

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22119006

研究課題名（和文）栄養応答における新規転写後制御機構の解明

研究課題名（英文）Novel Mechanism of Post-transcriptional Regulation in Nutritional Response

研究代表者

内藤 哲（Naito, Satoshi）

北海道大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：20164105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,200,000 円

研究成果の概要（和文）：植物におけるメチオニン合成の鍵となる段階を触媒するCGS酵素遺伝子（CGS1）はS-アデノシルメチオニン（SAM）に応答してSer-94コドンで翻訳を一時停止し、これと共役してmRNA分解をひき起こす。試験管内翻訳系を用いた解析により、翻訳停止に伴って新生ペプチドが縮んだコンフォメーションを取り、リボソーム出口トンネルとの相互作用が変化すること、および9コドン間隔で後続のリボソームが追突することを明らかにした。

一般的なmRNA分解ではポリA鎖の短縮化が最初かつ律速段階とされる。SAMに応答したCGS1 mRNA分解ではこれとは異なり、ポリA鎖の短縮化が起らないことを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Cystathionine γ -synthase (CGS) catalyzes the first committed step of methionine biosynthesis in plants. Expression of CGS1 gene that encodes CGS is feedback-regulated, in response to S-adenosyl-L-methionine (SAM), by translation arrest at Ser-94 codon followed by mRNA degradation. Studies using in vitro translation system revealed that nascent peptide of CGS1 takes compact conformation upon translation arrest, and conformation of 28S rRNA and/or interaction between the nascent peptide and rRNA changes. Upon translation arrest, ribosomes are stacked behind the initially arrested ribosome at Ser-94. We revealed that the stacked ribosomes are arranged at nine codon intervals.

During general mRNA degradation, poly(A) shortening is the first and usually the rate-limiting step. In SAM-induced CGS1 mRNA degradation, however, the poly(A) shortening was not observed.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：mRNA分解 リボソーム 翻訳停止 試験管内翻訳系 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

メチオニンはタンパク質を構成するのみならず、S-アデノシルメチオニン (SAM) を経て細胞内の様々な反応に関与する。植物におけるメチオニン合成は1970年代に行われた研究によってシスタチオニャ-シクターゼ (CGS) の段階でフィードバック制御されることが示されたが、CGSはアロステリック酵素ではなく、その制御機構は謎であった。我々は遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ *mtol1* 変異株を分離した (図1)。*mtol1* 変異の解析により、CGSをコードする *CGS1* 遺伝子の発現が、mRNAの分解段階でフィードバック制御されており、しかもこの制御にMTO1領域と名付けたCGS自身のアミノ酸配列がシスに作用するというユニークな制御機構の存在を明らかにした (Chiba et al. 1999, Ominato et al. 2002)。

この制御は翻訳中に起こり、コムギ胚芽の試験管内翻訳系で再現される (Chiba et al. 2003)。試験管内翻訳系を用いた解析により、SAM存在下ではMTO1領域直後のSer-94コドンで一時的な翻訳伸長の停止が起こり、これと共役して *CGS1* mRNA分解が起こることが示された (Onouchi et al. 2005)。新生ペプチドによる翻訳の停止と共役したmRNA分解は真核生物で初めての発見である。

このmRNA分解においては、5'末端を欠いた複数のmRNA分解中間体が蓄積する。Ser-94コドンで翻訳停止したリボソームに後続のリボソームが追突して数珠つなぎ状態になり、停止したそれぞれのリボソーム近傍でmRNA分解が引き起こされると考えられる (Haraguchi et al. 2008)。一方、ウサギ網状赤血球ライセートの試験管内翻訳系では、SAMに応答したリボソームの翻訳停止は、コムギ胚芽の試験管内翻訳系と同様にSer-94コドンで起るものの、これに引き続く *CGS1* mRNAの分解は観察されない (Onouchi et al. 2008)。*CGS1* mRNAの分解反応には植物固有の因子が必要であることを示唆している。

リボソームで合成されたペプチドは、大サブユニットを貫く出口トンネルを通過して外に出る。Ser-94で翻訳停止したとき、シス配列であるMTO1領域の新生ペプチドは出口トンネル内に位置する。このことは、翻訳中のリボソームが細胞内のSAM濃度を検知してメチオニン合成を制御している、即ち、リボソームが細胞内栄養センサーとして機能していると考えられる。

2. 研究の目的

様々な環境条件下で植物が持続的に成長するには、環境変動に対して細胞内恒常性を厳密に維持する機構が必要である。そのためには細胞内環境を機敏に感知し、それを即座に細胞の

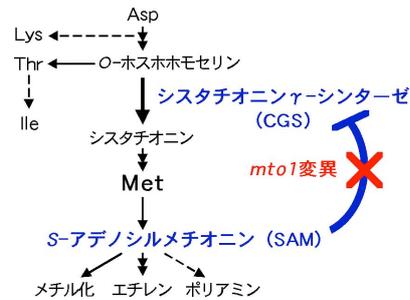


図1. メチオニンの生合成経路と *mtol1* 変異

mtol1 (methionine over-accumulation) 変異は *CGS1* 遺伝子のMTO1領域内に1アミノ酸置換をもち、CGSのフィードバック制御が起らない。

機能調節に反映させる分子メカニズムがなくてはならない。

本研究は、我々が *CGS1* 遺伝子の発現制御で発見した、植物固有の代謝調節機構をモデル系として、その分子機構を解明し、環境変動に対する植物の突破力に不可欠な細胞内環境の維持機構を理解しようとするものである。これまで、環境応答の研究は主として転写段階での制御に着目した研究が行われてきた。一方、転写後制御は、細胞のおかれた環境、特に細胞質の状態に迅速に対処するための手段として理にかなったものと言えよう。

3. 研究の方法

CGS1 遺伝子におけるSAMに応答した翻訳停止とmRNA分解は、*CGS1* の第1エクソンのコード領域が必要かつ十分である (Suzuki et al. 2001)。本研究では、*CGS1* の第1エクソンのコード領域とタグをつないだmRNAを用いるが、簡単のため、単に *CGS1* mRNAと記載する。

(1) 翻訳停止時のリボソームの状態の解析

リボソーム出口トンネル内の新生ペプチドのコンフォメーション変化を調べるためにペジレーション解析を行う。ポリエチレングリコール・マレイミド (PEG-MAL) は、タンパク質のシステイン残基と共有結合を形成し、約10 kDaのゲルシフトを生じさせる。PEG-MALは出口トンネルの外に出たシステイン残基とは反応しやすいが、出口トンネル内にあるシステイン残基とは反応しにくい。

翻訳停止したリボソーム・新生ペプチド・mRNA複合体の28S rRNAについて、UVクロスリンクおよびジメチル硫酸によるメチレーションプロテクション実験を行う。これにより、リボソーム28S rRNAのコンフォメーション変化、もしくは、新生ペプチドと28S rRNAの相互作用の変化を捉えることができる。

抗生物質のピュロマイシンは、アミノアシル

-tRNAのアナログであり、翻訳中のリボソームのA部位に入って、P部位のペプチジル-tRNAと反応し、ペプチジル-ピュロマイシンを生成する。この反応はリボソームのペプチジルトランスフェラーゼ活性によって触媒され、同活性、あるいは、ピュロマイシンのA部位へのアクセシビリティをモニターすることができる。

(2) CGS1 mRNA分解の解析

ウサギ網状赤血球ライセートの試験管内翻訳系ではSAMに反応したCGS1 mRNAの翻訳停止は起こるがmRNA分解は起こらない(Onouchi et al. 2008)。ウサギ網状赤血球ライセートの試験管内翻訳系をベースにして、CGS1 mRNA分解をになう因子のアッセイ系を確立する。

(3) シロイヌナズナ試験管内翻訳系の確立

シロイヌナズナの液体カルス培養から脱液胞化プロトプラストを調製し、シロイヌナズナの試験管内翻訳系を確立する。

(4) リボソーム出口トンネルの変異の解析

リボソームタンパク質L4とL17は、出口トンネルの内側に突き出した部分を持ち、出口トンネルの狭窄部位を形成する(図2)。L4もしくはL17タンパク質の突出部分のアミノ酸配列を改変した遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナ株を作成する。この株から試験管内翻訳系を調製し、SAMに反応したCGS1 mRNAの翻訳停止における出口トンネルの関与を解析する。

4. 研究成果

(1) 翻訳停止時のリボソームの状態の解析

CGS1 mRNAのSAMに反応した翻訳停止は一時的であるので、新たな共有結合の生成ではなく、何らかのコンフォメーション変化が考えやすい。そこで、SAMに反応してCGS1新生ペプチドがコンフォメーション変化を起こすとの作業仮説をたてた。

翻訳停止位置から様々な距離にシステイン残基を1つだけ持つように設計したCGS1 mRNAを用いて試験管内翻訳を行い、翻訳停止したリボソーム・新生ペプチド・mRNA複合体を回収してペジレーション解析を行った。その結果、SAM存在下では出口トンネル内のCGS1新生ペプチドがSAM非存在下と比べて、よりコンパクトなコンフォメーションを取ることが示された。

一方、MTO1領域内にアミノ酸置換を持ちSAMに反応したCGS1の発現制御が起こらない*mtol*変異を導入したmRNAでは、SAMの有無にかかわらず、出口トンネル内のCGS1新生ペプチドがコンパクトな構造を取ることがなかった。

なお、SAM非存在下では翻訳停止が起こらず、従って、SAM存在下と非存在下で出口トンネル

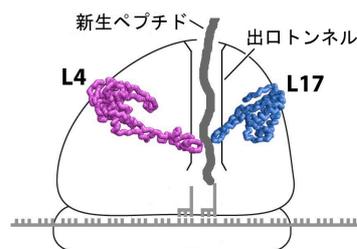


図2. リボソームタンパク質L4, L17とリボソーム出口トンネル

リボソーム出口トンネルの大部分はrRNAが形成するが途中にリボソームタンパク質のL4とL17が突き出した部分があり、狭窄部位を形成する。

内のCGS1新生ペプチドの状態を比べることはできない。そこで、一連の実験ではSer-94コドンで切れたnon-stop mRNAを解析に用いている。

これらの結果より、SAMに反応した翻訳停止と出口トンネル内のCGS1新生ペプチドのコンフォメーション変化が密接な関係にあることが示された。低分子化合物に反応して出口トンネル内の新生ペプチドがコンフォメーション変化を起こすことを示した最初の例である(雑誌論文10)。

さらに、翻訳停止したリボソーム・新生ペプチド・mRNA複合体の28S rRNAについて、UVクロスリンクおよびジメチル硫酸によるメチレーションプロテクション実験を行った。その結果、翻訳停止と並行して、出口トンネル部分の28S rRNAにコンフォメーション変化、もしくは、新生ペプチドと28S rRNAの相互作用に変化が生じていることが示された(雑誌論文10)。

SAMに反応した翻訳停止において、後続のリボソームが追突することにより数珠つなぎになる。リボソームはmRNAの10コドン程度をカバーするとされているので、追突したリボソームは、Ser-94から10コドン程度上流に位置すると期待される。Gly-84近傍のコドンを同義コドンに置換し、ペプチジル-tRNAのtRNA部分が変わることによる電気泳動度の変化を指標として、追突したリボソームの位置を解析した。その結果、追突した1つ目、2つ目のリボソームの位置を、それぞれ、Val-85、Ala-76と同定した。リボソームが9コドン間隔で数珠つなぎになっていることが明らかになった(雑誌論文5)。

Ser-94で停止したリボソーム、ならびに追突した1つ目、2つ目のリボソームについて、ピュロマイシンによるペプチジル-tRNAの離脱反応(ピュロマイシン反応)の詳細な解析を行い、数珠つなぎになったリボソームが停止している翻訳伸長反応段階を考察した。

ピュロマイシン反応のタイムコース解析により、いずれのリボソームについても、複数の状態が含まれることが明らかになった。ここでは、そのう

ちの主要な状態について記載する。Ser-94で翻訳停止したリボソームのピュロマイシン反応は非常に遅かった。Ser-94での翻訳停止は、転座前の段階で起り、このときペプチジル-tRNAはA部位にある。Ser-94で翻訳停止したリボソームのピュロマイシン反応が遅いのは、このことと対応していると考えられる。一方、追突したリボソームのピュロマイシン反応は、1つ目、2つ目とも、遅かったが、Ser-94で翻訳停止したリボソームほどには遅くなかった。

真核生物においては、翻訳伸長反応の各段階におけるピュロマイシン反応の速度についての報告がない。そこで、Val-85 non-stop RNAをSAM非存在下で翻訳させた場合を転座後の段階の対照とし、Ser-94 non-stop RNAをSAM存在下で翻訳させた場合を転座前の対照として、原核細胞における報告と、ピュロマイシン反応の速度(見かけの反応速度)の相対値を比較した。その結果、追突したリボソームは大サブユニット側がP部位に移行したP/Eハイブリッド状態であると考察した(雑誌論文5)。

さらに、Ser-94コドンでの翻訳停止に至る過程でのリボソームの状態の変化を、解析にし、SAMに反応した翻訳停止に至る課程でのmRNA:リボソーム:新生ペプチド複合体の状態の変化を考察した(投稿論文準備中)。

CGSは核にコードされ、葉緑体に移行する。SAMに反応した制御のシス配列であるMTO1領域と葉緑体移行シグナルの関係を解析し、両者はオーバーラップするが機能的には独立であることを明らかにした(雑誌論文3)。

(2) CGS1 mRNA分解の解析

CGS1 mRNAをSAM存在下でウサギ網状赤血球ライセートの試験管内翻訳系で翻訳し、翻訳停止した状態の反応液に、小麦胚芽抽出液を各種クロマトグラフで分画した画分を加えることで、CGS1のmRNA分解に関わる因子を同定する実験系を確立した。しかしながら、この活性は、ゲル濾過で2つの画分に別れ、その後の解析は困難であった。

一般に、mRNAの分解において、ポリA鎖の除去は最初の段階であり、かつ律速段階であるとされる。SAMに反応したCGS1 mRNAの分解におけるポリA鎖の状態を、シロイヌナズナのカルス培養系を用いて解析した。CGS1 mRNA分解においては、mRNA分解中間体が蓄積するので、このような解析に有利である。その結果、CGS1 mRNA分解が誘導されない通常条件下では、CGS1 mRNAのポリA鎖は50-80塩基であったのに対し、CGS1 mRNA分解を誘導すると、ポリA鎖が140-150塩基のものと、10-30塩基のものが蓄積し、前者は切断前の全長mRNA、後者はmRNA分解中間体に対応していた(図3)。翻訳中のmRNAは、キャップ結合タンパク質とポリA結

合タンパク質の相互作用により環状構造をとっており、翻訳終結に伴ってポリA分解酵素がリクルートされると考えられている。翻訳停止した状態では、ポリA分解酵素がリクルートされないため、ポリA鎖が長いまま保たれると考えることができる。そして、いったんCGS1 mRNA分解が起ると、ポリA鎖が急速に分解されると考えられる(雑誌論文6)。

(3) シロイヌナズナ試験管内翻訳系の確立

芽生えから誘導した液体培養カルスを材料とした試験管内翻訳系(Arabidopsis Cell Extract: ACE)を確立した。ACEは、播種から1ヶ月で調製可能である。これにより、試験管内翻訳系を用いた研究にシロイヌナズナの遺伝学を導入可能にした(雑誌論文9)。

(4) リボソーム出口トンネルの変異の解析

出口トンネルを構成するL4タンパク質のβ-ループに変異を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナを構築した。シロイヌナズナは、L4AとL4Dの2つのL4遺伝子を持つ。L4Dのβ-ループ頂点の両側に欠失を導入し、C末端にFLAGタグを付けて、L4Dノックアウト株に導入した。Western解析等により、変異型リボソームが構築され、翻訳に与っていることを示した。

得られた植物からシロイヌナズナ試験管内翻訳系(雑誌論文9)を調製し、CGS1 mRNAを翻訳させた結果、SAMに反応した翻訳停止効率が対照株に比べて低下していた。一方、SAMに反応した翻訳停止に伴って、MTO1領域を含む新生ペプチドは、出口トンネル内で収縮したコンフォメーションを取る(雑誌論文10)。新生

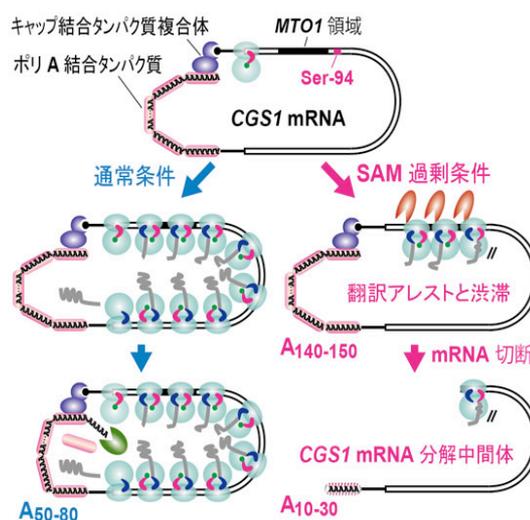


図3. CGS1 mRNA分解とポリA鎖

CGS1 mRNAのポリA鎖は、mRNA分解が誘導される条件では、通常条件よりも長い状態が保たれる。SAMに反応したmRNA分解に伴って急速に短縮化される(雑誌論文6)。

ペプチドのコンフォメーション変化を調べた結果、SAMに応答した新生ペプチドの収縮が起こりにくくなっていた。これらの結果は、SAMに応答したCGSI mRNAの翻訳停止に、リボソーム出口トンネルの狭窄部位が関与することを示している(投稿準備中)。

この他、新学術領域研究「植物環境突破力」の領域内の共同研究により、低温ストレス(雑誌論文7)およびホウ素応答機構(雑誌論文8)の研究を行った。また、領域外の共同研究により、メチオニン応答の数理解析(雑誌論文2)および上流ORFの検索と解析(雑誌論文4, 1)を行った。

<引用文献>

Chiba et al. (1999) *Science* 286: 1371-1374.

Suzuki et al. (2001) *Plant Cell Physiol.* 49: 1174-1180.

Ominato et al. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277: 36380-36386.

Chiba et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100: 10225-10230.

Onouchi et al. (2005) *Genes Dev.*, 19: 1799-1810.

Haraguchi et al. (2008) *Plant Cell Physiol.* 49: 314-323.

Onouchi et al. (2008) *Plant Cell Physiol.* 49: 549-556.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Ebina I, Takemoto-Tsutsumi M, Watanabe S, Koyama H, Endo Y, Kimata K, Igarashi T, Murakami K, Kudo R, Ohsumi A, Noh AL, Takahashi H, Naito S, Onouchi H* (2015) Identification of novel *Arabidopsis thaliana* upstream open reading frames that control expression of the main coding sequences in a peptide sequence- dependent manner. *Nucleic Acids Res.*, 43, 1562-1576. (査読有)

DOI: 10.1093/nar/gkv018

2. Sriyudthsak K, Sawada Y, Chiba Y, Yamashita Y, Kanaya S, Onouchi H, Fujiwara T, Naito S, Voit EO, Shiraishi F*, Hirai MY* (2014) A U-system approach for predicting metabolic behaviors and responses based on an alleged metabolic reaction network. *BMC Syst. Biol.*, 8, S4. (査読有)

DOI: 10.1186/1752-0509-8-S5-S4

3. Hagiwara-Komoda Y, Sugiyama T, Yamashita Y, Onouchi H, Naito S* (2014)

The N-terminal cleavable pre-sequence encoded in the first exon of cystathionine γ -synthase contains two different functional domains for chloroplast targeting and regulation of gene expression. *Plant Cell Physiol.*, 55, 1779-1792. (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcu110

4. Uchiyama-Kadokura N, Murakami K, Takemoto M, Koyanagi N, Murota K, Naito S, Onouchi H* (2014) Polyamine- responsive ribosomal arrest at the stop codon of an upstream open reading frame of the *AdoMetDC1* gene triggers nonsense-mediated mRNA decay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 55, 1556-1567. (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcu086

5. Yamashita Y, Kadokura Y, Sotta N, Fujiwara T, Takigawa I, Satake A, Onouchi H, Naito S* (2014) Ribosomes in a stacked array: elucidation of the step in translation elongation at which they are stalled during S-adenosyl- L-methionine-induced translation arrest of *CGSI* mRNA. *J. Biol. Chem.*, 289, 12693-12704. (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M113.526616

6. Yamashita Y, Lambein I, Kobayashi S, Onouchi H, Chiba Y, Naito S* (2013) A halt in poly(A) shortening during S-adenosyl- L-methionine-induced translation arrest in *CGSI* mRNA of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.*, 88, 241-249. (査読有)

DOI: 10.1266/ggs.88.241

7. Chiba Y*, Mineta K, Hirai MY, Suzuki Y, Kanaya S, Takahashi H, Onouchi H, Yamaguchi J, Naito S (2013) Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell Physiol.*, 54, 180-194. (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcs164

8. Tanaka M, Takano J, Chiba Y, Lombardo F, Ogasawara Y, Onouchi H, Naito S, Fujiwara T* (2011) Boron- dependent degradation of *NIP5;1* mRNA for acclimation to excess boron conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23, 3547-3559. (査読有)

DOI: 10.1105/tpc.111.088351

9. Murota K, Hagiwara-Komoda Y, Komoda K, Onouchi H, Ishikawa M, Naito S* (2011) *Arabidopsis* cell-free extract, ACE, a new in vitro translation system derived from *Arabidopsis* callus cultures. *Plant Cell Physiol.*, 52, 1443-1453. (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcr080

(μ /m の間違いあり:Erratum in *Plant Cell Physiol.* 53, 602, 2012)

10. Onoue N, Yamashita Y, Nagao N, Goto DB,

Onouchi H, Naito S* (2011) S-Adenosyl-L-methionine induces compaction of nascent peptide chain inside the ribosomal exit tunnel upon translation arrest in the *Arabidopsis CGSI* gene. *J. Biol. Chem.*, 286, 14903-14912. (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M110.211656

[学会発表] (計42件)

1. Yamashita Y, Kadokura Y, Sotta N, Fujiwara T, Satake A, Takigawa I, Onouchi H, Naito S: Ribosomes stack and are arrested at the early step of translocation upon S-adenosyl-L-methionine-induced translation arrest of *Arabidopsis CGSI* mRNA. *FASEB Science Research Conference, Post-transcriptional Control of Gene Expression: Mechanisms of mRNA Decay*. 2014年7月6日-11日, Big Sky (Montana, USA)
2. 山下由衣, 尾上典之, 室田克典, 青野志郎, 大橋悠文, 長谷川傑, 中嶋一恵, 尾之内均, 内藤 哲: 栄養センサーとしてのリボソーム: シロイヌナズナにおけるメチオニン生合成のフィードバック制御. **第54回 日本植物生理学会年会**, 2013年3月21日-23日, 岡山大学(岡山県・岡山市) (招待講演)
3. 内藤 哲: メチオニン生合成制御を基軸とした新規転写後制御機構の研究. **第30回 日本植物細胞分子生物学会大会**, 2012年8月3日-5日, 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市) (日本植物細胞分子生物学会学術賞受賞講演)
4. Yamashita Y, Kadokura Y, Onouchi H, Naito S: Autonomously arrested ribosome and those stacked behind it are in different states during translation elongation arrest induced by S-adenosyl-L-methionine in *Arabidopsis CGSI* mRNA. *23rd International Conference on Arabidopsis Research*, 2012年7月3日-7日, Vienna (Austria)
5. Onoue N, Yamashita Y, Murota K, Aono S, Tajima Y, Hasegawa S, Nakajima K, Onouchi H, Naito S: Nascent peptide-mediated translation arrest of *Arabidopsis CGSI* mRNA that occurs in response to S-adenosyl-L-methionine. **第34回 日本分子生物学会年会**, 2011年12月13日-16日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) (招待講演)
6. Onoue N, Yamashita Y, Goto D, Onouchi H, Naito S: Conformation changes of the ribosome-nascent peptide complex that occurs during S-adenosyl-L-methionine-induced translation arrest of *Arabidopsis CGSI* mRNA. *16th Annual Meeting of the RNA Society*, 2011年6月14日-18日, 京都

国際会議場 (京都府・京都市).

[図書] (計1件)

1. Yamashita Y, Onoue N, Murota K, Onouchi H, Naito S* (2014) Translation elongation arrest induced by S-adenosyl-L-methionine-sensing nascent peptide. In "*Regulatory Nascent Polypeptides*", Ed. Ito K, 187-201. Springer, Tokyo. (査読無, 招待論文)
ISBN 978-4-431-55052-5

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/arabi/>

(旧サーバーの故障により, コンテンツを順次移行中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 哲 (NAITO, Satoshi)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号:20164105

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし