

XBPIu mRNA スプライシングに関わる因子の探索と
そのスプライシング機構の解明

新谷 紗代子
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座
(河野 憲二 教授)

平成 23 年 5 月 16 日 提出

序論

膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体内において分子シャペロンと呼ばれる折りたたみ補助タンパク質により正しく折り畳まれ、分泌される。しかし、細胞が様々なストレスにさらされると、小胞体内に不完全な折りたたみ状態のタンパク質が蓄積する。この状態を小胞体ストレスとよび、細胞に障害をもたらす。そこで、細胞には小胞体ストレスを感知し、小胞体シャペロンやタンパク質の分解に関わる分子の転写を促進することで小胞体ストレス状態を改善する応答機構が存在する。この応答機構を *unfolded protein response (UPR)* という(1, 2)。

ほ乳類細胞における経路の一つに小胞体膜局在型のタンパク質 *IRE1 α* (*inositol requiring enzyme 1*) と転写因子 *XPB1* (*X-box-binding protein-1*)で構成される *IRE1 α - XPB1* 経路が存在する。この経路は小胞体ストレス時に、転写因子 *XPB1s* を誘導合成するために次のような巧妙な方法を用いている。転写因子 *XPB1s* の mRNA は常に前駆体の形で細胞質に存在する。しかし、このままでは転写活性能をもつ *XPB1s* は合成されない。なぜなら前駆体 mRNA (*XPB1u* mRNA) の翻訳領域が 26 塩基の余分な配列 (以下イントロン) で分断されているためである。転写因子 *XPB1s* の翻訳にはこのイントロンが除去され 2 つの翻訳領域が連結されなければならない。この *XPB1u* mRNA スプライシング反応は *IRE1 α* により開始される。I 型小胞体膜タンパク質 *IRE1 α* は小胞体内腔に存在するセンサードメイン、そしてサイトゾル側に存在するキナーゼドメインと RNase ドメインからなる。*IRE1 α* は小胞体ストレスを感知すると二量体化、もしくは多量体化する。その後、キナーゼドメインによる自己リン酸化により活性型となる(3, 4)。活性型 *IRE1 α* はエンドリボヌクレアーゼ活性をもち、*XPB1u* mRNA をイントロン部分で切断する。その後、切断された 2 つの翻訳領域 (以下 5' エクソン、3' エクソン) は未知の RNA ligase により連結され、成熟型の mRNA (*XPB1s* mRNA) となる。このスプライシング反応によって形成された成熟型の *XPB1s* mRNA から bZIP 型転写因子 *XPB1s* が翻訳される(5, 6)。*XPB1s* は、N 末端側に核局在化シグナル (NLS) と塩基性ロイシンジッパードメイン (bZIP)、C 末端側に転写活性化ドメインを持つ転写因子で、標的遺伝子上流に存在する ERSE (ER stress response element) 配列や UPRE (*unfolded protein response element*) 配列を介して標的遺伝子の誘導を行う (Figure 1)。*XPB1s* の標的遺伝子には、小胞体分子シャペロンや、小胞体に蓄積した変性タンパク質の分解反応 (ER associated degradation; ERAD) に関わる分子が存在し、小胞体内でのタンパク質の折りたたみの促進や、変性タンパク質の除去を行うことにより小胞体ストレス状態を緩和する(6, 7)。

この小胞体ストレス時におけるスプライソソームに依存しないスプライシング反

応は真核生物において広く保存されている。出芽酵母では、小胞体ストレス時に IRE1 α の prototype である Ire1 が転写因子 Hac1 の前駆体 mRNA を切断する (8, 9)。その後 2 つの翻訳領域は酵母の tRNA ligase である Rlg1 によって連結され、成熟型の mRNA となる(10)。この成熟型 mRNA から転写因子 Hac1 が翻訳され、UPR 標的遺伝子の誘導を行い、小胞体ストレス状態を改善する。この *HAC1* mRNA スプライシング機構は詳細に解析されており、転写因子 Hac1 は小胞体ストレス時に誘導されるよう以下のメカニズムを用いている。*HAC1* mRNA 前駆体は非ストレス時にポリソームが結合した状態で細胞質に存在している。しかし mRNA の 5'非翻訳領域とイントロンとの間に塩基対が形成されており、翻訳が抑制された状態になっている(11)。よって、小胞体ストレスによって活性化した Ire1 が *HAC1* mRNA 前駆体をイントロン部分で切断し、その後 2 つの翻訳領域が Rlg1 によって連結されることにより、イントロンが取り除かれ、翻訳抑制が解除される。この成熟型 mRNA から転写因子 Hac1 が誘導合成され小胞体ストレス状態を改善する。この *HAC1* mRNA のスプライシングは出芽酵母における pre-tRNA スプライシングに類似した機構で行われる。Ire1 は tRNA エンドヌクレアーゼと同様に 5'エクソンの 3'末端を 2', 3'-環状リン酸、3'エクソンの 5'末端をヒドロキシル基の形で *HAC1* mRNA を切断する (12)。その後 2 つのエクソンは Rlg1 によって 5'エクソンの 3'末端の環状リン酸の開環、GTP を用いた 3'エクソンの 5'末端のリン酸化、そして 3'エクソンの 5'末端のリン酸化部位のアデニル化という 3 つのステップを受け、アデニル化によって蓄えたエネルギーを使って Rlg1 により結合される (12, 13, 14)。連結反応ののち、2'-ホスホトランスフェラーゼの Tpt1 が結合部位に残された 5'エクソンの 3'末端の 2'位のリン酸基を取り除き、スプライシングが完了する (Figure 2) (15)。

HAC1 mRNA スプライシング機構とは対照的に、*XBPlu* mRNA スプライシングの詳細な機構、特にスプライシングにおける連結反応は未だ解明されていない。その理由として、*XBPlu* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase が同定されていないことが挙げられる。*XBPlu* mRNA のスプライシングにみられる特徴的なスプライシング反応は UPR で特異的に観察される機構であり、転写因子 XBP1s の翻訳に必須である。よって、小胞体ストレスに対する応答経路を理解する上で、このスプライシング機構の解明は重要である。そこで本研究では、*in vitro* において *XBPlu* mRNA スプライシング反応の再構成を行い *XBPlu* mRNA スプライシング機構の解析を行った。

Figure 1

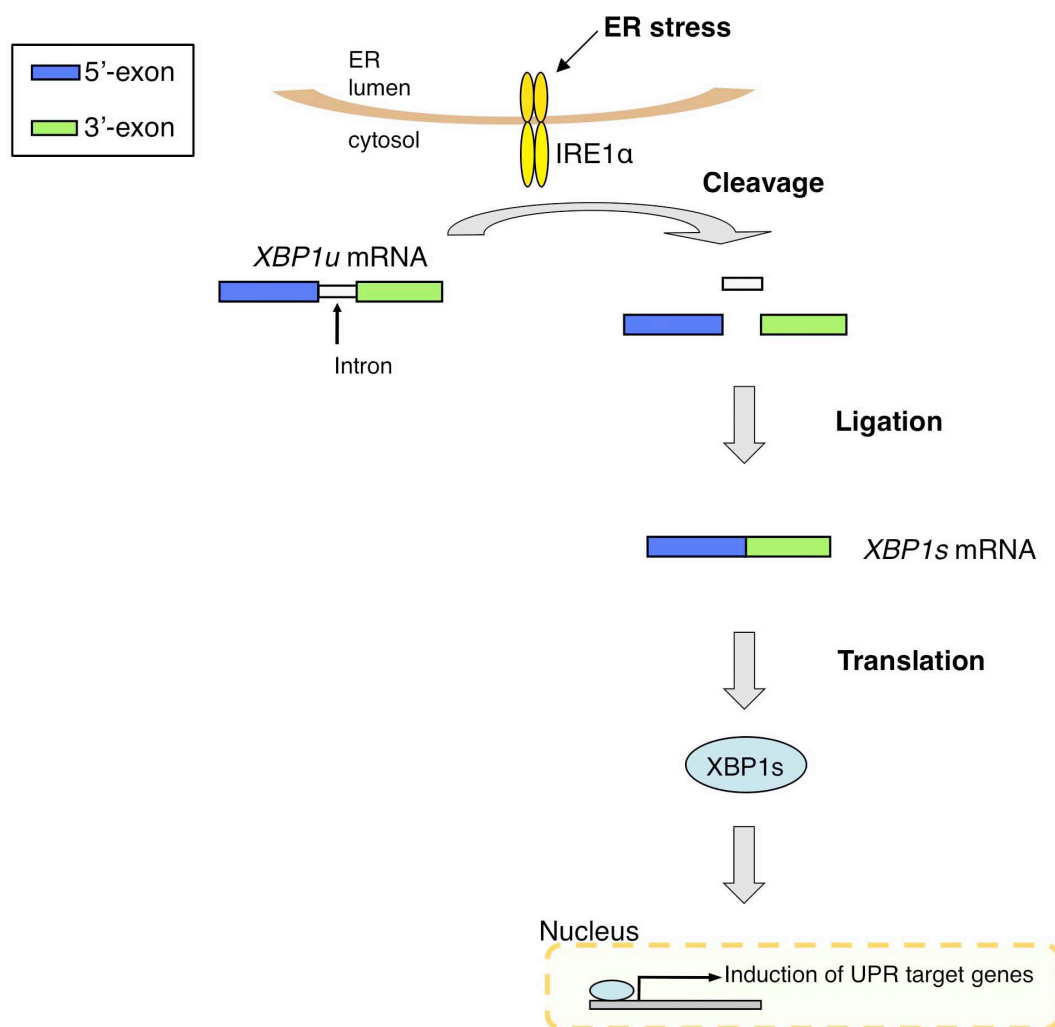


Figure 1

小胞体ストレス時における IRE1 α -XBP1 経路の概略図

小胞体膜局在型タンパク質 IRE1 α は小胞体ストレス条件下で活性化し転写因子 XBP1s の前駆体 mRNA (*XBP1u* mRNA) をスプライソソーム非依存的に切断し、その後 2 つの翻訳領域 (5'-exon, 3'-exon) が連結され成熟型の mRNA (*XBP1s* mRNA) となる。この *XBP1s* mRNA から翻訳された転写因子 XBP1s が UPR 遺伝子群の上流にある Unfolded Protein Response Element (UPRE) や ER Stress response Element (ERSE) 等のシス配列に結合し UPR 標的遺伝子群を誘導する。これにより小胞体シャペロンやタンパク質の分解に関わる分子の転写を促進することで小胞体ストレス状態を改善する。

Figure 2

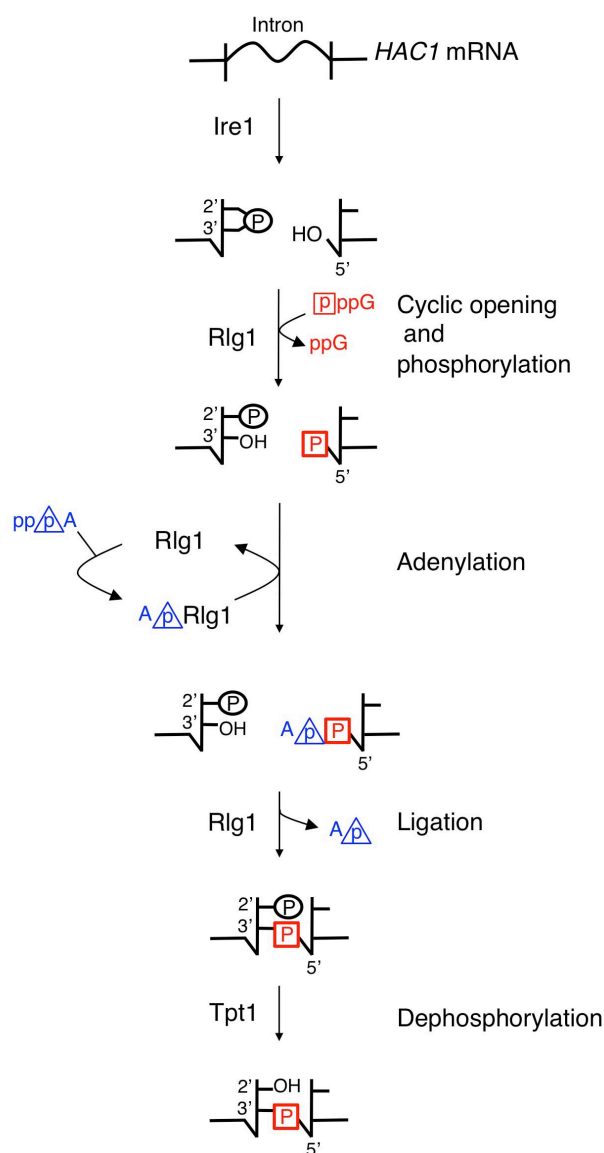


Figure 2

HAC1 mRNA スプライシングの概略図

HAC1 mRNA 前駆体は小胞体ストレス時に Ire1 により 5'エクソンの 3'末端を 2',3'-環状リン酸、3'エクソンの 5'末端をヒドロキシル基の形で切断される。その後これらのエクソンは酵母の tRNA ligase (Rlg1) により連結される。Rlg1 は 1)ホスホジエステラーゼ活性による 2',3'-環状リン酸の開環反応、2)キナーゼ活性による 3'エクソンの 5'末端のリン酸化反応を行い、その後 3) 3'エクソンの 5'末端のリン酸化部位のアデニル化のステップを経て2つのエクソンを連結する。この連結反応は、接合部位に 2'位のリン酸が残る。よって、この 2'位のリン酸が酵母の 2'-ホスホトランスフェラーゼ Tpt1 によって取り除かれスプライシングが完了する。

材料と方法

プラスミド作製

XBPlu RNAを転写するためのプラスミドpBS-hXBPluは、pCAX-F-XBP Δ DBD-venus (16) のKpnI-BamHI断片を、pBluescript II SK (-)のKpnI-BamHIサイトに導入し作製した。SL85 RNAを転写するためのプラスミドIVT-SL85は、SL85-template-sense (5'-CTCACTATTAGGGAAGAGGTCAGTGGTCGGATCTGTTGAGTCCGCAGTACT CAAACTACGTGTACCTCTGCAGTAGGTACAGGTCCAGTTATCACCCCTC-3') と SL85-template-antisense (5'-GAGGGGTGATAACTGGACCTGTACCTACTGCAGAGGTACACGTAGTTTGA GTACTGCGGACTCAACAGATCCGACCACTGACCTCTTCCCTAATAGTGAG-3') をテンプレートにしてSL85-sense (5'-CGGGATCCCGCAGTAATACGACTCACTATTAGGGAAGAGGTCAGTG-3') と SL85-antisense (5'-GGAATTCCGATATCGAGGGGTGATAACTGGACCTGTACC-3')を用いて増幅した、T7プロモーター配列の直下にSL85の配列をもつPCR断片をBamHIとEcoRIにより切断し、pEBFP (Clontech)のBamHI-EcoRIサイトに導入し作製した。SL59 RNAを転写するためのプラスミドIVT-SL59は、SL59-template-sense (5'-CTCACTATTAGGGAAGAGGTCAGTGGTCGGATCTGTTGAGTCCGCAGTAGGTACA GGTCCAGTTATCACCCCTC -3') と SL59-template-antisense (5'-GAGGGGTGATAACTGGACCTGTACCTACTGCGGACTCAACAGATCCGACCACTGACCTCTTCCCTAATAGTGAG-3') をテンプレートにしてSL59-sense (5'-CGGGATCCCGCAGTAATACGACTCACTATTAGGGAAGAGGTCAGTG-3') と SL59-antisense (5'-GGAATTCCGATATCGAGGGGTGATAACTGGACCTGTACC-3')を用いて増幅した、T7プロモーター配列の直下にSL59の配列をもつPCR断片をBamHIとEcoRIにより切断し、pEBFP (Clontech)のBamHI-EcoRIサイトに導入し作製した。バキュロウイルス発現用プラスミドpFB-WTαは、human IRE1α (アミノ酸468-977)をコードするPCR産物をpFastBacHTαのEcoRI-HindIIIサイトに導入して作製した。

バキュロウイルスを用いたヒト IRE1α 組み換えタンパク質の発現と精製

ヒト IRE1α タンパク質の発現は、Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen)にしたがって行った。Sf9 細胞は、100 rpm で攪拌したスピナーフラスコ中で、Sf-900 II SFM (Invitrogen)を用いて培養した。2 L の Sf9 細胞 (1×10^6 cell/ml)に培地の 50 分の 1 量のウイルス液を加え 28°C で 72 時間培養後、3,000 rpm、10 分、4 °C

で遠心し、細胞を回収した。回収した細胞は液体窒素で凍結し、30 ml の Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM aprotinin、1 mM leupeptin、1 mM pepstatin、1 mM PMSF) を加え氷上で融解したのち、30 分静置し細胞を溶解した。この細胞抽出液を 1,000 X g、10 分、4°C で遠心後、さらに上清を 30,000 rpm、1 時間、4°C で超遠心し最上層にある脂質を取り除いた。その細胞抽出液に、あらかじめ Lysis Buffer で平衡化した TALON Metal Affinity Resins (Clontech) 500 μ l を加え 4°C にて 2 時間ローテートしたのちカラムに充填した。その後、Buffer I (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10% glycerol pH8.0 at 4°C) 5 ml、1 M NaCl を含む Buffer I 5ml、Buffer I 5ml、Buffer II (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1.5 mM imidazole、10 mM ATP pH8.0 at 4°C) 5 ml、20 mM imidazole を含む Buffer I 5ml でカラムを洗浄し、5 ml の Elution Buffer I (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10% glycerol、200 mM imidazole pH8.0 at 4°C) で溶出した。溶出した画分を Buffer I で 20 時間透析し、再びあらかじめ Buffer I で平衡化した TALON Metal Affinity Resins (Clontech) 500 μ l を充填したカラムに 3 回通した。その後、Buffer I 5ml、1 M NaCl を含む Buffer I 5ml、Buffer I 5ml、Buffer II 5ml、20 mM imidazole を含む Buffer I、Rnase free の Buffer I 5ml でカラムを洗浄し、Elution Buffer II (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、50% glycerol、200 mM imidazole, pH8.0 at 4°C) で 500 μ l ずつ 6 回溶出した。そのうち 2、3 回目の溶出画分を 20 mM HEPES、10 mM MgCl₂、50 mM KCl、50% glycerol pH 7.3 at 4°C の Buffer で 20 時間透析しタンパク質を得た。

ほ乳類細胞抽出液の調製

ウサギ赤血球抽出液の調製

New Zealand White 種のウサギ (北山ラベス) の外縁耳静脈から、ベノジェクトへパリン含有真空採血管 (TERUMO) を用いて採血した。血液を 120 X g、12 分、2°C で遠心し、上清 (血漿) を除去し沈殿を回収した。その後等量の冷生理食塩水 (0.14 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、5 mM KCl) に懸濁し、650 X g、5 分、2°C で遠心し沈殿を回収した。生理食塩水による洗浄を 6 回繰り返したのち、等量の冷生理食塩水に懸濁し 1020 X g、15 分、2°C で遠心した。遠心後、上清 (白血球) を除去し、沈殿した細胞 (赤血球) を回収した。次に、沈殿と等量の冷蒸留水を添加し 30 秒間攪拌し、赤血球をバーストさせた。この懸濁液を 16,000 X g、18 分、2°C で遠心し、上清を赤血球抽出液とした。赤血球抽出液は、液体窒素で凍結し -80°C で保存した。

HeLa 細胞抽出液の調製

HeLa 細胞は、540 X g、10 分間、4°C で遠心して回収し、5 packed cell pellet volume (cpv) の氷冷 PBS(-) で洗浄した。その後、5 cpv の Buffer HA (10 mM HEPES pH 7.9 at 4°C、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM DTT) に懸濁し、10 分間氷上に静置した。その

後、540 X g、10 分間、4°Cで沈殿を回収し、2 cpv の Buffer HA を加え 25G のシリンジでホモジナイズし細胞膜を破碎した。この懸濁液を 540 X g、10 分間、4°Cで遠心し、上清を回収した。この上清に 0.11 倍量の Buffer HB (0.3 M HEPES pH 7.9 at 4°C、1.4 M KCl、0.03 M MgCl₂)を加え、5,000 X g、20 分間、4°Cで遠心し、上清を細胞質抽出液として回収した。回収した細胞質抽出液は、50 倍量以上の Buffer HD (20 mM HEPES pH 7.9 at 4°C、20% v/v glycerol、0.1 M KCl、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMFS、0.5 mM DTT)で 2 時間透析したのち、液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。

in vitro スプライシング反応

スプライシング反応に用いた *XBP1u* RNA は SpeI で直鎖状にした pBS-hXBP1u を用いて、Riboprobe System (Peomega) で作製した。スプライシング反応は、0.05 pmol の XBP1u RNA を 2.5 pmol の組み換えヒト IRE1 α タンパク質と 30 μ l の細胞抽出液、20unit の RNasin (Promega)、0.25 mM DTT、1.25 mM ATP、0.75 mM GTP を含む 40 μ l の kinase buffer (20 mM HEPES, 10 mM Mg(OAc)₂, 50 mM KOAc, pH7.3 at 4°C) 中で、30°C、60 分間反応させた。RNA 断片を RNAiso Plus (Takara) で抽出後、RT-PCR を行い 5%のアクリルアミドゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により検出した。RT-PCR 反応は、XBP1-RT プライマー(5'-GGATCTTGAATCTGAAGAGTC-3')を用いて Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen) にて cDNA を作製し、5X プライマー(5'-GAACCAGGAGTTAAGACAGC-3') と 3X プライマー (5' - AGTCAATACCGCCAGAATCC-3')を用いて PCR で増幅した。PCR 反応は、KAPATaq Extra (KAPA Biosystems) を用いて、25 サイクル (96°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒)にて行った。バンドの定量は Image gauge (Fujifilm)を用いて行った。スプライシング効率、ligase 活性は以下の式で算出した。スプライシング効率 = {XBP1s / (XBP1s + XBP1u)}。Ligase 活性 = スプライシング効率 / 活性測定に用いたタンパク質量 (μ g)。

XBP1u mRNA スプライシングに関わる RNA ligase の部分精製

硫酸アンモニウム分画

10 ml の赤血球抽出液を Buffer A (20 mM Tris-HCl pH8.9 at 4°C、20%グリセロール、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMSF、0.5 mM DTT)で 3 倍に希釈したのち、穏やかに攪拌しながら硫酸アンモニウムを添加した。硫酸アンモニウムが完全に溶解した後、30 分間攪拌し、さらに 1 時間静置した。その後、25,000 X g、30 分間、4°Cで遠心し沈殿を回収し Buffer A に溶解した後 PD-10 カラム (GE Healthcare)で脱塩した。

陰イオン交換クロマトグラフィー

硫酸アンモニウム沈殿にて得られた活性画分 (45%-65%沈殿画分) をあらかじめ

Buffer A にて平衡化した Mono Q HR5/5 カラム (GE Healthcare) に添加した。10 ml の Buffer A にて洗浄した後、Buffer A と Buffer B (20 mM Tris-HCl pH8.9 at 4°C、1M KCl、20%グリセロール、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMSF、0.5 mM DTT)を用いて 0.05 M KCl/min のリニアグラジエント (流速 0.5ml/min) で溶出した。溶出画分は Buffer A で 2 時間透析を行い *in vitro* スプライシング反応に用いた。

IRE1 α 切断断片の末端構造解析

基質 RNA (SL27) は以下のように作製した。基質の後半部分の配列を持つ合成 RNA (3' 末端をアミノ基で修飾 ; 5'-CAGCACUCAGACUA-3') 500 pmol の 5' 末端を T4polynucleotide kinase (Takara) で 25 mCi の [γ -³²P]ATP にてリン酸化し、RNAiso Plus (Takara) で RNA を精製した。その後、T4 RNA ligase (Takara) を用いて、基質の前半部分の配列を持つ合成 RNA (5'-UAGUCUGAGUCCG-3') と連結させた。この連結した RNA を変性ポリアクリルアミドゲルから切り出し精製を行い、SL27RNA とした。

作製した SL27 RNA (5,000 c.p.m.) を 100 pmol の組み換えヒト IRE1 α タンパク質と 20unit の RNasin (Promega)、0.25 mM DTT、1.25 mM ATP、0.75 mM GTP を含む 40 μ l の kinase buffer 中で、30°C、60 分間反応させた。さらに、60unit の Calf intestine alkaline phosphatase (Takara) と T4 polynucleotide kinase (Takara) を反応液に加え、60 分間、37 °C で反応させた。その後、10%変性ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、オートラジオグラフィーで検出した。

薄層クロマトグラフィー

基質 RNA (SL85 RNA) と SL59 RNA は EcoRV で直鎖状にした IVT-SL85、IVT-SL59 をそれぞれ鋳型とし、Riboprobe System (Promega) で [α -³²P]CTP 存在下にて作製した。作製した SL85 RNA (160,000 c.p.m.) を 20 pmol の組み換えヒト IRE1 α タンパク質と 30 μ l の赤血球抽出液、20unit の RNasin (Promega)、0.25 mM DTT、1.25 mM ATP、0.75 mM GTP を含む 40 μ l の kinase buffer 中で、30°C、60 分間反応させた。その後、スプライシングを受けた RNA 断片を変性ポリアクリルアミドゲルから切り出し精製を行い SL85 RNA とした。

精製した SL85 RNA (15,000c.p.m.) は 200unit の RNaseI (Ambion) にて 37°C、3 時間反応させモノヌクレオチドに切断した。その後、切断産物 (3,000 c.p.m.) を PEI cellulose (Merck) にスポットし、二次元薄層クロマトグラフィーにて展開したのちオートラジオグラフィーで検出した。一次元目は展開溶媒 A (isobutyric acid / saturated ammonia / water [66 / 1 / 3])、二次元目は展開溶媒 B (isopropanol / concentrated HCl / water [68 / 18 / 14]) で展開した(17)。

結 果

in vitro での *XBPlu* mRNA スプライシング反応の再構成

ほ乳類細胞における *XBPlu* mRNA スプライシング反応を解析するため、このスプライシング反応を *in vitro* で再構成した。現在までに *XBPlu* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase は同定されていないが、このスプライシング反応は細胞質で起こる事が報告されている (18, 19)。そこで ligase 供給源として、HeLa 細胞質抽出液、そして脱核され細胞質のみで構成される赤血球(20)に着目した。*in vitro* 転写によって作製したヒト *XBPlu* RNA と、バキュロウイルスを用いて作製した組み換えヒト IRE1 α タンパク質 (21)、そして ligase 供給源としてそれぞれの細胞抽出液を反応させ *XBPlu* RNA の連結反応を試みた。この反応によって得られた RNA 断片は、*XBPlu* RNA とスプライシングを受けた *XBPls* RNA 両方を増幅するプライマーで RT-PCR により検出した。その結果、細胞抽出液を加えた場合にのみ *XBPls* RNA と考えられる断片が確認された (Figure 3A, lane 2-5, lane 7-10)。この断片の DNA 配列を確認したところ、正しい位置でスプライシング反応が行われた *XBPls* RNA だと確認された (Figure 3B)。以上の結果より、スプライシング反応は正しく行われており *in vitro* で *XBPlu* mRNA スプライシング反応を再構成することに成功した。

Figure 3

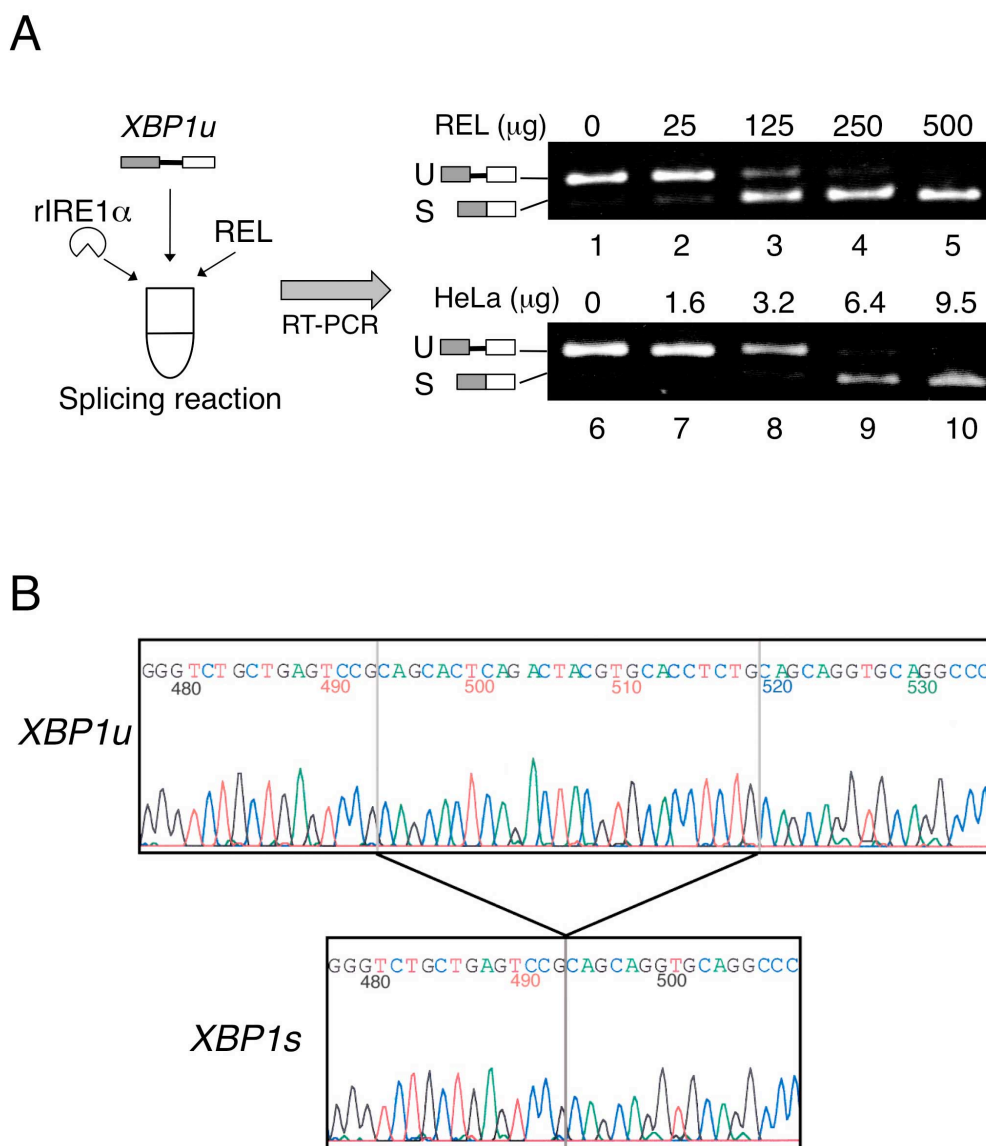


Figure 3 *XBP1u* mRNA スプライシング反応の *in vitro* 再構成系

A スプライシング反応再構成系の概略図。ヒト組み換え IRE1 α (rIRE1 α) と *in vitro* 転写反応で作製した *XBP1u* RNA (*XBP1u*)、そしてウサギ赤血球抽出液 (REL) もしくは HeLa 細胞質抽出液 (HeLa) を加え反応を行い、RNA を精製した。その後得られた RNA を *XBP1* 特異的なプライマーで RT-PCR を行い検出した。REL はそれぞれ 0 μ g (lane 1)、25 μ g (lane 2)、125 μ g (lane 3)、250 μ g (lane 4)、500 μ g (lane 5) HeLa 細胞質抽出液はそれぞれ 0 μ g (lane 6)、1.6 μ g (lane 7)、3.2 μ g (lane 8)、6.4 μ g (lane 9)、9.5 μ g (lane 10) もちいて反応を行った。U と S はそれぞれ *XBP1u* RNA と *XBP1s* RNA の RT-PCR 産物の位置を示している。**B** (A) で検出された *XBP1u* RNA (U)、*XBP1s* RNA (S) それぞれの cDNA 断片の DNA 配列を確認した。ヌクレオチド番号は、開始コドン(AUG)の A を 1 として番号をつけた。

XBPlu mRNA スプライシング連結反応におけるヌクレオチド要求性

出芽酵母の *HAC1* mRNA のスプライシングに関わる RNA ligase は Rlg1 である。Rlg1 は連結反応において、3'エクソンの 5'末端のリン酸化に GTP または ATP を必要とし、また 3'エクソンの 5'末端のリン酸化部位をアデニル化するために ATP を必要とする(12, 22)。そこで、*XBPlu* mRNA スプライシングの連結反応における ATP および GTP の要求性を調べた。まず、内在性の ATP および GTP の影響を除くため、ウサギ赤血球抽出液の硫酸アンモニウム分画を行った (Figure 4A)。その結果、硫酸アンモニウム濃度 45%~65%の画分に強い ligase 活性が確認された (Figure 4A, 45-65ppt)。よってこの活性画分をもちいて、連結反応における ATP および GTP の要求性を確認した。その結果、ATP と GTP はともに ligase 活性に影響した (Figure 4B)。

Figure 4

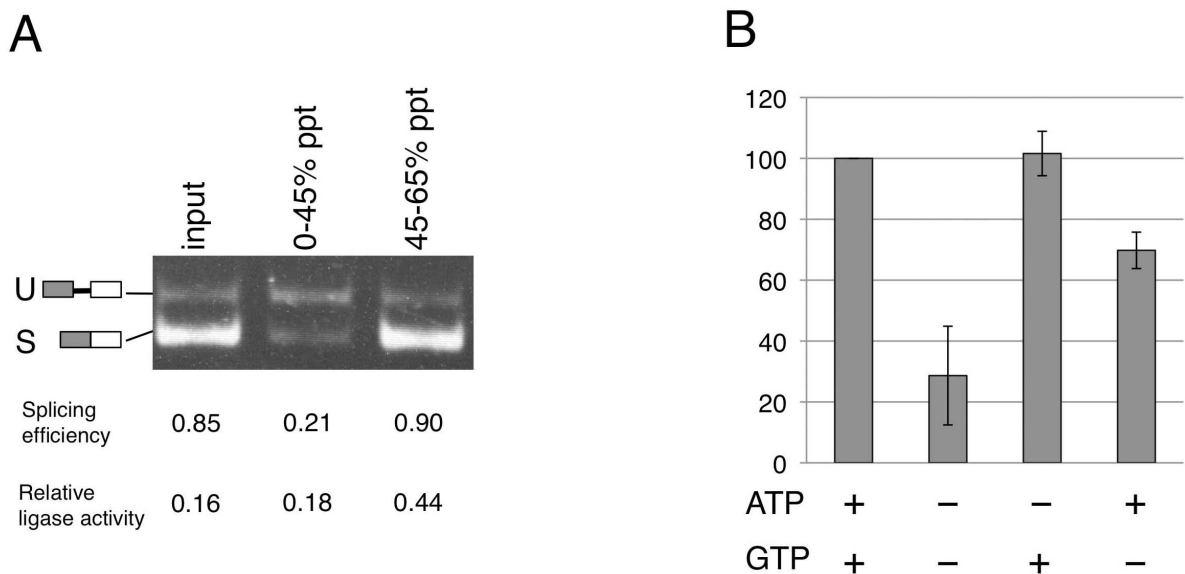


Figure 4

XBPlu mRNA スプライシング連結反応におけるヌクレオチド要求性

A 内在性のヌクレオチドを取り除くため、ウサギ赤血球抽出液の硫酸アンモニウム分画を行った。硫酸濃度 45%の沈殿画分 (0-45%ppt)、65%の沈殿画分 (45%-65%ppt)を回収し Buffer A で透析した。透析後の各画分にて *in vitro* スプライシング反応を行い、ligase 活性を測定した。U と S はそれぞれ *XBPlu* RNA と *XBPls* RNA の RT-PCR 産物の位置を示している。**B** IRE1 α にて切断した *XBPlu* RNA と硫酸アンモニウム濃度 45%-65%沈殿画分をもちいて *in vitro* スプライシング反応を行った。ATP 濃度 1.25 mM、GTP 濃度 0.75 mM での ligase 活性を 100%とし、グラフに示した。3回の実験の標準偏差をエラーバーで示した。

XBPlu mRNA スプライシングに関わる RNA ligase の部分精製

上述のように、*XBPlu* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase は同定されていない。そこで、作製した *XBPlu* mRNA スプライシング再構成系を用いてスプライシング反応に関わる RNA ligase の精製を行った。硫酸アンモニウム分画の後、活性画分 (Figure 4A 45-65%ppt) を陰イオン交換カラムにて分画し、それぞれの画分に対して ligase 活性を測定した。しかし、どの画分にも ligase 活性が検出されなかった (Figure 5A)。この結果を受け私は ligase が複数の因子から構成され、それぞれの因子が各画分に分配されたために活性が消失したと予想した。この可能性を検討するため、陰イオン交換カラム後の各画分をそれぞれ組み合わせて混合し、ligase 活性を測定する再構成実験をおこなった (Figure 5B と 5C)。その結果、2つの溶出画分を混合した際に、単独の場合と比べ、強いスプライシング活性が確認された (Figure 5B, lane 10 と Figure 5C, lane 8)。この結果より、*XBPlu* mRNA スプライシングに関わる RNA ligase は少なくとも2つの因子から構成される事が示唆された。これらの溶出画分 (fraction 5 と fraction 8) における ATP、GTP の影響を確認したところ、硫酸アンモニウム沈殿の活性画分と同様に、ATP と GTP がともに ligase 活性に影響することが確認された (Figure 6)。また、それぞれの Mono Q 溶出画分 (fraction 5 と fraction 8) の熱処理を行った場合、ligase 活性の消失がみられた (Figure 7B)。よって、連結反応に関わる因子はそれぞれ熱に不安定であることが示唆された。

Figure 5

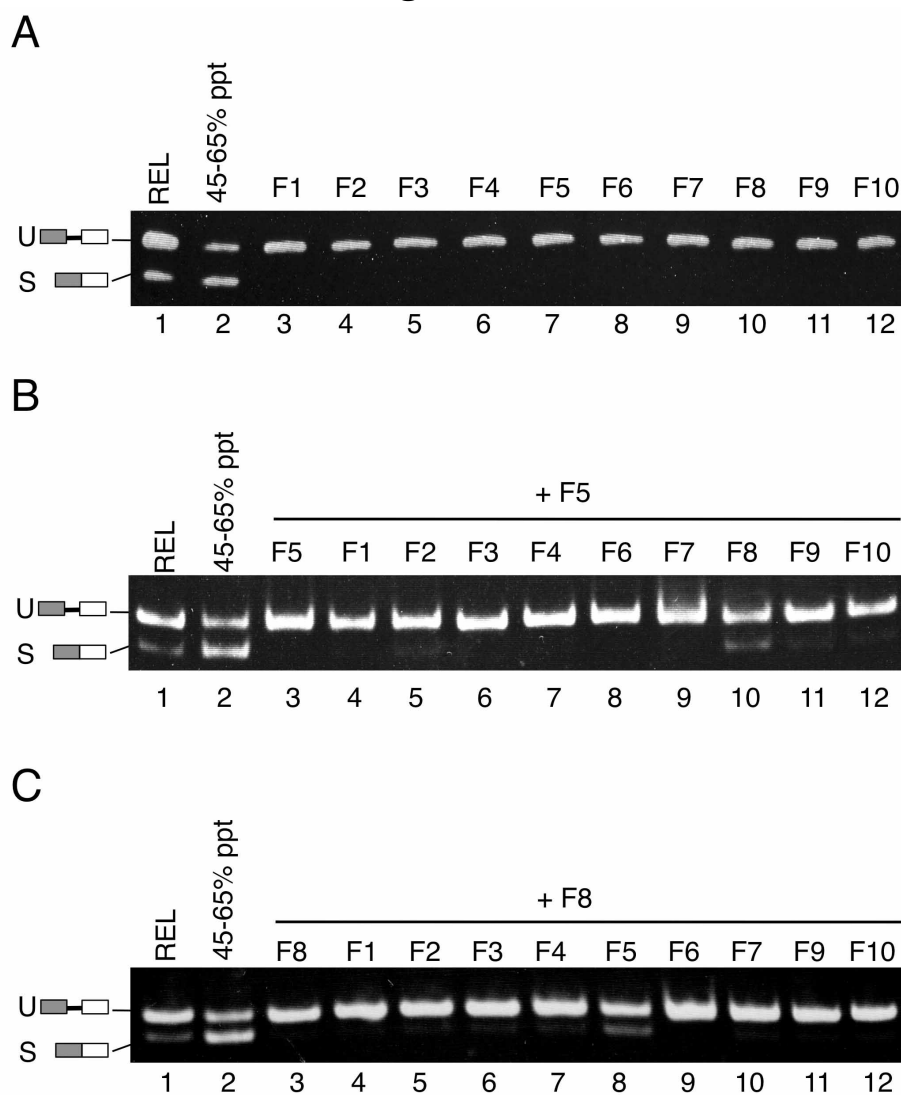


Figure 5 2つの Mono Q 画分が *XBP1u* mRNA スプライシングに必要である

A ウサギ赤血球抽出液 (REL)を硫酸アンモニウムにて分画したのち(45-65%ppt)、Mono Q カラムで分離しそれぞれの ligase 活性を測定した (lane 3~12)。**B** Mono Q カラム後の各画分をそれぞれ以下に記す組み合わせで混合し、それぞれの ligase 活性を測定した (lane 3: fraction 5 + fraction 5, lane 4: fraction 5 + fraction 1, lane 5: fraction 5 + fraction 2, lane 6: fraction 5 + fraction 3, lane 7: fraction 5 + fraction 4, lane 8: fraction 5 + fraction 6, lane 9: fraction 5 + fraction 7, lane 10: fraction 5 + fraction 8, lane 11: fraction 5 + fraction 9, lane 12: fraction 5 + fraction 10)。**C** Mono Q カラム後の各画分をそれぞれ以下に記す組み合わせで混合し、それぞれの ligase 活性を測定した (lane 3: fraction 8 + fraction 8, lane 4: fraction 8 + fraction 1, lane 5: fraction 8 + fraction 2, lane 6: fraction 8 + fraction 3, lane 7: fraction 8 + fraction 4, lane 8: fraction 8 + fraction 5, lane 9: fraction 8 + fraction 6, lane 10: fraction 8 + fraction 7, lane 11: fraction 8 + fraction 9, lane 12: fraction 8 + fraction 10)。

Figure 6

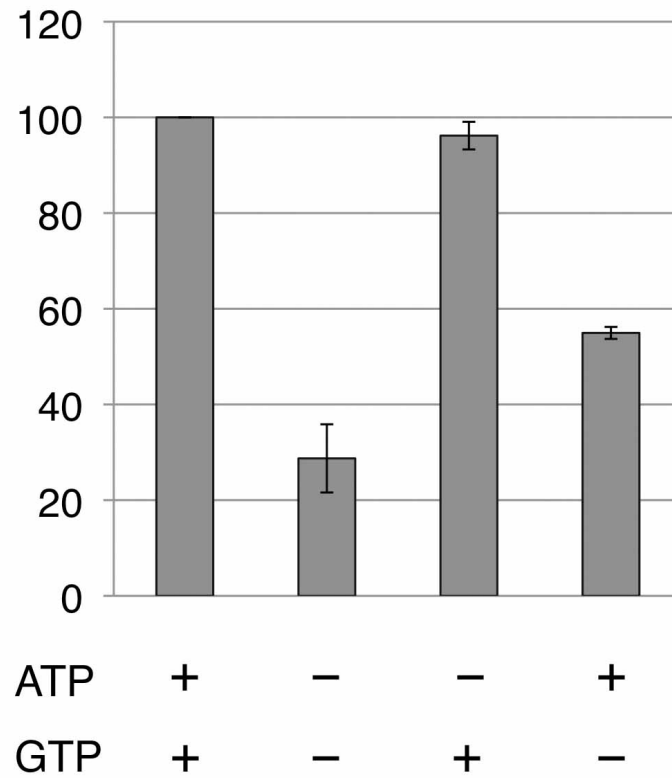


Figure 6

Mono Q 溶出画分におけるヌクレオチド要求性

IRE1 α にて切断した *XBPlu* RNA と Mono Q 溶出画分 (fraction 5 と fraction 8) をもちいて *in vitro* スプライシング反応を行った。ATP 濃度 1.25 mM、GTP 濃度 0.75 mM での ligase 活性を 100%とし、グラフに示した。3回の実験の標準偏差をエラーバーで示した。

Figure 7

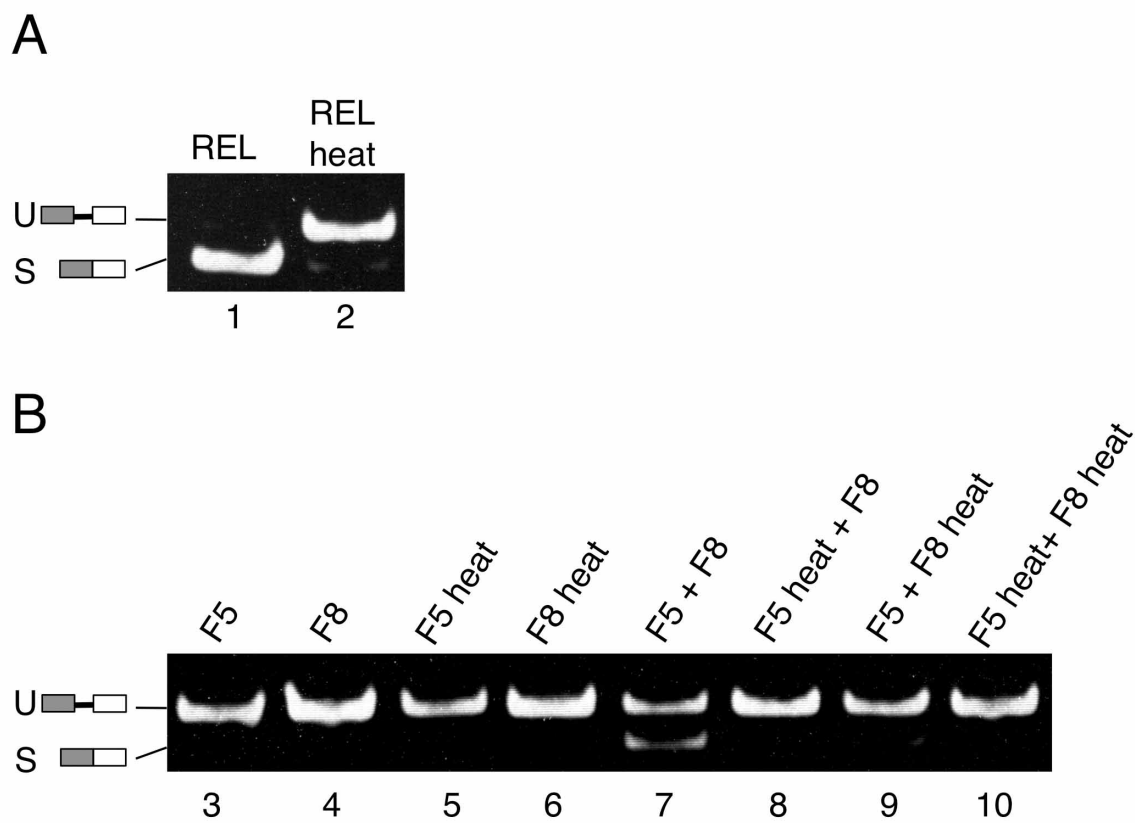


Figure 7

RNA 連結酵素は熱不安定性の因子である

A 96°Cで15分間処理したウサギ赤血球抽出液 (REL)をもちいて *in vitro* スプライシング反応を行った (lane 1: REL, lane 2: 熱処理を行った REL)。U と S はそれぞれ *XBP1u* RNA と *XBP1s* RNA の RT-PCR 産物の位置を示している。**B** 96°Cで15分間処理した Mono Q フラクシオン (fraction 5 と fraction 8) をもちいて *in vitro* スプライシング反応を行った (lane 3: fraction 5, lane 4: fraction 8, lane 5: 熱処理を行った fraction 5, lane 6: 熱処理を行った fraction 8, lane 7: fraction 5 + fraction 8, lane 8: 熱処理を行った fraction 5 + fraction 8, lane 9: fraction 5 + 熱処理を行った fraction 8, lane 10: 熱処理を行った fraction 5 + 熱処理を行った fraction 8)。

IRE1 α は2',3'-環状リン酸の形で*XBPlu* mRNAを切断する

現在までに、ほ乳類動物の細胞質で働く RNA ligase は同定されていない。しかし pre-tRNA を基質とした生化学的解析により、2つの異なる酵素反応の存在が報告されている (Figure 8A)。ひとは3'エクソンの5'末端が新たにリン酸化され、このリン酸基が3',5'-ホスホジエステル結合に使用される酵母と類似の連結反応 (5'-P 経路) (23)、もう一方はエンドヌクレアーゼによって切断後形成される5'エクソンの3'末端の2',3'-環状リン酸と3'エクソンの5'末端のヒドロキシル基が直接連結され3',5'-ホスホジエステル結合を形成する連結反応 (3'-P 経路) である (24, 25)。そこで *XBPlu* mRNA スプライシングでは、どちらの酵素反応で連結されるか調べるために以下の実験を行った。

まず始めに、IRE1 α がどのような末端構造で *XBPlu* mRNA を切断するか解析した。前述のように Ire1 は tRNA エンドヌクレアーゼと同様に5'エクソンの3'末端を2',3'-環状リン酸で切断する (12)。しかし、IRE1 α の切断によって形成される末端構造は明らかになっていない。そこで、IRE1 α で切断される部位のホスホジエステル結合のみを³²Pでラベルした基質 (SL27) を作製した (Figure 8B)。この SL27 RNA を組み換えヒト IRE1 α で切断し、切断断片を仔ウシ腸管粘膜由来アルカリホスファターゼ (CIAP) と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 PNK) で処理した。T4 PNK と CIAP はともに脱リン酸化活性を持つ。しかし、T4 PNK は2',3'-環状リン酸を脱リン酸化する一方で、CIAP は2',3'-環状リン酸を脱リン酸化することが出来ない (26)。よって、この2つの酵素で処理することにより、切断断片が2',3'-環状リン酸構造かどうかを放射性シグナルの有無で解析することができる (Figure 8C)。

SL27 RNA を組み換えヒト IRE1 α で切断後、切断断片をオートラジオグラフィーにて確認した。その結果、期待された位置に放射性ラベルされた RNA 断片が確認された (Figure 8D, lane 2)。次にこの切断断片を CIAP と T4 PNK で処理したところ、T4 PNK で処理した場合のみ、放射性シグナルが消失した (Figure 8D, lane 4)。この結果より IRE1 α による *XBPlu* mRNA の切断は、Ire1 そして tRNA エンドヌクレアーゼと同様に、2',3'-環状リン酸で切断することが示された。

Figure 8

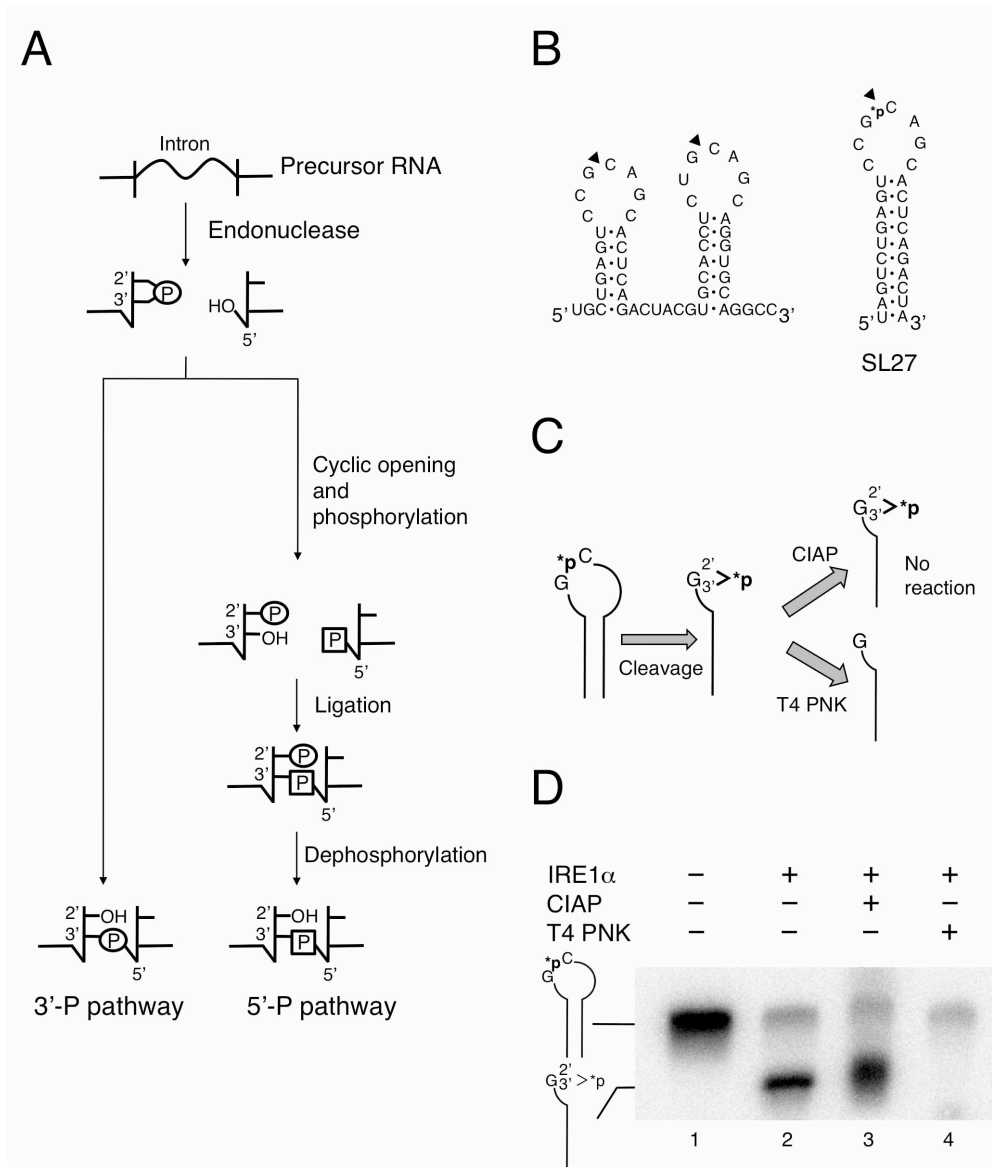


Figure 8 IRE1αによる *XBPlu* mRNA の切断で形成される切断断片の末端構造解析

A は哺乳類細胞の RNA スプライシングにおける RNA 連結反応機構。**B** ヒト *XBPlu* mRNA の予測される RNA 二次構造 (左図) と、この実験でもちいた RNA 基質 (SL27) の模式図 (右図)。SL27 は 5'切断部位の stem-loop 構造に対応する配列と stem 構造を安定化するための 4つの塩基配列をもつ。黒の三角形は IRE1α による切断部位を表す。*p は ³²P にて放射性ラベルしたリン酸基を表す。**C** IRE1α による切断で形成される切断断片の末端構造解析の模式図。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 PNK) と仔ウシ腸管粘膜由来アルカリホスファターゼ (CIAP) はともに脱リン酸化活性を持つ。しかし、T4 PNK は 2',3'-環状リン酸 (G>p で表す) を脱リン酸化出来るが CIAP は出来ない。**D** IRE1α で切断した SL27 RNA を CIAP と T4 PNK で処理した。その後、10% 変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行いオートラジオグラフィーにて検出した。SL27 RNA と IRE1α による切断後の SL27 RNA 断片の位置を左に示した。

5'エクソンの3'末端のリン酸がXBPls mRNAに取り込まれる

XBPlu mRNA スプライシングにおける連結反応をより明らかにするために、酵母と類似の 5'-P 経路で行われているのか、もしくは 3'-P 経路で行われているかさらに解析を進めた。現在ほ乳類細胞で確認されているこの2つの経路は、接合部位の 3', 5'-ホスホジエステル結合に使用されるリン酸基が異なる。すなわち、5'-P 経路では、3'エクソンの5'末端が新たにリン酸化され、このリン酸が 3', 5'-ホスホジエステル結合に使用される。一方 3'-P 経路ではエンドヌクレアーゼによって切断後形成される 5'エクソンの3'末端の 2', 3'-環状リン酸と 3'エクソンの5'末端のヒドロキシル基が直接連結されるため、連結後の RNA に 2', 3'-環状リン酸由来のリンが取り込まれる (Figure 9A, stage 3)。そこで、この2つの経路を区別するためには 2', 3'-環状リン酸を ^{32}P にてラベルし連結後の RNA 産物に ^{32}P が残っているかどうかで判断できる (Figure 9A stage 4) と考え以下の実験を行った。

まず、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ 存在下にて IRE1 α の切断部位のリン酸基が放射性ラベルされたモデル基質 (以下 SL85 RNA) (Figure 9B) を *in vitro* 転写で作製した (Figure 9A, stage 1)。この放射性ラベルされた SL85 RNA をもちいて *in vitro* スプライシング反応を行い、スプライシングをうけた RNA 産物を精製した。RNA 産物の接合部位であるグアニン (G) とシトシン (C) 間の 3', 5'-ホスホジエステル結合に、2', 3'-環状リン酸由来の ^{32}P が残っているかどうか判断するために、この RNA 産物を4種類の塩基すべてのホスホジエステル結合を切断しヌクレオチド 3'-モノリン酸にする酵素 RNase I にて処理を行った (Figure 9A, stage 4)。その後、二次元薄層クロマトグラフィーにて各ヌクレオチド 3'-モノリン酸を分離し、 ^{32}P にてラベルされたグアノシン 3'-モノリン酸 (以下 G*p) の有無を検出した (Figure 9A, stage 4)。二次元薄層クロマトグラフィーにて G*p スポットが検出された場合、*XBPlu* mRNA スプライシングにおける連結反応は 3'-P 経路によって行われていると考えられる (Figure 9A, stage 4)。

上記の実験にあたり使用したモデル基質 SL85 RNA には IRE1 α 切断部位付近の *XBPlu* mRNA 配列と相同な 85 ヌクレオチド配列に複数の変異を加えた (Figure 9B)。*XBPlu* mRNA の配列は、IRE1 α 切断部位に存在する2つの GC 配列に加えて8つの GC 配列が存在する。そのため *XBPlu* mRNA の配列をもちいて解析を行った場合、これらの GC 配列からの G*p のシグナルが検出されてしまい判断ができない。そこで SL85 RNA は IRE1 α 切断部位に存在する GC 配列以外の8つの GC 配列を、RNA の二次構造に変化のないように (6)、異なる塩基に置換した。このモデル基質 SL85 RNA をもちいてスプライシング反応を行った場合、連結後の RNA 産物は接合部位のみに GC 配列を持つため、二次元薄層クロマトグラフィーにて検出した G*p スポットは、接合部位の 3', 5'-ホスホジエステル結合由来のシグナルのみになる。

放射性ラベルした SL85 RNA をウサギ赤血球抽出液、または HeLa 細胞質抽出液を

もちいて *in vitro* スプライシング反応をおこなったところ、スプライシングを受けた SL85 RNA (spliced SL85) が検出された (Figure 10A, lane 3, 4)。この spliced SL85 RNA は、SL85 RNA の 26 塩基のイントロンを除いた配列を持つ SL 59 RNA と同様の位置で確認されたことより (Figure 10B, lane 1, 3, 4)、このモデル基質 SL85 RNA は *XBPlu* mRNA スプライシングと同じ機構でスプライシングを受けていると考えられる。精製後の spliced SL85 RNA を RNase I で処理し、最終産物を二次元薄層クロマトグラフィーにて展開しオートラジオグラフィーにて検出した。その結果、ウサギ赤血球抽出液、そして HeLa 細胞質抽出液のどちらにおいても、G*p のスポットが検出された (Figure 11)。また、それぞれのヌクレオチド 3'-モノリン酸の放射活性を算出した結果、3'-P 経路で連結反応が行われた場合の期待値と良く一致していた (Figure 11 説明文)。この結果より、ほ乳類細胞質における RNA ligase は 3'-P 経路にて *XBPls* mRNA の 2 つのエクソンをつなぐことが明らかとなった。

Figure 9

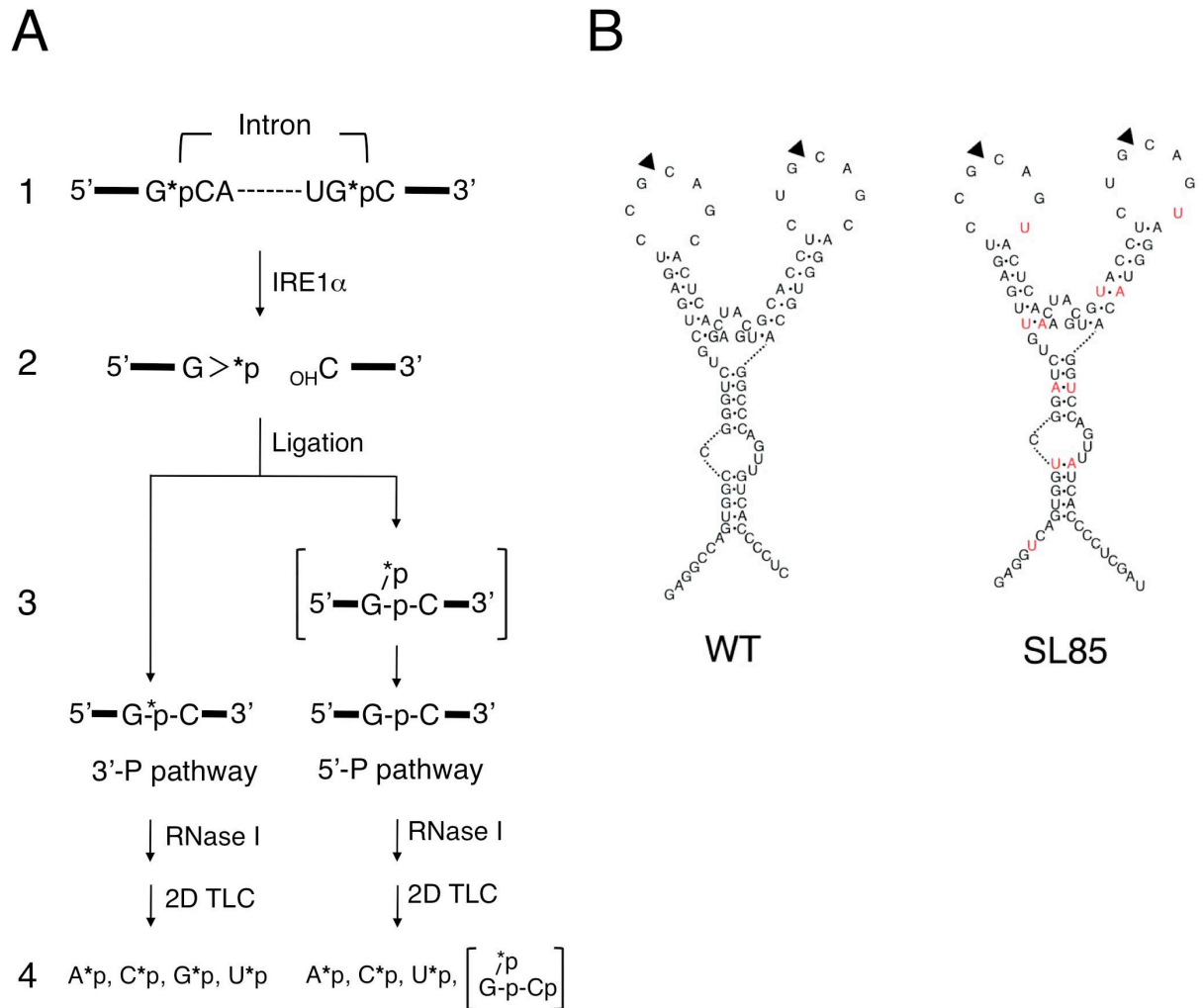


Figure 9

XBP1s mRNA の連結反応の解析

A 連結反応解析の模式図。*p は ^{32}P にて放射性ラベルしたリン酸基を、>p は 2', 3'-環状リン酸を表す。RNase I は 2'位のリン酸基をもつジヌクレオチド結合を切断することが出来ない。よって、連結後の RNA を RNase I にて切断した際に検出されるラベルされたモノヌクレオチドは連結反応機構によって異なる (stage 4)。**B** ヒト *XBP1u* mRNA の予測される RNA 二次構造 (左図) と、この実験でもちいた RNA 基質 (SL85) の模式図 (右図)。黒の三角形は IRE1 α による切断部位を表す。SL85 は *XBP1u* mRNA の IRE1 α 切断部位に存在する GC 配列以外の 8 つの GC 配列を、RNA の二次構造に変化のないように、異なる塩基に置換した配列を持つ。置換した塩基は赤で示した。

Figure 10

A

B

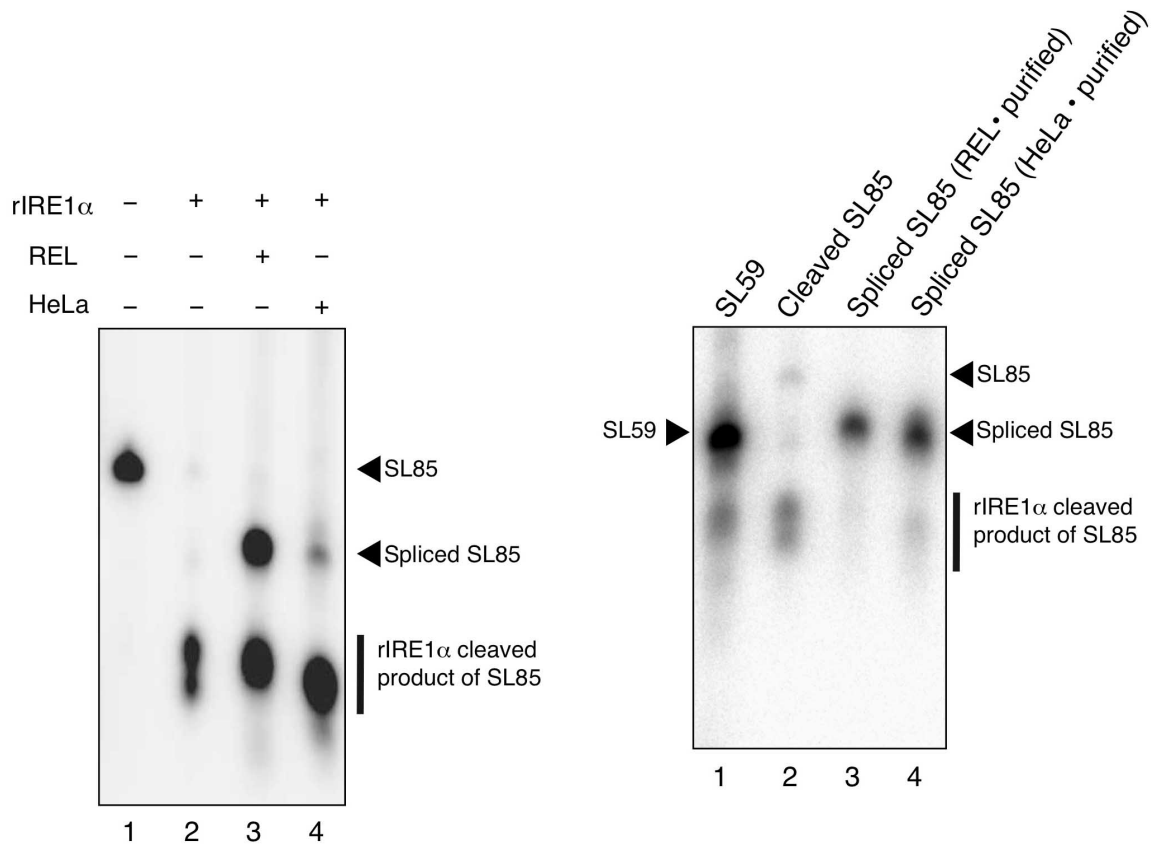


Figure 10

モデル基質 SL85 RNA をもちいたスプライシング反応

A ヒト組み換え IRE1 α (rIRE1 α) と *in vitro* 転写反応にて放射性ラベルした SL85 RNA、そしてウサギ赤血球抽出液 (REL) (lane 3) もしくは HeLa 細胞質抽出液 (HeLa) (lane 4) を加え *in vitro* splicing 反応を行った。その後 RNA を精製し、6%変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行いオートラジオグラフィーにて検出した。SL85 RNA、スプライシングをうけた SL85 RNA (spliced SL85)、そして rIRE1 α による切断断片の位置を右に示した。**B** Spliced SL85 RNA の精製。Spliced SL85 RNA を変性ポリアクリルアミドゲルから切り出し、ゲルから抽出した。精製した spliced SL85 RNA (lane 3: REL, lane 4: HeLa) は 6%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行いオートラジオグラフィーで検出した。SL59 RNA (lane 1) は SL85 RNA の 26 塩基のイントロンを除いた配列をもつ。よって、SL59 RNA は 正しくスプライシングを受けた SL85 RNA のサイズマーカーとしてもちいた。

Figure 11

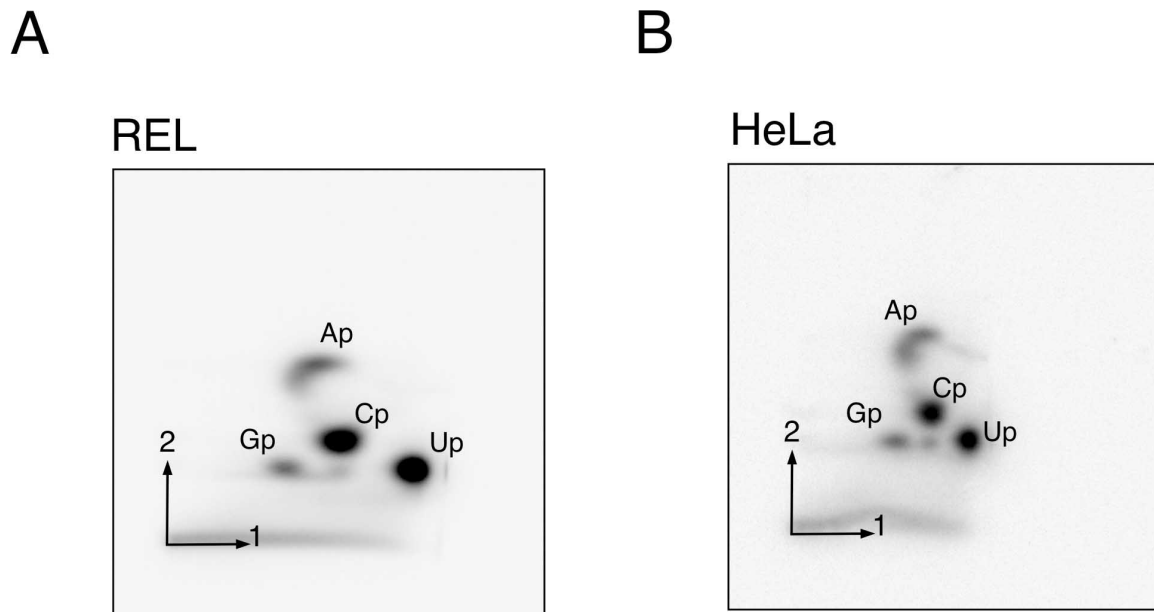


Figure 11

Spliced SL85 RNA の二次元薄層クロマトグラフィー

A SL85 RNA とウサギ赤血球抽出液 (REL) をもちいて *in vitro* splicing 反応を行い、スプライシングを受けた RNA をゲルから精製した。その後、精製した spliced SL85 RNA を RNase I で切断し、二次元薄層クロマトグラフィーで展開したのち、全放射活性に対するそれぞれのヌクレオチド 3'-モノリン酸 (Ap, Gp, Cp, Up) の放射活性の割合を算出した {実測値はそれぞれ、 0.119 ± 0.006 (Ap), 0.078 ± 0.006 (Gp), 0.359 ± 0.004 (Cp), 0.447 ± 0.007 (Up)} : 3 回の実験の標準偏差を \pm SD で示す。Ap, Gp, Cp, Up はそれぞれのヌクレオチド 3'-モノリン酸の位置を表している。SL85 RNA が 3'-P 経路でスプライシングされる場合の期待値は、それぞれ 0.133 (Ap), 0.0667 (Gp), 0.333 (Cp), 0.467 (Up) となり、実測値と期待値は一致した。**B** SL85 RNA と HeLa 細胞質抽出液 (REL) をもちいて *in vitro* splicing 反応を行い、スプライシングを受けた RNA をゲルから精製した。その後、精製した spliced SL85 RNA を RNase I で切断し、二次元薄層クロマトグラフィーで展開し、全放射活性に対するそれぞれのヌクレオチド 3'-モノリン酸 (Ap, Gp, Cp, Up) の放射活性の割合を算出した {実測値はそれぞれ、 0.133 (Ap), 0.084 (Gp), 0.385 (Cp), 0.387 (Up)}。

考 察

転写因子 XBP1s は、小胞体ストレス時に活性化した IRE1 α によって *XBP1u* mRNA がイントロン部分で切断されたのち、2つの翻訳領域が結合して初めて翻訳される。この *XBP1u* mRNA スプライシングは、スプライソソームに依存しないユニークな反応である。しかし、2つの翻訳領域がどのように連結するのか未だ明らかにされていない。そこで本研究では、*in vitro* での *XBP1u* mRNA スプライシング反応再構成系をもちいて *XBP1u* mRNA スプライシング反応の解析を行った。その結果、酵母の *HAC1* mRNA スプライシング機構と *XBP1u* mRNA スプライシング機構の類似点と相違点が明らかになった。

酵母 Ire1 は *HAC1* mRNA 前駆体 の 5'エクソンの 3'末端を 2', 3'-環状リン酸という末端構造で切断する。切断反応において、酵母 *HAC1* mRNA、ほ乳類細胞 *XBP1u* mRNA 中の切断部位は共通したステムループ構造 (CNGNNG 配列を持つ; N は任意の塩基) をもち、どちらの種においても 3番目の G と 4番目の任意の塩基のホスホジエステル結合が切断される(12, 27)。またヒト IRE1 α は Ire1 と同様のドメイン構造をもち、RNase ドメインにおいては酵母 Ire1 と 33%の相同性を持つ (28)。このように、それぞれの種における切断反応における共通性が示されていた一方、IRE1 α がどのような末端構造で *XBP1u* mRNA を切断するかは明らかにされていなかった。そこで本研究では、スプライシングの最初の段階である切断反応について脱リン酸化酵素を用いて解析を行った。その結果、ヒト IRE1 α も Ire1 や tRNA エンドヌクレアーゼと同様に *XBP1u* mRNA の 5'エクソンの 3'末端を 2', 3'-環状リン酸という末端構造で切断することが示された (Figure 8)。tRNA エンドヌクレアーゼによる基質 tRNA の切断に必要な活性残基とその触媒機構は、古細菌 tRNA エンドヌクレアーゼと基質 RNA との共結晶構造により解析されている(29)。また、近年酵母 Ire1 そしてヒト IRE1 α のサイトゾル領域のタンパク質結晶構造が報告された(30, 31)。酵母 Ire1 そしてヒト IRE1 α それぞれの RNase ドメインの結晶構造と上述の tRNA エンドヌクレアーゼの結晶構造を比較したところ、科学的性質の似た活性残基が同様の配向で存在していた。この結果は、Ire1 そしてヒト IRE1 α が tRNA エンドヌクレアーゼと同様に基質 RNA を 2', 3'-環状リン酸という末端構造で切断することを支持すると考えられる。

酵母の *HAC1* mRNA スプライシング機構と *XBP1u* mRNA スプライシング機構の類似性が示された一方で、ほ乳類細胞質に存在する RNA ligase は酵母 Rlg1 と異なる機構で *XBP1s* mRNA の 2つのエクソンを連結していることが本研究によって明らかとなった。現在までに、ほ乳類の細胞質で働く RNA ligase は同定されていない。しかし、ほ乳類細胞における RNA の連結反応には、Rlg1 と類似の反応である 5'-P経路とそして 3'-P

経路の2つの異なる機構が存在することが報告されていた (Figure 8A)。そこで*in vitro*による*XBPlu* mRNAスプライシング再構成系をもちいて、*XBPls* mRNAの2つのエクソンの連結反応を解析した結果、ほ乳類動物の細胞質で働くRNA ligaseは、3'-P経路で*XBPls* mRNAの2つのエクソンを連結することが示された (Figure 11)。このことより、*XBPlu* mRNAスプライシングにおける連結反応は*HAC1* mRNAスプライシングにおける連結反応と異なる機構で行われていると考えられる。酵母と類似した5'-P経路による連結反応の場合、連結後のRNA産物には接合部位に2'位のリン酸基が残される。そのため、スプライシングを完了させタンパク質が翻訳されるためには、この残されたリン酸基が2'-ホスホトランスフェラーゼによって取り除かれる必要がある。酵母ではTpt1がこの脱リン酸化反応を行う。しかし、Tpt1のほ乳類におけるホモログTRPT1のノックアウトマウスをもちいた解析により、TRPT1は*XBPls*の翻訳に影響しないことが報告されていた (32)。本研究で示されたように、*XBPls* mRNAの2つのエクソンの連結反応が3'-P経路で行われる場合、連結後のRNA産物は接合部位に2'位のリン酸基が残らないため2'-ホスホトランスフェラーゼの影響は受けないと考えられる。よって本研究によって示された結果はTRPT1ノックアウトマウスを用いた*in vivo*の解析結果と一致しており、TRPT1の不要性を説明する結果となっている。

また、酵母Rlg1の連結反応にはATPが必須である(22)。しかし、ほ乳類細胞質に存在する酵素による*XBPls* mRNAの2つのエクソンの連結反応はATP、GTPの両方の影響を受けた(Figure 4とFigure 6)。Rlg1による酵母の*HAC1* mRNA連結反応において、ATPは3'エクソンの5'末端のリン酸化部位のアデニル化に必須である。しかし、このアデニル化は連結反応が3'-P経路で行われる場合、必要ないと考えられる。よって、このヌクレオチド要求性の違いは、酵母Rlg1とほ乳類細胞質に存在するRNA ligaseとの連結反応機構の違いを反映しているのかもしれない。

XBPlu mRNA スプライシングにおける連結反応は未だ解明されておらず、その理由はこの連結反応に関わるRNA ligaseが同定されていないためである。そこで本研究では、カラムクロマトグラフィーを用いた生化学的手法により、このRNA ligaseの同定を試みた。残念ながら、*XBPlu* mRNAスプライシングに関わるRNA ligaseの同定には至らなかった。しかしカラムクロマトグラフィーにて酵素活性を濃縮した結果、ほ乳類細胞質で働くRNA ligaseは少なくとも2つの因子で構成されるという非常に興味深い結果が得られた。しかし、なぜ2つの溶出画分が必要なのか未だ明らかではない。複数の因子に関わる可能性として、*XBPls* mRNAの2つのエクソンを特異的に認識するタンパク質が一つの因子として働いていることが考えられる。現在、IRE1 α は*XBPlu* mRNAスプライシングのエンドヌクレアーゼとして働くだけでなく、さまざまなmRNAを切断し分解することが明らかとなっている(33, 34, 35)。もし、不要なmRNAの連結反応がおき、間違ったmRNAが形成された場合、このmRNAから翻訳さ

れた異質なタンパク質は細胞に悪影響を及ぼすと考えられる。よって、IRE1 α によって切断を受けたmRNAのなかから*XBPLs* mRNAのエクソンのみが連結されるように、*XBPLs* mRNAのエクソンを特異的に認識するタンパク質とRNA ligaseが存在し協調して働いているのかもしれない。

現在までに、*XBPLu* mRNAスプライシングに関わるRNA ligaseは同定されていない。その理由の一つとして、*XBPLu* mRNAスプライシングの連結反応が*HAC1* mRNAスプライシングと類似機構である5'-P経路で行われていると考えられていたことが挙げられる。本研究における解析の結果より、*XBPLs* mRNAの2つのエクソンの連結反応は3'-P経路で行われており、*XBPLu* mRNAスプライシングにおける連結反応は*HAC1* mRNAスプライシングにおける連結反応と異なる機構であることが示された。この連結反応における認識の大きなずれが、RNA ligaseの同定を困難にしていたと考えられる。また本研究によってRNA ligaseは少なくとも2つの因子で構成されることが示唆された。この結果は、RNA連結反応機構の複雑性を示しており、複数の因子が関わる場合、単一因子のcDNAの過剰発現を行うなどのシンプルな実験では、*XBPLu* mRNAスプライシングにおけるRNA ligase活性の促進がみられない可能性がある。よって、*in vitro*による*XBPLu* mRNAスプライシング再構成系はこの反応に関与するRNA ligaseの同定、そしてこのスプライシング機構を明らかにするための有用な解析手段である。今後は、本研究で得られた知見をもとに*XBPLu* mRNAスプライシングの全容を解明する予定である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、適切なお指導、助言を下さいました河野憲二教授、門倉広博士、今川佑介博士、井上倫宏氏、柳谷耕太博士に心から感謝致します。また、タンパク質、RNAのMS解析を行うにあたり、深尾陽一郎博士、倉田理恵氏、塚本潤子氏に多大なお協力を頂き感謝致します。また研究環境を整えて下さった橋本純子氏、増田尚代氏および河野研究室の皆様には感謝致します。

参考文献

1. Schroder, M. and Kaufman, R. J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 739-789.
2. Ron, D. and Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 519-529.
3. Kohno, K. (2010) Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: Similarities and differences between yeast and mammals. *J. Biochem.*, 147, 27-33.
4. Kimata, Y. and Kohno, K. (2010) Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 23, 135-142.
5. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-891.
6. Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G. and Ron, D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 92-96.
7. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K. and Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.*, 4, 265-271.
8. Cox, J. S. and Walter, P. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 87, 391-404.
9. Sidrauski, C. and Walter, P. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90, 1031-1039.
10. Sidrauski, C., Cox, J. S. and Walter, P. (1996) tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 87, 405-413.
11. Ruegsegger, U., Leber, J. H. and Walter, P. (2001) Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*, 107, 103-114.
12. Gonzalez, T.N., Sidrauski, C., Dorfler, S. and Walter, P. (1999) Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J.*, 18, 3119-3132.
13. Greer, C. L., Peebles, C. L., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1983) Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell*, 32, 537-546.

14. Phizicky, E. M., Schwartz, R. C. and Abelson, J. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* tRNA ligase. purification of the protein and isolation of the structural gene. *J. Biol. Chem.*, 261, 2978-2986.
15. Culver, G. M., McCraith, S. M., Consaul, S. A., Stanford, D. R. and Phizicky, E. M. (1997) A 2'-phosphotransferase implicated in tRNA splicing is essential in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 272, 13203-13210.
16. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. and Miura, M. (2004) A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.*, 10, 98-102.
17. Grosjean, H., Droogmans, L., Roovers, M. and Keith, G. (2007) Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates. *Methods Enzymol.*, 425, 55-101.
18. Back, S. H., Lee, K., Vink, E. and Kaufman, R.J. (2006) Cytoplasmic IRE1alpha-mediated XBP1 mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.*, 281, 18691-18706.
19. Uemura, A., Oku, M., Mori, K. and Yoshida, H. (2009) Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J. Cell. Sci.*, 122, 2877-2886.
20. Testa, U. (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, 18, 1176-1199.
21. Imagawa, Y., Hosoda, A., Sasaka, S., Tsuru, A. and Kohno, K. (2008) RNase domains determine the functional difference between IRE1alpha and IRE1beta. *FEBS Lett.*, 582, 656-660.
22. Belford, H. G., Westaway, S. K., Abelson, J. and Greer, C. L. (1993) Multiple nucleotide cofactor use by yeast ligase in tRNA splicing. evidence for independent ATP- and GTP-binding sites. *J. Biol. Chem.*, 268, 2444-2450.
23. Zillmann, M., Gorovsky, M. A. and Phizicky, E. M. (1991) Conserved mechanism of tRNA splicing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 5410-5416.
24. Filipowicz, W. and Shatkin, A. J. (1983) Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract. *Cell*, 32, 547-557.
25. Perkins, K. K., Furneaux, H. and Hurwitz, J. (1985) Isolation and characterization of an RNA ligase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82, 684-688.
26. Morse, D. P. and Bass, B. L. (1997) Detection of inosine in messenger RNA by inosine-specific cleavage. *Biochemistry*, 36, 8429-8434.
27. Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K., et al. (2001) Complementary signaling pathways regulate the

- unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107, 893-903.
28. Back, S. H., Schroder, M., Lee, K., Zhang, K. and Kaufman, R. J. (2005) ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*, 35, 395-416.
29. Xue, S., Calvin, K. and Li, H. (2006) RNA recognition and cleavage by a splicing endonuclease. *Science*, 312, 906-910.
30. Lee, K. P., Dey, M., Neculai, D., Cao, C., Dever, T. E. and Sicheri, F. (2008) Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell*, 132, 89-100.
31. Ali, M. M., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M.G., Morgan, G.J., Aherne, W., et al. (2011) Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *EMBO J.*, 30, 894-905.
32. Harding, H. P., Lackey, J. G., Hsu, H. C., Zhang, Y., Deng, J., Xu, R. M., Damha, M. J. and Ron, D. (2008) An intact unfolded protein response in *Trpt1* knockout mice reveals phylogenetic divergence in pathways for RNA ligation. *RNA*, 14, 225-232.
33. Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J. P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B. J., Oakes, S. A. and Papa, F. R. (2009) IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, 138, 562-575.
34. Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J. S. (2009) Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 186, 323-331.
35. Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A. and Iwawaki, T. (2010) Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic Acids Res.*, 38, 6265-6273.