

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590101

研究課題名(和文) リボソーム生合成に関わる新規RNA代謝複合体とシャペロンによる制御システムの解明

研究課題名(英文) Studies on a novel protein complex involved in RNA metabolism during ribosome biogenesis and its regulation by a molecular chaperone

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞のリボソーム生合成において機能するシャペロン様AAA ATPase NVL2は、RNAヘリカーゼDOB1との相互作用を介してリボソーム前駆体に作用し、分子複合体の構造変換に寄与する。本研究では、NVL2の作用標的となるDOB1、エキソソーム、およびその他の相互作用因子からなるrRNA代謝複合体について解析を行った。その結果、DOB1の他に、ポリAポリメラーゼPAPD5およびRNA結合タンパク質ZCCHC7を含む複合体(TRAMP様複合体)の存在を動物細胞において確認した。さらにこの複合体が、rRNA前駆体を含む核内RNAの3'末端ポリアデニル化において機能している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A chaperone-like AAA-ATPase NVL2 acts on a pre-ribosomal particle during ribosome biogenesis in eukaryotic cells through interaction with an RNA helicase DOB1, and it participates in a remodeling of the molecular complex. In this study, we have analyzed an rRNA metabolic complex consisting of DOB1, RNA exosome, and other associating factors, which could be a possible target of NVL2.

As a result, presence of TRAMP-like complex consisting of DOB1, a poly(A) polymerase PAPD5, and an RNA-binding protein ZCCHC7 was confirmed in mammalian cells. Furthermore, we have shown a possibility that this complex is functions in the 3'-polyadenylation of nuclear RNAs including the rRNA precursors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リボソーム生合成 リボソームRNA シャペロン

#### 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 DOB1 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に関与すると考えられる。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、NVL2 が作用する rRNA 代謝複合体の構成成分を明らかにし、それらのリボソーム生合成における機能を解明する。

(2) NVL2 がこれらの複合体の構造および機能を制御する分子機序を明らかにする。

(3) これらを通じて、リボソーム生合成過程の RNA 代謝において、分子シャペロンが果たす新たな役割を解明する。

#### 3. 研究の方法

(1) DOB1 を構成因子とするヒト TRAMP 様複合体の同定を行う。酵母 TRAMP 複合体は、基質 RNA の 3' 末端をポリアデニル化し、エキソソームによる分解へと導く複合体であり、ポリ(A)ポリメラーゼ Trf4/5、RNA 結合タンパク質 Air1/2、および RNA ヘリカーゼ Mtr4 (Dob1) から構成される。しかし高等動物細胞においては、これまでに Mtr4 (Dob1) に対応する分子としてヒト DOB1 (MTR4) の存在が知られているのみで、他のサブユニットの存在については明らかにされていない。データベースサーチの結果から、酵母 Trf4/5 および Air1/2 と限られた領域においてわずかな相同性を有するヒト cDNA として、ZCCHC7 および PAPD5 の存在が示された。これらはヒト TRAMP 様複合体サブユニットの候補と考えられる。そこで、これらの cDNA を単離し、細胞内で発現させることにより相互作用解析を行った。

(2) DOB1、PAPD5 および ZCCHC7 の cDNA を培養細胞内で過剰発現させ、細胞内 RNA のポリアデニル化およびそれら RNA の細胞内局在について、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法による解析解析を行う。この解析法を用いて、TRAMP 様複合体サブユニットおよび NVL2 の機能について、過剰発現およびノックダウンによる影響に関する検討を行った。

(3) オリゴ dT 配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた逆転写 PCR 法により、ポリアデニル化を受けた rRNA 前駆体由来する転写産物を増幅検出し、定量を行う。

この解析を用いて、TRAMP 様複合体サブユニットおよび NVL2 の機能について、過剰発現およびノックダウンによる影響に関して検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 真核細胞リボソームの生合成では、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行い、リボソーム前駆粒子が段階的に成熟する。この過程で、AAA ファミリーに属するシャペロン様 ATPase である NVL2 が RNA ヘリカーゼ DOB1 と相互作用し、リボソーム前駆粒子のエネルギー依存的構造変換に寄与すると考えられる。本研究では、NVL2 との相互作用が予想されたヒト TRAMP 様複合体の同定をまず行った。酵母 TRAMP 複合体はポリ(A)ポリメラーゼ Trf4/5、RNA 結合タンパク質 Air1/2、および RNA ヘリカーゼ Mtr4 (Dob1) から構成され、基質 RNA の 3' 末端をポリアデニル化してエキソソームによる分解へと導く。高等真核細胞では、Mtr4 (Dob1) に対応する分子としてヒト DOB1 (MTR4) の存在が示されたが、他のサブユニットの存在は明かされていなかった。そこで、データベースサーチにおいて Trf4/5 および Air1/2 と微弱な相同性を示したヒトタンパク質 ZCCHC7 および PAPD5 について、それらの性質を調べた。その結果、ヒト培養細胞において ZCCHC7 および PAPD5 は、DOB1、エキソソーム、および NVL2 と相互作用することが共免疫沈降実験から示された。従って、これらのタンパク質は、ヒトにおける TRAMP 様複合体のサブユニットとして働くと考えられた。また siRNA によるノックダウン実験の結果、ヒト TRAMP 様複合体の形成には、核エキソソームの触媒サブユニットである PM/ScI-100 (RRP6) との相互作用が重要であることが示された。これは、酵母の TRAMP 複合体では見られない特徴である。

(2) 上記により明らかにされた、DOB1 を構成因子に含むヒト TRAMP 様複合体とエキソソーム複合体の分子間相互作用について、NVL2 による制御に関する検討を行った。NVL2 は、分子内に 2 ヶ所の ATP 結合ドメインを有する ATPase である。各ドメインには、ATP の結合に必要な Walker A モチーフ、および加水分解に必要な Walker B モチーフが存在し、これらに変異を導入することにより、ATPase サイクルの特定段階をブロックしたドミナントネガティブ変異体を作成することができる。そこで、これらの変異体をテトラサイクリンにより発現誘導可能な細胞株を樹立した。これらの細胞で、TRAMP 様複合体およびエキソソーム複合体のサブユニットを FLAG タグ付加タンパク質として発現させ、共免疫沈降により他の複合体構成成分との相互作用における影響について検討した。しかし、これらの解析を通して、細胞内における複合体の挙動に、NVL2 変異体の発現による影響を

認めることはできなかった。

(3) さらに、グリセロール密度勾配遠心により細胞抽出液を分画し、両複合体の沈降密度から、それらの相互作用について検討した。しかし、この実験においても複合体の挙動に、NVL2 変異体の発現による影響を認めることはできなかった。これらの結果は、NVL2 が TRAMP 様複合体およびエキソソーム複合体とこれらに結合する未知の因子との相互作用を制御している可能性を示唆している。

(4) ヒト TRAMP 様複合体の rRNA 代謝における役割を解析するため、dT オリゴヌクレオチドをプライマーとする RT-PCR 法により 3' 末端がポリアデニル化された rRNA 前駆体を特異的に増幅し検出するアッセイを実施した。その結果、低濃度のアクチノマイシン添加によって生じる異常な rRNA 前駆体断片が 3' ポリアデニル化を受けた。さらに、この反応に PAPD5 および ZCCHC7 が必要であること、さらにその分解に DOB1 が必要であることが確認された。これらの研究を通して、NVL2 が相互作用するこれらの複合体が、リボソーム生合成過程における rRNA 前駆体のポリ(A)化および分解/プロセッシングに参与することが明らかにされた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Yuasa K., Nagame T., Dohi M., Yanagita Y., Yamagami S., Nagahama M., and Tsuji A. (2012) cGMP-dependent protein kinase I is involved in neurite outgrowth via a Rho effector, rhotekin, in Neuro2A neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、**421**, 239-44  
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.143

Yuasa K., Futamatsu G., Kawano T., Muroshita M., Kageyama Y., Taichi H., Ishikawa H., Nagahama M., Matsuda Y., and Tsuji A. (2012) Subtilisin-like proprotein convertase paired basic amino acid-cleaving enzyme 4 is required for chondrogenic differentiation in ATDC5 cells. *FEBS J.* 査読有、**279**, 3997-4009  
doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08758.x

長浜正巳, 分子シャペロンによるリボソームアセンブリーの制御-核小体 AAA-ATPase NVL2 の機能を中心に-, (2013) 生化学、査読無、85 巻、880-888  
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/06/85-10-08.pdf>

Ishida, YI., Takikawa, M., Suzuki, T., Nagahama, M., and Ogasawara, Y. (2014) Irreversible peroxidation of peroxiredoxin

2 is caused by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells. *FEBS Open Bio.* 査読有、4, 848-852  
doi: 10.1016/j.fob.2014.10.003

〔学会発表〕(計10件)

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、日本分子生物学会年会、2012年12月11日、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体 AAA-ATPase NVL2が制御するRNA代謝複合体の同定、日本分子生物学会年会、2012年12月13日、マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体 AAA-ATPase NVL2が制御するリボソーム生合成関連因子の同定、次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム、2013年9月15日、東京大学本郷キャンパス(東京都・文京区)

Nagahama M., Hiraishi N., and Ishida, YI. Identification of ribosome biosynthesis factors regulated by nucleolar AAA-ATPase NVL2. Biophysical Society Annual Meeting. 2014年2月18日、Moscon Center, San Francisco (U.S.A.)

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、日本薬学会年会、2014年3月30日、熊本大学黒髪キャンパス(熊本県・熊本市)

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、日本薬学会年会、2014年3月30日、熊本大学黒髪キャンパス(熊本県・熊本市)

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、日本細胞生物学会大会、2014年6月12日、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

平石伸宏、石田洋一、長浜正巳、核小体シャペロンNVL2が制御するリボソーム生合成因子WDR74の同定と機能解析、次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム、2014年9月21日、富山国際会議場(富山県・富山市)

長浜正巳、平石伸宏、石田洋、AAA-ATPase  
NVL2が制御するリボソーム生合成因子  
WDR74の機能解析、RIBOSO MEETING、  
2015年3月17日、ANAホリデイ・イン・リ  
ゾート宮崎(宮崎県・宮崎市)

石田洋、齋藤充昭、館雄一、長浜正巳、  
MTR4-エキソソーム複合体における新規  
相互作用因子SPF30のrRNAプロセシング  
における機能解析、RIBOSO MEETING、  
2015年3月17日、ANAホリデイ・イン・リ  
ゾート宮崎(宮崎県・宮崎市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.my-pharm.ac.jp/~biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

石田 洋一 (ISHIDA, Yo-ichi)  
明治薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：90510454