

- 1) Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**, 731–801.
- 2) Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004) *Diabetes*, **53**, S12–S18.
- 3) Hood, J.L., Logan, B.B., Sinai, A.P., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 1200–1212.
- 4) Hood, J.L., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 43126–43135.
- 5) Gao, G. & Dou, Q.P. (2000) *J. Cell. Biochem.*, **80**, 53–72.
- 6) Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., & Nicholls, D.G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 6447–6454.
- 7) Garcia, M., Bondada, V., & Geddes, J.W. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1241–1247.
- 8) Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., & Sorimachi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214–11224.
- 9) Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., & Hibi, N. (2000) *Neuroreport*, **11**, 4007–4011.
- 10) Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerioo, T., & Emr, S.D. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 271–282.
- 11) Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., & Emr, S.D. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 413–423.
- 12) Xu, W., Smith, F.J., Subaran, R., & Mitchell, A.P. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5528–5537.
- 13) Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., & Maeda, T. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9478–9490.
- 14) Boysen, J.H. & Mitchell, A.P. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1344–1353.
- 15) Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., & Maki, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 39104–39113.
- 16) Katoh, K., Suzuki, H., Terasawa, Y., Mizuno, T., Yasuda, J., Shibata, H., & Maki, M. (2005) *Biochem. J.*, **391**, 677–685.

秦 勝志, 反町 洋之

((財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所
カルパインプロジェクト)

New biology of calpain in relation with intracellular membrane systems

Shoji Hata and Hiroyuki Sorimachi (Department of Enzymatic Regulation for Cell Functions (Calpain Project), The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Rinshoken), 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan)

リボソームによる異常な翻訳終結の認識と mRNA 品質管理機構

生命現象の基盤となる遺伝子発現の正確性は、細胞の保持する様々な品質管理機構によって保証されている。翻訳の基質となる mRNA の品質はリボソームにより監視され、翻訳終結の異常が引き金となって mRNA の分解が促進される。ナンセンス変異を保持する mRNA は、nonsense-mediated decay (NMD) と呼ばれる特異的分解系によって速やかに分解される。また終止コドンを持たない mRNA (ノンストップ mRNA) も特異的分解系である nonstop mRNA decay (NSD) によって 3' 末端からの分解を受ける。リボソームによる異常な位置での翻訳終結の認識機構と、それに起因する mRNA 分解機構についての最近の研究成果を紹介したい。

1. mRNA 分解経路と P-ボディの役割

真核細胞の細胞質における mRNA 分解の主要経路は、mRNA の 3' 末端に存在するポリ(A)鎖の短鎖化によって始まる¹⁾。種々のポリ(A)除去酵素(デアデニラーゼ: deadenylase)によってポリ(A)鎖が除去される結果、5' 末端のキャップ構造が除去され、主要なエキソヌクレアーゼである Xrn1p によって、5'→3' 方向の速やかな分解が起こる(図1)。この過程で、ポリ(A)鎖の短鎖化によってデキャッピング(キャップ構造の除去反応)が促進される機構には、幾つかのモデルが提示されてきたが、ポリ(A)鎖の短鎖化により翻訳が抑制され、mRNA が P-ボディに移行し、デキャッピング酵素によりキャップ構造が除去される経路が最も重要であると考えられてきている。この経路に加え、エキソソームによって mRNA の 3' 末端から分解される経路もあり、ここでは ATP 依存ヘリカーゼである Ski 複合体と Ski7 が必須である²⁾(図1)。

P-ボディはプロセシングボディの略であり、デキャッピング酵素である Dcp1-Dcp2 複合体やデキャッピングを促進する因子が細胞質で形成する mRNA-タンパク質凝集体として Parker らによって発見された³⁾。その後の解析から、P-ボディが翻訳抑制と mRNA 分解制御の重要な場であることが、明確になってきた。その後、ヒトをはじめとする他の高等真核生物にも P-ボディとほぼ同様の構造体が発見された。さらに、特定の miRNA によって翻訳抑制される標的 mRNA が、RNA induced silencing complex

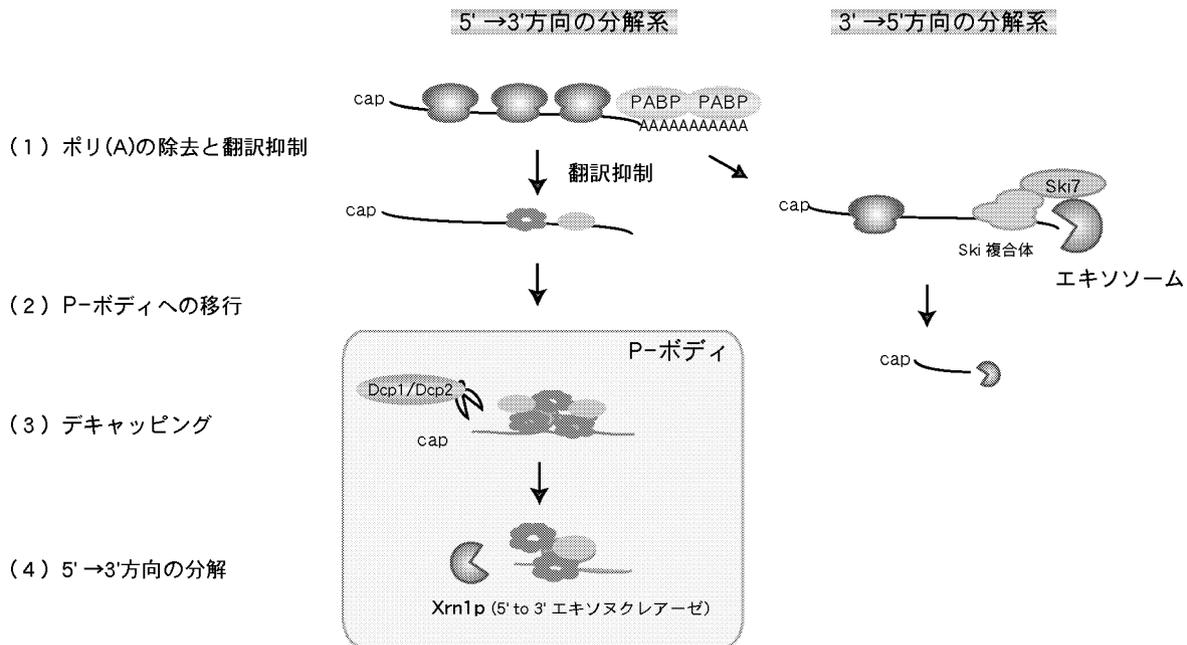


図1 一般的な mRNA 分解系における翻訳抑制と P-ボディの役割

mRNA 分解系はポリ(A)の短鎖化によって開始し、デアデニラーゼ等によってポリ(A)が除去された後、翻訳が抑制される。その結果、mRNA とタンパク質の凝集体である P-ボディが形成される。P-ボディに含まれるデキャッピング酵素によってキャップ構造が除去された後、5' → 3' エキソヌクレアーゼによる分解を受け、速やかに分解される (5' → 3' 分解経路)。エキソソームによって mRNA の 3' 末端から分解される経路もあり、ここでは ATP 依存ヘリカーゼである Ski 複合体と Ski7 が必須である (3' → 5' 分解経路)。

(RISC) の必須な構成成分である hAgo2 とともに P-ボディに局在することが示された⁴⁾。また、ショウジョウバエをはじめとする生物種において以前から解析されていた、母性 mRNA の翻訳抑制と局在化に関与する P-顆粒の構成成分との共通性が明らかになってきている。

2. 品質管理機構の意義

遺伝情報の担い手である mRNA 自身が正確に合成され、正しく局在し制御を受けることは、生命現象の基礎であり極めて重要である。一方、DNA 変異や転写エラー、スプライシングの異常等により、様々な異常 mRNA が合成される危険性に細胞は曝される。最も劇的なアミノ酸配列の変化を引き起こす変異は、塩基の欠失や挿入による読み枠のずれ (フレームシフト変異) であり、かつ多くの場合には正常な位置より上流で翻訳が終結する。また、強制的に翻訳を終結させるナンセンス変異や終止コドンを失った場合にも、異常な長さのタンパク質が発現される。このようなタンパク質は活性を失うばかりでなく、正常なタンパク質の活性を阻害する可能性がある。このような危機を回避するために、細胞は異常 mRNA を認識し分解する品質管

理機構を保持している。リボソームによる異常な翻訳終結の認識機構と、その結果として mRNA 分解が促進される機構について以下に紹介する。

3. ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD)

様々な生物種におけるナンセンス変異依存分解系 (NMD) の分子機構の解析から、1) リボソームが未成熟終止コドンで翻訳を終結する、2) NMD に必須な因子 Upt 1, 2, 3 の複合体が mRNA 上で形成される、3) 5' 端のキャップ構造が除去され、5' → 3' エキソヌクレアーゼによって mRNA が分解される機構、が真核生物に普遍的に存在することが示された⁵⁾。またナンセンス変異依存に 3' 末端からの分解も促進されることも明らかになっている⁶⁾。

終止コドンの位置の異常を認識するためには、リボソームが mRNA を翻訳し、その終結後の状態が正常の場合と異なる必要がある。この異常な終止コドンの識別について、スプライシングに依存する場合と依存しない場合が明らかになっている。高等真核生物 (ヒト) では、mRNA の重要な成熟化過程であるスプライシングが、異常な終止コドンの認識に重要な役割を果たしている。解析の結果、

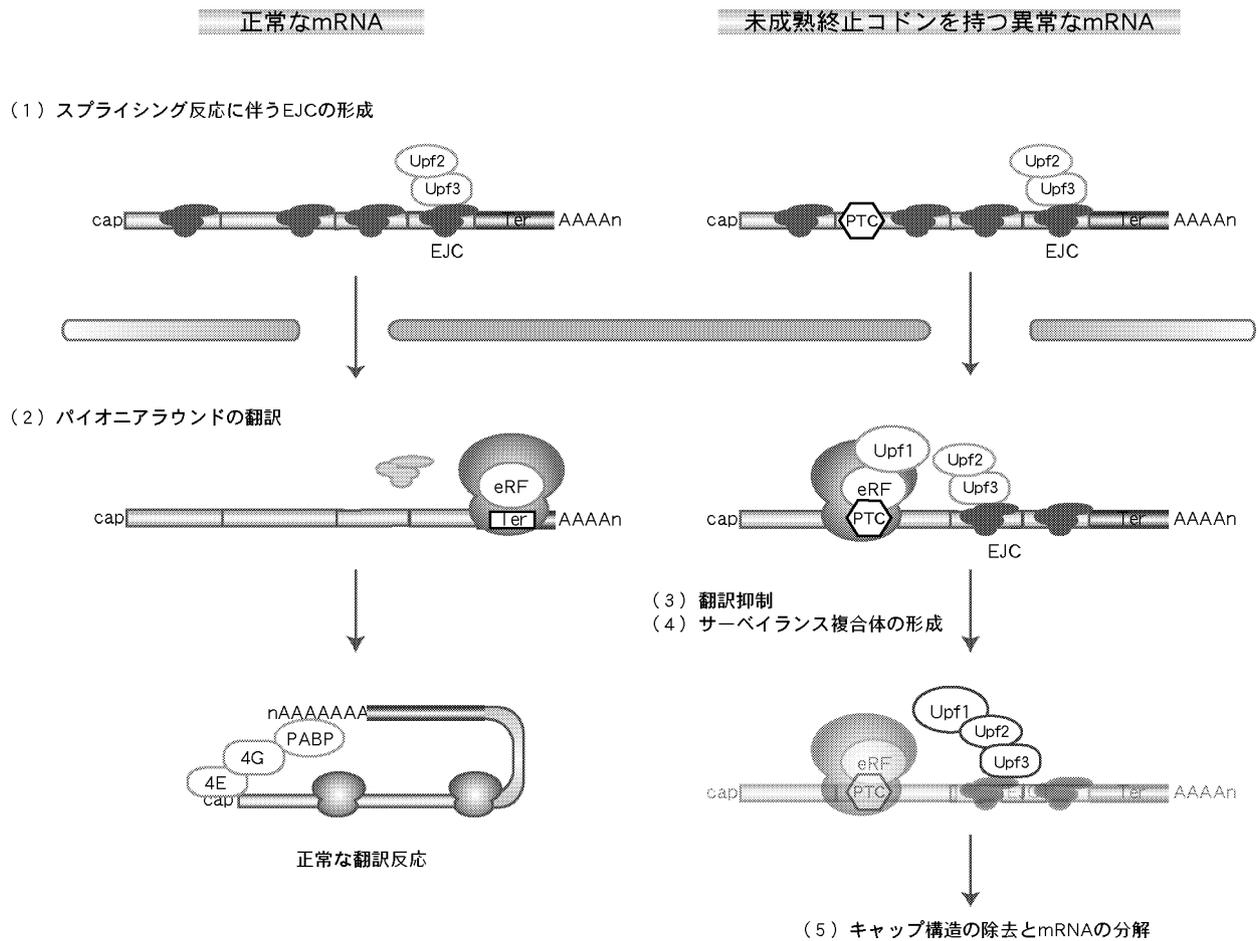


図2 スプライシング依存 NMD における異常な翻訳終結の認識機構

- (1) スプライシング反応に伴う EJC の結合スプライシングによりエクソンとエクソンの結合部位上流に EJC と呼ばれる複合体が形成される。
- (2) バイオニアラウンドの翻訳と呼ばれる mRNA の品質を確認するための最初の翻訳が行われ、PTC (未成熟終止コドン) で翻訳が終結する。
- (3), (4) 異常な翻訳終結に伴い、eRF1/3 と Upf1, EJC と Upf2, 3 の相互作用を介してサーベイランス複合体 (Upf1, 2, 3 複合体) が形成される。
- (5) キャップ構造の除去反応が促進され、5' → 3' 方向の mRNA 分解が促進される。

スプライシング反応の結果としてエクソン同士の結合部位の上流に形成される複合体 (EJC) が、NMD に必須な因子を含むことが示された (図 2)。正常な mRNA を翻訳するリボソームは、最初の翻訳により mRNA 上に形成された EJC 複合体を mRNA から解離させるため、NMD は機能しない。しかしながら、異常な位置で翻訳が終結した場合、複合体が除去されずに残り、NMD が引き起こされる⁷⁾。さらに主に線虫を用いた解析から、翻訳終結の際に形成される eRF1-eRF3-Upf1 と Upf1 のリン酸化酵素である SMG-1 が複合体を形成し、さらに異常な終止コドンの下流に存在する EJC と相互作用し、Upf1 がリン酸化され

ることが mRNA の分解に必要であることが示された⁸⁾。

一方、酵母とショウジョウバエにおける NMD では、異常な終止コドンの識別にスプライシングは関係しない。また高等真核生物においても、最後のエクソン中に終止コドンが存在しても NMD を受ける例が報告されており、異常な終止コドンの普遍的な識別機構は依然として未解決の問題である。異常な終止コドンと正常な終止コドンの明確な違いは mRNA 上での相対的位置であり、mRNA の 3' 末端からの距離の違いによって識別されるモデルが提示されている⁹⁾。翻訳終結因子 eRF3 はポリ(A)結合因子である PABP と NMD に必須な因子である Upf1 の双方と相互作用

用することが示されており^{8,10)}、異常な位置での翻訳終結においては、PABPとeRF3の相互作用が低下し、その結果としてUpf1がリボソームと結合し、翻訳が抑制され、リボソームと結合しないmRNAがP-ボディに移行し、最終的にmRNAが速やかに分解されると考えられている。

4. ノンストップ mRNA 分解系 (NSD)

終止コドンの位置が異常である mRNA として、最も極端なケースは終止コドン自体を含まない mRNA である。ノンストップ mRNA 由来の遺伝子産物を積極的に排除するシステムは原核生物で最初に発見され、トランス翻訳と呼ばれている。トランス翻訳は、tRNA と mRNA の両方の機能を保持する tmRNA という分子が主役となる。トランス翻訳の機能としては、1) タグ配列の付加による異常タンパク質の分解、2) ノンストップ mRNA の 3' 端で停滞したリボソームの解放によるリボソーム再生利用、が主に議論されてきた。

真核生物では現在まで、tmRNA と相同の機能を持つ分子は発見されていないが、ノンストップ mRNA 特異的な mRNA 分解系 (NSD) が発見され、ノンストップ mRNA の 3' 末端で停滞したリボソームを認識する因子 (Ski7p) によって、3'→5' 方向の分解を担う分子がリクルートされるモデルが提唱された¹¹⁾。また、リボソームが mRNA の 3' 端で停滞する結果、ノンストップ mRNA の翻訳効率が顕著に低下すること、ノンストップ mRNA の分解が両方向から促進されることを最近我々は明らかにした¹²⁾。

次に我々は、ノンストップ mRNA の翻訳自体が原核生物でも抑制されるかどうかを解析し、tmRNA 非存在下でノンストップ mRNA の翻訳自体は抑制されないことを見いだした。つまり真核生物ではノンストップ mRNA の翻訳自体が抑制されているが、原核生物ではノンストップ mRNA の翻訳が抑制されないために、トランス翻訳により不完全なタンパク質を積極的に分解する必要が生じたと解釈できる。これは真核生物にトランス翻訳が存在せず、その翻訳系自体に、ノンストップ mRNA における翻訳終結の異常を認識するシステムが内包されていることを示唆する。原核生物と真核生物の mRNA の 3' 末端の決定的な違いはポリ(A)鎖の存在であり、真核生物のノンストップ mRNA における発現抑制は、ポリ(A)鎖をリボソームが翻訳する結果である可能性が考えられた。

5. 品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新しい役割

我々は、ノンストップ mRNA 品質管理におけるポリ

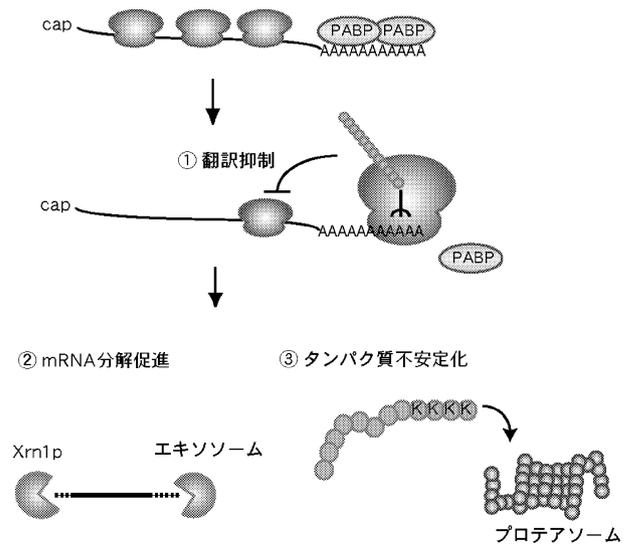


図3 ノンストップ mRNA 品質管理機構におけるポリ(A)鎖の新たな役割

ノンストップ mRNA の発現は、以下の3段階の機構で抑制される。①新生ポリペプチド鎖中のポリリシン残基に依存してリボソームからの解離が阻害され、それ以降の翻訳が抑制される(翻訳抑制)。②3'末端に到達したリボソームに依存して3'→5'方向のmRNA分解が、リボソームによるPABPの解離により5'→3'方向のmRNA分解が促進される(mRNA分解)。③ポリリシンの配列を指標にして、タンパク質が分解される(タンパク質の不安定化)。

(A)鎖の翻訳の役割を明らかにする目的で、ノンストップ mRNA の翻訳抑制を評価する系を構築した。その結果、ノンストップ mRNA の翻訳産物の発現量が100倍抑制されること、また翻訳抑制と mRNA 分解促進、さらに翻訳産物の不安定化がこの発現抑制に寄与することが明らかとなった。さらに我々は、ノンストップ mRNA の翻訳産物がプロテアソームによって分解されること、ポリ(A)鎖の翻訳産物である新生ポリペプチド鎖が60Sリボソームに結合する結果ノンストップ mRNA の翻訳が抑制されること、を示唆する結果を得た。さらにポリ(A)鎖を終止コドンの直前に挿入した場合にも、①翻訳抑制、②60Sサブユニットと翻訳産物との結合、③プロテアソームによる翻訳産物の不安定化、が観察された(図3、論文投稿中)。従って、ノンストップ mRNA のポリ(A)鎖の翻訳により、1) mRNA の分解が促進され、2) 合成中のポリリシンとリボソームとの相互作用により翻訳が抑制され、3) 翻訳産物の末端のポリリシンを指標としてプロテアソームによって速やかに分解される、と考えられる。ポリ(A)鎖はポリ(A)結合タンパク質PABPを介して翻訳開始、翻訳終結、mRNA安定性等に重要な役割を果たす。今回我々が得た

結果は、ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、mRNA品質管理機構において必須な役割を果たすことを明確に示している。

6. おわりに

miRNAによる遺伝子発現制御の普遍性と重要性が明らかになるにつれ、mRNAの翻訳効率やmRNAの安定性制御の重要性が益々明確になってきている。しかしながら、細胞内に存在するmRNAの翻訳効率や安定性がいかにして決定され、制御されるかは依然としてほとんど不明であり、miRNAによる制御のみでなく様々な制御機構が存在するものと予想される。今後も、遺伝子発現制御の様々な局面における翻訳の重要性が、次々と明らかにされるであろう。

- 1) Collier, J. & Parker, R. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, 861–890.
- 2) Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajihito, H., Hoshino, S., & Katada, T. (2001) *EMBO J.*, 20, 4684–4693.
- 3) Sheth, U. & Parker, R. (2003) *Science*, 300, 805–808.
- 4) Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. & Parker, R. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 719–723.
- 5) Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W. and Kulozik, A. E. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 801–808.

- 6) Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T., & Katada, T. (2003) *EMBO J.*, 22, 3951–3959.
- 7) Lejeune, F. & Maquat, L.E. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 309–315.
- 8) Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., & Ohno, S. (2006) *Genes Dev.*, 20, 355–367.
- 9) Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., & Jacobson, A. (2004) *Nature*, 432, 112–118.
- 10) Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., & Katada, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 50286–50292.
- 11) van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., & Parker, R. (2002) *Science*, 295, 2262–2264.
- 12) Inada, T. & Aiba, H. (2005) *EMBO J.*, 24, 1571–1583.

稲田 利文

(名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻,
科学技術振興事業団・さきがけ)

Ribosome recognizes aberrant translation termination and induces mRNA surveillance system

Toshifumi Inada (Department of Molecular Biology, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan and PRESTO, JST, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, Japan)