

## 特集：リボソームの機能調節と疾患

## II. リボソーム RNA の転写後修飾とアセンブリー

### II-1 リボソームサブユニット生合成の調節

吉川 治 孝, 泉 川 桂 一, 石 川 英 明, 高 橋 信 弘

細胞は転写された rRNA 前駆体のプロセッシングとそれらへのリボソームタンパク質の組み込みによって、40S の小サブユニットと 60S の大サブユニットを合成する。酵母の場合、このリボソームサブユニットの生合成は約 170 種にもものぼるタンパク質とほぼ同等の数の snoRNA からなるトランス作用因子が関わる工程であるが、遺伝的手法とプロテオミクス的手法の進歩によって、その工程の全容を議論できる段階にまで到達した。ヒトの場合も、酵母で得られた結果の延長として進化的に保存されたトランス作用因子の特定が進み、酵母とヒトの共通部分がみえてきた。しかし、一方でその違いも見いだされ、リボソームサブユニット生合成の調節機構の異なる部分も明らかになってきた。その最たるものは、ヒトにおいてはトランス作用因子の異常で組織特異的な疾患が発症することである。

#### 1. はじめに

真核生物におけるリボソームの大 (60S) サブユニットと小 (40S) サブユニットの生合成には、核小体内で rDNA から転写された rRNA 前駆体 (pre-rRNA; 哺乳類は 47S rRNA 前駆体, 酵母は 35S rRNA 前駆体) へリボソームタンパク質 (RP) やトランス作用因子 (trans-acting factor/assembly factor) が会合した 90S 前駆体から 60S 前駆体と 40S 前駆体への分割が必要である。ちなみに、トランス作用因子とは、リボソーム生合成には関わるが最終産物である成熟したリボソームには含まれないタンパク質や核小体内低分子 RNA (snoRNA) のことである。この分割は、47S/35S rRNA 前駆体の ITS1 領域の切断で生じると信じられている (酵母ではこの切断で 20S と 27S rRNA 前駆体が生じ、

哺乳類では 21S と 36S/32S rRNA 前駆体が生じる)。実際のところ、この切断の後に、60S 前駆体と 40S 前駆体へのそれぞれ独立した粒子への分割が起こらなければならないが、これが一体どのような仕組みで起こっているかの分子機構はいまだに不明である。驚くべきことに、この二つの粒子への分割は、リボソームサブユニットの生合成で最も重要な過程の一つであるにも関わらず、仮説すら存在していなかった。最近、筆者らは、ヒトの細胞において、この分割に、トランス作用因子としてよく知られているフィブリラリン (FBL) と Nop52, そして、今までミトコンドリアで酸化的リン酸化の調節因子として知られている p32 というタンパク質が重要な役割を担っている証拠を示した<sup>1)</sup>。本稿では、この最近の筆者らの知見に基づいた 90S 前駆体から 60S 前駆体と 40S 前駆体へと分割する過程と、それぞれが順次 60S サブユニットと 40S サブユニットへと成熟していく過程の調節機構について概説する。そして、リボソーム生合成の調節機構の破綻で発症する疾病の最近の知見についてもふれたい。

#### 2. 90S 前駆体から 60S 前駆体と 40S 前駆体への分割

筆者らはこれまで、ヒトのトランス作用因子を釣り餌として免疫沈降法で単離したリボソーム生合成の過程で形成

東京農工大学農学府 (〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8)

The regulatory mechanism underlying ribosomal subunit synthesis

Harunori Yoshikawa, Keiichi Izumikawa, Hideaki Ishikawa and Nobuhiro Takahashi (Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture & Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan)

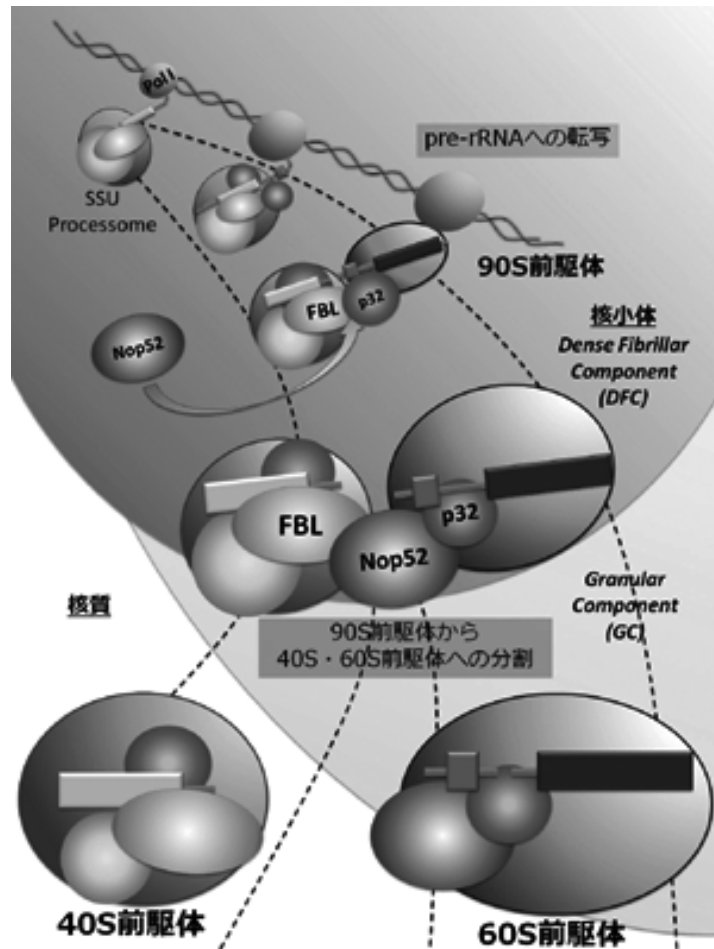


図1 90S リボソーム前駆体から40Sと60S前駆体への分割

されるさまざまなリボソーム前駆体のプロテオミクス解析を行ってきた。この一連の解析を通して90S前駆体の構成因子でありrRNA前駆体のメチル化を担うFBLと60S前駆体の構成因子のNop52は別々の前駆体に存在し、同じ前駆体中で共存しえないが、どちらもp32と相互作用できることを見いだした。しかし、p32は今までリボソーム生合成への関与が知られていなかったため、まずそれを証明した<sup>1)</sup>。そして、FBLとp32は核小体内で、Nop52とp32は60S前駆体中で直接相互作用すること、さらにNop52とFBLはp32を競合的に奪い合うことも見いだした。これらの結果を基に、90S前駆体内でrRNA前駆体のITS1領域の切断で生じた40S前駆体と60S前駆体はFBLとp32の間の結合でつなぎとめられているが、Nop52がこの結合に割り入る形でFBLからp32を競合的に奪うことで90S前駆体が二つの前駆体に分割する、というモデルを提案した(図1)<sup>1)</sup>。このモデルは、90S前駆体から60S前駆体と40S前駆体への分割を分子レベルで説明を可能にした現存する唯一のモデルである。

筆者らは、このFBL-p32-Nop52による90S前駆体の分

割機構を解析する過程で、p32とNop52についてさらに興味深い結果を二つ得ている。一つは、p32はRix1複合体と相互作用するとの結果で、そしてもう一つは、Nop52はPeBoW複合体と相互作用するとの結果である(未発表データ)。Rix1複合体とPeBoW複合体はともに60S前駆体構成成分として60Sサブユニットの生合成に関わる。これらの結果は、Nop52-p32が90S前駆体の分割以降も60S前駆体の成熟段階に関わっていることを示唆する。

### 3. 60Sサブユニットの生合成の調節

90S前駆体から分割された60S前駆体中では、ITS1の切断によって、哺乳類では36S/32S rRNA前駆体から28S'と12S rRNA前駆体を生じ、酵母では27S rRNA前駆体から7Sと25S rRNA前駆体を生じる(図2A, B)。60S前駆体は、このrRNA前駆体プロセッシングの進行に合わせてリボソームタンパク質の取り込みと必要なトランス作用因子の会合と解離を行いながら、核小体内のFC(fibrillar center)・DFC(dense fibrillar component)領域から、GC(granular component)領域、さらに核質へと成熟の場を移

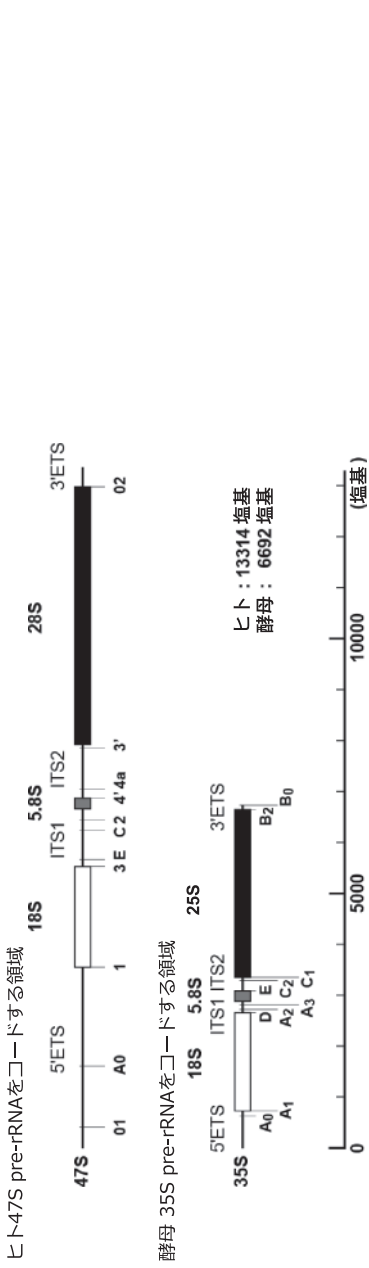


図 2A ヒトと酵母のリボソーム DNA の模式図

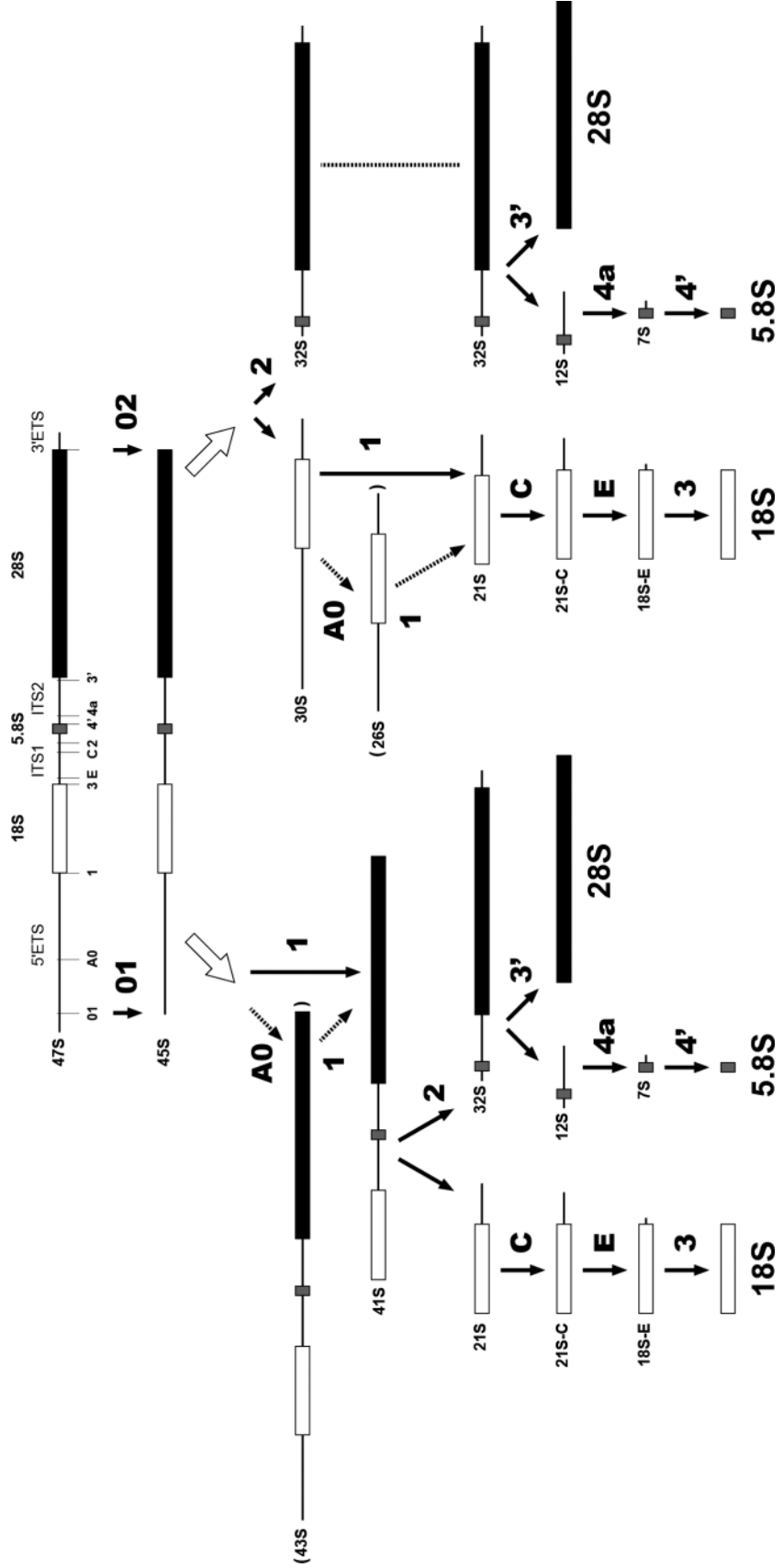


図 2B ヒトリボソーム RNA 前駆体のプロセッシング経路

図 2 リボソーム遺伝子とその産物の成熟過程

していく。その途中で、この前駆体はRNAポリメラーゼⅢから転写された5S rRNAを取り込み、最終的に細胞質で28S, 5.8S, 5Sの3種の成熟rRNAと49種類のリボソームタンパク質を含む60Sの大サブユニットを完成させる。

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では60Sサブユニットの生合成に関わる約80種類のトランス作用因子が同定され、そのうち70種類についての役割は明らかになっている。代表的なトランス作用因子を目印として、現在までに生合成過程で形成される少なくとも4種類の特徴的な60S前駆体が特定されている<sup>2)</sup>。すなわち、Ssf1・Nsa1は核小体で形成する初期の前駆体、Rix1は核質から細胞質に輸送される直前に形成される中期の前駆体、Arx1は核質-細胞質輸送中の前駆体、そしてLsg1は細胞質で形成する後期の前駆体の特徴づけている<sup>1)</sup>。一方、哺乳類に関しては、筆者らのグループによる解析によって、ヒトの60S前駆体を構成するトランス作用因子として少なくとも42種類の酵母ホモログが特定され、酵母の4種類の60S前駆体のうち、3種に相当する前駆体がヒトの60Sサブユニットの生合成過程で存在しうを示している。今のところ、ヒトを含めた哺乳類の細胞では、酵母に比べて、どの60S前駆体が、どのようなトランス作用因子の関与を経て成熟していくかはほとんど解明されていない。しかし、近年この60Sサブユニットの生合成過程に関わる前述したRix複合体1やPeBoW複合体などのサブコンプレックスが特定され、哺乳類での60Sサブユニットの生合成の調節機構の一端がみえつつある。そこで、これらのサブコンプレックスの60Sサブユニットの生合成における役割を次に述べたい。

### 1) PeBoW (Pes1・Bop1・WDR12) 複合体

Bop1はPestovらのグループによってマウス細胞の60Sサブユニット合成に関わる事が報告されたトランス作用因子である<sup>3)</sup>。Bop1は細胞質の成熟リボソーム中には存在せずに核内の60S前駆体中のみ存在し、そして36/32S rRNA前駆体のITS2領域の切断に関わる。この2000年に報告されたPestovらの論文は、ショ糖密度勾配超遠心分離法による核内のリボソーム前駆体の精製や、パルス・チェイス法によるrRNA前駆体プロセッシング過程の検出などを哺乳類細胞に適応した初めての論文であり、哺乳類でリボソーム生合成を研究する者にとってはまさにお手本となる論文である。この報告の後、Bop1の相互作用因子として、同じく60S前駆体中で機能するPes1とWDR12が同定され、これらもBop1と同じくITS2領域のプロセッシングに関わることが示された。これらは、PeBoW複合体を形成し、60Sサブユニットの合成に必要な一つの機能単位としてのサブコンプレックスを構成する<sup>4)</sup>。PeBoW複合

体は、まずBop1がPes1とともに60S前駆体に移行し、その後WDR12がこのBop1を標的として移行することで形成する。また、Bop1の非存在下ではPes1とWDR12は分解しやすくなり、PeBoW複合体の形成と安定性はBop1が握っている。Pes1・Bop1・WDR12の酵母ホモログであるNop7・Erb1・Ytm1も同様にサブコンプレックスを形成し、これはSsf1とNsa1を目印とする核小体での初期60S前駆体に含まれる<sup>2)</sup>。そのため、哺乳類細胞のPeBoW複合体は、比較的初期の60S前駆体中に含まれ、その機能は酵母から哺乳類まで保存されていると考えられる。

### 2) Rix (Ribosome export) 1 複合体

Rix1複合体は、酵母ではRix1・Ipi1・Ipi3からなるサブコンプレックスであり、その名のとおり核質に存在し細胞質に輸送される直前の60S前駆体中に含まれる。つい最近、Mullerらのグループによって酵母Rix1・Ipi1・Ipi3のヒトホモログであるPELP1・TEX10・WDR18からなるヒトRix1複合体が特定された。しかも非常に興味深いことに、ヒトRix1複合体には脱SUMO化酵素のSEN3が相互作用しており、PELP1とその相互因子Las1LとともにSEN3によって脱SUMO化され、さらにこのことがRix1複合体の核小体への局在に重要である可能性が示された<sup>5)</sup>。一方で、SEN3の有無に関わらずPELP1・TEX10・WDR18の相互作用は保たれることから、SUMO化はRix1複合体の形成ではなく、その局在にのみ影響を与えると考えられる。さらにヒトRix1複合体にはSEN3とLas1L以外にも、60S前駆体中で機能するNOL9やMDN1が相互作用しており、これらの因子はどれも32S rRNA前駆体のITS2切断に必要である<sup>6)</sup>。哺乳類細胞の場合、Rix1複合体は酵母よりも構成因子が多く、そしてSUMO化による制御を受けるなど、60Sサブユニット合成は酵母に比べより複雑な調節を受けていると思われる。興味深いことに、酵母ではRix1複合体 (Rix1・Ipi1・Ipi3) とMDN1の酵母ホモログRea1が核小体中の60S前駆体に移行することで、その中に含まれている哺乳類細胞のPeBoW複合体に相当するNop7-Erb1-Ytm1サブコンプレックスを60S前駆体から解離させる。これによって、Ssf1・Nsa1を目印とする初期の60S前駆体から、Rix1を目印とする中期の60S前駆体へと転換すると考えられている<sup>2)</sup>。

筆者らの結果と酵母での結果を哺乳類での60Sサブユニットの生合成に当てはめると、以下のようなシナリオが考えられる。1) 90S前駆体中から分割した初期の60S前駆体にはITS2の切断に関わるPeBoW複合体とp32-Nop52が含まれている、2) この初期60S前駆体中ではp32-Nop52が最初で次にPeBoW複合体という順番で相互作用する、3) p32を標的としてヒトRix1複合体が相互作用すると、4) PeBoW複合体が初期60S前駆体から解離し

て Rix1 複合体-p32-Nop52 を含む中期の 60S 前駆体が形成される (ただしこの際に Nop52 も同時に解離する可能性もある), というものである。このシナリオは今のところ筆者らによるまったくの推論でしかないが, 特定のトランス作用因子間の相互作用の変換で, 60S サブユニットの生合成の進行過程を説明できるという点で魅力的である。

酵母の場合, 核小体内の FC, DFC, GC から核質を経て細胞質に至るまでの 60S 前駆体の成熟過程の全体像がほぼ描けるようになってきた。一方で, 哺乳類では 60S 前駆体の構成因子やサブコンプレックスの特定はまだ道半ばであり, 60S 前駆体がどのような成熟過程を経ることでリボソーム 60S サブユニットが合成されるかは, その一端がようやく明らかになり始めたばかりである。明らかに, 酵母で見いだされた 60S サブユニットの生合成調整の機構の大部分が哺乳類でも保存されていると考えられるが, 筆者らは, ヒトの細胞において, 今回述べた p32 だけでなく, Treacle や parvulin (par14) など, 酵母では存在しないトランス作用因子が存在することを報告してきた。また Rix1 複合体が SUMO 化による制御を受けることをはじめ, 哺乳類は酵母とは異なる 60S サブユニット合成の調整機構も有している。さらに, ヒトのリボソーム生合成は, がんなどのさまざまな疾病とも深く関係している。たとえば, がん遺伝子産物である c-Myc は Rix1 複合体や PeBoW 複合体の発現量を上げ, リボソーム生合成を促進する。p32 の場合には, がん細胞で発現量が向上し, がん細胞の性質としてよく知られているワールブルク効果 (好氣的条件下で解糖系によるエネルギー生産を行う) の誘導にも関係する。このように, 哺乳類 60S サブユニットの合成の調節を含めたリボソーム生合成の調節機構の解明は, がんの発症機序の解明やその治療薬の開発という観点からより重要性を増すものと考えられる。

#### 4. 40S サブユニットの生合成の調節

リボソーム 40S サブユニット生合成に関わる因子も真核生物間で進化的に保存されており, その調節機構については差異を含みながらも, 共通している部分が多いと考えられる<sup>7,8)</sup>。そこで, 次にヒト 40S サブユニットの生合成について, 酵母において得られている知見を交えながら, その調節機構を概説する。

##### 1) 18S rRNA 前駆体のプロセシング

ヒトの場合, 40S サブユニットの核となる 18S rRNA は, 冒頭で述べた 47S rRNA 前駆体の ITS1 の切断で生じた 21S rRNA 前駆体が順次成熟のためのプロセシングを受けることで生じる (図 2B)。この 21S rRNA 前駆体は, 47S rRNA 前駆体のサイト 01, 02 のプロセシングで 45S rRNA 前駆体を生じた後に, 41S rRNA 前駆体を介した経路 (サ

イト A0, 1→2) と 30S を介した経路 (2→A0, 1) のどちらの経路からも生成しうる。また, サイト A0 と 1 の切断の順番により 43S や 26S rRNA 前駆体を経てから 21S rRNA 前駆体を生じる場合があり, どの経路を介するかは核外輸送の阻害やリボソームタンパク質の欠失などによっても変わることが知られている (図 2)。これらのことは, 生理的状态によってどの経路を経て 21S rRNA 前駆体を生じるかが決まることを示唆しており, 逆にどのような経路で 21S rRNA 前駆体が生じたかを知ることで生理的状态を推測することが可能になると思われる。しかし, 現時点では残念ながらそのような対応は必ずしも明らかになっていない。

酵母における 18S rRNA への成熟直前の前駆体は 20S rRNA 前駆体であり, この前駆体は PIN ドメインを持つ NOB1 エンドヌクレアーゼによるサイト D (ヒトにおけるサイト 3 に対応) の切断を細胞質において受け最終的に 18S rRNA へと成熟する (図 2B)。しかし, 酵母の 20S rRNA 前駆体が, ヒトの 21S rRNA 前駆体にそのまま対応するわけではない。ヒトの場合, 21S rRNA 前駆体はさらにプロセシングを受け, 18S rRNA への成熟直前の前駆体である 18S-E rRNA 前駆体を形成する。したがって, この 18S-E rRNA 前駆体が酵母の 20S rRNA 前駆体に相当すると思われる。最近, 21S rRNA 前駆体から 18S-E rRNA 前駆体種へのプロセシングに関して異なる二つのグループから報告がなされた<sup>9,10)</sup>。いずれの報告も, このプロセシングの進行に複数の 3'→5'エキソヌクレアーゼ (RRP6 を含むエキソソーム) やエンドヌクレアーゼ (RCL1, 未知の酵素) の酵素が関わるというものである。ヒトにおける主要な経路においては, 21S rRNA 前駆体は核内で 3'→5'方向へのエキソヌクレアーゼによるトリミングを受けるが, 別経路においては, サイト E でエンドヌクレアーゼにより切断され, 18S-E rRNA 前駆体と残りの ITS1 断片 (E-2) を生じる。E-2 は, 5'→3'エキソヌクレアーゼである XRN2 により速やかに除去される。ちなみに, XRN2 は 60S サブユニットを構成する 36S/32S rRNA 前駆体から ITS2 領域を除去する過程でも働いている。18S-E rRNA 前駆体の 3'→5'方向へのエキソヌクレアーゼによる 3' 末端側からのトリミングは, 核内でも行われるが, 細胞質に移行してからも継続される。最終段階である成熟 18S rRNA の形成は, 細胞質において酵母のサイト D に相当するサイト 3 が NOB1 のヒトホモログにより切断を受けることによりなされると考えられている<sup>9,10)</sup>。しかしながら, 18S-E rRNA 前駆体の末端配列は非常に不均一であるだけでなく酵母とヒトでは ITS1 配列自体がまったく異なっていることから, NOB1 ホモログが酵素の基質特異性という観点からサイト 3 を切断できるかどうか疑問がある。さらには, それ以前の問題として, 18S rRNA への最終成熟が

エンドとエキソのどちらのヌクレアーゼにより行われているかの結論さえも出ていない。このことは、逆にいうと、ヒトの18S-E rRNA 前駆体の最終成熟段階に複数の経路が存在することを示しているのかもしれない。

以上述べたように、18S rRNA 前駆体のプロセシングに関して、酵母とヒトで明確な違いが存在することも含め、近年の精力的な解析によってその調節機構の多くが明らかになってきている。これに対して、36S/32S rRNA 前駆体のプロセシングに関して、酵母とヒトとの間での違いについての解析はあまり進んでいない。たとえば、前述したXRN2の酵母ホモログであるRat1p自体のリボソーム生合成への関与は以前より知られていたが、高等生物におけるXRN2のリボソーム生合成への関与ですら明らかになったのはごく最近のことである。酵母とヒトとの間での前駆体rRNA プロセシングの類似点と相違点に関する解析はまだ始まったばかりといえる。

## 2) 40S サブユニット生合成におけるリボソームタンパク質の役割

酵母、ヒトともに40Sサブユニットは18S rRNA と33種類のリボソームタンパク質 (RPS) から構成される。したがって、40Sサブユニットの生合成においては、前項で述べた18S rRNA 前駆体から18S rRNA への成熟に加え、その工程でRPSが18S rRNA に適切に組み込まれる必要がある。このRPSの機能としては、成熟リボソームにおける翻訳の効率・正確さを規定することや構造的安定性を保つことなどがあげられるが、生合成段階における役割も報告されている。ヒトおよび酵母の40サブユニットの生合成過程に形成される40S前駆体に含まれるRPSの網羅的なプロテオミクス解析およびノックダウン解析によって、RPSには初期のプロセシング・アセンブリーに必要な“開始”RPSと“進行”RPSの二つのグループに分類されることがわかった。40Sサブユニットは構造的に大きくbody, platform, headの三つの領域に分けられるが、“開始”RPSはbodyおよびplatform領域に集中している。これに対し“進行”RPSはhead領域に存在している。body, platform, head領域は、ほぼこの順番にRPSのアセンブリーを進行させ、body領域のアセンブリーは単独で起こりうるが、platform, head領域のアセンブリーはその前の領域の状態に依存すると考えられている(勾配アセンブリー仮説“assembly gradient” theory)。この仮説は、body領域に存在するRPSの多くが転写と共役したプロセシングに必要であるとの知見と一致する<sup>11)</sup>。ヒトの場合、サイト1, A0, 2の切断をRPSが制御しており、実際に、“開始”RPSの欠損は初期のプロセシング中間体である30S rRNA 前駆体の蓄積を引き起こし、“進行”RPSの欠損は26S, 21S, 18S-E rRNA 前駆体などのサイト2切断以降の

さまざまなプロセシング中間体の蓄積を引き起こす。細菌のリボソーム小サブユニットの*in vitro*アセンブリーの実験においても、body領域でのrRNAの折りたたみとRPSのアセンブリーが最初に起こり、そこを構造的基盤として順次、platform, headの構造が形成されていくことが示されている。この結果は、ヒトおよび酵母の*in vivo*で得られた知見とほぼ一致しており、“機能的な”リボソームの形成には、RPSのアセンブリーの順番の厳密な制御が必要とされることを示している。このように、18S rRNA 前駆体の折りたたみおよびプロセシングがRPSそのものによって制御かつチェックされているものと考えられる。通常、新規合成されたリボソームタンパク質は速やかに核小体に移行し、リボソーム生合成に寄与すると考えられていることから、これらのことは、リボソームタンパク質の翻訳とリボソーム生合成が互いを監視し合いながら、全体としてタンパク質合成を調整するという制御機構の存在を示しているのかもしれない。

## 3) 40S サブユニット生合成におけるトランス作用因子の役割

40Sサブユニットの生合成に関わるトランス作用因子も、主に酵母の解析から同定されている。それらとしては、40S前駆体を含む90S前駆体としての構成成分を含めると約50種類であるが、40S前駆体が粒子として独立した後の段階で関わるものは非常に少なく10種類程度である<sup>7)</sup>。前者には、40Sサブユニットの形成に関わるとして命名されたSSUプロセソーム (small sub-unit processome) の構成成分25種類が含まれている。後者としては、TSR1, PNO1, NOB1, LTV1, RIO2, ENP1, DIM1があげられる。その後、これらのホモログはヒトの40S前駆体中に存在することが確かめられた。これらの中で、特にRIO2のヒトホモログ (hRIO2, 以後ヒトのタンパク質の場合タンパク質の名称の前に“h”を記載) については詳細な解析が行われ、多岐にわたる機能を持つことが明らかになっている<sup>8)</sup>。hRIO2の機能としては、40S前駆体の核外輸送 (hRIO2内の核外輸送シグナル配列に基づく機能)、18S-E rRNA 前駆体から成熟18S rRNA へのプロセシングへの関与およびトランス作用因子の40S前駆体からの解離促進・リサイクルなどがあげられる。hRIO2はタンパク質としてはキナーゼに分類され、自己リン酸化能を持つが、生体内での本来の基質は不明である。しかし、hRIO2のキナーゼ活性は18S-Eから18S rRNAへの最終成熟およびhLTV1, hPNO1, hNOB1の前駆体からの解離に必須で、hENP1の前駆体からの解離には不要であることがわかっている。このことは、hRIO2がトランス作用因子の会合状態が異なる複数の40S前駆体上でそのキナーゼ活性およびその活性を介さない機能を発揮することで40Sサ

ブユニットの生合成制御に関わっていることを示唆している。さらに、最近、このようなトランス作用因子の会合解離状態が、40S 前駆体の翻訳機能の制御に関わることを示す報告が、酵母の前駆体 40S サブユニットのクライオ電子顕微鏡による観察によりなされた<sup>12)</sup>。すなわち、40S 前駆体において、ENP1 と LTV1 は翻訳時に mRNA が入り込む溝をふさいでおり、また、DIM1, TSR1, RIO2, PNO1, NOB1 が翻訳開始因子 eIF1, eIF1A, eIF3 の結合を防ぐように配向することが示された。このことは、40S 前駆体が成熟の途中で翻訳機能を示すのを防ぐために、機能発現に重要な領域にトランス作用因子を結合させている可能性を示唆するものである。さらに、TSR1 は 40S と 60S サブユニットの会合面に存在し、このことが機能的な 80S リボソームの形成を防ぐ役割をしていると考えられる。一方で、酵母では 20S rRNA を含む 40S 前駆体が 80S リボソームおよびポリソーム中に存在しうることが報告されている<sup>11)</sup>。これらの報告は、細胞質での 40S サブユニットの最終成熟に至るまでに TSR1 を含まない 40S 前駆体が存在している可能性も示している。このようなさまざまな報告がなされる中、筆者らはヒト 40S サブユニットの最終成熟直前の前駆体の解析を行い、ポリ A テールのエキソヌクレアーゼとして知られる PARN が最終成熟に関わる段階に参与する可能性を見いだしている（未発表データ）。最終段階の調整は今まで信じられているよりも複雑かもしれない。いずれにせよ、40S 前駆体が 80S リボソームやポリソームを形成しているということは、40S サブユニットの最終成熟に至る前に翻訳機能をチェックする品質管理機構が存在していることを示唆している。残念ながらヒトの 40S 前駆体についてはまだ構造解析がなされておらず、酵母の 40S 前駆体と同様の構造を形成するかについては定かではない。今後、ヒトの 40S 前駆体の構造解析および個々のトランス作用因子の生化学的解析と併せてヒト 40S サブユニットの生合成の全容を明らかにすることが必要と思われる。

## 5. リボソーム生合成と疾病

前項までで述べたように、60S, 40S サブユニットの生合成は、rRNA 前駆体、RP とトランス作用因子の数百種のタンパク質—RNA が関わるきわめて複雑な反応経路を経て行われる。この生合成は、増殖期にある細胞が消費する全エネルギーと物質の 7~8 割も必要とする細胞のタンパク質生産ひいては生存に必須なプロセスである。したがって、そのプロセスの異常は細胞にとって致命的な影響を与えると予想され、個体にとっては胚性致死となると考えられてきた。しかし、近年、RP やリボソーム生合成と関連する因子の遺伝的変異を原因とする疾病が次々と報告され、また、非常に興味深いことに、リボソームがタンパ

ク質合成というすべての細胞にとってきわめて普遍的な機能を持つにも関わらず、これらの疾病の多くは組織特異的な症状を持つことが示された（表 1~3）。ここでは、疾病と関連するリボソーム生合成因子として、近年興味深い知見が得られたプロセッシングにおいて機能する 2 種類の因子（DKC1 : box H/ACA snoRNA, SNORD116 : box C/D snoRNA）を簡単に紹介し、最後に筆者らが初めてリボソーム生合成との関連を示した主に転写時に機能する Treacle について、リボソーム生合成での役割と変異により発症する疾病との関連を紹介したい。

### 1) 先天性角化不全症（DC : dyskeratosis congenita）

DC は、皮膚萎縮、爪形成不全、口腔内白斑といった皮膚粘膜炎異常を特徴とし、骨髄形成不全や、免疫不全、悪性腫瘍のリスク上昇を伴う遺伝性疾患である<sup>13)</sup>。DC の 30% が *DKC1* 遺伝子の異常で発症し（X 連鎖劣性遺伝疾患）、また、非常にまれではあるが、*NHP2* または *NOP10* 遺伝子の異常でも発症する（常染色体劣性遺伝疾患）。いずれの遺伝子もリボソーム生合成に関わるトランス作用因子をコードし、その産物（*DKC1*, *NHP2*, *NOP10*）は主に細胞内のリボソーム生合成の場である核小体および核内低分子 RNA の成熟の場である核内構造体カハール体に局在する。*DKC1* は、*NHP2*, *NOP10*、そしてもう 1 種類のトランス作用因子 *GAR1* とともに、box H/box ACA という 2 種類の共通配列を持つ box H/ACA snoRNA（または scaRNA）と結合することで box H/ACA RNA タンパク質複合体（H/ACA RNP）を形成する。H/ACA RNP は rRNA の特定のウリジン残基のシュードウリジン化反応を担うことで、リボソームによる翻訳の忠実性や IRES（配列内リボソーム進入部位）依存的な翻訳開始に影響を与える役割を持つ。一方で、*DKC1*, *NHP2*, *NOP10* はテロメア伸長を担うテロメラーゼの構成因子であり、テロメラーゼの触媒サブユニットである *TERT* と RNA コンポーネントである *TERC* とともにテロメアーゼ複合体を形成する。DC 患者由来の細胞では、テロメア長の短縮が特徴的にみられ、*DKC1*, *NHP2*, *NOP10* に加え、*TERT* や *TERC* も DC の原因遺伝子であることから、一般的に DC はテロメア維持能の欠陥で発症すると考えられている。しかし、*DKC1* 変異による DC 患者細胞では IRES 配列を持つ一部の mRNA 群の翻訳異常が報告されており、テロメア長の維持だけではなく、リボソーム生合成の障害と複合的な要因で症状が発現する可能性も考えられている<sup>14)</sup>。

### 2) プラダー・ウィリー症候群（PWS : Prader-Willi syndrome）

PWS は新生児での筋緊張低下、低身長、過食と肥満、性腺発育不全などのさまざまな特徴を示し、15,000 人に 1

表1 リボソーム生合成因子と関連した遺伝子疾患

遺伝子名		細胞内機能	疾患名	臨床症状	遺伝形式と発症頻度
ヒト	酵母				
<i>TCOF1</i>		rDNA 転写, 18S rRNA のメチル化	トリーチャー・コリンズ症候群	顔面形成異常	常染色体優性遺伝, 5万人に1人
<i>UTP14C</i>	<i>UTP14</i>	18S rRNA の成熟化	男性不妊症	精子減少症	未知
<i>CIRH1A</i>	<i>UTP4</i>	18S rRNA の成熟化	北米インディアン小児肝硬変 (NAIC)	新生児黄疸, 胆汁性肝硬変	常染色体劣性遺伝, 100例以下
<i>EMG1</i>	<i>EMG1</i>	40S サブユニットの成熟化	ポーエン・コンラディ症候群	精神運動遅滞, 成長障害	常染色体劣性遺伝
<i>RBM28</i>	<i>NOP4</i>	60S サブユニットの成熟化	ANE 症候群	頭髪異常, 神経学的異常, 内分泌障害	常染色体劣性遺伝
<i>SBDS</i>	<i>SDO1</i>	60S サブユニットの成熟化と核外輸送	シュバツハマン・ダイアモンド症候群	発育障害, 膝外分泌異常による吸収障害, 血液障害, 骨格異常	常染色体劣性遺伝
<i>WDR36</i>	<i>UTP21</i>	18S rRNA の成熟化	原発開放隅角緑内障	視神経障害	
<i>HCA66</i>	<i>UTP6</i>	18S rRNA の成熟化	神経線維腫症1型	皮膚神経線維腫, カフェ・オレ斑	常染色体優性遺伝, 3,000人に1人

I-3章の表1, II-5章の表1, III-6章の表1も参照.

表2 snoRNA と関連した遺伝子疾患

遺伝子名		細胞内機能	疾患名	臨床症状	遺伝形式と発症頻度
ヒト	酵母				
<i>DKC1</i>	<i>CBF5</i>	box H/ACA snoRNPs によるシュードウリジン化 テロメアーゼ複合体の安定化	先天性角化不全症	爪形成不全, 口内白斑, 皮膚萎縮, 精神発達遅滞	X連鎖優性疾患, 100万人に1人
<i>NHP2</i>	<i>NHP2</i>	box H/ACA snoRNPs によるシュードウリジン化 テロメアーゼ複合体の安定化	先天性角化不全症	皮膚粘膜異常, 骨髄機能不全	常染色体劣性遺伝
<i>NOP10</i>	<i>NOP10</i>	box H/ACA snoRNPs によるシュードウリジン化 テロメアーゼ複合体の安定化	先天性角化不全症	皮膚粘膜異常, 骨髄機能不全	常染色体劣性遺伝
<i>SNORD116</i>		box C/D snoRNA, 機能未知	ブラダー・ウィリー症候群	新生児筋緊張低下, 低身長, 肥満, 性腺発育不全	父親側常染色体インプリンティング
<i>RMRP</i>	<i>NME1</i>	5.8S, 60S サブユニットの成熟化	軟骨毛髪低形成症	軟骨形成不全を伴う低身長や毛髪異常, 免疫不全, リンパ腫の好発	常染色体劣性遺伝

表3 リボソームタンパク質と関連した遺伝子疾患

遺伝子名		細胞内機能	疾患名	臨床症状	遺伝形式と発症頻度
ヒト	酵母				
<i>RPS7</i>	<i>RPS7A</i> <i>RPS7B</i>	18S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPS17</i>	<i>RPS17A</i> <i>RPS17B</i>	18S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPS19</i>	<i>RPS19A</i> <i>RPS19B</i>	18S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPS24</i>	<i>RPS24A</i> <i>RPS24B</i>	18S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPL5</i>	<i>RPL5</i>	28S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPL11</i>	<i>RPL11A</i> <i>RPL11B</i>	28S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPL35A</i>	<i>RPL33A</i> <i>RPL33B</i>	28S rRNA の成熟化	ダイヤモンド・ブラックファン症候群	貧血症, 骨髄機能不全	常染色体優性遺伝
<i>RPS14</i>	<i>RPS14A</i> <i>RPS14B</i>	18S rRNA の成熟化	5q-症候群	大赤血球性貧血, 骨髄異形成症候群	—



人の割合で発症する遺伝性疾患である。PWSの原因遺伝子領域は15番染色体q11-q13であり、この領域は本来、父親由来の遺伝子のみが発現するゲノムインプリンティングにより遺伝子発現制御されている。そのため、PWSは父親由来のこの遺伝子領域の欠損もしくは、母親由来のゲノムインプリンティングダイソミー（染色体またはその一部が一对とも母親に由来）により発症する。PWSが15番染色体q11-q13領域のどの遺伝子に起因するかについてはまったく不明であったが、最近になって、rRNAの2'-O-リボースメチル化修飾に関するbox C/D型snoRNA群が存在し、中でもHBII-85 snoRNA (SNORD116)がPWSの原因遺伝子の有力な候補であることが明らかになった<sup>15)</sup>。しかし、現時点でSNORD116がメチル化標的とするrRNAサイトは見つかっておらず、リボソーム生合成とどのように関連しているか不明である。今後の研究の進展により、PWSとリボソーム生合成と関連性が明らかになることを期待したい。

### 3) トリーチャー・コリンズ症候群 (TCS: Treacher Collins syndrome)

TCSは常染色体優性遺伝疾患で、聴覚器、顔面骨、下顎、頬部の形成異常を特徴とした、下顎顔面骨形成不全症である。50,000人に1人の新生児でみられ、原因遺伝子であるTCOF1の遺伝子変異により、遺伝子産物であるTreacleの発現異常が原因となり発症する。TCSにみられるTCOF1遺伝子変異は、遺伝子欠損、遺伝子挿入、ミスセンス変異、スプライシング異常などさまざまであるが、TCSではいずれも不完全長のTreacleが発現し、細胞内でのTreacleの機能欠損が原因となり発症する。細胞内において、Treacleは、核小体内の主にrRNAの転写が行われるFCに局在し、rDNA転写因子であるUBF (upstream binding factor) やrRNA合成を担うRNAポリメラーゼI (Pol I) とともにrRNA転写過程で機能する。また、rRNAのプロセッシングで機能するNop56と相互作用し18S rRNAのメチル化に関与する。したがって、Treacleはリボソーム生合成の転写からプロセッシングまでの多くの段階で機能を持つことが予想され、これらの事実から、TCSはリボソーム病と推測された。一方で、胚発生過程において、Treacleは表皮外胚葉と神経管の間に存在する神経堤細胞の増殖と形成に関与する。これに加え、Treacleのハプロ不全マウス（遺伝子変異により産物が50%に減少し、その結果遺伝子の機能を喪失）では、神経上皮細胞のp53依存的な増殖抑制とアポトーシスがみられTreacleの機能欠陥による神経堤細胞の形成障害がTCSの原因であるとの報告から、TCSがリボソーム病ではないと考えられた<sup>16)</sup>。しかし、Treacleのハプロ不全マウス由来の神経上皮細胞では成熟リボソームが野生株と比べ少ないこと、TCOF1

に変異がない場合でもPol IのサブユニットであるPOLR1D, POLR1Cの変異によりTCSが発症することが報告され、TCSはリボソーム病であるという説が再浮上している<sup>17)</sup>。これらの相容れない報告は、TCSでは、胚発生過程の神経堤細胞において、タンパク質生産に必要なリボソームが十分合成されずストレスとなり、それがp53依存的な神経堤細胞の増殖抑制に伴う形成障害を起こしTCSの発症の原因となる、と考えれば説明がつく。しかし、Treacleは胎児期の多様な細胞で発現しているため、なぜ神経堤細胞に特異的な障害だけが現れるかについてはわかっていない。筆者らは、これらの不明な点を明らかにするためには、Treacleのリボソーム生合成における役割の詳細を明らかにする必要があると考え、Treacleのリボソーム生合成における役割の解析を進めている。今回は、紙面の関係上、詳細にふれないが、今まで得られた結果を簡単に紹介して本稿の最後としたい。TreacleがNop56と相互作用し、リボソーム生合成の初期段階に形成されるリボソーム前駆体に含まれることはすでに報告した<sup>18)</sup>。筆者らは、その後、Treacleおよびそのドメイン変異体の発現量を制御できる薬剤誘導株を樹立し、それらが相互作用しうるタンパク質を詳細に解析した。その結果によると、TreacleはrRNAに結合する前の段階でRPと複合体を形成し、また転写に関わる因子やヌクレオソームの形成に関わる因子とも複合体を形成している。4-2)項でRPSのrRNAへの組み込みの順番についてふれたが、TreacleがrRNAにRPを組み込む際にRPを選別して供給する役割を担っている可能性がある。また、筆者らは、TreacleはrDNA上のエピジェネティックな修飾も制御しているとの結果も得ており、リボソーム生合成において、転写とRP供給のバランスを制御していると考えている。今後、これらの可能性を明らかにし、TreacleとTCSに関して今まで不明な点を明らかにしていきたいと考えている。

### 文 献

- 1) Yoshikawa, H., Komatsu, W., Hayano, T., Miura, Y., Homma, K., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Miyazawa, N., Tachikawa, H., Yamauchi, Y., Isobe, T., & Takahashi, N. (2011) *Mol. Cell Proteomics*, 10, M110.006148.
- 2) Kressler, D., Hurt, E., Bergler, H., & Bassler, J. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, 1823, 92-100.
- 3) Strezoska, Z., Pestov, D.G., & Lau, L.F. (2000) *Mol. Cell Biol.*, 20, 5516-5528.
- 4) Hölzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., & Eick, D. (2005) *J. Cell Biol.*, 170, 367-378.
- 5) Finkbeiner, E., Haidl, M., Raman, N., & Muller, S. (2011) *Nucleus*, 2, 527-532.
- 6) Castle, C.D., Cassimere, E.K., & Denicourt, C. (2012) *Mol.*

- Biol. Cell*, **23**, 716–728.
- 7) Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., & Hurt, E. (2006) *Nature*, **441**, 651–655.
  - 8) Zemp, I., Wild, T., O'Donohue, M.F., Wandrey, F., Widmann, B., Gleizes, P.E., & Kutay, U. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 1167–1180.
  - 9) Sloan, K.E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G.J., & Watkins, N.J. (2013) *J. Cell Biol.*, **200**, 577–588.
  - 10) Preti, M., O'Donohue, M.F., Montel-Lehry, N., Bortolin-Cavaillé, M.L., Choismel, V., & Gleizes, P.E. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4709–4723.
  - 11) Karbstein, K. (2011) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 657–663.
  - 12) 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.
  - 13) Nelson, N.D. & Bertuch, A.A. (2012) *Mutat. Res.*, **730**, 43–51.
  - 14) Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., & Ruggero, D. (2006) *Science*, **312**, 902–906.
  - 15) Peters, J. (2008) *Nat. Genet.*, **40**, 688–689.
  - 16) Jones, N.C., Lynn, M.L., Gaudenz, K., Sakai, D., Aoto, K., Rey, J.P., Glynn, E.F., Ellington, L., Du, C., Dixon, J., Dixon, M J., & Trainor, P.A. (2008) *Nat. Med.*, **14**, 125–133.
  - 17) Dauwerse, J.G., Dixon, J., Seland, S., Ruivenkamp, C.A., van Haeringen, A., Hoefsloot, L.H., Peters, D.J., Boers, A.C., Daumer-Haas, C., Maiwald, R., Zweier, C., Kerr, B., Cobo, A. M., Toral, J.F., Hooeboom, A.J., Lohmann, D.R., Hehr, U., Dixon, M.J., Breuning, M.H., & Wieczorek, D. (2011) *Nat. Genet.*, **43**, 20–22.
  - 18) Hayano, T., Yanagida, M., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Isobe, T., & Takahashi, N. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 34309–34319.
-