【解説】

小胞体膜上で起こるスプライシングに 秘められた巧妙な仕組み

柳谷耕太, 河野憲二

真核生物は膜で覆われたオルガネラを有し、生命活動に必要な生化学反応をそれぞれのオルガネラに分担させている。そのため、細胞にはオルガネラの状態を監視し、その恒常性を維持させる機構が発達している。オルガネラの一つである小胞体に異常が生じた場合、その情報は小胞体膜上で起こる mRNA スプライシングを介して核に伝わり、恒常性維持機構が活性化される。本稿では、最近明らかになりつつある、このスプライシングに秘められた巧妙な仕組みを紹介する。

分泌経路を経る分泌タンパク質や細胞膜タンパク質は、細胞が外界へ情報を発信し、外部環境を把握するために必須のツールである。とくに多細胞生物においては、複数の細胞が寄り合わさって一つの生命体を形成するため、個々の細胞は分泌経路を介して情報を交換し、個体における位置づけを理解し、実行することが求められる。そのため、分泌・膜タンパク質の成熟過程を理解することは、細胞を個体としての文脈で解釈するために非常に重要である。

真核生物の細胞では、分泌・膜タンパク質は小胞体で合成、成熟されて、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とも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小胞体に流入した場合、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り、この状況は細胞に強い毒性をもつ。小胞体へのタンパク質流入量は細胞分化や環境応答などによって急速に変化するため、細胞はこのような動態に適切に対応する必要があると考えられている。実際、小胞体のフォールディング容量と流入タンパク質量の不均衡（小胞体ストレスと呼ばれる）が生じた場合、両者のバランスを調節するストレス応答（小胞体ストレス応答）を引き起こす仕組みが細胞には備わっている⁽¹⁾。

The Sophisticated Mechanisms of the mRNA Splicing on the Endoplasmic Reticulum
Kota YANAGITANI, Kenji KOHNO, 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

小胞体ストレス応答

真核生物は小胞体ストレスに対処するために、BiPやGrp94などの小胞体分子シャペロンやEDEMやHard1などの小胞体関連分解（ER-associated degradation; ERAD）に関わる因子を発現誘導することで、小胞体に蓄積した構造異常タンパク質の折りたたみ直しや分解を促進して、小胞体ストレスを緩和する。このストレス応答は、ストレスを感知するセンサーとそこから発せられるシグナル伝達機構から構成されている。I型小胞体膜タンパク質IRE1（出芽酵母ではIre1, 哺乳動物細胞ではIRE1 α ）は小胞体ストレスセンサーの一つで、酵母から植物やヒトまでのほとんどすべての真核生物に保存されている唯一の分子である。IRE1は小胞体ストレス時に蓄積した構造異常タンパク質をその内腔領域で感知し、サイトゾル側のキナーゼ、リボヌクレアーゼ領域を活性化させる。活性化したIRE1はサイトゾルで特定の転写因子（動物細胞では*XBPI*, 酵母では*HAC1*）の前駆体mRNAを特異的に2カ所切断し、スプライシング反応を開始させる（図1）。その後、切り離されたエクソンはtRNA ligaseであるRlg1でつなぎあわされることが酵母で明らかになっている（動物細胞においてはRlg1に相当するligaseはいまだ同定されていない⁽²⁾）。なお、このスプライシング反応は細胞質で起こることから、細胞質スプライシングと呼ばれている。

動物細胞と酵母ではIRE1 α /Ire1の標的mRNAが異な

り、それぞれ、*XBPI*, もしくは*HAC1*という遺伝子の前駆体mRNAがスプライシングされる。興味深いことに、*XBPI*と*Hac1*にはアミノ酸配列上の相同性がないにもかかわらず、スプライシングされて生じた成熟型mRNAからはどちらの場合でも塩基性ロイシンジッパー型転写因子が合成され、小胞体分子シャペロンなどの転写を誘導して小胞体に蓄積した構造異常タンパク質の修復や分解を促進する⁽²⁾（図1）。

細胞質スプライシングが起こる場所

細胞質スプライシングは、IRE1が標的mRNAと出会い、切断しないことには始まらない。したがって、IRE1が分布する場所がスプライシングの起こる場所であると考えられる。酵母、動物どちらにおいても、IRE1は小胞体膜タンパク質であることが報告されていることから⁽³⁻⁵⁾、細胞質スプライシングは小胞体膜上で起こると考えてよいであろう。それでは、このIRE1 α /Ire1と標的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だろうか？ それとも、サイトゾルを受動拡散するものの中で、たまたま小胞体膜に近づいた分子がスプライシングされるだけなのであるだろうか？ 最近の筆者らの研究で、動物細胞においてはスプライシング基質である*XBPI* mRNAが小胞体膜上に局在化することを見いだした⁽⁶⁾。同様に、Aragonらのチームも酵母におけるスプライシング基質*HAC1* mRNAが小胞

図1 ■ 小胞体膜上でのmRNAスプライシングを介した小胞体ストレス応答

小胞体ストレスセンサー IRE1は非ストレス下では小胞体分子シャペロンBiPが結合した不活性な状態に保たれている（①）。しかし、小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積すると、BiPが競合的にIRE1から奪われる。その結果、IRE1は二量体化／多量体化して活性化し、リボヌクレアーゼ活性を有するようになる（②）。活性化したIRE1は転写因子の前駆体mRNAを2カ所切断し、スプライシングを開始させる（③）。スプライシングされたmRNAからは機能的な転写因子が合成され、小胞体ストレス応答が惹起される（④）。

体膜上に局在化することを報告している⁽⁷⁾。どちらの mRNA もこの局在化によって小胞体ストレス時に活性化した IRE1 によってスプライシングされやすくなり、ストレス応答を効率よく引き起こす。興味深いことに、*XBPI* mRNA と *HAC1* mRNA は全く異なるメカニズムで小胞体膜に局在化するようである。本稿では、mRNA の小胞体局在化機構を中心に、小胞体膜上で起こるスプライシングの洗練されたメカニズムを紹介する。

動物細胞：*XBPI* mRNA のスプライシング機構

動物細胞では、小胞体ストレスはそのセンサー分子である IRE1 α によって感知される。IRE1 α は非ストレス条件下において、小胞体内腔で小胞体分子シャペロンである BiP と結合しており不活性化状態に保たれている (図 1)。しかしながら、糖鎖修飾阻害剤ツニカマイシンや還元剤 DTT などによって小胞体ストレスを誘導すると、IRE1 α に結合した BiP が構造異常タンパク質に競合的に奪われる^(8,9)。単量体となった Ire1 はホモ二量体化し、サイト

ゾル側のキナーゼドメインで自己リン酸化することで、キナーゼドメインに続くリボヌクレアーゼドメインを活性化させる (図 1, 図 2A)。活性化した IRE1 α は前駆体 *XBPI* (*XBPI* unspliced form; *XBPIu*) mRNA を 2 か所の特徴的なステムループで切断し、スプライシング反応を開始する。このスプライシング反応によって、*XBPIu* mRNA の ORF から 26 塩基のイントロンが切り出されて成熟型 *XBPI* (*XBPI* spliced form; *XBPIs*) mRNA となる (図 2A, B)。このスプライシング反応によってスプライシング部位から下流の領域がフレームシフトするので、*XBPIs* mRNA からは *XBPIu* タンパク質とは C 末端が異なる *XBPIs* タンパク質が合成される。*XBPIs* タンパク質は N 末端側には DNA 結合領域を、変化した C 末端には転写活性化ドメインをもつ活性化型転写因子で、分子シャペロンや、ERAD 関連因子や脂質合成因子の転写を促進し、小胞体ストレス状態を緩和に導く⁽²⁾ (図 2A)。

XBPIu mRNA は前駆体 mRNA ではあるが細胞質に分布するので、リボソームによって翻訳される。その翻訳産物 *XBPIu* は N 末端側に核内移行シグナルを C 末端

図 2 ■ *XBPI* mRNA のスプライシング機構

(A) *XBPI* mRNA の細胞質スプライシング。動物細胞において、IRE1 α 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 *XBPI* 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 *XBPIs* をコードするようになる。

(B) *XBPIu*, *XBPIs* の ORF 構造とタンパク質のドメイン構造。 *XBPIu* mRNA には 2 つの読み枠の異なる ORF (ORF1, ORF2) があり、ORF1 が翻訳されて *XBPIu* タンパク質が合成される。IRE1 α によるスプライシングによってイントロン (ORF1 中のオレンジ四角) が除かれ、ORF1 と ORF2 が融合して *XBPIs* mRNA となり、そこから活性のある転写因子 *XBPIs* が合成される。図中の NLS は核移行シグナル、bZIP は塩基性ロイジンジッパードメイン、NES は核外排出シグナル、HR は疎水性領域、AD は転写活性化ドメインを示す。

側に核外排出シグナルをもつ核-細胞質シャトルタンパク質で、XBP1s転写因子のネガティブレギュレーターとしての機能をもつことが報告されている⁽¹⁰⁾ (図2B)。

mRNAの細胞内分布場所は自身がコードするタンパク質によって大まかに予測することができる。分泌・膜タンパク質などの分泌経路を経るタンパク質をコードするmRNAは小胞体膜上に分布し、それ以外はサイトゾルに分布する。この予測方法では、XBP1u mRNAは分泌経路を経るタンパク質をコードするわけではないのでサイトゾルに分布すると推測できる。もし本当にサイトゾルに分布するのであれば、小胞体膜タンパク質であるIRE1 α と効率よく出会えないのではないか？ 筆者ら

はこの疑問に答えるためにXBP1u mRNAの局在場所を調べることにした。

XBP1u mRNAがIRE1 α に出会う仕組み

われわれはこの問いに答えるために、まず、XBP1u mRNAの細胞内分布をジグ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できる⁽¹¹⁾）。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わかった⁽⁶⁾。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

図3 ■ 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した小胞体膜タンパク質であるIRE1 α 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。われわれの研究で、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わかった。

(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さまざまな種と比較した。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15を元に改図)

とIRE1 α によってスプライシングを受けた*XBPIs* 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、*XBPIu* mRNAには存在し*XBPIs* mRNAにはない何かしらの特徴が*XBPIu* 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、*XBPIu* mRNAがin-frameで翻訳されることが*XBPIu* 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、*XBPIs*ではスプライシングによってフレームシフトするので*XBPIu*の読み枠を失っている）。*XBPIu* mRNAにコードされる*XBPIu*タンパク質はC末端側に高度に疎水的な領域HRをもち、マイクロソーム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*XBPIu* mRNAは小胞体膜から放出されることから、われわれは、*XBPIu* 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3A）。小胞体膜上への局在化能を消失させる変異を導入した*XBPIu* 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、*XBPIu* 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⁽⁶⁾。

われわれが提唱していたモデルの問題点

図3Bに示すように、*XBPIu*のC末端側には高度に疎水的な領域HRがある。筆者らの提唱したモデルは、新生*XBPIu*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*XBPIu* 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、*XBPIu* 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。なぜなら、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⁽¹²⁾、HRがトンネルの外に出た後には、差し引き13コドン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1秒当たり5.6アミノ酸なので⁽¹³⁾、13コドンは2.3秒ほどで翻訳が完了する。つまり、2.3秒程度しか図3Aの状態が保たれないということである。筆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。

翻訳が停止するという仮説

筆者らは、これまでのモデルの矛盾を解消しうる次のような仮説を立てた。それは、*XBPIu*を合成するリボソームは図3A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るか？ 筆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。したがって、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⁽¹⁴⁾。そこで、筆者らは*XBPIu*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⁽¹⁵⁾。

*XBPIu*の合成反応はC末端付近で一時的に停止する

*XBPIu*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*XBPIu*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ほど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3C）。解析の結果、この後者のバンドは、当初の期待どおり、C末端付近まで合成された*XBPIu*にtRNAが結合した翻訳停止中間体であることが判明した。なお、この翻訳停止反応はHEK293T細胞においても起こることを確認している。

*XBPIu*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。他の関連のないタンパク質のC末端に*XBPIu*の部分配列を融合させたところ、*XBPIu*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、そのほぼすべてが進化的に保存されていた（図3B）。

XBPIu 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*XBPIu* mRNAの小胞体膜局在化に実際に貢献するのであるか？ 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

導入法で見いだした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、*XBPlu* 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。すると期待どおり、翻訳停止を引き起こせない場合には、*XBPlu* mRNAの小胞体膜局在化能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*XBPlu* mRNAは新生XBPluポリペプチド鎖を介して小胞体膜へ局在化できるようになり、小胞体ストレス時には活性化したIRE1 α により効率よくスプライシングされることが明らかになった⁽¹⁵⁾。

***XBPlu* mRNAのスプライシングに秘められた巧妙な仕組み**

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XBPlu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、XBPlu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である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。

出芽酵母：*HACI* mRNAのスプライシング機構

酵母においては、Ire1の活性化は動物細胞のIRE1 α とほぼ同様のメカニズムで起こる。ただし、酵母の場合は、小胞体ストレス下で単量体となったIre1はホモ多量体を形成し、小胞体膜中で巨大な複合体（クラスター）を形成する⁽⁵⁾（光学顕微鏡で細胞内のドットとして観察できる）。クラスター化したIre1は前駆体 *HACI* (*HACI* unprocessed form; *HACI*^{un}) mRNAをスプライシングする。この反応によって252塩基のイントロンが除かれる。*HACI*^{un} mRNAは230アミノ酸残基からなるHac1p^{un}をコードしており、その終止コドンはイントロン内に位置している。Hac1^{un} タンパク質のN末端側にはDNA結合領域が存在するが、転写因子としての活性は低い⁽¹⁶⁾。Ire1によるスプライシングによってイントロンが除かれて新たなエクソンが加わると、Hac1^{un}

のC末端10残基が転写活性化能を有する18残基の領域と入れ替わった、活性化型転写因子Hac1ⁱをコードするようになる。さらに特筆すべきことに、イントロンには5' 非翻訳領域と塩基対を形成して翻訳を抑制する領域があるので、*HACI*^{un} mRNAからはほとんどタンパク質が合成されないが、スプライシングによってイントロンが除かれた成熟型 *HACI* (*HACI* induced form; *HACI*ⁱ) mRNAは抑制効果が解除されており、そこからはHac1ⁱ が合成されるようになる^(17,18)。Hac1ⁱ は、XBPlsと同様に小胞体に蓄積した構造異常タンパク質の修復や分解を促進する遺伝子の転写を誘導し、小胞体ストレス状態を緩和する⁽¹⁾。

***HACI* mRNAの小胞体膜局在化機構**

2009年にAragonらによって、酵母細胞内での*HACI* mRNAとIre1の小胞体ストレス下、非ストレス下における局在場所が調べられた⁽⁷⁾。Ire1には赤色蛍光タンパク質mCherryが融合しており、リアルタイムで可視化できるようにしてある。一方、*HACI* mRNAにはRNA結合タンパク質U1Aの結合配列がタンデムに挿入されており、緑色蛍光タンパク質GFPを融合したU1Aを共発現させることで可視化している（前駆体型と成熟型どちらの*HACI* mRNAも検出する）。これまでに木俣らが報告したように、Ire1は非ストレス条件下では小胞体全体に分布していたが、小胞体ストレス条件下では小胞体上に明瞭な点状構造（細胞当たり3～10個）として観察できるクラスターに集積していた^(5,7)。一方、*HACI* mRNAは非ストレス時にはサイトゾルに分散していたが、小胞体ストレス条件下では、Ire1同様、点状構造に集積していた。興味深いことに、小胞体ストレス時に形成される*HACI* mRNAのすべての点状構造はIre1クラスターと完全に重なっていた。また、Ire1のクラスター化は*hac1*欠失株でも起こるのに対して、*HACI* mRNAの局在化は*ire1*欠失株においては全く起こらないことから、*HACI* mRNAはIre1依存的に局在化する、つまり、クラスター化したIre1に集まるようである。

Ire1クラスターへの*HACI* mRNAの局在化は*HACI* mRNAの3'非翻訳領域(3'UTR)を必要とする(図4)。*HACI* mRNAの3'UTRには非常に長いステムループ構造(約80塩基)があり、その構造を変化させると*HACI* mRNAはIre1クラスターへ局在化しなくなるとともに、小胞体ストレス時にIre1によってスプライシングされる効率が著しく低下していた。これらの結果か

図4 ■ *HAC1* mRNAのIRE1クラスター局在化機構

(A) *HAC1^{unspliced}* mRNAの模式図。イントロンの一部の領域は5' UTRと塩基対を作り、Hac1^{unspliced} タンパク質の翻訳を抑制している。3' UTRには非常に長いステムループ構造があり、その中の一部の塩基 (3' BE) が種を超えて保存されている。

(B) 非ストレス条件下では*HAC1^{unspliced}* mRNAはサイトゾルに拡散しているが、小胞体ストレス時には3' UTRに含まれるステムループ構造を介して小胞体膜上のIRE1クラスターに局在化する。IRE1クラスターに局在化した*HAC1^{unspliced}* mRNAは活性化したIRE1によって効率よくスプライシングされる。スプライシングによって翻訳抑制能をもったイントロンが除かれると、*HAC1^{spliced}* mRNAはIRE1クラスターから解放される。*HAC1^{spliced}* mRNAからは小胞体ストレス応答を惹起する転写因子Hac1^{spliced} が合成される。

ら、*HAC1* mRNAはその3'UTRの高次構造を介してIRE1クラスターに局在化することで効率よくスプライシングを受け、小胞体ストレス応答を確実に引き起こすことを可能にしていることが明らかとなった (図4)。

一般的に、3'UTRの高次構造を介したmRNAの局在化にはその構造に結合するRNA結合タンパク質の存在が示唆される。Walterらはその候補として非常に興味深い可能性を提案している。クラスター化したIRE1自体がこのステムループのアダプターとなっているという仮説だ。IRE1のサイトゾル側の構造はクラスター化によって変化するという報告もあることから⁽¹⁹⁾、あなたが突拍子もない考えではないが、さらなる検証が必要であろう。他のRNA結合タンパク質の関与もまだ十分に可能性が残されており、今後の進展が待たれるところである。

ここまでの話では、IRE1クラスターに局在化するためには*HAC1* mRNAの3'UTRに含まれるステムループさえあれば十分である印象を読者はもつであろう。しかし、事はそう単純ではないようだ。3'UTR同様、イントロンを欠失した*HAC1* mRNAもIRE1クラスターへの局在化が起こらなくなってしまう。上述のように、イントロンには5'UTRと塩基対を形成して翻訳を抑制する効果がある^(17, 18)。どうやら、イントロンによるこの翻訳抑制効果が*HAC1* mRNAのIRE1クラスターへの局在化に必要なようである。*HAC1^{unspliced}* mRNAはIRE1にスプライシングされるとイントロンが除かれるので、*HAC1^{spliced}*

mRNAは翻訳抑制効果から解放されている。その結果、IRE1クラスターから解放され、細胞質全体に分布するようになり、転写因子を合成する。何ともよくできたシステムである。

両システムの比較

XBPIu mRNAと*HAC1u* mRNAはどちらも小胞体膜上のIRE1αまたはIRE1の近傍にリクルートされることで効率よくスプライシングされるようになる。しかしながら、その局在化メカニズムは大きく異なっている。*XBPIu* mRNAの場合はそれ自身がコードするタンパク質XBPIuによって小胞体膜へとリクルートされるが、*HAC1* mRNAは3'UTRを介して小胞体膜上のIRE1クラスターに局在化する。*XBPIu* mRNAは常に小胞体膜上に局在化するが、*HAC1* mRNAは小胞体ストレス時のみIRE1クラスターに局在化する。*XBPIu* mRNAの膜局在化には翻訳されることが必要であるが、*HAC1* mRNAの場合は翻訳が抑制されることが局在化に必須である。このように、*XBPIu* mRNAと*HAC1* mRNAの局在化の分子機構は明らかに異なっている。しかしどちらの場合も、それぞれ独自の洗練された仕組みで前駆体mRNAがIRE1によってスプライシングされる効率を高め、小胞体の危機的状況を速やかに伝えることを可能にする^(6, 7, 15)。

細胞質スプライシングの進化的考察

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。とくに、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*HAC1* mRNA、動物における*XBPIu* mRNAの2種類しか判明していなかった。しかしつい最近、植物のシロイヌナズナにおいて*AtbZip60*が、さらに、真菌類の*Cryptococcus neoformans*において*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^(20~22)。*AtbZIP60*、*HXL1*のスプライシング型mRNAはXBPIsや*HAC1*ⁱと同様に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。さらに上述したように、非スプライシング型mRNAの小胞体膜上への局在化機構が*XBPI* mRNAと*HAC1* mRNAで全く異なっている。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らは考えている。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(RIDDと呼ばれている)^(23, 24)。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、さまざま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くることを期待している。

文献

- 1) D. Ron & P. Walter: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 519 (2007).
- 2) K. Mori: *Traffic*, **4**, 519 (2003).
- 3) K. Mori, W. Ma, M. J. Gething & J. Sambrook: *Cell*, **74**, 743 (1993).
- 4) W. Tirasophon, A. A. Welihinda & R. J. Kaufman: *Genes Dev.*, **12**, 1812 (1998).
- 5) Y. Kimata *et al.*: *J. Cell Biol.*, **179**, 75 (2007).
- 6) K. Yanagitani *et al.*: *Mol. Cell*, **34**, 191 (2009).
- 7) T. Aragon *et al.*: *Nature*, **457**, 736 (2009).
- 8) A. Bertolotti, Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding & D. Ron: *Nat. Cell Biol.*, **2**, 326 (2000).
- 9) K. Okamura, Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru & K. Kohno: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 445 (2000).
- 10) H. Yoshida, M. Oku, M. Suzuki & K. Mori: *J. Cell Biol.*, **172**, 565 (2006).
- 11) R. S. Lerner *et al.*: *RNA*, **9**, 1123 (2003).
- 12) M. Kowarik, S. Kung, B. Martoglio & A. Helenius: *Mol. Cell*, **10**, 769 (2002).
- 13) N. T. Ingolia, L. F. Lareau & J. S. Weissman: *Cell*, **147**, 789 (2011).
- 14) H. Muto, H. Nakatogawa & K. Ito: *Mol. Cell*, **22**, 545 (2006).
- 15) K. Yanagitani, Y. Kimata, H. Kadokura & K. Kohno: *Science*, **331**, 586 (2011).
- 16) K. Mori, N. Ogawa, T. Kawahara, H. Yanagi & T. Yura: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4660 (2000).
- 17) R. E. Chapman & P. Walter: *Curr. Biol.*, **7**, 850 (1997).
- 18) U. Rügsegger, J. H. Leber & P. Walter: *Cell*, **107**, 103 (2001).
- 19) A. V. Korennykh *et al.*: *Nature*, **457**, 687 (2009).
- 20) Y. Deng *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7247 (2011).
- 21) Y. Nagashima, K. I. Mishima, E. Suzuki, Y. Shimada, Y. Iwata & N. Koizumi: *Nat. Sci. Rep.*, **1**, doi:10.1038/srep00029 (2011).
- 22) S. A. Cheon *et al.*: *PLoS Pathog.*, **7**, e1002177 (2011).
- 23) J. Hollien & J. S. Weissman: *Science*, **313**, 104 (2006).
- 24) D. Nakamura *et al.*: *FEBS Lett.*, **585**, 133 (2011).

プロフィール

板垣 又丕 (Yasuhiro Itagaki) <略歴> 1967年東北大学理学部化学科博士課程修了/1967年日本電子株式会社入社分析機器事業部JEOL USA配属、以後応用研究室室長、分析機器事業部副技師長等を経て、1993年(財)サントリー生物有機科学研究所/1998年コロンビア大学化学科質量分析室室長、現在に至る<研究テーマと抱負>押し付けがましくなく、質量分析の世界の素晴らしさを、いかに次世代に伝えられるか? <趣味>音楽鑑賞、マンハッタン散策

大木 出 (Izuru Ohki) <略歴> 2001年奈良先端大バイオサイエンス研究科博士課程修了、博士(バイオサイエンス)/2001年横浜市大大学院総合理学研究科博士研究員/2002年生物分子工学研究所(BERI)構造解析部研究員/2006年九大生体防御医学研究所博士研究員/2008年より奈良先端大バイオサイエンス研究科助教<研究テーマと抱負>専門は転写制御の構造生物学(NMRと結晶構造解析)。構造の視点からモデルを組み立て新たな生命現象を解明していきたい。in vitroでの緻密な生化学的解析を通してしか見えないことは

多い<趣味>山登り、料理、ヴァイオリン

小沢憲二郎 (Kenjiro Ozawa) <略歴> 1984年埼玉大学理学部生体制御学科卒業/1991年東北大学理学研究科博士課程修了(理博)/1991年(独)農業生物資源研究所研究員/2002年(独)農研機構・北海道農業研究センター主任研究員/2009年(独)農業生物資源研究所主任研究員、現在に至る<研究テーマと抱負>医薬品、有用物質生産用GM作物の開発<趣味>溪流釣り