琉球大学学術リポジトリ

［依頼総説］高等動物におけるリボソーム生合成とその調節

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2011-03-08 キーワード (Ja): キーワード (En): ribosomal biosynthesis, coordinated regulation, nucleolar localization signal, phosphorylation, RPS19 作成者: 徳, 誠吉, Toku, Seikichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016229

高等動物におけるリボソーム生合成とその調節

徳 誠吉

琉球大学医学部生体機能医科学講座生化学分野

Biosynthesis and regulation of ribosomes in higher organism

Seikichi Toku

Department of Biochemistry, School of Medicine, University of the Ryukyus

ABSTRACT

Ribosomes are ultramolecules composed of about 80 kinds of ribosomal protein (RP) and 4 kinds of rRNA. Gene expressions of these components are coordinately regulated. Pre-rRNA transcribed in the nucleolus assembles to form pre-ribosomes with RPs imported from cytoplasm. Maturation and processing of the pre-ribosomes are achieved through multiple steps. This article describes our previous works focusing on the followings: i) coupled synthesis between rRNA and RPs, ii) cloning and gene expression of RPs, iii) nucleolar localization signal, iv) a role of RPS19 phosphorylation on pre-ribosomal maturation. The mechanisms for coordination of the synthesis of ribosomal components are also discussed. *Ryukyu Med. J., 29(1,2)1～10, 2010*

Key words: ribosomal biosynthesis, coordinated regulation, nucleolar localization signal, phosphorylation, RPS19

はじめに

リボソームは細胞器官として細胞内外に蛋白質を供給する重要な役割を担っている．その分子構成は４種類のRNA成分（28S, 18S, 5.8S, 5S rRNA）と約80種類の蛋白質成分（リボソーム蛋白質，RP）からなる超高分子複合体である．細胞は自身の消費する代謝エネルギーの大半をリボソーム生合成のために費やしており，無駄のないよう，協調的に全ての成分が等しく合成されるように調節されていると考えられている[1)]．リボソームの生合成は３種類あるRNA polymerase (Pol I-III) を全部使って行われる特異な系であるが，ここでごく簡単にその過程を説明しておきたい．RPをコードするmRNAは全てPol IIによって核質中で転写され，核膜孔を通って細胞質へ運ばれ，ここで翻訳される．新生RPは再び核質へ戻り，リボソーム成熟の場である核小体へ到達する（Fig. 1）．一方，rRNAは核小体で合成されるが，その遺伝子（rDNA）は18S rRNA，5.8S rRNA，28S rRNAをコードする領域がスペーサーを挟んで連結されている．Pol Iによってこれらが一続きのリボソーム前駆体RNA（pre-rRNA）として転写された後，スペーサー部分がプロセシングとよばれる複数回の過程で除かれて３種類のrRNAが完成する．この間に核小体へ運ばれてきたRPは転写中のpre-rRNAと会合すると考

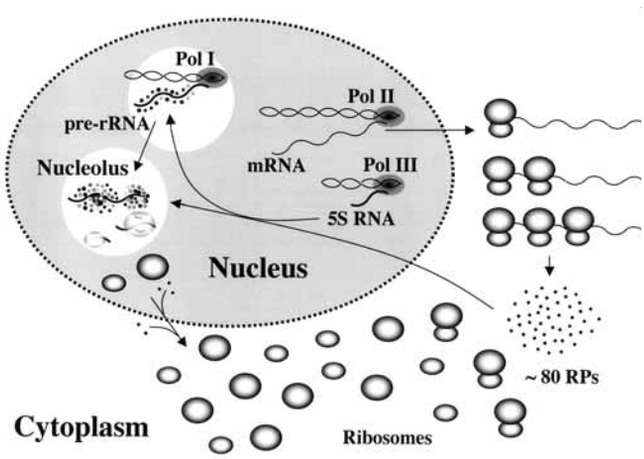

Fig. 1 Assembly and maturation steps of ribosome.

えられているが，リボソーム粒子成熟の過程は極めて複雑である[2,3]．核小体中心部に局在するFibrillar center (FC) には機能していないものも含めて1,000コピー前後のrDNAがあり，Pol Iの他にTIFIAやUBFなどの転写因子も存在している[4]．FCの周りを取り巻くDense fibrillar component (DFC)はRNA含量が特に多いため電子密度が高く，RNA鎖塩基のシュードウリジル化やリボースのメチル化の修飾反応を行うsnoRNAを含む酵素複合体に富んでいる．pre-rRNAの合成の場はFCとDFCとの境界部分にあるといわれており，転写の開始とともにこの転写産物はこれらの酵素により修飾を受ける．DFCの外側には最も大きいスペースを占めるGranular component (GC) が位置する．核小体全体では全RPに加え，150種類を超える非RPタンパク質が存在し，リボソームの成熟に関与している．それらの主なものにはrRNAのプロセッシングに働くヌクレオフォスミンやRNaseIII，RNA結合蛋白質のヌクレオリン，rRNAの二次構造形成に働くRNAヘリカーゼやATPaseなど多岐にわたっている．リボソーム小亜粒子（40Sサブユニット）の前駆体は最初に47S pre-rRNA前駆体上でプロセッソーム（SSU）と呼ばれる蛋白複合体を形成して切り出された90S前駆体から成熟していく[5]．それに対して，大亜粒子（60Sサブユニット）の前駆体は残りのpre-rRNA部分にLSU nobと呼ばれる前駆体部分から成熟していくと考えられている．一方，5S rRNAは核質のクロマチンDNAからPol IIIにより転写された後，核小体に運ばれてリボソーム前駆体に組み込まれると考えられている．大小の亜粒子前駆体はさらに核小体を離れ，核質をへて細胞質に至る過程で幾つかの蛋白質の交換を受けつつリボソーム粒子が完成する[6]．このように核小体は極めて多くの成分の組み立てを行う壮大な化学プラントであるといえる．これらの過程で起こるrRNA鎖のプロセッシングについては他に総説も多く，それらに譲りたい[6,7]．本稿では筆者のかかわってきた幾つかのリボソーム生合成の過程と調節についてｉ）rRNA合成とRP合成の共役性，ii）RP遺伝子の構造と発現調節，iii）RPの核移行と核移行シグナル，iv)リボソーム前駆体の成熟過程におけるRPS19のリン酸化，について項目ごとにまとめ，最後に調節の機構について考察する．

II. rRNA合成とRP合成の共役性

大腸菌などの前核生物においては栄養状態の悪い条件下ではマジックスポット化合物とよばれるppGppやpppGppがリボソーム上で合成され，無駄なくその構成成分を合成するように共役的調節機構が働いている[8]．ラットでも再生肝では共役的にリボソーム合成が上昇することから，両者間に類似の機構があるのではと考え，共役性の問題に取り組んだ．

先ず，ラットに低濃度アクチノマイシンD投与で選択的にrRNAの合成を阻害したときにRP合成が低下するかどうかを調べた．肝でのパルスラベルによるRPへの放射性ロイシンの取り込み能は低下せず，むしろやや亢進がみられた（Table 1）．このときのRP合成が低下しないことは*in vitro*鋳型活性によるmRNAレベルでも確認している[9]．野村らは酵母の系ではあるが，rRNA合成を人為的に変化させうる変異株を作成してこの問題に取り組んだ．即ち，rRNAを合成するPol Iの最大サブユニット遺伝子を*GAL*プロモーター支配下においた変異株を構築し，ガラクトース培地で培養してrRNA合成を強制的に抑制した時のRP合成を調べた[10]．やはり

Table 1 Effects of actinomycin D treatment in vivo on the relative activity for the biosynthesis of nascent ribosomal proteins

Fractions	^{14}C-radioactivity (dpm x 10-^{4})	^{3}H-radioactivity (dpm x 10-^{4})	Corrected ^{3}H/^{14}C ratio
Actinomycin D (1 h)			
Total proteins	206.0	1,963	1.00
Purified r-proteins	5.7	64	1.17
Actinomycin D (6 h)			
Total proteins	209.0	1,441	1.00
Purified r-proteins	2.4	20.8	1.28
Actinomycin D (6+6 h)			
Total proteins	208.0	1,119	1.00
Purified r-proteins	3.0	23.5	1.45

At the indicated time after actinomycin D treatment, each of two rats were intraperitoneally injected with [^{3}H]leucine. Each of two normal rats were intraperitoneally injected with [^{14}C]leucine. After 15 min of pulse labeling, liver homogenates were prepared from the two groups and were mixed. The ribosomal proteins were purified, and ^{14}C- and ^{3}H-radioactivities of each fraction were measured.

彼らもRPの合成低下がないことを確認しており，pre-rRNAに組み込まれずに過剰になったと考えられるRPは分解されると報告している．実際，過剰なRPは核内の分解系で分解されることが知られている[11]．しかし，これらのことから直ちに真核生物あるいは高等動物においてはリボソーム合成の共役性が無いとはいえない．もし，共役的調節機構があったとしてもリボソームの構成成分はPol I-IIIの三つの転写系が必要なうえ，極めて多くのプロセスを経て成熟するために，何処のどの段階で共役的に調節があるか分からないからである．この点については最後にもう一度包括的な観点から取り上げたい．

III. RP遺伝子のクローニングと発現調節

蛋白成分であるRPの遺伝子制御を知るために，鶏のゲノムライブラリーから*L30*および*L37a*遺伝子をクローニングした．得られたクローンは3.2 kbおよび2.6 kbの遺伝子を含んでいた．特徴的だったのはいずれも転写開始点から下流に６あるいは12 ntの5'TOP（5'末端オリゴピリミジン，ピリミジンストレッチ）をもつ点であった[12,13]．このような構造は全てのRP遺伝子に共通の構造であり，後述するmRNAの翻訳特性を決めていることが現在では知られている[14,15]．5'TOPの前後にGC含量の高い配列があるのもRP遺伝子の特徴である[16]．

遺伝子制御を詳しく知るために，プロモーターを形成していると考えられるL37a遺伝子転写開始点前後の1.14kbを上流あるいは下流側から連続的に欠失させた断片をCAT遺伝子上流に繋いだレポーター遺伝子による解析やゲルシフトアッセイ（EMSA）およびフットプリント法を組み合わせた方法でシスエレメントを含む，七つの蛋白質結合領域（A～G）を-120～+195の範囲に同定した[17]．B領域には，E26（ets）ウィルスのもつETS蛋白質ファミリーの結合モチーフ（A/TCCGG）が含まれていた（Fig. 2）．C領域には結合のシグナルは弱いものの結合蛋白質の存在が示唆された．DおよびE領域にはSP1やYY1の結合エレメントがみられた(Fig. 2)．CATアッセイからL37a蛋白質の発現に最も強く寄与していると考えられたのはB領域であり，A/TCCGG配列に結合するトランス因子としてETSファミリーの一つであるGA結合蛋白質（GABP）の関与がEMSAを用いた抗GABP抗体によるスーパーシフトの結果から示唆された．そこで，このモチーフ配列を約30回連結したコンカテマー配列をリガンドとして鶏ヒナ肝から結合蛋白をアフィニティー精製したが，精製蛋白はそのサブユニット構成からやはりGABPであることが分かった．主要なサブユニット構造はヘテロダイマー（αβ）およびヘテロテトラマー（α2β2）であり，メインはヘテロテトラマーだった[18]．D領域に結合しうるYY1も重要な働きをしていると考えられた．その後，バイオインフォマティクスを用いたR. Perry[16]の研究により，GABP，SP1およびYY1が比較的ユビキタスに存在する転写因子として高等動物RP遺伝子プロモーターに最も多く利用されていることが報告されたが，全てのRP遺伝子に共通の転写因子というものはなく，転写因子のみ

B Region (ETS)

cL37a	-49	GCCAGC**TTCCGG**CGCGACAGCTCAT	-25	(+)
	-70	CGTCACA**TCCGG**TCCCCGCTCGCCA	-46	(+)
cL7a	-69	CACCTT**TTCCGG**CCCAACATCTCGC	-45	(+)
	-101	CACCTC**TTCCGG**TCAGCCCCCCCTT	-77	(+)
	-115	CCCCTT**TTCCGG**CCCCACCTCTTCC	-91	(+)
	-136	TGCTTC**TTCCGG**TCCGCCCCACCCT	-112	(+)
mL32	-66	AAGCAC**TTCCGG**CTCTGGGTCCTCT	-90	(+)
mL30	-63	TTCCGC**TTCCGG**TCCCACAATCCTC	-39	(+)
hS14	-74	GGCGTC**TTCCGG**AACCCGACCTCGC	-50	(?)
	-34	GTATAC**TTCCGG**GACACGGAAGTGA	-10	(?)
rP2	-107	TCTTGC**TTCCGG**CGCACCCTTATCG	-87	(?)
xL14	-58	ACAAAC**TTCCGG**TTATCAGGTGTTC	-34	(?)

D Region (YY1)

cL37a	+43	TGCGCTCA**CCATC**TTCCTTCCCGGCG	+18	(+)
cL30	+9	CGGCCCGG**CCATC**TTGGTGGCGCGTG	+34	(+)
cL7a	+34	GCTACTCA**CCATC**TTGGATGTAGAGT	+9	(?)
mL32	+25	GGTGGCTG**CCATC**TGTTTTACGGTGA	+50	(+)
mL30	+10	CTCCCCGG**CCATC**TTGGCGGCTGGTG	+35	(+)
mL7	+65	ATCCTTCT**CCATCC**CCCAAACTAGAG	+90	(?)
hS17	+44	CGAGGCCG**CCATCC**TCCACAATCGTC	+69	(?)
	+64	ATCGTCCC**CCATC**TGCTTCCCGCGGT	+89	(?)
xL1	+52	GCTGACCG**CCATC**TCCTCGCTGCTTC	+27	(?)
rP2	+117	GCCGCGGT**CCATCC**CTCAGTCCCAAC	+92	(?)

E Region (YY1)

cL37a	+57	GGCCTATCCGCCT**CCATCCGCC**CCAA	+82	(+)
cL7a	+58	CCGGCATCCAGCG**CCATCCGCC**GACC	+83	(?)
mL32	+52	TCTGTATCGGCGG**CCATCCGCC**GCCC	+77	(+)

G Region (SP1)

cL37a	+160	CGGGAAGCCT**GGGCGG**AGGCCTTGTG	+185	(+)
mL32	+200	GCATCGGCCA**GGGCGG**GCTTGCGCCA	+225	(?)

Fig. 2　Conservation of *cis*-elements in ribosomal protein gene promoters Conserved nucleotides were indicated in bold.

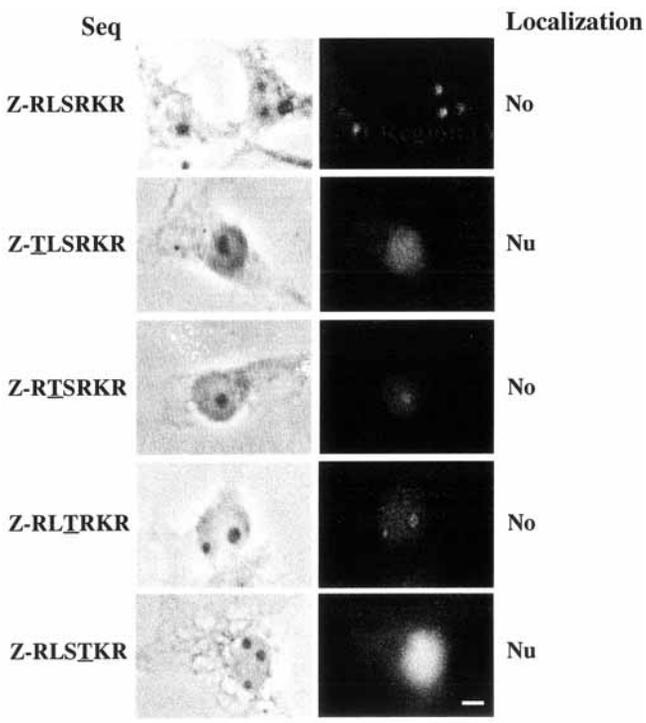

Fig. 3 Subcellular localization of mutated βGAL-L31 Z in the left column denotes βGAL sequence. Substituted amino acids were underlined. Nu, Nucleus; No, Nucleolus.

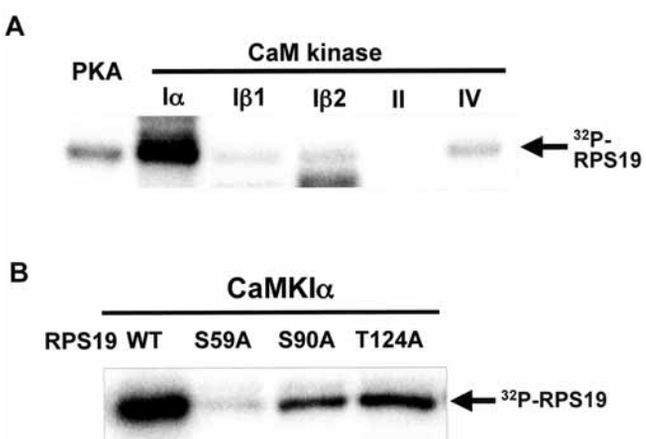

Fig. 4 *In vitro* phosphorylation by protein kinases of GST-RPS19 recombinant protein. (A) Phosphorylation by protein kinase A and CaM kinase isoforms. (B) Phosphorylation by CaM kinase Iα of wild and mutated GST-RPS19 recombinants.

で協調的発現をうまく説明できる状況にはない．しかし，これらの三つの結合エレメントのいずれかは殆どのRP遺伝子プロモーターに含まれており，後の項目で述べるRP遺伝子の協調的発現に重要であると考えられた．

IV．核移行と核小体移行シグナル

全てのRPが核小体へ移行し，そこで新生rRNA前駆体と結合してリボソーム粒子が成熟することから，RPには核移行シグナルに加えて，何らかの核小体移行シグナルがあるだろうと考えた．この問題ではL31蛋白質cDNAをpSVプロモーター下流にβ-galactosidase（βGal)との融合遺伝子となるようベクターを構築し，Cos-1細胞での一過性発現からその細胞内局在性を調べた[19]．L31のC末端側の15アミノ酸配列中に核小体移行シグナルが含まれていたが，さらに絞り込んで^{87}RLSRKR^{92}というさらに短い配列を特定した．理論上は核小体蛋白質の移行過程を考えると，核移行シグナルが機能して初めて核小体移行シグナルも機能すると考えられる．一般に，核移行シグナル（NLS）のモチーフとしてはChelskyらによってテトラペプチドK(K/R)X(K/R)が報告されている[20]．RKRをTTTに変えたものでは全く核への移行が見られないのでこの三アミノ酸は核移行シグナルの一部であろう(Fig. 3)．^{90}RだけをTに変えた^{87}RLSTKR^{92}は核への移行はみられたが，もはや核小体へは移行できなかった．興味深いのは^{87}RLSR^{90}であり，たったこれだけで核移行シグナルも核小体移行シグナルも兼ねていると考えられる．このテトラペプチドの中にあるLSは置換しても問題ないことから最小で必須のモチーフはRXXRであると結論した．実際，このような配列は核膜を持たない前核生物やミトコンドリアのような小器官性リボソームにはほとんどみられないのに対して真核生物リボソームには極めて多く，全RPの約45%でみられた．

L31核小体移行シグナルはたったの四アミノ酸の配列であったが，比較的短い配列はS7，S22，S25，L22などでも報告されている[21-25]．ウィルス蛋白のような外来蛋白質であるTat，Rev，Rexなども核小体に蓄積するタンパクとして知られているが，グルタミンを含んだ複数塩基性アミノ酸からなる比較的小さいシグナルをもっている[26,27]．しかし，核小体蛋白質の欠失実験で同定されたシグナル配列をβGALやピルビン酸キナーゼなどの他の蛋白質に移して組換え蛋白として発現させると全く核小体移行を示さない場合や[21]，核移行シグナルや他の核小体移行シグナルが付加的に必要なこともあり，複数核小体移行シグナル間の協調的役割も指摘されている[24,28-30]など，核移行シグナルのように単純ではないことも分かってきている．またS25，L5，L7a，L22などの他，NSR1，Nop25，p120，ヌクレオリンなどのRP以外の核小体蛋白質，またTat，Rev，Rexなどのウィルス蛋白質でシグナル配列がリボソーム前駆体のRNA部分との結合に必須であることが分かっている[25,28]．恐らく核移行シグナルや幾つかのRNA結合モチーフあるいは蛋白質結合モチーフとの協働作用によって核小体移行は実現されると考えられる．そういう脈絡からは核小体移行シグナルはrRNA前駆体や他の核小体蛋白との結合

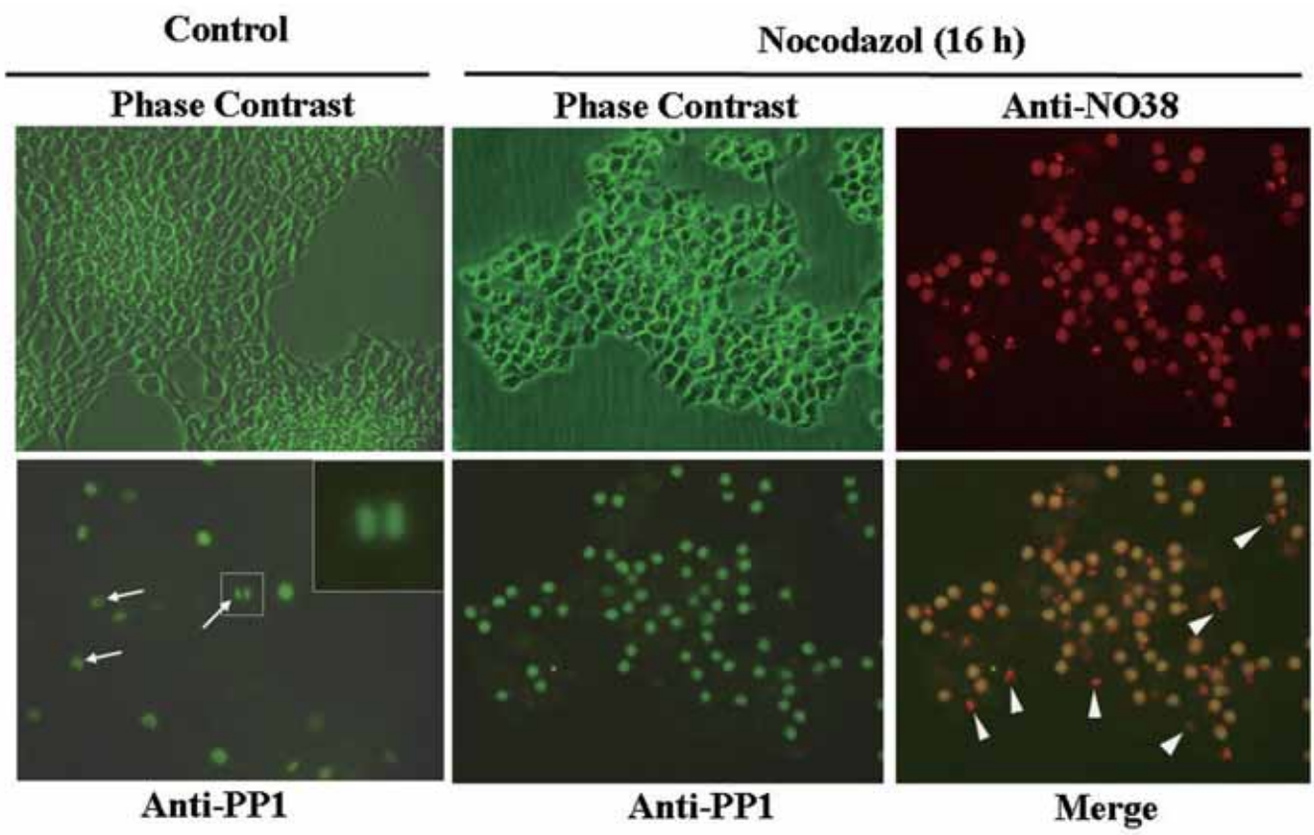

Fig. 5 Subcellular localization of phosphorylated S19. Arrows indicate segregating sister-chromatids at M phase in GT1-7 cells. Insert shows an enlarged image. Positive cells to anti-PP1 antibody increased daramatically in number in nocodazole treated cells. Arrowheads show nucleolus in G1-G2 phase. The nucleolus was avidly stained by anti-NO38 (nucloephosmin) antibody, but not by anti-PP1 antibody.

モチーフと共に働く核小体係留シグナルと呼んだ方がいいのかも知れない．Emmottらはプロテオーム解析から，ヌクレオフォスミンやヌクレオリンといった主要な核小体蛋白質が多くの核小体蛋白質間の結合を媒介するハブ蛋白質であり，核小体への蛋白質の移動に重要な役割を果たしていると主張している[31]．

V．リボソーム前駆体の成熟にともなうRPS19のリン酸化

RPは核小体へ運ばれて他の核小体蛋白質と共にpre-rRNA上でリボソーム前駆体を形成する．この前駆体のたどる成熟あるいはプロセッシングの過程もまたPol Ⅰによる転写の反応とリンクしており[5]，リボソーム生合成の速度を議論する上で重要である．我々はS19を目印にしてこの過程を観察している．この蛋白質は二つの協調的に働く核小体移行シグナルをもっている[30]．RPS19遺伝子はダイヤモンドブラックファン貧血症の原因遺伝子の一つとしても特定されており[32]，S19は細胞外に放出されると炎症時の好中球の遊走化因子としても機能するなど，RPのリボソーム外機能を示す例として注目されている[33]．また，S19の特異的結合蛋白質としてS19結合蛋白質（S19BP）がツーハイブリッド法で同定されたが，核小体にS19と共局在することから，S19の機能に対して何らかの役割を果たしていると推測されている[34]．また，S19はインビトロでCaMキナーゼⅠαによってリン酸化されやすいことが分かった[35]（Fig. 4A）．59番目セリンが最もリン酸化を受ける(Fig. 4B)ことから，このリン酸化を特異的に検出しうる抗PP1抗体を作成した．この抗体を用いて先ず，リン酸化S19はポリソームに含まれていることを明らかにした．しかし，リボソームの翻訳機能におけるリン酸化の役割は未だ分かっていない．

細胞周期との関連でGT1-7細胞を抗PP1抗体で染めると，陽性を示すのは細胞核であり，一部の細胞では凝縮染色体の中期板を形成していることからM期にS19のリン酸化が上昇することが分かった（Fig. 5）．M期に細胞を停止させるノコダゾールでGT1-7細胞を同調させると抗PP1抗体陽性細胞はぐっと増える．核小体ではリボソーム前駆体の形成と成熟が進むが，HAタグを付けて強制発現させた組換え蛋白質HA-S19BPを標的としてリボソーム前駆体を抗HA抗体で免疫沈降してもリン酸

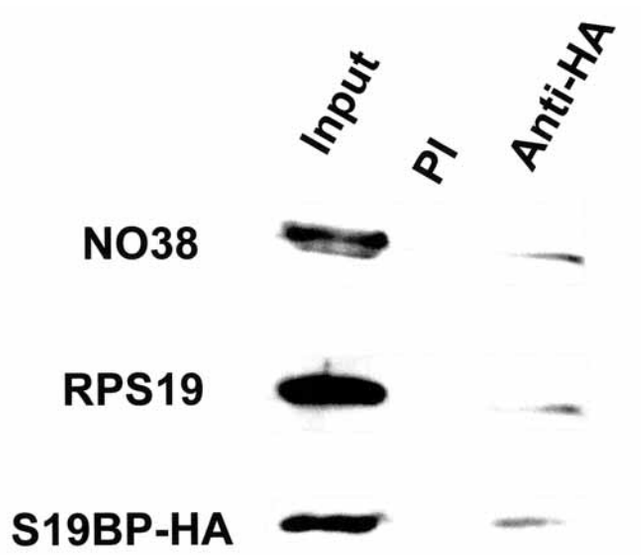

Fig. 6 Immuno-precipitation of pre-ribosomes using anti-HA antibody. GT 1-7 cells were transfected with pSV-HA-S19BP. Pre-ribosomes were precipitated with anti-HA antibody and protein A Sepharose from the cell extracts, purified and analyzed by western blotting.

化S19は殆ど検出されなかった（Fig. 6）．従って，S19のリン酸化は何らかの理由で染色体の凝縮過程で染色体との結合に関わっていることが考えられる．実際，M期染色体にはリボソーム前駆体やS19を含む24種類のRPが結合していることが免疫染色およびプロテオームによる研究で報告されている[36,37]．

核小体はM期には核膜と共に一見消失してしまうが，リボソーム前駆体はこの間凝縮染色体や，その近傍にあるPNB（pre-nucleolar body）あるいは細胞質にあるNDF（Nucleolus-derived foci）という小顆粒に一時的に分散して存在し，M期終期からG1にかけては核小体形成体（NOR）を中心に再形成されることが分かっている[38,39]．リン酸化はM期における凝縮染色体へのS19の一時的退避の機構なのかも知れない（Fig. 7）．また，M期における核小体の崩壊は細胞分裂を効率よく進めるためのリボソーム合成の一時的停止機構であろう．

VI. 協調的調節

ここで，もう一度リボソーム成分の等モルずつの合成を可能にする仕組み-協調的調節について考察してみたい．既に述べたように大腸菌ではマジックスポット化合物が合成されて共役的にリボソーム成分の合成調節を行っ

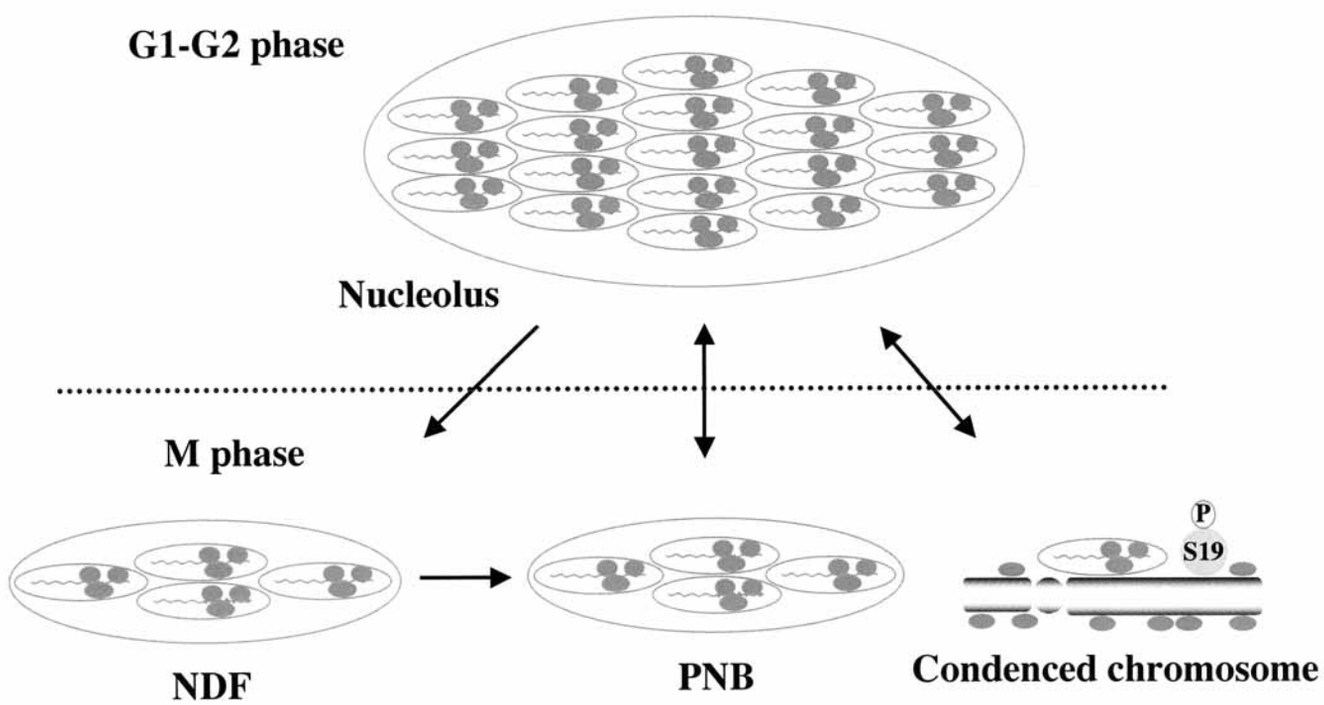

Fig. 7 Subcellular localization of pre-ribosomes during mitosis. Subcellular localization of pre-ribosomes during mitosis is schematically delineated. Transfer mechanism of the pre-ribosomes is not well known. Phosphorylated S19 is observed in condensed chromosomes. PNB, prenucleolar body; NDF, nucleolus derived foci.

ている．この化合物はPol Iの基質侵入孔に結合してrRNA合成を阻害する[40,41]．tRNA合成もこの化合物により阻害されることが分かっている．RPや翻訳延長因子の合成も阻害され，機構はよく分からないが全ての成分間に生合成上の共役性があるといえる．最近，ppGppは植物でも発見されており，同様の制御システムはかなり広範囲にあると考えられてきている[42]．

筆者がラット肝臓での共役性の問題に取り組んだのは1970年代の終わり頃で先取的ではあったが，共役性をみることはできなかった．恐らく共役性に関わるシグナルは遥か上流で働いており，単にPol Iを阻害するやり方では実験の網にかからなかったのであろう．現在出されている幾つかのモデルもそのことを示している．最も可能性が高く注目されているのはラパマイシンで阻害されるmTOR1を含んだ複合体（mTORC1）による調節である[43]．mTORはセリン/スレオニン型プロテインキナーゼであり，蛋白質合成および転写関連で重要なシグナル伝達機構として働いている．例えば，mTORはPol Iの転写因子TIF-1Aをアミノ酸濃度依存性に調節することでrRNA合成を制御している．Pol IIIによる５S rRNA合成との共役にもmTORが働く可能性が指摘されている．それによると，mTORの阻害によりTFIIIBおよびTFIIICが減少して５S rRNA合成が低下するという[44]．Tsangらによると発芽酵母ではTORが核内でrDNAプロモーターに結合してPol I活性を制御しているという[45]．さらにほ乳類でもPol IやPol IIIによって転写される遺伝子のプロモーターにmTORが直接結合して作用することが示された[46]．

酵母の研究ではRPもrRNA も遺伝子発現はTOR依存性であることが確立している[47]．両者の遺伝子プロモーターにはノンヒストン蛋白であるHMGBの酵母ホモログHMO1がHMGボックスを介して結合している．HMO1はほ乳類のrDNAプロモーターに働く転写因子UBFと殆ど同様の機能をもっており，UBFはenhanceosomeとして働くことが想定されていることからHMO1もそうではないかといわれている．TORが活性状態のとき，HMO1はrRNA遺伝子およびRP遺伝子プロモーターの両方に結合しているが，不活性な状態では解離するといわれており，HMO1という共通因子による共役性が想定されている．

また，興味深いことにやはり酵母の系ではあるがクロマチン構造のオン・オフからもTORによる共役性を説明できることが報告されている．例えば，rDNAプロモーターはラパマイシン感受性のヒストンデアセチラーゼ(HDAC）により発現が負に制御されているし[47]，RPプロモーターはヒストンアセチラーゼ（HAT）とヒストンデアセチラーゼ（HDAC）とにより正/負の両方向でTORにより制御されている[47,48]と言われている．

高等生物も含めて，約80種類のRPの翻訳に関してもmTORによる調節が存在すると考えられている．RPを含む殆どの5'TOPをもつ mRNAは普段過剰に細胞質に存在しており，ほんの一部のものしか翻訳されていないが，ホルモン刺激や高アミノ酸レベル下では効率的にポリソームに組み込まれる[15,49]．よく分かってはいないが，5'TOPmRNAの翻訳を選択的に促進する機構があると考えられている．当初，mTORの下流にS6キナーゼを介した促進機構が働くとする説が有力であったが，このキナーゼのヌル変異のS6K1(-/-)あるいはS6K2(-/-)細胞でもラパマイシン感受性の5'TOPmRNAの翻訳がみられることから否定されている．ピリミジンだけからなるという5'-TOPの構造から特異的な結合蛋白質があると考えられ，La抗原の結合や5'TOP下流配列への結合する因子ZNF9などが見いだされているが，試験管内での翻訳活性への影響は確認されていない[50,51]．

一方，酵母の系ではあるがL30では過剰な発現をしているmRNA前駆体のイントロンに新生RPが結合してプロセッシングを抑える[52]，或いはS14 mRNAでは分解する[53]ことによるフィードバック調節も知られており，これらは微調節の一つとされている．面白いのは5'TOP mRNA間でも最大で約５倍の量的な差があり，この差を縮めるのにどうしてもこのような調節が必要とされる点であろう．また，その他にも一つのRPが二つの重複遺伝子から発現する場合（特に酵母の場合）のようにRP遺伝子の進化による調節，各mRNAの半減期による調節なども，それぞれの生物での制御システムと考えられている．

VII. おわりに

リボソームの構成成分間の協調的調節は前項目で述べたようにTORを中心に解析がさらに進むであろう．核小体でのリボソーム前駆体の成熟過程はかなり複雑であり，多くのことが解明されなければならない．例えば，リボソーム前駆体成熟の時間経過に伴う変化以外にそれらの蛋白質リン酸化による制御や，成熟リボソームの核小体外あるいは細胞質への輸送など重要なステップのチェック機構の有無や，細胞周期に伴う変化とNDFやPDBあるいは凝縮染色体間でのリボソーム成分やリボソーム前駆体の移動など興味は尽きない．

Pedersonにより核小体の多彩な機能が指摘されてから関連分野も大変な広がりをみせている[54]．例えば，RP遺伝子の異常あるいはリボソーム形成の異常によるリボソーム性疾患としてダイヤモンド・ブラクッファン貧血症，シュバックマン・ダイヤモンド症候群，先天性角化異常症，軟骨毛髪形成不全などが知られている．リボソーム成熟過程が分かれば，病因の解明はそう遠くないであろう．医学の重要なテーマである細胞増殖と老化あるいは癌とアポトーシスとは表裏の関係にあり，これらの制御にリボソーム生合成の調節は重要な鍵になると思われる．多くの若い研究者の参入を期待している．

最後に，本稿で述べた研究成果は筆者の新潟大学時代にご指導いただいた鍋島陽一先生，琉球大学に赴任してからは田中龍夫先生，山本秀幸先生ならびに研究にご協力いただいた先生や大学院生の賜物であり，心から感謝申し上げます．

文　献

1) Warner J.R.: The economics of ribosome biosynthesis in yeast. Trends Biochem Sci, 24: 437-440, 1999.
2) Strouboulis J. and Wolfe A.P.: Functional compartmentalization of the nucleus. J Cell Sci, 109: 1991-2000, 1996.
3) Leary D.J. and Huang S.: Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. FEBS Lett. 509: 145-50, 2001.
4) Thiry M.: New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. Nucleic Acids Res, 20: 6195-200, 1992.
5) Granneman S. and Baserga S.J.: Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. Current Opinion in Cell Biology, 17:281-286, 2005.
6) Henras A.K., Soudet J., Gerus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mougin A. and Henry Y.: The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. Cell Mol Life Sci, 65: 2334-2359, 2008.
7) Fromont-Racine M., Senger B., Saveanu C. and Fasiolo F.: Ribosome assembly in eukaryotes. Gene 313: 17-42, 2003.
8) Cashel M.: The control of ribonucleic acid synthesis in Escherichia coli. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. J Biol Chem, 244: 3133-3141, 1969.
9) Toku S., Nabeshima Y. and Ogata K.: Effects of low dose actinomycin D treatment *in vivo* on the biosynthesis of ribosomal proteins in rat liver. J Biocem, 93: 349-359, 1983.
10) Wittekind M., Kolb J.M., Dodd J., Yamagishi M., Memet S., Buhler J-M. and Nomura M.: Conditional expression of RPAJ90, the gene encoding the largest subunit of yeast RNA Polymerase I: Effects of decreased rRNA synthesis on ribosomal protein synthesis. Mol Cell Biol, 10: 2049-2059, 1990.
11) Tsurugi K. and Ogata K.: Degradation of newly synthesized ribosomal proteins and histones in regenerating rat liver with and without treatment with a low dose of actinomycin D. Eur J Biochem, 101: 205-213, 1979.
12) Nakasone K., Kenmochi N., Toku S. and Tanaka T.: The structure of the gene encoding chicken ribosomal protein L30. Biochim Biophys Acta, 1174: 75-78, 1993.
13) Machida M., Toku S., Kenmochi N. and Tanaka T.: The structure of gene encoding chicken ribosomal protein L37a. Eur J Biochem, 213: 77- 80, 1993.
14) Meyuhas O.: Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. Eur J Biochem, 267: 6321-6330, 2000.
15) Hornstein E., Tang H. and Meyuhas O.: Mitogenic and nutritional signals are transduced into translational efficiency of TOP mRNAs. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 56: 477-484, 2001.
16) Perry R.P.: The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. BMC Evol Biol, 5: 15, 2005.
17) Toku S. and Tanaka T.: A characterization of transcriptional regulatory elements in chicken ribosomal protein L37a gene. Eur J Biochem, 238: 136-142, 1996.
18) Toku S., Quaye I.K. and Tanaka T.: Isolation and characterization of chicken GA-binding protein. Biochim Biophys Acta, 1579:50-54, 2002.
19) Quaye I.K., Toku S. and Tanaka T.: Sequence requirement for nucleolar localization of rat ribosomal protein L31. Eur J Cell Biol, 69: 151-155, 1996.
20) Chelsky D., Ralph R. and Jonak G, Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. Mol Cell Biol, 9: 2487-2492, 1989.
21) Annilo T., Karis A., Hoth S., Rikk T., Kruppa J. and Metspalu A.: Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region. Biochim Biophys Res Commn, 249: 759-766, 1998.
22) Timmers A., Stuger R., Schaap P.J., van 't

Riet J. and Raue H.A.: Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25. FEBS Lett, 452: 335-340, 1999.
23) Kubota S., Terry D.C. and Roger J.P.: Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S25: Common features shared with HIV-1 regulatory proteins. Oncogene, 18: 1503-1514, 1999.
24) Shu-Nu C., Lin C.H. and Lin A.: An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar localization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22. FEBS Lett, 484: 22-28, 2000.
25) Houmani J. and Ruf I.: Clusters of basic amino acids contribute to RNA binding and nucleolar localization of ribosomal protein L22. PLoS One, 4: e5306, 2009.
26) Siomi H., Shida H., Maki M. and Hatanaka M.: Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. J Virol, 64: 1803-1807, 1990.
27) Hatanaka M.: Discovery of the nucleolar targeting signal. Bioessays 12: 143-148, 1990.
28) Yan C. and Melese T.: Multiple regions of NSR1 are sufficient for accumulation of a fusion protein within the nucleolus. J Cell Biol, 123: 1081-1091, 1993.
29) Russo G., Ricciardelli G. and Pietropaolo C.: Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. J Biol Chem, 272: 5229-5235, 1997.
30) Da Costa L., Tchernia G., Gascard P., Lo A., Meerpohl J., Niemeyer C., Chasis J.-A, Fixler J. and Mohandas N.: Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. Blood, 101: 5039- 5045, 2003.
31) Emmott E. and Hiscox J.A.: Nucleolar targeting: the hub of the matter. EMBO reports 10: 231-238, 2000.
32) Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T.-N., Dianzani I., Punnet H.H., Shafer F.E., Cario H., Ramenghi U., Glomstein A., Pfeiffer R.A., Goringe A., Olivieri N.F., Smibert E., Tchernia G., Elinder G. and Dahl N.: Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. Am J Hum Genet 63: 1388-1395, 1999.
33) Yamamoto T.: Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimmer. Pathol Int. 50: 863-871, 2000.
34) Maeda N., Toku S., Kenmochi N. and Tanaka T.: A novel nucleolar protein interacts with ribosomal protein S19. Biochim Biochem Res Commun, 339: 41-46, 2006.
35) Maeda N., Toku S., Naito Y., Nishiura H., Tanaka T. and Yamamoto H.: Phosphorylation of ribosomal protein S19 at Ser59 by CaM Kinase Iα. J Neurochem, 109: 393-402, 2009.
36) Herdenandez-Verdun D. and Gautier T.: The chromosome periphery during mitosis. Bioessays. 16: 179-185, 1994.
37) Uchiyama S., Kobayshi S., Takata H, Ishihara T., Hori N., Higashi T., Hayashihara K., Sone T., Higo D., Nirasawa T., Takao T, Matsunaga S. and Fukui K.: Proteome analysis of human metaphase chromosomes. J Biol Chem 280: 16994-17004, 2005.
38) Dundr M., Misteli T. and Olson M.: The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. J Cell Biol, 150: 433-446, 2000.
39) Hernandez-Verdun D.: Nucleolus: from structure to dynamics. Hist Cell Biol, 125: 127-137, 2006.
40) Perederina A., Svetlov V., Vassylyeva M.N., Tahirov T.H. Yokoyama S. Artsimovitch I. and Vassylyev D.G.: Regulation through the secondary channel-structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. Cell 118: 297-309, 2004.
41) Artsimovitch I., Patlan V., Shun-ichi S., Vassylyeva M.N., Hosaka T., Ochi K., Yokoyama S. and Vassylyev D.G.: Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. Cell: 299-310, 2004.
42) Braeken K., Moris M., Daniels R., Vanderleyden J. and Michiels J.: New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. Trends Microbiol, 14: 45-54, 2006.
43) Wang X. and Proud C.G.: The mTOR pathway in the control of protein synthesis.

Physiol, 21: 362-369, 2006.
44) White R.J.: RNA polymerases I and III, growth control and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 69-78, 2005.
45) Tsang C.K. and Zheng X.F.S.: ROR-in(g) the nucleus. Cell Cycle, 6: 25-29, 2007.
46) Tsang C.K., Liu H. and Zheng X.F.S.: mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. Cell Cycle, 9: (5), 2010.
47) Xiao L. and Grove A.: Coordination of ribosomal protein and ribosomal RNA gene expression in response to TOR signaling. Current Genomics, 10: 198-205, 2009.
48) Mayer C. and Grummt I.: Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerase. Oncogene, 25: 6384-6391, 2006.
49) Caldarola S., Amaldi F., Proud C.G. and Loreni F.: Translational regulation of terminal oligopyrimidine mRNAs induced by serum and amino acids involves distinct signaling events. J Biol Chem 279: 13522- 13531, 2004.
50) Pellizzoni L., Cardinali B., Lin-Marq N., Mercanti D. and Pierandrei-Amaldi P.A.: *Xenopus laevis* Homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs *in vitro*: Implication of a protein factor in complex formation. J Mol Biol, 259: 904-915, 1996.
51) Zhu J., Hayakawa A., Kakegawa T. and Kaspar R.L.: Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation *in vitro*. Biochim Biophys Acta, 1521: 19-29, 2001.
52) Vilardell J. and Warner J.R.: Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. Genes Dev, 8: 211-22, 1994.
53) Fewell S.W. and Woolford J.L.: Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. Mol Cell Biol, 19: 826-834, 1999.
54) Pederson T.: The plurifunctional nucleolus. Nucl Acids Res, 26: 3871-3876, 1998.