

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)

タンパク質合成装置であるリボソームの生合成は、真核細胞では主に核小体で進行し、長鎖の前駆体 rRNA（脊椎動物では 47S pre-rRNA）の転写により開始される。その後、47S pre-rRNA が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。pre-rRNA のプロセッシング経路では、外部転写スペーサーと 2 ヶ所の内部転写スペーサー (ITS1 および ITS2) が、一連の切断とトリミングを受ける。また、その際に核小体では、47S pre-rRNA を中心に多数のリボソームタンパク質および非リボソームタンパク質が会合して 90S プレリボソーム粒子が形成され、その後に前駆体粒子の段階的なリモデリングを経て pre-40S および pre-60S 粒子が形成される。これらのプレリボソーム粒子は、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。この成熟過程には、様々な RNA 修飾酵素、RNA ヘリカーゼ、ATP アーゼ、GTP 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する。

NVL2 は核小体に局在するシャペロン様 ATPase であり、ATPase associated with diverse cellular activities (AAA) ファミリー II 型に属する。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。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、その一般的な機能は様々な細胞内プロセスで高分子複合体をエネルギー依存性の解離反応へと導くことである。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 WDR74 を脱会合させ、60S リボソーム形成を促進する¹⁾。また、pre-rRNA プロセ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 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²⁾。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 が果たす役割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 と強い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を解析した³⁾。

1. WDR74 モジュールは ATP 加水分解欠損型 NVL2 の発現に依存して MTR4-エキソソーム複合体と結合する

ATP 加水分解欠損変異型 NVL2(E365Q/E682Q)を細胞内に発現させると、WDR74 が MTR4-エキソソーム複合体中に顕著に蓄積し、pre-rRNA の初期プロセシングと 60S リボソーム形成が阻害される¹⁾。この現象の分子機構をより深く理解するために、野生型 NVL2 と比較して変異型 NVL2 とより強い結合能を示すタンパク質を探索した。FLAG タグ付加 NVL2 (野生型および変異型)

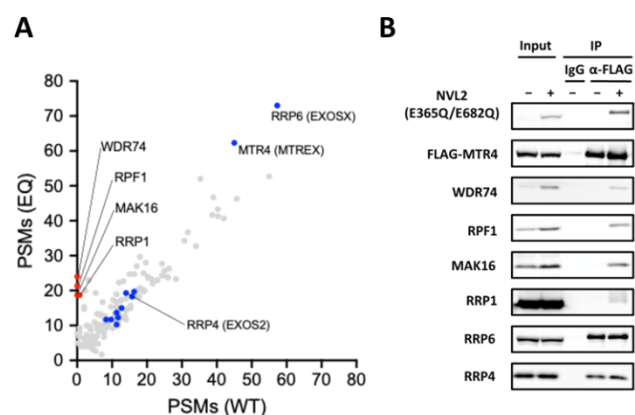


Figure 1. NVL2 と MTR4-エキソソームおよび WDR74 モジュールの結合

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 で解析した (Fig. 1A)。その結果、MTR4 および RNA エキソソームサブユニットを含むタンパク質群は、野生型および変異型 NVL2 に対して同様の結合能を示した。一方、複数のタンパク質は、変異型 NVL2 に対してより強い結合を示した。特に、RPF1、MAK16、RRP1、および WDR74 は、酵母における相同タンパク質 (Nsa1、Rpf1、Mak16、Rrp1) が複合体として 60S リボソーム生合成の初期段階に関与することが知られている。このことから、本研究においてヒト細胞より新たに同定された 4 つのタンパク質も同様に複合体 (WDR74 モジュール) を形成し、リボソーム生合成に関与することが予想された。

WDR74 モジュールを構成するタンパク質と MTR4-RNA エキソソーム複合体との結合を検証するために、変異型 NVL2 の誘導発現が可能な HEK293 細胞に FLAG-MTR4 を安定発現させ、共免疫沈降を行った (Fig. 1B)。その結果、RPF1、MAK16、RRP1、および WDR74 は、いずれも NVL2 の ATP 加水分解阻害下において MTR4 との結合が増強することが示された。次に、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、MTR4 および WDR74 モジュール構成因子間の相互作用への影響について検討した。その結果、WDR74 モジュールを構成する各タンパク質のいずれをノックダウンした場合においても、他のモジュール構成因子と MTR4 との結合に減少が見られた。

2. WDR74 モジュールの 60S リボソーム生合成における役割

WDR74 は、60S リボソームの生合成過程で機能することが知られている。そこで、WDR74 モジュールを構成する各タンパク質のリボソーム生合成における機能を解析するために、それぞれの因子をノックダウンし、ショ糖密度勾配遠心法により、リボソームサブユニット形成における影響を解析した (Fig. 2A)。その結果、WDR74 モジュールを構成するいずれのタンパク質を

ノックダウンした場合においても、60S リボソームの減少が認められた。次に、各 WDR74 モジュール構成因子の rRNA プロセッシング経路に及ぼす影響を解析した。主要なプロセッシング中間体 RNA は、ITS1 または ITS2 配列内に位置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. 2B)。その結果、WDR74 モジュールを構成するいずれのタンパク質をノックダウンした場合においても、通常の細胞では見られない 36S 中間体 RNA の異常蓄積が観察された。このことから、WDR74 モジュールの機能欠損により

ITS1 の site 2 での切断異常が引き起こされ、30S 中間体 RNA の減少および、36S 中間体 RNA の蓄積に至ったと考えられた (Fig. 2C)。これらの結果

から、WDR74、RPF1、MAK16、お

よび RRP1 が 60S リボソーム生合成経路において同一複合体の構成因子として機能していることが示された。

3. WDR74 モジュールの核内分布は ATP 加水分解欠損型 NVL2 変異体の発現により変化する

先行研究において NVL2(E365Q/E682Q)変異体を細胞内で発現させると、WDR74 が難溶性の核小体画分から可溶性の核小体/核質画分へと移行することが報告された。RPF1、MAK16、RRP1 が WDR74 と同様に NVL2 により核

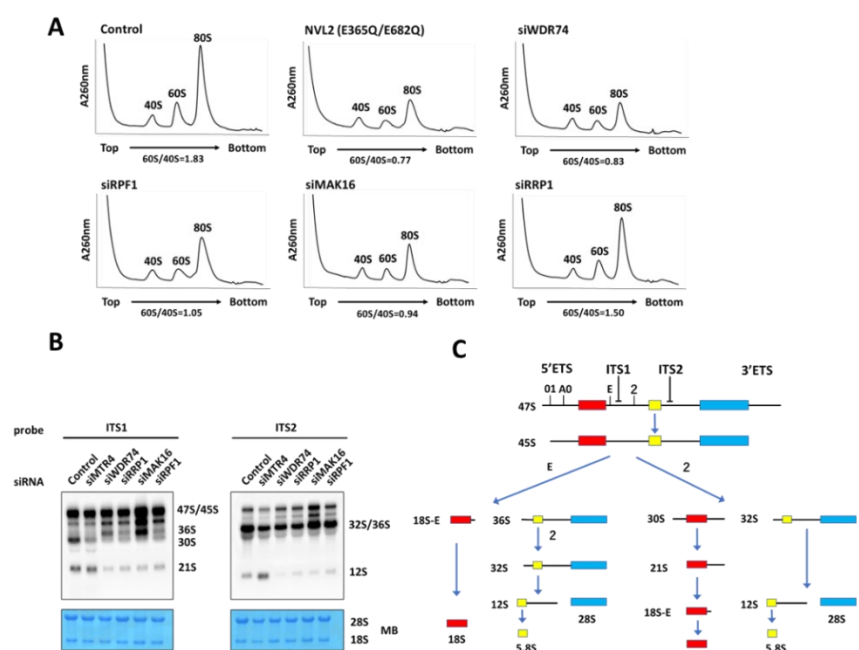


Figure 2. WDR74 モジュールの 60S リボソームサブユニット形成および rRNA プロセッシングにおける役割

内分布の変化を示すか調べるために、プレリボソームの異なる成熟段階を含む画分を分取し、ウェスタンブロッティングにより解析した (Fig. 3)。核小体マーカーのフィブリラリンと同様に、いずれの WDR74 モジュール構成因子も主に核小体の中心に隣接した DFC 画分 (SN3) に局在した一方、変異型 NVL2 の存在下では、核小体の周辺部の GC 画分 (SN2) へと分布の変化を

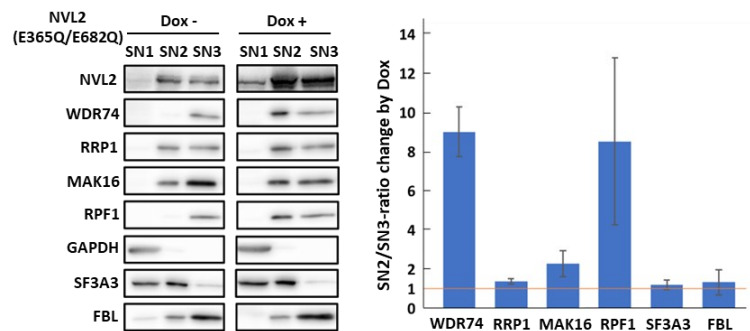


Figure 3. 変異型 NVL2 の発現による WDR74 モジュールタンパク質の核内分布への影響

起こした。この核内分布の変化はフィブリラリンでは観察されないことから、NVL2 変異体の発現によって WDR74 モジュールと MTR4-エキソソームとの相互作用に変化が生じた結果であると考えられた。

4. WDR74 の MTR4-エキソソーム複合体への蓄積は、5.8S rRNA の 3'末端成熟因子 PICT1 との会合を妨げる

MTR4-エキソソーム複合体は、rRNA プロセシングの後期において 5.8S rRNA の 3'末端成熟に必須である。核小体タンパク質 PICT1 はこの際のアダプターとして働き、5.8S rRNA の成熟化に至る中間体である 12S rRNA の 3'末端に MTR4-エキソ

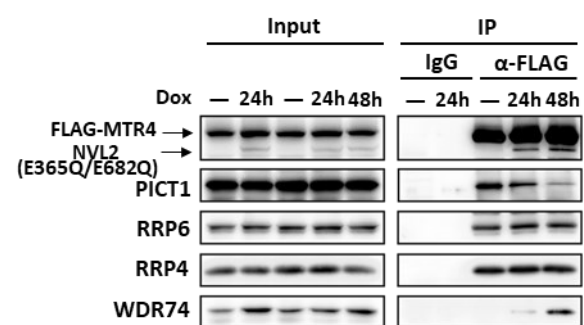


Figure 4. 変異型 NVL2 の発現により FLAG-MTR4 と PICT1 との結合が低下する

ソーム複合体をリクルートする。そこで、変異型 NVL2 の発現が MTR4 と PICT1 の相互作用に及ぼす影響を共免疫沈降により検討した (Fig. 4)。FLAG-MTR4 は、変異型 NVL2 の発現誘導後の時間に依存して WDR74 との結合増加を示した、またこの時に、PICT1 との相互作用は逆に低下する傾向を示した。

一方で、FLAG-MTR4 と RNA エキソソームサブユニット (RRP6 および RRP4) との相互作用には、変化が見られなかった。この結果から、NVL2 の ATP 加水分解を介して MTR4 から WDR74 モジュールが解離することによって、MTR4 と PICT1 の結合が促され、pre-5.8S rRNA のプロセッシングが進行する可能性が示された。

総括

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 加水分解により制御される MTR4 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。これらのタンパク質により構成される WDR74 モジュールは、pre-rRNA のプロセッシングにおいて ITS1 領域の切断に関与し、pre-60S リボソームの成熟に寄与すると考えられた。また、NVL2 の ATPase 活性を介して、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、MTR4 と PICT1 の結合が促進される。その結果、12S 中間体 RNA のプロセッシングが進行し、5.8S rRNA の形成へと至る制御メカニズムの存在が示唆された。

《参考文献》

- 1) Hiraishi N., Ishida Y., Nagahama M., *Biochem Biophys Res Commun.*, **467**, 534-540 (2015).
- 2) Miyao S., Saito K., Oshima R., Kawahara K., Nagahama M., *Biochem Biophys Res Commun.*, **637**, 203-209 (2022).
- 3) Hirooka Y., Izumikawa K., Miyao S., Ohga T., Nobe Y., Taoka M., Nagahama M., *Biochem Biophys Res Commun.*, **744**, 151175 (2025).