

rRNA 前駆体プロセッシングにおける AAA-ATPase NVL2 による
WDR74 モジュールの機能的制御

Functional Regulation of the WDR74 Module by AAA-ATPase NVL2 in
Pre-rRNA Processing

令和 4 年度入学

廣岡 侑也 (Hirooka, Yuya)

目次

略語	3
序論	4
実験材料および方法	
1. 細胞培養およびトランスフェクション	8
2. 抗体	9
3. 免疫沈降法およびウエスタンブロッティング	9
4. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) およびデータ解析	11
5. ショ糖密度勾配遠心を用いたリボソーム分画	12
6. RNA の抽出およびノーザンブロッティング	13
7. 細胞分画 (PSE 法)	15
実験結果	
1. ATP 加水分解欠損変異型 NVL2 に特異的な新規結合タンパク質群の同定	16
2. WDR74 モジュールと MTR4-RNA エキソソームの結合解析	17
3. リボソームサブユニット形成における WDR74 モジュールの機能	18
4. rRNA 前駆体プロセッシングにおける WDR74 モジュールの機能	19
5. NVL2 による WDR74 モジュール核内分布の制御	21
6. NVL2 による WDR74 および PICT1 と MTR4-エキソソームとの相互作用制御	22
7. 核小体ストレス応答における WDER74 モジュールの機能	23

考 察	25
参 考 文 献	30
謝 辞	37
図 表	38

略語

3'ETS	3'-external transcribed spacer
5'ETS	5'-external transcribed spacer
AAA	ATPase associated with various cellular activities
DFC	dense fibrillar component
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dox	doxycycline
DTT	dithiothreitol
FC	fibrillar center
GC	granular component
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ITS1	internal transcribed spacer 1
ITS2	internal transcribed spacer 2
NP-40	Nonidet P-40
NVL2	Nuclear VCP-like protein 2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PSE	preribosome sequential extraction
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PSM	peptide-spectrum match
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS-T	Tris-buffered saline containing Tween 20
WT	wild type

序論

真核生物のリボソームは、約 80 種類のタンパク質と 4 種類の rRNA (18S、5.8S、28S、5S)から構成される巨大な RNA-タンパク質複合体であり、生命活動にとって最も基本的なタンパク質合成を担う装置として機能している⁽¹⁾。ヒトを含む高等真核生物のリボソームでは、3 種類の rRNA (5.8S、28S、5S)と 48 種類のリボソームタンパク質から構成される 60S 大サブユニット、および 18S rRNA と 33 種類のリボソームタンパク質から構成される 40S 小サブユニットがそれぞれ独立に形成された後、それらが会合して 80S リボソームが形成され、細胞質においてタンパク質の翻訳を担う (Fig.1)。リボソームの生合成は、細胞の増殖や機能制御とも密接に関連している。近年では、リボソームの立体構造や生合成機構に関しても様々な知見が示されつつある。しかし、ヒトを含めた高等真核生物におけるリボソームの生合成機構については、十分な理解に至っていない。

動物細胞におけるリボソーム生合成は、主に核小体で進行し、RNA ポリメラーゼ I により長鎖の前駆体 rRNA (47S pre-rRNA) の転写により開始される。47S pre-rRNA は、28S、18S および 5.8S rRNA の配列を含む領域と、それらの両端および中間に存在する 4 か所のスペーサー領域 (5'-ETS、ITS1、ITS2、3'-ETS) から構成される。その後、47S pre-rRNA はエンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼによる多段階のプロセッシングを経て、成熟型の 18S、5.8S、および 28S rRNA が形成される^(2,3)。rRNA 前駆体のプロセッシング経路では、外部転写スペーサー領域 (5'-ETS および 3'-ETS) と内部転写スペーサー領域 (ITS1 および ITS2) が一連の切断とトリミングを受ける。このプロセッシングにおける主要な経路では、90S リボソーム前駆体粒子に含まれる 47S pre-rRNA が、32S 中間体 rRNA および 30S 中間体 rRNA へと分割され、それぞれ 60S リボ

ソーム前駆体粒子および 40S リボソーム前駆体粒子を構成する RNA となる。その後、60S リボソーム前駆体粒子においては、32S 中間体 rRNA から 28S および 5.8S rRNA がプロセッシングにより形成される。また、40S リボソーム前駆体粒子においては、30S 中間体 rRNA から 18S rRNA が形成される。さらにこれらとは独立して、5S rRNA が RNA ポリメラーゼ III によって転写された後に、60S リボソーム前駆体粒子へと組み込まれる。これらのリボソーム前駆体粒子は、核小体から核質を経て最終的には細胞質へと移動しながら成熟リボソームへと変換される。また、リボソーム前駆体粒子が核小体から核質へと移行していく過程では、多数の snoRNA およびリボソーム生合成タンパク質（トランス作用因子）との秩序立った相互作用が必要になる。この成熟過程には、様々な RNA 修飾酵素、RNA ヘリカーゼ、ATPase、GTPase やヌクレアーゼ等、エネルギー依存性のリモデリング因子を含む 200 種類以上のリボソーム生合成因子が関与している⁽⁴⁾。これらの生合成補助タンパク質の機能については、酵母を対象とした研究において詳細な知見が得られてきた。しかし、リボソーム生合成と関連した多細胞生物特有の生体調節機構や疾患機序の理解にとって重要なヒト細胞においては、未だ研究がほとんど手付かずの状態に残されている⁽¹⁾。

真核細胞のリボソーム生合成過程において、rRNA 前駆体のプロセッシングに主要な役割を果たすリボヌクレアーゼ複合体として、RNA エキソソームが存在する。RNA エキソソームは、補助因子として機能する様々な RNA 結合タンパク質とともに複合体を形成し、基質 RNA の 3'末端の分解またはプロセッシングを担い、細胞内 RNA の品質管理や制御に関与している。RNA エキソソームは核と細胞質においてそれぞれ機能し、9 個の非触媒サブユニットから構成されるコアエキソソームと、これらに選択的に結合する複数の触媒サブユニットから構成される。核質および細胞質においては、DIS3 (RRP44)が触媒サ

ブユニットとして機能している。一方、核小体においては、触媒サブユニットとして RRP6 が機能し、さらに補助因子として RNA ヘリカーゼである MTR4 と相互作用することにより、MTR4-エキソソーム複合体を形成し、rRNA 前駆体のプロセッシングに加え、snRNA や snoRNA など様々な核内 RNA の形成や分解に機能している⁽⁵⁻⁷⁾。また、rRNA 前駆体プロセッシングの後期段階では、MTR4 とアダプター因子 PICT1 とが結合することによって、MTR4-エキソソーム複合体が 5.8S rRNA 前駆体の 3'末端へとリクルートされ、5.8S rRNA の最終形成が促される⁽⁸⁻¹¹⁾。

細胞内において分子複合体の構造や機能の制御に重要な役割を果たすシャペロン様分子として、AAA (ATPase associated with diverse cellular activity) ファミリータンパク質が存在する。Nuclear VCP-like protein 2 (NVL2) は核小体に局在するシャペロン様 ATPase であり、AAA ファミリーII 型に属する⁽¹²⁾。II 型 AAA-ATPase は、N末端ドメインおよび分子間で保存性の高い二つの ATPase ドメイン(D1 および D2)の3つの構造ドメインによって特徴づけられる^(13,14)。NVL2 は、II 型 AAA-ATPase として最も解析の進んだ VCP/p97 と極めて高いアミノ酸配列相同性を示すが、それらの一般的な機能は様々な細胞内プロセスにおいて高分子複合体に作用しエネルギー依存性の解離反応へと導くことと考えられている⁽¹⁵⁾。分子シャペロンとして機能する NVL2 は、核内で RNA エキソソームおよびMTR4ヘリカーゼを含むRNAプロセッシング複合体MTR4-エキソソームと相互作用し、この複合体から ATP 加水分解依存的にリボソーム生合成因子 WD repeat-containing protein 74 (WDR74) を脱会合させ、60S リボソーム形成を促進する^(5,16-18)。WDR74 は 60S リボソーム形成の必須因子として知られている他、WDR74 のノックダウンにより、がん抑制タンパク質である p53 の細胞内蓄積を通して細胞増殖が抑制されることも報告されている⁽¹⁹⁾。分子内に存在する2か所の ATPase ドメインにおいて、ATP の加水分

解に必須の保存アミノ酸配列をともに置換したドミナントネガティブ変異型 NVL2 (E365Q/E682Q) は、MTR4-エキソソーム複合体からの WDR74 の脱会合を阻害することにより、リボソーム生合成を抑制できると考えられているが、その制御メカニズムやリボソーム生合成の抑制に至る分子機序は未だ解明されていない⁽¹⁸⁾。そこで、本研究では、リボソーム生合成経路における MTR4-エキソソーム複合体の機能制御において、NVL2 が果たす分子機能を詳細に明らかにするために、ATP 加水分解能が欠損した NVL2 と選択的な相互作用を示すタンパク質群を探索し、それらのリボソーム生合成における機能解明を試みることにした。

実験材料および方法

1. 細胞培養およびトランスフェクション

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞またはヒト結腸がん由来 HCT116 細胞は、10% ウシ胎児血清、および 0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン混合液 (Wako) を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Wako) を用いて、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

ドキシサイクリン (Dox) 誘導による FLAG-6xHis タグ付き NVL2 (WT または E365Q/E682Q 変異体) の安定発現細胞株を作製するために、PCR で増幅した cDNA を pcDNA5/FRT/TO (Thermo Fisher Scientific) に挿入し、pcDNA5/FRT/TO-NVL2 (WT または E365Q/E682Q) -FLAG-6His を作製した。Flp-In T-REx-293 細胞に pcDNA5/FRT/TO-NVL2 (WT または E365Q/E682Q) -FLAG-6His および pOG44 (Thermo Fisher Scientific) を同時にトランスフェクションし、100 µg/mL ハイグロマイシン B (Wako)、15 µg/ml ブラストサイジン S (フナコシ)、200 µg/ml G418 (Wako)、10% ウシ胎児血清、および 0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン混合液を添加した DMEM を用いて培養した。Strep-tag II タグ (-str) 付加 NVL2 (E365Q/E682Q 変異体) の Dox 誘導発現が可能な Flp-In T-REx-293 細胞は、先行研究で作製したものを用了⁽¹⁸⁾。

プラスミド DNA の一過性発現では、培地 1 ml に対し、PEI-MAX 3.6 µl、opti-MEM 200 µl、およびプラスミド DNA (1.3 µg) を混合し、血清および抗生物質を含まない DMEM に添加し、その後 48 時間培養した。

siRNA のトランスフェクションにはリポフェクション法を用い、

培地 1ml に対し、siLentFect 試薬 (BIO-RAD) 4 μ l、opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 200 μ l、および siRNA (終濃度 20 nM) を混合し、血清および抗生物質を含まない DMEM に添加した。添加後 24 時間で、再度同様にトランスフェクションを行い (培地は新しく交換した)、さらに 3 時間後に 1 μ g/ml Dox を添加し、その後 48 時間培養した。ノックダウン実験に使用した siRNA の配列は以下の通りである。

siWDR74: 5'-GGGAUUCUCAGAGUCUGGCAUGACA-3'

siRPF1: 5'-ACACUUA AUGUUCACGCGGUGGAAA-3'

siMAK16: 5'-GGAGAGACUGAAACAAGAUACGUAAU-3'

siRRP1: 5'-GCUGGGAAGAAAGACAGAU CGAGGA-3'

siMTR4: 5'-GGGAAUUAACAUGCCAGCUAGAACU-3'

2. 抗体

ウエスタンブロッティング用いた 1 次抗体および 2 次抗体は、Table. 1A および Table. 1B にそれぞれ示した。

3. 免疫沈降およびウエスタンブロッティング

Φ 100mm ディッシュで培養した細胞を、1 ml Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$ 、2 mM EDTA、0.5% NP-40、10% グリセロール、2 mM ATP、10 μ g/ml ロイペプチン、7 μ g/ml ペプスタチン、5.3 μ g/ml アプロチニン、15 μ g/ml ベスタチン、50 μ g/ml E64、1 mM PMSF) を用いて 1.5 ml チューブに回収した。これらのチューブを 4°C で 20 分間転倒混和し、Bioruptor UCD-300 (COSMO BIO) を用いて 20 秒間のソニケーションを 5 回 (強度 :

Middle、インターバル 30 秒間) 行い、その後、4°C、14,000 rpm で 30 分間遠心分離した。得られた上清のタンパク質量を揃え、坑 FLAG 抗体固定化ビーズ (Wako) を 20 μ l (50%スラリー) 添加し、4°Cで 2 時間転倒混和した。その後、上清のタンパク質の一部を Input とした。次に、ビーズを Wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、2 mM EDTA、10% グリセロール、0.05% NP-40、2 mM ATP、1 mM PMSF)で 4 回洗浄した。ビーズに Sample buffer を添加し、電気泳動用のサンプルとした。

タンパク質の分離は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) により行った。泳動サンプルには 2×Sample buffer を添加し、95°Cで 3 分間加熱処理した。SDS-PAGE 用の分離ゲルは、アクリルアミド濃度を 11.5% で調整した。タンパク質の分子量マーカーとして WIDE-VIEW prestained Protein Size Marker III (Wako) を用い、電気泳動後のタンパク質を Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後、0.3%スキムミルク/Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBS-T; 20 mM Tris-HCl pH7.6、137 mM NaCl、0.5% Tween 20)を用いてブロッッキングを 1 時間行った。続いて 1 次抗体と室温で 1 時間反応させた後洗浄し、HRP 標識 2 次抗体とさらに 1 時間反応させた。その後、Ez WestLumi (ATTO) または ImmunoStar Long Detection (Wako) と反応させ、化学発光検出用 CCD カメラ FusionSL4 を用い、タンパク質のバンドを検出した。

4. 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) および データ解析

NVL2 (WT または E365Q/E682Q)-FLAG-6xHis を発現誘導可能な Flp-In T-REx-293 細胞 (Φ 150mm ディッシュ 4 枚で培養)を 0.1 μ g/mL Dox で 24 時間処理後、3mL の回収バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、0.5 % IGEPAL CA-630、5 mM MgCl₂、2 mM ATP、2 mM EDTA、10 μ g/mL ロイペプチン、1 μ g/mL ペプスタチン、1 μ g/mL アプロチニンおよび 1 mM PMSF) で回収し、氷上で 10 分間静置した。その後、4°C、20,000 $\times$ g で 30 分間遠心分離した。上清を細胞抽出物として回集し、12 mg のタンパク質を含む細胞抽出液を 20 μ L の抗 FLAG M2 ビーズ (Sigma-Aldrich) とともに 4°C で 2 時間転倒混和した。次に、ビーズを 1 mL の回収バッファーで 5 回洗浄し、30 μ L の溶出バッファー (50 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、0.5 % IGEPAL CA-630、2 mM EDTA、および 0.5 μ g/mL FLAG ペプチド、Sigma-Aldrich)を加え氷上で 10 分間静置した。溶出液から、Ultrafree-MC GV カラム (Merck Millipore) を使用してアフィニティービーズを除去し、NVL2-FLAG 結合タンパク質を回収した。

NVL2-FLAG 結合タンパク質を、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離し、コロイド CBB 染色キット (TEFCO) を用いて各サンプルのバンドを染色した。次に、ゲルのバンド領域全体を分割して切り出し、DTT、ヨードアセトアミドおよび Trypsin/Lys-C Mix (Promega) を用いてゲル内消化を行った。得られたペプチドを、Q Exactive Orbitrap ハイブリッド質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いた LC-MS/MS により分析した⁽²⁰⁾。

LC-MS/MS 分析により得られたタンデム MS データは、Proteome Discoverer (Ver 3.0、Thermo Fisher Scientific) を使用して Mascot 互換形式に変換した。MASCOT v.2.3.02 (Matrix Science KK) を使用して、UniProt Human プロテオームデータベース (proteome ID : UP000005640、taxon ID : 9606) に対して検索を行った。検索パラメータは、カルバミドメチルシステインの固定修飾、N 末端のアセチル化、Gln-> pyro-Glu (N 末端グルタミン) および酸化メチオニンの可変修飾、最大 3 回の切断ミス、ペプチド質量許容誤差 ± 25 ppm、および MS/MS 許容誤差 ± 0.8 Da に設定した。ペプチド同定基準は、ベンダー定義 ($P < 0.05$ 、Matrix Science KK) に基づいた⁽²⁰⁾。さらに、候補とみなされたタンパク質の評価には、以下の基準を適用した。(i) ペプチド候補が 2 つ未満のタンパク質は候補から除外。(ii) 3 回の独立した実験のうち 1 回でも検出されなかったタンパク質は候補から除外。(iii) 3 回の独立した実験で平均ペプチドスペクトル一致数 (PSM) が 4 未満のタンパク質は候補から除外。(iv) コントロール細胞 (Dox 未処理) で検出されたタンパク質は、NVL2 (WT または E365Q/E682Q) 発現細胞で PSM 数が 2 倍以上増加しない限り、候補から除外。各タンパク質の平均 PSM 数は、NVL2(WT) と NVL2(E365Q/E682Q) 間で比較を実施した。

5. ショ糖密度勾配遠心を用いたリボソーム分画

$\Phi 60$ mm ディッシュに培養した Flp-In T-REx-293 細胞からリボソームを抽出するため、終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミドを添加しインキュベーターで 10 分間培養した。ディッシュを PBS で洗浄後、回収 buffer $500 \mu\text{l}$ [$20 \text{ mM Tris-HCl pH } 7.4$ 、 130 mM KCl 、 10

mM MgCl₂、2.5 mM DTT、0.5% NP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、10 µg/ml シクロヘキシミド、200 mg/ml ヘパリン、40 U/ml RNase inhibitor (Nacalai Tesque)]で回収し、氷上で15分間静置した。12,000 rpm で10分間遠心分離し、その上清をサンプルとした。スクロース液（10%または40%スクロース、10 mM Tris-HCl pH 7.4、60 mM KCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT）を作製し、グラジエントマスター (BIOCOMP)を用いてショ糖密度勾配(10%-40%で1本あたり約12 ml)を作製し、抽出した上清画分を重曹して36,000 rpm、4°Cで3時間超遠心(swing rotor P40ST、日立)を行い、リボソームの各サブユニットを分離した。遠心後のグラジエント溶液を Triax Flow Cell (BIOCOMP)を用いて吸収波長 260 nm で測定し、リボソームサブユニットの性状を調べた。

6. RNA の抽出およびノーザンブロッティング

Φ60 mm ディッシュに培養した HeLa 細胞を PBS で洗浄した後、500 µl のセパゾール(Nacalai Tesque)により回収した。サンプルにクロロホルム 200 µl を加え、ボルテックスミキサーでよく混和し、氷浴で3分静置後 4°C 14,000 rpm で15分間遠心分離を行った。上清を新しい 1.5 ml チューブに移してクロロホルム 200 µl を加え、ボルテックスミキサーでよく混和した。その後 4°C 14,000 rpm で2分間遠心分離した。上清を新しい 1.5ml チューブに移し、2-プロパノール 500 µl を加え、ボルテックスミキサーでよく混和し、氷浴で10分間静置した。その後 4°C 14,000 rpm で10分間遠心分離した。チューブの底に沈殿した RNA を残して上清をデカントで除去した。その後冷 70%エタノール 500 µl を加えリンスした後、4°C 14,000

rpm で 5 分間遠心分離した。チューブに沈殿した RNA を残してデカントで上清を除去し、TE buffer (Tris-HCl, pH8.0 1 mM、EDTA 0.1 mM) を加えタッピングおよびボルテックスにより RNA を溶解した。抽出した RNA は 0.75%変性アガロースゲルで泳動分離した。泳動後のゲルを RNase free の Milli Q 水で洗浄し、キャピラリー法を用いて RNA をナイロンメンブランに転写した。転写したメンブラン上の RNA を UV 照射 (UV cross-linker CX-2000) によりクロスリンクし、ExpressHyb Hybridization Solution (Takara Bio) を用いて 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。オリゴヌクレオチドプローブは Bioprobe 3'-Oligonucleotide Labeling kit (Enzo Life Sciences) を用いてビオチン標識した。ExpressHyb Hybridization Solution とプローブを混和した液とメンブランをメンブランのサイズに合わせてカットしたハイブリ・バックに封入し、42℃で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブランを Wash Solution 3 (2×SSC, 0.1%SDS) で室温にて 30 分間、Wash Solution 2 (0.1×SSC, 0.1%SDS) で 42℃ 30 分間×2 回洗浄した。その後、Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、blocking buffer (キットに添付) で室温、15 分間ブロッキングし、Streptavidin-HRP (300 倍希釈、キットに添付) を添加して 15 分間室温で反応させた。さらに、Wash buffer (キットに添付) で室温、5 分間 ×4 回洗浄し、Substrate Equilibration buffer (キットに添付) で 5 分間メンブランを振とう後、検出試薬 (Luminol/Enhancer Solution と Stable Peroxide Solution を等量混合 (キットに添付)・添加し 5 分間静置して反応させた。シグナルの検出は化学発光検出用 CCD カメラ Fusion SL4 を用いて

行った。rRNA 前駆体の検出に用いたプローブの配列は以下の通りである。

ITS1: 5'-AACGCGCTAGGTACCTGGACGG-3'

ITS2: 5'-ACGCCGCCGGGTCTGCGCTTA-3'

7. 細胞分画（PSE 法）

細胞分画（PSE 法）は、Neito らのプロトコルを参考に一部変更を加えて行った⁽²¹⁾。具体的には SN1 バッファーの組成を 0.05% NP-40 から 0.01% NP-40 に変更した。Φ100 mm ディッシュに培養した Flp-In T-REx-293 細胞を PBS で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤を含む SN1 バッファー（20 mM HEPES-NaOH pH 7.5、130 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.01% NP-40、40 U/ml RNase inhibitor およびプロテアーゼ阻害剤 [免疫沈降法の buffer 組成を参照]）を 500 μl 加えてよく懸濁し、4℃、3,800 rpm で 3 分間遠心分離した。上清を SN1 画分として分取し、残った沈殿物を SN1 バッファーで洗浄後、SN2 バッファー（10 mM HEPES-NaOH pH 7.5、10 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.1% NP-40、0.5 mg/ml heparin、40 U/ml RNase inhibitor およびプロテアーゼ阻害剤）300 μl で再懸濁し、100 U DNaseI を加え、室温で 10 分間静置し、その後、4℃、11,500 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を SN2 画分として分取し、残った沈殿物を SN3 バッファー（20 mM HEPES-NaOH pH 7.5、200 mM NaCl、4 mM EDTA、0.1% NP-40、0.04% デオキシリコール酸ナトリウム、4 mM imidazole、0.1 mg/ml heparin、1 mM DTT およびプロテアーゼ阻害剤）400 μl で再懸濁し、室温で 20 分間インキュベートした。その後、4℃、11,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を SN3 画分とした。

実験結果

1. ATP 加水分解欠損変異型 NVL2 に特異的な新規結合タンパク質群の同定

先行研究において、ATP 加水分解能を欠損したドミナントネガティブ変異体 NVL2(E365Q/E682Q)を細胞内に発現させると、MTR4-エキソソーム複合体に WDR74 が蓄積され、その後、初期段階の rRNA 前駆体プロセッシングと 60S リボソーム生合成が阻害されることが明らかにされている^(5,22)。本研究では、リボソーム生合成過程において NVL2 が MTR4-エキソソーム複合体から WDR74 を解離させることにより、rRNA 前駆体のプロセッシングが制御されるメカニズムを解明するために、野生型 NVL2 と比較して変異型 NVL2(E365Q/E682Q)と優位に相互作用するタンパク質を網羅的に探索することを試みた。まず最初に、FLAG タグ付加 NVL2 (WT または E365Q/E682Q) をベイトとして共免疫沈降を行い、相互作用タンパク質を LC-MS/MS で分析した。NVL2 との相互作用が知られている MTR4 や RNA エキソソームのサブユニット群は、野生型および E365Q/E682Q 変異型の NVL2 と同程度の相互作用を示した (Fig. 3A)。さらに、リボソーム生合成因子を含む複数のタンパク質群では、ATP 加水分解能欠損型 NVL2(E365Q/E682Q)とより強い結合を示した (Fig. 3B、Table. 2)。それらの中で、核小体タンパク質 RPF1、MAK16、RRP1 および過去の研究で同定された WDR74 が、変異型 NVL2 に対して特に強い結合を示した (Fig. 3C)。WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 は真核生物で広く保存されており、それらの酵母ホモログである Nsa1、Rpf1、Mak16 および Rrp1 は、リボソ-

ム前駆体粒子の構成因子の一部として、Nsa1 モジュールと呼ばれる複合体を形成し、60S リボソーム生合成の初期段階に関与することが報告されている⁽²³⁾。しかし、酵母 Nsa1 モジュールがリボソーム生合成において果たす機能や制御に関する知見はほとんど得られていない。本研究では、ヒト細胞において WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 の 4 つのタンパク質が Nsa1 モジュール様の複合体を形成してリボソーム生合成に機能しているのではないかと予想し、これらにより形成される複合体を WDR74 モジュールと呼ぶことにし、そのリボソーム生合成における機能を解明することとした。まず、これらのタンパク質群と変異型 NVL2 との相互作用を確認するため、FLAG タグ付加 NVL2 (野生型または E365Q/E682Q 変異型)をベイトとして HEK293 細胞に一過的に発現させ、共免疫沈降による結合解析を行った (Fig. 3D)。その結果、エキソソーム構成因子である RRP6 および RRP4 は、変異型と野生型で NVL2 との結合に変化は見られなかったのに対して、WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 は、いずれも ATPase 欠損型 NVL2 のみと明確な相互作用を示すことが確認された。

2. WDR74 モジュールと MTR4-RNA エキソソームの結合解析

NVL2(E365Q/E682Q)発現誘導に際して、RPF1、MAK16、RRP1 が WDR74 と同様に MTR4-エキソソーム複合体中に蓄積される可能性について検証するために、変異型 NVL2 の発現下または非発現下 (Dox 処理)において FLAG タグ付加 MTR4 を HEK293 細胞に安定発現させ、共免疫沈降を行った (Fig. 4A)。その結果、WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 は、いずれも変異型 NVL2 発現によって FLAG-

MTR4 との結合増加を示した。次に、WDR74-FLAG をベイトとして共免疫沈降を行った場合には、NVL2 の活性状態に関わらず RPF1、MAK16 および RRP1 は WDR74-FLAG と同様に結合を示した (Fig. 4B)。この結果から、NVL2 の ATPase 活性を介した WDR74、RPF1、MAK16、および RRP1 の MTR4 との相互作用制御とは対照的に、WDR74 モジュールの構成因子の間の相互作用は NVL2 活性による制御を受けないことが示された。次に、WDR74 モジュールを構成するそれぞれのタンパク質が、MTR4 との相互作用において果たす機能について検討を行うために、WDR74 モジュールを構成する各タンパク質を siRNA を用いてノックダウンし、他の WDR74 モジュール構成因子と FLAG-MTR4 との結合を解析した (Fig.5)。その結果、WDR74、RPF1 および MAK16 をそれぞれノックダウンした場合には、他のモジュール構成タンパク質と MTR4 との結合も大きく減少を示した。一方、RRP1 をノックダウンした場合には、その影響は微弱であった。これらの結果から、WDR74 モジュールを構成するそれぞれのタンパク質は、モジュール全体が MTR4 と結合するために必要であるが、RRP1 は他の因子と比べてその寄与が小さいと考えられた。

3. リボソームサブユニット形成における WDR74 モジュールの機能

先行研究において、pre-rRNA プロセッシングの初期段階において WDR74 が機能し、45S pre-rRNA が ITS1 の site 2 で切断される過程に関与することにより、60S リボソームの形成に寄与することが示されている⁽²²⁾。RPF1、MAK16 および RRP1 も同様にリボソーム生合成において機能しているかを調べるために、siRNA を用いて各

タンパク質をノックダウンし、ショ糖勾配遠心法により各リボソームサブユニットを分離し、60S および 40S リボソームサブユニットを示す吸光度のピーク比 (60S/40S) を指標とした解析を行った (Fig.6)。その結果、コントロールの未処理細胞 (60S/40S=1.83) と比較して、NVL2 (E365Q / E682Q) 変異体の発現下 (60S/40S=0.77) および WDR74 のノックダウン (60S/40S=0.83) によって、60S リボソームサブユニットの著しい減少が観察された⁽²²⁾。また、RPF1、MAK16 および RRP1 をノックダウンした場合においても (RPF1 : 60S/40S=1.05、MAK16 : 60S/40S=0.94、RRP1 : 60S/40S=1.50) 同様に減少傾向が見られた。この結果から、RPF1、MAK16 および RRP1 も、WDR74 と同様に 60S リボソームの生合成に寄与することが示された。しかし、RRP1 のノックダウンによるリボソームサブユニットの減少は、他の因子のノックダウンと比較すると軽微であった。この結果は、RRP1 をノックダウンした際に MTR4 と他のモジュール構成因子への影響が軽微であったことと相関を示すものであった (Fig.5)。

4. rRNA 前駆体プロセッシングにおける WDR74 モジュールの機能

ヒト細胞のリボソームの生合成では、リボソーム前駆体粒子の成熟にともなって、rRNA 前駆体のプロセッシングが進行する。最初に核小体において RNA ポリメラーゼ I により 47S rRNA 前駆体が転写された後、様々な rRNA 中間体の形成を経て最終的に 18S、5.8S および 28S rRNA へと成熟する。この rRNA プロセッシング過程において、MTR4-エキソソームは複数の段階で 3'末端から RNA のトリミングに関与することが知られている (Fig.7)。WDR74 モジュール

の構成因子がいずれも 60S リボソームの形成に関与することから、これらのタンパク質は rRNA 前駆体のプロセッシングにおいて同様に機能することが予想された。そこで次に、WDR74 モジュールの各構成因子が rRNA 前駆体のプロセッシング経路に及ぼす影響を解析した。HeLa 細胞において、WDR74 モジュールの各構成タンパク質をノックダウンし、rRNA 前駆体のプロセッシング過程における主要な中間体 RNA を、ITS1 または ITS2 配列に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロッティングにより検出した (Fig.8)。その結果、WDR74 モジュールの各構成タンパク質をノックダウンした細胞では、いずれにおいても 30S、21S および 12S 中間体 RNA が減少するとともに、正常な細胞ではほとんど観察されない 36S 中間体 RNA の蓄積が確認された。通常、ヒト細胞の rRNA 前駆体プロセッシング経路では、ITS1 領域の site 2 が優先的に切断されることにより rRNA 前駆体の成熟が進行する (Fig.7、右の経路)。一方、プロセッシング異常により site 2 での切断が抑制された場合、隣接する site E での代替的切断が生じ、36S 中間体 RNA が生成することが知られている (Fig.7、左の経路)^(20,24)。WDR74 モジュールの構成タンパク質が枯渇したことにより、ITS1 における site 2 での切断が阻害され、代わりに site E での切断が亢進したと考えられる。以上の結果より、WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 は、60S リボソーム生合成過程の rRNA 前駆体プロセッシング経路において、複合体として共通の機能段階に寄与しているものと考えられた。

5. NVL2 による WDR74 モジュールの核内分布の制御

核小体は、rRNA 前駆体の転写の場である **fibrillar center (FC)** を中心に、その周囲を初期段階の rRNA プロセッシングが行われる **dense fibrillar component (DFC)** と後期段階の rRNA プロセッシングやリボソーム前駆体粒子リモデリングが行われる **granular component (GC)** が取り囲む 3 層構造から構成される。リボソーム前駆体粒子が、この 3 つの領域の間を成熟にともなって移動することによってリボソーム生合成が進行する⁽²⁵⁾。先行研究では、NVL2(E365Q/E682Q)変異体を細胞内で発現させることによって、WDR74 が難溶性の核小体画分から可溶性の高い核小体/核質画分へと移行することが示されている⁽²²⁾。そこで、WDR74 モジュールを構成する RPF1、MAK16、RRP1 および WDR74 の核内分布が変異型 NVL2 の発現により影響を受けるかを検証することとした。そのために、Nieto らが開発したプレリボソームの異なる成熟段階を単離する新たな細胞分画法 (PSE 法) を部分的に改変して用いた⁽²¹⁾。本手法では、細胞質成分を含む SN1 画分、核質および GC 辺縁部を含む SN2 画分、GC 内部、DFC および FC を含む SN3 画分を分取し、それぞれの画分をウェスタンブロッティングにより解析した (Fig.9 A)。その結果、WDR74 モジュール構成タンパク質は主に核小体の中心部を含む SN3 画分に分布が見られるが、変異型 NVL2 の発現下では、核小体の周辺部を含む SN2 画分へと分布の変化を示した (Fig.9 B)。一方、このような核内分布の変化は DFC に局在する核小体マーカーであるフィブリラリンにおいては観察されなかった。この結果から、リボソーム前駆体の成熟にともなって核小体の中心から外周部まで移動した WDR74 モジュールの構成因子は、NVL2 の ATP 加水分解活と共

役して DFC まで送り返されることが示唆された。

6. NVL2 による WDR74 および PICT1 と MTR4-エキソソームとの相互作用制御

MTR4-エキソソーム複合体は、rRNA プロセッシング経路の後期段階において rRNA 中間体の 3'末端をトリミングし、成熟 rRNA の形成に必須のヌクレアーゼ複合体として機能している⁽¹⁰⁾。核小体に局在するリボソーム生合成因子 PICT1 は、MTR4-エキソソーム複合体を 12S 中間体 RNA の 3'末端へとリクルートするためのアダプターとして機能し、5.8S rRNA の成熟化に寄与する⁽¹¹⁾。また、臨床研究においては、PICT1 はがん進展因子として様々ながん種の予後マーカーとして注目されている⁽²⁶⁻²⁸⁾。そこで、PICT1 と MTR4 の結合が、変異体 NVL2 (E365Q / E682Q) の発現によりどのような影響を受けるかを検討した。Dox 処理により NVL2 (E365Q / E682Q) 変異体を発現誘導し、トランスフェクションにより発現させた FLAG-MTR4 をベイトとして共免疫沈降法およびウエスタンブロッティングを行った (Fig.10 A)。その結果、FLAG-MTR4 は、Dox 処理の時間に依存して WDR74 との結合増加を示す一方で、PICT1 との結合は減少傾向を示した。しかし、FLAG-MTR4 と RNA エキソソームのサブユニットである RRP6 および RRP4 との結合には影響が見られなかった。また、FLAG-PICT1 をベイトとして同様の共免疫沈降を行なった場合にも、NVL2(E365Q/E682Q)変異体の発現誘導によって、FLAG-PICT1 と MTR4-エキソソーム複合体との相互作用が減少を示した (Fig.10 B)。以上の結果より、NVL2 の ATP 加水分解活性を介して MTR4 から WDR74 モジュールタンパク質が解離されることが、

PICT1 を介して MTR4-エキソソーム複合体を 5.8S rRNA 前駆体へとリクルートするための前段階として不可欠であることが示唆された。

7. 核小体ストレス応答における WDR74 モジュールの機能

リボソーム生合成の破綻は核小体ストレス応答を誘導し、核小体から放出されたリボソームタンパク質（RPL5、RPL11、RPL23 等）が、がん抑制因子 p53 を標的とするユビキチンリガーゼ MDM2 と結合することによりその酵素活性を阻害する。その結果、核内では p53 が蓄積し、細胞増殖の停止やアポトーシスが引き起こされる⁽⁸⁾。この核小体ストレス応答経路はがん治療創薬の新たなターゲットとして期待されており、核小体における rRNA 前駆体の転写を阻害する CX-5461 や BMH-21 といった新規薬剤が開発され臨床試験が現在進行中である⁽²⁹⁻³¹⁾。一方、核小体における rRNA 前駆体プロセシングやリボソーム前駆体粒子の成熟に寄与する WDR74 もまた、MDM2-p53 経路の制御を介してがんの進展に寄与することが報告されている⁽³²⁾。そこで次に、WDR74 モジュール構成因子のノックダウンが核小体ストレス応答に及ぼす影響を解析することとした。この実験には、p53 遺伝子に変異を有さない HCT116 細胞を用い、p53 およびその下流因子 p21 の蓄積量をウェスタンブロッティングにより解析した（Fig.11 A）。その結果、コントロール細胞と比較して、WDR74、MAK16 および RRP1 をノックダウンした細胞では p53 および p21 の蓄積が確認された。ここで興味深いことに、RPF1 をノックダウンした細胞では p53 の蓄積が認められないにもかかわらず、p21 の誘導が観察された。この結果から、WDR74 モジュール

のノックダウンにより rRNA 前駆体のプロセッシング経路が破綻し、核小体ストレス応答が誘導されることが考えられた。また、WDR74、MAK16 および RRP1 が p53 依存的経路を介した核小体ストレス応答に関与する一方、RPF1 は p53 非依存的な経路を介して核小体ストレス応答に関与している可能性が示された (Fig.11 B)。WDR74、MAK16 および RRP1 においても、p53 依存性経路に加え、p53 非依存性経路を介した核小体ストレス応答調節の仕組みが存在している可能性も考えられる。多くのがん細胞では p53 遺伝子に変異が見られるため、RPF1 を始めとして WDR74 モジュールを構成するタンパク質群は、p53 非依存的な核小体ストレス応答経路を標的とした創薬ターゲットの候補になりうるのではないかと期待される。

考察

真核生物におけるリボソーム生合成は、rRNA 前駆体と数百種類におよぶ生合成補助因子群（トランス因子）が会合および脱会合を繰り返し、エネルギー依存的に制御を受けている⁽³³⁾。AAA ファミリーに属する ATPase NVL2 は、ATP 加水分解により得られるエネルギーを用いて、MTR4-エキソソーム複合体からその構成因子 WDR74 を脱会合させる。WD リピートファミリーに属する WDR74 は、分子内に WD リピートが 6 回繰り返される配列を持つ。WD リピートドメインは、トリプトファン（W）ーアスパラギン酸（D）のジペプチド配列を含む約 40~60 アミノ酸残基からなり、これが分子内で繰り返されることによって、タンパク質同士が相互作用するための足場が形成され、分子複合体の集合制御など、タンパク質相互作用を中心とした多彩な細胞機能に関与する⁽³⁴⁾。本研究では、LC-MS/MS プロテオミクススクリーニングにより、NVL2 の ATP 加水分解活性に依存した NVL2 結合タンパク質として、これまでに同定された WDR74 に加え、新たな核小体タンパク質（RPF1、MAK16、RRP1）を同定した（Fig.3）。これら 4 つのタンパク質が pre-60S リボソーム粒子の成熟プロセスに機能すると予想し、この複合体を WDR74 モジュールと名付けた。WDR74 モジュールを構成するタンパク質群（WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1）は、酵母においてもホモログが存在し、それらは Nsa1 モジュール（Nsa1、Rpf1、Mak1 および Rrp1 より成る）と呼ばれる複合体を形成している。Nsa1 モジュールはリボソーム前駆体粒子と結合し、それらの相互作用は NVL2 のホモログである Rix7 の ATP 加水分解能によって制

御されているが、rRNA 前駆体のプロセッシングにおける分子機序は不明である^(35,36)。また、Nsa1 と Rix7 の構造はそれぞれ X 線構造解析とクライオ電子顕微鏡構造解析により解明されているが、それらの分子によるプレリボソーム複合体からのエネルギー依存的な解離メカニズムは明らかにされていない^(37,38)。

本研究では、ヒト細胞において WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 が複合体を形成し、NVL2 の機能に依存して MTR4-エキソソーム複合体と相互作用することを明らかにした (Fig.4)。WDR74 モジュールの各構成因子をノックダウンする実験により、WDR74、RPF1 および MAK16 は、いずれも他のモジュール構成タンパク質が MTR4 と結合するために必要であり、各因子はモジュール全体の MTR4 との結合安定性に寄与しあっていると考えられた (Fig.5)。一方、RRP1 のノックダウンでは、他のコンポーネントと MTR4 との相互作用に大きな影響が見られなかった。このことから、RRP1 は WDR74 モジュールの形成とその NVL2 との結合にとって必須ではない可能性が考えられた。近年、ヒト細胞においてもクライオ電子顕微鏡を用いて、リボソーム前駆体粒子の各成熟段階における分子構造の解析が行われている (Fig.12)。その中で明らかにされた 60S リボソーム前駆体粒子の分子構造では、WDR74、RPF1 および MAK16 が互いに近接した位置に配置されている一方で、RRP1 はやや離れた位置に配置されており、本研究の観察結果を裏付けるものとなっている⁽³⁹⁾。このような WDR74 モジュール構成タンパク質の構造的配置が、リボソーム前駆体粒子の成熟メカニズムにおいて果たす役割を解明することは、リボソーム生合成機構の全容解明にとって、今後の重要な研究課題と考えられる。

ショ糖密度勾配遠心を用いたリボソームサブユニットの解析により、WDR74 モジュール構成因子のノックダウンでは、NVL2 変異体を発現させた場合と同様に、60S リボソームの顕著な減少が認められた (Fig.6)。リボソーム生合成の過程では、リボソームサブユニットに組み込まれる rRNA 前駆体のプロセッシングが並行して進行するため、WDR74 モジュールの各構成タンパク質が rRNA 前駆体のプロセッシングにおいて果たす役割を、ノーザンブロットティングにより解析した (Fig.8)。WDR74 モジュール構成タンパク質をそれぞれノックダウンすると、ITS1 領域における site 2 の切断が阻害され、代わりに site E での切断が促進され、36S 中間体 RNA の蓄積が観察された。30S、21S および 12S 中間体 RNA の減少は、それらが 36S 中間体 RNA よりもプロセッシング経路の下流において形成されるために引き起こされたと考えられる。一方で、MTR4 のノックダウンでは、12S 中間体 RNA の蓄積が認められた (Fig.8)。ここで、rRNA 前駆体プロセッシング経路の異なる段階において機能している WDR74 モジュールと MTR4-エキソソームが NVL2 による制御下で複合体を形成する理由として、rRNA 前駆体プロセッシングを制御する以下のようなメカニズムの存在が示唆された。即ち、NVL2 の ATPase 活性により MTR4-エキソソーム複合体から WDR74 モジュールが脱会合されると、遊離した WDR74 モジュールがプロセッシング経路の上流へと送り返されて機能するというリサイクリングモデルが考えられた。細胞分画実験の結果から、変異型 NVL2 を発現させた場合には、WDR74 モジュールの構成タンパク質は、核小体中心部に近い DFC 領域から核小体の周辺部に位置する GC 領域へと分布を変化させることが示された (Fig.9 B)。しかし、RRP1 と

MAK16 の一部は NVL2 による制御を受けずに GC 領域に局在するため、WDR74 と RPF1 のみが恒常的にリサイクルされると考えられた (Fig.9 A)。NVL2 の機能欠損下では、WDR74 モジュールのリサイクリングシステムが破綻するため、WDR74 モジュールがリボソーム前駆体粒子および MTR4-エキソソーム複合体と結合したまま核小体の外周部に濃縮していくと考えられた。さらに、この状態では MTR4 に PICT1 が結合できなくなるため、MTR4-エキソソーム複合体による 12S 中間体 RNA の 3'末端プロセッシングが阻害されると考えられた (Fig.10 A)。以上の結果より、WDR74 モジュールを足場とすることにより、NVL2 が初期リボソーム前駆体粒子に組み込まれ、rRNA 前駆体の初期プロセッシングと後期プロセッシングを時系列的に制御する役割を担うことが予想された。

WDR74 は多くのがん細胞で高レベルに発現しており、WDR74 に見られるがん特異的変異とがん予後不良との相関が報告されている⁽⁴⁰⁾。本研究では、p53 に変異を有さない HCT116 細胞を用いて、WDR74 モジュールの構成因子をそれぞれノックダウンし、リボソーム生合成の破綻にともなう核小体ストレス応答の誘導を観察した (Fig.11 A)。興味深いことに、RPF1 のノックダウンでは、p53 の増加を伴わない p21 の蓄積が確認された。このことから、WDR74 モジュールの構成タンパク質が p53 非依存的な核小体ストレス応答のメカニズムに関与していることが示唆された。この仮説を証明するためには、p53 が不活化されている HeLa 細胞や p53 をノックアウトさせた細胞株を用いた実験が必要である。今後、rRNA の転写を阻害する Pol I 阻害剤のみならず、rRNA 前駆体のプロセッシング経路を標的としたがん治療薬の開発が進むことが期待される。

本研究を通して、WDR74、RPF1、MAK16 および RRP1 から構成される WDR74 モジュールが rRNA 前駆体プロセシングの初期段階で ITS1 site2 の切断に寄与することが示された。WDR74 モジュールを rRNA 前駆体プロセシングの初期段階に継続的に供給し続けるためには、これらのタンパク質を後期のリボソーム前駆体粒子および MTR4-エキソソーム複合体から効果的に解離させ、プロセシングの初期段階へとリサイクリングさせる必要がある。NVL2 の機能不全によりこのリサイクリングシステムが破壊されると、ITS1 配列の異常な切断が起こる。さらに、プロセシングの後期段階において MTR4-エキソソーム複合体に WDR74 モジュールが異常に蓄積すると、複合体と PICT1 の結合が阻害されると考えられる。このような考えに基づき、NVL2 が ATPase 活性によって初期および後期 rRNA 前駆体プロセシングを時空間的に制御するリサイクリングモデルの提案へと至った (Fig.13)。酵母のリボソーム生合成過程においても、AAA-ATPase Rix7 による Nsa1 のリサイクリング機構の存在が示唆されているが、その制御メカニズムには MTR4 が関与しないと考えられ、本研究で示されたヒト細胞で見られるメカニズムよりも単純なものと想像される^(35,36)。本研究を通して提起された仮説を証明するためには、rRNA 前駆体プロセシング経路の最終段階を再構成する *in vitro* の実験系などを構築し、より詳細な解析を実施する必要がある、今後の重要な課題と考えられる。

参考文献

1. Henras A.K., Soudet J., Gerus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mougin A., Henry Y., The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci.*, **65**, 2334-2359 (2008)
2. Henras A.K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M.F., Chakraborty A., Gleizes P.E., An Overview of Pre-ribosomal RNA Processing in Eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev RNA*, **6**, 225–242 (2015)
3. Tomecki R., Sikorski P.J., Zakrzewska-Placzek M., Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells - focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases. *FEBS Lett*, **591**, 1801–1850 (2017)
4. Sanghai Z.A., Miller L., Molloy K.R., Barandun J., Hunziker M., Chaker-Margot M., Wang J., Chait B.T., Klinge S., Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit. *Nature*, **556**, 126-129 (2018)
5. Hiraishi N., Ishida Y., Nagahama M., AAA-ATPase NVL2 acts on MTR4-exosome complex to dissociate the nucleolar protein WDR74. *Biochem Biophys Res Commun*, **467**, 534-540 (2015).
6. Tollervey D., The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, **91**, 457-466 (1997)
7. Yu L., Kim J., Jiang., Feng B., Ying Y., Ji K.Y., Tang Q., Chen W., Mai T., Dou W., Zhou J., Xiang L.Y., He Y.F., Yang D., Li Q., Fu X., Xu Y., MTR4 drives liver tumorigenesis by promoting cancer

- metabolic switch through alternative splicing. *Nat Commun*, **11**, 708 (2020)
8. Thoms M., Thomson E., Baßler J., Gnädig M., Griesel S., Hurt E.,
The exosome is recruited to RNA substrates through specific adaptor proteins. *Cell*, **162**, 1029-1038 (2015)
 9. Cepeda L.P.P., Bagatelli F.F.M., Santos R.M., Santos M.D.M.,
Nogueira F.C.S., Oliveira C.C., The ribosome assembly factor Nop53 controls association of the RNA exosome with pre-60S particles in yeast. *J Biol Chem*, **294**, 19365-19380 (2019)
 10. Schneider C., and Bohnsack K.E., Caught in the Act-Visualizing Ribonucleases during Eukaryotic Ribosome Assembly. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **14**, e1766 (2023)
 11. Miyao S., Saito K., Oshima R., Kawahara K., Nagahama M., MTR4 adaptor PICT1 functions in two distinct steps during pre-rRNA processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **637**, 203-209 (2022)
 12. Germain-Lee E.L., Obie C., Valle D., NVL: a new member of the AAA family of ATPases localized to the nucleus. *Genomics*, **44**, 22-34 (1997)
 13. Ogura T., Wilkinson A.J., AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function. *Gene Cell*, **6**, 575-597 (2001)
 14. Hanson P.I., Whiteheart S.W., AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 519-529 (2005)
 15. Ahlstedt B.A., Ganji R., Raman M. The functional importance of VCP to maintaining cellular protein homeostasis. *Biochem Soc Trans*, **50**, 1457-1469 (2022)

16. Nagahama M., Hara Y., Seki A., Yamazoe T., Kawate Y., Shinohara T., Hatsuzawa K., Tani K., Tagaya M., NVL2 is a nucleolar AAA-ATPase that interacts with ribosomal protein L5 through its nucleolar localization sequence. *Mol Biol Cell*, **15**, 5712-5723 (2004)
17. Nagahama M., Yamazoe T., Hara Y., Tani K., Tsuji A., Tagaya M., The AAA-ATPase NVL2 is a component of pre-ribosomal particles that interacts with the DExD/Hbox RNA helicase DOB1. *Biochem Biophys Res. Commun*, **346**, 1075-1082 (2006)
18. Yoshikatsu Y., Ishida Y., Sudo H., Yuasa K., Tsuji A., Nagahama M., NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **464**, 780-786 (2015)
19. Zhou C., Yan M., Xiaoye J., Xingfeng S., WDR74 promotes proliferation and metastasis in colorectal cancer cells through regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Open Life Sci.* **16**, 920-929 (2021)
20. Preti M., O'Donohue M.F., Montel-Lehry N., Bortolin-Cavaille M.L., Choesmel V., Gleizes P.E., Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic Acids Res*, **41**, 4709-4723 (2013)
21. Nieto B., Gaspar S.G., Sapio R.T., Clavaín L., Bustelo X.R., Pestov D.G., Dosil M., Efficient fractionation and analysis of ribosome assembly intermediates in human cells. *RNA Biol*, **18**, 182-197 (2021)

22. Hiraishi N., Ishida Y., Sudo H., Nagahama M., WDR74 participates in an early cleavage of the pre-rRNA processing pathway in cooperation with the nucleolar AAA-ATPase NVL2. *Biochem Biophys Res Commun*, **495**, 116-123 (2018)
23. Kater L., Thoms M., Barrio-Garcia C., Cheng J., Ismail S., Ahmed YL., Bange G., Kressler D., Berninghausen O., Sinning I., Hurt E., Beckmann R., Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell*, **14**, 1599-1610 (2017)
24. Sloan K.E., Mattijssen S., Lebaron S., Tollervey D., Pruijn G.J.M., Watkins N.J., Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *Cell Biol*, **200**, 577-588 (2013)
25. Cmarko D., Verschure P.J., Rothblum L.I., Hernandez-Verdun D., Amalric F., Driel van R., Fakan S., Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol*, **113**, 181-187 (2000)
26. Ishibashi M., Kogo R., Shibata K., Ueo H., Uchi R., Matsumura T., Takano Y., Sawada G., Takahashi Y., Mima K., Kurashige J., Akiyoshi S., Iwaya T., Eguchi H., Sudo T., Sugimachi K., Suzuki A., Wakabayashi G., Mori M., Mimori K., Clinical significance of PICT1 in patients of hepatocellular carcinoma with wild-type TP53. *Ann Surg Oncol*, **3**, 537-544 (2013)
27. Uchi R., Kogo R., Kawahara K., Sudo T., Yokobori T., Eguchi H., Sugimachi K., Maehama T., Mori M., Suzuki A., Komune S., Mimori K., PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric

- cancer progression. *Br J Cancer*, **109**, 2199-2206 (2013)
28. Okamura K., Takayama K., Kawahara K., Harada T., Nishio M., Otsubo K., Ijichi K., Kohno M., Iwama E., Fujii A., Ota K., Koga T., Okamoto T., Suzuki A., Nakanishi Y., PICT1 expression is a poor prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncoscience*, **1**, 375-382 (2014)
29. Xu H., Di Antonio M., McKinney S., Mathew V., Ho B., O'Neil N.J., Santos N.D., Silvester J., Wei V., Garcia J., Kabeer F., Lai D., Soriano P., Banáth J., Chiu D.S., Yap D., Le D.D., Ye F.B., Zhang A., Thu K., Soong J., Lin S., Tsai A.H.C., Osako T., Algara T., Saunders D.N., Wong J., Xian J., Bally M.B., Brenton J.D., Brown G.W., Shah S.P., Cescon D., Mak T.W., Caldas C., Stirling P.C., Hieter P., Balasubramanian S., Aparicio S., CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat Commun*, **8**, 14432 (2017)
30. Jacobs R.Q., Huffines A.K., Laiho M., Schneider D.A., The small-molecule BMH-21 directly inhibits transcription elongation and DNA occupancy of RNA polymerase I in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, **298**, 101450 (2022)
31. Colis L., Peltonen K., Sirajuddin P., Liu H., Sanders S., Ernst G., Barrow J.C., Laiho M., DNA intercalator BMH-21 inhibits RNA polymerase I independent of DNA damage response. *Oncotarget*, **5**, 4361-4369. (2014)
32. Li Y., Zhou Y., Li B., Chen F., Shen W., Lu Y., Zhong C., Zhang C., Xie H., Katanaev V.L., Jia L., WDR74 modulates melanoma

- tumorigenesis and metastasis through the RPL5-MDM2-p53 pathway. *Oncogene*, **39**, 2741-2755 (2020)
33. Donizy P., Biecek P., Halon A., Maciejczyk A., Matkowski R., Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells - a new prognostic approach to an old concept. *Diagn Pathol*, **12**, 88 (2017)
34. Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J., The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, **24**, 181-185 (1999)
35. Gadai O., Strauss D., Braspenning J., Hoepfner D., Petfalski E., Philippsen P., Tollervy D., Hurt E., A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J.*, **20**, 3695-3704 (2001)
36. Kressler D., Roser D., Pertschy B., Hurt E., The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J Cell Biol.*, **181**, 935-944 (2008)
37. Lo Y.H., Romes E.M., Pillon M.C., Sobhany M., Stanley R.E., Structural analysis reveals features of ribosome assembly factor Nsa1/WDR74 important for localization and interaction with Rix7/NVL2. *Structure*, **25**, 762-772 (2017)
38. Lo Y.H., Sobhany M., Hsu A.L., Ford B.L., Krahn J.M., Borgia M.J., Stanley R.E., Cryo-EM structure of the essential ribosome assembly AAA-ATPase Rix7. *Nat Commun*, **10**, 513 (2019)
39. Broeck A.V., and Klinge S., Principles of human pre-60 S biogenesis. *Science*, **381**, 6653 (2023)

40. Wu X., Song P., Wang S., Qian Z., Ying J., Gao S., Li W., A Pan-Cancer Analysis of the Oncogenic Role of WD Repeat Domain 74 in Multiple Tumors. *Front Genet*, **13**, 860940 (2022)

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました長浜正巳教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始適切なご助言、ご指導を賜りました泉川桂一准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を頂きました東京都立大学・理学部・理学研究科・生物科学研究室の田岡万悟准教授、ならびに延優子特任研究員に深く感謝いたします。

本研究を遂行する上で様々なご協力をくださいました本研究室の宮尾宗太郎さん、大賀嵩之さんに感謝いたします。本実験の遂行に際してご協力いただいた生体分子学研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、研究活動を様々な面から支えて下さった家族に心より感謝いたします。

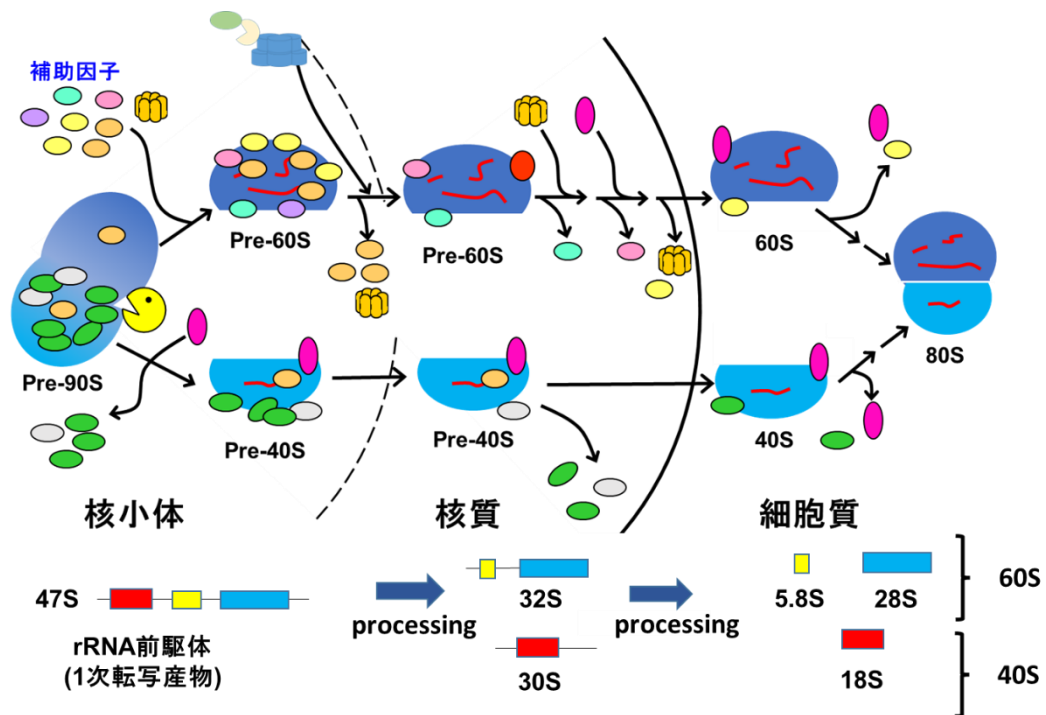


Fig.1 ヒト細胞におけるリボソーム生合成の流れ

核小体内で形成された 90S リボソーム前駆体粒子は、60S リボソーム前駆体粒子および 40S リボソーム前駆体粒子へと分割される。それらはさらに、核小体から核質を経て細胞質まで移行する過程で独立に成熟していく。その間に前駆体粒子の中では、RNA ポリメラーゼ I により転写された 47S rRNA 前駆体がプロセッシングを受け、成熟型の 28S、18S および 5.8S rRNA が形成される。またこの間に、RNA ポリメラーゼ III により転写された 5S rRNA が、60S リボソーム前駆体粒子の中に取り込まれる。細胞質ではさらに最終段階の成熟が進み、60S および 40S のリボソームサブユニットが完成すると、それらは会合して翻訳に機能する 80S リボソームの形成に至る。

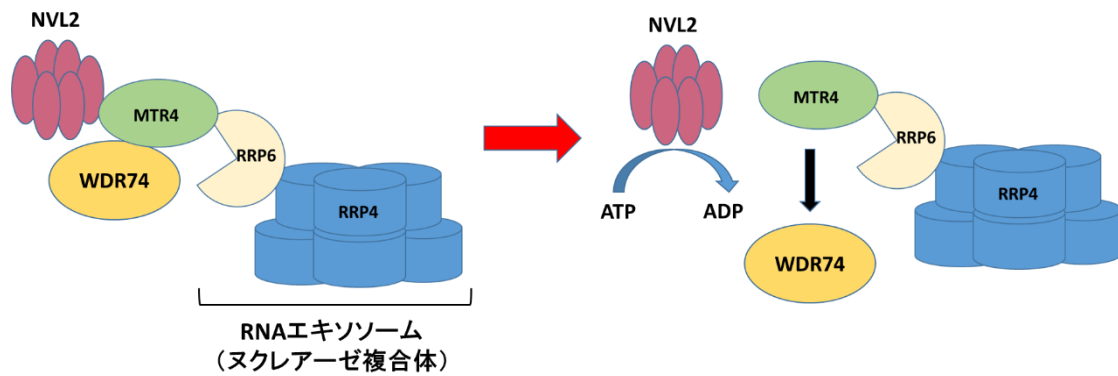


Fig.2 NVL2 は MTR4-エキソソームと WDR74 の相互作用を制御する

NVL2 は ATP の加水分解により得られるエネルギーに依存して、MTR4-エキソソーム複合体から WDR74 の脱会合を促す。RNA エキソソームは、9 個のサブユニットからなるリング状コアに触媒サブユニットが結合して機能する 5'-3'エキソヌクレアーゼ複合体である。核小体では、触媒サブユニットとして RRP6 が機能する。また、RNA エキソソームの働きを補助する因子として、RNA ヘリカーゼである MTR4 が協調的に機能する。リボソーム生合成因子である WDR74 は、NVL2 のシャペロン活性を介して、この複合体から脱会合される。

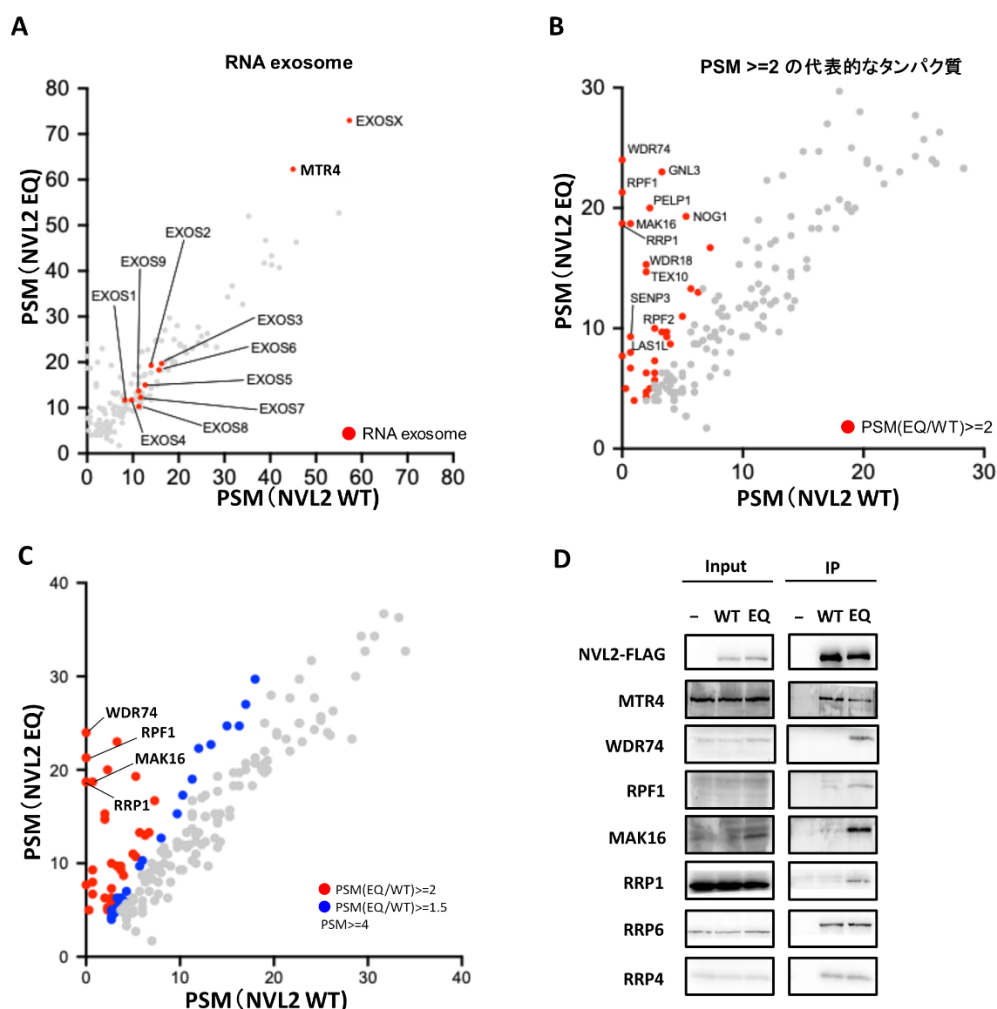


Fig.3 NVL2 の ATPase 活性により制御される新たなリボソーム生合成因子の同定

A,B,C) FLAG タグを付加した野生型 NVL2 または ATP 加水分解能を欠損させた変異型 NVL2 をベイトとして共免疫沈降を行い、共沈したタンパク質を LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析に供した。WT および EQ はそれぞれ野生型 NVL2 および変異型 NVL2 (E365Q/E682Q) を表す。各プロット図において、(A)では、MTR4-エキソソーム構成因子を赤のドットで表示した。(B)では、野生型 NVL2 に対して変異型 NVL2 とより強い結合を示すタンパク質を赤のドットで表示した。(C)では、野生型 NVL2 に対して変異型 NVL2 とより結合を示すタンパク質の結合レベルを赤および青のドットで表示した。

D) NVL2-FLAG(野生型または E365Q/E682Q 変異型)発現プラスミドをトランスフェクションし、NVL2-FLAG をベイトとして抗 FLAG 抗体ビーズを用いた共免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより沈降タンパク質を検出した。変異型 NVL2 の発現下でのみ、WDR74 モジュールを構成するタンパク質群と NVL2 が結合を示した。

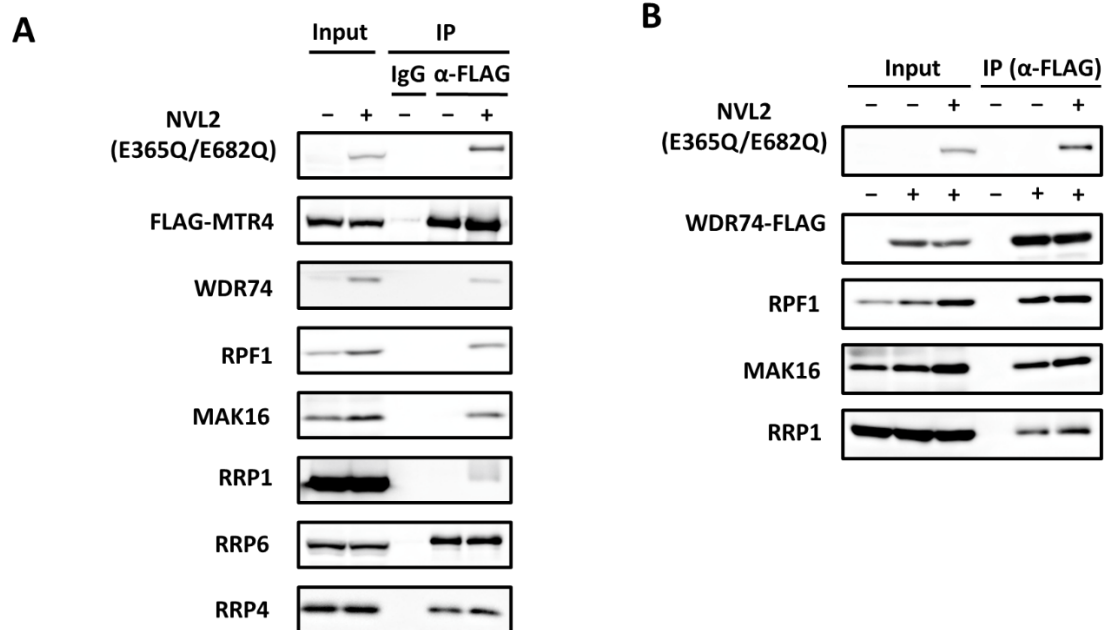


Fig.4 FLAG-MTR4 と WDR74 モジュールの結合解析

A) FLAG-MTR4 と NVL2-Strep (野生型または E365Q/E682Q 変異型) を発現した HEK293 細胞から、抗 FLAG 抗体ビーズを用いた共免疫沈降を行い、FLAG-MTR4 結合タンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングにて検出を行った。変異型 NVL2 の発現下でのみ、WDR74 モジュールを構成するタンパク質群と MTR4 が結合を示した。

B) FLAG-WDR74 をベイトとして共免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより解析を行った。WDR74-FLAG と RPF1、MAK16 および RRP1 の結合は、変異型 NVL2 (E365Q/E682Q) の発現による影響を受けなかった。

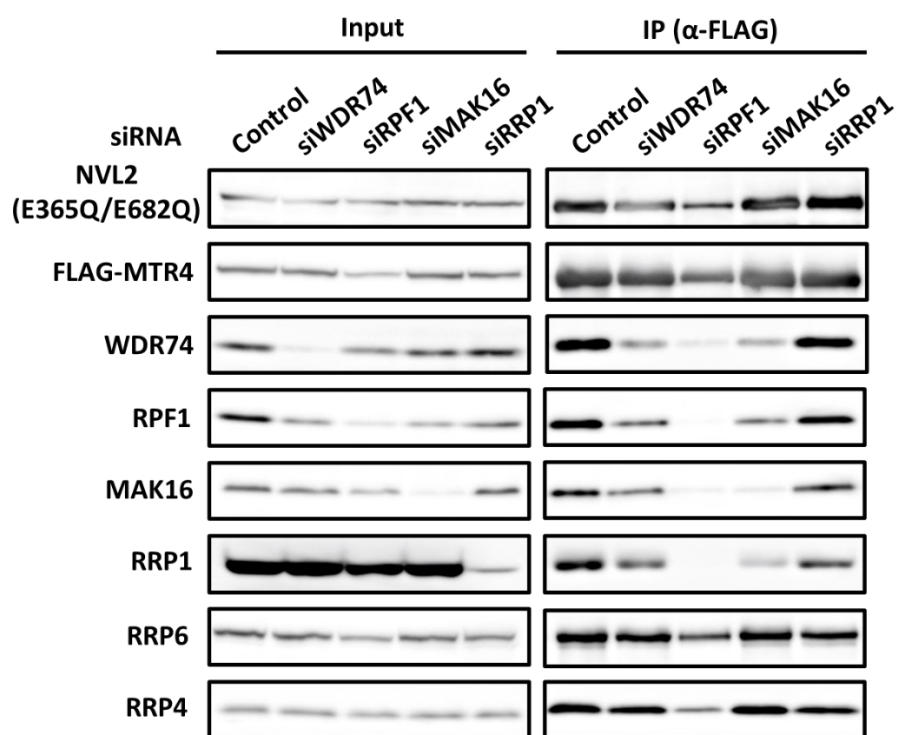


Fig.5 WDR74 モジュール構成因子のノックダウンによる FLAG-MTR4 と WDR74 モジュールの結合解析

FLAG-MTR4 と NVL2-Strep (E365Q/E682Q 変異体、Dox 処理により誘導可能) を発現した HEK293 細胞において、WDR74 モジュール構成因子のノックダウンを行い、Dox 処理による NVL2 変異体の発現誘導を行った。抗 FLAG 抗体ビーズを用いた共免疫沈降により、MTR4 結合タンパク質を分離し、ウエスタンブロッティングによる検出を行った。WDR74、RPF1、MAK16 のノックダウンにより、MTR4 と他のモジュール構成因子との結合減少が見られた。

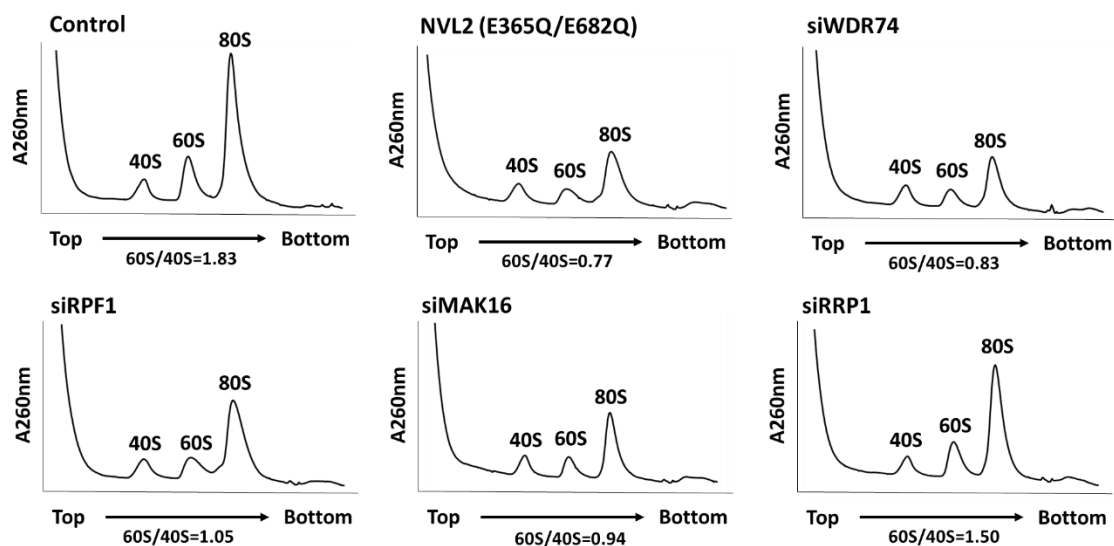


Fig.6 リボソームサブユニットの形成における WDR74 モジュールの機能解析

WDR74 モジュールの構成タンパク質をそれぞれノックダウンした HEK293 細胞および NVL2 (E365Q/E682Q)変異体を発現させた HEK293 細胞の抽出液を用い、ショ糖密度勾配遠心によりリボソームサブユニットを分離し、RNA に由来する吸光度を測定した。WDR74 モジュール構成タンパク質のノックダウンにより、60S および 40S リボソームを示す吸光度のピークの比率に影響が見られた。

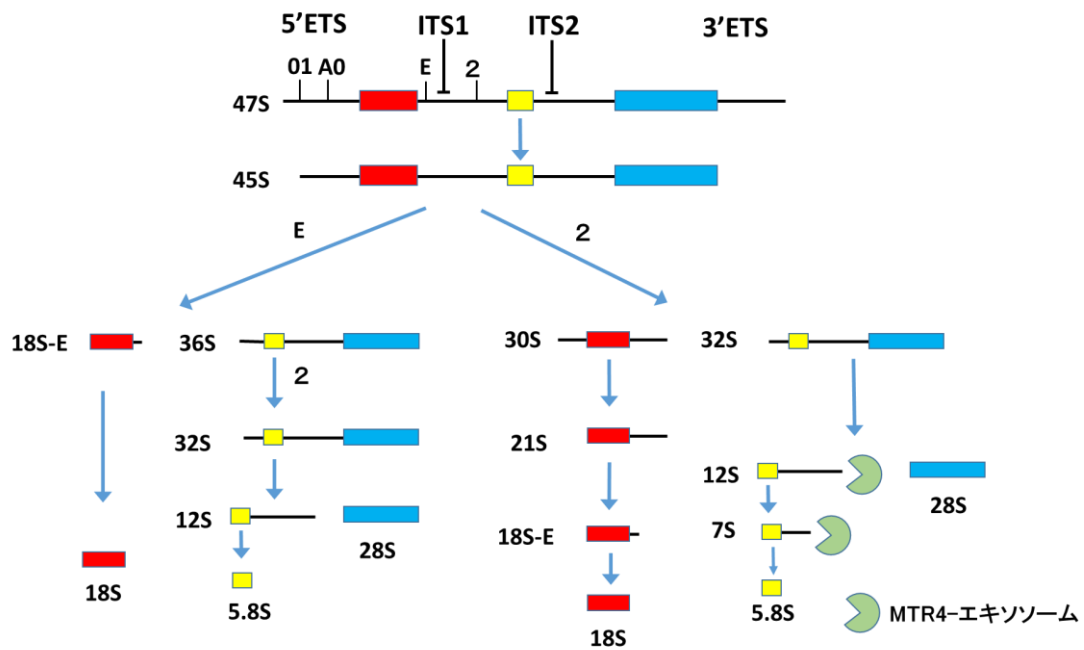


Fig.7 ヒト細胞における rRNA 前駆体のプロセッシング経路

RNA ポリメラーゼIの転写産物である 47S rRNA 前駆体 は、様々な修飾酵素により数百ヶ所の部位特異的な修飾を受ける。また、エンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼによるプロセッシングを受け、最終的に 28S、18S および 5.8S の 3 種類の成熟 rRNA へと変換される。

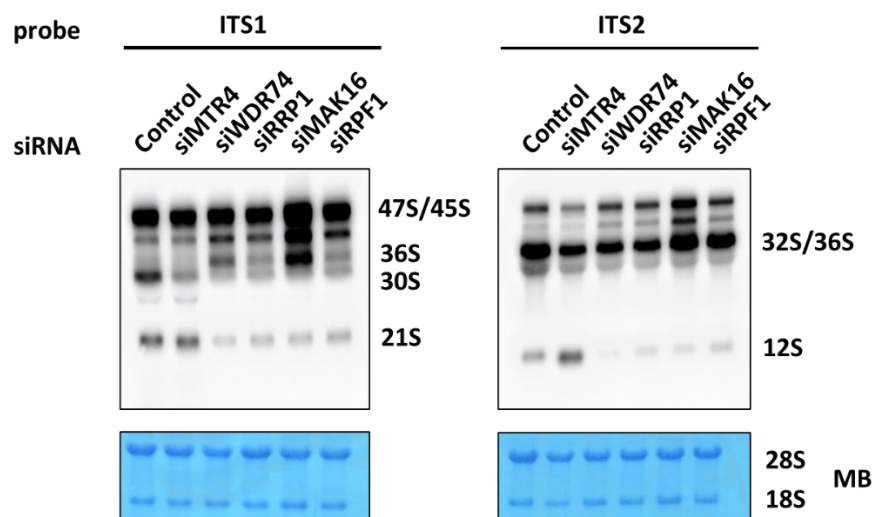


Fig.8 rRNA 前駆体プロセッシングにおける WDR74 モジュールの機能解析

WDR74 モジュール構成タンパク質をノックダウンした HeLa 細胞からトータル RNA を抽出し、ノーザンブロッティングを行った。ITS1 に特異的なプローブを用いた場合、各モジュール構成タンパク質のノックダウンにより 36S 中間体 RNA の蓄積が見られ、30S、21S および 12S 中間体 RNA は減少が見られた。

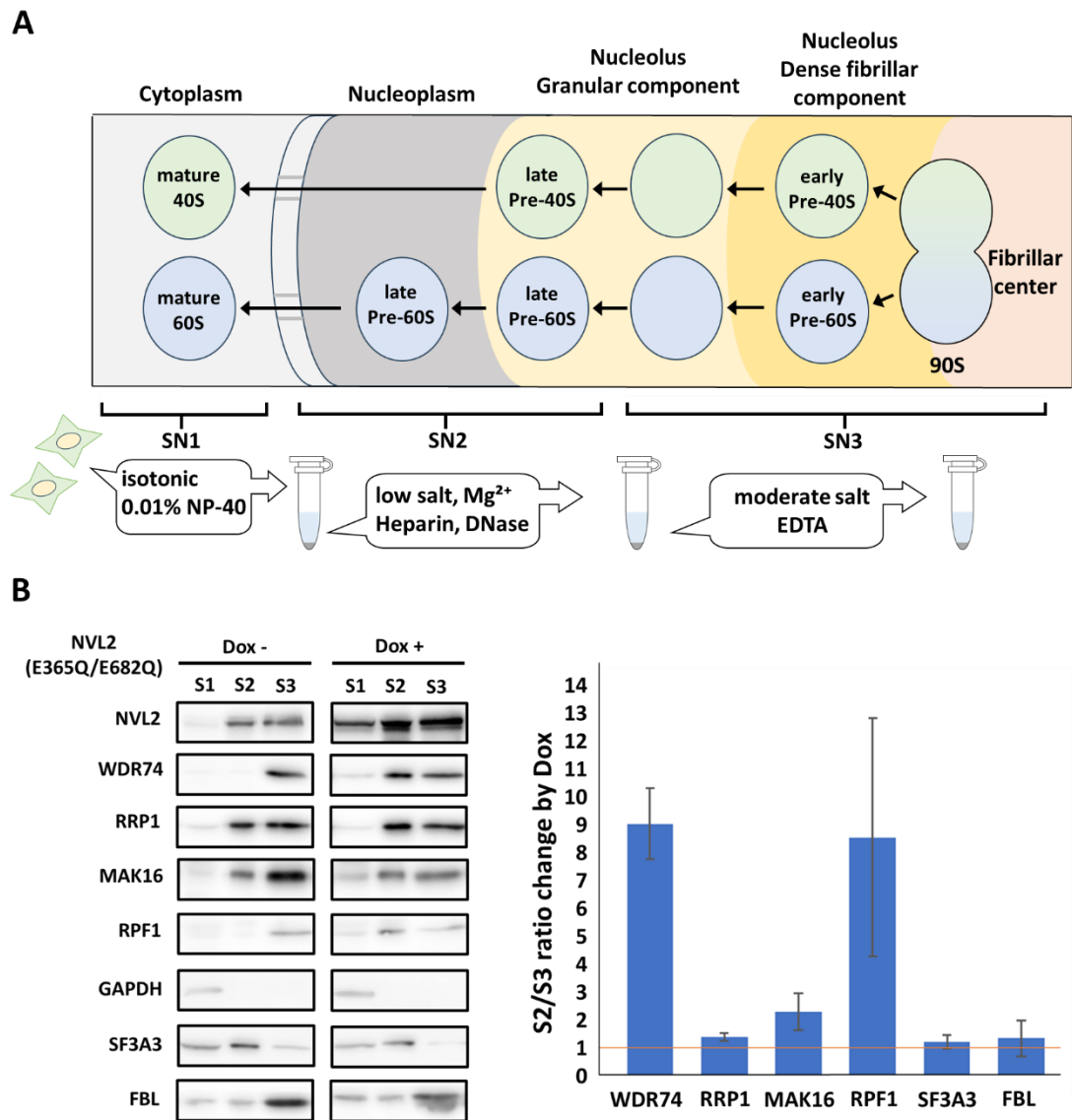


Fig.9 NVL2(E365Q/E682Q)変異体の発現による WDR74 モジュールの核内分布への影響

A) プレリボソーム粒子の初期および後期成熟中間体を含む細胞画分を分離するためのプレリボソーム逐次抽出 (PSE) 法の概要図。

B) NVL2 (E365Q/E682Q)変異体を Dox 処理により発現させた HEK293 細胞を用い、PSE 法により SN1、SN2、SN3 の画分を順次抽出した。それぞれの画分に抽出されたタンパク質をウェスタンブロッティングにより検出した。また、独立した 3 回の実験を行い、各バンドの強度を定量し、SN2/SN3 比が Dox 処理の有無により変化する割合をグラフ化した。エラーバーは標準偏差を表している。

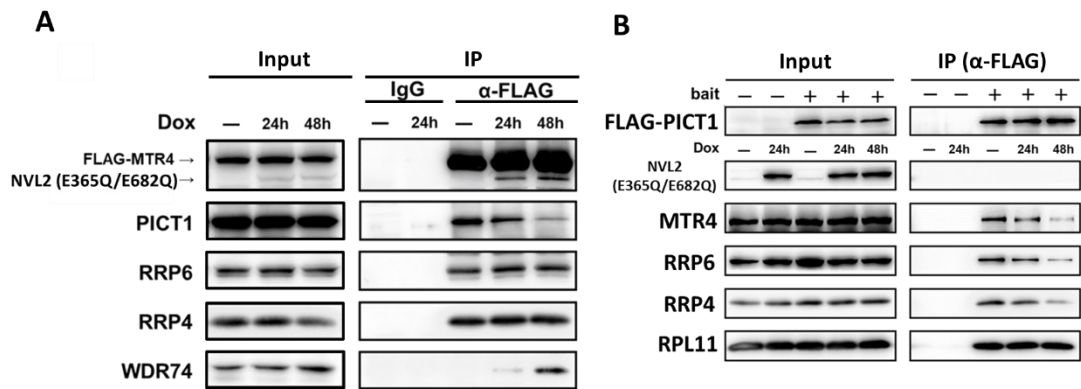


Fig.10 FLAG-MTR4 と PICT1 の相互作用における NVL2(E365Q/E682Q)変異体発現の影響

A) HEK293 細胞に FLAG-MTR4 発現プラスミドをトランスフェクションした後、NVL2(E365Q/E682Q)発現を誘導するために 24h または 48h の Dox 処理を行った。FLAG-MTR4 をベイトとして抗 FLAG 抗体ビーズを用いた共免疫沈降を行い、MTR4 結合タンパク質を分離してウエスタンブロッティングによる検出を行った。NVL2(E365Q/E682Q)変異体発現下では、WDR74 の結合増加に伴って、PICT1 の結合減少が見られた。

B) FLAG-PICT1 をベイトとして共免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングによる検出を行った。NVL2(E365Q/E682Q)変異体の発現誘導時間の変化にともなって、PICT1 と MTR4 の結合に減少が見られた。

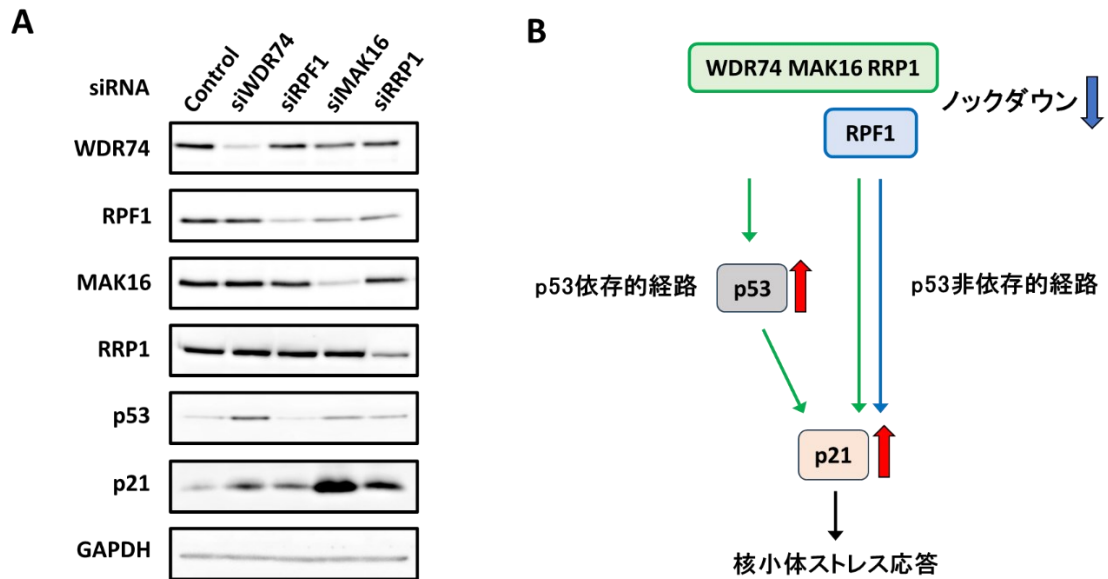


Fig.11 WDR74 モジュール構成因子のノックダウンによる核小体ストレス応答の誘導

A) HCT116 細胞を用いて、WDR74 モジュールの構成因子をそれぞれノックダウンし、核小体ストレス応答により誘導される p53 および p21 の増加をウエスタンブロッティングにより検出した。

B) WDR74 モジュール構成タンパクのノックダウンによる、p53 依存性および非依存性の核小体ストレス応答経路に関するモデル。

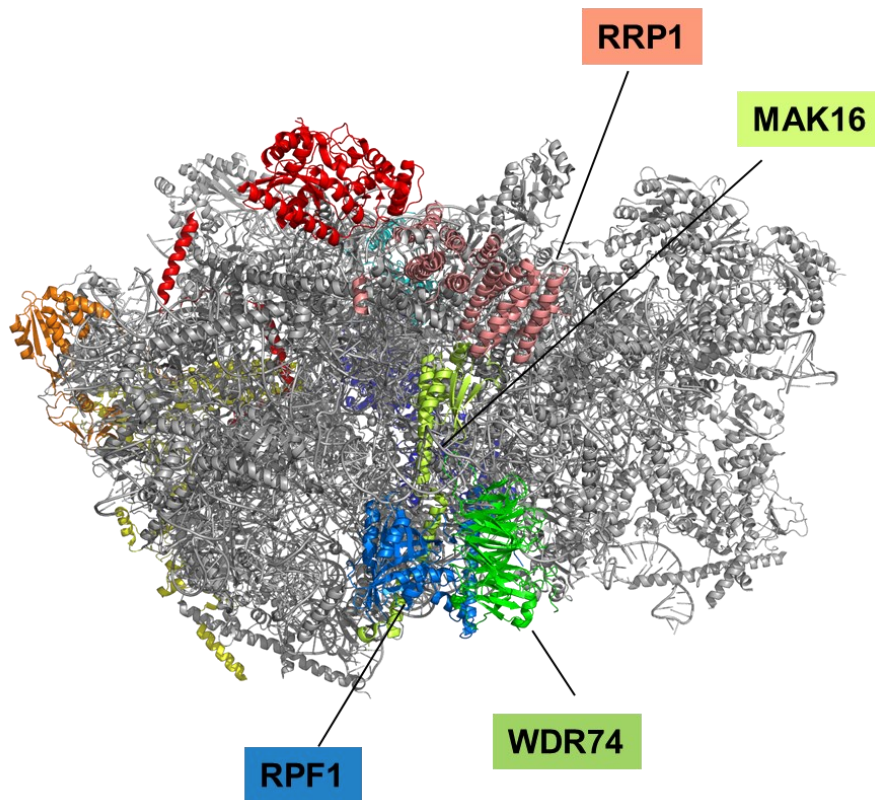


Fig.12 pre-60S リボソーム前駆体粒子の分子構造から見た WDR74 モジュール構成因子の立体配置

クライオ電子顕微鏡により明らかにされたヒト細胞における pre-60S 粒子の分子構造⁽³⁹⁾。

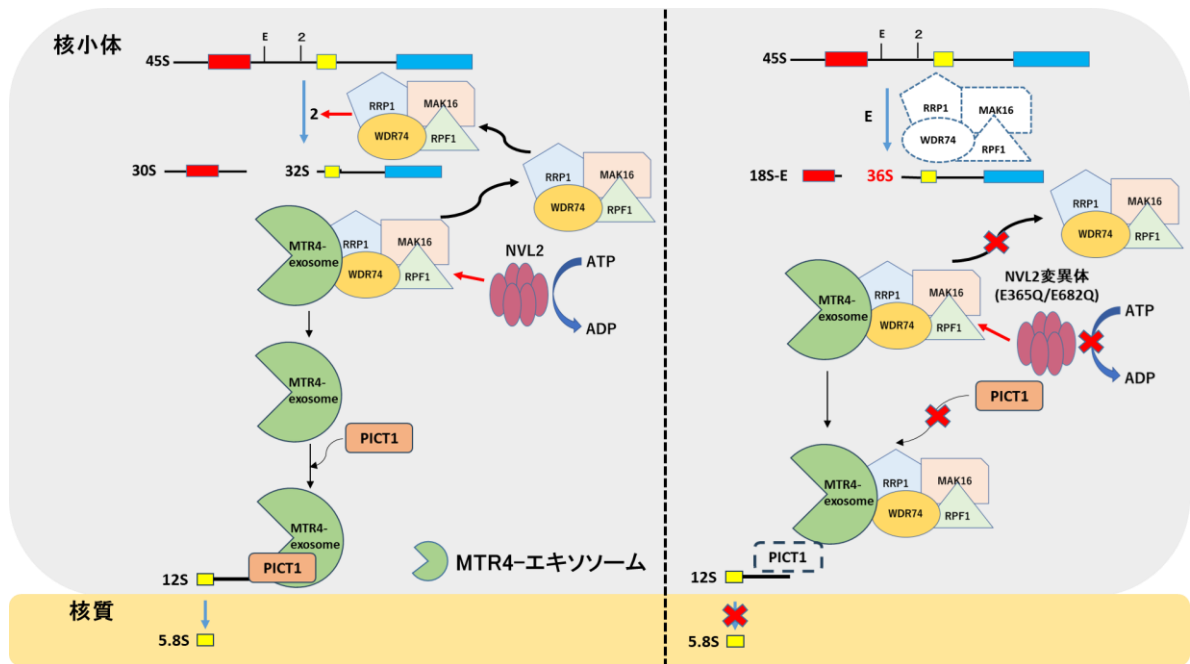


Fig.13 リボソーム生合成過程において NVL2 が介在する ITS1 初期切断部位への WDR74 モジュールタンパク質のリサイクリングに関するモデル

NVL2 の ATP 加水分解活性により WDR74 モジュールが MTR4 から解離した後、PICT1 が MTR4-エキソソーム複合体と結合可能になる。これによって、12S 中間体 RNA へと MTR4-エキソソーム複合体がリクルートされると、5.8S rRNA の 3'末端成熟が進行する。NVL2 の ATP 加水分解活性が阻害された場合には、このメカニズムが破綻し、ITS1 切断および 12S rRNA プロセッシングが阻害される。

Table. 1A 1次抗体

抗体名	希釈倍率	備考
fibrillarin (H-140)	10000	Santa Cruz Biotechnology (sc-25397)
p21	10000	GeneTex (629543)
p53 (DO-1)	10000	Santa Cruz Biotechnology (sc-126)
FLAG	2000	Sigma-Aldrich (F1804)
GAPDH (6C5)	500	Thermo Fisher Scientific (AM4300)
MAK16	2000	Proteintech (17505-1-AP)
MPP6	1000	GeneTex (40302)
MTR4	1000	当研究室で作成
NVL2	1000	当研究室で作成
PICT1	2000	Proteintech (27353-1-AP)
RPF1	2500	Sigma-Aldrich (HPA024642)
RPL11	10000	Novus Biologicals (MBP2-22283)
RRP1	2000	Proteintech (14896-1-AP)
RRP4	10000	当研究室で作成
RRP6	1000	Sigma-Aldrich (P4124)
SF3A3	5000	Proteintech (12070-1-AP)
STREP	2000	QIAGEN (34850)
WDR74	2000	ORIGENE (W001)

Table. 1B 2次抗体

抗体名	希釈倍率	備考
horseradish peroxidase(HRP)標識抗ウサギIgG	10000 or 100000	BIO-RAD(170-6515)
HRP標識抗マウスIgG	10000 or 100000	BIO-RAD(170-6516)
MOUSE ANTIRABBIT LIGHT CHAIN:HRP	100000	BIO-RAD(MCA6003P)
m-IgGκ BP-HRP	10000 or 100000	Santa Cruz(sc-516102)

Table. 2

Accession	ProteinMass	Protein description	ID_WT	ID_EQ	Ratio EQ/WT	Ave.(PSMs)		Classification1	Classification2
						293FTR	WT		
RPF1_HUMAN	40200.16	Ribosome production factor 1 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=RPF1 PE=1 SV=2		●	only EQ	0.0	0.0	NSA1 module	pre-60S complex
WDR74_HUMAN	42984.88	WD repeat-containing protein 74 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=WDR74 PE=1 SV=1		●	only EQ	0.0	0.0	NSA1 module	pre-60S complex
RRP1_HUMAN	53034.64	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=RRP1 PE=1 SV=1		●	only EQ	0.0	0.0	NSA1 module	pre-60S complex
LAS1L_HUMAN	83982.16	Ribosomal biogenesis protein LAS1L OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=LAS1L PE=1 SV=2		●	only EQ	0.0	0.0	Ribosome	pre-60S complex
MAK16_HUMAN	35688.83	Protein MAK16 homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=MAK16 PE=1 SV=2		●	28.000	0.0	0.7	NSA1 module	pre-60S complex
NOL9_HUMAN	80526.88	Poly(ADP-ribose) polymerase 9 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=NOL9 PE=1 SV=1		●	15.000	0.0	0.3	Ribosome	pre-60S complex
SENP3_HUMAN	65595.92	Sentrin-specific protease 3 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=SENP3 PE=1 SV=2		●	14.000	0.0	0.7	Ribosome	pre-60S complex
MOV10_HUMAN	114511.8	Helicase MOV10 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=MOV10 PE=1 SV=2		●	12.000	0.0	0.7		
WRNP1_HUMAN	72829.08	ATPase WRNP1 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=WRNP1 PE=1 SV=2		●	10.000	0.0	0.7		
PELP1_HUMAN	120878.96	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=PELP1 PE=1 SV=2		●	8.571	0.0	2.3	Ribosome	pre-60S complex
WDR18_HUMAN	48059.26	WD repeat-containing protein 18 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=WDR18 PE=1 SV=2		●	7.667	0.0	2.0	Ribosome	pre-60S complex
TEX10_HUMAN	106348.89	Testis-expressed protein 10 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=TEX10 PE=1 SV=2		●	7.333	0.0	2.0	Ribosome	pre-60S complex
GNL3_HUMAN	62467.64	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=GNL3 PE=1 SV=2		●	6.900	0.0	3.3		pre-60S complex
HNRPQ_HUMAN	33706.56	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=HNRPQ PE=1 SV=4		●	4.000	1.0	1.0	4.0	
RPF2_HUMAN	35731.24	Ribosome production factor 2 homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=RPF2 PE=1 SV=2		●	3.750	0.0	2.7	10.0	pre-60S complex
NOG1_HUMAN	74316.97	Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=NOG1 PE=1 SV=3	●	●	3.625	0.0	5.3	49.3	pre-60S complex
DDX56_HUMAN	62007.13	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=DDX56 PE=1 SV=1		●	3.167	0.0	2.0	6.3	
TOP2B_HUMAN	184121.81	DNA topoisomerase 2-beta OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=TOP2B PE=1 SV=3		●	2.900	0.0	3.3	9.7	
NOC3L_HUMAN	92945.74	Nucleolar complex protein 3 homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=NOC3L PE=1 SV=1		●	2.750	0.0	2.7	7.3	pre-60S complex
MRT4_HUMAN	27656.95	mRNA turnover protein 4 homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=MRT4 PE=1 SV=2		●	2.636	0.0	3.7	9.7	pre-60S complex
RRS1_HUMAN	41225.19	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=RRS1 PE=1 SV=2		●	2.545	0.0	3.7	9.3	pre-60S complex
MPH6_HUMAN	19088.6	M-phase phosphoprotein 6 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=MPH6 PE=1 SV=2		●	2.375	0.0	2.7	6.3	
PUM3_HUMAN	73937.43	Pumilio homolog 3 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=PUM3 PE=1 SV=3	●	●	2.353	0.0	5.7	13.3	pre-60S complex
ZNF790_HUMAN	76689.76	Zinc finger protein 790 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ZNF790 PE=2 SV=2		●	2.333	0.0	2.0	4.7	
ILF3_HUMAN	95678.22	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3	●	●	2.273	0.7	7.3	16.7	
DDX24_HUMAN	96998.69	ATP-dependent RNA helicase DDX24 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=DDX24 PE=1 SV=1	●	●	2.200	0.0	5.0	11.0	
ZNF283_HUMAN	80343.22	Zinc finger protein 283 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ZNF283 PE=1 SV=4	●	●	2.167	0.0	4.0	8.7	
ZNF471_HUMAN	75071.1	Zinc finger protein 471 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ZNF471 PE=2 SV=1		●	2.167	0.0	2.0	4.3	
UTP18_HUMAN	62420.62	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=UTP18 PE=1 SV=3		●	2.143	0.0	2.3	5.0	pre-40S complex
DDX31_HUMAN	94769.85	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX31 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=DDX31 PE=1 SV=2		●	2.125	0.0	2.7	5.7	
RL35_HUMAN	14542.56	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=RL35 PE=1 SV=2	●	●	2.063	0.3	6.3	13.0	60S ribosomal protein
ZNR46_HUMAN	62109.39	Zinc finger protein 846 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ZNF846 PE=1 SV=2		●	2.000	0.0	2.0	4.0	pre-60S complex
ZNF568_HUMAN	76600.92	Zinc finger protein 568 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=ZNF568 PE=2 SV=2		●	2.000	0.0	2.7	5.3	
TBL3_HUMAN	90346.98	Transducin beta-like protein 3 OS=Homo sapiens (Human) OX=9606 GN=TBL3 PE=1 SV=2	●	●	2.000	0.0	6.7	13.3	