

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06640

研究課題名(和文) リボソームRNA前駆体のプロセッシング制御と核小体ストレス応答をつなぐ分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism linking pre-rRNA processing and nucleolar stress response

研究代表者

長浜 正巳 (Nagahama, Masami)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60281169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームの生合成過程において、rRNA前駆体のプロセッシングに寄与するRNAヘリカーゼMTR4を基質RNAへとリクルートするためのアダプターとしてNop53が酵母で見出された。ヒトにおいては、核小体ストレス応答を介して細胞増殖を制御するPICT1が、Nop53の相同分子であると考えられた。本研究では、PICT1がリボソーム生合成およびがん抑制因子p53の制御の両者に関与し、これらの過程を機能的に結びつけている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リボソーム構築の過程においてrRNAプロセッシングの異常を監視し、核小体ストレス応答により細胞増殖が制御される機構について、NVL2、MTR4-ExosomeおよびPICT1の機能を明らかにしたものである。PICT1は、がん抑制因子p53を安定化し、細胞増殖およびアポトーシスを制御する。また、臨床分野では、様々ながんの予後規定因子として注目されている。したがって、この研究成果は、新たな抗がん剤を開発するための学術基盤として重要である。

研究成果の概要(英文)：In yeast cells, Nop53 functions as an adaptor for recruiting RNA helicase MTR4 to its appropriate RNA substrate during ribosome biogenesis. In human cells, PICT1 seems to be a functionally homologous protein for Nop53. In this study, we demonstrated that PICT1 is involved in both the pre-rRNA processing and regulating tumor suppressor p53, thereby linking ribosome biogenesis to cell growth regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム生合成 核小体ストレス RNAエキソソーム rRNAプロセッシング AAA ATPase PICT1 MTR4  
NVL

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞におけるリボソーム生合成では、核小体で生成した前駆体 RNA を中心に、多数のリボソームタンパク質と生合成補助因子が、会合および脱会合を経て、リボソーム前駆体の段階的成熟が進行する。

(2) AAA ファミリーに属するシャペロン様 ATPase である NVL2 は、RNA ヘリカーゼ MTR4 およびエキソヌクレアーゼ Exosome よりなる複合体との結合を介してリボソーム前駆体と相互作用し、エネルギー依存的に分子複合体の構造変換および rRNA 前駆体のプロセッシングに関与すると考えられている。

(3) 高等真核生物のリボソーム構築は、細胞増殖やアポトーシスなど細胞機能の制御と密接な関係にある。リボソーム構築に異常をきたした細胞では、核小体ストレス応答が誘導され、がん抑制因子 p53 の増加を介し、細胞増殖が抑制される。しかし、その分子機構については不明な点が多く残されている。

(4) 近年、酵母において、MTR4-Exosome 複合体をリボソーム前駆体粒子へと適切にリクルートするためのアダプター Nop53 が同定された。興味深いことに、Nop53 のヒトにおける相同分子は PICT1 とよばれる核小体タンパク質であり、核小体ストレス応答を制御し、がん予後の規定因子としても知られる分子であった。このことより、ヒト細胞では、MTR4-Exosome 複合体と PICT1 の相互作用により、リボソームの構築プロセスと核小体ストレス応答の制御が機能的にリンクしている可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、リボソームの構築過程において rRNA プロセッシングの異常を監視し、核小体ストレス応答を介して細胞増殖を制御するための経路に関して、NVL2、MTR4-Exosome および PICT1 の相互作用が果たす役割を解明することを目的とする。また、これを通して、新たな抗がん剤の開発につながる学術基盤を創出することを目指す。

(2) 上記の目的を達成するための具体的な手段として、がん制御因子である PICT1 と rRNA 前駆体のプロセッシング装置である MTR4-Exosome の相互作用における機序を解明する。

(3) PICT1 がリボソーム生合成においてどのように機能しているかを明らかにする。また、MTR4-Exosome と PICT1 の相互作用が核小体ストレス応答の制御においてどのように機能しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト細胞において、MTR4-Exosome 複合体と PICT1 との相互作用を検証し、それらの結合様式や調節メカニズムを明らかにするために共免疫沈降実験を行い、MTR4-Exosome、PICT1 および NVL2 の結合について検討した。その際に、siRNA を用いて MTR4 および Exosome の各サブユニットをノックダウンし、PICT1 との相互作用に重要な構成因子について検討を行った。また、MTR4-Exosome と PICT1 との相互作用が、NVL2 の ATP 加水分解と共役して制御されるかを検討した。そのために、ATP の加水分解能を欠損した変異型 NVL2 (E365Q/E682Q) を用い、ドキシサイクリン依存的な発現誘導のもとで、相互作用の変化を検討した。

(2) PICT1 の rRNA プロセッシングにおよぼす影響について検討を行った。PICT1 をノックダウンした細胞において、rRNA 前駆体のプロセッシング段階に及ぼす影響を詳細に調べるために、rRNA 前駆体のスペーサー領域 (5'ETS, ITS1, ITS2, 3'ETS) に対応するプローブを用い、プロセッシング中間体の蓄積または減少を、ノーザンブロットングにより検討した。また、ショ糖密度勾配遠心法により、リボソームの 40S および 60S 各サブユニットの形成に及ぼす影響を検討した。

(3) 核小体においてリボソームの構築に異常が生じると、リボソームタンパク質が核質に遊離され、MDM2 (p53 の分解経路で働くユビキチンリガーゼ) と結合しその活性を阻害する。その結果、p53 が安定化され、細胞周期の進行が抑制される。核小体ストレス応答とよばれるこのプロセスにおいて、PICT1 は負の制御機能を有し、がんの悪性化とも関連している。しかし、そのメカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、NVL2 および MTR4-Exosome が、PICT1 とともに核小体ストレス応答の制御に機能するかを検討した。これらの因子をノックダウンした細胞において、p53 およびその下流因子である p21 の量的な変化をウェスタンブロットングにより検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 高等真核生物におけるリボソーム構築の異常は、核小体ストレス応答を誘導し、p53 経路を経て細胞増殖の抑制へと至る。しかし、これらの過程を結ぶ分子機構については、不明な点が多く残されている。我々はこれまでの研究において、シャペロン様 AAA-ATPase NVL2 の制御下において、MTR4-Exosome 複合体(RNA ヘリカーゼとエキソヌクラーゼよりなる)が、rRNA 前駆体のプロセシングに機能することを明らかにしてきた。この複合体を基質 RNA へとリクルートするアダプターとして、酵母では Nop53 が見出された。またヒト細胞では、核小体ストレス応答を制御するがん制御因子 PICT1 がこれに対応する分子であると考えられた。本研究では、MTR4-Exosome 複合体と PICT1 の相互作用に着目し、rRNA プロセシングの異常と核小体ストレス応答を結ぶ品質管理機構について、これらの因子が果たす役割の解明を試みた。まず、MTR4-Exosome 複合体、PICT1 および NVL2 の分子間相互作用を解析するために、ヒト細胞を用いて、各因子をノックダウンし、共免疫沈降により各分子間の結合を解析した。その結果、PICT1 は MTR4 との結合を介して RRP6 を含む核エキソソームと結合していることが示された。また、酵母 Nop53 において Mtr4 との結合に重要なアミノ酸配列(AIM 配列)が PICT1 でも保存されていることから、これらに変異を導入し、MTR4 との結合を解析した。その結果、PICT1 の場合においても、AIM 配列が MTR4 との結合に重要な役割を果たしていることが示された。

(2) リボソーム生合成における PICT1 の機能について解析を行った。siRNA により PICT1 をノックダウンした細胞を用いて、ショ糖密度勾配遠心法により、リボソームサブユニット形成への影響を検討した。その結果、60S リボソームの特異的減少が確認された。また、ノーザンブロット法により rRNA 前駆体のプロセシングへの影響を検討した結果、60S リボソームの形成過程で生じる 32S および 12S 中間体に異常な蓄積が認められた。これらの結果から、PICT1 は 60S リボソームの形成過程に必要な rRNA 前駆体のプロセシングにおいて、複数の段階で機能している可能性が考えられた。

(3) NVL2、PICT1 および MTR4-Exosome 複合体を構成する各因子を、siRNA を用いてノックダウンし、核小体ストレス応答への影響を検討した。p53 の機能が正常な U2OS および HCT116 細胞を用い、ウエスタンブロットングによる解析を行った。その結果、PICT1 のノックダウンにより p53 およびその下流因子である p21 の増加が認められた。興味深いことに、MTR4 のノックダウンにおいても同様の影響が見られたものの、Exosome の触媒サブユニットである DIS3 および RRP6 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。このことから、核小体ストレス応答の誘導機構においては、MTR4 と PICT1 の相互作用が重要と考えられるが、rRNA 前駆体のプロセシングを担うヌクラーゼ活性自体は、これには直接関与していないことが示された。

(4) これらの成果を通して、高等真核生物のリボソーム生合成過程において、rRNA 前駆体のプロセシングと核小体ストレス応答とを関連づける分子機構として、PICT1 と MTR4-Exosome の相互作用が重要な役割を果たす可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Toshimichi, Imamachi Naoto, Imamura Katsutoshi, Taniue Kenzui, Kawamura Takeshi, Suzuki Yutaka, Nagahama Masami, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Systematic Analysis of Targets of Pumilio-Mediated mRNA Decay Reveals that PUM1 Repression by DNA Damage Activates Translesion Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107542 ~ 107542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sun Xiaoning, Kawata Kentaro, Miki Atsuko, Wada Youichiro, Nagahama Masami, Takaya Akiko, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Exploration of <i>Salmonella</i> effector mutant strains on MTR4 and RRP6 degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioScience Trends	6. 最初と最後の頁 255 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/bst.2020.03085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Urae Seiya, Harita Yutaka, Udagawa Tomohiro, Ode Koji L., Nagahama Masami, Kajiho Yuko, Kanda Shoichiro, Saito Akihiko, Ueda Hiroki R., Nangaku Masaomi, Oka Akira	4. 巻 133
2. 論文標題 A cellular model of albumin endocytosis uncovers a link between membrane and nuclear proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs.242859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.242859	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiraishi Nobuhiro, Ishida Yo-ichi, Sudo Haruka, Nagahama Masami	4. 巻 495
2. 論文標題 WDR74 participates in an early cleavage of the pre-rRNA processing pathway in cooperation with the nucleolar AAA-ATPase NVL2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 116 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.10.148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Katsutoshi, Takaya Akiko, Ishida Yo ichi, Fukuoka Yayoi, Taya Toshiki, Nakaki Ryo, Kakeda Miho, Imamachi Naoto, Sato Aiko, Yamada Toshimichi, Onoguchi Mizutani Rena, Akizuki Gen, Tanu Tanzina, Tao Kazuyuki, Miyao Sotaro, Suzuki Yutaka, Nagahama Masami, Yamamoto Tomoko, Jensen Torben Heick, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Diminished nuclear RNA decay upon Salmonella infection upregulates antibacterial noncoding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e97723 ~ e97723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201797723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 宮尾宗太郎、齋藤佳奈子、河原康一、長浜正巳
2. 発表標題 がん制御因子PICT1とrRNAプロセッシング複合体の相互作用による核小体ストレス応答制御
3. 学会等名 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshimichi Yamada, Naoto Imamachi, Katsutoshi Imamura, Takeshi Kawamura, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Identification of functional targets reveals that the suppression of pumilio-mediated mRNA decay increases cell resistance to DNA damage in human cells
3. 学会等名 mRNA Turnover: Mechanisms, Regulation and their Implication in Infectious and Age-Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮尾宗太郎、齋藤佳奈子、大島廉太、上林幸拓、河原康一、長浜正巳
2. 発表標題 がん制御因子PICT1とMTR4-Exosomeの結合およびrRNAプロセッシングにおける機能
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大島廉太、三木俊二、山下文希、宮尾宗太郎、辻明彦、長浜正巳
2. 発表標題 核小体AAA-ATPase NVL2と結合するスプライソソーム因子CWF19L2の機能解析
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshimichi Yamada, Naoto Imamachi, Katsutoshi Imamura, Takeshi Kawamura, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Systematic analysis of targets of PUMILIO (PUM)-mediated mRNA decay reveals that PUM1 regulates DNA damage response pathway
3. 学会等名 日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshimichi Yamada, Naoto Imamachi, Katsutoshi Imamura, Takeshi Kawamura, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Identification of functional targets reveals that the suppression of pumilio-mediated mRNA decay increases cell resistance to DNA damage in human cells
3. 学会等名 日本放射線影響学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮尾宗太郎、齋藤佳奈子、河原康一、長浜正巳
2. 発表標題 がん制御因子PICT1とMTR4/エキソソームの相互作用およびrRNAプロセシングにおける機能解析
3. 学会等名 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sotaro Miyao, Kanako Saito, Renta Oshima, Yukihiro Kanbayashi, Kohichi Kawahara, Masami Nagahama
2. 発表標題 Tumor regulator PICT1 interacts with MTR4/exosome and is involved in the pre-rRNA processing
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Nagahama, Sotaro Miyao, Ryunosuke Nakamura, Nobuhiro Hiraishi, Koichi Kawahara, Yo-ichi Ishida
2. 発表標題 MTR4/Exosome-interacting proteins under control of the nucleolar AAA-ATPase NVL2 in human cells
3. 学会等名 International Conference on Ribosome Synthesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮尾宗太郎、河原康一、長浜正巳
2. 発表標題 がん制御因子PICT1とMTR4-エキソソームの相互作用およびリボソーム生合成における機能解析
3. 学会等名 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長浜正巳、宮尾宗太郎、中村龍之介、河原康一
2. 発表標題 核小体ストレス応答制御タンパク質PICT1のリボソーム生合成における機能解析
3. 学会等名 Ribosome Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田俊理、今町直登、仲木竜、川村猛、長浜正巳、秋光信佳
2. 発表標題 PUM1タンパク質によるmRNA分解制御が、DNA障害後の細胞生存を促進する
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Han Han, Toshimichi Yamada, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Nobuyoshi Akimitsu
2. 発表標題 Identification of mRNAs involved in MTR4-mediated RNA decay in nucleus
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田洋一、濱志帆、長浜正巳
2. 発表標題 MTR4-エキソソーム複合体と相互作用するTudorタンパク質SPF30の結合因子の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長浜正巳
2. 発表標題 ヒト細胞リボソームの構築における分子リサイクリングと核小体ストレス応答
3. 学会等名 細胞でつながる研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------