

- 7) 中山和久, 申 惠媛 (2008) 蛋白質 核酸 酵素, 53, 2058-2064.
- 8) Lee, M.C.S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005) *Cell*, 122, 605-617.
- 9) Krauss, M., Jia, J.Y., Roux, A., Beck, R., Wieland, F.T., De Camilli, P., & Haucke, V. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 27717-27723.
- 10) Shin, H.-W., Kobayashi, H., Kitamura, M., Waguri, S., Sukanuma, T., Uchiyama, Y., & Nakayama, K. (2005) *J. Cell Sci.*, 118, 4039-4048.
- 11) Burd, C.G., Strohlic, T.I., & Gangi Setty, S.R. (2004) *Trends Cell Biol.*, 14, 687-694.
- 12) Nishimoto-Morita, K., Shin, H.-W., Mitsushashi, H., Kitamura, M., Zhang, Q., Johannes, L., & Nakayama, K. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 10583-10592.
- 13) Man, Z., Kondo, Y., Koga, H., Umino, H., Nakayama, K., & Shin, H.-W. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 11569-11578.
- 14) Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P.A., Rittinger, K., Gambelin, S.J., & Smerdon, S.J. (2001) *Nature*, 411, 215-219.
- 15) McMahon, H.T. & Gallop, J.L. (2005) *Nature*, 438, 590-596.
- 16) Qualmann, B., Koch, D., & Kessels, M.M. (2011) *EMBO J.*, 30, 3501-3515.
- 17) Suetsugu, S., Toyooka, K., & Senju, Y. (2010) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21, 340-349.
- 18) Zhu, G., Chen, J., Liu, J., Bunzelle, J.S., Huang, B., Wakeham, N., Terzyan, S., Li, X., Rao, Z., Li, G., & Zhang, X.C. (2007) *EMBO J.*, 26, 3484-3493.
- 19) van Weering, J.R., Verkade, P., & Cullen, P.J. (2010) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21, 371-380.
- 20) Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B., & Echard, A. (2010) *Nat. Cell Biol.*, 12, 645-654.
- 21) Shin, H.-W., Takatsu, H., & Nakayama, K. (2012) *Membranes*, 2, 118-133.

申 惠媛^{1,2}, 満 智秋², 中山 和久²

(¹ 京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット,

² 大学院・薬学研究科)

Roles of small GTPases and BAR domain proteins in post-Golgi membrane traffic

Hye-Won Shin^{1,2}, Zhiqiu Man² and Kazuhisa Nakayama²

¹Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists and

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

RNA 品質管理における停滞リボソーム解離複合体の普遍的機能

1. はじめに

遺伝子産物の多様性を獲得することは、個体を形成する

多種多様な細胞機能を獲得するために極めて重要な分子基盤である。選択的スプライシングは、一つの前駆体 mRNA から多くの成熟型 mRNA を産生するための最も重要な制御機構であり、限られた数の遺伝子からその数十倍もの遺伝子産物を生み出す原動力ともなっている。一方で、選択的スプライシングの過程においては、高頻度でエラーが起こり異常 mRNA が合成される。このような異常 mRNA は、細胞の保持する品質管理機構によって認識され排除される。従って、選択的スプライシングによる mRNA 多様性獲得機構は、mRNA 品質管理機構を前提として成立する機構である。通常の条件下で発現している mRNA は、全て mRNA 品質管理機構による「認証」を受けたものであり、遺伝子発現制御の理解には mRNA 品質管理の分子機構の理解が不可欠である。

近年のヒトゲノム研究により、遺伝子疾患の原因変異が数多く同定されているが、ほとんどの遺伝病についてその治療法は確立されていない。ナンセンス変異は、ヒトの遺伝病の主要な原因変異であり、異常な位置での翻訳終結を引き起こす。ナンセンス変異により疾患が発症する遺伝病として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや嚢胞性線維症などが知られている。ナンセンス変異を持った異常 mRNA は、特異的な mRNA 品質管理機構によって認識され迅速に分解される。従って、ナンセンス変異を持った異常 mRNA から合成される異常な短鎖型タンパク質は、活性を持たないだけでなく、発現量自体が抑制されている。この mRNA 品質管理機構による異常タンパク質の発現抑制は、短鎖型の異常タンパク質が正常なタンパク質に対して阻害的に作用し、ヘテロ型でも症状が現れることを回避するために重要であると考えられる。

mRNA 品質管理機構については、①本来の位置より上流に終止コドンを持つ mRNA, ②終止コドンを持たないノンストップ mRNA, ③翻訳伸長反応が阻害される配列を持った mRNA, を特異的に認識する機構が知られている¹⁾。我々は、mRNA の分解促進に加えて、翻訳抑制と異常タンパク質の分解が異常 mRNA 由来の異常タンパク質の発現抑制に重要であることを明らかにしてきた²⁻⁶⁾。本稿では、mRNA 上で停滞したりボソームの解離活性を保持する Dom34:Hbs1 複合体に焦点をあて、品質管理機構における普遍的な役割について紹介する。

2. ノンストップ mRNA 分解系 (Nonstop Decay) の分子機構

終止コドンの位置が異常である mRNA として、最も極

端なケースは終止コドン自体を含まないノンストップ mRNA である。ノンストップ mRNA は、正常細胞でも ORF 途中でのポリ(A)鎖の付加により産生され、mRNA 全体の数%を占める⁷⁾。ノンストップ mRNA は NSD (Nonstop Decay) と呼ばれる mRNA 品質管理機構によって、3'末端から迅速に分解される⁸⁾。この迅速な分解には、ノンストップ mRNA の3'末端で停滞したりボソームが mRNA から解離することが必須である。Parker らは、3'末端で停滞したりボソームが Ski7 によってノンストップ mRNA から解離し、3'→5'方向のエキソヌクレアーゼ (RNA 分解複合体) であるエキソソームによって迅速に分解されるモデルを提唱した。しかしながら、このモデルを支持する実験結果は報告されておらず、3'末端で停滞したりボソームが解離される分子機構は未だ不明であった。

3. NSD における Dom34 : Hbs1 複合体の機能

様々な生物種において、特異的なアミノ配列を持ったタンパク質が合成された場合に、タンパク質合成反応 (翻訳伸長反応) が阻害されることが報告されている。翻訳伸長反応が阻害され、リボソームが mRNA 上で停止した場合に、mRNA 分解酵素の標的になる可能性が示唆されていた。Parker らは、出芽酵母において、mRNA の高次構造 (ステムループ) によって翻訳伸長反応が阻害された場合、mRNA が分子内で切断されることを報告し、NGD (No-Go Decay) と名付けた⁹⁾。これは、本来停止することのないリボソームが mRNA 上で立ち往生することを細胞が異常と認識する結果、mRNA が迅速に分解される品質管理機構と考えることができる。我々は、ポリ(A)鎖の翻訳によって翻訳伸長反応が阻害されることを見いだしたため、ポリ(A)配列の翻訳によって NGD が起こるかを検討した。その結果、ポリリジンの合成による翻訳伸長反

応の阻害に依存して、NGD が起こることを見いだした⁶⁾。

Parker 博士らは、翻訳終結因子 eRF1 : eRF3 複合体と相同性を示す Dom34 : Hbs1 複合体が NGD に関与することを見いだした。その後、試験管内で再構成された翻訳反応系を用いて、Dom34 : Hbs1 複合体の活性が Green 博士らによって解析された。その結果、Dom34 : Hbs1 複合体が翻訳伸長複合体の A サイトに結合し、①リボソームサブユニットの解離と②ペプチジル tRNA のリボソームからの解離が起こることが示された¹⁰⁾。これらの結果から、mRNA 上で立ち往生したりボソームに Dom34 : Hbs1 複合体が結合し、リボソームの解離を引き起こし、その後に未知の mRNA 分解酵素によって分子内切断が起こるモデルが考えられていた。

我々は、ポリ(A)鎖の翻訳によって翻訳伸長反応が阻害された場合に、mRNA の分子内切断 (NGD) が起こることを見いだしたため、Dom34 : Hbs1 複合体の機能について解析を行った。その結果我々は、Dom34 : Hbs1 複合体が NGD に必須でないことを見いだした。同時に、NGD における mRNA の分子内切断の結果生じる 5'側の分解中間体 (5'-NGD 中間体) が Dom34 : Hbs1 複合体依存に分解されることを見いだした。この 5'-NGD 中間体はキャップ構造を持ち、終止コドンを持たないノンストップ mRNA である。従って、Dom34 : Hbs1 複合体が終止コドンを持たないノンストップ mRNA の分解機構である NSD において、Dom34 : Hbs1 複合体が重要な機能を果たす可能性が強く示唆された。では Dom34 : Hbs1 複合体の持つどのような機構で、ノンストップ mRNA の分解を促進するのであろうか? 試験管内反応系を用いた Green 博士らの解析によって、Dom34 : Hbs1 複合体が mRNA 上で立ち往生したりボソームに結合し、各サブユニットへと解離させることが示されていた。従って、我々はノンストップ

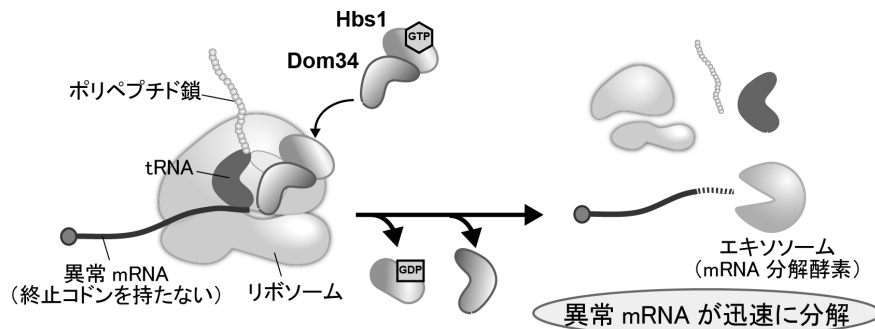


図1 Dom34 : Hbs1 複合体は、異常 mRNA の3'末端で停滞したりボソームを解離させることで、ノンストップ mRNA の分解を促進する。

mRNAの3'末端で停止したリボソームに対しても Dom34:Hbs1 複合体が作用し、各サブユニットに解離させる可能性を考えた。この活性を検証するために、自己切断活性を持つハンマーヘッドリボザイムを用いて効率よくノンストップ mRNA を細胞内で発現させる系を構築し、Dom34:Hbs1 複合体が mRNA の3'末端で停滞したリボソームを解離させるかについて検討した。その結果、①ノンストップ mRNA 由来のタンパク質の合成には Dom34:Hbs1 複合体が必要である^{11,12)}、②Dom34:Hbs1 複合体非存在下の細胞では、ノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームがペプチジル tRNA を含む状態で存在する¹²⁾、ことが明らかとなった。この結果から、Dom34:Hbs1 複合体が、終止コドン非依存の翻訳終結反応に必須であることが *in vivo* で初めて証明された (図1)。同様の結果が、酵母とヒトの試験管内翻訳反応系を用いた生化学的解析においても証明されている^{13,14)}。Dom34 は tRNA と極めて類似した構造を保持し¹¹⁾、GTP 結合因子 Hbs1 との複合体としてリボソームの A サイトに結合し、終止コドン非依存にリボソームを mRNA から解離させることが明らかとなった。

ノンストップ mRNA の3'末端で停滞したリボソームが解離する反応は、3'→5'方向のエクソヌクレアーゼ (RNA 分解複合体) であるエクソソームによるノンストップ mRNA の分解に必須である。ノンストップ mRNA の分解効率を *dom34* 欠損変異株と *hbs1* 欠損変異株で測定した結果、Dom34:Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の迅速な分解に必須であることが明らかとなった。

4. NSD の新たなモデル

以前我々は、ノンストップ mRNA では、翻訳伸長阻害と異常タンパク質のプロテアソームによる分解が起こることを報告した。今回の NSD における Dom34:Hbs1 複合体の機能解析の結果と統合して、以下の様な新規ノンストップ mRNA 品質管理機構を提唱する (図2)。このノンストップ mRNA 品質管理機構においては、①ポリ(A)鎖の翻訳による伸長反応の阻害、②mRNA の迅速な分解、③異常タンパク質の迅速な分解、の三つの機構が逐次的に作用し、異常タンパク質の合成を1%程度まで、非常に強く抑制している。

5. RNA 品質管理における Dom34:Hbs1 複合体の普遍的機能

NGD においても、翻訳伸長阻害に依存した mRNA の分

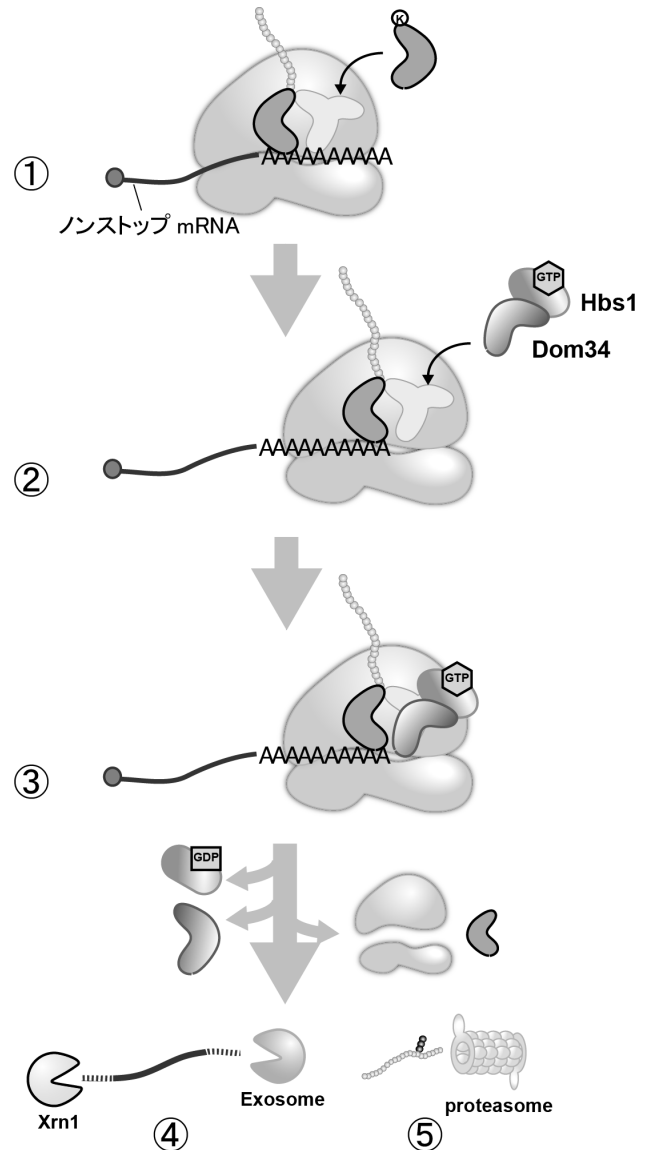


図2 新たなノンストップ mRNA 品質管理機構モデル

- ①終止コドンが存在しないため、正常な mRNA では翻訳されないポリ(A)鎖をリボソームが翻訳してポリリジンが合成される結果、伸長反応が阻害される^{2,3)}。リボソームトンネルとポリリジンとの静電的相互作用の結果、リボソームの活性/構造が変化し、伸長反応が阻害されると予想される。
- ②最終的に mRNA の末端でリボソームが停止する。
- ③mRNA の末端で停止したリボソームの A サイトには、mRNA が存在しないため、eRF1 やアミノアシル tRNA は結合しない。その結果として、Dom34:Hbs1 複合体が結合し、リボソームを mRNA から解離させる¹²⁾。
- ④mRNA の3'末端が解放され、エクソソームが3'末端から効率よくノンストップ mRNA を分解する^{8,12)}。ノンストップ mRNA のポリ(A)鎖はリボソームによって翻訳されたため、ポリ(A)結合タンパク質 (PABP) がポリ(A)鎖から解離している。その結果として、5'末端からも Xrn1 によって効率よく分解される²⁾。
- ⑤異常タンパク質もユビキチン化されプロテアソームによって分解される^{3,15)}。

子内切断の結果生じる二つの分解中間体のうち、5'側の断片もノンストップ mRNA である。前述の様に、この5'側分解中間体の分解にも Dom34:Hbs1 複合体が必要であった¹²⁾。Dom34:Hbs1 複合体は、翻訳活性を失った異常リボソーム RNA の迅速な分解機構 (NRD) にも関与する品質管理因子である。これらの結果から、Dom34:Hbs1 複合体が、「停滞したリボソーム」という共通した異常翻訳を認識し、三つの品質管理機構 (NGD/NRD/NSD) を作動させる普遍的な品質管理因子であることが明らかになった。

6. 今後の展望

異常 mRNA 由来の異常タンパク質の発現抑制に、mRNA の分解促進に加えて、翻訳抑制と異常タンパク質の分解重要であることを明らかにしてきたが、その分子機構の一端が解明されつつある。特に、ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構について、国内外の多数の研究グループが精力的に解析を進めている。特に異常タンパク質の分解に関与する E3 ユビキチンライゲースの特異性や、翻訳に共役したユビキチン化の反応については、今後数年で飛躍的に解明が進むと予想される。一方、ペプチジル tRNA である翻訳アレスト産物のペプチド鎖解離反応を担う因子や NGD を担うエンドヌクレアーゼの同定など、解決すべき問題は山積している。今後も仙台から情報を発信すべく、新研究室のメンバーと共に努力したい。

- 1) Isken, O. & Maquat, L.E. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 1833–1856.
- 2) Inada, T. & Aiba, H. (2005) *EMBO J.*, **24**, 1584–1595.
- 3) Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 519–524.
- 4) Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 10343–10352.
- 5) Kuroha, K., Tatematsu, T., & Inada, T. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 1265–1271.
- 6) Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., & Inada, T. (2010) *EMBO Rep.*, **11**, 956–961.
- 7) Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., Milos, P.M. (2010) *Cell*, **143**, 1018–1029.
- 8) van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., & Parker, R. (2002) *Science*, **295**, 2262–2264.
- 9) Doma, M.K. & Parker, R. (2006) *Nature*, **440**, 561–564.
- 10) Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., & Green, R. (2010) *Science*, **330**, 369–372.
- 11) Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., & Nureki, O. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17575–17579.
- 12) Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., & Inada, T. (2012) *Mol. Cell*, **46**, 518–529.
- 13) Pisareva, V.P., Shabkin, M.A., Hellen, C.U., Psetova, T.V., & Pisarev, A.V. (2011) *EMBO J.*, **30**, 1804–1817.
- 14) Shoemaker C.J. & Green, R. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1392–1398.
- 15) Bengtson, M.H. & Joazeiro, C.A. (2010) *Nature*, **467**, 470–473.

稲田 利文

(東北大学大学院薬学研究科)

A general role of Dom34: Hbs1 complex in RNA quality control systems
Toshifumi Inada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai 980–8578, Japan)