

論文審査の結果の要旨

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

論文提出者 平石 伸宏 (Hiraishi, Nobuhiro)

細胞のタンパク質合成装置として機能するリボソームは、多数のタンパク質とRNAから構成される複合体であり、多様な生合成補助因子がその構築に関与している。核小体で形成されたリボソーム前駆体粒子は、核質を経て細胞質へと移行し、その過程においてrRNA前駆体が段階的なプロセッシングを受けて、成熟型のrRNAが生成する。この間に生じる分子間相互作用は厳密に制御され、その異常は様々な疾患との関連が報告されている。AAAファミリーに属するシャペロン様ATPaseであるNVL2は、この過程においてRNAヘリカーゼMTR4およびエキソヌクレアーゼ複合体エキソソームからなるRNA代謝複合体に作用し、複合体の脱会合制御を介してリボソーム生合成に寄与すると考えられている。本研究は、プロテオミクスの手法を用い、NVL2の制御下においてMTR4-エキソソーム複合体と相互作用する因子を同定し、さらにその機能解明を目的としたものである。

まず、申請者は、NVL2の制御下でMTR4-エキソソーム複合体と相互作用する因子を見出すために、ドミナントネガティブ変異型NVL2を発現させた

細胞において、この複合体に含まれるタンパク質を分離した。蛍光ディフュージョン二次元電気泳動法を用いて、それらを正常な細胞と定量的かつ網羅的に比較した結果、変異型 NVL2 の発現により MTR4 との結合増加を示すタンパク質として WDR74 の同定に至った。

次に、申請者は、WDR74 のリボソーム生合成における役割を調べるために、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る細胞質リボソームの性状解析を行った。その結果 WDR74 は、NVL2 と同様に 60S リボソームの形成に寄与することが示された。次に申請者は、rRNA 前駆体のプロセッシングにおいて WDR74 が果たす役割をノーザンブロットイングにより解析した。rRNA 前駆体のプロセッシング過程で生じる中間体 RNA を、WDR74 ノックダウンの有無において比較した結果、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。さらにこれらの細胞では、正常細胞でほとんど検出されない 41S および 36S 中間体 RNA 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 の形成に至るプロセッシングの最終段階に異常が見られるのに対して、WDR74 のノックダウンにより生じるプロセッシングカスケード上流の異常は観察されなかった。

さらに申請者は、変異型 NVL2 の発現により、細胞内の WDR74 に引き起こされる生化学的な性状および局在の変化について検討を行った。その結果、変異型 NVL2 の発現は、WDR74 の界面活性剤による抽出効率の変化や、核小体から核質への部分的な局在変化を引き起こすことが示された。次に、*in situ* PLA 法を用いて、MTR4 と WDR74 の細胞内における相互作用解析を行った。その結果、両者の相互作用は変異型 NVL2 の発現により増加し、それらは主に核質において認められた。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する過程において、WDR74 が核小体から核質へと

機能的に移行する可能性を示すものであった。

以上の研究から、本論文は、MTR4-エキソソーム複合体との相互作用が NVL2 の ATPase 活性により制御される新規のリボソーム生合成補助因子として WDR74 の同定について報告し、その rRNA 前駆体プロセッシングにおける機能を明らかにしている。さらに本論文は、NVL2 を介した核内における WDR74 の空間的制御の意義について言及するなど、新規性と独創性に富むものである。したがって、本論文は博士（薬科学）の学位に十分値するものと認める。

平成 28 年 3 月 1 日

主査 明治薬科大学 教授

長 浜 正 巳 印

副査 明治薬科大学 教授

小笠原 裕 樹 印

副査 明治薬科大学 教授

紺 谷 圈 二 印