

みにれびゅう

リボソームの生合成に共役したリボソーム前駆体の品質管理機構

松尾 芳隆

1. はじめに

リボソームはタンパク質の合成装置として重要な働きを担っており、正常なリボソームの供給は、細胞増殖や、条件に応じた遺伝子発現にとって非常に重要である。真核生物のリボソームは4種類のRNAと79種類のタンパク質からなる巨大な複合体であり、その生合成には、rRNAの合成および修飾やプロセッシング、リボソームタンパク質の集合、正確な立体構造の形成、核から細胞質への輸送など、多くの過程が存在している。この複雑な生合成過程の大部分はタンパク質合成の場である細胞質とは隔離された核内で行われるが、その過程で生じた異常なリボソーム前駆体は、細胞質へ輸送されることなく、核内で分解されることが知られている。しかし、生合成過程の様々な段階で生じる多種多様な異常リボソーム前駆体を、細胞が認識する機構は長い間未解明のままであった。近年、いくつかのグループから、リボソームの生合成過程でのチェックポイント、つまりリボソーム前駆体の品質管理機構に関する報告がなされた。本稿では、これらの報告を中心に、リボソームの生合成、核外輸送と品質管理機構に関する最近の話題を紹介する。

2. リボソームの生合成

リボソームの生合成は、すべての生物にとって最もエネルギーを消費するイベントの一つであり、対数増殖期の出芽酵母は1分間に約2,000ものリボソームを合成するといわれている。その仕組みは非常に複雑で、最も単純な真核生物の一つである出芽酵母のリボソームでさえ200種類以上の生合成因子を必要としている¹⁾。リボソームの生合成の開始地点である核小体では、RNAポリメラーゼIに

よって、三つのrRNA(18S, 5.8S, 25S)を含む一つの大きな35S rRNA前駆体が転写される(図1)。転写された35S rRNAには即座に多数の核小体低分子RNA(snoRNAs)が結合し、約100のrRNA塩基の修飾が施され、同時に多くのリボソームタンパク質や生合成因子も結合し、新生35S rRNA、タンパク質、核小体低分子RNAからなる巨大な90S前駆体が形成される¹⁾(図1)。また、RNAポリメラーゼIIIによって転写される四つ目のrRNAである5S rRNAもこの時期に取り込まれると予想される。また、電子顕微鏡を用いた観察から、転写された35S rRNAの5'末端に球状の構造が確認されることから²⁾、この球状構造のものが40S前駆体、もしくは40S前駆体と60S前駆体を含む90S前駆体に相当すると考えられている。合成された90S前駆体に含まれる35S rRNAは、20S rRNAと27S rRNAに切断され、それぞれ40S前駆体と60S前駆体が形成される¹⁾(図1)。なお、一定の割合で35S rRNAの転写が完了する前にこの切断が起こることも確認されている³⁾。形成された40S前駆体は、この時点でほとんどのリボソームタンパク質と生合成因子を含んでいるため、そのまま核外へ輸送されると推測されており、最終的に細胞質にて成熟化が完了する¹⁾。一方、60S前駆体は、核小体、核質、細胞質へと成熟の場を移動させながら、さらなる成熟過程を経る。核質の60S前駆体と特異的に結合するRix1タンパク質のアフィニティー精製で得られる60S前駆体(以後Rix1前駆体と呼ぶ)には、AAA-ATPaseであるReal、GTPaseであるNug2、WDリピートタンパク質であるRsa4が非常に多く含まれている⁴⁾。Realは六つのATP結合部位からなるリング領域と、MIDAS(metal ion dependent adhesion site)ドメインを含むテイル領域から構成され、MIDASドメインはRsa4のN末端領域に位置するMIDO(MIDAS interacting domain)ドメインと相互作用する⁴⁾(図1)。また、免疫電子顕微鏡を用いたRix1前駆体の解析は、Realのリング領域が60S前駆体の5S rRNA領域に結合するのに対し、テイル領域はRsa4の結合領域の近傍と相互作用する可能性を示している⁴⁾。さらに、精製したRix1前駆体とATPを反応させると、60S前駆体からRealとRsa4の乖離が誘導されることから、Realによって、Rsa4の乖離を伴う60S前駆体の大きな構造変換が引き起こされるモデル(Realによる60S前駆体の再編成)が提案されている⁴⁾(図1)。

東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野(〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3 C305)

Quality control of pre-ribosome coupled with ribosome biogenesis

Yoshitaka Matsuo (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba 6-3, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan)

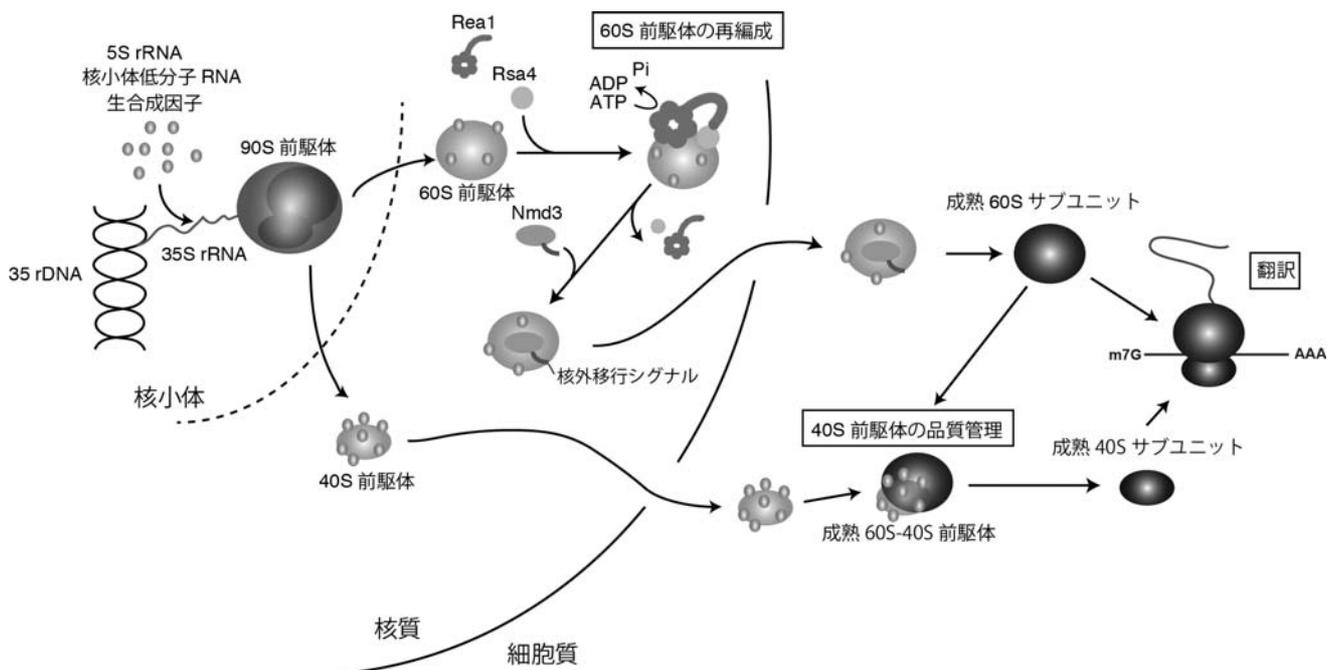


図1 出芽酵母のリボソームの生合成

核内の60S前駆体は、数種類の輸送因子（Arx1, Bud20, Mex67/Mtr2, Npl3など）と結合し、最終的には核外移行シグナルを持つ輸送アダプタータンパク質Nmd3と結合する¹⁾(図1)。Nmd3と結合した60S前駆体はCrm1/Ran依存的に細胞質へと輸送され、その後、最終的な成熟過程を経て60Sサブユニットへと成熟する⁵⁾(図1)。

3. 核内における60S前駆体の品質管理機構

前節で述べたように、リボソームの生合成は非常に複雑であり、合成途中の誤りによって、さまざまな異常リボソームを産生する危険性ははらんでいる。そのため細胞は、合成された異常リボソームを検出し、分解する品質管理機構を備えている。

2005年、Tollerveyらのグループは、核内の合成過程で生じた異常なrRNAが、TRF4-Air1/2-Mtr4 polyadenylation complex (TRAMP複合体)によって短いポリA鎖を付加され、それが目印となりエキソソームによって分解されることを発表した⁶⁾。その翌年、彼らは60Sサブユニットの生合成因子であるSda1の温度感受性変異株(*sda1-2*)を用いた解析で、異常60S前駆体の核外輸送が阻害され、TRAMP複合体とエキソソーム依存的に未成熟rRNAが分解されることを報告した⁷⁾。*sda1-2*の非許容温度下におけるリボソームタンパク質L11の局在解析では、60S前駆体が初めに核質に蓄積し、その後、核小体内のNo-bodyと呼ばれる画分に集められるようすが観察されている⁷⁾。さらに、No-bodyにはTRAMP複合体とエキソソームも濃縮

されていることが観察されていることから、60S前駆体がNo-bodyに集められ分解されている可能性が示唆されている⁷⁾。しかし、異常リボソーム前駆体の識別機構は不明のままであった。

4. 細胞質における40S前駆体の品質管理機構

2011年にKarbsteinらは、核から輸送された40S前駆体には60Sサブユニットとの会合面に七つの生合成因子(Ltv1, Rio2, Tsr1, Dim1, Enp1, Nob1, Pno1)が安定に結合しており、これらが協調して働くことで、mRNAとの結合や60Sサブユニットとの会合を阻害しているモデルを提案した⁸⁾。さらに、その翌年の2012年にKarbsteinとTollerveyらは、細胞質にて、40S前駆体と成熟60Sサブユニットが結合する翻訳様の会合を報告した^{9,10)}。核から輸送された40S前駆体は未成熟な20S rRNAも含んでおり、成熟するためには20S rRNAのプロセッシングと、先に述べた生合成因子の除去を完了させる必要がある。二つのグループは、核から輸送された40S前駆体と成熟60Sサブユニットが会合することによって、20S rRNAのプロセッシングと生合成因子の除去が行われ、それと同時に40S前駆体の品質管理が行われるモデルを提唱した(図2)。細胞質の40S前駆体の成熟化には上述した七つの生合成因子以外にもいくつか必要な生合成因子が存在する。これらの因子は安定に40S前駆体に結合していないことから、七つの生合成因子の乖離に必要である可能性が考えられた。また、これまでに生合成因子の乖離にはATPaseが関

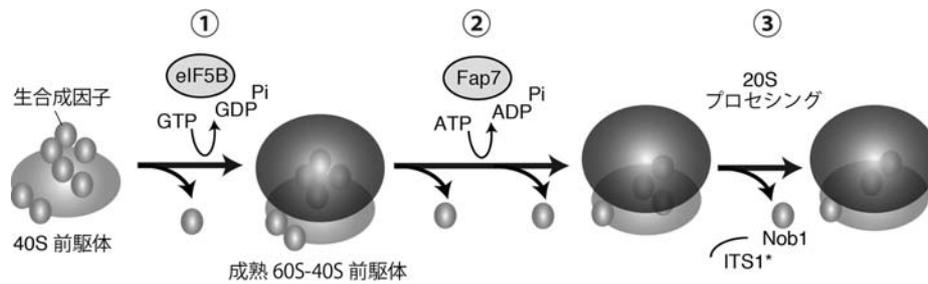


図2 40S 前駆体と60Sサブユニットの会合による40S前駆体の品質管理

① eIF5BのGTPase活性に依存して成熟60Sサブユニットと40S前駆体が会合する. ② ATPase Fap7によって生合成因子が除去される. ③ Nob1による20S rRNAのプロセッシングが引き起こされる. *ITS1 (Internal Transcribed Spacers)

与している例が多く報告されていたことから, KarbsteinらはATPaseであるFap2の枯渇条件下においてポリソーム解析を行った. すると予想に反して, 80Sリボソームの蓄積が観察され, 蓄積された80Sリボソームの中には成熟60Sサブユニットに加えて, 40S前駆体の構成因子 (Tsr1, Dim1, Enp1, Nob1, Pno1と20S rRNA) が大量に含まれていた⁹⁾. また, この80Sリボソームには開始tRNAが含まれていないことから, タンパク質合成能はないことも示されている⁹⁾. さらに, 翻訳開始因子eIF5Bが40S前駆体と成熟60Sサブユニットの会合を促進することも報告している⁹⁾. 一方Tollerveyらは, Nob1による20S rRNAのプロセッシングが, eIF5BのGTPase活性およびeIF5Bと25S rRNAの結合に依存していることを示した. さらにNob1のアフィニティー精製によって得られた複合体に, 40S前駆体由来する20S rRNAと成熟60Sサブユニット由来する25S rRNAが含まれていたことから, Karbsteinらと同様に40S前駆体と成熟60Sサブユニットが会合することを示した¹⁰⁾. 以上の結果から, eIF5BのGTPase活性に依存した40S前駆体と60Sサブユニットの会合によって40S前駆体の品質がチェックされること, さらに品質が確認できた場合は, Fap7のATPase活性に依存して生合成因子が乖離し, その結果Nob1による20S rRNAのプロセッシングが引き起こされるモデルが提案されている(図2).

5. 核外輸送に共役した60S前駆体の品質管理機構

先に述べたように, 60S前駆体は輸送アダプター因子であるNmd3と結合することによって核外移行能を獲得するわけだが, 核内で生じた異常な60S前駆体は, 細胞質へ輸送されることなく分解される. このことから, Nmd3は正常に成熟した60S前駆体を識別して結合することが予想されていたが, 長い間その識別機構は謎に包まれていた.

我々はこれまでに, 60S前駆体の核外輸送だけでなく,

その直前に起こるRealによる60S前駆体の再編成機構について詳細な解析を行ってきた. その解析の過程で, 核外移行能を獲得する直前の60S前駆体であるRix1前駆体には, RealとRsa4に加えて, GTPaseであるNug2が非常に多く含まれており, さらにNug2は核にのみ局在していることを見いだしていた¹¹⁾. そこで, Nug2が60S前駆体の核外移行能の獲得に関与している可能性を調べることにした. まず, RNAとタンパク質の結合領域を決定するCRAC (cross-linking and analysis of cDNA) 法を用いてrRNA上におけるNug2とNmd3の詳細な結合領域を同定し, 60S前駆体上におけるNug2とNmd3の結合領域が重複していることを見いだした. この結果は, Nug2とNmd3が同時に60S前駆体に結合できないことを示しており, 免疫沈降法を用いた複合体解析からもこの結果をサポートする結果が得られた. つまり, Nug2はNmd3のプレースホルダーとして機能しうる可能性が考えられた. そこで我々は, ①Nug2はどのようにして60S前駆体から乖離するのか, ②Nug2と60S前駆体の結合がNmd3の結合を阻止するのか, ③Nug2の欠損がNmd3と未成熟な60S前駆体の結合を誘発させるのかという三つの疑問を明らかにするために, さらなる解析を進めた. 初めに, 2種類のNug2優性阻害変異株を作製し, ポリソーム解析とリボソームタンパク質Rpl25-eGFPの局在解析を行った. すると, これら二つの変異体は60S前駆体との結合は保持するが, 60Sの生合成および核外輸送を阻害することが確認された. また, 酵素学的解析によって, Nug2のGTPase活性が K^+ によって促進されること, そして二つの変異体のうち一方はGTPとの結合能を失った変異体であるのに対し, 他方はGTPとの結合能は保っているがGTPase活性を失った変異体であることを確認した. 我々は以前, Rsa4とRealが緩衝液中のATPに依存して60S前駆体から乖離することを*in vitro*の解析によって報告した⁹⁾. この条件下ではNug2の乖離は観察できなかったが, 緩衝液中にATPだけでなく K^+ を添加することで, Nug2が60S前駆体から乖離することを見いだした¹¹⁾. さらに, 2種類のNug2変異体でも

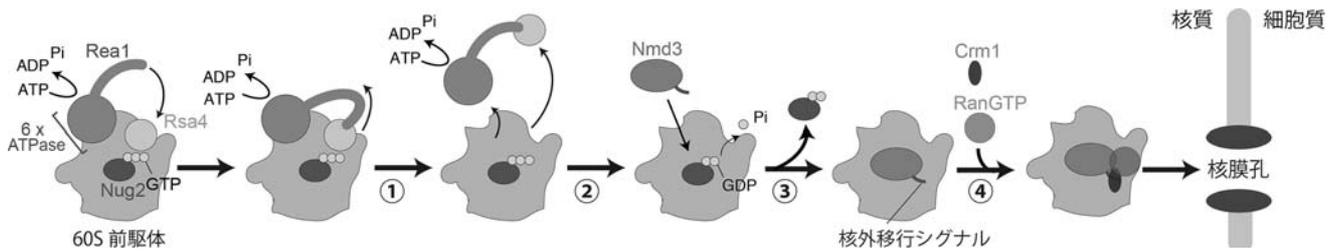


図3 Realによる再編成および核外輸送に共役した60S前駆体の品質管理機構

① AAA-ATPase Realによる60S前駆体の再編成に伴う構造変換が引き起こされる。② Nug2が再編成による構造変換を感知し、自身のGTPase活性が上昇する。③ GDP型へ変換されたNug2が60S前駆体から乖離することでNmd3の結合領域が露出し、Nmd3が結合する。④ Nmd3の核外移行シグナルをCrm1/RanGTPが認識し、核外へと輸送される。

解析を行った結果、GTP結合能が欠損したNug2変異体ではRsa4, Real, Nug2のすべての乖離が阻害され、GTPase活性のみが欠損したNug2変異体ではNug2の乖離だけが阻害されることが明らかになった¹¹⁾。以上の結果は、Realによる60S前駆体の再編成を誘導するにはNug2のGTP結合能が、そしてNug2の乖離にはK⁺依存性のGTPase活性およびATPに依存したRealの再編成活性が必要であることを示している。また、上記した2種類のNug2変異体がNmd3と60S前駆体の結合を阻害すること、さらにはNug2の枯渇がNmd3と未成熟な60S前駆体の結合を誘発させることも*in vivo*解析によって明らかにした¹¹⁾。以上の結果から、Nug2がNmd3のプレースホルダーとして働き、未成熟な60S前駆体に誤ってNmd3が取り込まれることを阻止すること、さらにNug2の乖離がRealによる60S前駆体の再編成、およびそれに伴うNug2のGTPase活性に依存していることを明らかにした(図3)。

6. おわりに

リボソームタンパク質やリボソームの生合成に関与する生合成因子の遺伝子変異が、さまざまな遺伝病やがん感受性を上昇させる原因になっていることや、リボソームの生合成異常によってがん抑制遺伝子であるp53の安定化、およびアポトーシスの誘導が観察されていることから、現在、がん治療における創薬のターゲットとしてリボソームの生合成研究が世界中で注目されている¹²⁾。現在までにリボソームの生合成をターゲットとした創薬研究で、CX-3543やCX-5461といった化合物ががん細胞特異的にRNAポリメラーゼIを阻害し、p53の安定化を介したアポトーシスを引き起こすことが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。いずれの化合物もすでに臨床試験に入っており、がん治療への応用が期待されている。

謝辞

本稿で紹介した“核外輸送に共役した60S前駆体の品

質管理機構”の研究はドイツハイデルベルク大学生化学センターのEd Hurt教授のもとで行ったものです。関係者の皆様に感謝致します。

- 1) Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., & Hurt, E. (2013) *J. Cell Sci.*, 126, 4815-4821.
- 2) Miller, O. L., Jr. & Beatty, B.R. (1969) *Science*, 164, 955-957.
- 3) Kos, M. & Tollervey, D. (2010) *Mol. Cell*, 37, 809-820.
- 4) Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., & Hurt, E. (2009) *Cell*, 138, 911-922.
- 5) Lo, K. Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E.M., & Johnson, A.W. (2010) *Mol. Cell*, 39, 196-208.
- 6) LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., & Tollervey, D. (2005) *Cell*, 121, 713-724.
- 7) Dez, C., Houseley, J., & Tollervey, D. (2006) *EMBO J.*, 25, 1534-1546.
- 8) Strunk, B.S., Loucks, C.R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C.L. 3rd, Karbstein, K., & Skiniotis, G. (2011) *Science*, 333, 1449-1453.
- 9) Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., & Karbstein, K. (2012) *Cell*, 150, 111-121.
- 10) Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowskam, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., & Tollervey, D. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 744-753.
- 11) Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.G., Tollervey, D., & Hurt, E. (2014) *Nature*, 505, 112-116.
- 12) Golomb, L., Volarevic, S., & Oren, M. (2014) *FEBS Lett.*, 588, 2571-2579.
- 13) Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K., Huser, N., Proffitt, C., Bliesath, J., Haddach, M., Schwaebe, M. K., Ryckman, D.M., Rice, W.G., Schmitt, C., Lowe, S.W., Johnstone, R.W., Pearson, R.B., McArthur, G.A., & Hannan, R.D. (2012) *Cancer Cell*, 22, 51-65.
- 14) Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., O'Brien, S.E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M.K., Siddiqui-Jain, A., Streiner, N., Quin, J.E., Sanij, E., Bywater, M.J., Hannan, R.D., Ryckman, D., Anderes, K., & Rice, W.G. (2011) *Cancer Res.*, 71, 1418-1430.
- 15) Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J.P., Lim, J.K., Von Hoff, D., Anderes, K., Rice, W.G. (2009) *Cancer Res.*, 69, 7653-7661.

著者寸描**●松尾芳隆** (まつお よしたか)

東北大学大学院薬学研究科助教, 理学博士.

■**略歴** 2006年奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科修了(理学博士), 同年同ポスト研究員, 08年Heidelberg大学Biochemi-Zentrum (BZH) ポスト研究員, 13年より東北大学大学院薬学研究科助教.

■**研究テーマと抱負** リボソームの生合成および核外輸送の分子機構の解明.