, 5'-acctagtccaactgaagcct-3'; reverse, 5'-accagttagctgaagaccagt-3')、EmeraldAmp PCR Master Mix を用いて PCR を行い、3% アガロースゲルに泳動し、エチジウムブロドマイド溶液で DNA を染色し、紫外線を照射して検出した。

### **【RNA-crosslinking immunoprecipitation (RNA クロスリンク免疫沈降法)】**

トランスフェクションした後 36 時間後、PBS で 1 回洗って UV (480 mJ/cm<sup>2</sup>) を当ててクロスリンクした。RIP buffer (150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% Igepal, 10 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Set III DMSO Solution, and 100 U/ml recombinant RNase inhibitor; Takara Bio)で細胞を回収し、ソニケーターで細胞を破碎した後、15000 rpm で 20 分間遠心して上清を回収し、anti-FLAG Affinity Gel で免疫沈降した。免疫沈降サンプルに 0.2 mg/ml の Proteinase K (New England Biolabs)を加えて 37°Cで 30 分間反応させた。NucleoSpin RNA (Takara Bio)で Total RNA を抽出し、PrimeScript RT-PCR Kit (Takara Bio)で cDNA を合成した。リアルタイム PCR

は FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche) と Table 3 にあるプライマーを用いて解析した。

### **【リアルタイム PCR】**

FastStart Universal SYBR Green Master Mix と Table 5 にあるプライマーを用いて解析した。

### **【統計解析】**

解析結果のグラフは 3~4 回の独立した実験の平均値、エラーバーは SD で示している。t 検定または Tukey-Kramer 検定を用いて群間の有意差検定を行った。

**Table 1** クローニングに使用したプライマー一覧

発現プラスミド名*すべてHuman由来	Forward_Primer, F: Reverse_Primer, R:
p RK7-AMPK $\gamma$	F: ATGAATTCGGATGGAGTCGGTTGCTGCA R: ATCTCGAGTCAGGGCTTCTTCTCTCCAC
p RK7-Myc-SRSF1	F: ATAAGCTTTCGGGAGGTGGTGTGAT R: ATGGATCCTTAAGACCACTGTATCCAATTCTGG
pRK7-Flag-SRSF1	F: ATAAGCTTTCGGGAGGTGGTGTGAT R: ATGGATCCTTAAGACCACTGTATCCAATTCTGG
pRK7-Flag-SRSF9	F: CGATGACAAGAAGCTTATGTCTGGGCTGGGCGGAC R: CGACCTGCAGAAGCTTTCAGTAGGGCCTGAAAGGAGA
pGEX-KG-SRSF1 109-158	F: ATGAATTCTATCAGCATCTCCTCGACGA R: ATAAGCTTCAACCAGTGCCATCTCGGTAAA
pGEX-KG-SRSF9 98-148	F: ATGAATTCTAGGTGGGAGGAATGG R: ATAAGCTTCACCCCACTCCATCCTTCTG
pGEX-KG-SRSF1_Full-length	F: ATGAATTCTCGGGAGGTGGTGTGATT R: ATAAGCTTTCATTATGTACGAGAGCGAGATCTGC
pRK7-Myc- $\beta$ -catenin	F: GGAAGATCTGAAGCTTATGGCTACTCAAGCTGATTTGA R: CGACCTGCAGAAGCTTTTACAGGTCAGTATCAAACCAGGC

**Table 2** プラスミドDNAへの変異導入に使用したプライマー一覧

因子名	Forward_Primer, F: Reverse_Primer, R:
SRSF1 109-158 (S133A)	F: AGTGGAGCTTGGCAGGATTTAAAGGAT R: CTGCCAAGCTCCACTTGGAGGCAGTCC
SRSF9 98-148 (S123A)	F: TCAGGCGCCTGGCAGGACCTGAAGGAT R: CTGCCAGGCGCCTGACGGAGGAAGTCC
SRSF1 (S133A)	F: AGTGGAGCTTGGCAGGATTTAAAGGAT R: CTGCCAAGCTCCACTTGGAGGCAGTCC
SRSF1 (S133D)	F: AGTGGAGATTGGCAGGATTTAAAGGAT R: CTGCCAATCTCCACTTGGAGGCAGTCC
SRSF9 (S123A)	F: ATGAATTCGGATGGAGTCGGTTGCTGCA R: ATCTCGAGTCAGGGCTTCTTCTCTCCAC
SRSF9 (S123D)	F: ATGAATTCGGATGGAGTCGGTTGCTGCA R: ATCTCGAGTCAGGGCTTCTTCTCTCCAC
$\beta$ -catenin (c. 1187–1206; 5'-aagggauggaaggucuccuu-3' to 5'-aagguuauugaggucuccuu-3')	F: GGAAGTTATTGAAGGTCTCCTTGGGACTCT R: CCTTCAATAACTTCTGTTTAGTTGCAGC

**Table 3** 一次抗体

抗体名	会社
HA-antibody	MBL
Flag-antibody	MBL
Myc-antibody	MBL
SRSF1 Monoclonal Antibody (96)	Thermo Fisher SCIENTIFIC
リン酸化SRSF1 {Cys+LPPSG(pS)WQDLK-NH <sub>2</sub> }	株式会社スクラムに合成を依頼
Anti-SRSF9 (SRp30c) pAb	MBL
Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Antibody	CST
Acetyl-CoA Carboxylase Antibody	CST
AMPK $\gamma$ 1 Antibody	CST

**Table 4** ビオチン化 RNA プローブ

因子名	配列
Ron	WT: CGGAGGAAG
	Mut: CGGTTGTTG
$\beta$ -catenin	WT: AAGGGAUGGAAGGUCUCCUU
	Mut: AAGUUAUUUAAGGUCUCCUU

**Table 5** リアルタイム PCR 用プライマー

因子名	Forward_Primer / Reverse_Primer (5'→3')
Ron (発現プラスミドの配列を含む)	F: CTACTGGTGGCGGAGGAAG R: GGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGC
$\beta$ -catenin	F: CTACTGGTGGCGGAGGAAG R: GGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGC
GFP	F: AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG R: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG

## 第三章 AMPK による SRSF1 のリン酸化と機能制御

### 緒言

近年、AMPK 活性化剤であるメトホルミンによって選択的スプライシングが変動することが報告されている。しかし、AMPK がどの基質を介して選択的スプライシングを制御するかは未だ明らかとなっていない。

そこで、本章では AMPK 新規基質候補の中から、スプライシング制御に関与する RNA 結合タンパク質である SRSF1 に着目し、AMPK が SRSF1 をリン酸化することでスプライシングを制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。第一節では SRSF1 の AMPK によるリン酸化について解析し、第二節では SRSF1 の局在変化について調べた。第三節では AMPK による SRSF1-RNA 結合変化を *in vitro* RNA pulldown assay によって調べた。第四節では、AMPK による SRSF1 のリン酸化を介してマクロファージ刺激タンパク質受容体型キナーゼである RON の選択的スプライシングが変化するか解析を行った。

## 第一節 SRSF1 のリン酸化

### 緒言

スプライシングに関与する AMPK の基質を同定するために、AMPK 結合タンパク質を精製した後、LC-MS/MS による質量解析を行い、AMPK と結合したタンパク質を検出した。AMPK 結合タンパク質として挙げられた候補リストの中から、AMPK によってリン酸化を受けるための AMPK 認識モチーフを持っているタンパク質を抽出した。その結果、スプライシングに関与する RNA 結合タンパク質である SRSF1 を AMPK の新規基質候補として見出した。

本節では、まず AMPK と SRSF1 の結合について解析し、次に AMPK による SRSF1 のリン酸化部位の特定を行った。



## 結果

### ・ SRSF1 は AMPK と結合する。

先行研究において LC-MS/MS による解析から、SRSF1 と AMPK との結合が示唆されたことから、*in vitro* 及び細胞内での SRSF1 と AMPK 結合についてのさらなる解析を行った。SRSF1 と AMPK の結合を検出するために GST 融合型の SRSF1 (GST-SRSF1) を精製し、これと AMPK の各サブユニットを過剰発現させた HEK293T 細胞の破碎液を混合することで *in vitro* GST pulldown assay を行い、ウェスタンブロッティング法 (WB) にて検出した。その結果、GST-SRSF1 と AMPK の各サブユニットとの結合が確認された (Figure 3-1 A)。次に、細胞内における SRSF1 と AMPK との結合について免疫沈降法にて解析を行った結果、SRSF1 と AMPK の各サブユニットとの結合が見られた (Figure 3-1 B)。続いて、内在性の SRSF1 を免疫沈降した結果、AMPK  $\alpha$ 1 サブユニットと SRSF1 との結合が認められた (Figure 3-1 C)。したがって、AMPK は SRSF1 と結合することが明らかとなった。

### ・ AMPK は SRSF1 の Ser133 をリン酸化する。

SRSF1 の RRM2 配列内に AMPK 認識モチーフ配列と一致する配列が存在しており、AMPK は SRSF1 の Ser133 をリン酸化することが予想された。また、このモチーフ配列はヒトやゼブラフィッシュを含む脊椎動物の種間において高く保存されていた (Figure 3-2 A)。そこで SRSF1 の Ser133 が AMPK によってリン酸化されるか明らかにするために、Ser133 を含む SRSF1 ペプチド (a.a. 109-158) を AMPK の基質として用いて *in vitro* kinase assay にて解析を行った。その結果、SRSF1 ペプチドの野生型 (WT) では AMPK によるリン酸化が検出されたが、Ser133 を Ala に置換した S133A は AMPK によってリン酸化されなかった (Figure 3-2 B, C)。したがって、AMPK は *in vitro* において SRSF1 の Ser133 を直接リン酸化することが明らかとなった。

次に、培養細胞内においても AMPK が SRSF1 の Ser133 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 SRSF1 抗体を新たに作製した。まず、過剰発現系における AMPK のリン酸化を調べた。HEK293T 細胞に Myc-SRSF1 と AMPK の各サブユニットを過剰発現させ、WB にて解析を行った。その結果、Myc-SRSF1 の WT と AMPK を共発現させた細胞では作製した抗体によるバンドが検出され、この細胞に脱リン酸化酵素を処理することでこのバンドは消失した (Figure 3-2 D)。さらに、Myc-SRSF1 S133A は AMPK によってリン酸化されなかった (Figure 3-2E)。以上の結果から、今回新たに作製した Ser133 のリン酸化認識抗体は Ser133 のリン酸化修飾を特異的に検出できることが確認できた。続いて、内在性においても同様に AMPK による SRSF1 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 と AMPK 活性化剤である A769662 をそれぞれ HEK293T 細胞に添加し、WB にて解析を行った。AMPK 阻害剤である Compound C を添加することで SRSF1 のリン酸化は低下し (Figure 3-2 F)、活性化剤である A769662 を添加することでこれは上昇した (Figure 3-2 G)。したがって、細胞内においても AMPK は SRSF1 をリン酸化することが明らかとなり、さらに Compound C 添加によってこのリン酸化が顕著に低下したことから、AMPK は SRSF1 の Ser133 のリン酸化において主要なキナーゼであることが示唆された。

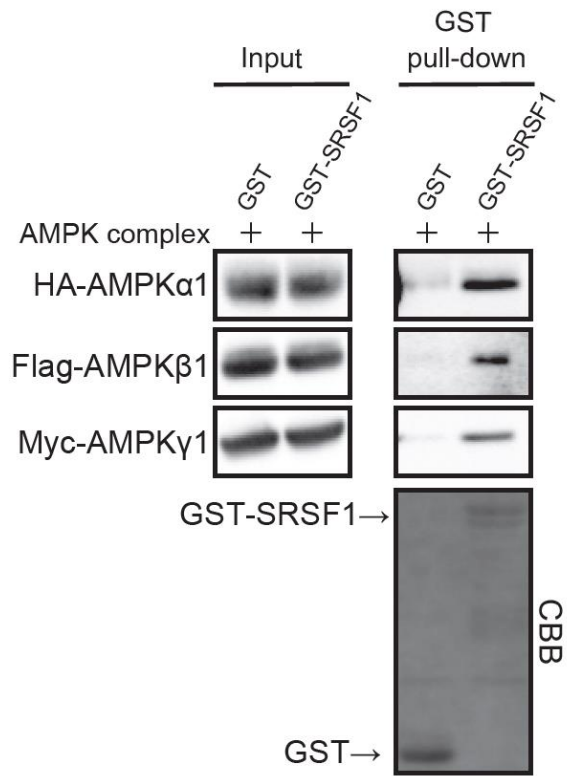
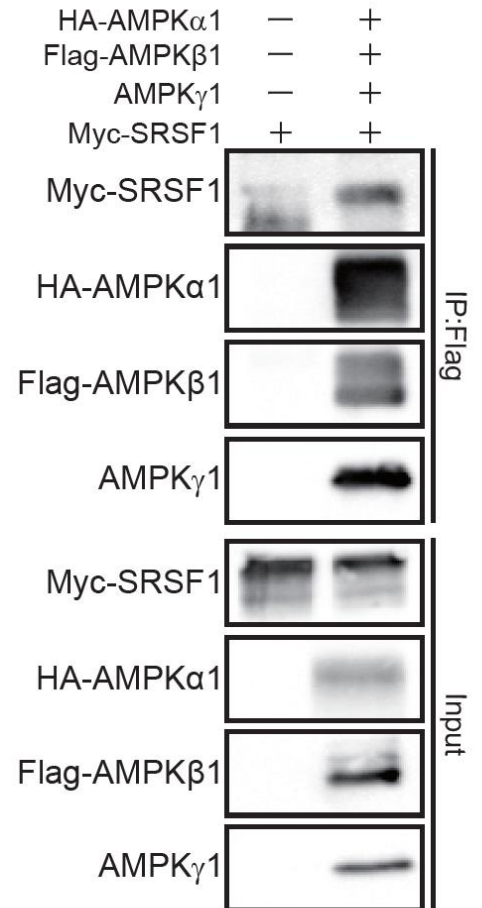
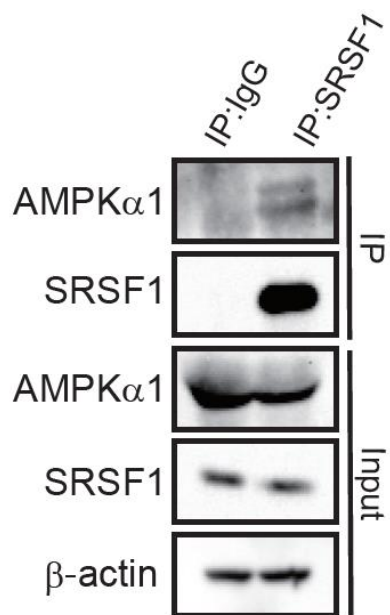
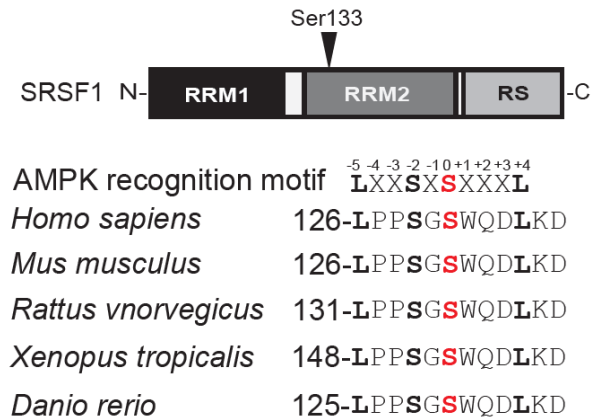
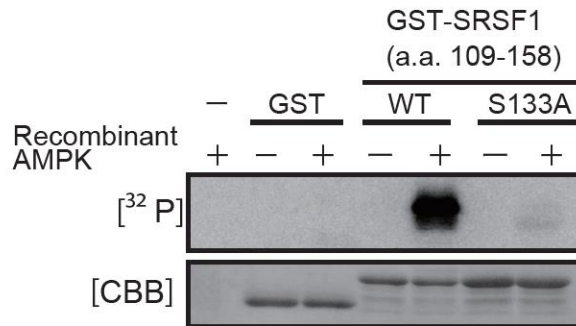
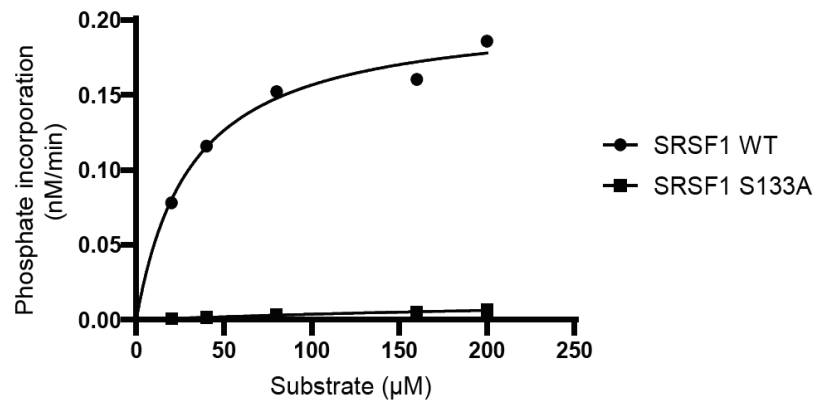
**A****B****C**

Figure 3-1. AMPK は SRSF1 と結合する。

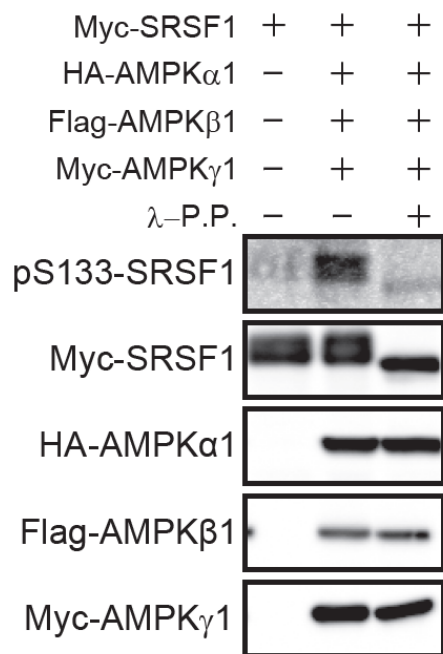
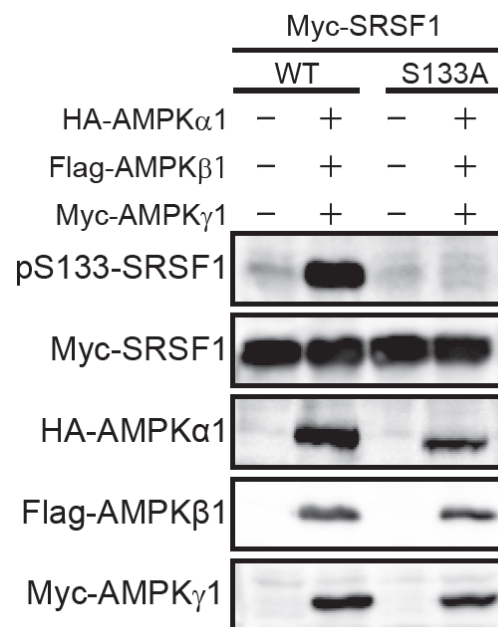
(A) GST および GST-SRSF1 をそれぞれリコンビナントタンパク質として合成した。これと AMPK 複合体を過剰発現させた HEK293T 細胞ライセート液を混合した後、グルタチオンセファロースビーズでプルダウンした。(B) Myc-SRSF1 と Flag-AMPK $\beta$ 1 を共発現あり、なしで HEK293T 細胞に強制発現し、抗 Flag 抗体で免疫沈降した。(C) 内在性の SRSF1-AMPK 結合について解析するために、抗 SRSF1 抗体で免疫沈降した。

**A****B****C**

	SRSF1 WT	SRSF1 S133A
Vmax (nM/min)	0.206	0.020
Km (µM)	31.54	422.0
mmol phosphate/mol peptide (30min)	0.117	0.001

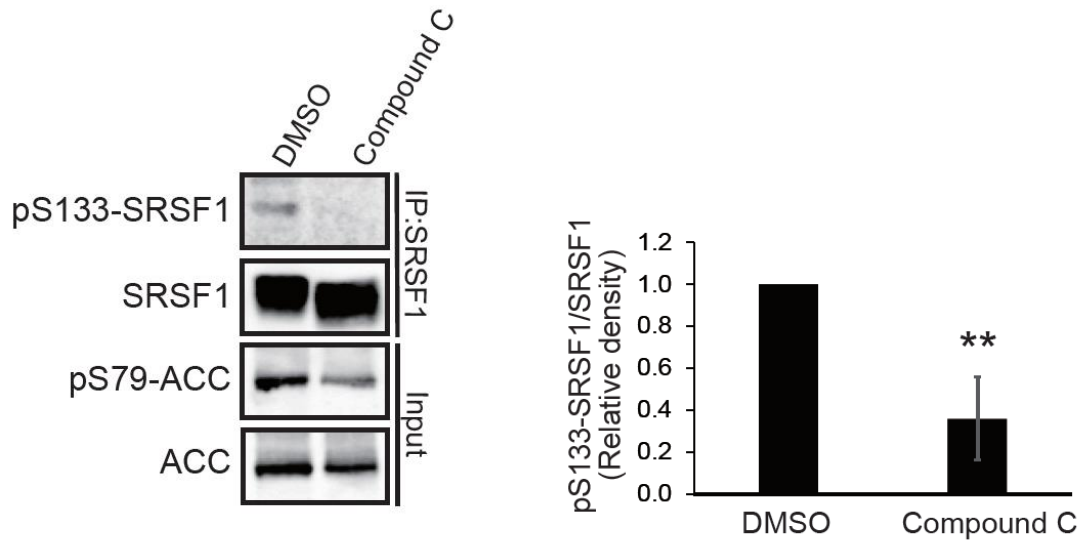
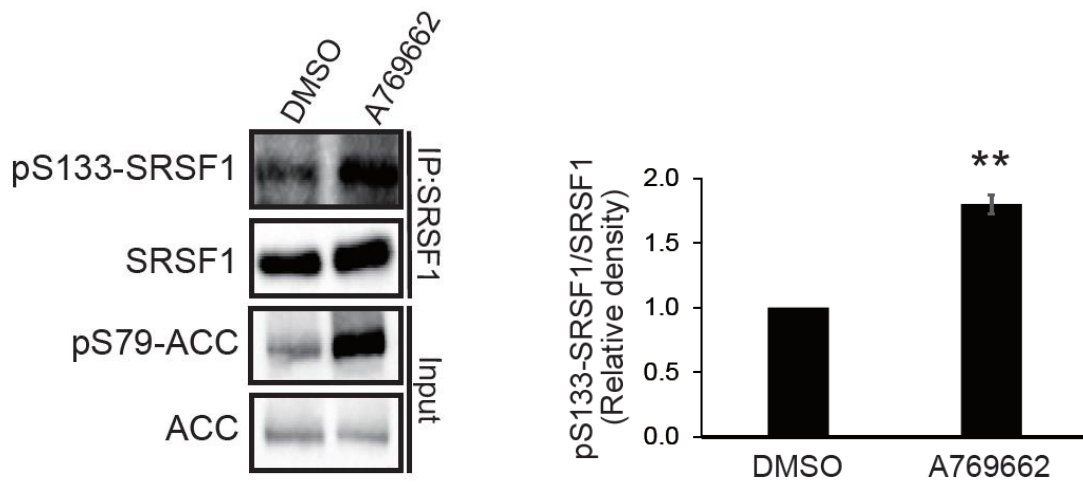
Figure 3-2 A-C. *in vitro* において AMPK は SRSF1 の Ser133 をリン酸化する。

(A) SRSF1 のドメインと AMPK によるリン酸化モチーフについて。(B, C)SRSF1 の配列内にある 109~158 番目のアミノ酸からなるペプチドを合成し、*in vitro* において放射線ラベルした ATP と AMPK リコンビナントタンパク質でリン酸化反応を行った。(C) SRSF1 のカイネティクス解析。合成したペプチドと AMPK リコンビナントタンパク質を 30 分間リン酸化反応させた。GraphPad Prism8 を用いて基質反応速度のグラフを作成し、 $V_{max}$  と  $K_m$  値を算出した。

**D****E**

**Figure 3-2 D, E.** 過剰発現系において AMPK は SRSF1 の Ser133 をリン酸化する。

(D, E) HEK293T 細胞に SRSF1 と AMPK 複合体を共発現し、脱リン酸化酵素を処理したものと未処理のものを比較した (D)。SRSF1 の野生型と非リン酸化変異体(S133A)の AMPK によるリン酸化の比較 (E)。

**F****G**

**Figure 3-2 F, G. AMPK の活性変化によって Ser133 のリン酸化状態は変動する。**

(F, G) 内在性 SRSF1 のリン酸化について。MCF7 細胞に 20  $\mu$ M の Compound C (F) または 250  $\mu$ M の A769662 (G) を添加し、4 時間後に細胞を回収し、抗 SRSF1 抗体で免疫沈降した。ウェスタンブロットの結果を左に示し、右に 3 回分の結果を image J で数値化しトータル SRSF1 に対するリン酸化 SRSF1 の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは $\pm$ 標準偏差で示している(n=3,\*\*p<0.01)



## 第二節 SRSF1 の細胞内局在

### 緒言

SRSF1 はリン酸化やメチル化酵素によって翻訳後修飾をうけることで細胞内での局在が変化し、その機能が制御されていることが報告されている [49-51]。そのため、Ser133 のリン酸化によって SRSF1 の細胞内局在が変化するのではないか、と仮説を立てた。

本節では、AMPK による SRSF1 の細胞内での局在の変化を調べるために AMPK 活性化剤の添加および SRSF1 変異体による SRSF1 の局在変化について免疫蛍光染色にて解析した。

## 結果

### ・ AMPK によって SRSF1 の細胞内局在は変化しない。

AMPK が内在性の SRSF1 の細胞内局在に影響を及ぼすか検証するために、MCF7 細胞に AMPK 活性化剤の A769662 を添加後、免疫蛍光染色法にて SRSF1 の局在を調べた。A769662 を添加し、AMPK を活性化させた場合において、SRSF1 は核内に局在した状態から変化しなかった (Figure 3-3 A)。次に、SRSF1 の野生型と変異型 (S133D；疑似リン酸化変異体, S133A；非リン酸化変異体) をそれぞれ MCF7 細胞に過剰発現させて局在を調べたところ、野生型と変異型のいずれにおいても先の結果と同様に、SRSF1 は核内に局在していた (Figure 3-3B)。以上の結果から、AMPK による SRSF1 リン酸化は SRSF1 の細胞内局在には影響しないことが示され、SRSF1 のリン酸化は核内での SRSF1 の機能を制御することが示唆された。

**A**

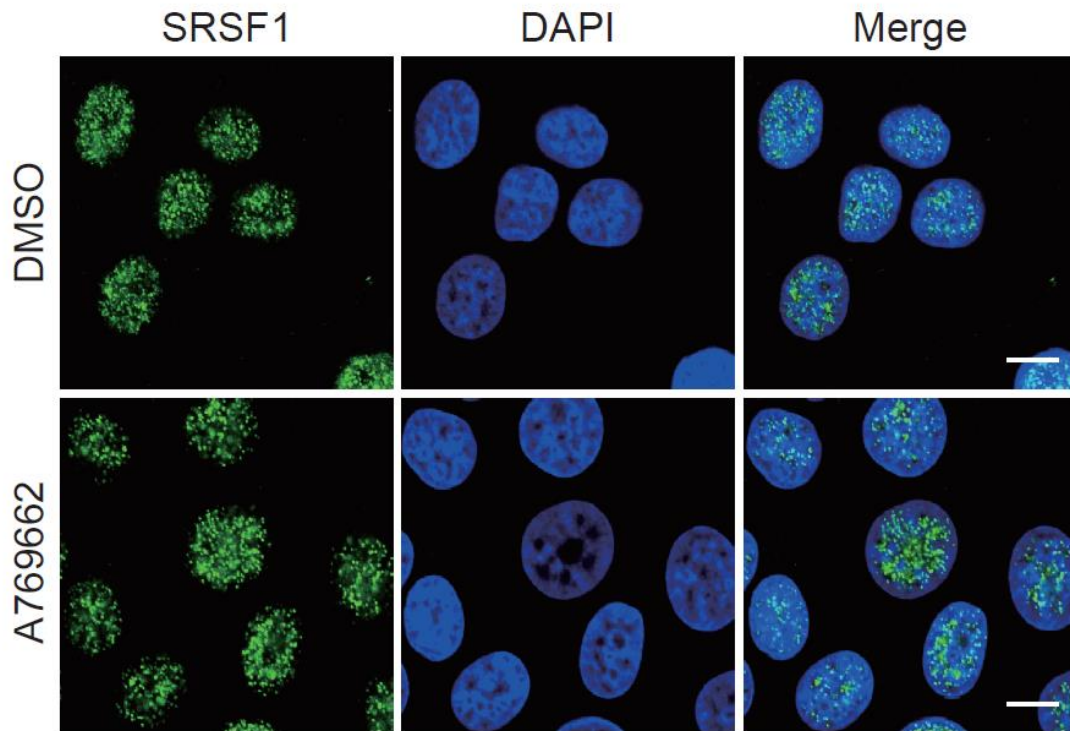


Figure 3-3 A. AMPK は内在性 SRSF1 の細胞内局在には影響しない。  
(A) MCF7 細胞に DMSO または 250  $\mu$ M A769662 を添加し、37°C で 4 時間インキュベートした。免疫蛍光染色法により SRSF1 の局在を観察した。

**B**

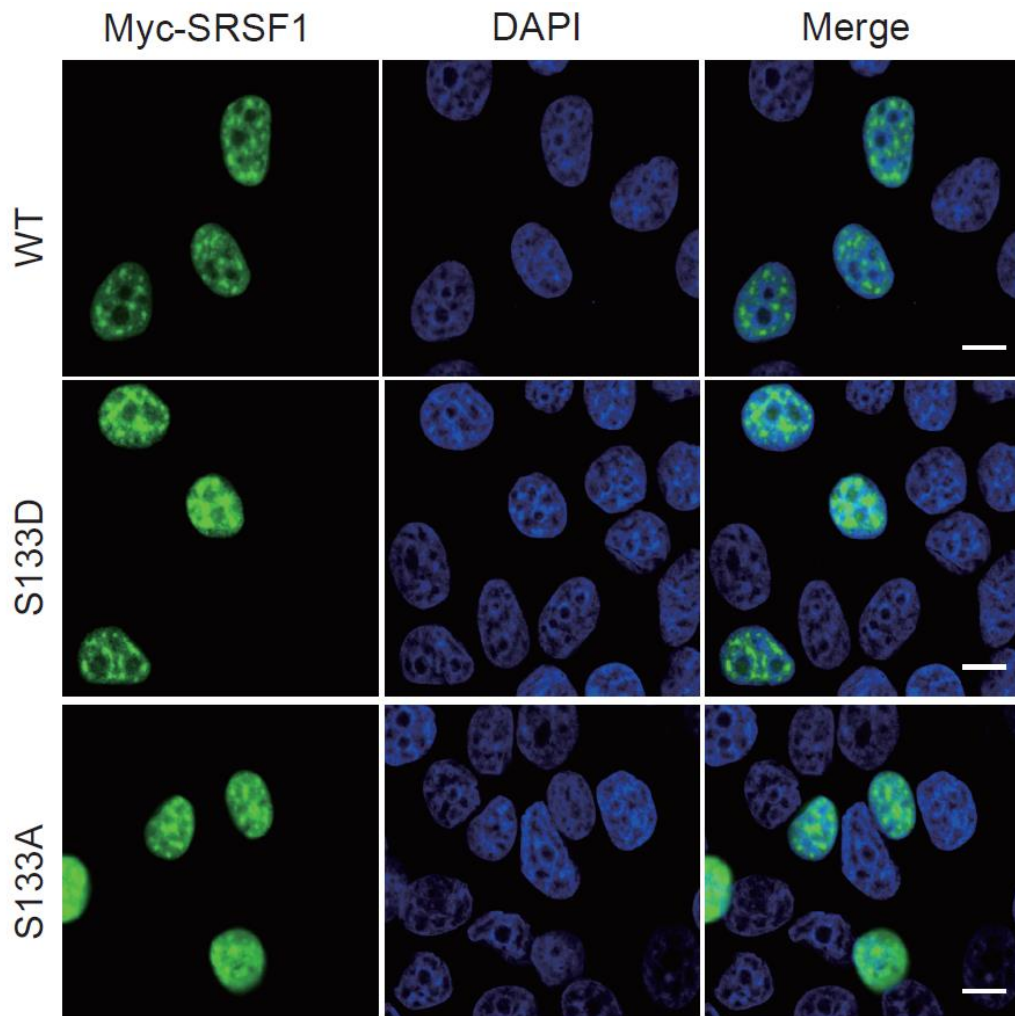


Figure 3-3 B. Ser133 の変異によって SRSF1 の細胞内局在は変化しない。

(B) Myc-SRSF1 の野生型と変異体をそれぞれ MCF7 細胞に強制発現し、抗 Myc 抗体で免疫染色し、それぞれの局在を比較した。DNA を DAPI で染色した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### 第三節 AMPK による SRSF1-RNA 結合変化 緒言

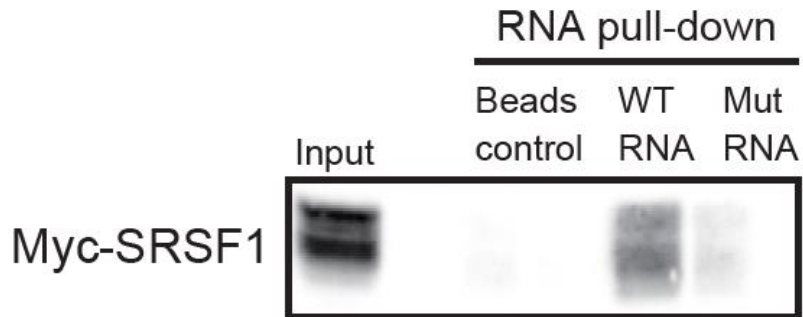
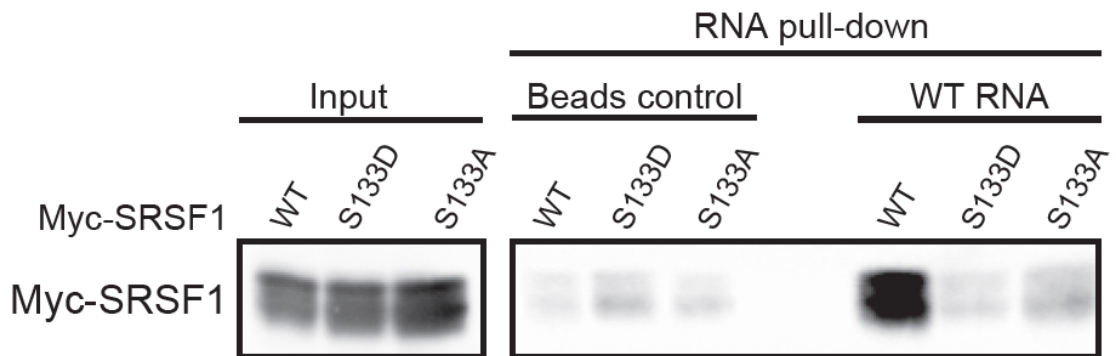
SRSF1 の RRM2 内には RNA と直接結合する SWQDLKD モチーフと呼ばれるアミノ酸配列から名付けられたモチーフが存在し、Ser133 は SWQDLKD の S に該当する。そのため、Ser133 のリン酸化は RNA との結合に影響を与えることが考えられた。また、過去の報告では、SWQDLKD モチーフを介して 5'-GGA-3'配列と結合することが知られている。そこで、AMPK が SRSF1 をリン酸化することで 5'-GGA-3'配列との結合が変化するか検討した。

## 結果

・AMPKによってSRSF1とGGAモチーフ配列との結合は阻害される。

SRSF1のRRM2とRNAの結合に関する構造解析の結果から、RRM2はGGAモチーフ配列と結合することが示されている [52]。そのため、本研究においてもこのモチーフ配列との結合が確認できるか解析するために5'-CUGAAGGACA-3'の5'側をビオチン化したプローブを合成し、*in vitro* RNA pulldown assayでSRSF1との結合を検討した。その結果、Myc-SRSF1と5'-CUGAAGGACA-3'との結合が確認でき、一方で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 (Figure 3-4A)。よって、本研究においてもSRSF1はGGAモチーフと特異的に結合することが示された。

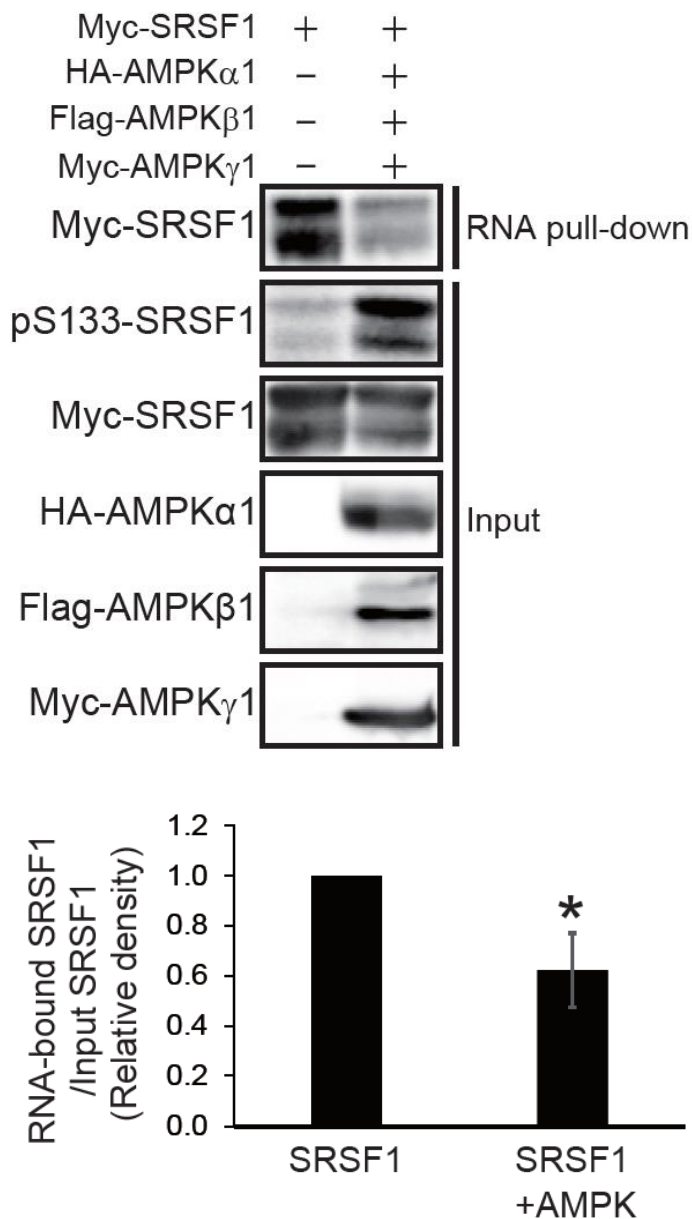
次に、SRSF1のSer133のリン酸化がGGAモチーフとSRSF1との結合に及ぼす影響について検討した。まず、Ser133の変異によるビオチン化RNAプローブとSRSF1の結合変化について解析した結果、疑似リン酸化変異体 (S133D)のみならず、非リン酸化変異体 (S133A)であるS133AにおいてもWTと比較してビオチン化RNAプローブとの結合量が減少した (Figure 3-4B)。よって、Ser133のアミノ酸側鎖がRNAとの結合に重要であることが示唆された。次にAMPKによるリン酸化によるSRSF1とRNAとの結合変化について解析した結果、ビオチン化RNAプローブと結合するMyc-SRSF1量がAMPKの共発現によって有意に減少した (Figure 3-4C)。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GGAを含むRNAとの結合を阻害することが示された。

**A****B**

**Figure 3-4A, B. SRSF1 と GGA モチーフ配列は結合する。**

(A) HEK293T 細胞に Myc-SRSF1 を強制発現し、  
 ビオチン化 5'-CUGAAGGACA-3' RNA (WT RNA) または 5'-CUGAAUUACA-3'  
 (Mut RNA) RNA プローブと反応させてアビジンビーズでプルダウンした。(B)  
 Myc-SRSF1 の野生型または変異型を強制発現させて RNA プローブへの結合量  
 を比較した。

**C**



**Figure 3-4 C. Ser133 のリン酸化によって GGA モチーフ配列との結合能は低下する。**

(C) Myc-SRSF1 と AMPK の共発現ありとなしにおけるビオチン化 RNA プローブとの結合量を比較した。ウェスタンブロットの結果を上図に示し、下図に 3 回分の結果を image J で数値化しインプット SRSF1 に対する RNA プローブと結合した SRSF1 量の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは±標準偏差で示した (n=3,\*p<0.05)。



## 第四節 AMPK による RNA スプライシング制御機構

### 緒言

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。本節では Ron mRNA の選択的スプライシングをモデルとして AMPK が SRSF1 依存的な選択的スプライシングに影響を及ぼすか検証し、さらにその制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 結果

### ・ AMPK の活性を制御することで Ron mRNA のエクソン 11 のスプライシングは変動する。

SRSF1 がエクソン 11 のスキッピングを誘導することで  $\Delta$ Ron が生成される (Figure 3-5 A)。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  $\Delta$ 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  $\Delta$ Ron/Ron の比率を解析した。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、 $\Delta$ Ron が増えることによって  $\Delta$ 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。(Figure 3-5 B, C)。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。

### ・ AMPK は SRSF1 を介して Ron エクソン 11 の選択的スプライシングを制御する。

Figure 3-5 での変化が SRSF1 を介したものであるか調べるために MCF7 細胞に 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 (Figure 3-5 D)。まず、過去の報告と同様に、SRSF1 をノックダウンすることで  $\Delta$ Ron/Ron の比率が低下することが確認できた (Figure 3-5E)。また、野生型の MCF7 細胞に A769662 を添加することで認められた  $\Delta$ 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 (Figure 3-5E)。したがって、AMPK は SRSF1 介して Ron 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。

### ・ AMPK によるリン酸化で SRSF1 と Ron mRNA との結合は阻害される。

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 Ron mRNA 前駆体のエクソン 12 の 5'-CGGAGGAAG-3' と直接結合することが報告されている [53]。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、*in vitro* RNA pull-down assay を行った結果、ビオチン化 5'-CGGAGGAAG3' RNA プロブと SRSF1 との結合が確認された (Figure 3-6 A)。また、5'-CGGAGGAAG-3' を 5'-CGGUUGUUG-3' に変異させるこ

とで SRSF1 との結合が低下することが報告されている [53]。本実験でもこの報告と同様に、上記の変異によって SRSF1 との結合が低下した (Figure 3-6 A)。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。Figure 3-4 と同様に、Ser133 の変異によってエクソン 12 と SRSF1 との結合が低下した (Figure 3-6B)。よって、SRSF1 とエクソン 12 との結合は RRM2 ドメインを介していて、さらに、GGA モチーフ配列との結合と同様に、SRSF1 とエクソン 12 との結合においても Ser133 のアミノ酸側鎖が重要である可能性が示唆された。次に、リン酸化 SRSF1 とエクソン 12 の結合を解析した結果、リン酸化によって SRSF1 とエクソン 12 との結合は有意に低下した (Figure 3-6 C)。

続いて、培養細胞内のリン酸化 SRSF1 と Ron のエクソン 12 の結合について RNA-CLIP 法で調べた。Ron のイントロンを含むエクソン 10 からエクソン 12 の配列をコードした Ron ミニ遺伝子を HEK293T 細胞に導入し、SRSF1 に結合するミニ遺伝子由来の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析した。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 (Figure 3-6 D)。したがって、Figure 3-5 と 3-6 の結果から、AMPK は SRSF1 と Ron mRNA 前駆体との結合を阻害することで選択的スプライシングを抑制することが示された。

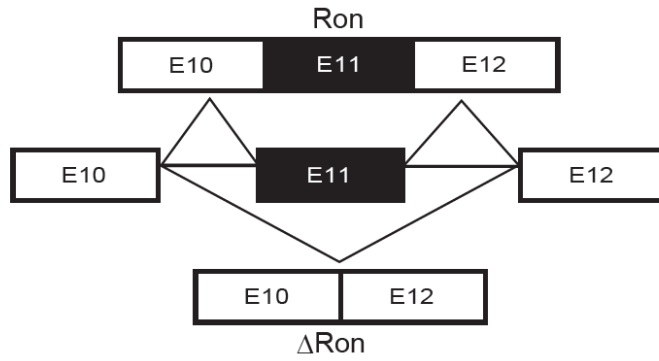
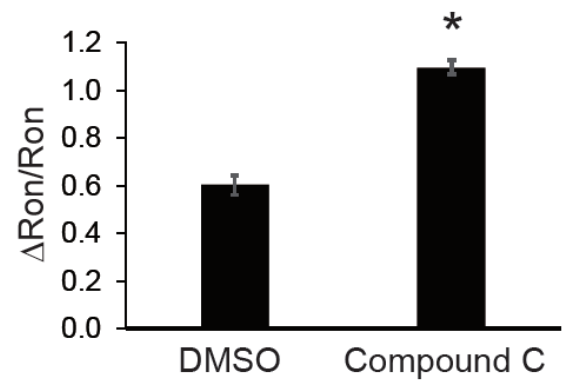
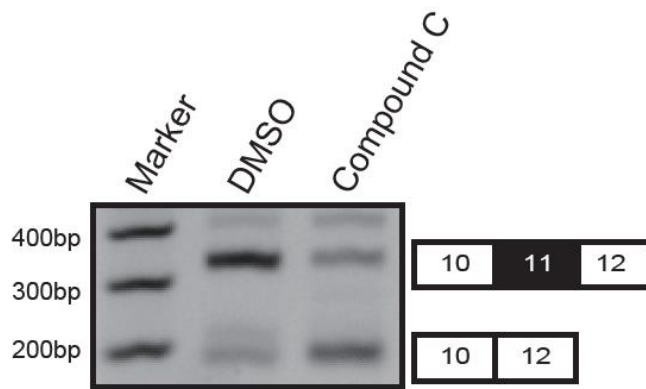
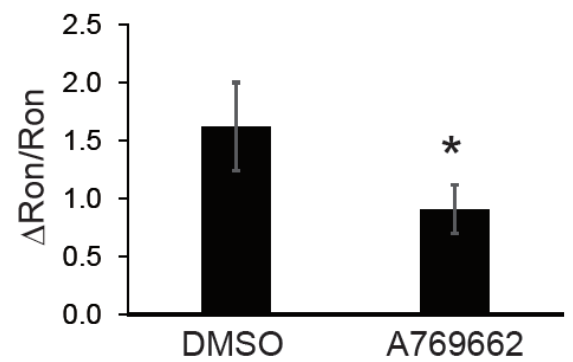
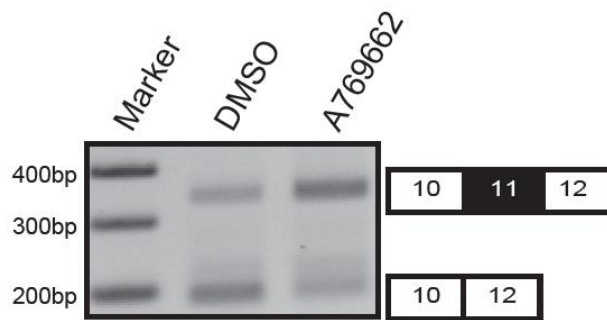
**A****B****C**

Figure 3-5 A-C. AMPK の活性変化によって Ron エクソン 11 のスプライシングは変動する。

(A) Ron エクソン 11 のスプライシングパターン。 (B, C) Ron エクソン 11 のスキッピングを RT-PCR 法で解析した。MCF7 細胞に 100  $\mu$ M の Compound C (B) または 250  $\mu$ M の A769662 を添加して 4 時間後に RNA を回収した(C)。左図は RT-PCR の結果を示し、右のグラフでは Ron のスキッピングとインクルージョンの割合を示している ( $\Delta$ Ron/Ron)。グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した(n=3-4, \*p<0.05)。

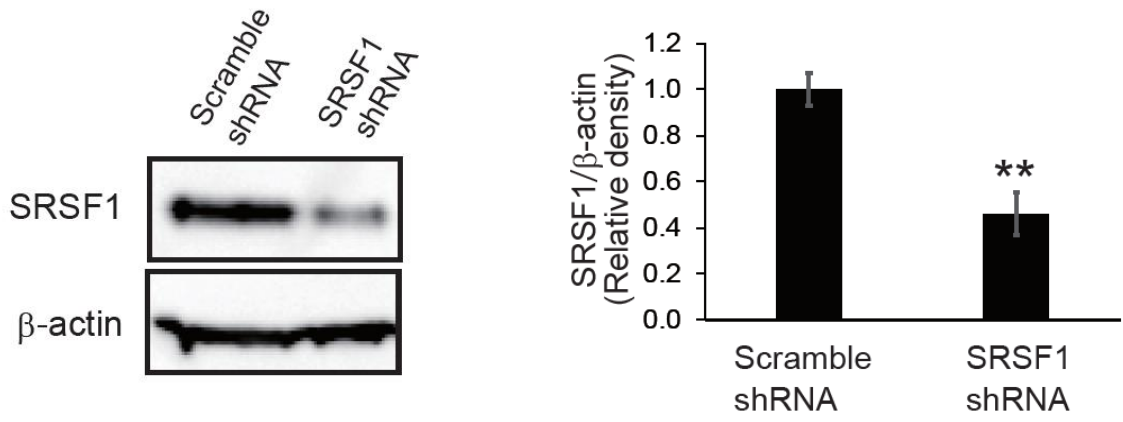
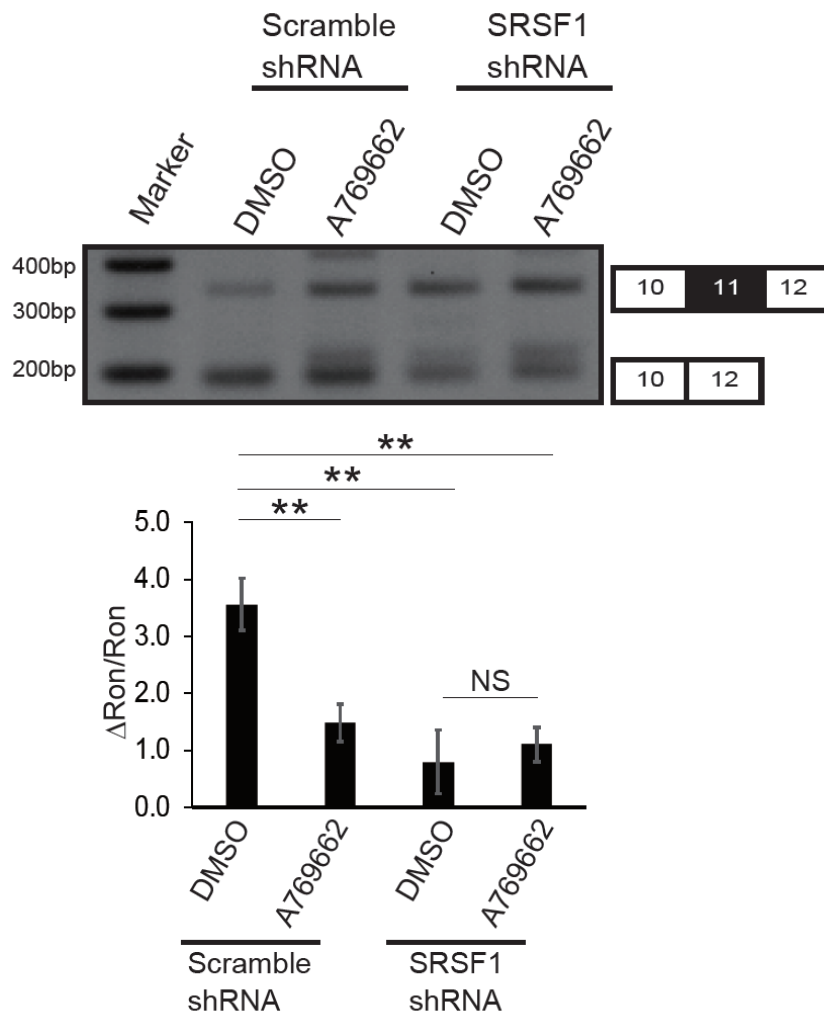
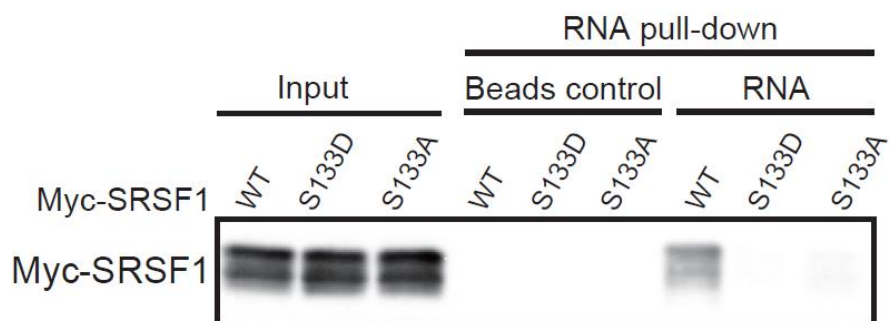
**D****E**

Figure 3-5 D, E. AMPK は SRSF1 を介して選択的スプライシングを抑制する。

(D) レンチウイルスによって shRNA を MCF7 細胞に導入し、SRSF1 ノックダウン細胞を樹立した。ウェスタンブロットの結果を左に示し、右に 3 回分の結果を image J で数値化し  $\beta$ -アクチンに対する SRSF1 量の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは $\pm$ 標準偏差で示した (n=3, \*\*p<0.01)。 (E) Ron エクソン 11 のスキッピングを RT-PCR 法で解析した。樹立した SRSF1 ノックダウン細胞に 250  $\mu$ M の A769662 を添加して 4 時間後に RNA を回収した。上の図は RT-PCR の結果を示し、下のグラフでは Ron のスキッピングとインクルージョンの割合を示している ( $\Delta$ Ron/Ron)。グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した(n=3-4, \*\*p<0.01) 。NS は有意な差がないことを示している。

**A****B**

**Figure 3-6 A, B. SRSF1 と Ron mRNA との結合について**

(A) HEK293T 細胞に Myc-SRSF1 を強制発現し、ビオチン化 5'-CGGAGGAAG-3' RNA (WT Ron) または 5'-CGGUUGUUG-3' (Mut Ron) RNA プローブと反応させてアビジンビーズでプルダウンした。(B) Myc-SRSF1 の野生型または変異型を強制発現させて RNA プローブへの結合量を比較した。

**C**



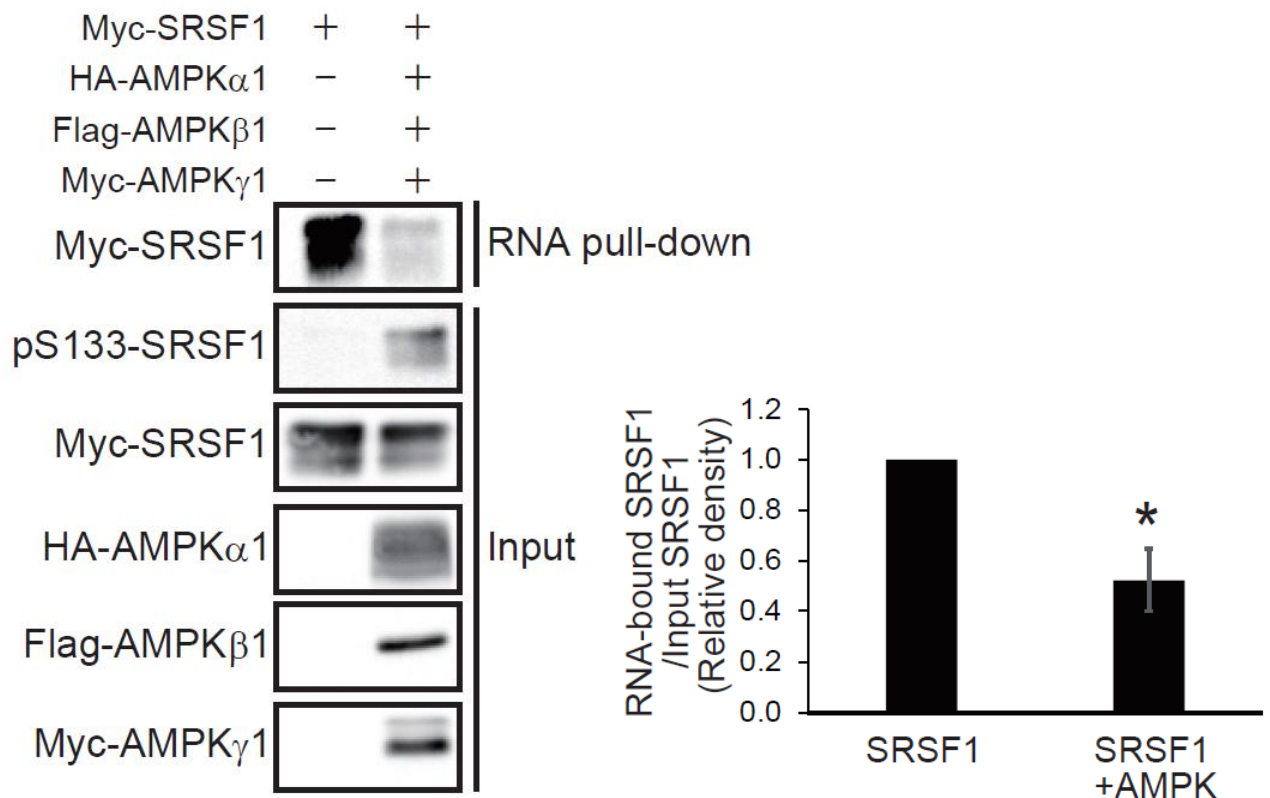


Figure 3-6 C. AMPK はリン酸化によって SRSF1 と Ron mRNA との結合を阻害する。

(C) Myc-SRSF1 と AMPK の共発現ありとなしにおけるビオチン化 RNA プローブとの結合量を比較した。

ウェスタンブロットの結果を左図に示し、右図に 3 回分の結果を image J で数値化しインプット SRSF1 に対する RNA プローブと結合した SRSF1 量の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは±標準偏差で示した (n=3, \*p<0.05)。

D

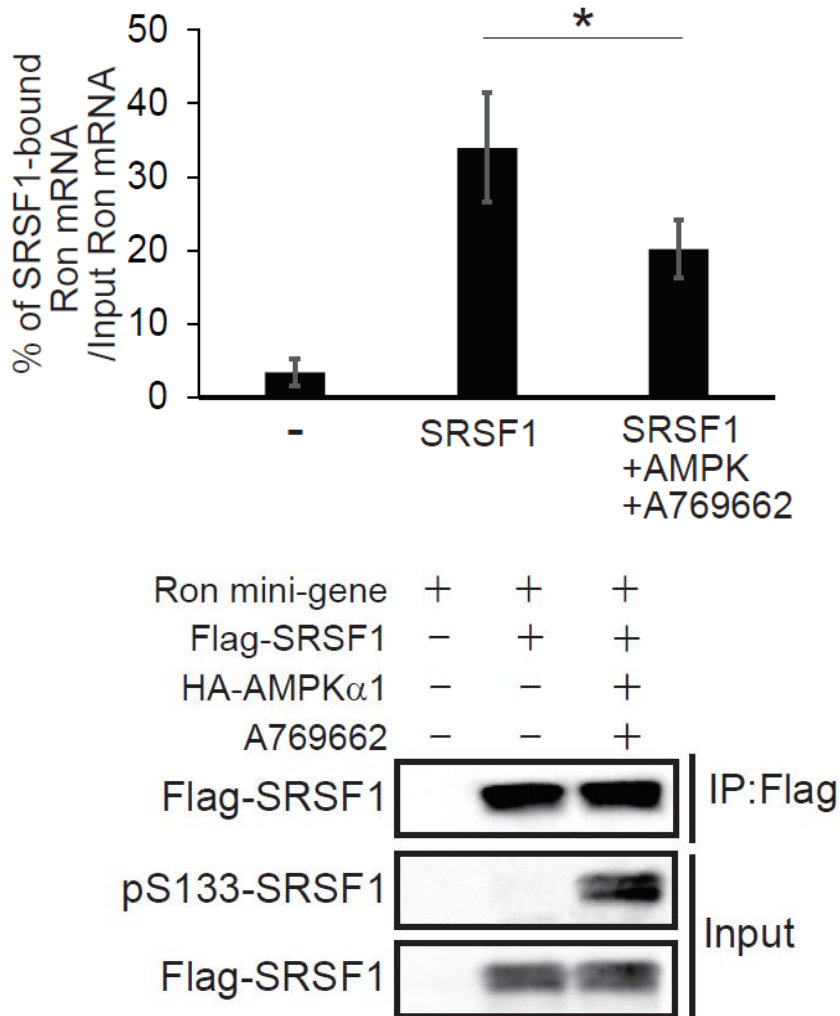


Figure 3-6 D. AMPK はリン酸化によって SRSF1 と Ron mRNA との結合を阻害する。

(D) Ron ミニ遺伝子(Ron のイントロンを含むエクソン 10 から 12 の配列をコードしたもの)と図にあるプラスミドを HEK293T 細胞に強制発現した。250  $\mu$ M の A769662 を添加して 4 時間後細胞を回収し、抗 Flag 抗体で免疫沈降したサンプルから RNA を抽出した。上図に SRSF1 に結合した Ron mRNA 量を qPCR で解析した結果を示し、下図にウェスタンブロットの結果を示した。 。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは $\pm$  標準偏差で示した (n=3, \*p<0.05)。

## 第五節 考察

### ・本章のまとめ

本章の概略図を Figure 3-7 に示した。本章の実験結果から、スプライシングを制御する AMPK の基質として初めて、SRSF1 を同定した。AMPK は SRSF1 配列内の RRM2 ドメインをリン酸化し、SRSF1 の核内での局在は変えずに、mRNA との結合を制御することが明らかとなった。さらに、選択的スプライシング変化のモデルとして、Ron のエクソン 11 のスプライシングパターンを調べた結果、AMPK は SRSF1 のリン酸化を介して選択的スプライシングを制御することが明らかとなった。本節ではリン酸化 SRSF1 と RNA の結合について、AMPK が SRSF1 をリン酸化することの意義などについて考察する。

### ・リン酸化 SRSF1 と RNA との結合について

SRSF1 は 2 つの RNA 結合ドメイン (RRM ドメイン) を持ち、N 末端側にある RNA 結合ドメイン (canonical RRM) と canonical RRM とは異なる立体構造を持ち、RNA と結合する pseudo-RRM と呼ばれる RRM2 が後ろに続く [54, 55]。SRSF1 が RNA と結合してスプライシングを制御するためには RRM1 と RRM2 の両方が重要であるが [56, 57]、RRM2 は基質特異性が高いことが報告されている [24, 25]。RRM2 配列内の SWQDLKD モチーフは RRM2 を持つ SR タンパク質の中で配列保存性が高く、このモチーフと RNA 配列内の 5'-GGA-3'モチーフが結合することが立体構造解析によって明らかとなっている [52]。

第三節と第四節の実験結果より、SRSF1 と 5'-GGA-3'を含む RNA 配列との結合がリン酸化修飾によって阻害されることが明らかとなっている (Figure 5 C, 6 C, D)。ここで、SRSF1 と RNA の結合の立体構造解析の結果から [52]、Ser133, Trp134, Gln135 が 5'-GGA-3'モチーフとの結合に重要であり、中でも、Ser133 と Gln135 間で形成される水素結合によって RNA 配列と相互作用することが示されている。この知見から、Ser133 のリン酸化修飾によって Gln135 との水素結合がなくなることで RNA との相互作用が消失し、結合が阻害されたことが考えられる。さらに、SRSF1 の RRM2 の結合と RNA の結合には Ser133 と Gln135 間で形成される水素結合が重要であることも示された。

### ・SRSF1 の翻訳後修飾について

SRSF1 は様々な翻訳後修飾を受けることで細胞内での局在や機能が制御されている。特に、RS ドメインのリン酸化修飾が SRSF1 の核内外への移動に重要である。RS ドメインは SRPKs によってリン酸化を受けると核内へ移行し [58, 59]、脱リン酸化酵素によって脱リン酸化されることで細胞質に移行する [60]。また、

RRM2 配列の変異によって RS ドメインの N 末端側との分子内結合が阻害されることで SRSF1 の核内への移動が抑制されることが報告されている [51]。

これらの知見から第二節では、Ser133 がリン酸化されることで SRSF1 の細胞内局在が制御されるのではないかと仮説を立てた。ところが、Figure3 より、SRSF1 のリン酸化部位の変異および AMPK 活性化条件下では SRSF1 は核内に存在し、細胞内局在の変化は見られなかった。SRSF1 の SWQDLKD モチーフが SRPK1 と結合することが報告されており [61]、Ser133 の変異やリン酸化修飾によってこの結合が変化することが考えられる。そのため、SRSF1 と SRPK1 との結合のリン酸化修飾による変化については検証していく必要がある。しかしながら、Figure 3-2 D から Ser133 のリン酸化修飾の有無に関係なく、Myc-SRSF1 について hyper-phosphorylation 状態のバンドが見られるため、Ser133 のリン酸化によって、SRPK1 のように SRSF1 の局在を制御するリン酸化酵素による SRSF1 のリン酸化修飾は変化しないことが示唆された。そのため、AMPK による選択的スプライシングの変化は主に核内での SRSF1 と RNA の結合阻害によるものであることが考えられる。AMPK は核と細胞質の基質をともにリン酸化し、その機能を制御しているので [5]、AMPK は核内で SRSF1 をリン酸化することで選択的スプライシングを制御していることが示唆される。

#### ・既知の AMPK 基質と SRSF1 のリン酸化の比較について

Figure 2 C では、Ser133 を含む SRSF1 の一部配列におけるリン酸化反応のカイネティクス解析を行ったが、今後は全長 SRSF1 についても同様の解析を行い、さらに既知の AMPK 基質である ACC との比較を行うことが必要である。この比較によって、これまでの基質と同程度に SRSF1 がリン酸化修飾を受けるかを検討することができる。

#### ・AMPK による腫瘍細胞の浸潤・転移抑制について

Ron はマクロファージ刺激タンパク質 (MSP) 受容体型のチロシンキナーゼであり、MSP と結合することで活性化されて下流のシグナル伝達経路を活性化する [62]。これによって、Ron は上皮間転換 (EMT) に関わっており、組織修復や臓器再生に重要である。

しかし、腫瘍組織で Ron の発現制御に異常が生じることで Ron は腫瘍細胞の運動や浸潤能を増加させ、腫瘍の転移に有利に働くと考えられている。Ron mRNA スプライシングバリエーションである  $\Delta$ Ron はリガンドの結合を伴わずに活性化する。腫瘍細胞においては  $\Delta$ Ron が多く発現し、腫瘍の転移が亢進されている [63]。また、腫瘍細胞における SRSF1 の過剰発現によって Ron mRNA 前駆体

のエクソン 11 のスキッピングを介して  $\Delta$ Ron の発現量が増加し、腫瘍細胞の運動性や浸潤性は増加する [53]。

一方で、AMPK の活性化は Akt-MDM2-Foxo3 シグナル経路を制御し、EMT を抑制することが報告されている [64]。本章では、AMPK が SRSF1 による  $\Delta$ Ron 生成を抑制することを明らかにした。そのため、AMPK は SRSF1 標的遺伝子の選択的スプライシングを制御することによっても EMT を抑制することが示唆された。さらに、SRSF1 は多くの腫瘍で高く発現しているがん原遺伝子として同定されていて、腫瘍に関わる因子のスプライシングを制御している [65]。したがって、AMPK は SRSF1 を介した腫瘍化促進を抑えるための治療標的となり得ると考えられる。

#### ・メトホルミンによるスプライシング変化についてこれまでの報告との比較

AMPK は mTORC1 をリン酸化することで mRNA の翻訳を抑制している [20]。AMPK の活性化剤であるメトホルミンは mTORC1 経路を介して標的 mRNA の翻訳を抑制している [66]。さらに、メトホルミン添加によって RNA-binding motif protein 3 (RBM3) のタンパク質発現量が低下することで選択的スプライシングが変化することが報告されている [33]。本章では、AMPK が SRSF1 を直接リン酸化することで SRSF1 と RNA との結合を阻害し、選択的スプライシングを抑制することを示した。したがって、AMPK はスプライシングを制御するタンパク質発現の抑制のみならず、RNA 結合タンパク質の RNA 結合能を阻害することによっても選択的スプライシングを抑制することが示唆された。

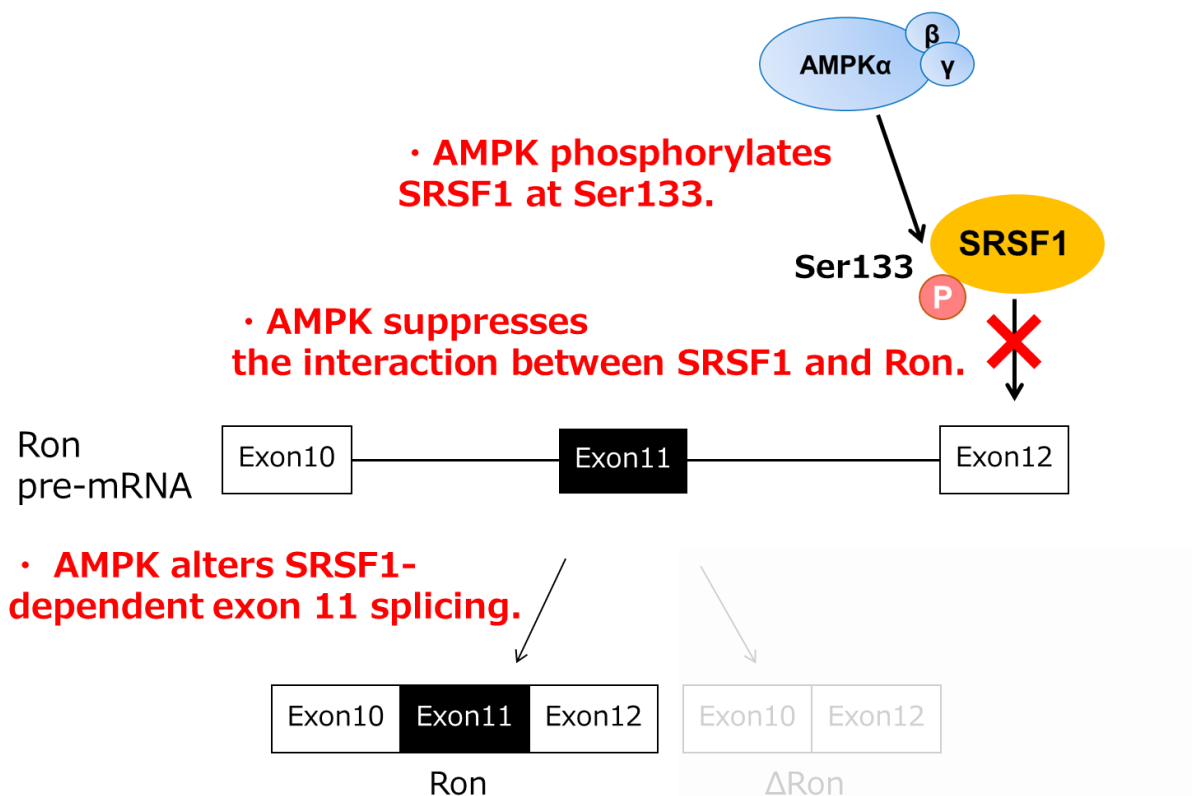


Figure 3-7. AMPK はリン酸化によって SRSF1 と Ron mRNA の結合を阻害することで Ron のエクソン 11 の選択的スプライシングを抑制する。

AMPK が SRSF1 の Ser133 をリン酸化することで Ron のエクソン 12 との結合が阻害される。SRSF1 はエクソン 12 と結合することでエクソン 11 を誘導しているため、この結合の阻害によってエクソン 11 のスキッピングが抑制される。

## 第四章 AMPK による SRSF9 のリン酸化と機能制御

### 緒言

$\beta$ -catenin は、胚発生や組織を維持するための重要な役割を担い、多彩な機能を持つタンパク質である。しかし、 $\beta$ -catenin が正常に分解できなくなったり、 $\beta$ -catenin の合成が過剰になったりすることで  $\beta$ -catenin が細胞内で異常蓄積し、これがヒトにおける多様な腫瘍に関与することが明らかとなっている。

がん原遺伝子である serine/arginine-rich splicing factor 9 (SRSF9) が過剰に発現することで、SRSF9 が  $\beta$ -catenin mRNA と結合して mTORC1 依存的な翻訳が活性化されることで  $\beta$ -catenin が蓄積されることが近年報告された。しかしながら、SRSF9 と mRNA の結合がどのように制御を受けるかについては明らかとなっていない。

そこで本章では、AMPK による SRSF9 のリン酸化修飾による  $\beta$ -catenin 発現の制御機構を明らかにすることを目的とした。第一節では AMPK による SRSF9 のリン酸化について解析し、第二節では AMPK による SRSF9 と  $\beta$ -catenin mRNA との結合変化について解析した。第三節では、AMPK による SRSF9 のリン酸化を介した翻訳制御機構について調べた。

## 第一節 SRSF9 のリン酸化

### 緒言

第四章で SRSF1 の RRM 配列内にある SWQDLKD モチーフの Ser133 を AMPK はリン酸化することを示した。SWQDLKD モチーフは RNA と直接結合し、基質特異性が高いことが報告されている [52]。SRSF9 もまた RRM 配列内に SWQDLKD モチーフを持ち、その配列が SRSF1 と比較して高く保存されていることから、SRSF9 もまた AMPK の基質なのではないか、と考えた。

本節では AMPK による SRSF9 のリン酸化部位の特定を行った。



## 結果

### ・ AMPK は SRSF9 の Ser123 をリン酸化する。

SRSF9 配列中の AMPK 認識モチーフ配列を検索した結果、Ser123 周辺の配列が AMPK 認識モチーフ配列と一致しており、さらに、この配列は様々な種間において高く保存されていた (Figure 4-1 A)。まず AMPK が SRSF9 の Ser123 を直接リン酸化するか明らかにするために、SRSF9 配列内で 98 番目のアミノ酸から 148 番目のアミノ酸を含むポリペプチドを基質として用いて *in vitro* kinase assay に供した。その結果、AMPK は野生型 SRSF9 ペプチドをリン酸化するが、アラニンに変異させた非リン酸化変異体 (S123A) では AMPK によるリン酸化は検出されなかった (Figure 4-1 B)。したがって、AMPK は *in vitro* で SRSF9 の Ser123 を直接リン酸化することが明らかとなった。

次に、培養細胞内においても AMPK が SRSF9 の Ser123 をリン酸化するか検討した。第三章で作製した抗リン酸化 SRSF1 抗体に関しては、作製するにあたり使用した抗原のアミノ酸配列が SRSF9 の配列とも一致していることから、リン酸化 SRSF9 の検出にも利用できることが予想された。HEK293T 細胞に Flag-SRSF9 と AMPK の各サブユニットを過剰発現させ、WB にて解析を行った。その結果、SRSF9 の WT と AMPK を共発現させた細胞では作製した抗体によるバンドが検出され、この細胞に脱リン酸化酵素を処理することでこのバンドは消失した (Figure 4-2 C)。一方で、SRSF9 S123A は AMPK によってリン酸化されなかった (Figure 4-2D)。よって、第三章で使用した抗体が SRSF9 の Ser123 のリン酸化を認識すること、ならびに強制発現系にて AMPK が細胞内においても Ser123 をリン酸化することが示された。続いて、内在性においても同様に AMPK による 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、WB にて解析を行った。AMPK 阻害剤である Compound C を添加することで SRSF9 のリン酸化は低下した (Figure 4-2 E)。したがって、細胞内において AMPK は SRSF1 のみならず SRSF9 もリン酸化することが明らかとなった。

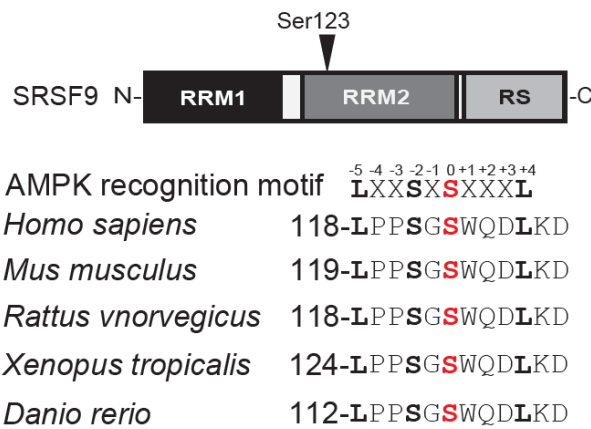
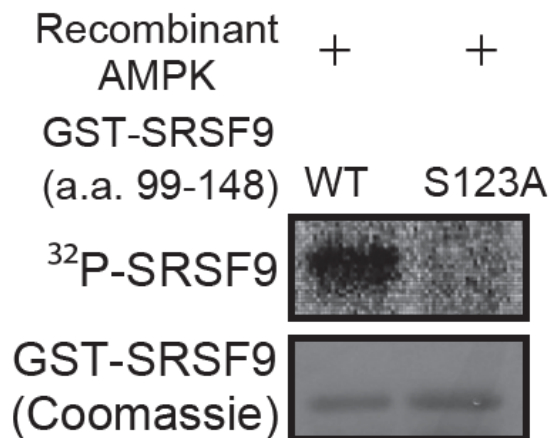
**A****B**

Figure 4-1 A, B. *in vitro*において AMPK は SRSF9 の Ser123 をリン酸化する。

(A) SRSF9 のドメインと AMPK によるリン酸化モチーフについて。(B) SRSF9 の配列内にある 98~148 番目のアミノ酸からなるペプチドを合成し、*in vitro*において放射線ラベルした ATP と AMPK リコンビナントタンパク質でリン酸化反応を行った。

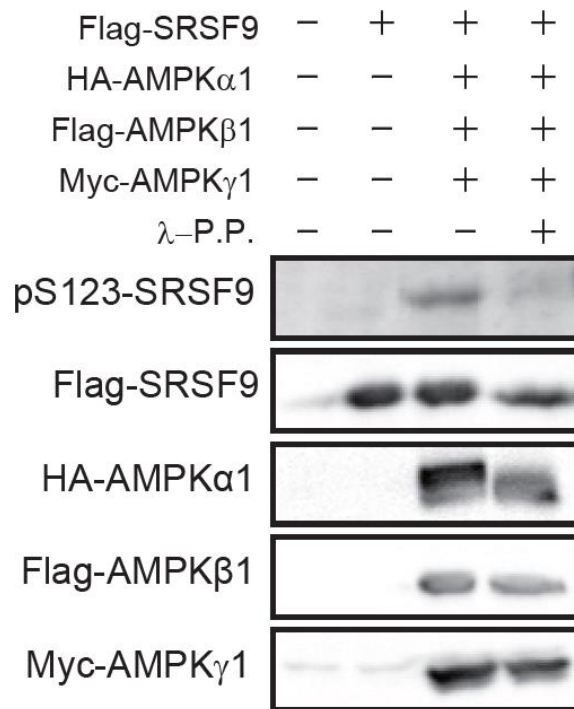
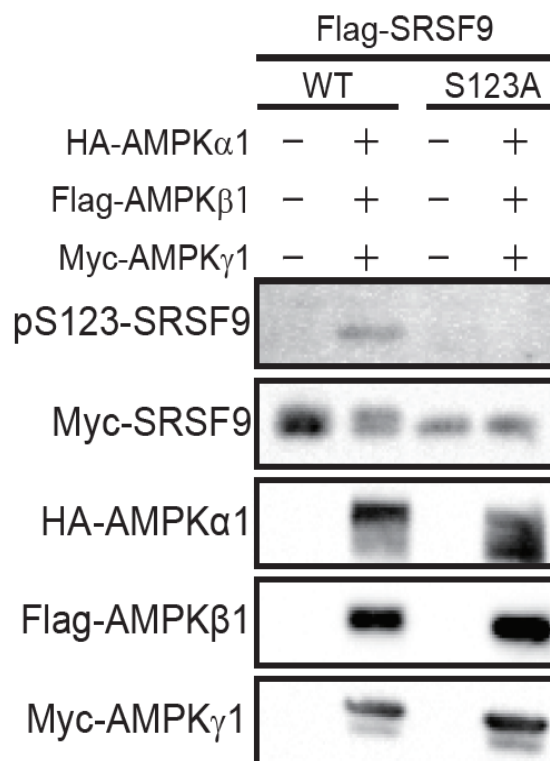
**C****D**

Figure 4-1 C, D. 過剰発現系において AMPK は SRSF9 の Ser123 をリン酸化する。

(C, D) HEK293T 細胞に SRSF1 と AMPK 複合体を共発現し、脱リン酸化酵素を処理したものと未処理のものを比較した (C)。SRSF1 の野生型と非リン酸化変異体(S133A)の AMPK によるリン酸化の比較 (D)。

**E**

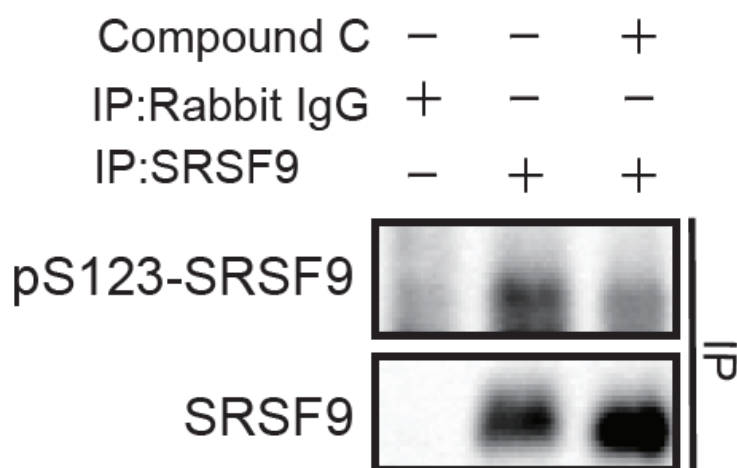


Figure 4-1 E. AMPK の阻害によって SRSF9 の Ser123 のリン酸化は低下する。

(E) 内在性 SRSF1 のリン酸化について。MCF7 細胞に 20  $\mu$ M の Compound C を添加した 4 時間後に細胞を回収し、抗 SRSF1 抗体で免疫沈降した。

## 第二節 AMPK による SRSF9-RNA 結合変化

### 緒言

$\beta$ -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  $\beta$ -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と考えられている。これまでに  $\beta$ -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  $\beta$ -catenin タンパク質の合成経路に関する研究報告から、 $\beta$ -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 [48]。実際に、SRSF9 も腫瘍細胞において過剰発現しており、 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -catenin mRNA との結合が変化するか検討した。

本節では、 $\beta$ -catenin mRNA 配列上のどこに SRSF9 が結合するか明らかにし、さらに AMPK による SRSF9 のリン酸化修飾がこの結合に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

## 結果

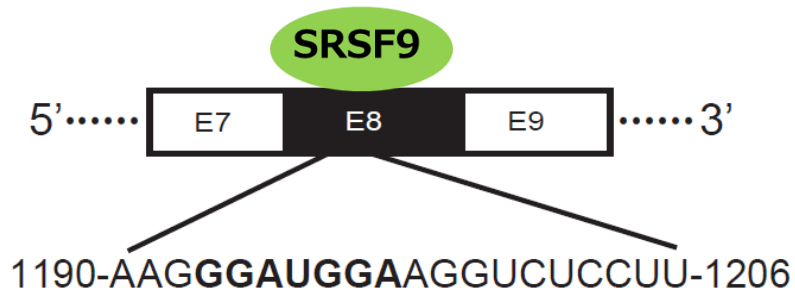
・ SRSF9 は  $\beta$ -catenin のエクソン 8 にある 5'-GGAUGGA-3' と結合する。

$\beta$ -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、 $\beta$ -catenin mRNA 配列上にこの結合モチーフ配列があるか RBPmap motifs database [67] と呼ばれる予測ツールを用いて検索を行った。その結果、 $\beta$ -catenin mRNA のエクソン 8 の配列内にある 5'-GGAUGGA3' 配列が見出され (Figure 4-2 A)、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  $\beta$ -catenin mRNA と上記の配列を介して結合するか検討した。この配列が SRSF9 と  $\beta$ -catenin との結合に必要であるか確認するために、Myc- $\beta$ -catenin を HEK293T 細胞に発現させて RNA-CLIP 法で SRSF9 に結合した  $\beta$ -catenin mRNA 量を解析した。その結果、5'-GGAUGGA-3' を 5'-GUUAUUG-3' に変異させることで SRSF9 に結合した  $\beta$ -catenin mRNA 量は有意に減少したため (Figure 4-2 B)、 $\beta$ -catenin と SRSF9 は 5'-GGAUGGA-3' を介して結合していることが示された。

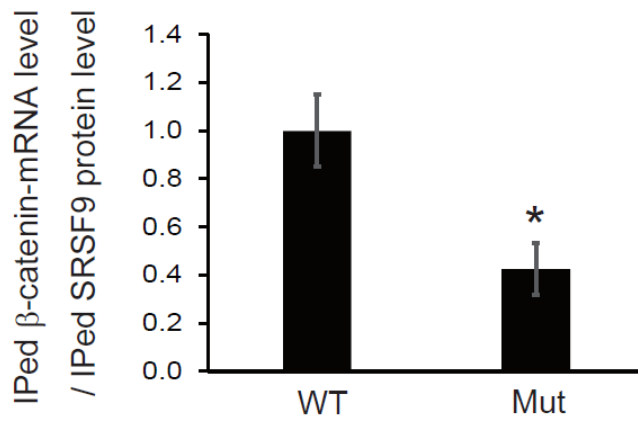
・ AMPK は SRSF9 をリン酸化することで SRSF9 と  $\beta$ -catenin mRNA との結合を阻害する。

SRSF9 の SWQDLKD モチーフは mRNA との結合に重要である [52]。そのため、SRSF9 がリン酸化修飾を受けることで  $\beta$ -catenin のエクソン 8 との結合が変化するか検討した。5'-GGAUGGA-3' を含む  $\beta$ -catenin のエクソン 8 の配列にビオチンを付加した RNA プローブを合成し、*in vitro* RNA pull-down assay でこのプローブと結合する SRSF9 を検出した。野生型 SRSF9 ではこのプローブとの結合が検出されたが、変異型 SRSF9 との結合は検出されなかった (Figure 4-2 C)。よって、 $\beta$ -catenin のエクソン 8 は SRSF9 と結合し、さらに、Ser123 のアミノ酸側鎖が RNA との結合に重要であることが示唆された。次に、AMPK が SRSF9 をリン酸化することで  $\beta$ -catenin との結合に及ぼす影響について解析したところ、AMPK によって SRSF9 のリン酸化が上昇することで  $\beta$ -catenin RNA プローブとの結合量が有意に減少した (Figure 4-2 D)。以上の結果から、*in vitro* において SRSF9 配列内の SWQDLKD モチーフがリン酸化されることによって SRSF9 と  $\beta$ -catenin エクソン 8 との結合が阻害されることが示された。

**A**



**B**



**C**

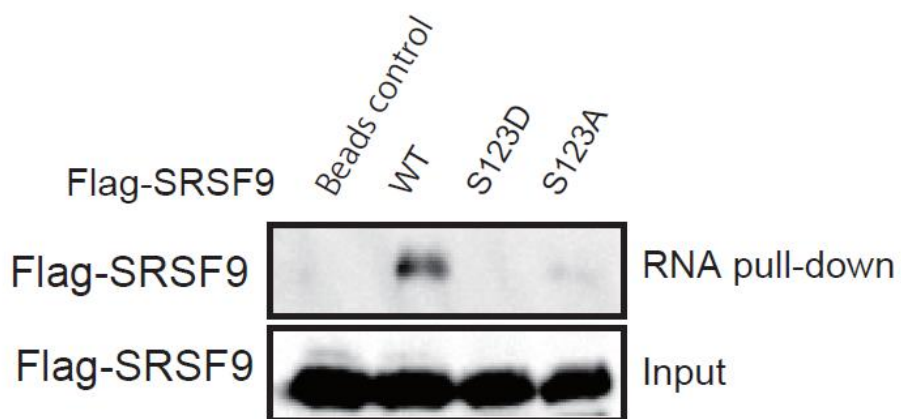


Figure 4-2 A-C. SRSF9 は  $\beta$ -catenin のエクソン 8 の 5'-GGAUGGA-3' と結合する。

(A)  $\beta$ -catenin のエクソン 8 に SRSF9 の結合配列があることが RBPmap のモチーフ検索結果から明らかとなった。。(B) Myc- $\beta$ -catenin と Flag-SRSF9 を HEK293T 細胞に強制発現した。トランスフェクション後、細胞を回収し、抗 Flag 抗体で免疫沈降したサンプルから RNA を抽出した。SRSF9 に結合した  $\beta$ -catenin mRNA 量を qPCR で解析した結果を示した。(C) HEK293T 細胞に野生型 Flag-SRSF9 または変異型 Flag-SRSF9 を強制発現し、ビオチン化 RNA プローブと反応させてアビジンビーズでプルダウンした。

**D**

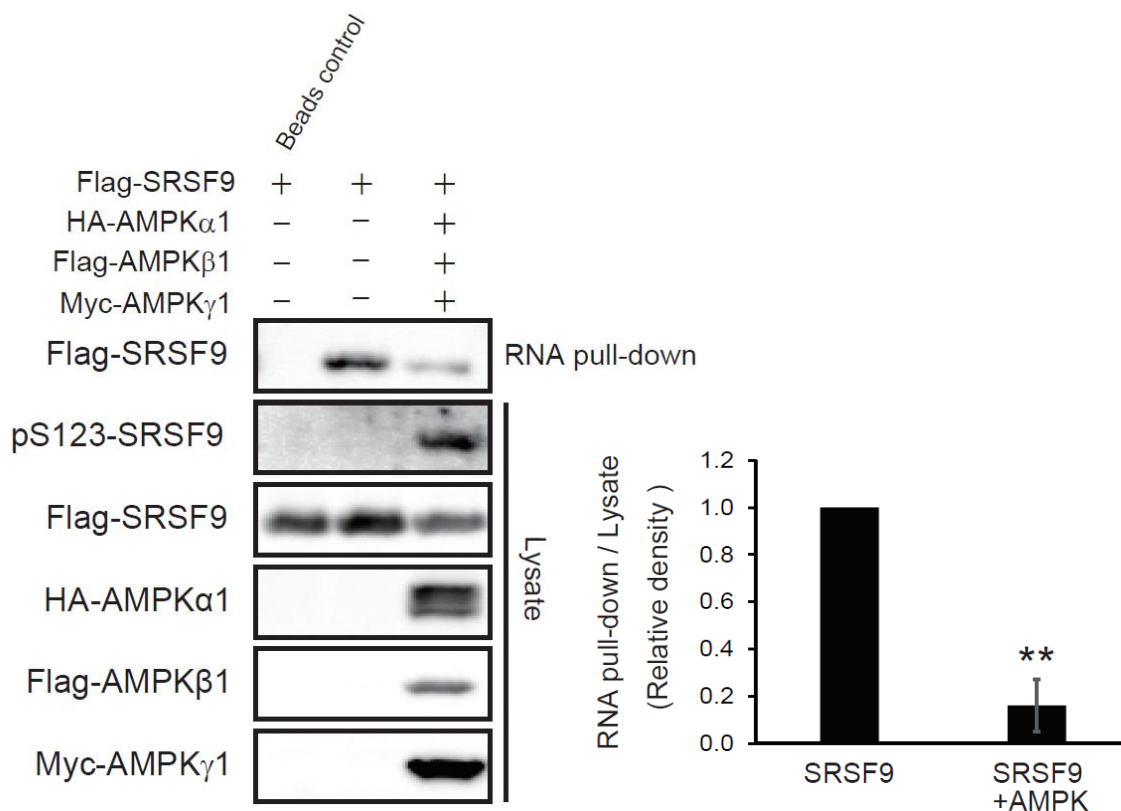


Figure 4-2 D. SRSF9 は  $\beta$ -catenin のエクソン 8 の 5'-GGAUGGA-3' と結合する。

(D) Myc-SRSF1 と AMPK の共発現ありとなしにおけるビオチン化 RNA プローブとの結合量を比較した。ウェスタンブロットの結果を左に示し、右に 3 回分の結果を imageJ で数値化しインプット SRSF9 に対する RNA プローブと結合し



た SRSF9 量の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは±標準偏差で示した (n=3, \*\*p<0.01)。

## 第三節 AMPK による SRSF9-mTORC1 結合変化

### 緒言

SRSF9 と SRSF1 は  $\beta$ -catenin mRNA と結合することで mTORC1 依存的な翻訳を活性化させることで  $\beta$ -catenin のタンパク質発現量を制御している [48]。ここで、SRSF1 は mTORC1 と結合し、さらに SWQDLKD モチーフ内の WQD を AAA に変異させることで SRSF1 と mTORC1 が結合できなくなり、mTORC1 による翻訳活性が低下することが報告されている [46, 68]。  $\beta$ -catenin のタンパク質発現量についても SRSF1 と SRSF9 配列内の SWQDLKD モチーフの変異によって減少することが示されているが [48]、SRSF9 と mTORC1 との結合については明らかとなっていない。

本章では、SRSF9 と mTORC1 の結合について解析し、さらに Ser123 の変異における SRSF9 と mTORC1 との結合についても解析を行った。

## 結果

・ SRSF9 は mTORC1 と結合するが変異によって SRSF9 と mTORC1 の結合は変化しない。

SRSF9 と mTORC1 の結合を共役免疫沈降法によって検出した結果、過剰に発現させた SRSF9 は mTORC1 と結合した (Figure 4-3)。さらに、S123D 変異体では mTORC1 との結合は変化しなかった (Figure 4-3)。よって、RNA との結合を阻害する S123D 変異体は mTORC1 との結合には影響しないことが示された。

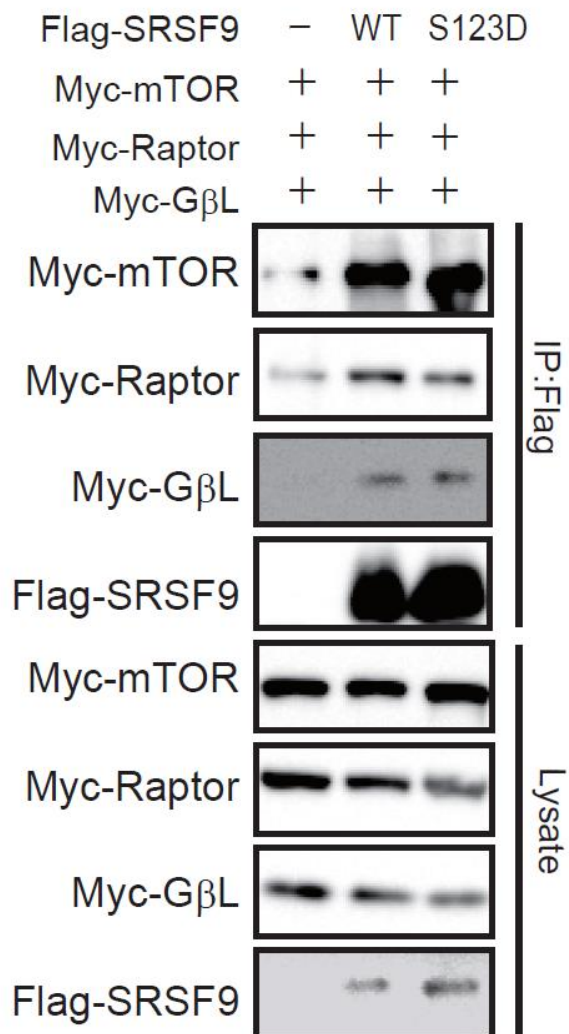


Figure 4-3. SRSF9 はmTORC1 と結合するが、S123D 変異体でも mTORC1 と結合できる。

野生型および S123D 変異型 Flag-SRSF9 と mTORC1 の構成因子発現プラスミドを HEK293T 細胞に強制発現し、抗 Flag 抗体で免疫沈降した。

## 第四節 SRSF9 を介した AMPK による 翻訳制御機構

### 緒言

AMPK の活性化剤は mTORC1 や Wnt シグナル経路を介して腫瘍細胞の増殖や細胞成長を阻害する [69]。例えば、AMPK の活性化剤であるメトホルミンは Wnt シグナル経路を介した細胞増殖と  $\beta$ -catenin 発現を阻害することが報告されている [41]。しかし、AMPK による  $\beta$ -catenin の発現抑制の詳細な分子機構については明らかとなっていない部分が多く残っている。

そのため、本節では AMPK による SRSF9 のリン酸化を介した  $\beta$ -catenin の発現制御機構について明らかにすることを目的とした。

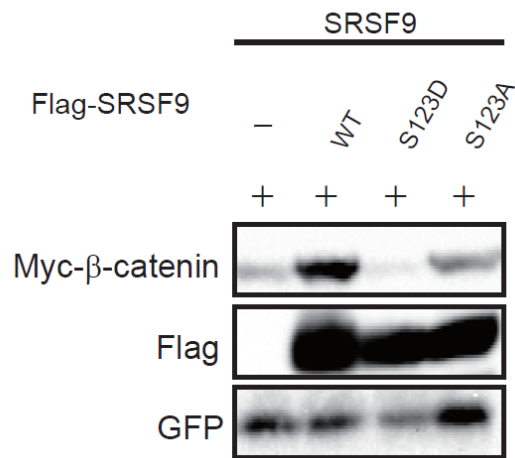
## 結果

・ AMPK は SRSF9 のリン酸化を介して  $\beta$ -catenin タンパク質発現を制御する。

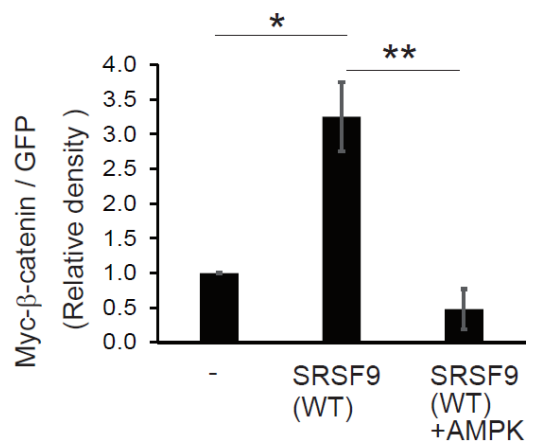
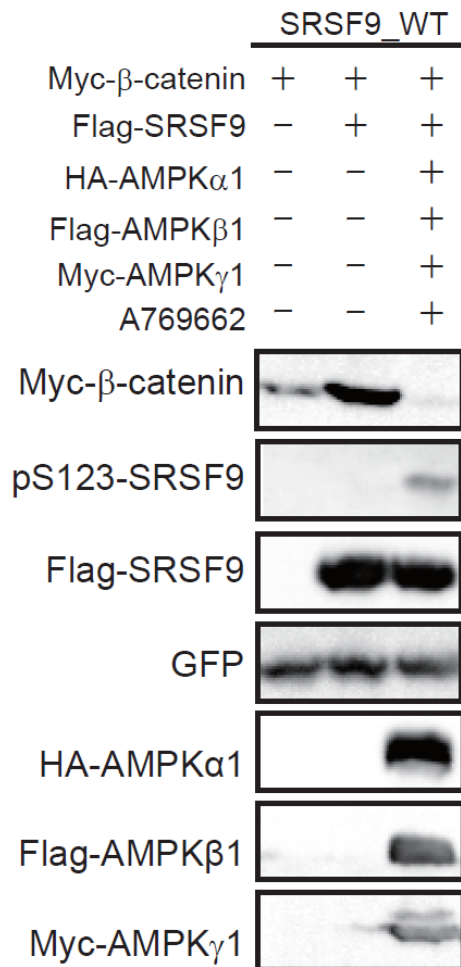
SRSF9 の過剰発現によって  $\beta$ -catenin mRNA との結合を介して、 $\beta$ -catenin のタンパク質発現量が上昇することが報告されている [48]。Figure 4-2 C から、Ser123 の変異によって SRSF9 は  $\beta$ -catenin mRNA と結合できなくなることが示されたことから、SRSF9 の Ser123 の変異による外因性の  $\beta$ -catenin のタンパク質発現量の変化について解析した。野生型 SRSF9 との共発現によって  $\beta$ -catenin の発現量は上昇したが、Ser123D と S123A のどちらの変異型 SRSF9 においては  $\beta$ -catenin 量は変化しなくなった (Figure 4-4 A)。さらに、AMPK が SRSF9 をリン酸化することによる  $\beta$ -catenin 発現量の変化について解析した結果、プロテアーゼ阻害剤である MG-132 を添加した場合において、Ser123 のリン酸化によって  $\beta$ -catenin 発現量は SRSF9 のみと比較して減少した。したがって、AMPK による SRSF9 を介した  $\beta$ -catenin 発現上昇の抑制はタンパク質分解によるものではないことが示された。さらに、非リン酸化変異体である S123A 変異型 SRSF9 と AMPK を共発現した場合においては  $\beta$ -catenin 発現量の変化が見られなくなった (Figure 4-4C)。

SRSF9 や AMPK を過剰に発現させた場合における  $\beta$ -catenin mRNA の発現量の変化を調べた結果、SRSF9 と AMPK の共発現ありとなしのどちらにおいても  $\beta$ -catenin mRNA 発現量は変化しなかった (Figure 4-4 D)。したがって、AMPK と SRSF9 は  $\beta$ -catenin mRNA 発現量には影響しないこと、さらに、SRSF9 のリン酸化を介して AMPK は  $\beta$ -catenin タンパク質の合成を抑制することが示唆された。

**A**



**B**



C

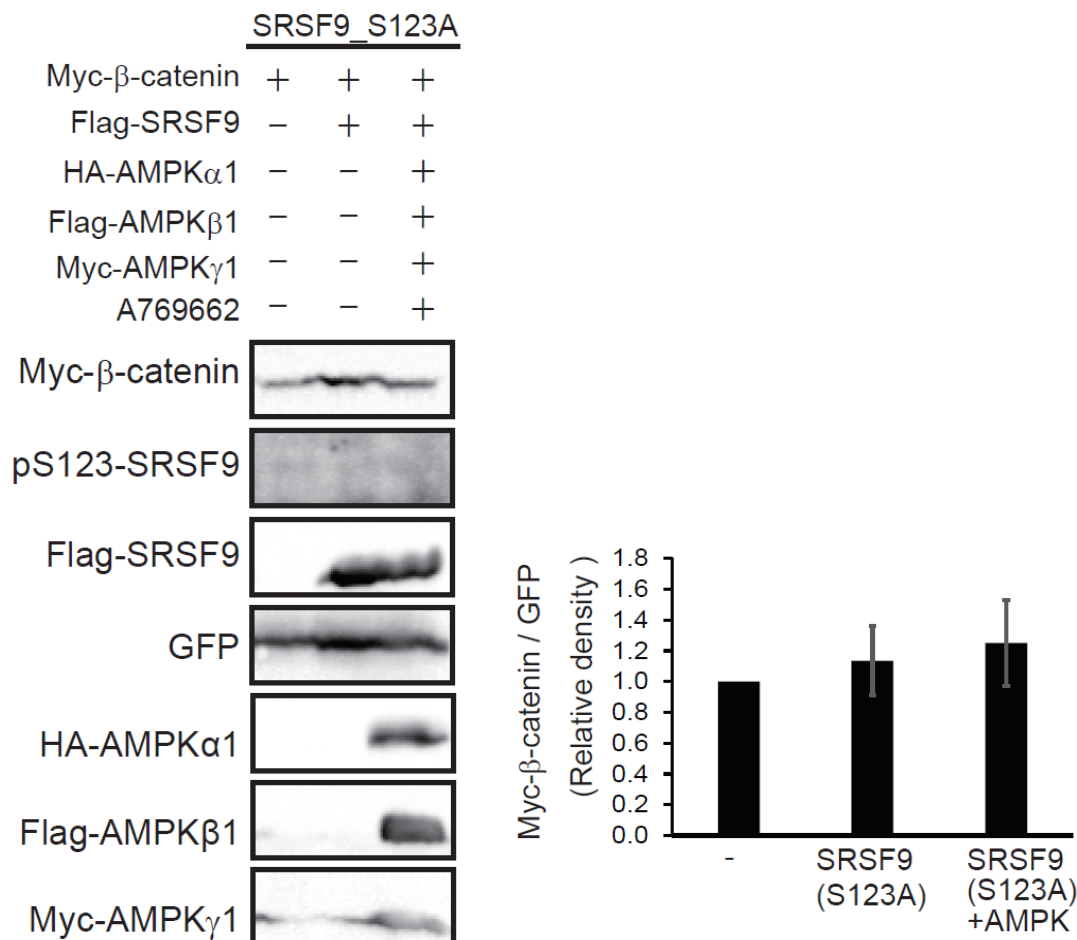


Figure 4-4 A-C. AMPK が SRSF9 をリン酸化することで Myc-β-catenin のタンパク質発現量は変化する。

(A) 野生型または変異型 Flag-SRSF9 を強制発現させて Myc-β-catenin タンパク質発現量を比較した。トランスフェクション効率を確認するために、GFP 発現プラスミドを共発現させた。

(B, C) 野生型 (B)または S123A (C) Flag-SRSF9 と AMPK の共発現ありとなしにおける Myc-β-catenin タンパク質発現量を比較した。トランスフェクション効率を確認するために、GFP 発現プラスミドを共発現させた。ウェスタンブロットの結果を左図に示し、右図に 3 回分の結果を image J で数値化 GFP に対する Myc-β-catenin 量の割合をグラフにしたものを示した。グラフはそれぞれ平均値を示し、エラーバーは±標準偏差で示した (n=3, \*p<0.05)。



**D**

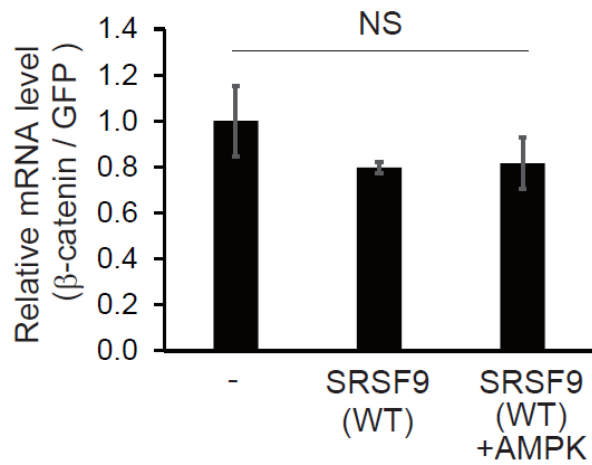


Figure 4-4 D. AMPK 及び SRSF9 は  $\beta$ -catenin mRNA 量には影響しない。

(D) Myc- $\beta$ -catenin と Flag-SRSF9, AMPK をそれぞれ HEK293T 細胞に共発現し、Total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、qPCR 法で  $\beta$ -catenin mRNA 量を測定した。グラフは GFP mRNA 量に対する  $\beta$ -catenin mRNA の割合の平均値を示し、エラーバーは $\pm$ 標準偏差で示した (n=3)。NS は有意な差がないことを示している。

## 第五節 考察

### ・本章のまとめ

本章の概略図を Figure 4-5 に示した。本章の実験結果から、第三章で AMPK の基質であると同定した SRSF1 と同じ SWQDLKD モチーフを持つ SRSF9 について、SRSF9 もまた AMPK の基質であり、AMPK は SRSF9 のこのモチーフ内にある Ser123 をリン酸化することを明らかにし、これによって  $\beta$ -catenin mRNA との結合が阻害された結果、 $\beta$ -catenin の翻訳が抑制されることが明らかとなった。

本節では、AMPK による SRSF9 タンパク質のリン酸化について、リン酸化 SRSF9 と RNA の結合についてなど考察する。

### ・リン酸化 SRSF9 と RNA の結合について

結晶構造解析より、SRSF1 の SWQDLKD モチーフが RNA と直接結合していることが示されている [52]。さらに、Ser133 の側鎖が分子内での水素結合を形成することが RNA 配列内にある GGA モチーフとの結合に重要であることも明らかとなっている [52]。SRSF1 と SRSF9 の SWQDLKD モチーフ周辺の配列はほぼ一致しているため (Figure 4-6)、SRSF1 の Ser133 と相同的である SRSF9 の Ser123 も SRSF1 と同様に分子内で水素結合していることが予想される。本章の第二節では疑似リン酸化変異体の S123D や非リン酸化変異体の S123A のような SRSF9 の Ser123 の変異体によって GGA モチーフをもつ RNA との結合能は減少した。したがって、Ser123 の側鎖は SWQDLKD モチーフ内での水素結合を形成し、RNA と結合するのに必要であることが考えられる。

SRSF9 の RS ドメインもまた重要なドメインであるが、RS ドメイン欠損変異体では SRSF9 過剰発現による  $\beta$ -catenin 発現量の上昇には影響しないことが報告されている [48]。そのため、SWQDLKD モチーフのリン酸化が SRSF9 と  $\beta$ -catenin との結合阻害を介する  $\beta$ -catenin 発現量低下に重要であることが明らかとなった。

### ・SRSF9 と mTORC1 の結合について

SRSF1 は mTORC1 と結合し、mTORC1 を活性化することでタンパク質の合成を亢進させることが報告されている [46]。さらに、SWQDLKD モチーフの変異、SWQDLKD から SAAALKD に変異させることで SRSF1 の mTORC1 との結合能が低下するため、このモチーフが SRSF1 と mTORC1 間の結合に重要であることが示されている [46]。

本章の第三節の結果から、SRSF9 もまた SRSF1 と同様に mTORC1 と結合することが明らかとなった。しかし、S123D 変異体においても野生型 SRSF9 と同様に mTORC1 と結合していたので、AMPK は SRSF9 と mTORC1 の結合には影

響せず、SRSF9 と  $\beta$ -catenin mRNA との結合を阻害することで  $\beta$ -catenin の合成を抑制したことが示唆される。しかしながら、SRSF9 と mTORC1 間の結合がどのように制御されるかについてはさらなる検討が必要である。

#### ・ AMPK による $\beta$ -catenin を介した抗腫瘍抑制効果について

AMPK 活性化剤であるメトホルミンの添加によって  $\beta$ -catenin の分解が促進され、 $\beta$ -catenin 発現量が低下することが報告されている [41]。さらに、本章の第四節の結果から、AMPK による SRSF9 のリン酸化は mRNA の転写は変えず、 $\beta$ -catenin mRNA の翻訳を抑制することが明らかとなった。よって、AMPK は様々な制御機構を介して  $\beta$ -catenin の蓄積を抑制していることが考えられる。

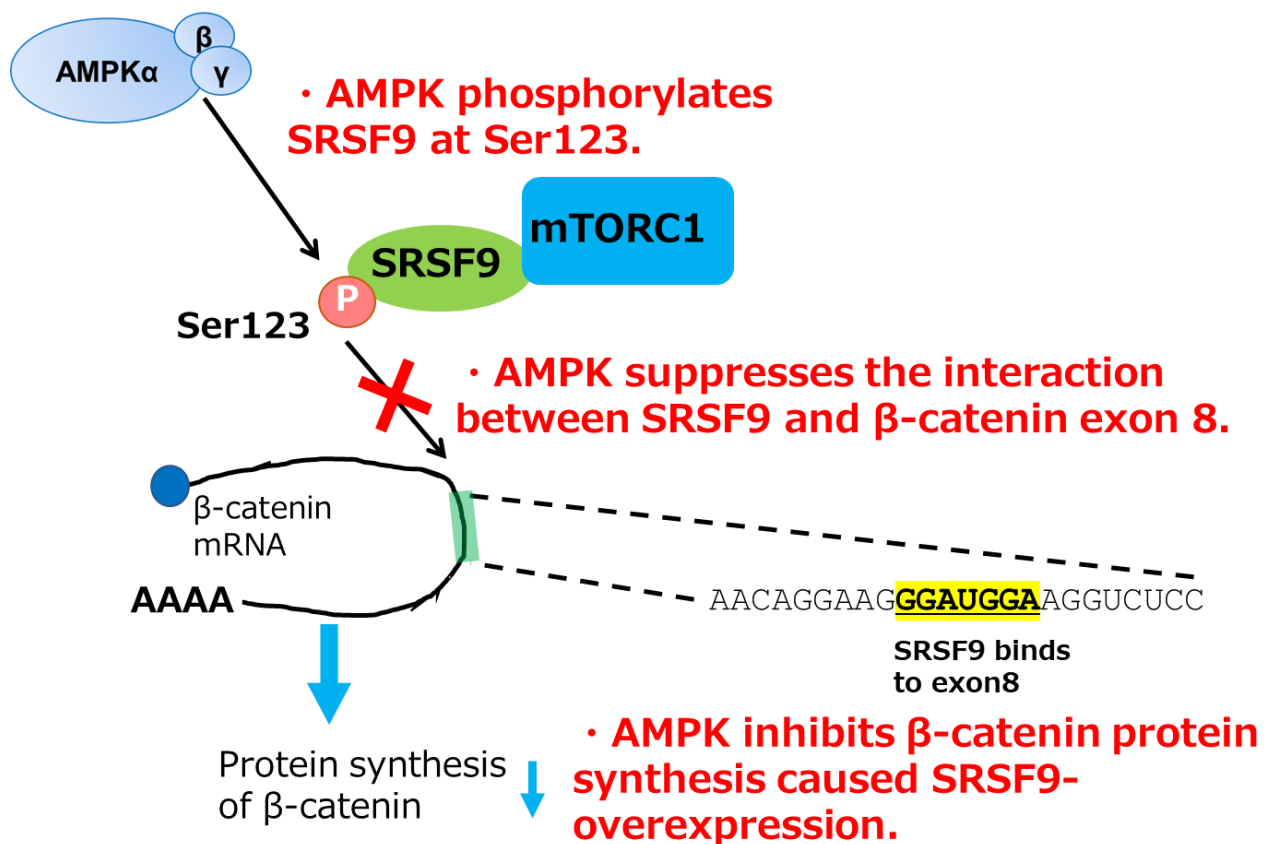


Figure4-5. AMPK はリン酸化によって SRSF9 と  $\beta$ -catenin mRNA の結合を阻害することで  $\beta$ -catenin の翻訳を制御する。

AMPK が SRSF9 の Ser123 をリン酸化することで  $\beta$ -catenin のエクソン 8 との結合が阻害される。SRSF9 は  $\beta$ -catenin と結合することで翻訳を制御しているため、リン酸化によってこれが阻害されることで  $\beta$ -catenin の翻訳が抑制される。

SRSF1 N**RVVVSGLPPSGSWQDLKD**HMREAG

SRSF9 F**RVLVSGLPPSGSWQDLKD**HMREAG

Figure 4-6. SRSF1 と SRSF9 の SWQDLKD 周辺アミノ酸配列のアライメント結果

赤太字は SRSF1 と SRSF9 で一致したアミノ酸を示している。

## 第五章 総括

AMPK は細胞の中でのエネルギーバランスを制御しているだけでなく、腫瘍細胞の増殖や運動性にも影響を及ぼしている。そのため、AMPK は代謝疾患に留まらない幅広い疾患に対する治療と予防に関わる重要な創薬標的分子である。本研究では、このような AMPK による新たな抗腫瘍抑制効果として、がん原遺伝子である SRSF1 と SRSF9 の機能抑制とその分子機構について明らかにした。本章では、AMPK によるスプライシング制御、AMPK による SRSF タンパク質と RNA 結合制御、SRSF1 と他のタンパク質との相互作用について今後の展望を考察する。

### 【AMPK によるスプライシング制御】

第三章では、AMPK が SRSF1 のリン酸化を介して選択的スプライシングを制御していることを示した。興味深いことに、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq と情報学的解析より、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて低栄養に応答して選択的スプライシングが変化する遺伝子が多数同定されている [70]。AMPK は細胞のエネルギー状態に応答して活性化し、シグナル経路を制御していることから、ヒトでも栄養状態によって選択的スプライシングが変化する事が考えられる。そのため、今後は AMPK の活性化剤や AMPK が活性化する生理学的条件によってどの遺伝子の選択的スプライシングが変動するかについて網羅的に解析することが必要である。これによって、栄養状態に応答して AMPK がスプライシングをも変化させることでエネルギー恒常性を維持するかを明らかにすることができる。

### 【AMPK による SRSF タンパク質と RNA 結合制御】

#### ・ SRSF1 によるエクソソーム含有 microRNA 量の制御について

第三章と第四章の実験結果から、AMPK による SRSF タンパク質のリン酸化によって SRSF タンパク質特異的に結合する RNA 配列と SRSF タンパク質との結合が阻害されることが明らかとなった。近年、エクソソームを介したがんの増殖、浸潤、転移などのがん悪性化メカニズムの解明に向けた研究が行なわれており、その一環として、がん細胞が膵臓がん由来細胞である PANC-1 細胞から分泌されるエクソソーム内 microRNA 含有量が SRSF1 との結合によって制御されていることが報告された [71]。興味深いことに、SRSF1 は microRNA 配列内において GGA 配列を含むモチーフと結合することが明らかとなっているため、SRSF1 は RRM2 を介して microRNA と結合することが考えられる。した

がって、AMPK が SRSF1 の RRM2 をリン酸化することによって microRNA との結合が変化し、エクソソーム内の microRNA 量が減少する可能性が考えられる。

### ・「RNA 病」の治療標的として

遺伝子疾患と関連する変異の約 15%は、RNA スプライシング制御異常との関連が指摘されている。スプライシング異常に起因する「RNA 病」に対して、低分子化合物による RNA スプライシング制御への介入による治療薬の創薬を目指した研究が行なわれている。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)は出生男児の 3500 人に 1 人の割合で発症し、最も頻度の高い重篤な遺伝性筋疾患である [72-74]。現在、DMD に対する有効な治療はない。筋細胞を保護するタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異によって停止コドンやアミノ酸読み取り枠のずれによる下流の停止コドンが生じることでナンセンス変異依存 mRNA 分解機構等によりジストロフィンタンパク質発現が低下し、筋萎縮が進行する。そこで、この停止コドンによる異常を回避するために人為的に停止コドンを含んだエクソンをスキップすれば、一部欠失したジストロフィンタンパク質を回復させることができると考えられた。このような治療に關与する低分子化合物として、Cdc2-like kinase (Clk)阻害剤である TG003 が最初に発見された [75]。さらに、他の Clk 阻害剤やスプライシング阻害剤などによって異常スプライシングが改善することも報告されている [76, 77]。上に挙げた異常スプライシングの改善には SRSF タンパク質の RS ドメインのリン酸化が關与することが過去に報告されている。一方で、本研究によって RNA との結合に直接關与する RRM のリン酸化によってスプライシングが変化することが明らかとなった。したがって、今後、AMPK 活性化剤による RNA との結合阻害が上に挙げたスプライシング異常が原因として引き起こされる遺伝子疾患の治療につながる可能性が考えられる。

### 【SRSF1 と結合するタンパク質との相互作用について】

本研究では、AMPK による SRSF タンパク質のリン酸化は RNA との結合能を制御することが示された。しかし、SRSF1 の RRM2 ドメインは RNA との結合だけでなく、タンパク質間相互作用にも重要で、他のタンパク質と結合を介して SRSF1 は細胞の機能を制御している [55]。

タンパク質翻訳後修飾の一つである small ubiquitin-like modifier (SUMO) 化のリガーゼである protein inhibitor of activated STAT-1 (PIAS1)と結合することでグローバルなタンパク質の SUMO 修飾に關与し、SRSF1 の RRM2 ドメインが PIAS1 との結合に重要であることが報告されている [78]。また本研究における

予備的検証実験により HEK293T 細胞に SRSF1 を共発現させることで SUMO1 修飾が増加し、AMPK 共発現あるいは SRSF1 の変異体によって低下していた。したがって、AMPK によるリン酸化が PIAS1 との結合に関与していると考えられる。

その他にも RRM2 を介した SRSF1 と他のタンパク質間との相互作用が報告されているため、結合とリン酸化による変化について検証することで AMPK のさらなる制御機構が明らかになると考えられる。

### 【最後に】

本研究から、栄養応答分子である AMPK は代謝経路を制御するだけでなく、転写後調節の一環であるスプライシングをも制御することが明らかとなり、AMPK はスプライシングを介した遺伝子発現調節にも重要であることが示された。さらに、AMPK による翻訳後修飾について、AMPK は mTORC1 の活性を制御するだけでなく、SRSF9 と特異的に結合する mRNA との結合をリン酸化によって制御し、標的 mRNA の翻訳を制御していることが示された。その他にも上に示したような AMPK による SRSF タンパク質の機能制御が考えられるため、本研究から得られた知見から検証を進めていくことで AMPK 活性化による疾患治療の分子機構を詳細に理解できることが期待される。



## 英文要旨

### Introduction

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine / threonine kinase that is activated by energy deficiency stress. AMPK phosphorylates substrates involved in catabolic processes or anabolic processes to maintain cellular energy homeostasis. AMPK exists as a heterotrimeric complex consisting of a catalytic subunit ( $\alpha$ -subunit) and two regulatory subunits ( $\beta$ -subunit and  $\gamma$ -subunit): the  $\beta$ -subunit, which has a glycogen-binding domain, and the  $\gamma$ -subunit, which binds to ATP, ADP, and AMP. Phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit at Thr172 in the activation loop of the kinase domain by the upstream kinases LKB1 and CaMKK $\beta$  is required for activation of AMPK. Furthermore, the binding of AMP/ADP to the  $\gamma$ -subunit changes the structure of the AMPK complex and protects Thr172 from dephosphorylation.

In recent years, it has become clear that AMPK has various functions other than energy metabolism regulation, including cell proliferation and cell polarity. In our laboratory, we have been searching for unidentified AMPK substrates to figure out the novel functions of AMPK. To identify the AMPK substrate, AMPK interacting proteins were purified by two-step pull-down via  $\beta$ -subunit that was fused to two different tag and identified them by LC-MS/MS and AMPK phosphorylation motif analysis. We identified Serine/Arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) and SRSF9 as candidates of the AMPK substrates.

SRSF1 and SRSF9 belong to the SR protein family and have been characterized as essential splicing factors required for pre-mRNA splicing. The 12 human SR proteins have a modular domain structure, with one or two RNA recognition motifs (RRMs) and a C-terminal RS domain comprising multiple Arg-Ser dipeptide repeats. The RRM2s recognize the specific sequence of pre-mRNA. Interestingly, it was found that the phosphorylation site by AMPK exists in RRM2 of SRSF1 and SRSF9. Thus, we analyzed whether AMPK phosphorylates SRSF1 and SRSF9 and this phosphorylation affects their function.

## **Summary 1 AMPK phosphorylates SRSF1 and SRSF9.**

We examined the amino acid sequence of SRSF1/9 to identify a potential AMPK phosphorylation site in SRSF1/9. The amino acid sequence surrounding Ser133 of SRSF1 and Ser123 of SRSF9 matched the consensus sequence of an AMPK phosphorylation motif. To examine whether AMPK phosphorylates SRSF1/9, we performed *in vitro* kinase assays using a polypeptide containing phosphorylation sites expected to be phosphorylated by AMPK. AMPK phosphorylated the SRSF1/9 wild-type polypeptide, whereas mutations of Ser133 of SRSF1 and Ser123 of SRSF9 to alanine abrogated phosphorylation by AMPK. Therefore, these results suggest that AMPK directly phosphorylates Ser133 of SRSF1 and Ser123 of SRSF9 *in vitro*. To confirm whether AMPK phosphorylates SRSF1/9 in cultured cells, we generated an anti-phospho-SRSF1/9 antibody. We transiently transfected HEK293T cells with SRSF1/9 and the AMPK. AMPK overexpression enhanced the phosphorylation in wild type SRSF1, whereas the phosphorylation was not detected in a Ser133/Ser123 to alanine mutants. These results suggest that AMPK phosphorylates exogenous SRSF1/9. Next, we examined whether AMPK phosphorylates endogenous SRSF1/9 in cultured cells. Compound C, an AMPK inhibitor, suppressed SRSF1/9 phosphorylation. These data suggest that AMPK also phosphorylates endogenous SRSF1/9.

## **Summary 2 AMPK regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1.**

### **2-1 AMPK suppresses the interaction of SRSF1 with GGA motif in RNA sequence via phosphorylation of SRSF1.**

In RRM2 of SRSF1, there is the SWQDLKD motif that directly binds to RNA, and Ser133 corresponds to “S” of SWQDLKD. Therefore, it was considered that the phosphorylation of Ser133 affects its binding to RNA. A previous study shown that RRM2 of SRSF1 directly interacts with 5'-GGA-3' motif. Thus, we investigated whether phosphorylation of SRSF1 affects the interaction between SRSF1 and the motif.

First, we confirmed that the 5'-biotnylated RNA probes containing GGA motif interacted with SRSF1, whereas a mutant probe did not interact with SRSF1. Therefore, it was confirmed that SRSF1 specifically binds to the motif.

We compared the binding of wild-type or SRSF1 mutants to the RNA probes. The interaction between SRSF1 and the RNA probes was reduced by both the S133D and S133A mutants. This result suggests that the side chain of Ser133 may be involved in the regulation of RNA binding. Thus, we next investigated whether AMPK-induced SRSF1 phosphorylation affects the RNA-binding ability of SRSF1. The amount of Myc-SRSF1 bound to the RNA probes was significantly reduced by co-expression of AMPK. These data suggest that AMPK suppresses the interaction of SRSF1 with GGA motif via phosphorylation of Ser133 *in vitro*.

## **2-2 AMPK inhibits SRSF1-mediated Ron exon 11 splicing.**

SRSF1 is overexpressed in various tumors, and it has been reported that altering the splicing pattern of the target genes produces translation products with different activities, which enhances tumor cell proliferation and invasion. SRSF1 is known to regulate alternative splicing of the pre-mRNA of Ron, a macrophage-stimulating protein (MSP) receptor. SRSF1 interacts with Ron pre-mRNA and promotes the production of  $\Delta$ Ron through the skipping of Ron exon 11, which enhances cell motility and invasion. To verify whether the AMPK activity is involved in SRSF1-mediated alternative splicing of Ron exon 11, we treated MCF7 cells with Compound C or A769662 to alter AMPK activity. We found that inhibition of AMPK by Compound C treatment promoted Ron exon 11 skipping, whereas AMPK activation by A769662 treatment decreased Ron exon 11 skipping. To confirm whether AMPK affects Ron splicing via SRSF1, we generated SRSF1-depleted MCF7 cells using shRNA. Treatment with A769662 in wild-type MCF7 cells suppressed Ron exon 11 skipping, and as expected, SRSF1 depletion also decreased exon 11 skipping in SRSF1-depleted MCF7 cells. However, A769662 treatment did not suppress Ron exon 11 skipping in SRSF1-depleted MCF7 cells. These results suggest that AMPK inhibits Ron exon 11 skipping via SRSF1.

## **2-3 AMPK suppresses the interaction with Ron via SRSF1 phosphorylation.**

As AMPK altered alternative splicing of Ron exon 11, we next focused on the interaction between SRSF1 and Ron mRNA. A recent study found that SRSF1 binds directly to exon 12, which leads to Ron exon 11 skipping and this interaction is abrogated by the mutation in the CGGAGGAAG sequence in exon 12. As this study, we also confirmed that SRSF1 binds to the Ron exon 12 probe containing CGGAGGAAG sequence *in vitro* and the interaction was decreased by its mutation. We confirmed whether the interaction with Ron is suppressed by AMPK-induced SRSF1 phosphorylation. The interaction with the probe was decreased by both S133D and S133A mutation. We next examined whether AMPK suppresses the interaction with Ron exon 12 via SRSF1 phosphorylation. AMPK-induced SRSF1 phosphorylation reduced the interaction with the probe.

Furthermore, to confirm whether phosphorylation of SRSF1 by AMPK reduced the binding to Ron mRNA in cultured cells, expression of the exogenous Ron mini-gene that binds to SRSF1 was measured by qPCR. We found that SRSF1 phosphorylation reduced the level of SRSF1-interacting Ron mRNA derived from the Ron mini-gene. These results suggest that AMPK inhibits the alternative pre-mRNA splicing of Ron by suppressing the interaction between SRSF1 and Ron pre-mRNA.

## **Summary 3 AMPK regulates $\beta$ -catenin by phosphorylation of SRSF9.**

### **3-1 AMPK suppresses the interaction between SRSF9 and $\beta$ -catenin mRNA.**

$\beta$ -catenin regulates cell proliferation by activating transcription of the target gene. However, abnormal accumulation of  $\beta$ -catenin protein in the cytoplasm or nucleus causes abnormal activation of transcription of the target gene, leading to tumorigenesis. So far, the degradation pathway of  $\beta$ -catenin degradation has been well studied. On the other hand, recent study has shown that that proto-oncogene SRSF9 promotes the synthesis of  $\beta$ -catenin via binding  $\beta$ -catenin mRNA and enhancing its translation in an mTOR-dependent manner. However, it remains unclear how the interaction between SRSF9 and

$\beta$ -catenin mRNA is regulated. Thus, in this study, we investigated whether SRSF9 phosphorylation by AMPK to change its binding to  $\beta$ -catenin.

SRSF9 has been found to bind to  $\beta$ -catenin mRNA; however, it is unclear which sequences of  $\beta$ -catenin's mRNA is required for the binding. We used the RBPmap bioinformatics program to identify the potential SRSF9-binding sequences at GGAUGGA on exon 8 in the human  $\beta$ -catenin mRNA. To confirm SRSF9's interaction with  $\beta$ -catenin mRNA through exon 8, we co-expressed SRSF9 and full-length human  $\beta$ -catenin mRNA in cells and measured SRSF9-binding  $\beta$ -catenin mRNA by qPCR. The mutation of potential sequence of exon 8 reduced SRSF9's interaction with  $\beta$ -catenin mRNA, suggesting that SRSF9 binds to  $\beta$ -catenin mRNA through the GGAUGGA sequence.

We next performed in vitro RNA-protein pull down assay with a 5'-biotinylated mRNA probe containing the GGAUGGA sequence ( $\beta$ -catenin exon 8 probe). The SRSF9 mutants S123D and S123A reduced the interaction with  $\beta$ -catenin exon 8 probe. We also examined whether Ser123 phosphorylation by AMPK reduces the interaction between SRSF9 and  $\beta$ -catenin mRNA. We found that phosphorylation of SRSF9 by co-expression of AMPK reduced the binding between SRSF9 and the probe. These data suggest that the phosphorylation of SRSF9 disrupts the interaction with  $\beta$ -catenin mRNA.

### **3-2 The S123D mutation does not affect the interaction between SRSF9 and mTORC1.**

Although it has been reported that overexpression of SRSF9 activates mTORC1-dependent  $\beta$ -catenin mRNA translation, the binding of SRSF9 to mTORC1 is unknown. Thus, we determine whether SRSF9 interacted with mTORC1. In a co-immunoprecipitation experiment, we found that overexpressed SRSF9 interacted with mTORC1. Interestingly, the S123D mutant still maintained with mTORC1. These results suggest that S123D mutant does not affect SRSF9's binding to mTORC1.

### **3-3 The S123D mutation does not affect the interaction between SRSF9 and mTORC1.**

The results of 3-1 suggest that AMPK-induced phosphorylation of SRSF9 Ser123 inhibits the interaction between SRSF9 and  $\beta$ -catenin mRNA. Because SRSF9's Ser123

mutation did not interact with  $\beta$ -catenin's exon 8, we investigated whether the overexpressing SRSF9 mutants affect the protein levels of exogenous  $\beta$ -catenin. As expected, the overexpression of wild-type SRSF9 increased the protein level of exogenous  $\beta$ -catenin, whereas S123D and S123 mutants did not. We also confirmed that AMPK-induced SRSF9 phosphorylation also failed to increase exogenous  $\beta$ -catenin protein levels. Moreover, the phosphor-defective S123A mutant of SRSF9 prevented the AMPK-induced suppression of protein production of exogenous  $\beta$ -catenin, suggesting that AMPK regulated the  $\beta$ -catenin protein expression via SRSF9 phosphorylation. We monitored  $\beta$ -catenin's mRNA expression levels in the cells overexpressing SRSF9 or AMPK to find AMPK-induced suppression of  $\beta$ -catenin protein level was not mediated by mRNA expression. These results showed that the amount of  $\beta$ -catenin protein was suppressed by AMPK without altering the mRNA expression level of  $\beta$ -catenin.

## **Discussion**

In this study, we identified SRSF1/9 as AMPK substrates. AMPK directly phosphorylated SRSF1 at Ser133 and SRSF9 at Ser123 in an RNA recognition motif. The phosphorylation by AMPK suppressed the interaction between SRSF1/9 and specific RNA sequences. AMPK inhibited the SRSF1-mediated alternative pre-mRNA splicing of Ron by suppressing its interaction with exon 12 of Ron pre-mRNA. Moreover, AMPK suppressed  $\beta$ -catenin protein synthesis caused by SRSF9 overexpression by suppressing the binding of SRSF9 to  $\beta$ -catenin mRNA.

RRM2 of SRSF1 contains SWQDLKD, a phylogenetically conserved amino acid sequence, and this motif directly interacts with RNA. The results of crystal structure analysis illustrated that SRSF1 binds to the GGA motif via the SWQDLKD motif of RRM2. In fact, we observed that the phosphorylation of SRSF1 at Ser133 inhibited its binding to RNA containing the motif. Moreover, crystal structure analysis further revealed that Ser133, Trp134, and Gln135 form an ideal surface for binding the GGA motif via confirmation of hydrogen bonding between Ser133 and Gln135. Therefore, it is suggested that the phosphorylation of Ser133 inhibits the interaction of SRSF1 with RNA by suppressing the formation of hydrogen bonds with Gln135. In fact, Ser133 mutations including both the S133A and S133D mutation decreased binding to the GGA motif.

These data also suggest that the Ser133 side chains forming hydrogen bonds with Gln135 is important for the interaction of SRSF1 with RNA. Since the amino acid sequence around SRSF9's SWQDLKD motif is almost identical to SRSF1's, it is speculated that the SRSF9's Ser123, which is homologous to SRSF1's Ser133, also makes an intermolecular hydrogen bond in the motif.

It has been reported that the AMPK activator not only improves diabetes by reducing blood glucose level, but also suppresses tumor growth. Although AMPK has been reported to suppress protein synthesis and tumor cell growth by phosphorylating mTORC1, analysis of other detailed mechanisms remains unclear. On the other hand, since overexpression of SRSF1 and SRSF9 has been observed in various tumor cells, these are identified as proto-oncogenes. SRSF1 overexpression is associated with cell motility and invasion via the promotion of Ron exon 11 skipping. In this study we found that AMPK inhibits the SRSF1-mediated production of the  $\Delta$ Ron isoform. It has been reported that  $\beta$ -catenin protein is abnormally accumulated by SRSF9 overexpression and it caused tumorigenesis. We suggest that AMPK inhibits production of  $\beta$ -catenin protein caused by SRSF9 overexpression. However, further investigation is necessary to clarify in the detail tumor suppressive effect of AMPK activation; whether  $\Delta$ Ron protein levels are changed by AMPK activation and cell proliferation is regulated by AMPK via reducing  $\beta$ -catenin protein levels. This study suggests a novel regulatory pathway in which AMPK suppresses the production of splicing isoform involved in tumor malignancy and accumulation of  $\beta$ -catenin. Therefore, SRSF1 and SRSF9 are expected to be new targets for tumor suppression by AMPK activators.

## 引用文献

- 1 Hardie, D. G., Ross, F. A. and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**, 251-262
- 2 Hardie, D. G. (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895-1908
- 3 Mihaylova, M. M. and Shaw, R. J. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* **13**, 1016-1023
- 4 Steinberg, G. R. and Kemp, B. E. (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev.* **89**, 1025-1078
- 5 Garcia, D. and Shaw, R. J. (2017) AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell.* **66**, 789-800
- 6 Herzig, S. and Shaw, R. J. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **19**, 121-135
- 7 Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol.* **2**, 28
- 8 Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* **13**, 2004-2008
- 9 Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A. and Cantley, L. C. (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 3329-3335
- 10 Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. and Witters, L. A. (2005) The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem.* **280**, 29060-29066



- 11 Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **2**, 9-19
- 12 Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. (2005) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* **2**, 21-33
- 13 Kim, J., Yang, G., Kim, Y. and Ha, J. (2016) AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med.* **48**, e224
- 14 Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. and Hardie, D. G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* **229**, 558-565
- 15 Scott, J. W., Ling, N., Issa, S. M., Dite, T. A., O'Brien, M. T., Chen, Z. P., Galic, S., Langendorf, C. G., Steinberg, G. R., Kemp, B. E. and Oakhill, J. S. (2014) Small molecule drug A-769662 and AMP synergistically activate naive AMPK independent of upstream kinase signaling. *Chem Biol.* **21**, 619-627
- 16 Rena, G., Hardie, D. G. and Pearson, E. R. (2017) The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* **60**, 1577-1585
- 17 Zisman, A., Peroni, O. D., Abel, E. D., Michael, M. D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B. B., Wojtaszewski, J. F., Hirshman, M. F., Virkamaki, A., Goodyear, L. J., Kahn, C. R. and Kahn, B. B. (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* **6**, 924-928
- 18 Chavez, J. A., Roach, W. G., Keller, S. R., Lane, W. S. and Lienhard, G. E. (2008) Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* **283**, 9187-9195

- 19 Li, X., Wang, L., Zhou, X. E., Ke, J., de Waal, P. W., Gu, X., Tan, M. H., Wang, D., Wu, D., Xu, H. E. and Melcher, K. (2015) Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen. *Cell Res.* **25**, 50-66
- 20 Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* **30**, 214-226
- 21 Nakano, A., Kato, H., Watanabe, T., Min, K. D., Yamazaki, S., Asano, Y., Seguchi, O., Higo, S., Shintani, Y., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Kaibuchi, K., Mochizuki, N., Kitakaze, M. and Takashima, S. (2010) AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* **12**, 583-590
- 22 Shepard, P. J. and Hertel, K. J. (2009) The SR protein family. *Genome Biol.* **10**, 242
- 23 Howard, J. M. and Sanford, J. R. (2015) The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* **6**, 93-110
- 24 Cáceres, J. F., Misteli, T., Sreaton, G. R., Spector, D. L. and Krainer, A. R. (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol.* **138**, 225-238
- 25 Mayeda, A., Sreaton, G. R., Chandler, S. D., Fu, X. D. and Krainer, A. R. (1999) Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol Cell Biol.* **19**, 1853-1863
- 26 Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R. and Shoemaker, D. D. (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science.* **302**, 2141-2144
- 27 Brett, D., Pospisil, H., Valcárcel, J., Reich, J. and Bork, P. (2002) Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet.* **30**, 29-30

- 28 Cartegni, L., Chew, S. L. and Krainer, A. R. (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* **3**, 285-298
- 29 Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., Wallace, S. E., Bean, L. J. H., Mirzaa, G. and Amemiya, A. (1993) *GeneReviews*.
- 30 Ranum, L. P. and Cooper, T. A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci.* **29**, 259-277
- 31 Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S. and Brook, J. D. (2002) Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet.* **11**, 805-814
- 32 Kouki, T., Takasu, N., Nakachi, A., Tamanaha, T., Komiya, I. and Tawata, M. (2005) Low-dose metformin improves hyperglycaemia related to myotonic dystrophy. *Diabet Med.* **22**, 346-347
- 33 Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J. F., Bénit, P., Rustin, P., Franc, S., Charpentier, G., Furling, D., Bassez, G., Nissan, X., Martinat, C., Peschanski, M. and Baghdoyan, S. (2015) In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol Ther Nucleic Acids.* **4**, e262
- 34 Valenta, T., Hausmann, G. and Basler, K. (2012) The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714-2736
- 35 Valkenburg, K. C., Graveel, C. R., Zylstra-Diegel, C. R., Zhong, Z. and Williams, B. O. (2011) Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* **3**, 2050-2079
- 36 Stamos, J. L. and Weis, W. I. (2013) The  $\beta$ -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**, a007898
- 37 Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. and Kikuchi, A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with

GSK-3 $\beta$  and beta-catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* **17**, 1371-1384

38 Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y. and Alkalay, I. (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* **16**, 1066-1076

39 Piao, S., Lee, S. H., Kim, H., Yum, S., Stamos, J. L., Xu, Y., Lee, S. J., Lee, J., Oh, S., Han, J. K., Park, B. J., Weis, W. I. and Ha, N. C. (2008) Direct inhibition of GSK3 $\beta$  by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One.* **3**, e4046

40 Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L. and Cadigan, K. M. (2012) How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf).* **204**, 74-109

41 Zou, Y. F., Xie, C. W., Yang, S. X. and Xiong, J. P. (2017) AMPK activators suppress breast cancer cell growth by inhibiting DVL3-facilitated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activity. *Mol Med Rep.* **15**, 899-907

42 Piñol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* **355**, 730-732

43 Cáceres, J. F., Sreaton, G. R. and Krainer, A. R. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **12**, 55-66

44 Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K. and Cáceres, J. F. (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev.* **18**, 755-768

45 Karni, R., Hippo, Y., Lowe, S. W. and Krainer, A. R. (2008) The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 15323-15327

46 Michlewski, G., Sanford, J. R. and Cáceres, J. F. (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell.* **30**, 179-189

- 47 Ben-Hur, V., Denichenko, P., Siegfried, Z., Maimon, A., Krainer, A., Davidson, B. and Karni, R. (2013) S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. *Cell Rep.* **3**, 103-115
- 48 Fu, Y., Huang, B., Shi, Z., Han, J., Wang, Y., Huangfu, J. and Wu, W. (2013) SRSF1 and SRSF9 RNA binding proteins promote Wnt signalling-mediated tumorigenesis by enhancing  $\beta$ -catenin biosynthesis. *EMBO Mol Med.* **5**, 737-750
- 49 Huang, Y., Yario, T. A. and Steitz, J. A. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 9666-9670
- 50 Sinha, R., Allemand, E., Zhang, Z., Karni, R., Myers, M. P. and Krainer, A. R. (2010) Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol.* **30**, 2762-2774
- 51 Serrano, P., Aubol, B. E., Keshwani, M. M., Forli, S., Ma, C. T., Dutta, S. K., Geralt, M., Wüthrich, K. and Adams, J. A. (2016) Directional Phosphorylation and Nuclear Transport of the Splicing Factor SRSF1 Is Regulated by an RNA Recognition Motif. *J Mol Biol.* **428**, 2430-2445
- 52 Cléry, A., Sinha, R., Anczuków, O., Corriero, A., Moursy, A., Daubner, G. M., Valcárcel, J., Krainer, A. R. and Allain, F. H. (2013) Isolated pseudo-RNA-recognition motifs of SR proteins can regulate splicing using a noncanonical mode of RNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, E2802-2811
- 53 Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P. M., Green, M. R., Riva, S. and Biamonti, G. (2005) Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Mol Cell.* **20**, 881-890
- 54 Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A. R. (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5803-5816
- 55 Das, S. and Krainer, A. R. (2014) Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res.* **12**, 1195-1204

- 56 Cáceres, J. F. and Krainer, A. R. (1993) Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.* **12**, 4715-4726
- 57 Zuo, P. and Manley, J. L. (1993) Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **12**, 4727-4737
- 58 Gui, J. F., Lane, W. S. and Fu, X. D. (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature.* **369**, 678-682
- 59 Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A. R. and Hagiwara, M. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem.* **274**, 11125-11131
- 60 Ma, C. T., Ghosh, G., Fu, X. D. and Adams, J. A. (2010) Mechanism of dephosphorylation of the SR protein ASF/SF2 by protein phosphatase 1. *J Mol Biol.* **403**, 386-404
- 61 Ngo, J. C., Giang, K., Chakrabarti, S., Ma, C. T., Huynh, N., Hagopian, J. C., Dorrestein, P. C., Fu, X. D., Adams, J. A. and Ghosh, G. (2008) A sliding docking interaction is essential for sequential and processive phosphorylation of an SR protein by SRPK1. *Mol Cell.* **29**, 563-576
- 62 Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K. A., Godowski, P. J. and Comoglio, P. M. (1994) RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *EMBO J.* **13**, 3524-3532
- 63 Collesi, C., Santoro, M. M., Gaudino, G. and Comoglio, P. M. (1996) A splicing variant of the RON transcript induces constitutive tyrosine kinase activity and an invasive phenotype. *Mol Cell Biol.* **16**, 5518-5526
- 64 Chou, C. C., Lee, K. H., Lai, I. L., Wang, D., Mo, X., Kulp, S. K., Shapiro, C. L. and Chen, C. S. (2014) AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis. *Cancer Res.* **74**, 4783-4795
- 65 Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D. and Krainer, A. R. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 185-193

- 66 Larsson, O., Morita, M., Topisirovic, I., Alain, T., Blouin, M. J., Pollak, M. and Sonenberg, N. (2012) Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 8977-8982
- 67 Paz, I., Kosti, I., Ares, M., Cline, M. and Mandel-Gutfreund, Y. (2014) RBPmap: a web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. **42**, W361-367
- 68 Sanford, J. R., Ellis, J. D., Cazalla, D. and Cáceres, J. F. (2005) Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 15042-15047
- 69 Yue, W., Yang, C. S., DiPaola, R. S. and Tan, X. L. (2014) Repurposing of metformin and aspirin by targeting AMPK-mTOR and inflammation for pancreatic cancer prevention and treatment. *Cancer Prev Res (Phila)*. **7**, 388-397
- 70 Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y. and Fujiwara, T. (2017) Genome-wide analysis of specific alterations in transcript structure and accumulation caused by nutrient deficiencies in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **91**, 741-753
- 71 Xu, Y. F., Xu, X., Gin, A., Nshimiyimana, J. D., Mooers, B. H. M., Caputi, M., Hannafon, B. N. and Ding, W. Q. (2020) SRSF1 regulates exosome microRNA enrichment in human cancer cells. *Cell Commun Signal*. **18**, 130
- 72 Duchenne. (1867) The Pathology of Paralysis with Muscular Degeneration (Paralysie Myosclerotique), or Paralysis with Apparent Hypertrophy. *Br Med J*. **2**, 541-542
- 73 Zellweger, H. and Antonik, A. (1975) Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. **55**, 30-34
- 74 Hoffman, E. P., Brown, R. H. and Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. **51**, 919-928
- 75 Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M. V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A.

R., Suzuki, M. and Hagiwara, M. (2004) Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem.* **279**, 24246-24254

76 Yoshida, M., Kataoka, N., Miyauchi, K., Ohe, K., Iida, K., Yoshida, S., Nojima, T., Okuno, Y., Onogi, H., Usui, T., Takeuchi, A., Hosoya, T., Suzuki, T. and Hagiwara, M. (2015) Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, 2764-2769

77 Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2007) Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol.* **3**, 576-583

78 Pelisch, F., Gerez, J., Druker, J., Schor, I. E., Muñoz, M. J., Risso, G., Petrillo, E., Westman, B. J., Lamond, A. I., Arzt, E. and Srebrow, A. (2010) The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 16119-16124



## 原著論文

1. AMP-activated protein kinase regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1.

Eri Matsumoto, Kaho Akiyama, Takuya Saito, Yu Matsumoto, Ken-Ichi Kobayashi, Jun Inoue, Yuji Yamamoto, Tsukasa Suzuki

*Biochemical Journal* **477** 2237–2248 (2020)

2. AMP-activated protein kinase regulates  $\beta$ -catenin protein synthesis by phosphorylating serine/arginine-rich splicing factor 9

Eri Matsumoto, Yu Matsumoto, Jun Inoue, Yuji Yamamoto, Tsukasa Suzuki

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **534** 347-352 (2021)

## 謝辞

本研究は平成30年4月1日から令和2年3月20日まで東京農業大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻 栄養生化学研究室にて行われたものです。

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、直接ご指導、ご鞭撻を受け賜りました当研究室の山本 祐司教授、井上 順教授、鈴木 司助教、松本 雄宇助教、そしてノートルダム清心女子大学の小林 謙一教授に心から御礼申し上げます。