

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-4 リボソームの品質管理機構～選択的分解から修復まで

北 島 真

リボソームは多くの機能ドメインをもった巨大複合体である。このようなリボソームの合成途上にエラーがあったり、成熟したリボソームが細胞内外のストレスにより損傷した場合、リボソームの正常な機能が失われることがある。細胞はこのような機能不全リボソームの生成を防ぐと同時に、生成した機能不全リボソームを認識して選択的に除去する品質管理機構をそなえていることが、近年の研究から明らかになってきた。本稿では、出芽酵母の系をもちいて解明されたりボソーム品質管理のさまざまな機構を解説すると同時に、最近になって報告された動物細胞の核小体における損傷塩基の修復などの興味深い知見を紹介する。

1. はじめに

さまざまな原因で細胞内には機能不全リボソームが発生する。細胞は多様な機能不全リボソームに対して、どのように対処し、リボソームの品質の維持を行っているのだろうか。

機能を失った分子を取り除いて品質管理を行うために細胞がとる方法は大きく分けて二つある。一つは DNA 修復のようにエラーを訂正して正しい分子に戻す方法であり、もう一つは mRNA の品質管理のように間違った分子を選択的に分解して新たに正しい分子を作り直す方法である。リボソームのような複雑な構造体の場合、多様な位置に起こるエラーを個別に修復するのはきわめて困難だと予想される。実際にこれまでに行われた研究から、細胞は機能しない異常リボソームを多くの場合選択的に分解することでリボソームの品質を維持していることが明らかになってきた。

リボソームの品質管理は、真核生物の場合、核内で rRNA が転写されプロセシングされた直後から、細胞質で最後の成熟化を行い、実際に 80S としてタンパク質合成に関与する段階まで、ほぼすべての過程にわたって存在しているらしい。特にリボソームの合成段階では、異常分子を分解する経路だけでなく、「正しく合成された中間体だけを次のステップに進ませる」ための仕掛けが多数用意されており、最終産物である成熟リボソームの品質を保証するために寄与している。リボソームはそれ自体が巨大分子であるばかりでなく、合成過程にも多くのエネルギーが必要となるため、異常のある分子をできるだけ合成初期に排除することでエネルギーを節約しているのだろう。

本稿ではまず、最も研究の進んでいる出芽酵母の系を中心に、近年急速に明らかになってきているリボソームの品質管理機構を概説する。発見の時系列にできるだけ沿って解説した後で、ヒトや細菌を材料として最近報告された興味深い例を紹介したい。

2. 核内でのリボソーム合成の品質管理

核内でのリボソーム前駆体は品質管理機構により監視されている (図 1)。

2006 年に Dez らは、出芽酵母の核内のリボソーム前駆体に対して品質管理機構が存在していることを見だし

京都大学ウイルス研究所 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53)

Quality control of ribosomes

Makoto Kitabatake (Institute for Virus Research, Kyoto University, Shougoin-Kawaharacho 53, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

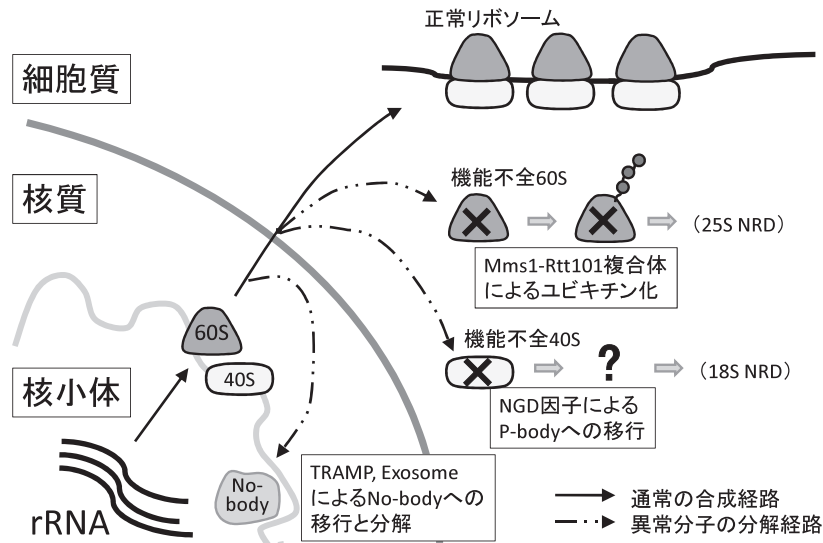


図1 真核生物リボソームの品質管理

た¹⁾。彼らはまず、HEAT (Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and the yeast kinase TOR1) リピートを持つタンパク質 Sda1 の温度感受性株では制限温度下で 40S と 60S の核外輸送が阻害され、核内で分解されることに気がついた。分解前の 60S に含まれる 27S rRNA 前駆体を調べると、3'末端に通常にはないポリ(A)が付加されていた。変異体をもちいた解析から、このポリ(A)付加には TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation) 複合体が必要であり、TRAMP 複合体の構成因子である Trf4 が欠損した株ではポリ(A)付加と、60S 前駆体の分解の両方が抑圧されることがわかった。TRAMP 複合体によるポリ(A)付加は通常エキソソームによる 3'末端からの分解を誘導するが、実験の結果、エキソソームの構成因子 Rrp6 の欠損によっても 60S 前駆体の分解が抑圧されることが明らかになった。

興味深いことに、非制限温度下に *sda1* 温度感受性株を置くと、温度シフト直後には核質全体に 40S 前駆体と 60S 前駆体が分布しているのだが、その後時間が経過するにつれて核小体の一部に非常に強い rRNA のシグナルが点状に現れることがわかった。この点状の新規構造体にはエキソソームと TRAMP 複合体が濃縮していた。これらの構造体への rRNA の集積は、Trf4 や Rrp6 の欠損株ではみられないことから、TRAMP 複合体とエキソソームは協力して、核内にとどめられているリボソーム前駆体をこの新しい点状構造体に集積させ、分解する役割を持つことがわかった。

Sda1 の温度感受性株のみならず、リボソームの核外輸送因子である Crm1 の温度感受性株でも同様の点状シグナルの集積がみられることから、核外へ輸送されずに核内に異常に長くとどまっているリボソーム前駆体は、どのような理由でとどまっているかに関わらず、この構造体(彼ら

は No-body と名づけている) に集積して分解されている可能性がある。リボソームの合成経路においては、一つ一つの構成因子が箱根細工のように順番通り組み合わせ、正しい前駆体構造をとって初めて、核外輸送因子が結合できるようになる。核内に異常に長くとどまっている分子には何らかの欠損があると判定されるのだろう。しかし現在のところ細胞がどのようにして、リボソーム前駆体の核内係留時間を測っているのかはわかっていない。今後詳しい解析が必要だろう。

3. 成熟した 40S・60S サブユニットに対する品質管理

1) 機能不全 rRNA 分解機構 (NRD) の発見

2006 年、Dez らの報告と前後して、LaRiviere らは成熟した 40S・60S サブユニットもそれぞれ品質管理の対象になっているという興味深い報告を行った。彼らは 40S に含まれる 18S rRNA の活性中心や、あるいは 60S に含まれる 25S rRNA の PTC (Peptidyl Transferase Center) に変異を持つリボソームは、どちらも機能不全リボソームになること、またどちらも細胞内で迅速に分解されることを見いだした²⁾。

彼らは変異 rRNA の安定性を研究するにあたり、プラスミドから RNA ポリメラーゼ II (RNA Pol II) を使って rRNA を発現させるシステムを利用した。これらの rRNA には、18S と 25S にそれぞれ短いタグ配列が挿入されており、ゲノムから合成されるリボソームから区別することができるように工夫されていた。これらのタグ配列を導入した位置は、rRNA 上のほとんど保存されていない短いループであり、挿入によってリボソームの機能は阻害されることが、RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株をこのプラスミドで (RNA Pol II により転写させた rRNA で) 相補さ

せる実験から示された。18Sや25Sの重要塩基に変異を導入したプラスミドではこの株の増殖を相補する活性は完全に失われたことから、変異によりリボソームの機能が阻害されたことが確認された。これらの機能不全変異を持つ18Sや25S rRNAは、60分前後の半減期で急速に分解されることが示された。

これらの変異RNAを発現した細胞からリボソームを調製し、シヨ糖密度勾配遠心にて分画したところ、変異RNAは完全に成熟した40Sや60Sの位置に取り込まれ、80Sにも一部は取り込まれていることが示された。このことから、塩基置換があるにも関わらず、Dezらの示したNo-bodyでの分解経路に入ることなく、変異rRNAは通常どおりのアセンブリープロセスを経て最終的に成熟サブユニットまで完成していることが示唆されている。その後、何らかの形で細胞はリボソームの異常を検知して、選択的にこれらのサブユニットを分解しているようだった。以上の結果から彼らは、機能不全rRNAの分解機構を総称して、nonfunctional rRNA decay (NRD)という名前を提唱した。

2) 18S NRDの機構

彼らはさらにこの経路の研究を続け、40Sサブユニットの品質管理(18S rRNAの分解経路なので、18S NRDと呼ばれる)に関与するタンパク質を同定した³⁾。

彼らはまず、18S NRDと25S NRDの両方について、翻訳阻害剤によるrRNA分解速度への影響を検証した。すると興味深いことに、18S NRDと25S NRDでは阻害剤に対する反応が異なることがわかった。25S NRDの基質は翻訳阻害剤を加えた細胞でも通常どおりに分解が継続したが、対照的に18S NRDの基質の場合には分解が完全に停止していることが観察された。

この観察からヒントを得て彼らは、18S NRDにはmRNA品質管理の経路が関与しているのではないかと考えた。nonsense-mediated mRNA decay (NMD)やno-go decay (NGD)、nonstop decay (NSD)など(これらの経路については稲田利文博士の項を参照)、多くの異常mRNAの細胞内での分解経路はどれも18S NRDのケースのように翻訳阻害剤に感受性であるためである。実際にこれらmRNA品質管理の経路に関わる因子を一つずつノックアウトした細胞で調べてみると、no-go decayに関わる因子であるHbs1あるいはDom34を欠損した細胞では18S NRDが大きく遅延することが明らかになった。これら二つの因子は、mRNA上の二次構造の影響のために翻訳途上の80Sリボソームが停滞した状態を認識し、Aサイトに入って80Sを分離させる役割を果たしていると考えられている。18S NRDの基質として使われた機能不全18S rRNA変異は、mRNAのコドンを認識するデコーディングセンターに変異を持ち、Aサイトに入ってきたtRNA

が(仮に正しいアンチコドンを持っている場合でも)正しく保持されないような欠陥をもっている。そのためこのような変異18S rRNAを持つリボソームも、mRNAに二次構造がある場合と同様にmRNA上に停滞してしまうと考えられ、そのためにno-go decayに関わる因子が両方の経路に関与してくるものと思われた。

彼らはその他にも18S NRDの基質がその後、異常mRNAの分解の場として知られているP-body (processing body)に運ばれてXrn1とエキソソームの両者により分解されることを示しており、下流のRNA分解過程においてもmRNA品質管理と18S NRDとの共通因子が使われていることが明らかにされている。

3) 25S NRDの機構

筆者らは2004年から25S rRNAの品質管理機構に興味を持ち、LaRiviereらとほとんど同じ系を用いて実験を行ってきた。その後2006年にLaRiviereらによるNRD発見の報告がなされたため、研究の方向を現象の記述から関与する因子の解明に変えて、スクリーニングを継続した⁴⁾。

前述したとおり、酵母の25S rRNAの機能に影響を与えない部分に短いタグ配列を挿入し、このRNAを含む35S rRNA全体をプラスミド上のPol IIプロモーターから転写させる系を筆者らも使用した。この系でPTCに点変異を導入すると機能不全25S rRNAを細胞内で転写させることができるが、LaRiviereらの観察と同様に、このような機能不全25S rRNAは細胞内で迅速に分解され、変異のない25S rRNAを発現した場合と比較すると20%程度しか全RNA中に存在しないことがわかった。

出芽酵母にはおよそ6,000個の遺伝子があるが、そのうち5,000個は生育に必須ではなく、遺伝子破壊株を作製することができる。筆者らはこのような5,000株の遺伝子破壊株コレクションを購入し、25S NRD基質を発現するプラスミドをそれぞれに導入し、変異25S rRNAが分解されずに細胞内に蓄積するような株をスクリーニングした。

最終的に5,000株の中から、25S NRDに必要な二つの因子が同定された(図2)。それらはMms1とRtt101であり、同じユビキチンE3リガーゼ複合体の構成因子だった。これらの因子の欠損株で変異25S rRNAの安定性を確認したところ、調べた変異25S rRNAのすべてで分解は完全に停止していることがわかった。さらに興味深いことに、野生株に機能不全25S rRNAを発現した酵母からリボソームを精製し、免疫ブロットにより調べたところ、変異25Sの発現によりリボソーム画分に含まれるユビキチン化タンパク質のシグナルが増強することが示された。これらのシグナルは40、50、60 kDの長さに階段状に現れていることから、一つあるいはきわめて少数のリボソーム結合タンパク質が、機能不全25S rRNAの存在を目印にユビキチン化を受けているものと考えられた。Mms1あるいは

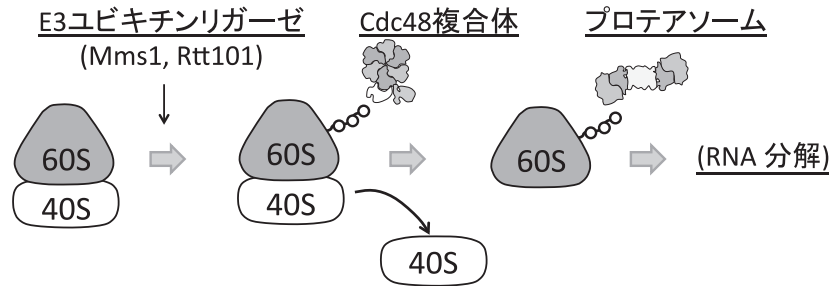


図2 25S NRD 経路

Rtt101 を欠損した変異株と同様にリボソームを精製して調べたが、そのような株から得たサンプルでは変異 25S rRNA の発現の有無に関わらず、階段状のユビキチン化シグナルは一切観察されなかった。

以上の観察から筆者らは、機能を失うような変異を持った 25S rRNA が細胞内に出現した場合、このような RNA は成熟 60S や、場合によっては 80S にまで取り込まれるが、その段階で細胞内のユビキチンリガーゼ複合体に認識され、ユビキチン化を受ける。このことが目印となって機能不全リボソームの分解が始まる、このような仕組みが存在すると結論した⁴⁾。

最近になって筆者らは、酵母の生育に必須な遺伝子を Tet-off プロモーターで条件的に抑制することで、25S NRD に関わる因子をさらに同定することに成功した⁵⁾。Mms1 や Rtt101 が含まれる E3 ユビキチンリガーゼの結合因子である Cdc34 や、ユビキチン化された基質をプロテアソームに運ぶ役割がある Cdc48-Npl4-Ufd1 複合体、さらにはプロテアソームの構成因子そのものも 25S NRD に必要とされることが明らかになった。また、機能不全 25S rRNA に MS2 タグ配列を導入することで、変異 25S rRNA を含むリボソーム粒子だけを選択的に回収する仕組みを構築し、リボソームのユビキチン化が機能不全粒子だけに選択的にみられるものだとすることを明らかにした。つまり 25S NRD においては、機能不全リボソームが Mms1 と Rtt101 を含む E3 リガーゼにより選択的にユビキチン化され、そのユビキチンを目印に Cdc48 複合体が結合してプロテアソームをリクルートし、プロテアソームが何らかのタンパク質の分解を行う。こうすることで初めて、それまでリボソームタンパク質に覆われ大切に守られていた rRNA が溶媒側に露出することになり、RNase による分解が開始される、という順番が明らかになってきた。

なお 25S NRD の場合には、18S NRD の場合と違って、どのようにして機能不全リボソームが選択的に認識されるのか、最初の重要なステップがまだ理解できていない。今後の解析が必要な点である。

4. 細胞質での 40S・60S 成熟化最終段階における機能の確認

1) 40S サブユニット成熟段階での品質管理

成熟した状態になるまで、ブロックタンパク質で保護されている、というのがリボソーム合成時の基本的なシステムらしい。これらのブロックタンパク質は、細胞質に輸送されたサブユニット前駆体が成熟化過程を終える最終段階において、最後の機能確認試験を通過した上で外される。40S においても 60S においても、そのようなシステムが報告されている。数多くの研究があるが、ここでは近年の代表的なものを紹介したい。

2011 年に Strunk らは、40S の合成段階後期の複合体を出芽酵母から精製してクライオ電子顕微鏡にて観察し、興味深い構造を見いだした⁶⁾。彼女らは、アセンブリー因子に融合したタグ配列を用いて、出芽酵母の細胞質から後期の 40S 前駆体を精製しクライオ電子顕微鏡によってその構造を解明した。この前駆体に含まれる七つの成熟化因子の位置を明らかにしたところ、興味深いことに、これらの因子はすべて、翻訳開始の各ステップをそれぞれ阻害する場所に結合していることがわかった。これらの因子は協力して、翻訳開始因子の 40S への結合を妨害し、40S に存在する mRNA が結合するチャネルが開くのを阻害し、60S の結合をブロックし (Tsr1 を欠乏させると、プルダウンされる 40S 前駆体に 60S が結合してくることからそのように推論されているが、これは後の論文で解釈の間違いだったと判明している。後述)、tRNA のアンチコドンが結合する部位をふさいでいた。このように複数のステップを同時に止めることで、細胞は未成熟な 40S 前駆体が翻訳の場である 80S に導入されてしまう事故を確実に防いでいるのだろうと考えられた。

2012 年になって同じグループより、40S 前駆体の細胞質における成熟化の経路がより詳細に明らかにされた⁷⁾。彼女らは同じ系を用いて、翻訳開始をブロックしている成熟化因子がどのようにして最終段階で除去されるのかに興味を持ち、研究を行った。この段階への関与が疑われた ATPase である Fap7 の発現抑制を行い、シヨ糖密度勾配速

心でリボソームを分離して、40S 前駆体に先の七つの成熟化因子が存在するかどうかを調べようとしたところ、意外なことに、目的の40S 前駆体はこの条件では80Sの大きさの位置に検出されることがわかった。調べてみるとこの80Sの画分の中には、40S 前駆体(18S rRNAの3'末端は細胞質で切断されるのだが、切断される前の20S rRNAがこの中に含まれていた)と60Sサブユニットの両方が1:1で含まれることがわかった。この80Sはしかし通常の翻訳中のリボソームと違ってtRNAを含んでおらず、また、40S合成の最終段階で結合するRPS14, S26の二つのリボソームタンパク質も含まれていなかった。このことから彼女たちは、成熟化の最終段階において40S 前駆体は一度60Sとの結合を行い、擬似的な80S粒子を形成した上で、正しく60Sと結合できたものだけを認識し、Fap7のATPase依存的に七つの成熟化因子を除去する、というモデルを提案している。(前の論文でTsr1が結合していることで60Sと40S 前駆体の結合は阻害される、としているのは、tsr1欠乏状態でこの擬似的80Sが安定化しているのを、異常な80Sが間違っただけで、と見誤った可能性が高い。)

なおこの擬似的80Sの形成には、通常の翻訳反応で80S形成を補助する翻訳開始因子eIF5Bが同様に必要であること、また40Sと80Sの解離には通常の翻訳反応で終結に関与するRli1が必要であることも示されている。基本的に同じ内容の報告が別グループからも同時期になされている⁸⁾。

2) 60S サブユニット成熟段階での品質管理

40Sの場合と同様に、60Sの成熟化においても、正しいアセンブリーを経たものだけを次のステップに進ませることで、最終産物の高い完成度が達成されている。

核外輸送に関与するアダプターNMD3のリボソームへの結合は、正常に成熟した60S 前駆体を識別して行われると考えられている。また細胞質に出た後も60Sの成熟化が続くが、この過程において何重にも品質管理が行われることが示唆されている。たとえばリボソームタンパク質P0は細胞質で結合してストーク(stalk, GTPase活性中心)が完成する(II-2章, 水田啓子博士の総説, 図3を参照)。機能的なストークができると今度はそれを利用してEfl1 GTPaseが結合し、Tif6の解離を誘導する。Tif6が解離するとLsg1 GTPaseがアクセスできるようになり、GTP分解と共役してNMD3を外す。NMD3が除去されると40Sとの会合が初めて開放され、40Sとの結合が可能となる(II-2章, 図3参照)。このような「手順前後を許さない」仕組みがあるために、細胞は正しい順序で精密なリボソームタンパク質の結合を行うことができる。

上記の過程にあるTif6の解離メカニズムについて、2012年にJohnsonらのグループから興味深い報告があっ

た⁹⁾。

PTCの最も近くに存在するリボソームタンパク質はRPL10である。彼らはこのタンパク質のPTCに最も近い部分のループに変異を導入したところ、60S 前駆体からのTif6の解離が阻害されることに気がついた。この阻害はTif6そのもの、あるいはEfl1の変異により抑圧された。このときにみられたTif6の変異は、60S 前駆体との結合活性が弱まり、自然と脱落する速度が上昇するようなものだった。またEfl1は翻訳伸長因子eEF2に高い相同性を示す因子であり、新規に形成されたストークを認識してAサイトに入ってくると考えられるGTPaseであるが、ここで得られた変異はGTP結合型のEfl1をGDP結合型の構造に近づけるように作用することがシミュレーションで示唆された。これらのことからJohnsonらは、Rpl10のループがPTC上できれいに形成されていて、正しいストーク構造を保持している前駆体だけがEfl1のGTPase活性化を誘導することができ、Tif6を解離させて成熟60Sの完成に導かれる、という結論を導いている。

異常分子の分解については彼らはふれていないが、Rpl10の変異体を持つ酵母株からポリソームプロファイルを確認したデータがあり、変異によってはハーフマー(ポリソームに60Sのない40Sが結合した状態)が観察されている。このことは60Sの量が減っていることを示しており、おそらくTif6を長時間結合する変異リボソームは、何らかの機構で分解されるのだろう。Mms1などの25S NRD因子がこの分解に関与している可能性があり、今後この部分については解明が進んでいくはずである。

5. 最近見いだされたりボソーム品質管理機構

1) 大腸菌リボソームにも品質管理が行われている

これまで紹介した事例はすべて出芽酵母を用いて明らかにされたものだが、リボソームの品質管理は細菌においても報告されている。2013年になってWalkerらのグループからは、YbeYというRNaseが大腸菌の70Sリボソームの品質管理に関与しているという報告を行っている¹⁰⁾。

YbeYはほぼすべての細菌に保存されているRNaseで、rRNAのプロセシングに関与していることが知られていた。彼らはYbeYを精製して生化学的性質を調べ、この酵素が金属イオン依存的な一本鎖RNAエンドヌクレアーゼであることを明らかにした。YbeYの欠損した大腸菌変異株では誤ったプロセシングを受けたRNAを含む70Sリボソームが蓄積することから、YbeYはrRNAの品質管理に関わる可能性があると考えた。この仮説を直接的に検証するため、彼らは野生株とYbeY欠損株から30Sおよび70Sリボソームを精製し、*in vitro*でYbeYタンパク質と混ぜ、rRNAの切断パターンを比較する実験を行った。

実験の結果は、驚くほど明快なものだった。野生株から

精製した30Sも70Sも、YbeYと混ぜても、あるいはYbeYに結合するRNaseであるRNase Rと混ぜた場合でも、RNAにはまったく変化が現れず、これらのRNaseは野生型リボソーム粒子に含まれるRNAをまったく切断できなかつた。YbeYとRNaseの混合物をもちいた場合でも結果は変化しなかつた。一方それとは対照的に、YbeYを欠損した大腸菌株から精製した70S（上述のとおり、プロセシング異常を示すRNAを一部含んでいる）に対してYbeYとRNase Rの混合物を働かせた場合には、プロセシング異常のRNA産物だけでなく、完全長の23Sから16Sまで、すべてのRNAが完全に消化されてしまうことがわかつた。この分解にはYbeYとRNase Rの両方の存在が必要であり、どちらか片方だけを使った場合にはまったく分解がみられなかつた。使用するYbeYが活性中心に変異を持つものである場合には、分解活性は失われた。

以上の結果から彼らは、このような分解がみられるのはYbeY欠損細胞で70Sリボソームが正常に形成されていないためであり、この分解は異常リボソームを認識し排除するための品質管理機構である、と考えた。このことを確認するために彼らは野生株の大腸菌株を抗生物質カスガマイシンで処理し、機能を阻害した上で70Sリボソームを精製し、この方法で機能不全となったりリボソームもまたYbeYとRNase RによるRNA分解の基質になるかどうかを確かめる実験を行った。カスガマイシンは梅沢浜夫らによって春日大社の土壌から分離された抗生物質だが、開始rRNAと30Sとの結合を阻害し、結果として30Sのいくつかのリボソームタンパク質を欠いた異常な70S粒子（実際の大きさは61S）を形成することが知られている。再び驚くべきことに、彼らの想像どおり、カスガマイシンで処理された野生型70Sリボソームを精製して*in vitro*でYbeYとRNase Rの混合物と保温すると、完全にすべてのRNAが消化されてしまった。

YbeYとRNase RはどちらもrRNAのプロセシングに関与する因子であることから、細菌においてはリボソーム合成経路と品質管理が同じタンパク質によって行われ、密接に関連していることが明らかになった。これらの因子は真核生物にホモログを持たないが、上述のとおり真核生物の場合にもrRNAのプロセシングに関与するエキソソームがNo-bodyでの品質管理やNRDに必要であることが示されており、真核生物でも相似のシステムが働いていると考えられることもできるだろう。

2) 酸化損傷を受けたrRNAは修復される場合がある

2013年になって、リボソームの品質管理が「異常分子の分解」だけでなく、修復により行われる場合がある、という事例が初めて報告された¹⁰⁾。NilsenらはヒトのDNA修復に関与する因子SMUG1が、rRNAの修飾に関与するDKC1と直接結合し、rRNA中の損傷塩基の除去修復に関

与することを明らかにした。

SMUG1は、DNAに取り込まれたウラシルを取り除き、修復するための塩基除去修復経路に関わるウラシルDNAグリコシラーゼである。ウラシル以外にも、損傷により生成するピリミジン塩基（5-ホルミルウラシルや5-カルボキシウラシルなど）を一本鎖DNAから除去する活性が知られている。Nilsenらはこの因子がHeLa細胞の中で核小体とカハール体に存在し、これらの構造体の両方でDKC1と共同存在を示すことを見いだした。免疫沈降により解析すると、SMUG1はDKC1と物理的に結合していることが示された。DKC1はH/ACA snoRNPの構成要素であり、rRNAのシュドウリジン化を行う因子である。そこで彼らはSMUG1が核内においてリボソームの合成にも何らかの寄与をしているのではないかと考え、SMUG1を細胞内より免疫沈降し、結合するRNAを調べた。RT-PCRによりさまざまなRNAを調べたところ、SMUG1はrRNAの一次転写産物である47S rRNAに結合するが、プロセシングを受けたrRNAである28S、18S、5.8Sなどには結合しないことがわかつた。rRNAのシュドウリジン化は切断前の47S rRNA上で起こることから、SMUG1はDKC1と同時期にrRNAに結合しているものと考えられた。

SMUG1をノックダウンしても47S rRNAの量は変わらず、RNA Pol Iによる転写には影響を与えなかつた。しかし同じ細胞で28S、18S、5.8Sの量は顕著に減少していた。全RNA中に含まれるポリ(A)+mRNAの量を見るとSMUG1ノックダウンにより逆に上昇していることから、この結果はプロセシング後のrRNAがSMUG1のない細胞では何らかの理由で分解されていることを示唆している。彼らはこの分解を、品質管理の欠損により異常なRNAが作られたため、と解釈している。実際にSMUG1ノックダウン細胞から28S rRNAと18S rRNAを精製して液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法により解析すると、本来は混入しないはずの異常塩基5-ヒドロキシメチルウリジンが野生型の細胞に比べて2.5倍高い濃度で混入してくることが明らかとなった。DKC1とSMUG1の二重ノックダウンではさらに高い濃度での混入が観察された。このことはDKC1と結合したSMUG1が、プロセシング前の47S rRNAに結合し、異常塩基の塩基除去修復を行っている、ということを示す結果である。もともとSMUG1は一本鎖DNAを認識して異常塩基を除去することが知られている因子であるが、一本鎖RNAに対しても細胞内で同様の機能を果たしているのだろう。実際に、精製したSMUG1を用いて短いRNA断片中の5-ヒドロキシメチルデオキシウリジンを除く*in vitro*の活性が同じ論文で示されている。5-ヒドロキシメチルデオキシウリジンの位置を通常のウリジンに置換したり、シュドウリジンに置換した場合には塩基の切り出しはみられなかつた。

6. おわりに

熱的なゆらぎの中で、誤った配列やフォールディングを含むRNAやタンパク質が生成してくることを完全に防ぐことはできない。これらの分子が複数組み合わされた超分子複合体においては、異常部品の混入に加えて組み立ての誤りも発生する。このような巨大複合体の異常に対して細胞がどのような手段を講じているかについては、これまであまりわかっていなかった。

2000年に原核生物リボソームの結晶構造が明らかにされて以来、巨大複合体の細部を初めて我々は詳しく見ることができるようになった。活性中心の構造をもとに、RNAの点変異一つでリボソーム全体の機能を阻害することも可能になった。並行して開発された出芽酵母のさまざまな系を利用することで、リボソームの品質管理の実態がこの十年に急速に明らかにされてきた。2011年に解明された真核生物リボソームの結晶構造はさらにこの流れを加速し、これまでに知られていない新しい現象が今後次々に明らかにされていくだろう。

細胞内に存在する巨大複合体はリボソームだけではない。スプライソソームや、核膜孔複合体、プロテアソーム、RNAポリメラーゼ、光化学系IとIIなど、さまざまなものが知られている。これらの複合体についても最近になって結晶構造が報告されるようになってきている。リボソームの品質管理機構の解明で培われた方法論や概念をも

とに、これらの構造体の品質管理機構が解明される時代がすでに来ているのかもしれない。

文 献

- 1) Dez, C., Houseley, J., & Tollervey, D. (2006) *EMBO J.*, **25**, 1534–1546.
- 2) LaRiviere, F.J., Cole, S.E., Ferullo, D.J., & Moore, M.J. (2006) *Mol. Cell*, **24**, 619–626.
- 3) Cole, S.E., LaRiviere, F.J., Merrikh, C.N., & Moore, M.J. (2009) *Mol. Cell*, **34**, 440–450.
- 4) Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, A., & Ohno, M. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 963–974.
- 5) Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., & Ohno, M. (2012) *EMBO J.*, **31**, 2579–2589.
- 6) 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.
- 7) Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., & Karbstein, K. (2012) *Cell*, **150**, 111–121.
- 8) Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., & Tollervey, D. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 744–753.
- 9) Bussiere, C., Hashem, Y., Arora, S., Frank, J., & Johnson, A. W. (2012) *J. Cell. Biol.*, **197**, 747–759.
- 10) Jacob, A.I., Köhrer, C., Davies, B.W., RajBhandary, U.L., & Walker, G.C. (2013) *Mol. Cell*, **49**, 427–438.
- 11) Jobert, L., Skjeldam, H.K., Dalhus, B., Galashevskaya, A., Vågbø, C.B., Bjørås, M., & Nilsen, H. (2013) *Mol. Cell*, **49**, 339–345.