

平成 21 年 3 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570180
 研究課題名 (和文) リボソーム RNA プロセシング複合体の AAA-ATPase NVL2 による制御機構
 研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of the ribosomal RNA processing complex by AAA-ATPase NVL2
 研究代表者
 長浜 正巳 (NAGAHAMA MASAMI)
 徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：60281169

研究成果の概要：細胞のタンパク質合成装置であるリボソームは、多数のタンパク質とリボソーム RNA より構成される。リボソーム RNA は、前駆体分子のプロセシングにより形成されるが、この現象にはエキソヌクレアーゼや RNA ヘリカーゼから成る複合体が関与している。本研究では、AAA ファミリーに属するシャペロン様 ATPase である NVL2 が、この複合体と相互作用し、リボソーム RNA のプロセシングに関与することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核小体、リボソーム、AAA タンパク質、分子シャペロン、rRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内のタンパク質合成装置であるリボソームは、約 80 種類のリボソームタンパク質と、4 種類のリボソーム RNA (rRNA) から構成される巨大分子複合体であり、真核細胞では 40S および 60S リボソームが会合した 80S 複合体として機能する。リボソームの生合成では、まず最初に核小体で、rRNA 前駆体とリボソームタンパク質、および他のタンパク質 (ヌクレアーゼや RNA ヘリカーゼなど) が会合し、リボソーム前駆体 (プレリボソーム) が形成される。リボソーム前駆体は、多段階にわたる分子会合と解離を経て成熟リボソームへと変換され、その過程で rRNA 前

駆体が 28S、18S および 5.8S の rRNA へとプロセシングされる。また 5S rRNA は、別の経路で合成された後、プレリボソームに組み込まれる。リボソームタンパク質以外のタンパク質は、最終的にプレリボソームから解離し、40S および 60S の成熟型リボソームが形成される。このようにリボソームの生合成においては、様々な分子の結合と解離が整然と進行する必要がある。それゆえ、この過程では、これらの相互作用を制御する分子シャペロンの働きが重要であると考えられる。しかし現在まで、リボソームの生合成過程における分子シャペロンの具体的な働きは、ほとんど明らかにされていない。

(2) NVL は、VCP (別名 p97)と高いアミノ酸配列相同性をもつ核タンパク質として同定された。VCP は主に細胞質において、オルガネラ膜の融合やユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解などの機能に関するシャペロン様 ATPase である。VCP と NVL は、ともに分子内に 2 ヶ所の特徴的な ATP 結合部位をもち、AAA タンパク質と呼ばれる ATPase ファミリーに属する。AAA タンパク質が関与する細胞内機能は多様であるが、それらに共通して見られる特徴は、ATP の加水分解に伴い分子複合体の構造を制御し、それらの解離を促す機能をもつことである。NVL は専ら核に局在することから、主に細胞質に存在する VCP とは異なる役割を担っていると考えられる。しかし、その細胞内機能はこれまで不明であり、我々の研究によりその一端が初めて明らかにされた。我々は、NVL の主要アイソフォームである NVL2 が、リボソーム生合成の場である核小体に局在することを示した。また、MVL2 の ATP 結合部位に変異を導入したドミナントネガティブ変異体を培養細胞内で発現させると、60S リボソームの生合成が顕著に抑制されることを示した。さらに我々は、60S リボソームの構成タンパク質である L5 や、酵母で 60S リボソーム生合成への関与が知られている RNA ヘリカーゼ Dob1p のヒトホモログ DOB1 が、NVL2 と ATP 依存的に結合することを明らかにした。これらの結果から NVL2 は、プレリボソームにおける DOB1 や L5 の分子間相互作用を制御するための分子シャペロンとして機能している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内で様々な分子複合体の構造制御と解離調節機能に関与する AAA タンパク質に着目し、そのメンバーである NVL2 がリボソーム生合成において果たす役割を解明することを目的とした。具体的目標として、平成 19 年度においては、DOB1 および L5 とプレリボソームとの相互作用が NVL2 により制御される分子機構を詳しく検討し、プレリボソームの成熟過程において NVL2 が分子シャペロンとして果たす役割を解明することとした。また平成 20 年度においては、リボソーム RNA 前駆体がプレリボソーム中でプロセッシングをうけて成熟リボソームへと変換される過程において、NVL2 とプレリボソームとの相互作用が果たす役割を解明することを目標とした。これらの研究を通して、プレリボソームの成熟過程において、NVL2 が機能するステップとその分子機構に関する情報を取得し、NVL2 によるリボソーム生合成制御の全体像を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、DExD/H-box 型 RNA ヘリカーゼである DOB1 と NVL2 が、ATP 依存的に相互作用することを明らかにした。DOB1 は、酵母において 5.8S rRNA 前駆体のプロセッシングに関与することが報告されており、エキソソームと呼ばれるエキソヌクレアーゼ複合体の補助因子として働くと考えられている。エキソソームは、約 10 個のサブユニットから形成される巨大なリング状複合体である。また、DOB1 とエキソソームが rRNA 前駆体上に集積する際に、MPP6 と呼ばれる RNA 結合タンパク質がそれらのプラットフォームとして働く可能性が提唱されている。

我々は、NVL2 のドミナントネガティブ変異体の一つが 60S リボソームの生合成を阻害することを示した。一般に、NSF などの他の AAA タンパク質においては、このような変異体を発現させた際、その標的となるタンパク質複合体が細胞内に異常な蓄積を示すことが観察されている。したがって、NVL2 変異体の場合には、本来機能を果たした後に解離すべき DOB1、エキソソーム、MPP6 などのタンパク質が、プレリボソーム上に留まり、プレリボソームの成熟が阻害された可能性が考えられる。この可能性を検証するために、変異型 NVL2 を発現させた細胞を用いて、これらの因子の相互作用を免疫沈降法により解析し、正常な細胞と比較した。さらにこれらの細胞において、rRNA 前駆体のプロセッシングが進行する速度を比較するために、細胞を L-[methyl-3H]methionine や ³²P などで標識し、パルスチェイス実験を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① NVL2 の ATPase ドメイン変異体

本研究で用いた NVL2 変異体は、AAA ドメイン中の Walker A モチーフで保存された、ATP の結合に重要なリジン残基をメチオニンに改変したもの、および Walker B モチーフで保存された、ATP の加水分解に重要なグルタミン酸残基をグルタミン改変したものである。これらの変異体ではそれぞれ、ATP が結合しない、または ATP は結合するが加水分解が行われないと考えられる。これらの変異体は、その検出を容易にするために、カルボキシ末端にストレプトタグを付加した。これらの変異体および野生型 NVL2 の cDNA を、pcDNA5/FRT/T0 ベクターに挿入して発現用プラスミドを構築した。これらのプラスミドを Flp-In T-Rex293 細胞にトランスフェクションし、ブラストジシンとハイグロマイシンを用いてセレクションを行うことにより、野生型および変異型 NVL2 の発現がドキシサイクリンの添加により誘導される安定発現細胞を樹立し、以降の実験で用いた。

② NVL2 変異体の発現による細胞内リボソームへの影響

作製した NVL2 変異体が、細胞内のリボソームに及ぼす影響を調べるために、上記の NVL2 変異体発現細胞を用いてリボソーム分画実験を行った。RNA の吸光を指標として、リボソームの各サブユニットを測定した結果、野生型 NVL2 を誘導発現させた細胞では、コントロールの細胞と比べて変化はなく、40S、60S および 80S リボソームに由来する 3 つのピークが確認できた。一方、変異型 NVL2 を誘導発現させた細胞では、いずれの変異体の場合においても、60S リボソームの著しい減少が見られ、これに伴い 80S リボソームの量も減少していた。この効果は、NVL2 の 2 つの ATPase ドメインの両方において ATP の加水分解能を欠失させた変異体で特に顕著であった。これらの結果から、NVL2 の各 ATPase ドメインにおける、ATP の結合と加水分解のサイクルが、NVL2 によるリボソーム生合成の制御に重要であることが示唆された。

③ DOB1-エキソソーム複合体と NVL2 の相互作用

NVL2 は、RNA ヘリカーゼである DOB1 と相互作用することが明らかになっている。DOB1 は、5.8S リボソーム RNA 前駆体のプロセシングに関与し、エキソソームの補助因子として機能していると考えられている。そこで、NVL2 がリボソームの生合成に関与する分子機構を調べるために、NVL2 がエキソソームとも相互作用しているかどうかを免疫沈降法により検討した。FLAG タグを付加した DOB1 を動物細胞で発現させ、免疫沈降を行うと内在性 NVL2 が共沈することから、両者が相互作用していることが確認できた。また FLAG-DOB1 とエキソソームのサブユニットである PM/Sc1-100 および Rrp4 との相互作用も確認できた。さらに、FLAG-PM/Sc1/100 が Rrp4、DOB1 および NVL2 と相互作用することが確認できた。一方、GST-MPP6 については、PM/Sc1-100 および Rrp4 との相互作用は確認できたが、NVL2 および DOB1 との相互作用は確認できなかった。また、上記の NVL2 変異体を発現させたときに、これらの因子間の相互作用に影響が見られるかどうかを検討したが、これまでの実験では確認することができなかった。今後、実験条件を変えて、さらに検討を行う必要があると考えられる。

④ NVL2 変異体の発現によるリボソーム RNA 生合成への影響

上記の NVL2 変異体が、リボソーム RNA の生成に影響を及ぼすかどうかを調べるために、リボソーム RNA の新規合成およびプロセシングを、³²Pi を用いたパルスチェイス実験により

解析した。培地中に ³²Pi を添加して 30 分標識した後、2 時間のチェイスを行った。その結果、上記のいずれの変異型 NVL2 を誘導発現した細胞においても、野生型 NVL2 の場合と比べて、28S rRNA、5.8S rRNA および 32S 中間体の生成量に減少が認められた。一方、47S/45S 前駆体は、逆に蓄積する傾向が認められた。そこで、この現象をさらに詳しく解析するために、特に顕著な影響が見られた変異体について、これらの細胞を標識後、チェイスの時間を 30、60、120、240 分とさらに細かく区切って解析を行った。その結果、変異型 NVL2 を誘導発現させた細胞では、野生型の場合と比較して、上記と同様の傾向が確認できた。また、32S 中間体の生成については、生成速度に遅延が見られたものの、時間の経過とともに量の増加が認められ、最終的には野生型とほぼ同レベルに達した。一方、28S および 5.8S rRNA は、長時間のチェイスにおいても生成が抑制されていた。以上の結果から、NVL2 変異体によるリボソーム生合成の障害は、主に 32S 中間体から 28S および 5.8S rRNA が形成される過程の障害によって引き起こされた可能性が考えられた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

リボソームの生合成は極めて多くの因子が関わる複雑なプロセスであるため、その仕組みの多くが、分子間の遺伝的相互作用の解析が容易な酵母を用いて調べられてきた。これまで動物細胞におけるリボソーム生合成の解析はあまりなされてこなかったが、両者の基本的な機構は共通であると考えられている。しかし、ヒトを含めた多細胞生物においては、リボソームの生合成は細胞の増殖・癌化やアポトーシスの制御と密接に関与している。このため動物細胞のリボソーム生合成には、酵母では見られないより高度な制御機構が介在していると考えられる。

また近年、酵母の NVL2 ホモログである Rix7 の機能が報告された。このタンパク質は 60S リボソームの生合成に関与しており、我々の NVL2 の解析結果と一致している。しかし、Rix7p がリボソーム生合成に関与する具体的な分子機構は未解明の点が多い。また、NVL2 と Rix7p は細胞内局在などいくつかの性質において違いが見られ、それらは動物細胞と酵母のリボソーム生合成機構における違いを反映していると考えられる。したがって本研究の成果を基礎として、将来動物細胞のリボソーム生合成制御システムに特異的な分子機構をあきらかにできる可能性が期待できる。

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)

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Yanagino, T., Yuasa, K., Nagahama, M., Matsuda, Y., and Tsuji, A. Transcriptional regulation of fibrillin-2 gene by E2F family members in chondrocyte differentiation. J. Cell. Biochem. 査読有 106, (2009) 580-588
- ② Yuasa, K., Yamagami, S., Nagahama, M., and Tsuji, A. Trafficking of cGMP-dependent protein kinase II via interaction with Rab11. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 374, (2008) 522-526
- ③ Yuasa, K., Suzue, K., Nagahama, M., Matsuda, Y., and Tsuji A. Transcriptional regulation of subtilisin-like proprotein convertase PACE4 by E2F: Possible role of E2F-mediated upregulation of PACE4 in tumor progression. Gene 査読有 402, (2007) 103-110

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 谷田渚、核小体分子シャペロン NVL2 と rRNA プロセッシング複合体の相互作用解析、第 48 回日本生化学会中国・四国支部例会、2007 年 5 月 19 日、高知文化プラザ
- ② 柳野卓也、軟骨分化におけるフィブリリン-2 の機能解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長浜 正巳 (NAGAHAMA MASAMI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60281169