

核小体 RNA 分解に関わるヒト TRAMP 様複合体に関する研究

Study on the Human TRAMP-like Complex Involved in
the Nucleolar RNA Degradation

平成 25 年度入学 須藤遥 (Sudo, Haruka)

指導教員 長浜正巳

RNA エキソソームは、細胞内 RNA の分解において主要な役割を果たす 3'-5'エキソヌクLEASE 複合体である。9 個のサブユニットからなるコアエキソソームは、種類の異なる触媒サブユニットと結合し、様々な基質 RNA に作用する。エキソソームの細胞内局在や基質特異性は、触媒サブユニットの違いに加え、相互作用する補助因子の種類によっても規定される。核では、RRP6 が触媒サブユニットとして用いられる(核エキソソーム)。RRP6 には、さらに RNA ヘリカーゼ MTR4 や核酸結合タンパク質 C1D などの補助因子が相互作用し、rRNA 前駆体などの核内 RNA の分解またはプロセッシングに機能する。

当研究室では、核小体において MTR4 と特異的に相互作用するタンパク質として Nuclear VCP-like protein 2 (NVL2)を同定し、これらが核エキソソームと共に rRNA 前駆体の成熟過程に寄与することを示してきた¹⁾。さらに、NVL2 が制御する MTR4-エキソソーム複合体の相互作用因子として WDR74 を同定した。プロテオーム解析技術の進展により、MTR4 には他にも様々な相互作用因子の存在が示された。このことから、MTR4 は相互作用タンパク質

を巧みに使い分けることにより、高等真核生物の RNA 代謝に多様性をもたらしていると考えられる。従って、MTR4 の相互作用因子の性質を解析することは、核エキソソームの機能解明において極めて重要な課題である。

酵母では、Mtr4 (ヒト MTR4 のオルソログ) がポリ(A)ポリメラーゼ Trf4/5 および RNA 結合タンパク質 Air1/2 と共に TRAMP (Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation) 複合体を形成し、核エキソソームの補助因子として機能することが報告されている²⁾。TRAMP 複合体は、基質 RNA の 3'末端をポリアデニル化することにより、核エキソソームによる 3'-5' RNA 分解を促進する。ヒトにおいても同様の仕組みが予想されたが、MTR4 以外にはヒトホモログの存在が示されていなかった。本研究では、酵母 Trf4/5 および Air1/2 に相当するヒト因子として PAPD5 (PAP-associated domain-containing protein 5) および ZCCHC7 (Zinc finger CCHC domain-containing protein 7) を見出し、それらの MTR4 および核エキソソームとの相互作用について解析を行った。さらに、ヒト TRAMP 様複合体の役割を明らかにするために、核小体 RNA 分解におけるエキソソームおよび TRAMP 様複合体の機能解析を行った。

1. PAPD5 および ZCCHC7 は TRAMP 様複合体の構成因子である

酵母 Trf4/5 および Air1/2 のヒトオルソログを明らかにするため、BLAST によるホモロジーサーチを行った。その結果、全アミノ酸配列において高い相同性を示すタンパク質は見出されなかったが、機能ドメインに絞った検索においては、PAPD5 および ZCCHC7 がそれぞれ検出された (Fig. 1)。これら 2 つのタンパク質に関して蛍

光抗体法により細胞内局在を調べたところ、PAPD5 は主に核質に分布し、核小体マーカーであるヌクレオリンとも部分的に共局在が示された(Fig. 1A)。また、ZCCHC7 は主に核小体に局在することが明らかとなった(Fig. 1B)。

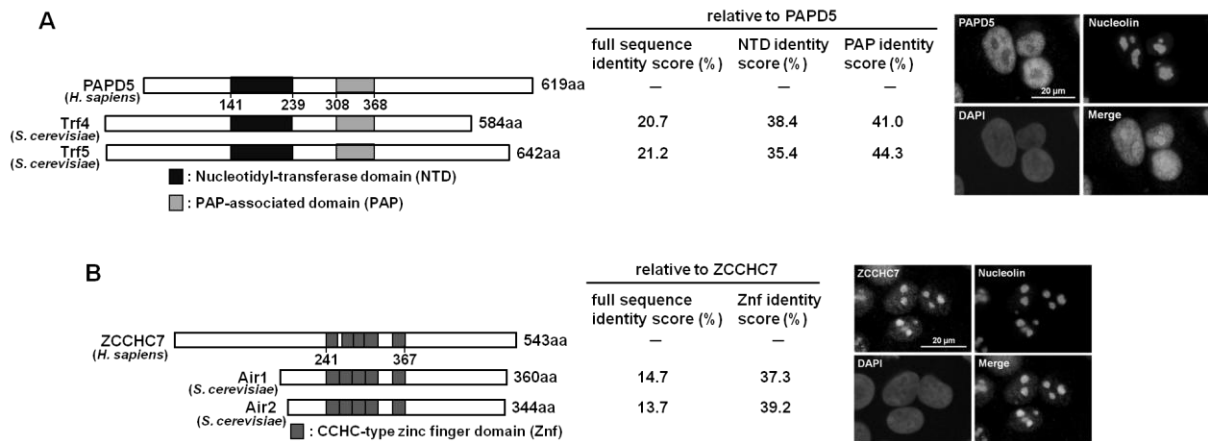


Figure 1. PAPD5 および ZCCHC7 のアミノ酸配列相同性および細胞内局在

次に、PAPD5 および ZCCHC7 が MTR4 や核エキソソームと相互作用するかどうかを調べるために、FLAG タグを付加した PAPD5 または ZCCHC7 を Flp-In T-REx-293 細胞に発現させ、共免疫沈降を行った。その結果、いずれのタンパク質をベイトとした場合においても、MTR4 および核エキソソームが共沈し、さらに PAPD5 および ZCCHC7 との相互作用が確認された(Fig. 2A, B)。また、内在性の PAPD5 または ZCCHC7

を免疫沈降した場合においても、これらの因子の相互作用が確認された(Fig. 2C, D)。さらに、MTR4 または RRP6 をベイトに共免疫沈降を行った場合にも、同様の相互作用が確認された。以上の結果から、

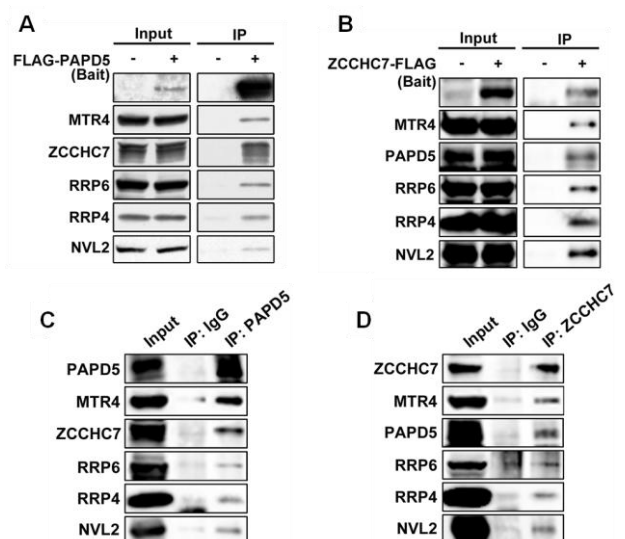


Figure 2. ZCCHC7 および PAPD5 は MTR4、核エキソソームと相互作用する

PAPD5 および ZCCHC7 は、MTR4 と共に TRAMP 様の複合体を形成し、核エキソソームと相互作用することが明らかになった。

2. ヒト TRAMP 様タンパク質の相互作用において RRP6 は重要な役割を担う

近年、RNA の分解およびプロセシングの過程において、様々な RNA 結合タンパク質や RNA 修飾酵素とエキソソームとの相互作用が MTR4 により仲介されることが示されている。従って、TRAMP 様複合体と核エキソソームとの相互作用においても MTR4 が重要な役割を果たすと推定された。そこで、MTR4 の発現抑制がそれらの相互作用に及ぼす影響について調べた。まず、FLAG-RRP6 をベイトとした免疫沈降に際し MTR4 をノックダウンしたところ、過去の報告と同様に¹⁾、NVL2 との相互作用に減少が認められた。この結果を踏まえ、PAPD5 および ZCCHC7 との相互作用についても検討したが、意外にも変化がほとんどみられなかった (Fig. 3A)。

FLAG-PAPD5 または ZCCHC-FLAG をベイトとした場合でも同様に、これらと核エキソソームとの相互作用に影響はみられなかった。このことから、MTR4 は TRAMP 様複合体と核エキソソームとの相互作用において、直接的には寄与しないことが示唆された。

当研究室では、MTR4 が RRP6 を介してエキソソーム

と相互作用することを報告した¹⁾。従って、RRP6 には触媒サブユニットとしての働きだけではなく、MTR4 などの補助因子がエキソソームと相互作用するための場としての役割が考えられた。そこ

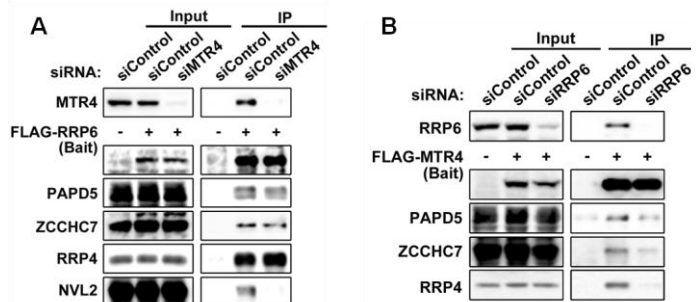


Figure 3. TRAMP 様複合体の形成における MTR4 と RRP6 の役割

で次に、RRP6の発現抑制によるTRAMP様タンパク質の分子間相互作用への影響を調べた。FLAG-MTR4をベイトとした免疫沈降に際しRRP6をノックダウンしたところ、RRP4との相互作用が減少し¹⁾、さらにPAPD5およびZCCHC7との結合低下もみられた(Fig. 3B)。また、FLAG-PAPD5またはZCCHC7-FLAGをベイトとした場合においても、エキソソームおよびMTR4との相互作用に減少がみられた。以上の結果から、RRP6はTRAMP様タンパク質とエキソソームの相互作用、およびTRAMP様複合体の維持において重要な役割を果たすことが示された³⁾。

3. rRNAの形成過程におけるTRAMP様タンパク質の機能解析

リボソームを構成するrRNAは、47S rRNA前駆体として転写された後に、複数段階のプロセッシングを経て成熟体へと変換される(Fig. 4A)。MTR4やRRP6は、この過程において複数の段階で機能することが示唆されている。また、この過程で切り出される5'ETS由来RNA断片の分解においても、MTR4およびRRP6が機能することが報告されているが、TRAMP様タンパク質の

関与については示されていない。そこで、PAPD5とZCCHC7がその分解に機能するかを調べた。TRAMP様タンパク質またはRRP6をそれぞれノックダウンした細胞からRNAを抽出し、ノーザンブ

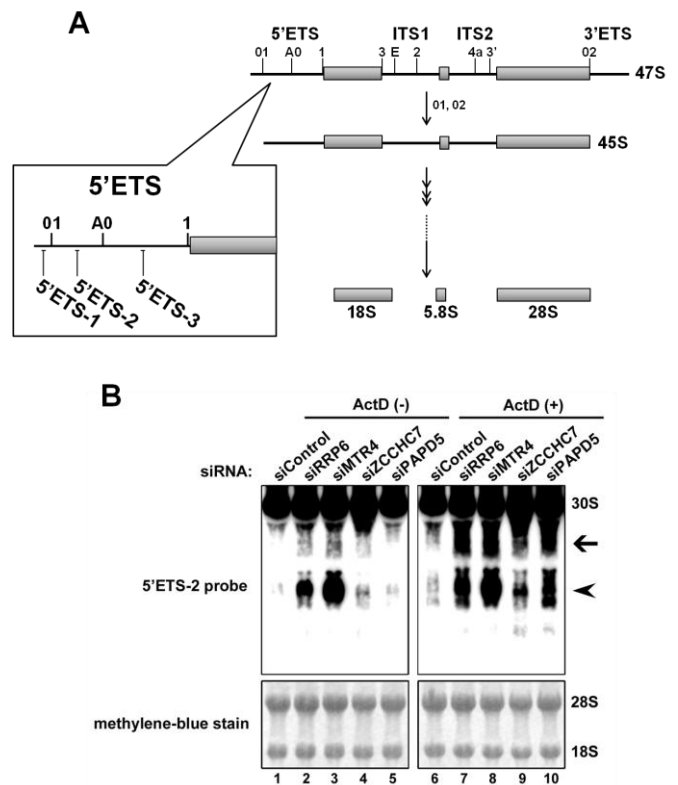


Figure 4. rRNA前駆体5'ETS断片の分解におけるTRAMP様複合体の役割

ロットティングによる解析を行った。その結果、いずれの場合においても、5'ETS 領域に由来した大きさの異なる 2 種類の RNA 断片の蓄積がみられた (Fig. 4B, lane 2-5, 矢印および矢頭)。また、低濃度の転写阻害剤アクチノマイシン D (ActD) で処理したところ、ZCCHC7 および PAPD5 のノックダウンにおいて、RNA 断片の蓄積に著しい増加がみられた (Fig. 4B, lane 9 および 10)。以上の結果から、TRAMP 様複合体は rRNA の形成過程において、エキソソームによる 5'ETS RNA 断片の分解に寄与することが示唆された³⁾。

総括

本研究では、ヒト細胞において PAPD5 および ZCCHC7 が、TRAMP 様の複合体を形成し、核エキソソームと相互作用することを明らかにした。酵母では、Trf4/5、Air1/2、および Mtr4 の 3 者のみで安定な TRAMP 複合体を形成する。これに対し、ヒト TRAMP 様タンパク質の分子間相互作用には、RRP6 の存在が不可欠であることが示唆された。従って、ヒト TRAMP 様タンパク質は、酵母 TRAMP 複合体とは性質の異なる相互作用機序を有すると考えられた。また、rRNA の形成過程において、ZCCHC7 および PAPD5 は、エキソソームと共に 5'ETS に由来した RNA 断片の分解に関与することが示された。

《参考文献》

- 1) Yoshikatsu Y., Ishida Y., Sudo H., Yuasa K., Tsuji A., Nagahama M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **464**, 780-786 (2015).
- 2) LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petflaski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D., *Cell*, **121**, 713-724 (2005).
- 3) Sudo H., Nozaki A., Uno H., Ishida Y., Nagahama M., *FEBS Lett.*, **590**, 2963-2972 (2016).