

- 1) Pasteur, L. (1882) *Br. Med. J.*, 1, 489.
- 2) Hoffmann, J.A. (2003) *Nature*, 426, 33–38.
- 3) Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., & Hoffmann, J.A. (1996) *Cell*, 86, 973–983.
- 4) Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Kusuhara, H., Santa, T., & Sekimizu, K. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 774–779.
- 5) Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., & Sekimizu, K. (2002) *Microb. Pathog.*, 32, 183–190.
- 6) Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., & Sekimizu, K. (2005) *Mol. Microbiol.*, 56, 934–944.
- 7) Kamimura, M., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Tsuzuki, S., Hayakawa, Y., & Kiuchi, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286, 67–73.
- 8) Ha, S.D., Nagata, S., Suzuki, A., & Kataoka, H. (1999) *Peptides*, 20, 561–568.
- 9) Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M., & Kamimura, M. (2003) *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 52, 163–174.
- 10) Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., & Sekimizu, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 2185–2191.
- 11) Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura, M., Nakamura, Y., Noda, H., Imamura, K., Mita, K., & Sekimizu, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 28635–28642.
- 12) Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., Oonishi, T., Kamimura, M., Imamura, K., & Sekimizu, K. (2013) *Dev. Comp. Immunol.*, 39, 147–153.
- 13) Clark, K.D., Volkman, B.F., Thoetkiattikul, H., Hayakawa, Y., & Strand, M.R. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 37431–37435.
- 14) Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi, A., & Hayakawa, Y. (2012) *Sci. Rep.*, 2, 210.
- 15) Ishii, K., Hamamoto, H., Imamura, K., Adachi, T., Shoji, M., Nakayama, K., & Sekimizu, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 33338–33347.
- 16) Ishii, K., Adachi, T., Imamura, K., Takano, S., Usui, K., Suzuki, K., Hamamoto, H., Watanabe, T., & Sekimizu, K. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 36582–36592.

石井 健<sup>1</sup>, 浜本 洋<sup>2</sup>, 関水 和久<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院理学系研究科,

<sup>2</sup> 東京大学大学院薬学系研究科)

Regulation of innate immunity by the insect cytokine paralytic peptide in the silkworm *Bombyx mori*

Kenichi Ishii<sup>1</sup>, Hiroshi Hamamoto<sup>2</sup> and Kazuhisa Sekimizu<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo; <sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

## 生物間における細胞質スプライシングの保存性と多様性

### 1. はじめに

真核生物では多くの遺伝子において転写と共役したスプライシングが起こり、イントロンが除去され、翻訳可能な成熟した mRNA となる。このスプライシングは、核内に存在するタンパク質と RNA の複合体スプライセオソームで起こる。一方、スプライシングを含むプロセッシングを受けた mRNA が細胞質に運ばれた後に起こる「細胞質スプライシング」が知られている<sup>1)</sup>。現在まで、細胞質スプライシングは真核生物で保存されている小胞体ストレス応答においてのみ観察されている。小胞体ストレス応答とは、小胞体で合成されるタンパク質のフォールディングに支障が起こると、その回避のために小胞体シャペロンや小胞体関連分解に関わる遺伝子の発現が協調的に起こる現象で、酵母から動物、植物に至るまで広く保存されている<sup>2)</sup>。小胞体ストレス応答では、小胞体内でのタンパク質のフォールディング状況を検知し、核へ伝えるセンサーとその下流の情報伝達系が存在する。IRE1 は、酵母から動物、植物まで唯一保存されている小胞体ストレスセンサーで、細胞質スプライシングにおける mRNA の切断を触媒する。植物 IRE1 ホモログは 10 年以上前に報告されていたが、細胞質スプライシングの標的は 2011 年まで不明であった<sup>3)</sup>。本稿では、植物で明らかになった事実を踏まえ、生物間における細胞質スプライシングの保存性と多様性について概説する。

### 2. 細胞質スプライシングを触媒する IRE1 と標的となる bZIP 型転写因子 mRNA

IRE1 は小胞体内腔に存在するセンサードメイン、膜貫通ドメイン (TMD) に続き、細胞質側にタンパク質キナーゼドメインさらにリボヌクレアーゼドメインを持つ I 型膜タンパク質である (図 1)。出芽酵母 IRE1 は bZIP 型転写因子 *HAC1* mRNA の細胞質スプライシングを触媒し、その結果生じた *HAC1* mRNA (*HAC1s*) からのみ転写活性化能を持つ *HAC1* タンパク質が翻訳される。本稿では、mRNA, タンパク質ともに細胞質スプライシング前の構造を u (unspliced) フォーム, 細胞質スプライシング後の構造を s (spliced) フォームと表記する。哺乳動物には IRE1 $\alpha$

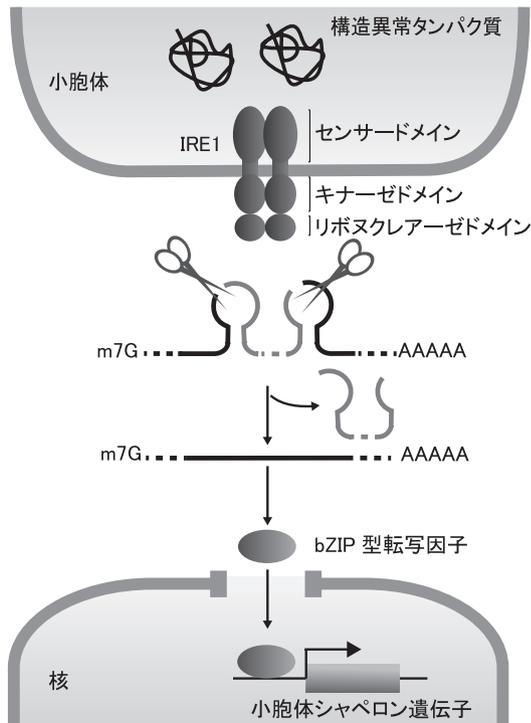


図1 IRE1 依存的細胞質スプライシング

小胞体膜に存在する IRE1 は、小胞体内の構造異常タンパク質の蓄積により、自己リン酸化を介して、リボヌクレアーゼ活性が活性化される。リボヌクレアーゼは小胞体シャペロン等の転写活性化に働く bZIP 型転写因子の mRNA の細胞質スプライシングを触媒する。細胞質スプライシングにより生じた mRNA から、活性型転写因子が翻訳される。

と IRE1 $\beta$  の二つのホモログが存在し、両者は出芽酵母 IRE1 と同様、bZIP 型転写因子 *XBP1* mRNA の細胞質スプライシングを触媒する。しかし、IRE1 $\alpha$  がユビキタスに発現し、その遺伝子破壊により個体は致死となるが、IRE1 $\beta$  は消化管の上皮細胞特異的に発現し、遺伝子破壊が致死に至らないなど、両者の生理機能は大きく異なる。*XBP1* の場合も *XBP1s* タンパク質のみが転写因子としては活性型である。

植物では、我々がシロイヌナズナ<sup>4)</sup>とイネ<sup>5)</sup>から IRE1 ホモログを報告していた。最近その細胞質スプライシングの標的となる bZIP 型転写因子が明らかとなった<sup>6-8)</sup>。シロイヌナズナにおける IRE1 の標的は bZIP60 (または AtbZIP60) と呼ばれ、そのイネオルソログは OsbZIP50 と呼ばれる。本稿では、シロイヌナズナとイネで共通した現象を記述する際には bZIP60 と表記する。シロイヌナズナは IRE1A, IRE1B の二つのパラログを持つが、少なくとも bZIP60 のスプライシングには、両者は同様に関わる。

IRE1A と IRE1B の二重遺伝子破壊株は通常条件下では、特に成長の異常はみられず、アミノ酸配列の相同性から考えても哺乳類の IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\beta$  の関係がシロイヌナズナの IRE1A と IRE1B の関係に当てはまるとは考えられない。一方、イネは IRE1 を 1 コピーしか持たず (OsIRE1), その機能不全は致死とされている<sup>9)</sup>。bZIP60 の場合も、活性型は bZIP60s であるが、後述のように活性化機構は HAC1, XBP1, bZIP60 で大きく異なる。

### 3. IRE1 により切断される bZIP 型転写因子 mRNA の二次構造とリガーゼ

IRE1 による細胞質スプライシングにより活性化される bZIP 型転写因子のアミノ酸配列や活性化機構が、後述のように酵母、動物、植物においてかなり異なる一方で、bZIP 型転写因子の mRNA の細胞質スプライシングを受けるサイトの二次構造の保存性は高い。図 2A に示すように、*HAC1*, *XBP1*, *bZIP60* のスプライシングサイトはいずれも二つのステムループ構造からなる。ステムの長さやループの塩基数には若干の多様性があるが、スプライシングサイト周辺には高度に保存された塩基がみられる (図 2B)。しかし、スプライシングにより切り出されるイントロンの長さは多様であり、酵母 *HAC1* では 252 塩基、ヒト *XBP1* では 26 塩基、シロイヌナズナ *bZIP60* では 23 塩基である。

IRE1 のリボヌクレアーゼ活性により、これらステムループ構造の 2 か所のホスホジエステル結合が切断されるが、スプライシングが完結するためには、切断後速やかに 2 本の RNA 分子は連結される必要がある。酵母 *HAC1* の細胞質スプライシングには tRNA リガーゼ (RLG1) が関わる。リコンビナントの IRE1 タンパク質、RLG1 タンパク質、*HAC1* mRNA を試験管内で反応させることで *HAC1* mRNA の細胞質スプライシングが再構築できることから、連結は RLG1 によって触媒されることが考えられる。*XBP1* の細胞質スプライシングに関わるリガーゼは同定されていない。*bZIP60* の細胞質スプライシングに関わるリガーゼもやはり不明であるが、シロイヌナズナの tRNA リガーゼ AtRLG1 が、酵母 RLG1 の欠損を部分的に相補できる<sup>10)</sup>ことから、AtRLG1 がスプライシングに関与することが推測される。

### 4. bZIP 型転写因子タンパク質の活性化機構

ここではこれまで述べてきた三つの bZIP 型転写因子 mRNA の細胞質スプライシングとその結果起こるタンバ

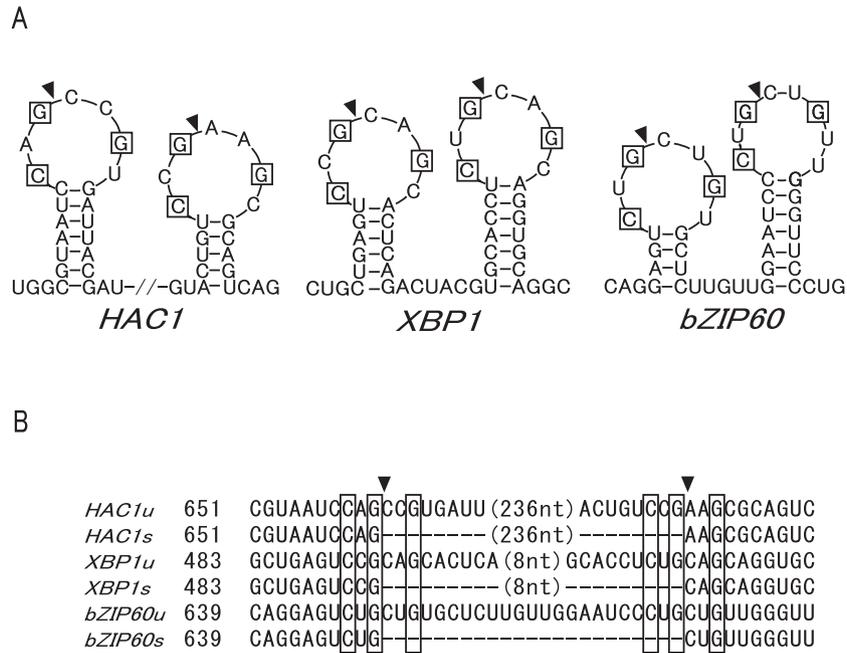


図2 細胞質スプライシングを受ける mRNA の構造  
 (A) *HAC1*, *XBP1*, *bZIP60* mRNA の二次構造予測. 矢頭は RNA の切断箇所を, □で囲んだ塩基は保存性の高い塩基を示す. (B) *HAC1*, *XBP1*, *bZIP60* mRNA のスプライシングサイト周辺の塩基配列. 矢頭と□で囲んだ塩基は A と同じ.

ク質の活性化機構について述べる. 図3に示すように *HAC1* の場合, *HAC1u* mRNA は 230 アミノ酸からなる *HAC1u* タンパク質をコードする. しかし *HAC1u* タンパク質は翻訳されないか, あるいは翻訳されてもすぐに分解される. 細胞質スプライシングの結果生じる *HAC1s* mRNA では, *HAC1u* mRNA にあった停止コドンが消失し, *HAC1s* mRNA は *HAC1u* タンパク質より ORF が 8 アミノ酸大きな *HAC1s* タンパク質をコードするようになる. *HAC1s* タンパク質は安定的に翻訳され転写因子として機能し, 小胞体シャペロン等の転写を誘導する. 一方, *XBP1* の場合, 26 塩基の細胞質スプライシングによりフレームシフトが起こる. その結果, *XBP1u* が 261 アミノ酸をコードするのに対し, *XBP1s* は 376 アミノ酸からなるタンパク質となる. *HAC1u* タンパク質がほとんど検出されないのとは異なり, *XBP1u* は翻訳され, 核と細胞質を行き来し, *XBP1s* とヘテロダイマーを形成し, *XBP1s* の制御に関わるとされる<sup>11)</sup>.

それでは *bZIP60* の場合はどうだろうか? 我々は, *bZIP60* を小胞体ストレスの誘導剤としてよく利用されるツニカマイシンにより転写量が増加する *bZIP* 型転写因子として同定した<sup>12)</sup>. ストレス非存在下では *bZIP60* タンパ

ク質は小胞体膜に局在し, ツニカマイシン処理により分子量が小さなタンパク質が検出された<sup>12)</sup>. この結果から, 我々は当初, *bZIP60* は小胞体ストレス依存的にタンパク質レベルで切断され, 核へ移行し, 転写因子として機能すると推定した. しかし, その後の研究から, *bZIP60* は IRE1 による細胞質スプライシングにより制御されることが明らかとなった. つまり, *bZIP60u* は 23 塩基の細胞質スプライシングを受け, *XBP1* と同様にフレームシフトが起こる. しかし, *XBP1* がスプライシングの結果, 大きなタンパク質をコードするようになるのに対し, *bZIP60s* タンパク質は 258 アミノ酸と 295 アミノ酸からなる *bZIP60u* タンパク質より小さい. 図3にも示すように *bZIP60s* は *bZIP60u* がコードしていた膜貫通ドメインを失うことにより, 小胞体膜ではなく核へ局在し, 転写因子として機能するようになると考えられる. *bZIP60* の場合, s フォームは u フォームより小さくなる点で, *HAC1*, *XBP1* と異なる. さらに *bZIP60* は, その N 末端部分付近に転写活性ドメインを有している点でも *HAC1*, *XBP1* とは異なる. このように, *HAC1*, *XBP1*, *bZIP60* はいずれも IRE1 による細胞質スプライシングを介して活性化されるが, タンパク質が活性化される機構は大きく異なる.

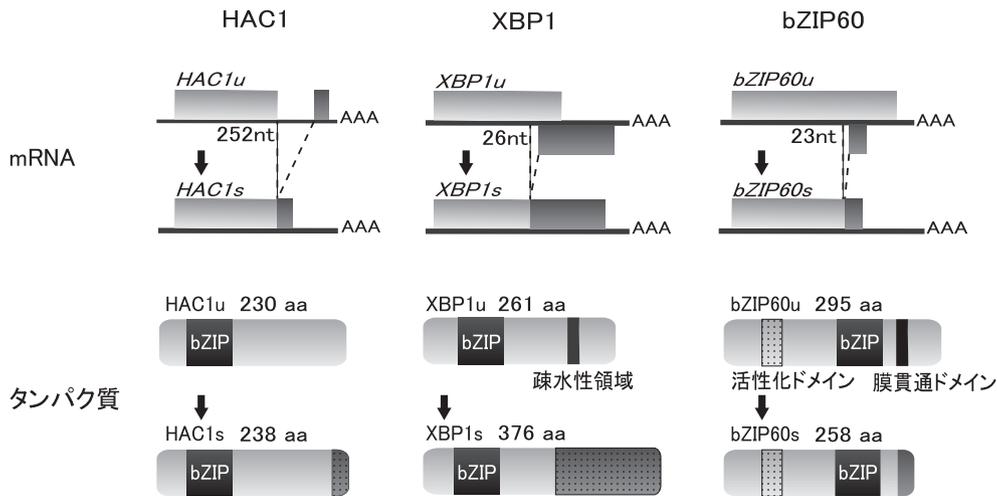


図3 細胞質スプライシングとタンパク質の活性化機構

HAC1 (出芽酵母), XBP1 (ヒト), bZIP60 (シロイヌナズナ) の mRNA およびタンパク質の u フォーム, s フォームの比較. HAC1 では, 細胞質スプライシングにより停止コドンが消失し, 同じ読み枠のアミノ酸配列が付加される. XBP1 と bZIP60 では, 細胞質スプライシングにより, 読み枠の異なるアミノ酸配列と途中から入れ替わる. XBP1 は u フォームよりも s フォームが大きい, bZIP60 では s フォームが小さくなる.

## 5. bZIP 型転写因子 mRNA の小胞体膜への局在機構

HAC1, XBP1, bZIP60 の mRNA が IRE1 による細胞質スプライシングを受けるためには, これらの mRNA (u フォーム) は, 小胞体膜に存在する IRE1 の近くに局在する必要がある. HAC1 の場合, ストレス非存在下では, HAC1u mRNA は細胞質に分散しているが, 小胞体ストレスにより IRE1 が小胞体膜上でクラスター化し, HAC1u mRNA はクラスター化した IRE1 近傍に局在し, 細胞質スプライシングを受ける. この局在化には HAC1u mRNA の 3' UTR と細胞質スプライシングにより除去されるイントロンの高次構造が必要とされる<sup>13)</sup>. 一方, XBP1 mRNA の小胞体膜への局在には, XBP1u タンパク質の C 末端側に存在する疎水性領域 (HR) が関わる<sup>14)</sup>. つまり, 翻訳途中の XBP1u ポリペプチドの HR が小胞体膜に結合することで, リボソームと XBP1u mRNA が小胞体膜へ局在し, IRE1 により認識され, スプライシングを受ける. この際, XBP1u mRNA と結合したリボソームが一時的に翻訳を停止し, 安定化するとされる<sup>15)</sup>. このように, HAC1 と XBP1 の mRNA が小胞体膜へ局在する方法は大きく異なる<sup>16)</sup>. bZIP60 の場合も mRNA が IRE1 の標的となるために小胞体膜へ局在すると推定されるが, その機構に関する報告はない. シロイヌナズナの bZIP60 に限らず, 植物の bZIP60 ホモログの u フォームは膜貫通ドメインを持つと

予想されることから, XBP1 と同様にポリペプチドを介した小胞体への局在が推定されるが, その検証は今後の課題である.

## 6. おわりに

以上のように, 真核生物で広く保存されている小胞体ストレス応答では, IRE1 による細胞質スプライシングが起こり, その結果いずれも bZIP 型の転写因子が活性化される. しかし, IRE1 の構造と IRE1 によって認識される mRNA の構造は生物間でかなりよく保存されているのに対し, bZIP 型転写因子タンパク質はアミノ酸配列, ドメイン構造とも保存性は非常に低い. また, 活性化機構や mRNA の小胞体への局在機構も大きく異なる. 本稿では IRE1 の機能を細胞質スプライシングに絞って紹介したが, IRE1 が小胞体で合成されるタンパク質の mRNA を広範囲に分解することも知られており, この機構は RIDD (Regulated Ire1-dependent decay of mRNAs) と呼ばれる. RIDD は出芽酵母ではみられないが, 分裂酵母では HAC1 ホモログが存在せず, RIDD が起こることが報告された<sup>17)</sup>. また, 我々はシロイヌナズナでも RIDD が起こることを報告している<sup>18)</sup>. 以上を勘案すると, IRE1 のもともとの機能は RIDD であり, その後, 進化の過程で細胞質スプライシングを担うようになった可能性も考えられる. そう仮定した場合, どうして細胞質スプライシングのターゲットは常

に bZIP 型転写因子なのだろうか？ この疑問に答えるため、種々の生物における細胞質スプライシングと RIDD の分子機構の解明が進むことが期待される。

- 1) 吉田秀郎 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, 51, 863–870.
- 2) Moore, K.A. & Hollien, J. (2012) *Annu. Rev. Genet.*, 46, 165–183.
- 3) Iwata, Y. & Koizumi, N. (2012) *Trends Plant Sci.*, 17, 720–727.
- 4) Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., & Chrispeels, M.J. (2001) *Plant Physiol.*, 127, 949–962.
- 5) Okushima, Y., Koizumi, N., Yamaguchi, Y., Kimata, Y., Kohno, K., & Sano, H. (2002) *Plant Cell Physiol.*, 43, 532–539.
- 6) Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.-X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S.H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 7247–7252.
- 7) Nagashima, Y., Mishiba, K.I., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., & Koizumi, N. (2011) *Sci. Rep.*, 1, 29.
- 8) Hayashi, S., Wakasa, Y., Takahashi, H., Kawakatsu, T., & Takaiwa, F. (2012) *Plant J.*, 69, 946–956.
- 9) Wakasa, Y., Hayashi, S., Ozawa, K., & Takaiwa, F. (2012) *Sci. Rep.*, 2, 944.
- 10) Mori, T., Ogasawara, C., Inada, T., Englert, M., Beier, H., Takezawa, M., Endo, T., & Yoshihisa, T. (2010) *Mol. Biol. Cell*, 21, 3722–3734.
- 11) Iwata, Y. & Koizumi, N. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5280–5285.
- 12) Iwata, Y., Fedoroff, N.V., & Koizumi, N. (2008) *Plant Cell*, 20, 3107–3121.
- 13) Aragón, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korrenykh, A.V., Rubio, C.A., & Walter, P. (2009) *Nature*, 457, 736–740.
- 14) Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., & Kohno, K. (2009) *Mol. Cell*, 34, 191–200.
- 15) Yanagitani, K., Kimata, K., Kadokura, H., & Kohno, K. (2011) *Science*, 331, 586–589.
- 16) 柳谷耕太, 河野憲二 (2012) 化学と生物, 50, 633–640.
- 17) Kimmig, P., Diaz, M., Zheng, J., Williams, C.C., Lang, A., Aragón, T., Li, H., & Walter, P. (2012) *eLIFE*, 1, e00048.
- 18) Mishiba, K., Nagashima, Y., Suzuki, E., Hayashi, N., Ogata, Y., Shimada, Y., & Koizumi, N. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 5713–5718.

小泉 望, 長島 幸広  
(大阪府立大学生命環境科学研究科)

Conservation and divergence of cytoplasmic splicing in the organisms

Nozomu Koizumi and Yukihiro Nagashima (Graduate School of Environmental and Life Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Nakaku, Sakai 599-8531, Japan)

## がん細胞はどこに行くのか～ケモカインによるがん転移の臓器選択性と新たな治療戦略の構築～

### 1. はじめに

高度な外科的手術方法の開発や、画期的な分子標的治療薬の導入等、がん治療技術は目覚ましい進歩を遂げている。しかしながら、高齢化社会の進行とともに、わが国のがんの罹患者数、死亡者数は増え続けている。この要因として、がん細胞の発生臓器（原発巣）から遠隔臓器への移動（がん転移）が挙げられる。すなわち、「がん転移を制圧するは、がんを制圧する」ことであり、したがって、「がん転移の分子機序を解明」し、そこから「新たな創薬戦略を構築」することは重要な研究課題である。がん転移はランダムに起こるわけではなく、例えば、乳がんは肺や骨へ、大腸がんは肝臓へと、ある程度の指向性があり、これらはがん転移の臓器選択性と呼ばれている。実際に、これらの現象は、1889年に莫大ながん患者の剖検解析結果から、イギリスの外科医である Stephen Paget により“seed and soil”説として提唱されており<sup>1)</sup>、100年以上たった現在も、この現象解明が種々の学問研究領域でなされているのが現状である。

ケモカイン (chemokine) は、細胞遊走を主要な作用とするサイトカインの一群であり、ヒトでは50種にのぼるケモカインと18種のケモカイン受容体 (レセプター) が同定されている<sup>2)</sup>。臓器は恒常的あるいは炎症をはじめとした刺激によりケモカインを放出し、ケモカイン受容体を発現する細胞 (リンパ球など) はケモカインの濃度勾配・発現部位に従って移動 (遊走) する。それぞれの組織、臓器やリンパ球はその種類によって発現パターンが異なるため、どのリンパ球がどの臓器に移行するかは、ケモカインによって厳密に制御されている。

現在、我々は、このがん転移の臓器選択性の分子機序を免疫学の研究領域から迫るべく、リンパ球の生体内挙動とがん細胞の転移挙動の類似性をケモカインに見だし研究を進めている (図 1a)<sup>3)</sup>。将来的には、がん転移に対する新たな治療戦略を創造することを目的としている。本稿では、我々の研究結果ならびにがん細胞上のケモカイン受容体を標的とした創薬の現状を解説する。