

研究最前線

遺伝子発現ノイズ排除とNMD

金沢医科大学総合医学研究所

石垣靖人

1 はじめに

DNA から RNA に読みとられる遺伝情報の配列は、常に一定の安定した情報ではなく、様々なノイズを含んでいるものと思われる。遺伝子発現を大きな目で見てみると、転写因子等の働きによって任意の遺伝子が発現すると同時に、転写産物の中には不要な転写産物＝遺伝子発現のノイズも多数含まれており、これを除くことによって必要な転写産物を発現させるノイズ排除の機構が存在している(図1)。最初の転写産物から切り出されて分解されてしまうイントロンは、このようなノイズの最たるものかもしれない。本稿では、ノイズ排除の1例として「NMD」と呼ばれる mRNA 分解機構に焦点をあてて紹介する。

2 ナンセンス変異と PTC

mRNA の読み枠内で本来アミノ酸をコードしていたコドンが、ゲノム DNA 上の突然変異によって終止コドンへと置き換わるような変異のことをナンセンス変異と呼ぶ。多くの劣性遺伝疾患では、塩基の置換や欠失によってナンセンス変異を生じていることが知られている。例えば、紫外線感受性遺伝疾患の一つである色素性乾皮症 A 群では、日本人患者の9割以上にナンセンス変異が見出される。患者(ホモ接合体)の出現頻度から推測される変異のキャリアー(ヘテロ接合体)は数百人に1人と考えられており、日本人の中に一定数の人たちがこの疾患の原因遺伝子に変異を持っていると想像される。現在知られている劣性遺伝疾患は相当数に上ることから、一見正

常人の中にもおそらくは複数の遺伝子にナンセンス変異が潜んでいると思われる。

ナンセンス変異を持つ遺伝子から発現した mRNA からは、途中で途切れたペプチドが生成することから、mRNA の不完全な終止コドン、PTC (premature termination codon) と呼ばれることも多い。この PTC の生じる原因は様々であり、遺伝疾患におけるゲノム上のナンセンス変異だけが原因とは限らない。例えば、T 細胞や B 細胞におけるレセプター遺伝子の再構成時には一定の頻度で PTC を生じることが知られている。さらに RNA の代謝においても、スプライシング時にイントロンが除去されなかったり、オールタネイティブなスプライシングの結果として PTC が生じる例が知られている。また、mRNA 上で配列の変換を行う RNA 編集(editing)によっても Apo B 遺伝子 mRNA 上に PTC が生じることが知られている¹⁻³⁾。

3 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

このように細胞内で常に生じているであろう PTC を持つ mRNA は、結果として正しいアミノ酸配列よりも短いペプチドをコードすることになる。短い欠失型のタンパク質は、本来の配列を部分的に持つために、正常なタンパク質の持つ活性を競合的に阻害する可能性がある。先に述べたように、劣性遺伝疾患の変異遺伝子の頻度を考えると多くの遺伝子で競合阻害が起きているのであろうか？答えは No である。色素性乾皮症を含めた劣性遺伝疾患では、これら PTC を持つ mRNA は巧妙な機構により選び出され、迅速に分解、除去されている。したがって、キャリアーでは正常な遺伝子由来の mRNA のみが半分量発現し、変異を持つ遺伝子の mRNA は分解されて発現していない。この不要な RNA を選択的に除く機構がナンセンス変異依存 mRNA 分解(NMD; nonsense-mediated mRNA decay, または RNA surveillance)である。

劣性遺伝疾患における NMD の実際の例を図2に示した。ここでは、日本人色素性乾皮症 A 群の患者由

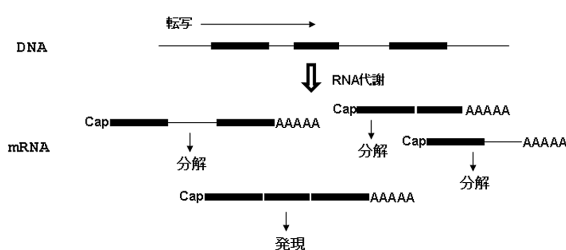


図1 遺伝子発現ノイズの除去

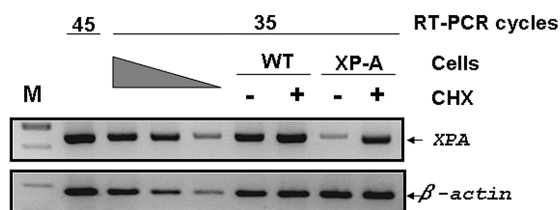


図2 日本人色素性乾皮症A群に観察される原因遺伝子 *XPA* の発現消失

来細胞 (XP-A) から RNA を抽出してきて定量的な RT-PCR で解析した結果である。原因遺伝子 *XPA* には点突然変異があり、スプライシングアクセプターサイトのずれから読み枠もずれて PTC が生じる⁴⁾。CHX は後述するが NMD の阻害剤であるシクロヘキシミドである。CHX を加えていない状態 (-) でバンドの濃さをみると、健常人由来細胞 WT では強い発現が観察されるが、XP-A ではバンドが非常に薄くなっていることがわかる。他のナンセンス変異が原因となっている劣性遺伝疾患でも、同様に NMD による原因遺伝子の発現消失が観察される。

4 NMD の機構

NMD は PTC を持つ mRNA のみを選別して分解するシステムであるが、その機構は最近になってようやく理解が進んできた。NMD の重要なポイントは、スプライシングを受けた mRNA 上で起きることである。さらに、大部分の遺伝子の正常な終止コドンは最終エクソンにあるが、最終エクソンに存在するナンセンス変異は認識されない。つまり、cDNA にナンセンス変異をいれても、その転写産物は NMD によって分解されないし、イントロンを含む配列を発現させると他のエクソンに存在する PTC は認識されて mRNA の分解が導かれるが、最終エクソンに変異をいれても分解を受けない。また、NMD による mRNA 分解には翻訳が必要であり、リボソームによってコドンを認識するステップが PTC を認識していると考えられている。このことは、翻訳の阻害剤であるシクロヘキシミドが NMD を阻害することと一致する。実際、図 2 で CHX (+) のレーンでは (-) で消失している *XPA* 遺伝子のバンドが回復してきている。また、PI-3 型キナーゼ阻害剤であるワルトマニンも NMD を阻害できるので、NMD にはリン酸化が必要である⁵⁾。また、NMD の標的となる mRNA の 5' 末端にはキャップ構造が付加されているが、CBC (Cap binding complex) が結合していることが知られている。通常細胞質で翻訳を受けている mRNA のキ

ャップ構造には eIF4E が結合しているので、この違いは NMD の大きな特徴の一つである⁶⁾。

現在考えられている NMD の起きる mRNA の様子は図 3 のようであるとされている。まず、転写された pre-mRNA がスプライシングを受けることによって、それぞれのエクソンのつなぎ目に EJC (exon junction complex) と呼ばれる複合体が形成される。この EJC を足場として Upf3 と呼ばれる因子が結合し、核膜付近で Upf2 が会合し、続いて Upf1 がリクルートされて Upf1-2-3 複合体が形成される。mRNA に Upf 複合体が結合している段階では、キャップ構造に CBC が結合している。やがて CBC が結合した mRNA において初めての翻訳反応 (pioneer round translation) がはじまると、リボソームの進行に伴って各 EJC は次々とはずされていくが、リボソームが PTC に到達して停止すると、下流の EJC を足場として形成された Upf 複合体と翻訳装置の間に相互作用が起きて変異が認識されと考えられている。PTC を持つことが確認された mRNA は、キャップ構造をはずされ、ポリ A 配列の分解を経ずに 5'→3' 方向への分解が起こる。PI-3 キナーゼの一つである SMG1 はこれらのステップのいずれかで Upf 複合体中の Upf1 をリン酸化すると予想される。ナンセンス変異をもたない mRNA では、リボソームが正常な終止コドンに達することで翻訳の終結が起こり、下流に EJC を介した Upf 複合体が結合していないために分解には導かれない。やがて、細胞質で CBC は翻訳開始因子である eIF4E へと置換される。この品質保証された mRNA には、eIF4G をはじめとする他の翻訳

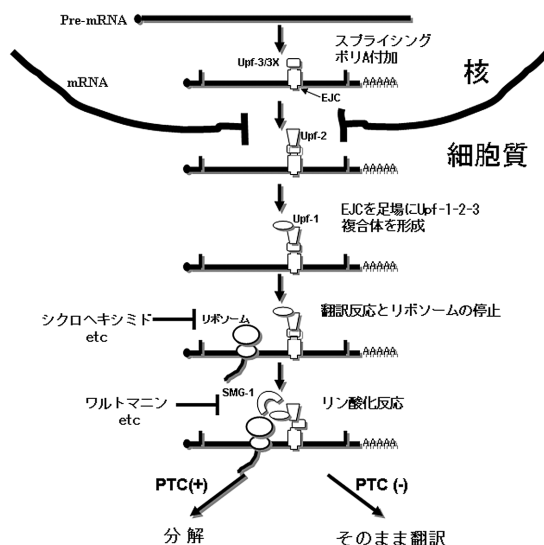


図3 NMD の機構モデル

開始因子がつぎつぎと集結し、リボソームを呼び込んで、細胞質における活発な翻訳が始まると考えられる。おそらくはNMDを回避するため大部分の正常な終止コドンが最終エクソンに存在する事実と、実験的に最終エクソン中のナンセンス変異がNMDに認識されないこともこのモデルを支持している^{7,8)}。

5 PTCを持つmRNA分解以外のNMD関連因子の役割

NMDはスプライシング、mRNA輸送、翻訳、タンパク質のリン酸化制御などを必要とする複雑なシステムである。一方でNMD関連因子がNMD以外の機構にも関与していることが報告されている。酵母のUpf変異体では、染色体末端に位置して細胞分裂寿命を決定するテロメア配列の短縮が報告されている。SMG1が細胞周期チェックポイントを制御するPI-3キナーゼであるATMやATRと非常に似通った配列を持ちDNA傷害センサーとして機能していること、またUpf1がDNAポリメラーゼ δ と結合する等の報告から、mRNAの分解とは関連がないように思われる老化制御や細胞周期チェックポイントなどの機構にもNMD、またはNMD関連因子が寄与する可能性が考えられている⁹⁾。最近我々のグループは、NMD関連因子が別の因子の量的制御を行っていることを見出しており、mRNAだけでなくタンパク質の分解経路にも寄与するのではないかと考えている。

6 おわりに

NMDの標的となるPTCを持つmRNAが、ゲノムあるいは転写産物全体でどれくらい存在しているのかも未だに定量的な解析結果は報告されていない。DNAマイクロアレイを利用した遺伝子発現量の解析では、個体差の大きい遺伝子は少なくとも数百個以上存在するが、これらすべてがナンセンス変異を持つとは考えにくく、おそらくは一塩基多型(SNPs)などによる発現量の変動も反映していると考えている。

最近、RNAiを利用してNMD関連因子発現をノックダウンすると、多数の遺伝子発現変動が起きることが報告された。この実験結果はNMDの標的となるナンセンス変異がゲノム配列中にかなりの頻度で存在している可能性と同時に、NMDが変異に関係なく遺伝子の発現量を調節している可能性を示唆する。今後は、NMDの分子レベルでの機構解明がさらに進んでいくとともに、遺伝情報発現やその品質管理における生物学的な役割がさらに明らかにされていくことが期待される。

なお、本総説中の実験結果及び研究について、金沢医科大学奨励研究S2005-6、武田科学振興財団、北國がん基金、科学研究費補助金からのご支援をいただきました。深く感謝いたします。また、金沢大学大学院自然科学研究科の長尾章弘氏、野川敦司氏、松永司先生、及び金沢医科大学総合医学研究所所長の松井忍先生、同研究所共同利用部門長中川秀昭先生をはじめとする研究所の皆様にもこの場をお借りして感謝いたします。

参考文献

- 1) J. Weischenfeldt, J. Lykke-Andersen, and B. Porse: Messenger RNA surveillance: neutralizing natural nonsense, *Curr Biol.*, **15**, 559-562 (2005)
- 2) S. Li, and M.F. Wilkinson: Nonsense surveillance in lymphocytes?, *Immunity.*, **8**, 135-141 (1998)
- 3) A. Chester, A. Somasekaram, M. Tzimina, et al.: The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay, *EMBO J.*, **22**, 3971-3982 (2003)
- 4) I. Satokata, K. Tanaka, N. Miura, et al.: Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9908-9912 (1990)
- 5) M. Pal, Y. Ishigaki, E. Nagy, et al.: Evidence that phosphorylation of human Upf1 protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway, *RNA*, **7**, 5-15 (2001)
- 6) Y. Ishigaki, X. Li, G. Serin, et al.: Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20, *Cell*, **106**, 607-617 (2001)
- 7) F. Lejeune, Y. Ishigaki, X. Li, et al.: The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling, *EMBO J.*, **21**, 3536-3545 (2002)
- 8) 石垣靖人: NMDの役割とその機構, 蛋白質核酸酵素, **48**, 382-389 (2003)
- 9) K.M. Brumbaugh, D.M. Otterness, C. Geisen, et al.: The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells, *Mol. Cell*, **14**, 585-598 (2004)