

核小体 AAA-ATPase NVL2により制御される新規 MTR4相互作用

タンパク質 WDR74の同定および機能解析

Identification and Functional Analysis of a Novel  
MTR4-interacting Protein WDR74 Regulated by  
Nucleolar AAA-ATPase NVL2

平成25年度入学 平石 伸宏 (Hiraishi, Nobuhiro)

指導教員 長浜 正巳

細胞内のタンパク質合成を担うリボソームは、多数のリボソームタンパク質と4種類のリボソームRNA (18S、5.8S、28Sおよび5S rRNA)から構成される巨大な分子複合体である。その分子構造はX線結晶構造によって明らかにされ、抗菌薬の標的分子としても研究にされてきた。一方、リボソームの生合成に関する分子機構には未解明の点が多く残されている。酵母を用いた解析から、リボソーム生合成には、200種類以上の生合成補助因子（トランス作用因子）の関与が示されている。リボソーム前駆体粒子が核小体から核質へと移行する過程において、これら因子の分子間相互作用が厳密に制御され、rRNA前駆体のプロセッシングが段階的に進行する。近年、リボソームの生合成異常に起因する「リボソーム病」とよばれる疾患群が報告され、医学・薬学分野においてもその生合成機構の解明は重要な課題となりつつある。

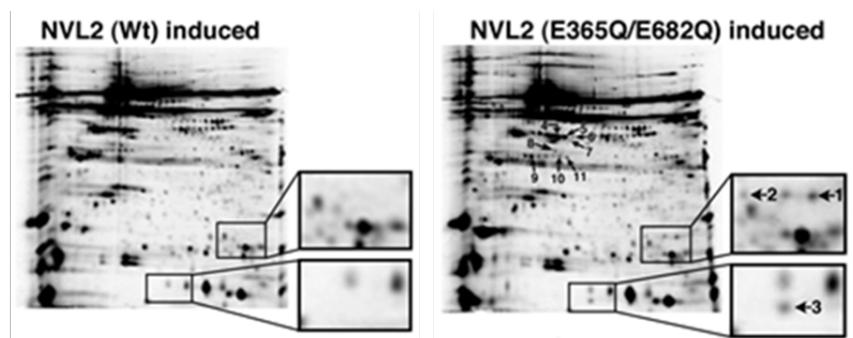
これまで当研究室では、AAAファミリーに属するシャペロン様 ATPaseである NVL2 (Nuclear VCP-like protein 2)が、ヒトのリボソーム生合成において果たす役割について解析してきた。一般に

AAA-ATPaseは、そのATPase活性を用いて分子複合体の構成因子を脱会合へと導き、複合体の構造変換や機能制御を担う特徴を有する。これまでの研究において、NVL2のATPase活性を欠損した変異体がドミナントネガティブ変異体として機能し、60Sリボソームの生合成を抑制することが示された(1)。さらにNVL2は、RNAヘリカーゼMTR4と相互作用し、エキソヌクレアーゼ複合体であるエキソソームと協調し、rRNA前駆体のプロセッシングに機能することが示唆された(2)。このことからNVL2は、MTR4やエキソソームを含むRNA代謝複合体から特定の構成因子を脱会合させ、この機能を通してrRNA前駆体のプロセッシングを制御する可能性が考えられた。しかし、その具体的な分子機序はこれまで明らかにされていなかった。本研究では、プロテオミクス的手法を用いて、NVL2により制御されるMTR4-エキソソーム複合体の相互作用因子を同定し、さらにその機能を解明することを目的とした。

### 1. NVL2が制御する新規MTR4相互作用タンパク質WDR74の同定

NVL2により制御される因子をMTR4-エキソソーム複合体から見出すために、野生型または変異型NVL2をそれぞれ発現させた細胞間において、

この複合体に含まれるタンパク質を網羅的に比較した。



**Figure 1. NVL2により制御されるMTR4相互作用タンパク質WDR74の同定**

そのために、ドキシサイクリンの添加により野生型 (Wt)または変異型 (E365Q/E682Q)のNVL2を発現する細胞を用い、これらに3×FLAG-MTR4を発現させた二重発現細胞を作製した。それぞれの

細胞株から3×FLAG-MTR4およびその相互作用タンパク質を免疫沈降法により精製し、蛍光ディフレンシャル二次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いて定量的に比較を行った。その結果、変異型NVL2の発現細胞において、3×FLAG-MTR4との相互作用が増強を示す11個のスポットを見出した (Figure 1)。これらのタンパク質をMALDI型質量分析計を用いて同定した結果、No.1-2のスポットからWDリピー

トファミリーに属するタンパク質であるWDR74が同

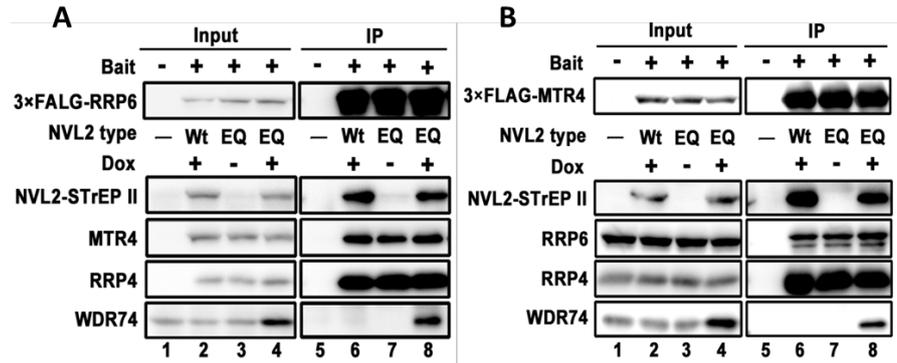


Figure 2. MTR4-exosome複合体とWDR74の相互作用解析

定された。そこで、MTR4およびエキソソームのサブユニットRRP6をそれぞれベイトとして共免疫沈降を行い、ウエスタンブロットティングによる解析を行った。その結果、変異型NVL2を発現させた場合においてのみ、WDR74とMTR4-エキソソーム複合体との相互作用が確認された (Figure 2AおよびB, lane 8)。これらの結果からWDR74は、NVL2のATPase活性により制御される新規のMTR4-エキソソーム複合体相互作用因子であることが示された<sup>(3)</sup>。

## 2. WDR74およびNVL2は、60Sリボソーム生合成においてrRNA前駆体のプロセッシングに關与する

WDR74のリボソーム生合成における機能を調べるために、WDR74をノックダウンした細胞を用い、ショ糖密度勾配遠心法により細胞質リボソームの性状を解析した (Figure 3A, BおよびC)。2種類のオリゴヌクレオチド (siWDR74-1,2) を用いてWDR74のノックダウンを行った結果、コントロールの細胞と比較して、60Sリボ

ソームを示すピークが著しい低下を示した。また、これにともない80Sリボソームの減少も認められた。その一方、40Sリボソームのピークに大きな変化は見られなかった。同様の結果は、変異型NVL2を発現させた細胞においても観察された。つぎに、rRNA前駆体のプロセッシングにおいてNVL2とWDR74が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 (Figure 3D)。ヒト細胞における

rRNA前駆体のプロセッシングには、主要経路に加えて、プロセッシングの異常に際して機能する代替経路など複数の経路が存在する。そこで、それらの経路において生じる中間体RNAを、変異型NVL2発現細胞、WDR74ノックダウン細胞、および正常細胞との間で比較し、rRNA前駆体のプ

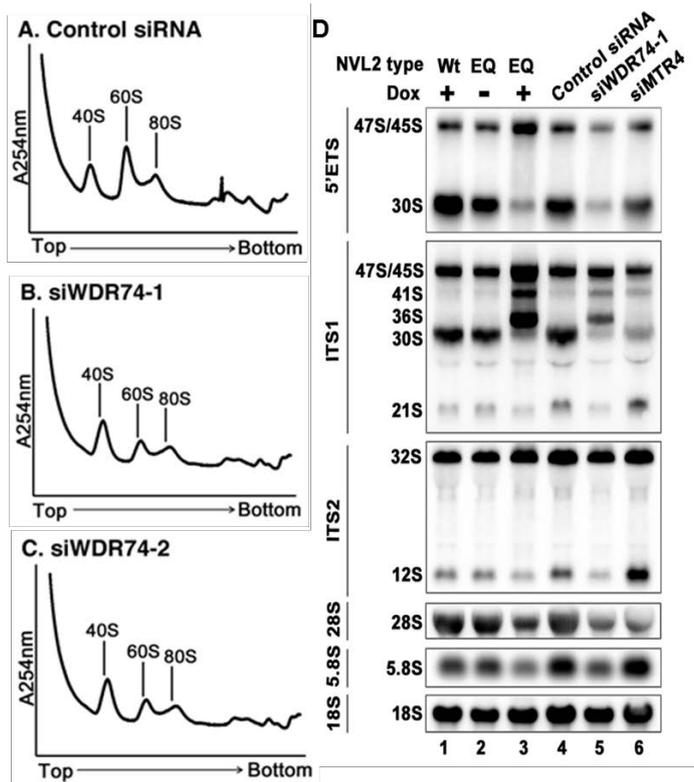


Figure 3. 60Sリボソーム生合成におけるWDR74の機能

ロセッシングにおけるWDR74およびNVL2の機能を解析した。その結果、変異型NVL2発現細胞とWDR74ノックダウン細胞では、5.8Sおよび28S成熟rRNAの減少が認められた (Figure 3D lane3および5)。さらにこれらの細胞では、正常細胞では検出されない41Sおよび36S rRNA前駆体の増加が認められた。また興味深いことに、MTR4をノックダウンした細胞では、5.8S rRNAの形成に至る下流段階のプロセッシングにおいて12S rRNA前駆体が蓄積する異常が見られた (Figure 3D lane 6)。この結果は、WDR74のノックダウン

や変異型NVL2の発現に際して見られた、プロセッシングカスケードの異常とは異なる現象を示していた。

### 3. 変異型NVL2の発現はWDR74とMTR4との相互作用を核質において増強させ、WDR74の核内分布の変化を導く

変異型NVL2を発現させた細胞では、WDR74の界面活性剤による抽出効率に変化がみられた (Figure 2AおよびB InputのWDR74)。

そこで、変異型NVL2の発現により引き起こされる、細胞内WDR74

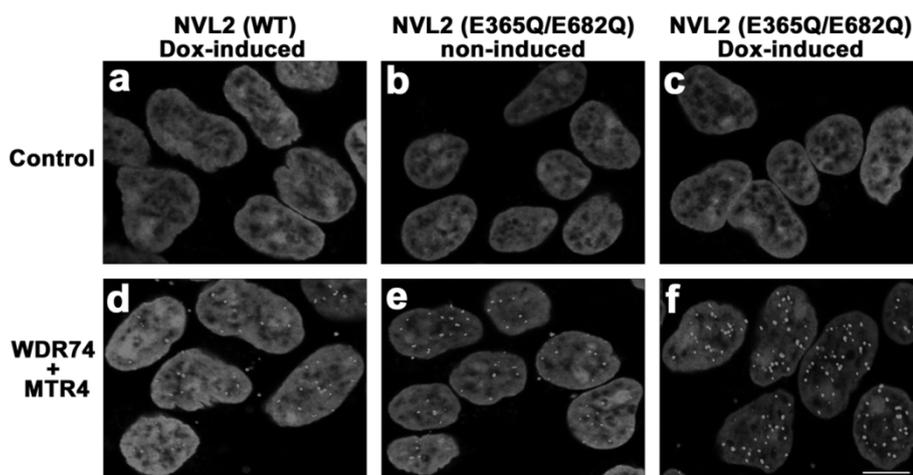


Figure 4. Duolink *in situ* proximity ligation assayを用いたMTR4-WDR74の細胞内相互作用解析

の生化学的性状および微小局在変化について詳細な検討を行った。その結果、変異型NVL2の発現細胞では、NP-40による可溶化が困難な核小体領域から、可溶化が容易な核小体領域または核質へとWDR74の分布が変化することが示された。つぎに、*in situ* PLA法を用いて、MTR4とWDR74の細胞内における分子間相互作用およびその分布を解析した。この手法は、2種類の分子に対する抗体を用いて、近接した分子間の相互作用を細胞内における蛍光シグナルとして高感度に検出するための方法である。解析の結果、変異型NVL2を発現させた細胞では、WDR74とMTR4の相互作用を示すドット状の蛍光シグナルが顕著に増加した (Figure 4f)。また得られたシグナルは、本来WDR74が局在する核小体だけでなく、核質においても認められた。この現象は、rRNA前駆体のプロセッシングカスケードが

核内で進行していく過程で、WDR74が機能的に核小体から核質へと移行する可能性を示唆する結果となった。

### 総括

本研究では、NVL2のATPase活性と共役してMTR4-エキソソーム複合体から解離される新規のリボソーム生合成補助因子としてWDR74を同定した。rRNA前駆体のプロセッシングカスケードにおいて、WDR74とMTR4は上流および下流の段階においてそれぞれ機能していた。ドミナントネガティブ変異体を用いてNVL2の機能を阻害した細胞では、WDR74の細胞内分布が、プロセッシング上流段階の場である核小体から、下流段階の場である核質へと移行していた。また、変異型NVL2の作用によるWDR74とMTR4との相互作用の増強は核質において見られた。このことからWDR74は、NVL2の作用を介して、MTR4-エキソソーム複合体との相互作用のみならず、核内における空間的制御をうけ、rRNA前駆体プロセッシングの上流から下流にいたる過程で機能する可能性が考えられた。

### 参考文献

- 1) Nagahama M., Yamazoe T., Hara Y., Tani K., Tsuji A., Tagaya M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 1075-1082 (2006).
- 2) Yoshikatsu Y., Ishida Y., Sudo H., Yuasa K., Tsuji A., Nagahama M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **464**, 780-786 (2015).
- 3) Hiraishi N., Ishida Y., Nagahama M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**, 534-540 (2015).