

図3 Self-subunit swapping メカニズムの提唱モデル

アポ酵素 ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub> 中の n 個の  $\alpha$  サブユニットの一つが交換する場合を記載. コバルトイオン (●), システイン (SH), システィンシルフェン酸 ( $\text{SO}^-$ ), システィンシルフィン酸 ( $\text{SO}_2^-$ ), アルギニン (R)

の“ $\alpha$ サブユニット”は翻訳後修飾導入の過程で“外部で翻訳後修飾を受けた $\alpha$ サブユニット(翻訳後修飾以外は同一のタンパク質)”とスワッピングする<sup>7,9)</sup>。そのため、翻訳後修飾が完了した後に、“アポ酵素に元々存在していた $\alpha$ サブユニット”はホロ酵素には存在しない。一方、これまでに数多くのタイプの翻訳後修飾が発見されてきたが、これらのすべては元々存在していたタンパク質に対して翻訳後修飾がなされる。つまり、翻訳後修飾が完了した後も元々存在していたタンパク質は翻訳後修飾を受けて存在し続けることと対比させると、self-subunit swappingは翻訳後修飾“導入”の新しい概念である。スワッピングによる翻訳後修飾の“導入”を証明するためには、翻訳後修飾前後のタンパク質を区別する(1アミノ酸変異などの)目印をつける必要があり、現時点では、J1菌のL-NHase, H-NHaseのみでしか実証されていない。しかし、NHaseだけでなくチオシアネート加水分解酵素においても、サブユニットのスワッピングにより翻訳後修飾が導入されホロ酵素が生成する可能性がある。これまで報告されてきた数多くの翻訳後修飾(リン酸化, グリコシル化, ユビキチン化など)においても、外部でそれらの修飾を受けたタンパク質とスワッピングすることで修飾が導入される例が見つかれば、本概念はさらに多くの興味を集めるであろう。

- 1) Yamada, H., Shimizu, S., & Kobayashi, M. (2001) *Chem. Rec.*, 1, 152-161.
- 2) Kobayashi, M., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1992) *Trends Biotechnol.*, 10, 402-408.
- 3) Nagashima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., Yohda, M., Kamiya, N., & Endo, I.

(1998) *Nat. Struct. Biol.*, 5, 347-351.

- 4) Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., & Wakagi, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 1169-1174.
- 5) Asano, Y., Tani, Y., & Yamada, H. (1980) *Agri. Biol. Chem.*, 44, 2251-2252.
- 6) Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1998) *Nature Biotech.*, 16, 733-736.
- 7) Zhou, Z., Hashimoto, Y., Shiraki, K., & Kobayashi, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 14849-14854.
- 8) Zhou, Z., Hashimoto, Y., & Kobayashi, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 14930-14938.
- 9) Zhou, Z., Hashimoto, Y., Cui, T., Washizawa, Y., Mino, H., & Kobayashi, M. (2010) *Biochemistry*, 49, 9638-9648.
- 10) Komeda, H., Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4267-4272.

橋本 義輝, 小林 達彦

(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻)

New post-translational modification mechanism by protein swapping

Yoshiteru Hashimoto and Michihiko Kobayashi (Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

## HDL 産生における ABC トランスポーター A1 の活性制御機構

### 1. はじめに

動脈硬化症, とりわけ心筋梗塞や狭心症など冠動脈疾

患のリスクは、いわゆる悪玉コレステロールと呼ばれる LDL (低密度リポタンパク質) の血中濃度が上昇するに従って高くなることは良く知られている。一方、善玉コレステロールとして知られている HDL (高密度リポタンパク質) に関しては、多くの疫学的研究が、その値が低いほど冠動脈疾患を増加させ、高いほど減少させるという関係を示していることから、動脈硬化症に対して防御因子として働くと考えられてきた。HDL 研究におけるブレイクスルーは、HDL 欠損症患者において ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) の機能不全をもたらす遺伝子変異が認められたという報告であろう<sup>1)</sup>。ほどなく ABCA1 ノックアウトマウスで HDL がほぼ消失すること<sup>2)</sup>、さらに ABCA1 過剰発現マウスにおける HDL 値上昇と抗動脈硬化作用が明らかにされ<sup>3)</sup>、HDL 恒常性における ABCA1 の生理的重要な

性がクローズアップされた。

ABCA1 は特に肝臓や小腸、マクロファージ等に高発現しているが、多くの組織で広く発現が認められる。2261 アミノ酸から成る巨大な膜タンパク質で、主に細胞の表面膜上で機能し、細胞外ドメインに結合するアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) に対して、細胞内のコレステロール及びリン脂質を搬出して、HDL 粒子の形成を促進する (図 1)<sup>4)</sup>。

細胞膜にある ABCA1 がどのようにコレステロール及びリン脂質を輸送して HDL 産生に関わるのか、その詳細な分子メカニズムについては実はまだよく分かっていない。一方で、ABCA1 の発現や機能を調整する機構については、核内受容体による転写促進やリン酸化等による翻訳後調節をはじめ、これまで多くの知見が報告されてきた。本

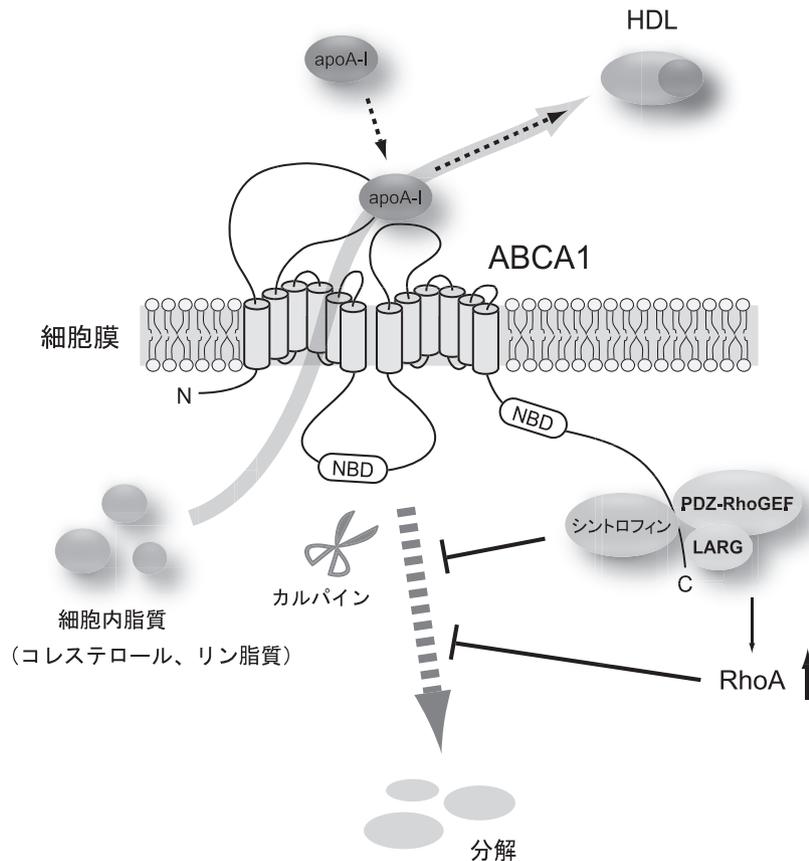


図 1 ABCA1 による HDL 産生

ABCA1 は 12 回膜貫通型のタンパク質で、二つの大きな細胞内ドメインにはそれぞれ ATP 結合領域 (NBD) が存在する。ABCA1 は細胞内のコレステロールやリン脂質を細胞外の apoA-I に搬出し、HDL 粒子を形成する。シントロフィンや、PDZ-RhoGEF 及び LARG は、ABCA1 の細胞内ドメインと結合して、ABCA1 の分解を抑制し、HDL 産生を促進する。詳細は、本文を参照。

稿では、そうした活性制御システムについて、まず筆者らが見出した相互作用タンパク質による ABCA1 発現制御機構について紹介する。さらに最近のトピックとして、マイクロ RNA による ABCA1 の転写後調節機構について、簡単に概説したい。

## 2. シントロフィン は ABCA1 と細胞骨格とを結びつけ、HDL 産生を促進する。

ABCA1 は 12 の膜貫通領域と、分子の中心部と C 末端側に二つの大きな細胞内ドメインを有する (図 1)。当初我々は、HDL 欠損症の患者から発見された C 末端側細胞内ドメインの一部を欠損した ABCA1 変異体について、細胞レベルで HDL 産生能が減弱することを見出していた<sup>5)</sup>。さらに、ABCA1 の C 末端 (2258-2261) にはタンパク質間相互作用に重要な結合モチーフ (PDZ 結合モチーフ) が存在し、このモチーフのみを欠損した変異体でも HDL 産生が低下したことから、この部位における相互作用タンパク質が ABCA1 の活性を制御することが予想された。

そこで我々は、細胞内相互作用を保持した状態で ABCA1 を免疫沈降してプロテオーム解析する手法を用いて、ABCA1 結合タンパク質を網羅的に同定した。野生型の ABCA1 と比較して PDZ 結合モチーフを欠損した ABCA1 においては、PDZ タンパク質シントロフィン ( $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\alpha 1$ -の三つのサブタイプ) 及び、それらと複合体を形成することが知られている分子ユトロフィン、ジストロブレピンとの結合が失われていた<sup>6)</sup>。シントロフィンは細胞骨格系タンパク質で、ユトロフィンやジストロブレピンと複合体を形成しアクチンとの結合を仲介することで、イオンチャンネルやレセプターの足場タンパク質として機能する。siRNA によりシントロフィンの発現を抑制したところ、ABCA1 の発現及び HDL 産生量の減少が認められた。また、この効果は三つのサブタイプのうち、 $\beta 1$ -シントロフィンで最も顕著だった。逆に、 $\beta 1$ -シントロフィンを強制発現した細胞において、ABCA1 の発現は上昇し、HDL 産生は促進した。Pulse-chase の実験から、ABCA1 の発現上昇はタンパク質分解の抑制によることが示され、 $\beta 1$ -シントロフィンの結合は ABCA1 の安定化に寄与することが明らかになった (図 1)<sup>6)</sup>。また、yeast-2-hybrid を利用した実験からも、同様にシントロフィンの ABCA1 への結合が報告された<sup>7)</sup>。シントロフィンは膜タンパク質である ABCA1 を細胞骨格にアンカリングすることによって、ABCA1 の活性を担保していると考えられる。

## 3. PDZ-RhoGEF 及び LARG は、RhoA を活性化して ABCA1 の分解を抑制し、HDL 産生を促進する。

ABCA1 と結合する PDZ タンパク質の解析から、Rho GTPase (RhoA, Rac, Cdc42) である PDZ-RhoGEF 及び LARG (leukemia-associated RhoGEF) を同定した<sup>8)</sup>。RhoGEF は Rho GTPase (RhoA, Rac, Cdc42) の活性を促進する因子として知られている。PDZ-RhoGEF 及び LARG は、Rho GTPase の中でも RhoA の活性化を特異的に担うこと、さらに、分子内に PDZ ドメインを持つことで膜タンパク質や受容体に直接結合して、外部からの刺激を RhoA の活性化という形で細胞内に伝える役割を持つことが知られている。例えば、神経細胞に発現している膜タンパク質プレキシシン B1 には細胞内ドメインに PDZ-RhoGEF が結合しており、リガンドのセマフォリン 4B が細胞外ドメインに結合することで、RhoA が活性化し、神経軸索の退縮が起こる。つまり、ABCA1 とこれら RhoGEF との結合は、1) ABCA1 はリガンド刺激により RhoA のシグナルを細胞内に伝えるレセプターとしての機能を持ち、さらに、2) RhoA の活性が HDL 産生にとって重要な役割を果たしている可能性を示唆した。これまでの研究においても、apoA-I が ABCA1 の細胞外ドメインに結合すると、apoA-I が細胞外で ABCA1 の運び出す脂質の受け皿となるだけでなく、細胞内でリン酸化酵素等のシグナル伝達系を活性化することから、apoA-I = リガンド、ABCA1 = レセプターとしての役割が指摘されていた。

ApoA-I が ABCA1 に結合すると、ABCA1 のカルパインによる分解が抑制されることが報告されていたが<sup>9)</sup>、我々は、ヒト初代繊維芽細胞において PDZ-RhoGEF 及び LARG の発現を siRNA により抑制すると、この apoA-I による ABCA1 の分解抑制が減弱される (分解されやすくなる) ことを見出した。PDZ-RhoGEF 及び LARG は RhoA を活性化するので、RhoA の活性化による ABCA1 の発現に及ぼす影響について調べたところ、活性化型 RhoA の強制発現によって ABCA1 のタンパク質分解が抑制され、逆に、不活性化型 RhoA によって分解が促進されることが分かった。さらに、apoA-I の細胞への添加により、RhoA が極めて短時間で活性化しており、apoA-I による ABCA1 の発現安定化は RhoA 阻害剤または不活性化型 RhoA の強制発現によって失われた。これらの結果から、apoA-I の ABCA1 に対する結合によって、ABCA1 の C 末に結合した PDZ-RhoGEF 及び LARG を介して RhoA が活性化され、ABCA1 の分解を抑制して HDL 産生反応を促進している

というモデルが想定された (図 1)。

RhoA による ABCA1 の活性制御に関しては、HMG-CoA 還元酵素 (コレステロール合成) 阻害剤スタチンが RhoA の活性化を阻害し、核内受容体 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) を含む複数のシグナル伝達系を介して、結果的に ABCA1 の mRNA を上昇させることが報告されていた<sup>10)</sup>。実際に、RhoA の阻害剤や、RhoA, PDZ-RhoGEF 及び LARG の発現抑制により ABCA1 mRNA 量の増加が認められ、これらの細胞においては apoA-I 刺激による ABCA1 タンパク質の安定化が阻害されるにも関わらず、apoA-I による HDL の産生量はコントロールの細胞と比較して変わらないという結果が得られた。つまり、RhoA の活性化を持続的に阻害することによって、ABCA1 のタンパク質レベルでは分解促進による減少、mRNA レベルでは増加するという、逆方向の二重制御が行われていることが予想された。そこで、PDZ-RhoGEF 及び LARG の発現を抑制するだけでなく、同時に PPAR $\gamma$  の発現を siRNA により抑制することで、ABCA1 mRNA 上昇に至る経路をブロックしたところ、apoA-I による HDL 産生量は有意に減少した<sup>9)</sup>。このことは、PDZ-RhoGEF 及び LARG から RhoA の活性化による ABCA1 タンパク質の分解抑制が、HDL 産生において重要であることを示唆している。

シントロフィンや PDZ-RhoGEF 及び LARG といった結合タンパク質による ABCA1 の発現調節は、ABCA1 のような半減期が短いタンパク質が安定的に存在し機能するためには極めて重要な機構であると考えられる。ABCA1 発現に対する RhoA の二重制御に関しては、例えば、肝臓における ABCA1 の転写が細胞内コレステロールに応答する複数の転写因子によって正と負の両側から同時にコントロールされるように<sup>11)</sup>、多重の制御システムの存在が細胞のコレステロール恒常性を厳密に維持するために必要なかもしれない。その生理的意義を明らかにするには、さらなる検証が必要であろう。

#### 4. miR-33a/b は ABCA1 の翻訳を抑制し、HDL 産生量を低下させる。

マイクロ RNA は標的遺伝子の翻訳を制御することで様々な生命現象に関与することが知られているが、最近になって脂質代謝の制御に関与するマイクロ RNA の役割が明らかにされつつある。マイクロ RNA は 22 塩基程度の短い non-coding RNA で、標的とされる mRNA の 3' UTR などに結合して、mRNA の分解誘導または翻訳阻害によ

り標的遺伝子の発現を減少させる。マイクロ RNA と標的配列との結合は完全に相補的ではなくても起こるため、一つのマイクロ RNA が 100 以上の遺伝子の発現に影響を与えることもある。マイクロ RNA に関する詳しい解説は多くの優れたレビューがあるので、そちらを参照して頂きたい<sup>12)</sup>。

最近三つの研究グループよりほぼ同時期に、脂質代謝に深く関与するマイクロ RNA として miR-33a 及び miR-33b が同定された<sup>13~15)</sup>。miR-33a はコレステロールの生成や取り込みを制御する転写因子 SREBP-2 (Sterol regulatory element-binding protein 2) をコードする遺伝子のイントロンの中に存在する。このような intronic miRNA は宿主遺伝子と同時に転写され生成されることが知られている。miR-33a も SREBP-2 と共転写されると考えられ、miR-33a と SREBP-2 の各組織での発現量はほぼ相関している<sup>15)</sup>。

細胞においてコレステロールレベルが低くなると、小胞体膜上の SREBP-2 はゴルジ体に移行後、一部が切り出され核に移行する。SREBP-2 は HMG-CoA 還元酵素や LDL レセプターの発現を上昇させ、コレステロールの生成や取り込みを活性化させると同時に、SREBP-2 自身の転写を促進し、その結果 miR-33a の転写も促進すると考えられる。実際コレステロール欠乏状態の細胞においては、SREBP-2 と miR-33a の発現は共に上昇しており、コレステロールの添加で両者の発現は減少した<sup>13,15)</sup>。

ABCA1 mRNA は 3' UTR に三つの miR-33a 結合領域を有し、miR-33a の良い標的となることが予想された。miR-33a を細胞に導入したところ、ABCA1 mRNA 及びタンパク質発現量は減少し、HDL 産生も低下した<sup>13,15)</sup>。逆に、修飾アンチセンスや hairpin inhibitor による miR-33a の機能阻害によって、ABCA1 発現は上昇し、HDL 産生は促進された<sup>13~15)</sup>。つまりコレステロールが必要な細胞では、SREBP-2 でコレステロールの合成・蓄積を促進し、miR-33a で ABCA1 によるコレステロールの放出を抑える、という反応が同時に行われていることになる (図 2)。

In vivo での結果はさらに興味深い。miR-33a のマウスへの投与により、肝臓での ABCA1 発現量が減少し、血中 HDL 値は低下する<sup>13,14)</sup>。また逆に、miR-33a のアンチセンスで肝臓での ABCA1 発現量が増大し、HDL 値の上昇が認められた<sup>13,14)</sup>。Horie らは miR-33a 欠損マウスを作製し、肝臓及び腹腔内マクロファージにおいて、野生型と比較して ABCA1 タンパク質発現量が増加しており、血中の HDL コレステロール値が 20% 以上高くなることを示している<sup>16)</sup>。さらに、miR-33a アンチセンスを動脈硬化モデル

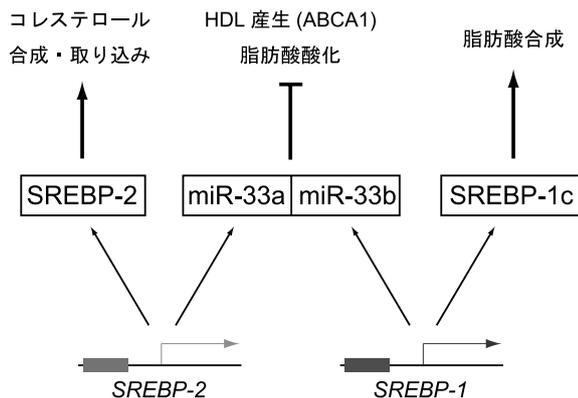


図2 miR-33a/bによる制御

SREBP2/miR-33aとSREBP-1c/miR-33bはそれぞれ共転写され、コレステロール、脂肪酸の生合成・蓄積を活性化する一方で、放出・分解反応を抑制する。

マウス (Ldlr<sup>-/-</sup> mice) に投与すると、冠状動脈におけるプラークが退縮することが確認された<sup>17)</sup>。

miR-33aと対をなすもう一つのマイクロRNA—miR-33bは、脂肪酸の生合成を制御する転写因子SREBP-1cをコードする遺伝子のイントロン中に存在する。SREBP-2/miR-33aと同様にSREBP-1cとmiR-33bも共転写され、miR-33bはCPT1a等の脂肪酸酸化(分解)系遺伝子を標的として、その発現を抑制する<sup>18)</sup>。

面白いことに、miR-33aとmiR-33bの配列は僅かに2塩基が異なるだけで、特にシード配列とよばれる標的mRNAを決定するのに重要な2~8番目の塩基配列は完全に一致している。そのため、miR-33aとmiR-33bは脂肪酸酸化系とHDL産生系(ABCA1以外ではABCG1やNPC1(Niemann-Pick disease, type C1)も標的となる)の遺伝子を共に抑制することが明らかにされている(図2)<sup>18,19)</sup>。

種を超えて広く保存されているmiR-33aに対して、miR-33bは齧歯類には保存されていない。ごく最近、サルでmiR-33aとmiR-33bの阻害による効果を調べた研究が報告された<sup>20)</sup>。修飾アンチセンスの投与により、肝臓でのABCA1発現レベルの増加とHDLの血中濃度の上昇が認められ、さらに、肝臓における脂肪酸酸化系遺伝子発現の上昇、合成系遺伝子発現の低下、その結果として血中VLDL中のトリグリセライド量の減少が観察された<sup>20)</sup>。動脈硬化やメタボリックシンドロームに対する新しい治療法として、実用化への可能性はかなり高いと考えられる。

## 5. おわりに

ABCA1のHDL産生活性を左右するのは、当然上記の

ような相互作用タンパク質やマイクロRNAだけではない。その仕組みは非常に多岐にわたり、まだ明らかになっていない点も多く残されていると考えられる。ABCA1はHDLを対象とした創薬の格好のターゲットであり、その活性制御機構のより深い理解から、新しいコンセプトに基づく抗動脈硬化薬の開発が待たれる。

- 1) Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J., Jr., & Hayden, M.R. (1999) *Nat. Genet.*, 22, 336-345.
- 2) Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani, M.F., Rothe, G., Lackner, K.J., Chimini, G., & Schmitz, G. (2000) *Nat. Genet.*, 24, 192-196.
- 3) McNeish, J., Aiello, R.J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K.L., Roach, M.L., Royer, L.J., de Wet, J., Broccardo, C., Chimini, G., & Francone, O.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4245-4250.
- 4) Yokoyama, S. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 20-27.
- 5) Fitzgerald, M.L., Okuhira, K., Short, G.F., 3rd, Manning, J.J., Bell, S.A., & Freeman, M.W. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 48477-48485.
- 6) Okuhira, K., Fitzgerald, M.L., Sarracino, D.A., Manning, J.J., Bell, S.A., Goss, J.L., & Freeman, M.W. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 39653-39664.
- 7) Muehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N., & Ueda, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 15091-15095.
- 8) Okuhira, K., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Ohoka, N., Suzuki, K., Sawada, J., Naito, M., & Nishimaki-Mogami, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 16369-16377.
- 9) Arakawa, R. & Yokoyama, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 22426-22429.
- 10) Yano, M., Matsumura, T., Senokuchi, T., Ishii, N., Murata, Y., Taketa, K., Motoshima, H., Taguchi, T., Sonoda, K., Kuki-dome, D., Takuwa, Y., Kawada, T., Brownlee, M., Nishikawa, T., & Araki, E. (2007) *Circ. Res.*, 100, 1442-1451.
- 11) Tamehiro, N., Shigemoto-Mogami, Y., Kakeya, T., Okuhira, K., Suzuki, K., Sato, R., Nagao, T., & Nishimaki-Mogami, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 21090-21099.
- 12) Bartel, D.P. (2009) *Cell*, 136, 215-233.
- 13) Rayner, K.J., Suarez, Y., Davalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., & Fernandez-Hernando, C. (2010) *Science*, 328, 1570-1573.
- 14) Marquart, T.J., Allen, R.M., Ory, D.S., & Baldan, A. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 12228-12232.
- 15) Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen,

- D.E., Gerszten, R.E., & Naar, A.M. (2010) *Science*, 328, 1566–1569.
- 16) Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Marusawa, H., Iwanaga, Y., Hasegawa, K., Yokode, M., Kimura, T., & Kita, T. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17321–17326.
- 17) Rayner, K.J., Sheedy, F.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., Temel, R.E., Parathath, S., van Gils, J.M., Rayner, A.J., Chang, A.N., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E.A., & Moore, K. J. (2011) *J. Clin. Invest.*, 121, 2921–2931.
- 18) Davalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramirez, C.M., Warriar, N.P., Andreo, U., Cirera-Salinas, D., Rayner, K., Suresh, U., Pastor-Pareja, J.C., Esplugues, E., Fisher, E.A., Penalva, L.O., Moore, K.J., Suarez, Y., Lai, E.C., & Fernandez-Hernando, C. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 9232–9237.
- 19) Gerin, I., Clerbaux, L.A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A. K., Burant, C.F., Leclercq, I.A., MacDougald, O.A., & Bommer, G.T. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 33652–33661.
- 20) Rayner, K.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., McDaniel, A.L., Marshall, S.M., van Gils, J.M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Goedeke, L., Liu, X., Khatsenko, O.G., Kaimal, V., Lees, C.J., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E.A., Temel, R.E., & Moore, K.J. (2011) *Nature*, 478, 404–407.

奥平 桂一郎

(国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部)

Regulatory factors for ABCA1 activity of HDL generation  
Keiichiro Okuhira (Division of Biochemistry and Molecular  
Biology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Ka-  
miyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-0098, Japan)

## 小胞体膜上で起こるスプライシングの巧妙な仕組み

### 1. はじめに

真核生物の細胞では、分泌・膜タンパク質は小胞体で合成されて成熟し、目的地へ輸送される。これら分泌経路を経るタンパク質は翻訳と共役して小胞体内へ送り込まれ、糖鎖修飾を受けると共に分子シャペロンやフォールディング酵素などによって正しい立体構造に折りたたまれて成熟する。タンパク質を正しい形に折りたたむ能力の容量を一般にフォールディング容量と呼ぶが、小胞体のフォールディング容量を超える量のタンパク質が流入した場合や、グルコース飢餓や低酸素状態などの環境ストレスによってフォールディング容量が減弱した場合などには、折りたたみが不全な構造異常タンパク質が蓄積することがある（こ

のような状況を小胞体ストレスと呼ぶ）。小胞体ストレスは細胞に強い毒性を持ち、ひどい場合には細胞死を引き起こすこともある。このようなストレスに応じて、細胞は小胞体膜上で mRNA をスプライシングするといった非常に風変わりな方法でストレス応答プログラムを活性化させ、小胞体ストレスに立ち向かう（核で起こる一般的な mRNA スプライシングと区別するために、細胞質スプライシングと呼ばれている）。本稿では、最近明らかになった動物細胞における細胞質スプライシングの洗練されたメカニズムについて紹介する。さらに、細胞質スプライシングの進化について考察したい。

### 2. 細胞質スプライシング

動物細胞において、小胞体ストレスは I 型小胞体膜タンパク質 inositol requiring 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) によって感知される。IRE1 $\alpha$  は小胞体内腔の構造異常タンパク質の蓄積をその内腔領域で感知し、活性化する。活性化した IRE1 $\alpha$  はサイトゾル側の ribonuclease 領域で *X-box binding protein 1* (*XBP1u*) mRNA の特異的な二ヶ所を切断し、スプライシング反応を開始させる（図 1A）。この反応によって、*XBP1u* mRNA は open-reading frame (ORF) から 26 塩基のイントロンが切り出され、その結果、スプライシング部位以降の配列でフレームスイッチが起こった成熟型 *XBP1* mRNA (spliced *XBP1* mRNA : *XBP1s* mRNA) ができる（図 1B）。*XBP1s* mRNA からは機能的な転写因子 XBP1s が合成され、小胞体分子シャペロンや小胞体関連分解に関わる因子などの転写を誘導し、小胞体ストレス状態を緩和する<sup>1,2)</sup>。

細胞質スプライシングでは、IRE1 $\alpha$  が基質である *XBP1u* mRNA と出会う必要がある。IRE1 $\alpha$  は上述のとおり小胞体膜タンパク質であるので、*XBP1u* mRNA は小胞体膜上で IRE1 $\alpha$  に切断されると考えられるが、IRE1 $\alpha$  と *XBP1u* mRNA の小胞体膜上での遭遇には何か積極的な過程が存在するのか、それとも、サイトゾルを受動拡散する *XBP1u* mRNA の中で、たまたま小胞体膜に近づいた分子だけがスプライシングされるのか、この問いに対する明確な解答は得られていなかった。

### 3. *XBP1u* mRNA が IRE1 $\alpha$ に出会う仕組み

我々はこの問いに答えるために、まず、*XBP1u* mRNA の細胞内分布場所をジギトニンを用いた生化学的細胞分画法で調べた（この方法を用いるとサイトゾルに分布する mRNA を小胞体膜上に分布するものと分離することが出