

- 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

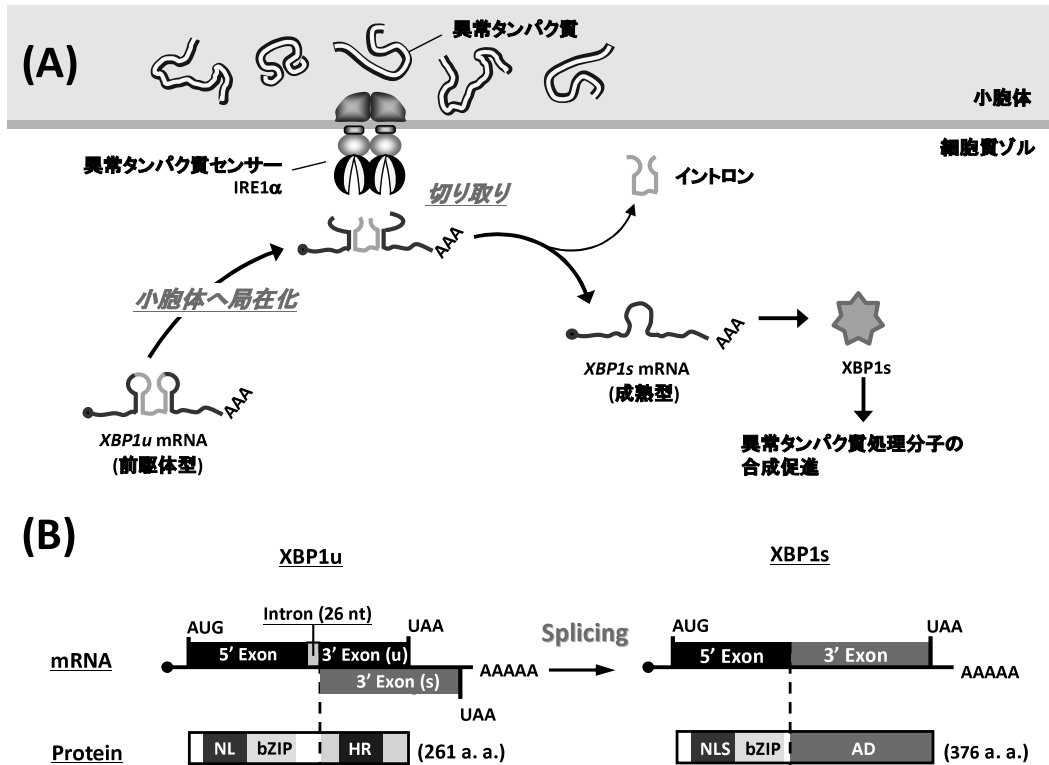


図1 XBP1 mRNA の細胞質スプライシング機構

(A) XBP1 mRNA の細胞質スプライシング. 動物細胞においては, IRE1 $\alpha$  は小胞体に構造異常タンパク質が蓄積すると二量体化して活性化し, 細胞質で XBP1 前駆体 mRNA をスプライシングする. スプライシングによって 26 塩基のイントロンが除かれると, フレームスイッチが起こり, 前駆体 mRNA では異なる読み枠でコードされていた DNA 結合領域と転写活性化領域が融合し, 機能的転写因子 XBP1s をコードするようになる.

(B) XBP1u, XBP1s の ORF 構造とタンパク質のドメイン構造. XBP1u mRNA には二つの読み枠の異なる ORF (ORF1, ORF2) があり, ORF1 が翻訳されて XBP1u タンパク質が合成される. IRE1 $\alpha$  によるスプライシングによってイントロン (ORF1 中のグレー四角) が除かれ, ORF1 と ORF2 が融合して XBP1s mRNA となり, そこから活性のある転写因子 XBP1s が合成される. 図中の NLS は核移行シグナル, bZIP は塩基性ロイシンジッパードメイン, HR は疎水性領域, AD は転写活性化ドメインを示す.

来る). 非ストレス時において, XBP1u mRNA は小胞体膜上に分布することが分かった<sup>3)</sup>. 興味深いことに, 細胞を小胞体ストレス誘導剤で処理すると IRE1 $\alpha$  によってスプライシングを受けた XBP1s mRNA が小胞体膜からサイトゾルに放出されることが明らかになった. この結果から, XBP1u mRNA には存在し, XBP1s mRNA にはない何かしらの特徴が XBP1u mRNA の小胞体膜へのリクルートに必要であることが示唆される. 変異体を用いた解析から, XBP1u mRNA が in-frame で翻訳されることが XBP1u mRNA の小胞体膜への局在化に必要であることが明らかとなった (上述のように, XBP1s ではスプライシングによってフレームシフトするので XBP1u の読み枠を失っている). XBP1u mRNA にコードされる XBP1u タンパク質

は C 末端側に高度に疎水的な領域 HR を持ち, ミクロソーム膜への結合能を有する. さらに, 翻訳中のリボソームから新生鎖を遊離させる作用のある翻訳阻害剤 puromycin 処理によって XBP1u mRNA は小胞体膜から放出されたことから, 我々は, XBP1u mRNA は自身を翻訳中のリボソームから伸長中の新生ポリペプチド鎖によって小胞体膜に局在化するというモデルを提唱した (図 2A). 小胞体膜上への局在化能を消失させる変異を導入した XBP1u mRNA は小胞体ストレス時にスプライシングされにくくなることから, XBP1u mRNA が積極的に小胞体膜上にリクルートされることは効率的にスプライシングされるための必要条件であるようだ<sup>3)</sup>.

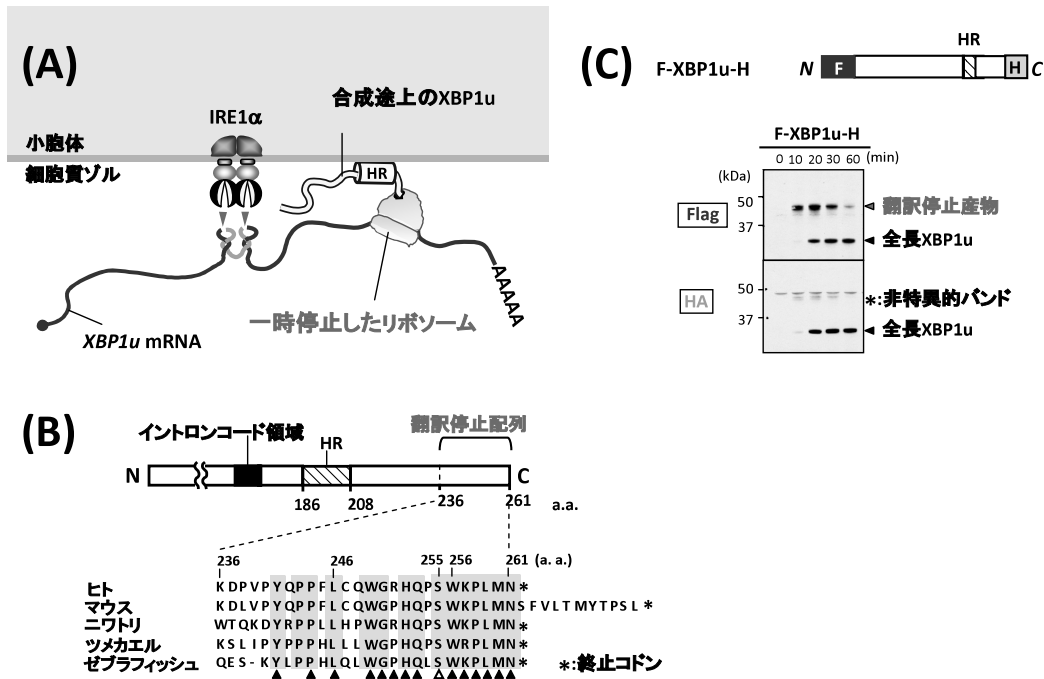


図2 XBP1u mRNAの小胞体膜局在化機構

(A) XBP1u mRNAの小胞体膜局在化機構のモデル。XBP1u mRNAを翻訳中のリボソームから伸長する新生XBP1uポリペプチドはHRを介して膜に結合し、その結果、XBP1u mRNAをリボソーム-新生鎖複合体の一部として膜上にリクルートする。小胞体ストレス時には活性化された小胞体膜タンパク質であるIRE1 $\alpha$ によって、膜に係留されたXBP1u mRNAが効率的にスプライシングされる。我々の研究で、XBP1uのC末端付近を合成中のリボソームが一時的に停止し、翻訳途中の状態を安定化することで、XBP1u mRNAが効率的に小胞体膜上に局在化することが分かった。

(B) XBP1uのC末端。HRと翻訳停止配列の位置関係を示す。下図では、翻訳停止能を有するC末端26アミノ酸残基からなる配列を様々な種で比較した。黒矢頭はアラニン置換によって翻訳停止能が減弱、もしくは消失するアミノ酸を、白矢頭はアラニンに置換すると翻訳停止反応が延長するアミノ酸を示す。

(C) XBP1uの合成中にリボソームは一時的に停止する。ウサギ網状赤血球ライセートを用いてin vitroでXBP1uを翻訳すると、全長XBP1uが現れるよりも早い時間帯に合成途中のXBP1uのC末端にtRNAが共有結合した翻訳停止産物が現れた。上部の模式図はin vitro翻訳反応に用いたXBP1uを示す。“F”はFLAGエピトープ、“H”はHAエピトープを示す。下図の上部、下部パネルではFLAGエピトープ、または、HAエピトープに対する抗体でそれぞれF-XBP1u-Hを検出した。

(B, Cは文献6から引用)

#### 4. 我々が提唱していたモデルの問題点

図2Bに示すように、XBP1uのC末端側には高度に疎水性な領域HRがある。著者らの提唱したモデルは、新生XBP1uポリペプチド鎖のHRが小胞体膜に対して錨のように働いてXBP1u mRNAを小胞体膜上に係留しているというものである。このモデルが成立するためには、XBP1u mRNAを翻訳中のリボソームが終止コドンに到達する前に、HRがリボソームトンネルの外に露出している必要がある。しかし、ここには解決すべき問題があった。何故なら、HR以降のC末端は53アミノ酸残基しかなく、リボ

ソームトンネルの長さが約40アミノ酸残基相当であることを考慮すると<sup>4)</sup>、HRがトンネルの外に出た後には、差し引き13コドンを翻訳したらリボソームは終止コドンに到達し、タンパク質とmRNAは解離してしまう。真核細胞ではリボソームの翻訳速度は一秒当たり2アミノ酸程度なので、13アミノ酸は7秒程で翻訳が完了する。つまり、7秒程度しか図2Aの状態が保たれないということである。著者らのモデルが成立するためにはこの時間は短すぎるように思われる。

## 5. 翻訳が停止するという仮説

著者らは、これまでのモデルの矛盾を解消する次のような仮説を立てた。それは、XBP1uを合成するリボソームは図2Aのような状態を安定化するためにC末端を合成する際に一時的に停止する、というものだ。この仮説を検証するには翻訳停止反応が起こるか否かを検出する必要がある。では、どのように検出するのであろうか？ 著者らは伸長中のポリペプチドのC末端に着目した。翻訳過程において、伸長中のポリペプチド鎖には必ずC末端にtRNAが共有結合している。それなので、もし翻訳停止が起こっていれば、明瞭なバンドとしてtRNAが共有結合した分子種（ペプチジル tRNA）が検出できるはずである<sup>5)</sup>。そこで、著者らはXBP1uの合成中にペプチジル tRNAが現れるか否かを調べることにした<sup>6)</sup>。

## 6. XBP1uの合成反応はC末端付近で一時的に停止する

XBP1uを、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 翻訳系で合成したところ、全長XBP1uは時間依存的に蓄積したが、それに加えて、全長よりも16 kDa程大きいバンドが全長よりも早い段階で現れ、最終的には消失した(図2C)。解析の結果、この後者のバンドは、当初の期待通り、C末端付近まで合成されたXBP1uにtRNAが結合した翻訳停止中間体であることが判明した。つまり、XBP1uの合成反応はC末端付近で一時的に停止するということである。なお、この翻訳停止反応は *in vivo* でも起こることを確認している<sup>6)</sup>。

## 7. XBP1uの翻訳停止配列はC末端26残基の保存度の高い領域であった

次に、この翻訳停止を引き起こす責任領域を探索した。関連の無いタンパク質のC末端にXBP1uの部分配列を融合させたところ、XBP1uのC末端26アミノ酸残基のみで翻訳停止反応を引き起こした。さらに、アラニンスキャニング変異導入法でこの領域内の翻訳停止に関わるアミノ酸残基を調べると、この領域の26アミノ酸のうち14残基が翻訳停止に貢献しており、そのほぼ全てが進化的に保存されていた(図2B)。

## 8. XBP1u mRNAの効率的な小胞体膜局在化とスプライシングには翻訳停止反応が必要である

それでは、翻訳停止反応はXBP1u mRNAの小胞体膜局在化に実際に貢献するのであろうか？ この問いに答える

ために、筆者らは先のアラニンスキャニング変異導入法で見出したL246AやW256Aといった翻訳停止反応を消失させる変異を導入した場合、XBP1u mRNAの小胞体膜局在化にどのような影響を及ぼすか調べた。すると期待通り、翻訳停止を引き起こせない場合には、XBP1u mRNAの小胞体膜局在化能力が著しく低下していた。さらに、翻訳停止を引き起こせない変異体は小胞体ストレス時にスプライシングを受ける効率も低下していた。これらの結果から、翻訳停止反応によってXBP1u mRNAは新生XBP1uポリペプチド鎖を介して小胞体膜へ局在化出来るようになり、小胞体ストレス時には活性化したIRE1 $\alpha$ に効率よくスプライシングされることが明らかになった。

## 9. おわりに

動物細胞において、細胞質スプライシングは基質mRNAが積極的に小胞体膜に局在化することで効率化されていた。この局在化にスプライシングを受ける前の前駆体mRNAがコードするタンパク質XBP1uが働く点は、前駆体mRNAがサイトゾルに存在し、翻訳され得る状態にある細胞質スプライシングならではのメカニズムである。さらに、XBP1uは合成途中の状態でも機能するが、この一過的な存在を翻訳停止配列によって安定化させていた。ごく最近まで、細胞質スプライシングはIRE1と基質mRNA、RNA ligaseの3因子からなる比較的シンプルなシステムと考えられていたが、本稿の例のようにまだまだ未知のメカニズムは潜んでいるかもしれない。

## 10. 進化的考察

小胞体ストレスに対する応答機構は真核生物で広く保存されている。特に、IRE1は酵母をはじめ、動物や植物にも存在する。ところが、そのスプライシング基質となるmRNAは、つい最近まで、出芽酵母における *homologous to ATF/CREB 1 (HAC1)* mRNA、動物におけるXBP1u mRNAの二種類しか判明していなかった。しかし、2011年になって植物のシロイヌナズナにおいて *Arabidopsis thaliana bZIP (AtbZip60)* が、さらに、真菌類の *Cryptococcus neoformans* において *HAC1 and XBP1-Like gene 1 (Hxl1)* のmRNAがそれぞれの種のIRE1にスプライシングされることが報告された<sup>7-9)</sup>。XBP1, HAC1, AtbZIP60, HXL1の4種全てでスプライシング型mRNAはbZip型転写因子をコードするが、興味深いことに、その保存性は極めて低い<sup>10)</sup>。さらに、非スプライシング型mRNAの小胞体膜上への局在化がXBP1 mRNAに加えて、HAC1 mRNAでも報

告されているが、その仕組みは全く異なっている<sup>10)</sup>。これらの事実を総合すると、真核生物の進化の過程では、まず、IRE1が遺伝子として誕生し、進化的にある程度分岐した後に、それぞれに、そのスプライシング基質が生まれたのではないかと筆者は考えている。その場合、IRE1には細胞質スプライシングを介さない存在意義があったはずである。IRE1には、小胞体ストレス時に分泌タンパク質をコードするmRNAを切断、分解することで、ストレス状態の小胞体へのタンパク質流入量を減少させる働きがあることが報告されている (regulated Ire1-dependent decay; RIDDと呼ばれている)<sup>11,12)</sup>。このRIDDの機能がスプライシング基質を獲得する以前のIRE1の主要な機能だったのかもしれない。今後、様々な種で細胞質スプライシングの多様性が明らかにされて、現在の細胞質スプライシングの洗練されたメカニズムがどのような変遷を経て形作られたかを理解できる日が来ることを期待している。

- 1) Mori, K. (2003) *Traffic*, 4, 519–528.
- 2) Ron, D. & Walter, P. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 519–529.
- 3) Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., & Kohno, K. (2009) *Mol. Cell*, 34, 191–200.
- 4) Kowarik, M., Küng, S., Martoglio, B., & Helenius, A. (2002)

*EMBO J.*, 10, 764–778.

- 5) Muto, H., Nakatogawa, H., & Ito, K. (2006) *Mol. Cell*, 22, 545–552.
- 6) Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., & Kohno, K. (2011) *Science*, 331, 586–589.
- 7) Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.X., Srivastava, R., Rothstein, S. J., & Howell, S.H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 7247–7252.
- 8) Nagashima, Y., Mishima, K.I., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., & Koizumi, N. (2011) *Nat. Sci. Rep.*, 1, doi : 10.1038/srep00029.
- 9) Cheon, S.A., Jung, K.W., Chen, Y.L., Heitman, J., Bahn, Y.S., & Kang, H.A. (2011) *PLoS Pathog.*, 7, e1002177.
- 10) Aragón, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korrennykh, A.V., Rubio, C.A., & Walter, P. (2009) *Nature*, 457, 736–740.
- 11) Hollien, J. & Weissman, J.S. (2006) *Science*, 313, 104–107.
- 12) Nakamura, D., Tsuru, A., Ikegami, K., Imagawa, Y., Fujimoto, N., & Kohno, K. (2011) *FEBS Lett.*, 585, 133–138.

柳谷 耕太, 河野 憲二

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

The sophisticated mechanisms of the mRNA splicing on the endoplasmic reticulum

Kota Yanagitani and Kenji Kohno (Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916–5, Takayama, Ikoma, Nara 630–0192, Japan)