

がん制御タンパク質 PICT1 のリボソーム生合成における機能解析

Functional Analysis of the Cancer-Associated Protein PICT1 in
Ribosome Biogenesis

平成 31 年度入学 宮尾宗太郎 (Miyao, Sotaro)

タンパク質合成装置であるリボソームの細胞内形成は、細胞の生存や増殖にとって不可欠な生体プロセスである。リボソーム生合成は、核小体において 200 種類以上の制御タンパク質が、厳密に秩序だった機能を果たしながら進行する。一般にリボソーム生合成は、増殖速度が活発ながん細胞において亢進が認められる。一方、この過程に異常が生じた細胞では、核小体ストレス応答が誘発され、がん抑制因子 p53 の活性化を介して細胞増殖の停止やアポトーシスが引き起こされる。

リボソームの形成過程においては、核小体で一次転写産物として生成した長鎖の rRNA 前駆体が、複数のヌクレアーゼによる作用を受けて段階的に成熟する。この RNA プロセシングの過程で主要な役割を果たすヌクレアーゼ複合体として、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する RNA エキソソームが知られている。RNA エキソソームは、2 個の触媒サブユニット (RRP6、DIS3) を含んだ合計 11 個のサブユニットから形成され、細胞内における様々な RNA の分解やプロセシングに機能している。また、核内で機能する RNA エキソソームに必須の補助因子として、RNA ヘリカーゼ MTR4 が存在する。MTR4 には、さらに多様なコファクターやアダプターが結合し、これによって RNA エキソソームのヌクレアーゼ活性や基質選択性が制御されている。

近年、出芽酵母のリボソーム生合成因子 Nop53 が Mtr4-エキソソーム複合体と相互作用し、この複合体を rRNA 前駆体の特定部位に導くアダプターとして機能していることが報告された。¹⁾興味深いことに、Nop53 のヒトにおける相同分子は PICT1 と呼ばれる既知タンパク質であった。PICT1 は、核小体ストレス応答に関連した細胞増殖制御因子として知られ、臨床研究においては、がんの予後マーカーとして注目されている分子であった。しかし、ヒト細胞における PICT1 と MTR4 の機能的関連やリボソーム生合成における機能は不明である。そこで本研究では、PICT1 と MTR4-エキソソームの相互作用が、ヒト細胞のリボソーム生合成において果たす機能を解析し、rRNA 前駆体プロセッシングと細胞増殖制御の接点において、PICT1 が果たす役割を解明することを目的とした。

1. ヒト PICT1 と MTR4-エキソソームの相互作用解析

はじめに、ヒト細胞において、PICT1 と MTR4-エキソソームとが結合する可能性について検証した。Flp-In T-REx-293 細胞において、FLAG タグを付加した MTR4 または RRP6 を発現させ、共免疫沈降法による結合解析を行った。その結果、予想に従って、FLAG-MTR4 (Fig. 1A) および FLAG-RRP6

(Fig. 1B) が、内在性 PICT1 と結合することが確認された。

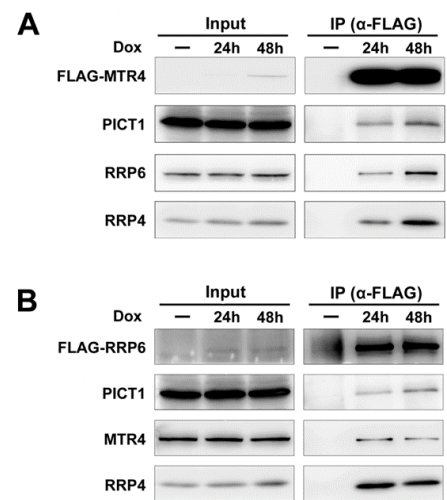


Figure 1. MTR4-エキソソームと PICT1 の結合解析

2. ヒト PICT1 のリボソームサブユニット形成における役割

酵母 Nop53 は、リボソーム生合成の過程で、rRNA 前駆体のプロセッシングに機能するタンパク質である¹⁾。そこで、ヒト細胞においても、PICT1 がリ

ボソームサブユニットの形成に機能しているか検討することにした。Flp-In T-REx-293 細胞において、siRNA を用いて PICT1 をノックダウンした後、ショ糖密度勾配遠心法により分離した細胞質リボソームを、RNA の吸光度を指標に検出した (Fig. 2)。その結果、60S リボソーム

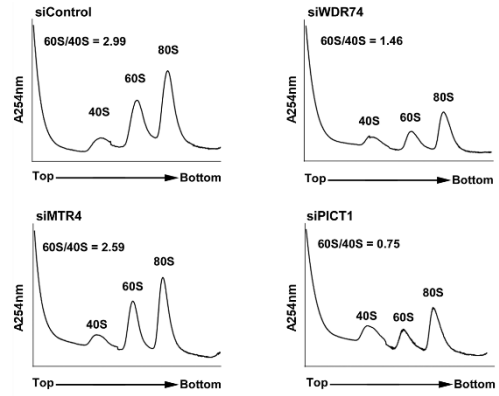


Figure 2. PICT1 のリボソームサブユニット形成における役割

の形成因子として知られる WDR74 のノックダウンと同様に、PICT1 のノックダウンにおいても 60S リボソームを示すピークの減少が認められた。このことから、ヒト細胞において、PICT1 が 60S リボソームの形成機構に参与していることが示唆された。

3. ヒト PICT1 の rRNA 前駆体プロセッシングにおける役割

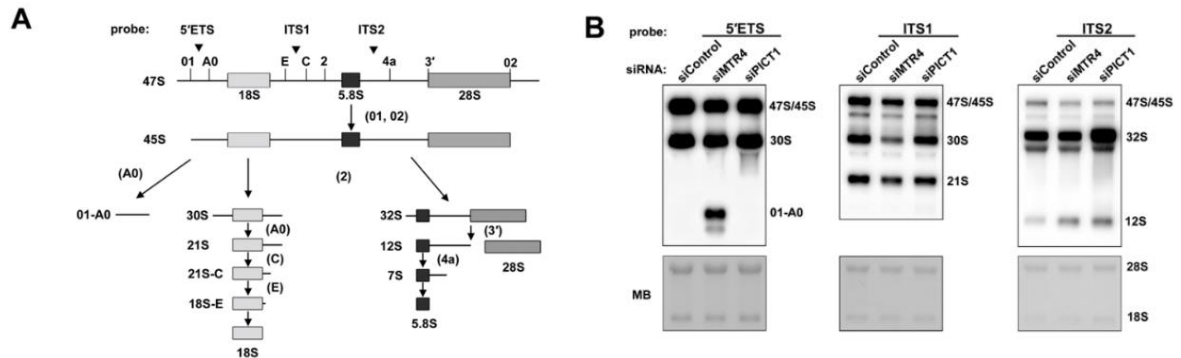


Figure 3. PICT1 の rRNA 前駆体プロセッシングにおける役割

リボソームを構成する 18S、5.8S および 28S rRNA は、長鎖前駆体 RNA (47S pre-rRNA) の部分配列としてはじめに転写される。47S pre-rRNA には 4 カ所のスペーサー領域 (5'-ETS、ITS1、ITS2、3'ETS) が含まれるが、これらの領域は複数のヌクレアーゼの作用により段階的に切除され、成熟 rRNA が形成される (Fig. 3A)。このようにして前駆体 RNA から形成された rRNA のうち、5.8S および 28S rRNA は 60S サブユニットに、そして 18S rRNA は 40S サブユニットにそれぞれ組み込まれる。この一連の過程において、MTR4-エキソソームは、5'-ETS (01-A0) フラグメントの分解、18S rRNA

の 3' 末端形成、および 5.8S rRNA の 3' 末端形成の段階でそれぞれ機能している。また酵母では、5.8S rRNA の 3' 末端形成段階へと Mtr4-エキソソームをリクルートするアダプターとして、Nop53 の機能が示されている²⁾。そこで、ヒト細胞の rRNA 前駆体プロセッシングにおいて PICT1 の機能を検証するために、PICT1 をノックダウンし、rRNA 前駆体のスペーサー領域に特異的なプローブを用い、ノーザンブロット解析を行った (Fig. 3B)。その結果、PICT1 のノックダウンにより、5.8S rRNA 形成の直前の中間体である 12S RNA の蓄積が観察された。さらに予想外の結果として、12S 中間体よりも上流に位置する 32S 中間体 RNA にも蓄積が認められた。このことから、ヒト PICT1 は、5.8S rRNA の形成に至る RNA プロセッシング経路において、上流と下流の異なる 2 つの段階で機能していることが示唆された。

4. PICT1 の AIM 配列が MTR4 との結合および rRNA 前駆体プロセッシングにおいて果たす機能

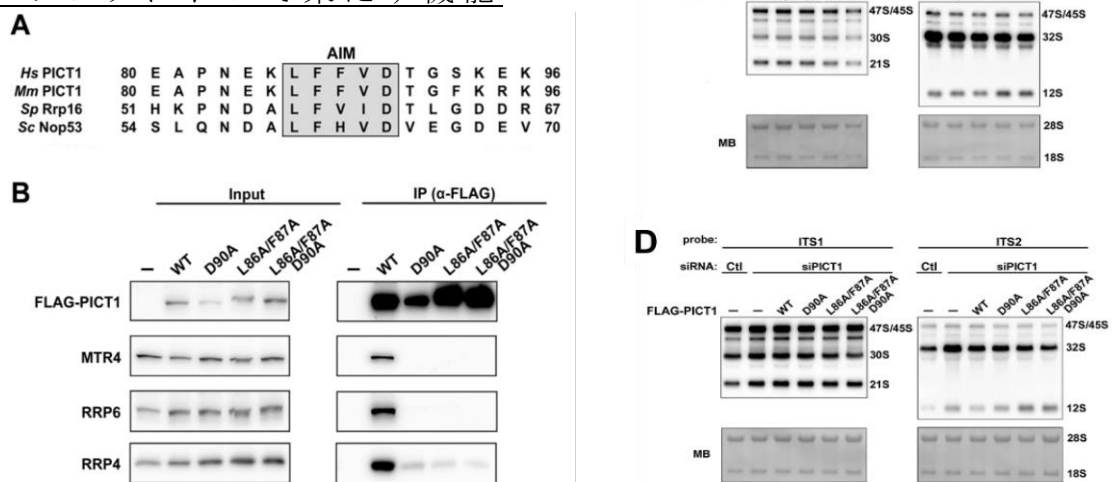


Figure 4. PICT1 の AIM 配列が MTR4 との結合および rRNA 前駆体プロセッシングにおいて果たす機能

酵母 Nop53 において、Mtr4 との相互作用に重要な共通配列として、AIM (Arch-Interacting-Motif) と呼ばれるアミノ酸配列が報告された¹⁾。この配列は、ヒト PICT1 においてもよく保存されていた (Fig. 4A)。そこで、ヒト PICT1 の AIM 配列にアミノ酸置換を導入した 3 種類の変異体 (D90A、L86A/F87A、L86A/F87A/D90A) を作成した。これらの変異

型 PICT1 を Flp-In T-REx-293 細胞に発現させ、内在性 MTR4-エキソソームとの結合を共免疫沈降法により解析した (Fig. 4B)。その結果、PICT1 の AIM 配列変異は、MTR4 やエキソソーム構成タンパク質 (RRP6、RRP4) との結合能に、著しい低下をもたらした。次に、これらの PICT1 変異体を HeLa 細胞にて一過的に発現させ、rRNA 前駆体プロセッシングへの影響をノーザンブロットィングにより解析した (Fig. 4C)。その結果、これらの細胞では、PICT1 のノックダウンと同様に、12S 中間体 RNA の蓄積が確認された。しかし、ノックダウンで見られた 32S 中間体 RNA の蓄積は認められなかった。そこで、内在性 PICT1 をノックダウンした細胞に、野生型または AIM 変異型の PICT1 をトランスフェクションし、ノックダウン効果の回復について検討した (Fig. 4D)。その結果、PICT1 の AIM 配列変異体は、32S 中間体 RNA の蓄積を解消することはできたが、12S 中間体 RNA の蓄積は解消されなかった。これらの結果から、PICT1 が関与する 2 つのプロセッシング過程のうち、AIM 配列と MTR4-エキソソームとの相互作用は、12S 中間体から 5.8S rRNA が形成する段階のみに必要であると考えられた。

5. PICT1 および MTR4 の核小体ストレス応答における役割

PICT1 は、MDM2-p53 経路に依存した核小体ストレス応答機構において、制御因子の一つとして機能している。PICT1 の減少は核小体ストレス応答を促進し、p53 タンパク質の蓄積やアポトーシスを引き起こすことが知られている²⁾。そこで、PICT1 の減少と同様に、MTR4 の減少が p53 タンパク質の蓄積を誘導するかを検討した。その結果、大腸がん由来 HCT116 細胞 (Fig. 5) および骨肉

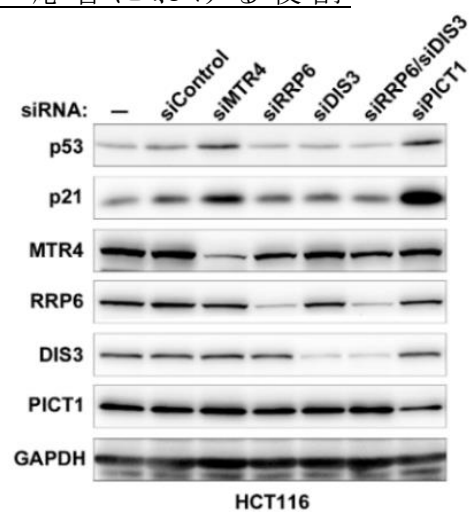


Figure 5. PICT1 および MTR4 のノックダウンによるがん抑制因子 p53 への影響

腫由来 U2OS 細胞において、MTR4 または PICT1 をノックダウンした場合には、p53 の蓄積が認められた。しかし、RNA エキソソームの触媒サブユニットである RRP6 または DIS3 のノックダウンでは、そのような効果が認められなかった。以上の結果から、核小体ストレス応答における p53 経路の活性化は、RNA のプロセッシング機能そのものではなく、PICT1 と MTR4 の物理的相互作用により制御されているのではないかと考えられた。

総括

本研究では、ヒト細胞において PICT1 が AIM 配列依存的に MTR4-エキソソームと相互作用することを示した³⁾。また、この相互作用は、12S 中間体 RNA が 5.8S rRNA へと成熟するプロセッシングに重要であると考えられた。また、PICT1 は 32S 中間体 RNA のプロセッシングにも機能していたが、この過程では AIM 配列の機能を必要としないことから、12S 中間体 RNA のプロセッシングとは異なる機序で PICT1 が機能していると考えられた。また、ヒトなどの多細胞生物では、核小体ストレスによる細胞増殖の制御機構において、PICT1 と MTR4 の相互作用が p53 量の調節に関与していると考えられた。このことは、MTR4-エキソソームと PICT1 の分子間相互作用が、がん治療の新たなターゲットになりうる可能性を示している。

《参考文献》

- 1) Thoms T., Thomson E., Baßler J., Gnadig M., Griesel S., Hurt E., *Cell.*, **162**, 1029-1038 (2015).
- 2) Sasaki M., Kawahara K., Nishio M., Mimori K., Kogo R., Hamada K., Itoh B., Wang J., Komatsu Y., Yang Y.R., Hikasa H., Horie Y., Yamashita T., Kamijo T., Zhang Y., Zhu Y., Prives C., Nakano T., Mak T.W., Sasaki T., Maehama T., Mori M., Suzuki A., *Nat. Med.*, **17**, 944-951 (2011).
- 3) Miyao S., Saito K., Oshima R., Kawahara K., Nagahama M., *Biochem Biophys Res Commun.*, **637**, 203-209 (2022).