

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790095

研究課題名(和文)核小体シャペロンNVL2が制御するrRNAプロセシング複合体のプロテオミクス解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis of rRNA-processing complex regulated by nucleolar chaperon NVL2

研究代表者

石田 洋一(Ishida, Yo-ichi)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90510454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：AAAファミリータンパク質は、そのATPase活性により分子複合体の脱会合を制御するシャペロン様の機能を持つ。核小体AAA-ATPase NVL2は、60Sリボソーム生合成を制御し、その分子機構にRNAヘリカーゼDOB1/MTR4との相互作用が重要である。従って、NVL2の脱会合因子はDOB1含有複合体中に存在することが予想されていた。本研究によって、まず、DOB1の相互作用タンパク質を網羅的に同定する実験系を確立することができた。さらに、この手法を用いて、NVL2のATPase依存的な脱会合因子として、DOB1含有複合体からSPF30およびWDR74を世界に先駆けて同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：AAA family proteins regulate the dissociation of molecular complexes by their ATPase activities. Nucleolar AAA-ATPase NVL2 regulates the biogenesis of 60S ribosome via the interaction with RNA helicase DOB1/MTR4. Therefore, it is suggested that there are dissociating factors regulated by NVL2 in DOB1-containing complex. However, the dissociating proteins are not yet to be identified. In this study, the experimental system that DOB1-interacting proteins could be comprehensively identified was first established by proteomics using fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometric analysis. Using this system, SPF30 and WDR74 were identified as the dissociating-factors regulated by NVL2 from DOB1-containing complex.

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：生化学

キーワード：プロテオーム リボソーム生合成 NVL2 DOB/MTR4 SPF30 WDR74

1. 研究開始当初の背景

AAA ファミリータンパク質は、その ATPase 活性を用いて分子複合体から構成因子を脱会合するシャペロン様の機能を持つ。細胞内においては、分子複合体の立体構造制御を通じて、様々な細胞機能に関与することが知られており、当研究グループでは、核小体 AAA-ATPase NVL2 の機能解析を進めている。

タンパク質翻訳装置であるリボソームは、4 種類の rRNA (28S、18S、5.8S、および 5S) と約 80 種類のリボソームタンパク質から構成される巨大分子複合体である。その生合成は、200 種類以上の補助因子群 (分子シャペロン、ヌクレアーゼ、RNA ヘリカーゼなど) によって制御されており、rRNA 前駆体のプロセッシングに伴い、構成・制御タンパク質間の相互作用が複雑に交錯し、核小体から細胞質まで前駆粒子が移動しながら進行する。

当研究グループでは、リボソーム生合成における NVL2 の機能解析を進めている。これまでの解析により、NVL2 はその ATPase 活性により 60S リボソームの生合成を制御すること、また、その分子機構として、RNA ヘリカーゼ DOB1/MTR4 やヌクレアーゼ複合体であるエキソソームとの相互作用が重要であることを明らかにしてきた。さらに、海外の別の研究グループから、酵母において、MTR4 はエキソソームと機能協調して、RNA の分解やプロセッシングに関わるとの報告がなされていた。

AAA ファミリーの一般的機能から考えると、NVL2 は DOB1 を構成因子とする分子複合体から何らかの因子を脱会合することにより、60S リボソーム生合成、特に rRNA プロセッシングに関与する分子機構が予想される。しかしながら、NVL2 の脱会合因子は未だ同定されておらず、リボソーム生合成の分子機構解析を進める上で大きな課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究は、NVL2 が制御する脱会合因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 安定発現細胞株の作製

HEK293 細胞に、NVL2 野生型または ATPase ドメイン変異型 E365Q/E682Q をトランスフェクションし、さらに 3xFLAG タグを付加した DOB1 (3xFLAG-DOB1) をトランスフェクションすることにより、NVL2 と 3xFLAG-DOB1 の二重安定発現細胞株を作製した。なお、NVL2 の発現は、ドキシサイクリン (Dox) の添加によって誘導することができる。

(2) 共免疫沈降法

作製した細胞から DOB1 含有複合体を精製するため、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用

いた共免疫沈降法を行った。細胞を可溶化した後、抗 FLAG 抗体固定化ビーズ (和光純薬) を処理することにより、ベイトの FLAG-DOB1 とその相互作用タンパク質をビーズに結合させた。ビーズを洗浄した後、FLAG ペプチドを用いて競合的に溶出し、DOB1 含有複合体画分とした。

(3) 蛍光ディフアレンシャル二次元電気泳動

DOB1 含有複合体画分に含まれるタンパク質を分離・検出するため、蛍光ディフアレンシャル二次元電気泳動 (2D-DIGE) を用いた。DOB1 含有複合体画分中のタンパク質を PAGE Clean Up Kit (ナカライテスク) を用いて沈殿させた後、タンパク質蛍光ラベル化剤 IC3-OSu または IC5-OSu (いずれも同仁化学) を用いて蛍光ラベルを施した。タンパク質サンプルをプロテアイン IEF セル (バイオラッド) を用いて等電点分離した後、さらに SDS-PAGE を行うことにより二次元分離した。タンパク質の検出・定量は、Typhoon (GE ヘルスケア) を用いて行った。

(4) タンパク質の同定

タンパク質の同定はゲル内消化およびペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法により行った。タンパク質分離したゲルを銀染色 MS キット (和光純薬) を用いて染色した後、興味あるタンパク質のバンドまたはスポットを切り出した。ゲル片を還元・アルキル化およびトリプシン処理した後、生じた消化ペプチドを抽出した。MALDI 型質量分析計 UltrafleXtreme (ブルカーダルトニクス) を用いて消化ペプチドの質量を測定し、マスショットサーチ (マトリックスサイエンス) を行うことによりタンパク質を同定した。

(5) ウェスタンブロッティング

タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜に転写した。転写後の膜をブロッキングした後、1 次抗体および HRP 標識 2 次抗体で処理した。膜を洗浄後、特異的バンドを化学発光検出した。

4. 研究成果

(1) 二重安定発現細胞の基本的性質

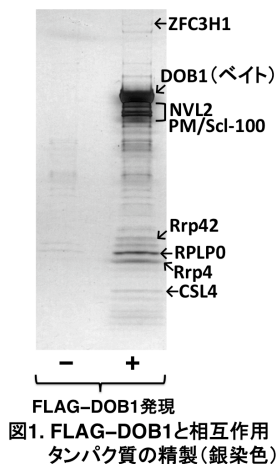
HEK293 細胞に NVL2 と 3xFLAG-DOB1 をトランスフェクションすることにより二重発現細胞を作製した。まず、作製した細胞の基本的性質を明らかにするため、間接蛍光抗体法により細胞内分布を調べた。その結果、NVL2 は核小体に局在した。3xFLAG-DOB1 は核小体を含む核全体に分布し、内在性タンパク質の分布と一致した。また、NVL2 E365Q/E682Q 変異型の発現により分布に変化は見られなかった。

次に、エキソソームとの相互作用について調べるため、3xFLAG-DOB1 をベイトにした共免疫沈降法とウェスタンブロッティング

を行った。その結果、エキソソームサブユニットである PM/Scf-100 や RRP4 の共沈が認められ、NVL2 野生型と E365Q/E682Q 変異型発現の間で共沈量に違いは見られなかった。

(2) DOB1 含有複合体のプロテオミクス解析手法の確立

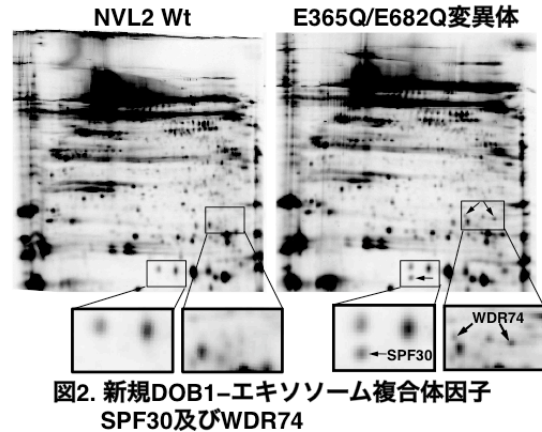
NVL2 は、その ATPase 活性を用いて DOB1 含有複合体から何らかの因子を脱会合することが示唆される。従って、NVL2 E365Q/E682Q 変異型を発現させると、ATPase 活性が欠損するために、脱会合因子が DOB1 含有複合体中に蓄積することが予想される。そのようなタンパク質を同定するには、DOB1 含有複合体のプロテオミクス解析が有効であると思われるが、目的の複合体を高感度に検出・定量・同定することが不可欠である。そこで、DOB1 含有複合体のプロテオミクス解析を行うための基礎検討を行った。共免疫沈降法において、可溶化法、ビーズの種類、溶出法などを検討した結果、図 1 に示すように、DOB1 精製物から複数の RNA 代謝関連タンパク質が同定され、同定タンパク質の中には、既知 DOB1 相互作用因子である PM/Scf-100 や RRP4 も含まれていた。また、極微量のタンパク質からタンパク質の同定を可能とするため、トリプリン処理の方法や添加剤だけではなく、使用するチューブに至るまで検討を重ねた結果、銀染色ゲルから高い確率 (90%程度) で同定することができるようになった。



(3) NVL2 によって制御される脱会合因子 SPF30 および WDR74 の同定

以上の基礎実験を踏まえて、DOB1 含有複合体から、NVL2 によって制御される脱会合因子の同定に着手した。NVL2 と 3xFLAG-DOB1 の二重発現細胞から、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いて DOB1 含有複合体を精製し、精製物中に含まれるタンパク質を蛍光ラベルした後、2D-DIGE により分離し、タンパク質スポットを蛍光検出した。その結果、NVL2 野生型発現に比べて

E365Q/E682Q 変異型発現により増加するタンパク質スポットを検出した。次に、これらのスポットを MALDI 型質量分析計を用いて同定した結果、新規 DOB1 相互作用タンパク質として、SPF30 と WDR74 の同定に成功した (図 2)。さらにこの結果は特異抗体を用いたウエスタンブロットティングによっても確認することができた。



以上の結果、NVL2 はその ATPase 活性により、DOB1 含有複合体から SPF30 および WDR74 を脱会合することにより、エキソソームも含めた rRNA プロセッシング複合体の構造を制御し、rRNA プロセッシングに関与することが示唆された。

(4) スプライシング関連因子 SPF30

mRNA のスプライシングは、数種の U snRNP が連続的に会合と脱会合することによりイントロンが切り出される反応である。本研究で同定された SPF30 は、U snRNP の間を橋渡しする機能が報告されているが、NVL2 との関連性やリボソーム生合成における機能は不明である。ドメイン構造としては、分子の中央部分に Tudor ドメインと呼ばれるジメチル化アルギニン認識部位が存在する。近年、Tudor ファミリータンパク質の機能解析が進められ、生殖細胞系列への分化に重要な役割を果たすことが報告されているが、SPF30 の機能解析はほとんど行われていない。SPF30 は、Tudor ドメインを介して、アルギニンジメチル化タンパク質を認識して、rRNA を始めとする RNA 代謝に関与する可能性が考えられる。

(5) リボソーム生合成補助因子 WDR74

ヒト細胞における WDR74 の機能解析は全く行われていない。酵母において、WDR74 のオルソログである Nsa1 が 60S リボソーム生合成に関わることが報告されている。しかしながら、DOB1 やエキソソームとの関連性を示唆する報告は全くなされておらず、WDR74 は rRNA の分解もしくはプロセッシングとリンクしてリボソーム生合成に関与することが予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(3)連携研究者 なし

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 須藤遥、野崎彩、宇野秀謙、石田洋一、長浜正巳、ヒト TRAMP 様複合体の核エキソソームおよび核小体シャペロン NVL2 との相互作用解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012/12、福岡
- ② 平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体 AAA-ATPase NVL2 が制御する RNA 代謝複合体因子の同定、第 35 回日本分子生物学会年会、2012/12、福岡
- ③ 石田洋一、平石伸宏、長浜正巳、リボソーム生合成に働く AAA-ATPase NVL2 が制御する rRNA 代謝関連因子の同定、第 2 回 RIBOSOME MEETING、2013/3、東京
- ④ 齋藤充昭、石田洋一、長浜正巳、核小体シャペロン NVL2 が制御する新規 RNA 代謝複合体因子 SPF30 の相互作用解析、日本薬学会第 134 年会、2014/3、熊本
- ⑤ 館雄一、平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体 AAA-ATPase NVL2 が制御する新規複合体因子 SPF30 および WDR74 の相互作用因子の探索、日本薬学会第 134 年会、2014/3、熊本
- ⑥ 平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体 AAA-ATPase NVL2 が制御する新規リボソーム生合成因子 WDR74 の同定と機能解析、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014/6、奈良

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.my-pharm.ac.jp/~biochem/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 洋一 (ISHIDA, Yo-ichi)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90510454

(2)研究分担者 なし