

第4節 スプライシング制御① mRNA 転写・プロセッシング・核外輸送・品質管理における相互連携の重要性

藤田 賢一¹⁾, 堀 史人²⁾, 鶴飼 生望²⁾, 前田 明¹⁾, 増田 誠司²⁾

1) 藤田医科大学, 2) 近畿大学

はじめに

高等真核細胞において、タンパク質をコードする遺伝子は核内で mRNA 前駆体として転写され、キャッピング、スプライシング、3' 末端の切断とポリアデニル化を受けて成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は、mRNA 核外輸送因子を介して核膜孔を通過して、細胞質に輸送され、タンパク質翻訳の設計図となる。これらのプロセッシング過程は独立して進行するのではなく、互いに連携して行われる。加えてプロセッシングが完了するまで核外に輸送されないよう積極的に核内に留められる（核内繫留）。このようにスプライシングを含めたプロセッシング過程は、mRNA の核内繫留機構の解除および核外輸送と連動している。本節では、ヒトの核内 mRNA の転写・プロセッシング・核外輸送過程について、最新の知見を含めつつ詳しく解説しよう。

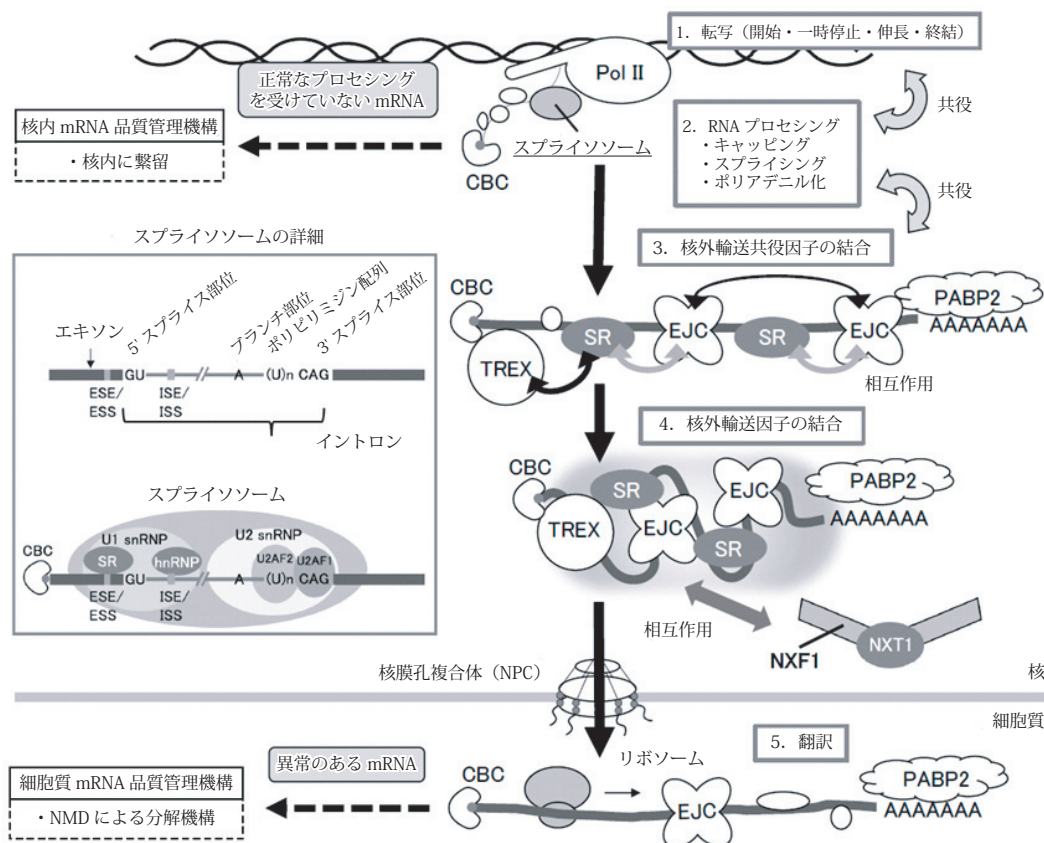
1. mRNA プロセッシングと核外輸送の共役

タンパク質をコードする遺伝子は RNA ポリメラーゼ II によって mRNA 前駆体として転写される。mRNA 前駆体はキャッピング、スプライシング、3' 末端プロセッシングなどの mRNA プロセッシングを受けて成熟した mRNA となる。これらのプロセッシングには数多くの因子（mRNA プロセッシング因子）が関わっている。RNA ポリメラーゼ II とプロセッシングを行う因子群は、mRNA 上に秩序だって会合と解離を繰り返すことで転写と各プロセッシングを密接に連携させる（以降、共役と記載する、図 1）¹⁾。転写と mRNA プロセッシングの共役に中心的な役割を担うのは RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニットの C 末領域（Carboxy-terminal domain ; CTD）である。CTD は種を超えて保存された YSPTSPS の繰り返し配列（反復の回数は出芽酵母では 26 回、ヒトでは 52 回と異なる）から構成されており、長く伸びた尾のような構造をとっている。出芽酵母の RNA ポリメラーゼ II の X 線結晶構造解析から、CTD は RNA ポリメラーゼ II から新規に生合成された RNA の出口近傍に存在し²⁾、様々な mRNA プロセッシング因子を転写伸長中の RNA 上にロードする足場として機能する³⁾。RNA ポリメラーゼ II による転写反応は、転写開始、一時停止、伸長、終結の 4 つの段階に分けることができ、この転写周期の進行に伴って CTD のリン酸化様式は動的に変化する。CTD のリン酸化様式の変化に応じて、適切な mRNA プロセッシング因子が CTD 上にリクルートされ、これらが順次 mRNA 上にロードされていくことで転写と mRNA プロセッシングの共役が正確に行われる¹⁾。

mRNA プロセッシングを終了した後、成熟 mRNA は細胞質へと輸送され、タンパク質翻訳の設計図となる。核と細胞質間の物質輸送は、核膜に存在する核膜孔複合体（Nuclear pore complex ; NPC）と呼ばれる 125 MDa ほどの非常に大きな複合体を介して行われる。核膜孔を介した物質移動について、分子量が約 40 kDa 以下の小さな分子は拡散によって核膜孔を通過することができる。しかし RNA やタンパク質のように大きな分子を輸送する場合には、それぞれ専用の輸送体が必要になる。mRNA 核外輸送についても、転写と mRNA プロセッシングの関係性と同じく、mRNA プロセッシングと mRNA 輸送過程が共役して進行する（図 1）。この共役の中核を担うのが TREX 複合体（Transcription-export ; TREX）である⁴⁾。

TREX 複合体は進化的に保存されたタンパク質複合体であり、主にスプライシングの完了を足掛かりとして、5' 末端のキャップ部位のキャップ結合複合体（Cap-binding complex ; CBC）と結合する。さらに 3' 末端のプロセッシングが完了した成熟 mRNA にリクルートされる。mRNA の核外輸送を最終的に担う因子は、mRNA 輸送体である NXF1 と NXT1 のヘテロ二量体であるが、通常単独では mRNA に相互作用できず、結合を仲介するアダプター分子が必要である。TREX 複合体は mRNA プロセッシング完了に伴って成熟 mRNA にリクルートされ、次いで NXF1-NXT1 ヘテロ二量体と mRNA を結ぶアダプターとして機能することで転写・プロセッシング・核外輸送過程の共役因子として働

く⁴⁾。ヒトの TREX 複合体は、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ UAP56, THO サブ複合体 (THOC1, THOC2, THOC3, THOC5, THOC6, THOC7), ALYREF, CIP29, CHTOP, POLDIP3, および ZC3H11A から構成される。この TREX 複合体に加えて、後に説明するスプライシング調節因子である SR タンパク質群 (ヒトでは SRSF1-12 の 12 種が存在する) と、スプライシング完了に伴って結合するエクソン接合部複合体 (exon-junction complex; EJC) も NXF1-NXT1 ヘテロ二量体と mRNA を結ぶアダプターとして働く^{4,5)}。次に TREX 複合体と各因子が、プロセッシング過程に伴って動的に mRNA へとリクルートされる過程を説明する。



mRNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ複合体 (RNA Pol II) によって核内で転写され、種々のプロセッシングを受けて成熟した mRNA となる。成熟 mRNA にはプロセッシングの完了と共に共役して核外輸送共役因子が結合する。核外輸送共役因子は、mRNA の核外輸送に働く核外輸送因子が mRNA に結合する足場となる。核内で mRNA プロセッシングに不具合が生じた mRNA 前駆体は、核内に繋留される。また不具合を持つ mRNA の中で、誤って細胞質に輸送された場合は NMD と呼ばれる分解機構により除去される。

図1 mRNAのプロセッシングおよび核外輸送機構

1.1 キャッピングと核外輸送の共役

RNA ポリメラーゼ II が新生 RNA をおよそ 25 ~ 30 塩基ほど転写すると、一時停止する。この時、キャッピング酵素が mRNA の 5' 末端に 7-メチルグアノシンを付加する。この構造をキャップといい、mRNA と他の RNA を区別する上で重要な目印となる。転写伸長に伴って適切にキャッピング付加された後、CBC が結合する。mRNA は、CBC の結合によって 5' 末端が保護される。これにより RNA 分解酵素であるエキソヌクレアーゼによる 5' 末端側からの分解から保護される。さらに CBC は、その後の核外輸送や細胞質での安定性や翻訳開始にも影響する。TREX 複合体は CBC およびスプライシングを介して mRNA の 5' 末端にリクルートされ、次に NXF1-NXT1 ヘテロ二量体を mRNA 上に結合させる。これにより mRNA は 5' から 3' 方向に核膜孔を通過して細胞質へと輸送される。事実、電子顕微鏡観察と並はずれて mRNA 量の多いユスリカ属のバルビアン環遺伝子を用いて、mRNA がキャップ構造を先頭に 5' から 3' の方向に向けて核膜孔を移動していることが明らかにされている。このように、TREX 複合体は構成因子 ALYREF を介して CBC と相互作用しつつ、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体を mRNA にリクルートすることで 5' から 3' という方向性をもった核外輸送にも寄与している。

1.2 スプライシングと核外輸送の共役

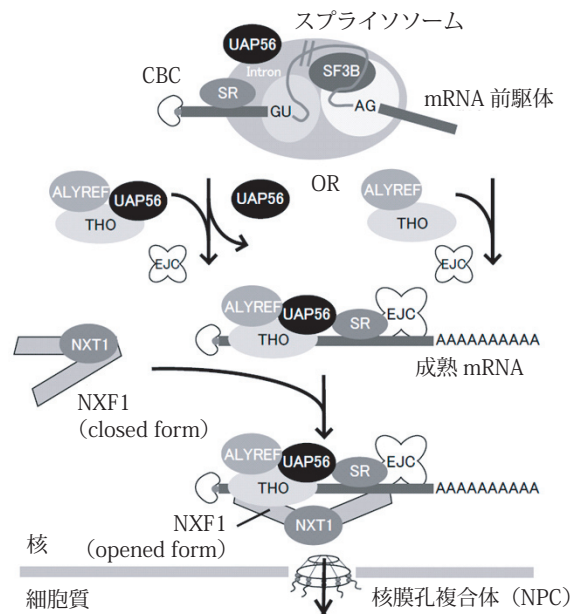
TREX 複合体はスプライシングの完了をきっかけとして、mRNA にリクルートされる。よってまずスプライシング反応について説明しよう。mRNA 前駆体スプライシングは、5 種類の snRNA (U1, U2, U4, U5, U6 snRNA) と 170 種類以上のタンパク質からなるスプライソソームと呼ばれる巨大な複合体によって、2 つのエキソンに挟まれたイントロンとの境界が正確に認識されて切り出される過程である⁶⁾。イントロン上には、スプライシングを行なうための目印となる保存された共通配列が 4 ヶ所存在している (図 1)。上流エキソンとイントロン境界部に存在する 5' スプライス部位、同じく下流エキソンとの境界に存在する 3' スプライス部位、3' スプライス部位から 20-30 塩基程度上流のイントロンに存在するブランチ部位ならびにブランチ部位と 3' スプライス部位の間のポリピリミジン配列である。各部位の保存された共通配列は、スプライソソームの構成因子によって認識される。

スプライシングの最初の段階において、5' スプライス部位は U1 snRNP (snRNA タンパク質複合体粒子)、ブランチ部位には SF1、ポリピリミジン配列と 3' スプライス部位は、U2AF⁶⁵ と U2AF³⁵ が結合した U2AF ヘテロ二量体がそれぞれ結合する。その後、U2 snRNP は U2AF ヘテロ二量体と相互作用し、先にブランチ部位に結合した SF1 と入れ替わってブランチ部位に結合する。その後、これら因子の相互作用を経て、他のスプライソソーム構成因子へと入れ替わりが起ることによって適切なスプライソソームのリモデリングが生じる。その結果、スプライシングが進行してイントロンの除去およびエキソン同士の連結が行われる。前述の 4 つの保存された共通配列に加え、スプライシング部位を決める制御配列としてエキソン内に存在するスプライシング促進配列 (Exonic splicing enhancer ; ESE) やスプライシング抑制配列 (Exonic splicing silencer ; ESS)、イントロン内に存在するスプライシング促進配列 (Intronic splicing enhancer ; ISE) およびスプライシング抑制配列 (Intronic splicing silencer ; ISS) も存在している。これらの制御配列には、一般にスプライシングの促進に働き、セリンとアルギニンに富む領域をもった SR タンパク質群、また一般にスプライシングの阻害に働く hnRNA タンパク質群を含めて様々な RNA 結合タンパク質が mRNA と相互作用し、結合した部位近傍のスプライシングを調節する。スプライシングの完了に伴って、エキソン-エキソン境界の上流 24 塩基あたりの mRNA 上に 4 種類の中核タンパク質と 10 種類ほどの表層タンパク質から構成される EJC 複合体が形成される。EJC 複合体は後述するように、核外輸送や、細胞質での不良 mRNA の分解など、スプライシング後の機能にも密接に関与している⁷⁾。最近、成熟 mRNA を再びスプライシングさせないために EJC 複合体の結合が必要であることが示された⁸⁾。

THO-サブ複合体を含む TREX 複合体構成因子は転写中の RNA ポリメラーゼ II にリクルートされる。また TREX 複合体の構成因子である UAP56 は、U1 snRNP と U2AF⁶⁵ それぞれに相互作用して mRNA 前駆体に結合し、スプライソソームの形成とリモデリングに関わることで、スプライシングの進行を助ける (図 2)⁹⁾。その後、TREX 複合体はスプライシングの完了した mRNA に結合する¹⁰⁾。mRNA に結合した TREX 複合体は、THO-サブ複合体の THOC5 と ALYREF および CHTOP が、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体と相互作用することで成熟 mRNA を核外輸送へと導く¹¹⁻¹³⁾。NXF1 は RNA 結合領域 (RNA-binding domain ; RBD) を有するが、RBD は NXF1 内の他の領域と相互作用しているため、NXF1 は単独では mRNA と結合しない。TREX 複合体は、構成因子の THOC5, ALYREF および CHTOP を介して NXF1 を mRNA 上にリクルートするだけでなく、NXF1 の分子内相互作用を解消することで RBD を介した NXF1 の RNA 結合を助ける。これに続いて、NXF1 は mRNA を核膜孔から細胞質へと輸送する。

TREX 複合体に加えて、SR タンパク質群も NXF1-NXT1 ヘテロ二量体のリクルートに働く¹⁴⁾。SR タンパク質群はスプライシングの終了後も mRNA 上に留まり、TREX 複合体の構成因子や NXF1-NXT1 ヘテロ二量体と相互作用することでスプライシングを完了した mRNA の核外輸送を促進する。SR タンパク質のうち SRSF1 や SRSF7 は、転写周期における RNA ポリメラーゼ II の CTD と同様に、スプライシングの進行と共に動的にリン酸化修飾される。これらの SR タンパク質は、スプライシング完了と共に脱リン酸化される。この状態の SR タンパク質には NXF1-NXT1 ヘテロ二量体が強く結合する。よって SR タンパク質の脱リン酸化の制御は、スプライシング完了後の mRNA 核外輸送を促進する働きを持つ¹⁴⁾。EJC 複合体は、スプライシングの終了後に mRNA 上に形成される。また SR タンパク質や TREX 複合体ならびに NXF1-NXT1 ヘテロ二量体と相互作用して mRNA-タンパク質複合体 (messenger ribonucleo-protein particle ; mRNP) を形成する⁷⁾。EJC 複合体と SR タンパク質、および TREX 複合体は、スプライシングが

完了した成熟 mRNA 上で会合することから、成熟 mRNA と結合タンパク質から構成される mRNP を適切な高次構造にパッケージングし、核外輸送を促進していると考えられている¹⁵⁾。後述するように TREX 複合体の mRNA へのリクルートはキャッピングとスプライシングだけでなく、3' 末端プロセッシングとも関連している。このことから TREX 複合体と EJC 複合体および SR タンパク質群とが秩序をもって協調的に mRNP を構成することが効率的な mRNA 核外輸送に重要と考えられる。



スプライシングおよび各プロセッシング過程の完了をトリガーとして TREX 複合体、EJC 複合体がそれぞれ結合する。UAP56 と SR タンパク質は mRNA 前駆体の段階から結合し、スプライシングの進行を促す。これらの核外輸送共役因子は核外輸送因子 NXF1-NXT1 ヘテロ二量体の RNA 上へのリクルートを促す。これにより成熟 mRNA は効率的に核外輸送される。

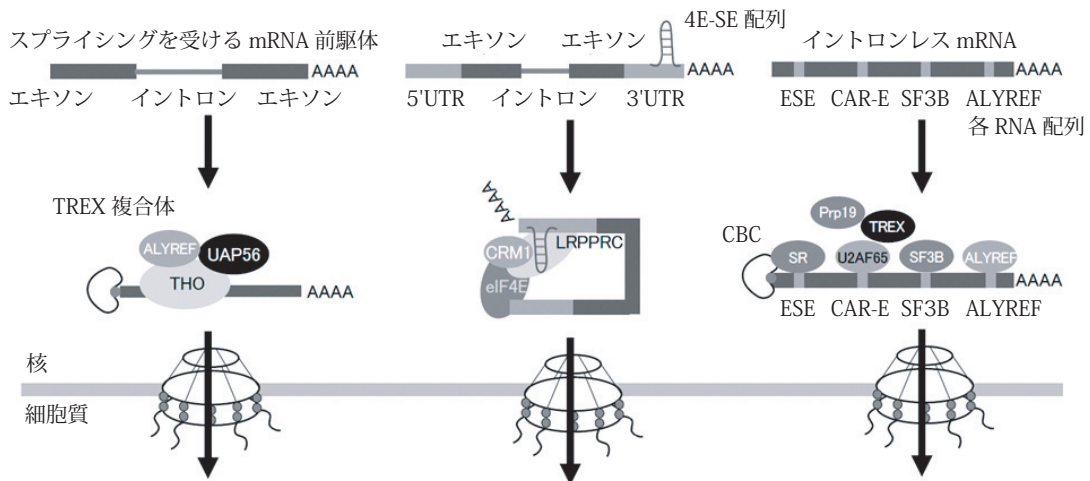
図2 スプライシングと核外輸送の共役

1.3 3' 末端プロセッシングと核外輸送の共役

3' 末端プロセッシングは、RNA ポリメラーゼ II が遺伝子の端にあるポリ (A) 付加シグナル (AAUAAA と下流の GU あるいは U に富む配列) を転写したのちに、3' 末端プロセッシング因子がポリ (A) 付加シグナルを認識して mRNA を切断し、続いてポリ A ポリメラーゼが mRNA の 3' 末端に連続したアデニンヌクレオチド (A) からなるポリ (A) 鎖を付加する反応である (ポリアデニル化)。この反応もスプライシングと同様に 20 種以上の因子が関わる複雑な反応である。まずポリ (A) 付加シグナルが RNA ポリメラーゼ II の CTD に結合した CPSF (切断ポリアデニル化特異因子) と CstF (切断促進因子) により認識される。CPSF と CstF が mRNA 上に移動することで、CF (切断因子) 複合体が形成され RNA 鎖を切断する。次いで、ポリ A ポリメラーゼが、切断によってできた mRNA の 3' 末端に約 200 個のアデニンを付加する。付加されたポリ (A) 鎖には、ポリ (A) 結合タンパク質 2 (PABP2) が結合し、mRNA をヌクレアーゼによる 3' 末端からの分解から保護する。一方、切断によって生成した下流の RNA は、5' → 3' エキソヌクレアーゼである XRN2 によって分解される。同時に、XRN2 は転写を続けている RNA ポリメラーゼ II を含む転写伸長複合体を不安定化して転写を終結に導く。転写を正しく終結させることは、下流にある遺伝子を誤って転写するのを防ぐだけでなく、RNA ポリメラーゼ II を新たな転写に再利用するためにも重要である。CF 複合体に含まれる PCF11 は TREX 複合体構成因子である ALYREF と相互作用し、ALYREF の遺伝子部位へのリクルートに働くことが示されている¹⁶⁾。その後、3' 末端プロセッシングに働く複合体の形成に伴って、ALYREF は UAP56 と相互作用し TREX 複合体に動員されると考えられる¹⁷⁾。

2. 様々な mRNA 核外輸送経路

ここまで、TREX 複合体と NXF1-NXT1 ヘテロ二量体を介した mRNA 核外輸送機構について説明してきた。しかし mRNA の核外輸送は、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体に加えて、タンパク質の核-細胞質輸送に働く輸送体である CRM1 も一部の mRNA の輸送に働いている¹⁸⁾。CRM1 は TREX 複合体とは異なるアダプター因子を利用していることや、特定の mRNA 群の輸送に関わることから、NXF1-NXT1 による mRNA 輸送経路とは異なる輸送経路を使うことで巧みに遺伝子の発現を制御している (図 3 中央)。これまで述べてきたようにスプライシングの完了は TREX 複合体をリクルートするために重要であるが、ヒトゲノムの約 5% を占めているのが、イントロンを持たない遺伝子である。そのような遺伝子から転写されたスプライシングを受けない mRNA (イントロンレス mRNA) はスプライシングに依存することなく、TREX 複合体や SR タンパク質をリクルートする特別な RNA 配列を持つので、効率的に核外輸送される (図 3 右)。一方で、イントロンを持つ遺伝子からイントロンを除外した cDNA に由来する mRNA は、内在性のイントロンレス mRNA とは異なり TREX 複合体や SR タンパク質を取り込む仕組みを持たない。つまり外来性の遺伝子を発現させる際に使用する cDNA からの転写産物は、効率良く核外輸送されにくい。そこでイントロンレス mRNA の核外輸送機構についても、最後に簡単に概説したい。



mRNA はいくつかの mRNA 核外輸送経路によって細胞質へと輸送される。スプライシングを受けない遺伝子の多くは TREX 複合体と NXF1-NXT1 を介して核外輸送される (図左)。一部の mRNA 群は CRM1 と、CRM1 専用のアダプタータンパク質によって輸送される (図中央)。CRM1 による mRNA 輸送経路の代表として LRPPRC アダプタータンパク質を介したものを表記した。イントロンを持たない mRNA は、内部に有する RNA 配列を介して TREX 複合体等をリクルートすることで核外輸送を促す。

図 3 様々な mRNA 核外輸送経路

2.1 CRM1 による mRNA 輸送

CRM1 はタンパク質の輸送に働く機構を利用し、mRNA の輸送も行う^{18,19)}。よってまず CRM1 によるタンパク質輸送の分子機構を説明したのちに、CRM1 を介した mRNA 輸送について述べる。

CRM1 は、核外輸送シグナル (Nuclear export signal ; NES) というロイシンに富んだシグナル配列に結合して、標的タンパク質の核外輸送を行う核外輸送受容体 (Exportin) を形成する。CRM1 と標的タンパク質の会合は、低分子量 G タンパク質 Ran と Ran の GTP 加水分解を調節する Ran 結合タンパク質群によって制御される。細胞内で Ran は、GTP 結合型 (RanGTP) と GDP 結合型 (RanGDP) という 2 種類のヌクレオチド結合状態を取り、これらの立体構造は異なっている。CRM1 は RanGTP 依存的に NES と結合して、CRM1-NES-RanGTP からなる核外輸送複合体を形成する。この複合体において RanGTP が RanGDP に変換されると、Ran の構造変化が引き金となって三者複合体は解離する。

RanGDP から RanGTP への変換は、Ran のグアニンヌクレオチド交換促進因子 (GEF) である RCC1 (Regulator of chromosome condensation 1) によって行われる。RCC1 は核に局在するため、核内の RanGDP は速やかに RanGTP

に変換される。このため、CRM1-NES-RanGTP の核外輸送複合体は効率よく形成される。一方で、細胞質には Ran による GTP 加水分解を促進するタンパク質群 (RanGAP, RanBP1, RanBP2) が存在しているため、RanGTP は容易に RanGDP に変換される。したがって細胞質に移動した核外輸送複合体は解体されて、NES を持つタンパク質は放出される。解離した CRM1 は核膜孔を双方向に通過可能であるため、核内に単独で戻る。このように核-細胞質間における RanGTP と RanGDP の濃度は空間的に制御されている。また Ran の状態によって CRM1-NES の結合と解離が制御されるため、標的タンパク質は核内から細胞質へと一方向的に輸送される。

CRM1 は RNA とは直接結合しないため、CRM1 が標的 mRNA を輸送するためにはアダプタータンパク質を必要とする (図 3 中央)。現在までに CRM1 のアダプタータンパク質として HuR (Human antigen R), LRPPRC (Leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein), NXF3 (Nuclear export factor 3) の 3 種類が同定されている。HuR は pp32 ならびに APRIL と複合体を形成して 3'UTR 領域に AU-rich 配列 (AU-rich element; ARE) と呼ばれる RNA 配列を持つ mRNA 群と結合する。LRPPRC は eIF4E と相互作用し、やはり 3'UTR 領域に 4E-SE と呼ばれる RNA 配列を持つ mRNA と結合する。両アダプタータンパク質に対し、NXF3 が RNA 配列の嗜好性を持つかは不明である。また、いずれかのアダプタータンパク質の発現を阻害しても、他の CRM1 アダプタータンパク質が制御する mRNA 輸送経路と、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体を介した mRNA 輸送経路は阻害されないことから、それぞれは独立した mRNA 輸送経路を形成していると考えられる。さらに、スプライシングを受けて NXF1-NXT1 ヘテロ二量体によって核外輸送されるレポーター mRNA に、人工的な RNA 配列を付加して CRM1 を結合できるようにすると、このレポーター mRNA は本来結合するはずの NXF1-NXT1 ヘテロ二量体は結合できなくなると報告されている²⁰⁾。このことから、mRNA には NXF1-NXT1 ヘテロ二量体か CRM1 のどちらかが結合し、細胞質へと輸送するモデルが考えられている。

CRM1 が輸送する mRNA 群は、細胞増殖や、ストレス応答に関わる機能を持つ遺伝子群が多いと報告されている^{18,19)}。例えば、熱ストレス応答に関わる Hsp70 の mRNA は ARE 配列をもち、HuR-CRM1 によって輸送される。また、4E-SE 配列を持ち、LRPPRC-CRM1 によって輸送される mRNA には cyclin D1, c-Myc など細胞増殖に重要な転写産物が含まれる。さらに、NXF3 は精巣特異的に発現することが報告されていることから、精巣特異的な mRNA 群の輸送に働く予想されている。一方、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体は細胞の種類によらず普遍的に発現している。今後、分子機構の解析が進めば、CRM1 による mRNA 輸送経路の生理学的な重要性が、より一層明らかになるだろう。

2.2 インترونレス mRNA の輸送

上述のようにイントロンのない遺伝子はゲノム全体から見ると少数であるが、その多くが細胞増殖や発生に重要なシグナル伝達因子や制御タンパク質をコードしているため、これらの発現制御機構の理解は重要である²¹⁾。これまで様々なイントロンレス mRNA において、核外輸送に必要な RNA 配列が同定されてきた^{14,21,22)}(図 3 右)。

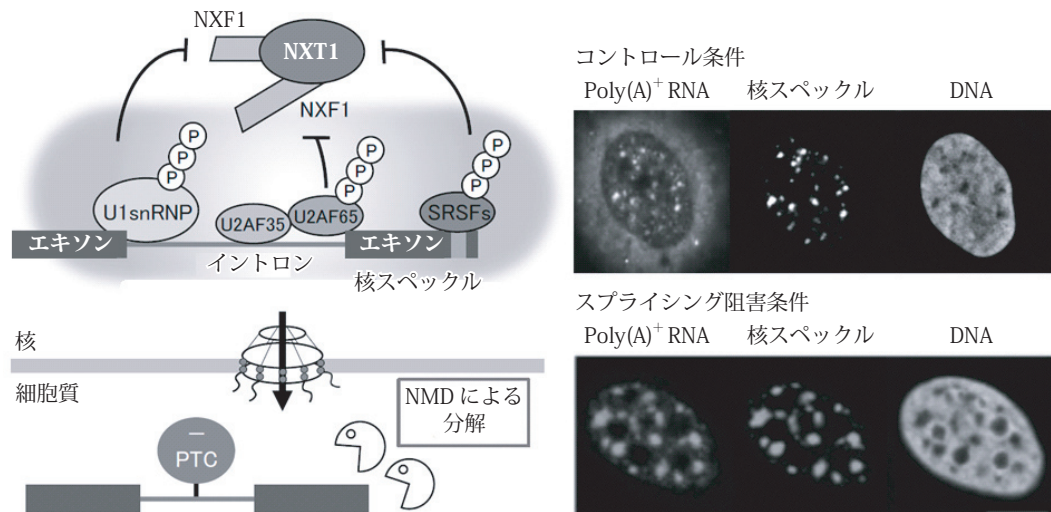
c-Jun エンハンサー配列 (CJE) は標的イントロンレス mRNA の核外輸送を促進させる配列として最初に発見された。その後、ヒトの 3 つのイントロンレス mRNA (HSPB3, IFN α 1, IFN β 1 遺伝子由来) において、TREX 複合体および NXF1-NXT1 ヘテロ二量体による核外輸送を促進させる配列として細胞質蓄積領域 (Cytoplasmic accumulation region; CAR) が発見された。CAR 配列は 3 つの転写産物間で 162 塩基から 285 塩基に及び、それぞれの CAR 配列を欠失した転写産物は核内に蓄積する。また CAR 配列を外来のレポーター mRNA の上流に挿入すると、このレポーター mRNA の核外輸送が促進される。CJE 配列を用いても同様の実験結果が得られている。そこで CJE 配列と CAR 配列で共通して存在していた 10 塩基の共通配列 CAR-E について研究が進められ、この CAR-E 配列がスプライソソームの構成因子である U2AF⁶⁵ と Prp19 複合体、および TREX 複合体を mRNA 上にリクルートすることによって核外輸送を促進することが明らかになった。CAR-E 配列に似た配列は、ヒトの天然イントロンレス遺伝子に広く存在することが示されている。

CAR-E 配列以外にも TREX 複合体のリクルートを促進する RNA 配列が存在する。TREX 複合体構成因子の ALYREF はイントロンレス mRNA の 5' 末端だけでなく、3' 末端領域にも結合し、核外輸送を促進すると報告されている^{14,21,22)}。

またイントロンレス mRNA にも ESE 様の RNA 配列が存在し、ESE 様配列に SR タンパク質がリクルートされ、それに導かれる形で TREX 複合体も会合してくる^{14,21,22)}。またスプライソソーム構成因子 SF3B1 をリクルートする RNA 配列もイントロンレス mRNA 上に同定されている。この場合も標的のイントロンレス mRNA に TREX 複合体がリクルートされる。このようにイントロンレス mRNA は、TREX 複合体をリクルートする様々な RNA 配列を獲得してきたことが示唆される。今後、この分子基盤をより詳細に解析していけば、TREX 複合体をリクルートする RNA 配列を標的 mRNA に付加することで効率的な核外輸送が実現できると予想される。この技術を開発できれば、目的タンパク質をコードする cDNA に付加することで、その mRNA の効率的な核外輸送を実現し、タンパク質生産性を向上させる細胞工学分野にも貢献できる基盤知見となると期待される。

3. スプライシングを受けていない mRNA の核内繫留機構

これまで、スプライシングやその他のプロセッシングが完了した mRNA の核外輸送を促進する機構について紹介してきた。ここでは、スプライシングに不具合が生じてイントロンが除去されなかった、あるいはまだスプライシングされていない mRNA の核内繫留機構について詳しく説明しよう。このような mRNA は膜構造を持たない核スペックルと呼ばれる核内構造体に留められる^{14,22,23)}。核スペックルは核質のクロマチン領域間に存在し、転写因子、mRNA スプライシング因子をはじめ、各プロセッシング因子や mRNA 核外輸送因子に富む核内構造体である。最近の研究から核スペックルはスプライシングが実行される場であると同時に、スプライシングが完了していない mRNA を留める品質管理の場であると考えられている²²⁾。核内繫留のメカニズムは、(1) 核スペックルへ繫留する、(2) mRNA 核外輸送因子の mRNA へのリクルートを阻害する、という 2つの制御機構で構成されていると予想されている (図 4)。



スプライシングを受けていない mRNA 前駆体は、スプライシング過程に伴って結合した U1 snRNP, U2AF³⁵, U2AF⁶⁵, SR タンパク質によって核スペックルに留められ、NXF1-NXT1 の結合を阻害する。誤って細胞質に輸送されてしまった場合、多くは NMD により速やかに分解される。ヒト培養細胞を用いて Poly(A)⁺ RNA に対する蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を行うと、コントロール条件では細胞質に mRNA を表すシグナルが観察されるが、スプライシング因子を細胞内で枯渇させると mRNA を表すシグナルが核スペックルに繫留される様子が観察される。記載した顕微鏡画像は文献²³⁾のものを使用した。

図 4 スプライシングを受けていない mRNA の核内繫留機構

まず、mRNA 前駆体の核内繫留に働く因子について記載する。面白いことに、mRNA 前駆体の核内繫留に関与する因子はスプライシング因子そのものであった。スプライシングが完了しなかった場合、スプライシング過程に働く因子群は mRNA 前駆体に結合したまま留まる。このこと自体が、mRNA 前駆体の核内繫留機構の鍵となる。つまりスプライシングの初期段階に働く因子群がまず mRNA 前駆体に結合することがこの機構に重要である。実際に、スプライシングの最初期段階で働く U1 snRNP の 5' スプライス部位への結合を、U1 snRNA 結合部位の変異や U1

snRNP のタンパク質 U1-70K の枯渇によって阻害すると、スプライシングされていないレポーター mRNA の核内繫留が妨げられ、細胞質へ漏出する。同様に、3' スプライス部位への変異や、U2 snRNP より先に 3' スプライス部位に結合する UAP56 や U2AF⁶⁵ を枯渇させた場合においても、スプライシングされていないレポーター mRNA の核内繫留機構が破綻して細胞質へと輸送される。それではスプライシング因子群はどのように mRNA 核外輸送因子のリクルートを阻害し、核内に繫留するのだろうか。

SR タンパク質と同様に U1 snRNP の構成要素である U1-70K や U2 snRNP に結合する因子 U2AF⁶⁵ も、アルギニンとセリンの繰り返しに富む領域 (Arginine-serine rich domain ; RS 領域) を有する。これらの RS 領域を持つスプライシング因子群は、mRNA 前駆体の核スペックルへの積極的な核内繫留に機能するとされている。RS 領域は特定のタンパク質二次構造を示さない低複雑性領域 (Low-complexity region ; LCR) であり、LCR を有する因子群が凝集して存在することによって液-液相分離を介した核スペックルの形成と、mRNA 前駆体の繫留が成立すると考えられている^{14,22)}。実際に、U2AF⁶⁵ と U1-70 K による mRNA の核内繫留には、それぞれの RS 領域を必要としている。これらの因子群の RS 領域はスプライシング過程に伴い SR タンパク質キナーゼと cdc2 様キナーゼ族、およびタンパク質ホスファターゼ 1 (protein phosphatase 1) によってスプライシングの進行に伴ってリン酸および脱リン酸制御を受ける^{14,22)}。つまりスプライシングが完了していない mRNA 前駆体上には、リン酸化型の RS 領域を持つスプライシング因子群が集積しており、核内繫留因子として前駆体 mRNP の核内繫留の目印となると考えられている^{14,22)}。また先に述べたように、リン酸化状態の SR タンパク質は、NXF1-NXT1 ヘテロ二量体の結合を阻害する。一方スプライシングが完了すると SR タンパク質は脱リン酸化され、mRNA 上に NXF1-NXT1 ヘテロ二量体が結合する。このようにして RS 領域を持つスプライシング因子群は、mRNA を核スペックルへ繫留するか、mRNA 核外輸送因子をリクルートするかを、リン酸化状態の変化を介して協調的に制御している。

なお本節では詳しい記載を割愛するが、スプライシングに不具合が生じてイントロンが除去されていない mRNA はイントロン内に早期終始コドン (Premature termination codon ; PTC) を含むことが多い。このため、誤って細胞質に輸送されたとしてもナンセンスコドン介在的 mRNA 分解 (Nonsense-mediated mRNA decay ; NMD) と呼ばれる分解機構により速やかに分解される⁷⁾。このように細胞はスプライシングされていない mRNA から誤ってタンパク質へと翻訳しないよう複数の品質管理機構を保持することで、正確な遺伝子発現を実現している (図 4)。

おわりに

mRNA 前駆体が転写され、プロセッシングを受け、最終的に成熟 mRNA が核から細胞質へと輸送される中で、非常に多くのタンパク質が関わり精密に制御されていることを理解していただけたと思う。重要なことは、これらの多種多様な因子の働きが、常に連携しながら mRNA の各プロセッシング過程が進行している事実である。これは、生物が長い進化の中で、mRNA の転写から細胞質への輸送までの複雑な過程を正確無比かつ円滑に完結させるべく、成し遂げていった最高の戦略に違いない。

本節では紙面の制限から、主にスプライシングに焦点を当てて説明したが、核内繫留機構は、スプライシングと密接に結びついていることをお分かりになられたら幸いである。ここに記載した品質管理の機構はまだ完全に理解されたわけではないが、それでも生命の多様性に必要な遺伝子発現が堅牢な機構によって担保されていることを実感してもらえれば幸いである。最後に、ここに記載した内容以外にも、研究の進展によって未知の機構が見つかるのではないかと、それによって mRNA の転写から核外輸送へと至る経路また品質管理機構の理解が進むことを期待している。

謝辞

作図を手伝っていただきました、藤田医科大学の金久朋未さんにこの場を借りて感謝致します。

文 献

- 1) S. Komili, P.A. Silver, Coupling and coordination in gene expression processes : A systems biology view, *Nat. Rev. Genet.* 9, 38-48 (2008)
<https://doi.org/10.1038/nrg2223>
- 2) K.J. Armache, H. Kettenberger, P. Cramer, The dynamic machinery of mRNA elongation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 197-203 (2005)
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.03.002>
- 3) Y. Hirose, J.L. Manley, RNA polymerase II and the integration of nuclear events, *Genes Dev.* 14, 1415-1429 (2000)
<https://doi.org/10.1101/gad.14.12.1415>
- 4) C.G. Heath, N. Viphakone, S.A. Wilson, The role of TREX in gene expression and disease, *Biochem. J.* 473, 2911-2935 (2016)
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160010>
- 5) M. Müller-McNicoll, V. Botti, A.M. de Jesus Domingues, H. Brandl, O.D. Schwich, M.C. Steiner, T. Curk, I. Poser, K. Zarnack, K.M. Neugebauer, SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export, *Genes Dev.* 30, 553-566 (2016)
<https://doi.org/10.1101/gad.276477.115>
- 6) C.L. Will, R. Lührmann, Spliceosome structure and function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1-2 (2011)
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- 7) H. Le Hir, J. Saulière, Z. Wang, The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks, *Nat. Publ. Gr.* 17, 41-54 (2015)
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>
- 8) Y. Otani, K. Fujita, T. Kameyama, A. Mayeda, The exon junction complex core represses cancer-specific mature mrna re-splicing : A potential key role in terminating splicing, *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6519 (2021)
<https://doi.org/10.3390/ijms22126519>
- 9) H. Shen, X. Zheng, J. Shen, L. Zhang, R. Zhao, M.R. Green, Distinct activities of the DExD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome, *Genes Dev.* 22, 1796-1803 (2008)
<https://doi.org/10.1101/gad.1657308>
- 10) S. Masuda, R. Das, H. Cheng, E. Hurt, N. Dorman, R. Reed, Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing, *Genes Dev.* 19, 1512-1517 (2005)
<https://doi.org/10.1101/gad.1302205>
- 11) J. Katahira, H. Inoue, E. Hurt, Y. Yoneda, Adaptor Aly and co-adaptor Thoc5 function in the Tap-p15-mediated nuclear export of HSP70 mRNA, *EMBO J.* 28, 556-567 (2009)
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.5>
- 12) C.-T. Chang, G.M. Hautbergue, M.J. Walsh, N. Viphakone, T.B. van Dijk, S. Philipsen, S. a Wilson, Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex., *EMBO J.* 32, 473-486 (2013)
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.342>
- 13) N. Viphakone, G.M. Hautbergue, M. Walsh, C. Te Chang, A. Holland, E.G. Folco, R. Reed, S.A. Wilson, TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, *Nat. Commun.* 3 (2012)
<https://doi.org/10.1038/ncomms2005>
- 14) M. Wegener, M. Müller-mcnicoll, Nuclear retention of mRNAs - quality control, gene regulation and human disease, *Semin. Cell Dev. Biol.* 79, 131-142 (2018)
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.001>

- 15) G. Singh, A. Kucukural, C. Cenik, J.D. Leszyk, S.A. Shaffer, Z. Weng, M.J. Moore, The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus, *Cell*. 151, 750-764 (2012)
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.007>
- 16) S.A. Johnson, G. Cubberley, D.L. Bentley, Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factor Yra1 by Direct Interaction with the 3' End Processing Factor Pcf11, *Mol. Cell*. 33, 215-226 (2009)
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.007>
- 17) S.A. Johnson, H. Kim, B. Erickson, D.L. Bentley, The export factor Yra1 modulates mRNA 3' end processing, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1164-1171 (2010)
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2126>
- 18) M. Delaleau, K. Borden, Multiple Export Mechanisms for mRNAs, *Cells*. 4, 452-473 (2015)
<https://doi.org/10.3390/cells4030452>
- 19) N. Siddiqui, K.L.B.B. Borden, mRNA export and cancer, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 3, 13-25 (2012)
<https://doi.org/10.1002/wrna.101>
- 20) I. Taniguchi, N. Mabuchi, M. Ohno, HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment, *Nucleic Acids Res.* 42, 6645-6658 (2014)
<https://doi.org/10.1093/nar/gku304>
- 21) E.A. Grzybowska, Human intronless genes : Functional groups, associated diseases, evolution, and mRNA processing in absence of splicing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424, 1-6 (2012)
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.092>
- 22) M. Khan, S. Hou, M. Chen, H. Lei, Mechanisms of RNA export and nuclear retention, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 1-20 (2022)
<https://doi.org/10.1002/wrna.1755>
- 23) M. Kurata, N. Fujiwara, K. Fujita, Y. Yamanaka, S. Seno, H. Kobayashi, M. Yusaku, N. Takahashi, Y. Shibuya, S. Masuda, Food-Derived Compounds Apigenin and Luteolin Modulate mRNA Splicing of Introns with Weak Splice Sites, *IScience*. 22, 336-352 (2019)
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.033>