

- Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., & Takata, M. (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 1138–1146.
- 11) Langevin, F., Crossan, G.P., Rosado, I.V., Arends, M.J., & Patel, K.J. (2011) *Nature*, 475, 53–58.
- 12) Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltout, M.E., D'souza, S., Woodruff, R.V., & Walker, G.C. (2009) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73, 134–154.
- 13) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., & Hanaoka, F. (1999) *Nature*, 399, 700–704.
- 14) Parris, C.N. & Seidman, M.M. (1992) *Gene*, 117, 1–5.
- 15) Powell, S.N. & Kachnic, L.A. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 9731–9732.

小田 司

(群馬大学生体調節研究所遺伝子情報分野)

Regulation of the DNA-replication stress-response pathways by heat shock protein 90 (HSP90)

Tsukasa Oda (Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8512, Japan)

スプライソソームのスプライシング以外の機能

1. はじめに

真核生物において、DNAから転写されたばかりの mRNA は未成熟の状態であり、このような未成熟 mRNA (precursor mRNA : pre-mRNA) は、5'末端のキャッピング、3'末端のポリ A 化、スプライシングによるイントロンの除去などの転写後修飾を受け成熟型となり、細胞質へと輸送され、翻訳の鋳型となる¹⁻³⁾。現在までに、転写や転写後修飾機構に関しては数多くの研究がなされており、それぞれの機構の詳細な分子メカニズムも解明されてきた。さらに、近年、転写と転写後修飾が共役することで転写後修飾が効率的に行なわれるという事実が明らかとなり、現在では、mRNA の転写を行なう RNA ポリメラーゼ II に様々な転写後修飾因子が結合し、転写後修飾が協調的に行なわれる mRNA ファクトリーという概念が一般化している⁴⁾(図 1)。加えて、最近の研究から、転写が転写後修飾に与える影響だけでなく、転写後修飾因子同士が正確な遺伝子発現を行なうために協調していることも明らかになってきた。本稿では、そのような例としてスプライシング関連因子が、スプライシング以外の機能として 3'末端

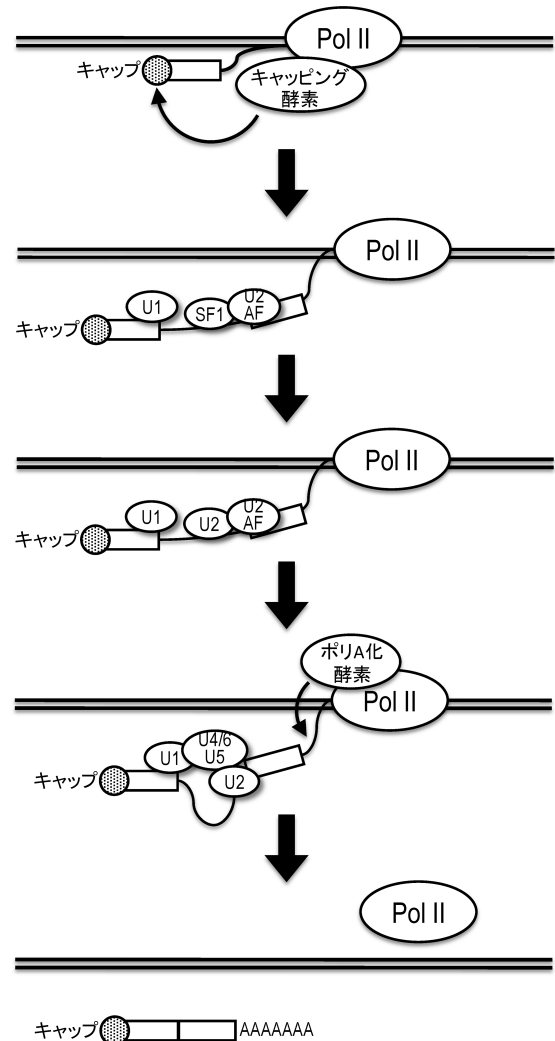


図 1 mRNA の転写後修飾

転写された mRNA は、5'末端のキャッピング、スプライシングによるイントロンの除去、3'末端のポリ A 化を受け成熟型となり、核外輸送される。長方形はエクソン、実線はイントロン、二重線は DNA を表す。

のプロセッシングや mRNA の核外輸送をも制御しているという最近の報告に焦点を当て、その分子メカニズムなどを概説したい。

2. mRNA 転写後修飾

転写されたばかりの pre-mRNA は、遺伝情報を持つエクソンと、遺伝情報を持たないイントロンが交互に並んだ構造をしており、正確な遺伝子発現のためにはスプライシングによってイントロンが取り除かれ、エクソン同士が繋ぎあわさる必要がある。スプライシング反応の中心的な役

割を果たすのは、スプライソソームと呼ばれる高分子複合体であり、その構成因子はU1, U2, U4, U5, U6核内低分子リボヌクレオタンパク質 (small nuclear ribonucleoprotein: snRNP) という五つのサブコンプレックスである。これらの snRNP は、snRNA と呼ばれる RNA 分子に、それぞれの snRNP 特異的タンパク質が結合した構造をしており、snRNA が pre-mRNA のスプライシング部位周辺配列と RNA-RNA 結合を形成することにより、正確なスプライシング部位の認識を行なっている³⁾。

スプライシング反応は、U1 snRNP, U2AF, SF1 がそれぞれ、イントロンの 5'末端 (5'スプライス部位)、イントロンの 3'末端 (3'スプライス部位)、3'末端から 20~40 スクレオチド上流のブランチ部位に結合するところから始まる (図 1)。その後、U2 snRNP が SF1 と入れ替わりブランチ部位に結合し、さらに、U4/U6・U5 snRNP が結合する。この後、構造変換を経ることにより、活性型スプライソソームとなり、スプライシング反応が行なわれる。スプライシングの他、5'末端のキャッピング、3'末端のポリ A 鎖付加を受けた成熟型 mRNA は核外に輸送され、翻訳の鋳型となる。

3. U1 snRNP は pre-mRNA を異常なポリ A 化から保護する

上述のように、スプライソソームは五つの snRNP から成っており、それぞれが 1:1 の割合で会合することにより形成されている。しかしながら、ヒトにおいては U1 snRNP は他の snRNP と比較して過剰に存在している⁵⁾。筆者らは、U1 snRNP にはスプライシング以外の機能があり、そのためスプライシングに必要な量より多くの U1 snRNP が存在する必要があるのではないかと考え、U1 snRNP の機能阻害がトランスクリプトームに与える影響を観察することとした⁶⁾。

先に述べたように、U1 snRNP は、U1 snRNA と pre-mRNA が RNA-RNA 結合を作ることによってスプライシング部位を認識している。そこで、U1 snRNA の pre-mRNA 認識配列に対するアンチセンス・モルフォリノオリゴ (U1 AMO) を用いて、RNA-RNA 結合を阻害することにより、その機能阻害を行なった。また、トランスクリプトーム解析には、タイリングアレイを用いた。通常のマикроアレイはエキソン部分にのみプローブが設計されているが、タイリングアレイは、ゲノム上の全ての領域にプローブが設計されているため、スプライシング異常によって最も大きな影響を受けると予想されるイントロン部分に関する情報

も得ることができる。さらに、観察された変化が、スプライシング阻害によるものか、U1 snRNP の機能阻害特異的なものであるかを区別するために、U2 snRNA に対するアンチセンスオリゴ (U2 AMO) と、スプライソソームに結合してスプライシングを阻害する化合物であるスプライソスタチン A (SSA) をコントロールとして用いた^{6,7)}。

U1 AMO, U2 AMO, ならびに SSA 処理細胞においては、予想通りスプライシングが阻害され、イントロン領域が蓄積している遺伝子が多数観察されたが、U1 AMO 処理細胞においては、遺伝子の 5'側のみが蓄積するという興味深い現象が、多くの遺伝子において観察された。この結果は、U1 snRNP の阻害により転写が早期終了してしまい、そのため遺伝子の 5'側のみが蓄積していると解釈出来る。そこで、3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により、転写終結点を決定したところ、転写は遺伝子の途中で終了しており、さらに驚くべきことに早期に転写終結した mRNA は、その 3'末端においてポリ A 鎖が付加されていた。先に述べたように、通常は遺伝子の 3'末端においてポリ A 鎖の付加が行なわれるが、U1 snRNP 阻害細胞中では、転写が終結していないにもかかわらず、遺伝子の途中においてポリ A 鎖付加が起こることが明らかとなった。一方、この現象は SSA 処理や U2 snRNP の阻害では観察されなかったことから、U1 snRNP 阻害特異的なものだと考えられる。

次に、この異常なポリ A 化が、3'末端で起こる正常なポリ A 化と同一のメカニズムによるものかどうかを検討した。まず、この異常なポリ A 化を受けた部位の周辺領域を調べたところ、3'末端の正常なポリ A 化部位と同様に、ポリ A 化部位の 10~30 スクレオチド上流に AAUAAA というポリ A 化シグナルが存在していた。次に、この異常なポリ A 化シグナルを含むミニ遺伝子を作成し、そのポリ A 化シグナルに変異を導入すると、U1 snRNP 阻害による異常なポリ A 化は観察されなくなった。すなわち、本来ならば遺伝子の 3'末端のみで機能するポリ A 化酵素が、U1 snRNP を阻害することにより遺伝子の途中に存在するポリ A 化シグナルを認識してしまい、異常なポリ A 化を行なっていると考えられる。言い換えれば、U1 snRNP は pre-mRNA を異常なポリ A 化から保護しているのである。

次に、U1 snRNP が pre-mRNA を異常ポリ A 化から保護するメカニズムを明らかにするために、上述のミニ遺伝子の 5'スプライス部位に変異を導入し、U1 snRNP と pre-mRNA との結合を阻害した。すると、U1 AMO 処理によ

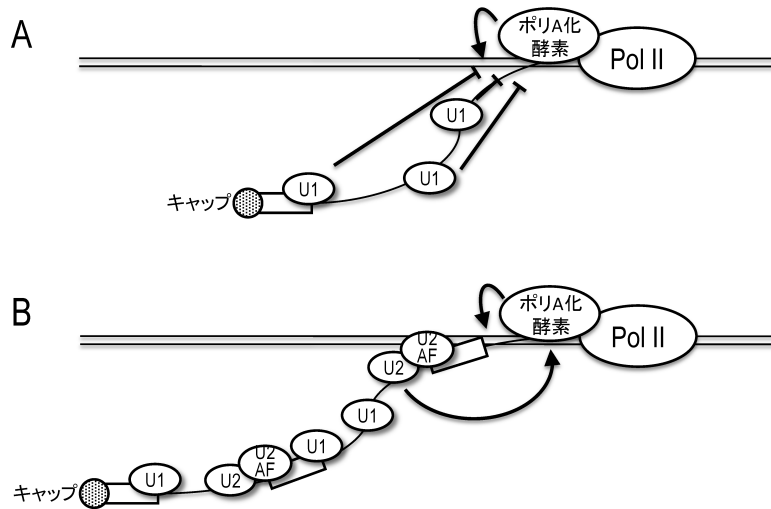


図2 スプライシング因子とポリ A 化

(A) U1 snRNP は、5'スプライシング部位やそれ以外の様々な部位に結合することにより、mRNA を転写途中での異常なポリ A 化から保護している。
(B) U2 snRNP はイントロンに結合することにより、スプライシングのみならず、3'末端の正常なポリ A 化を促進する。

る U1 snRNP の阻害なしに異常なポリ A 化が観察された。すなわち、U1 snRNP が 5'スプライス部位に結合することは、スプライシングのみならず、pre-mRNA を異常なポリ A 化から保護する機能にも必要であると考えられる。さらに、5'スプライス部位の変異に加え、U1 AMO 処理を行なうことにより U1 snRNP の結合を完全に阻害すると、より多くのポリ A 化が観察された。この結果は、U1 snRNP はスプライシングに必要な 5'スプライス部位のみならず、それ以外の 5'スプライス部位と類似した配列にも結合することにより、pre-mRNA 全体を異常なポリ A 化から保護していると解釈出来る (図 2A)。

ヒトのような高等真核生物は、エキソンと比較して非常に長いイントロンを持っており、5'スプライス部位に結合している U1 snRNP だけではその長いイントロン全体を異常なポリ A 化から保護するには不十分なのであろう。そのため、U1 snRNP は、5'スプライス部位以外のイントロン中の様々な領域に結合する必要がある。それ故、スプライシングに用いられるよりも多くの U1 snRNP が必要であり、このことが U1 snRNP が他の snRNP と比較して過剰に存在している理由だと考えられる。

4. U2 snRNP は mRNA の 3'末端修飾を促進する

上に述べたように、U1 snRNP は pre-mRNA を異常なポリ A 化から保護する機能があるが、U2 snRNP は、逆にポ

リ A 化を促進する働きがあることが知られている⁸⁾(図 2B)。U2 snRNP は pre-mRNA のブランチ部位に結合することにより、スプライシング反応を行なっているが、このブランチ部位に変異を導入することで U2 snRNP と pre-mRNA の結合を阻害すると、スプライシングの阻害のみならず、ポリ A 化の阻害も観察される。また、U2 snRNA の pre-mRNA 認識配列を分解することで U2 snRNP の機能を阻害した場合にも、スプライシングならびにポリ A 化の阻害が引き起こされる。これらの結果から U2 snRNP はスプライシング以外の機能として、ポリ A 化を促進する機能も持つと考えられる。

U2 snRNP はポリ A 化酵素である CPSF と結合することなどから、イントロンを持つ pre-mRNA と結合した U2 snRNP は、ポリ A 化酵素のリクルートや、ポリ A 化酵素と pre-mRNA の結合の安定化に貢献し、mRNA のポリ A 化を正に制御しているのであろう。また、最も下流のイントロンは、3'末端のプロセシングが終了した後にスプライシングを受けるとい報告もあり⁹⁾、効率的なポリ A 化のためには U2 snRNP が pre-mRNA と結合していることが必要なのかもしれない。

さらに、U2 snRNA は通常のポリ A 鎖を持つ mRNA の 3'末端修飾だけでなく、3'末端にポリ A 鎖の代わりにヘアピン様の構造を持つヒストン mRNA の 3'末端修飾も促進することが報告されている¹⁰⁾。上述のように、U2 snRNP

はイントロンに結合することにより mRNA の 3'末端修飾を促進するが、多くのヒストン mRNA はイントロンを持たない。しかしながら、多くのヒストン mRNA において保存されている 7 塩基の共通配列をもち、この 7 塩基に U2 snRNP が結合し、3'末端修飾を促進する。この 7 塩基はブランチ部位とは相同性がないこと、また、その結合には U2 snRNA は必要ではないことから、U2 snRNP の構成タンパク質が直接その配列に結合していると考えられる。先に述べたように、ヒストン mRNA の 3'末端修飾は通常の mRNA とは異なりポリ A 化を受けることはないが、その修飾には通常の mRNA と同様に CPSF が必須であることが知られている¹¹⁾。したがって、結合様式は違うものの、U2 snRNP はヒストン mRNA にも結合し、CPSF を介して、ヒストン mRNA の 3'末端修飾を促進していると考えられる。

5. スプライシング因子は pre-mRNA の核内係留に関わる

最近の研究から、スプライシング因子は pre-mRNA の核内係留にも関わっていることが明らかとなった。スプライシング機構に異常が起き、未成熟な pre-mRNA が核外に輸送され、翻訳されると、異常なタンパク質が産生されてしまう。そこで、細胞はこのような異常タンパク質の産生を防ぐためにスプライシングを受けていない pre-mRNA を核内に留めておく機構を持つ¹²⁻¹⁴⁾。最近、竹村らは新たな pre-mRNA の核内係留因子としてスプライシング因子である U1 snRNP と U2AF65 を同定した¹⁵⁾。U1 snRNP や U2AF65 は、pre-mRNA の核内係留に関わるだけでなく、イントロンを持たない mRNA に人為的に結合させた場合でも mRNA の核内係留を促進したため、U1 snRNP と U2AF65 はスプライシング非依存的に mRNA を核内係留する活性を持つと考えられる。これらの因子がどのような分子メカニズムで mRNA を核内に係留しているかは明らかになっていないが、スプライシング因子の結合が、正しくスプライシングを受けていない mRNA を選別する一種の品質管理機構として働くというのは、非常に合理的なシステムであるといえる。

6. おわりに

本稿で紹介したように、いくつかのスプライソソームの構成因子は、他の転写後修飾を制御するというスプライシング以外の機能を持つ。これらの機能は、転写や転写後修飾、核外輸送のそれぞれのステップが互いに監視しあい、

遺伝子発現の正確性を保つために、正しいプロセッシングを受けた mRNA のみを翻訳するというメカニズムの一翼を担っているのだろう。今後の研究から、さらなる転写後修飾間の相互作用が明らかとなり、高等真核生物の持つ巧妙な遺伝子発現機構の理解が深まることが期待される。

謝辞

本稿で紹介した異常ポリ A 化の研究は、米国ペンシルベニア大学の Gideon Dreyfuss 教授のもとで行なったものです。関係者の皆様に感謝致します。

- 1) Gu, M. & Lima, C.D. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 99-106.
- 2) Proudfoot, N.J. (2011) *Genes Dev.*, **25**, 1770-1782.
- 3) Wahl, M.C., Will, C.L., & Luhrmann, R. (2009) *Cell*, **136**, 701-718.
- 4) Hagiwara, M. & Nojima, T. (2007) *J. Biochem.*, **142**, 11-15.
- 5) Baserga, S.J. & Steitz, J.A. (1993) in *The RNA World* (Gesteland, R.F. & Atkins, J.F. eds.), pp. 359-381, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 6) Kaida, D., Berg, M.G., Younis, I., Kasim, M., Singh, L.N., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2010) *Nature*, **468**, 664-668.
- 7) Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., & Yoshida, M. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 576-583.
- 8) Kyburz, A., Friedlein, A., Langen, H., & Keller, W. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 195-205.
- 9) Bird, G., Fong, N., Gatlin, J.C., Farabaugh, S., & Bentley, D.L. (2005) *Mol. Cell*, **20**, 747-758.
- 10) Friend, K., Lovejoy, A.F., & Steitz, J.A. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 240-252.
- 11) Marzluff, W.F. & Duronio, R.J. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 692-699.
- 12) Dziembowski, A., Ventura, A.P., Rutz, B., Caspary, F., Faux, C., Halgand, F., Laprevote, O., & Seraphin, B. (2004) *EMBO J.*, **23**, 4847-4856.
- 13) Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., & Nehrbass, U. (2004) *Cell*, **116**, 63-73.
- 14) Rutz, B. & Seraphin, B. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1873-1886.
- 15) Takemura, R., Takeiwa, T., Taniguchi, I., McCloskey, A., & Ohno, M. (2011) *Genes Cells*, **16**, 1035-1049.

甲斐田 大輔

(富山大学 先端ライフサイエンス拠点)

Extra-splicing functions of spliceosome
Daisuke Kaida (Frontier Research Core for Life Sciences,
University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama
930-0194, Japan)