

## 特集：リボソームの機能調節と疾患

## II. リボソーム RNA の転写後修飾とアセンブリー

### II-3 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—

長 浜 正 巳

真核細胞におけるリボソーム生合成では、約 80 種からなる構成因子に加え、それらの構築過程に働く 200 種以上に及ぶ生合成補助因子による、分子の秩序立った集合および解離のプロセスが整然と進行する。またこれと協調して、リボソーム前駆体粒子の成熟過程では、前駆体 RNA から成熟 rRNA へと、多段階の RNA のプロセシング反応が系統的に進行する。この複雑かつ壮大な分子間相互作用の過程を制御するために、細胞核内には RNA ヘリカーゼ、分子シャペロンなどの ATP 依存性分子装置が作動している。これらの分子群の働きにより成り立つリボソーム生合成は、細胞にとって最大のエネルギー消費プロセスとなっている。本稿では、多様な分子複合体の脱会合制御を担う AAA ファミリー ATPase の働きを中心に、筆者らの研究に言及しつつ、リボソームアセンブリー制御における分子シャペロンの役割と RNA 代謝との関連について紹介したい。

#### 1. はじめに：真核細胞リボソームの生合成における分子アセンブリー

真核細胞におけるリボソーム生合成では、まず核小体で RNA ポリメラーゼ I による 47S 前駆体 RNA の転写が行われ、これを中心に多数のリボソームタンパク質が会合する。同時にこれらに加えて、RNA ヘリカーゼ、リボヌクレアーゼ、核小体内低分子 RNA (snoRNA) など、RNA プロセシングや分子構築に必要な補助因子群が会合し、巨大なリボソーム前駆体 (90S 前駆体粒子) が形成される。その後 90S 前駆体粒子は、60S および 40S リボソームの前駆体 (60S 前駆体粒子, 40S 前駆体粒子) へと分割され、さらにそれらが核小体から核質へ、そして細胞質へと移行

する過程で成熟を重ね、大・小 2 つのリボソームサブユニットの形成にまで至る (図 1)<sup>1-3)</sup>。このリボソーム前駆体粒子の成熟過程では、一次転写産物である 47S 前駆体 RNA から、さまざまなヌクレアーゼによる切断や分解 (プロセシング) を経ながら、各種サイズの間体が段階的に形成され、最終的に 28S (酵母では 25S), 18S, および 5.8S の rRNA が生成する (図 3B)<sup>4)</sup>。また、これとは別の経路で 5S rRNA が生成し、60S 前駆体粒子の成熟過程の途中からこれに組み込まれる。

このリボソーム生合成の過程で機能する補助因子群 (トランス作用因子) は、200 種を超える膨大な数からなる<sup>5)</sup>。しかし、それらはいずれも最終的にはリボソームに組み込まれることはなく、生合成の特定の段階で前駆体粒子から解離することで、成熟リボソームが形成される。リボソーム生合成では、これら多数の因子群が整然と会合および脱会合のプロセスを経ることにより、巨大な分子複合体の構造が秩序を維持しつつ変換されていく。このように、リボソームの生合成はきわめて複雑であり、かつ緻密に統御された時空間プロセスとして構成されている。

リボソーム生合成の機構解明は、多数の関連因子間の遺

明治薬科大学生体分子学教室 (〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1)

Regulation of ribosome assembly by molecular chaperones —functional analysis of nucleolar AAA-ATPase NVL2—

Masami Nagahama (Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose-shi, Tokyo 204-8588, Japan)

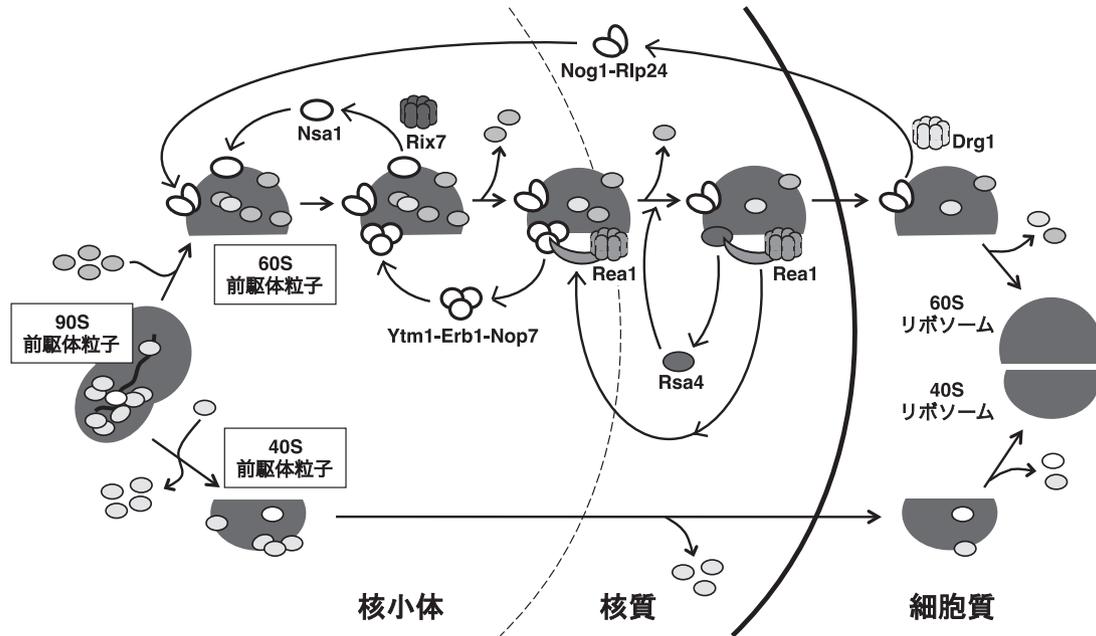


図1 真核細胞リボソームの生合成における AAA-ATPase の働き  
出芽酵母において、60S 前駆体粒子の成熟における役割が示された、3 種の AAA-ATPase (Rix7, Drg1, Rea1) の作用を示した。

伝学的相互作用を解析することが容易であり、また近年では生化学的手法による分子間相互作用の網羅的解析のための研究基盤が整った出芽酵母を対象に、数多くの知見が蓄積されてきた。これとは対照的に、ヒトなどの高等真核生物においては、技術的困難からほとんど解析が進められてこない状況にあった。動物細胞におけるリボソーム生合成の機構は、酵母で示されてきたものと大枠では共通点が多いと考えられる。しかし、高等真核生物では、細胞増殖やアポトーシスの制御など、多細胞生物に特有の生体制御とリボソーム生合成との関連がさまざまに示されており、ここでは酵母には存在しないより高次の制御機構が介在することが予想される。したがって、それらの解明は、リボソーム病をはじめとする種々の関連疾患の発症機序の理解にもつながると期待される。近年では、細胞より分離されたきわめて微量のタンパク質複合体の構成成分を高精度に同定可能なプロテオミクスの技術が発達し、動物細胞においてもリボソーム生合成の機構解明に取り組むことが可能になりつつある。

リボソーム生合成において、このように複雑な分子アセンブリーの過程が正確かつ効率的に進行するためには、構成因子間の自立的な相互作用によるだけでは不可能であり、それらのプロセスを促進・制御するためのシャペロン様分子の関与が予想される。実際に酵母におけるリボソーム生合成では、Hsp70-Hsp40 シャペロン系の関与などが報告され<sup>6,7)</sup>、また本稿で詳述する AAA シャペロンファミリーの関与も報告されている<sup>8)</sup>。しかし、これまでに得ら

れた知見は限られたものであり、動物細胞に至ってはそのような研究はほとんど皆無といえる。

## 2. 分子複合体の脱会合を促進するシャペロンとしての AAA ファミリー ATPase

AAA (トリプル A: ATPase associated with diverse cellular activities) タンパク質は、原核生物から真核生物まで、生物界に広く存在するシャペロン様 ATPase ファミリーである。AAA-ATPase は、ほかの ATPase ファミリーにも共通の Walker A および Walker B モチーフに加え、このファミリーに特有の SRH (second region of homology) モチーフを含む ATPase ドメイン (AAA ドメイン) を特徴とする (図 2)<sup>9)</sup>。AAA-ATPase には、分子内に 1 か所の AAA ドメインを有する I 型および、2 か所の AAA ドメインを有する II 型が存在し、それらはいずれも六量体のリング状構造を形成して機能する。細胞内に存在する多種類の AAA-ATPase の機能は、細胞内物質輸送、細胞小器官 (オルガネラ) 膜融合、細胞周期制御、タンパク質分解、DNA 複製・修復など多岐にわたる。しかし、それらに共通した作動原理として、細胞内の分子複合体に作用し、ATP 加水分解と共役したリング構造の変化を介し、基質複合体の構成因子を脱会合へと導く分子シャペロンとしての働きがあげられる。

出芽酵母のリボソーム生合成では、これまでに 3 種の AAA-ATPase (Rix7, Rea1, Drg1) の関与が報告されており (図 1)、これらのうち Rix7 と Drg1 は II 型に属する。

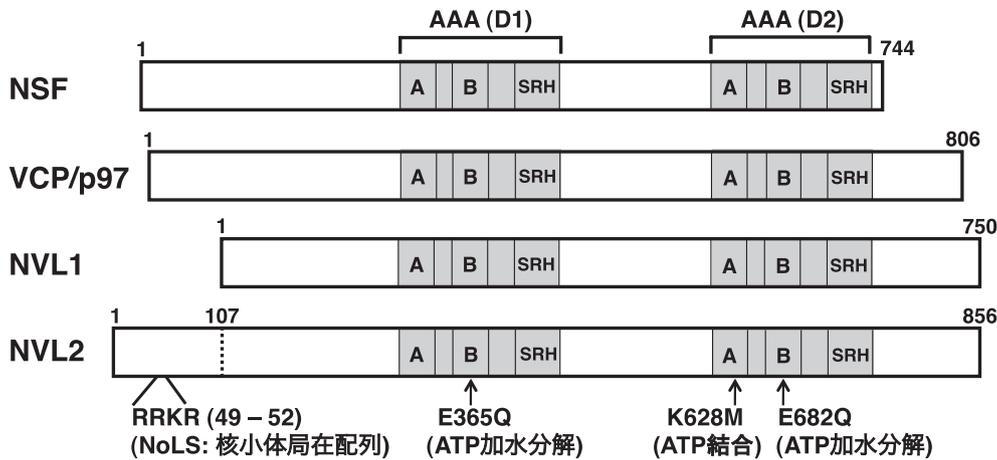


図2 ヒトの主なII型AAA-ATPaseとNVLアイソフォームの構造

II型AAA-ATPaseは、分子内に2か所のAAAドメイン(D1およびD2ドメイン)を有する。NVL2における核小体局在配列、および筆者らが用いたドミナントネガティブ変異体におけるアミノ酸置換を示した。A: Walker Aモチーフ, B: Walker Bモチーフ, SRH: second region of homology.

Rix7は、AAAファミリーATPaseの中で、リボソーム生合成への関与が最初に報告されたメンバーであり、リボソーム成熟過程の中期において核小体で機能する<sup>10)</sup>。Rix7は、60S前駆体粒子に存在するNsa1というトランス作用因子に作用し、これをエネルギー依存的に前駆体粒子から引き離す<sup>11)</sup>。この過程を経て、リボソーム前駆体粒子の成熟がさらに以降の段階へと進展すると考えられる。60S前駆体粒子から離脱したNsa1は、成熟段階の上流に位置するほかの前駆体粒子へと再び戻され、新たなリボソーム生合成サイクルに利用される。しかし、Nsa1自身がトランス作用因子としてリボソーム生合成で果たす役割は不明である。Drg1は最も近年、リボソーム生合成への関与が示されたAAAファミリーATPaseであり、60Sリボソーム成熟の最終段階近くで細胞質において機能する。Drg1は細胞質に存在する60S前駆体粒子からNog1およびRlp24などのトランス作用因子を引き離し、核内へとリサイクリングするために必要である<sup>12,13)</sup>。

またRea1は構造的に特殊なAAA-ATPaseであり、モータータンパク質であるダイニン重鎖と類似の形状を有する巨大分子である。Rea1は、N末端側に6か所の連続したAAAドメインを有し、この領域がリング状の構造を形成している。このリング領域を介して、Rea1は60S前駆体粒子と結合し、一方でC末端側に伸長した領域がヒンジのように働き、60S前駆体粒子上の特定のタンパク質をエネルギー依存的に引きはがすと考えられている。このようなメカニズムを用いて、Rea1は、60Sリボソーム成熟過程の中期および後期における2か所のステージでそれぞれ機能することが報告されている。これらの作用は、核小体と核質の境界領域、および核質においてそれぞれ起こり、前者ではYtm1, Erb1, Nop7からなる複合体が、また後者

ではRsa4というトランス作用因子が、それぞれ異なる成熟段階の60S前駆体粒子から引きはがされる<sup>14-17)</sup>。

### 3. 高等真核細胞の核小体に局在するAAA-ATPase NVL2

筆者らは、細胞のオルガネラ膜融合などに働くII型AAA-ATPaseであるNSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor) やVCP (*v*alysin-*c*ontaining protein, 別名 p97) などの機能について研究を行う過程で、VCPと酷似したアミノ酸配列を有する機能未知の分子NVL (*n*uclear *v*CP-like protein) が核に存在することに着目し<sup>18)</sup>、その機能解析を開始した(図2)。NVLには、選択的スプライシングにより生じる2種のアイソフォーム(NVL1, NVL2)が存在し、NVL2はNVL1の開始コドンよりも上流に新たな開始コドンを有するため、N末端側にさらに延長されたアミノ酸配列を持つ。我々の解析から、これらのアイソフォームは核内において異なる分布をとり、NVL1は核質のみに、NVL2は主に核小体に局在することが示された。また調べた範囲において、NVL2が細胞内の主要な分子種として存在し、NVL1の発現はきわめて低いレベルであった。そこで我々は、NVL2の核小体における機能に注目し、以降の研究を行うことにした<sup>19)</sup>。

まず最初に、核小体にNVL2が局在する仕組みについて検討を行った。NVL1とNVL2の構造における違いは、NVL2に特異的なN末端延長配列のみであることから、NVL2の核小体局在に必要なアミノ酸配列はこの領域に存在すると考えられた。一般に核小体タンパク質の多くが、塩基性アミノ酸のクラスターを特徴とする核小体局在配列(NoLS: *n*ucleolar *l*ocalization *s*equence)を有するが、NVL2のN末端領域にもこのような配列(Arg-Arg-Lys-Arg)が認められる。実際に、この配列に変異を導入すると、

NVL2は核小体への局在能を失い核質に分布するようになることから、この塩基性配列がNVL2のNoLSとして機能していると考えられる。

また核小体タンパク質は、そのNoLSを介してほかの核小体因子と相互作用することで、核小体に集積すると考えられている。そこで、NoLS依存的にNVL2が相互作用する因子を探索したところ、60Sリボソームの構成タンパク質であるRPL5が見いだされた。RPL5は細胞質に加えて核小体に多く存在し、核小体への分布に異常をきたした変異型RPL5を発現する細胞では、NVL2の核小体局在にも異常が現れた。このことからNVL2は、RPL5との相互作用を介してリボソーム生合成の場である核小体へとリクルートされ、そこでリボソーム前駆体粒子の成熟に必要な分子リモデリングに寄与しているのではないかと予想された。

#### 4. ドミナントネガティブ変異体を利用したNVL2のリボソーム生合成における機能解析

NVL2は、リボソーム生合成の場において実際に機能しているのだろうか？ これを調べるために、我々はドミナントネガティブ変異体を用いたアプローチをとることにした。これまでに、NSFやVCPなどのII型AAA-ATPaseにおいてさまざまな変異体の性質が解析され、2か所のAAAドメイン(D1およびD2)におけるATPの結合や加水分解が、分子の構造や機能制御に果たす役割について調べられてきた。NVL2と最も構造が類似したVCPでは、D1ドメインにおけるATPの結合が、六量体リング構造の形成と分子の基本機能に必須である。そのため、D1ドメインのWalker Aモチーフに保存されたLys残基を改変してATP結合能を欠損させると、VCPの分子機能は完全に損なわれる。一方、D2ドメインにおけるATPの結合は、六量体形成や基質との相互作用に必須ではないものの、複合体を構造変換へと導く分子シャペロンとしての機能に重要である。そのため、D2ドメインのWalker Aモチーフに同様の変異を導入してATP結合能を欠損させた場合には、ドミナントネガティブ変異体としての性質を示すようになる。また、各ドメインにおけるATPの加水分解も、VCPのシャペロン機能にとって重要である。そのため、D1またはD2ドメインのWalker Bモチーフに保存されたGlu残基をそれぞれ改変してATP加水分解能を欠損させた場合にも、それらはドミナントネガティブ変異体として機能し、さらに両ドメインに同時にこの変異を導入した場合には最も強い阻害作用を示すようになる<sup>20,21)</sup>。

そこで筆者らは、VCPで明らかにされたこのような性質を利用して、種々の変異型NVL2を作製し、それらのリボソーム生合成への影響を検討した。まず各種の変異型NVL2をHEK293細胞に発現させ、シヨ糖密度勾配遠心法

を用いた分画により、細胞質リボソームへの影響を調べた(図3A)。その結果、変異型NVL2を発現させた細胞では、60Sリボソームの量に著しい減少がみられ、それに伴う80Sリボソームの減少も認められた。これに対して、40Sリボソームへの影響は認められなかった。このことから、NVL2が60Sリボソームの形成に特異的に寄与することが示唆された。そこで次に、これらの変異体の発現がrRNAの形成過程に及ぼす影響を検討した。これらの細胞を<sup>32</sup>P無機リン酸または<sup>3</sup>Hメチルメチオニンの存在下で培養し、放射性標識された47S rRNA前駆体が、プロセシングを受けて成熟rRNAへと変換されるまでの分子量変化の過程を、パルスチェイス法により解析した(図3B, C)。その結果、変異型NVL2を発現させた細胞では、47S前駆体RNAから28Sおよび5.8S rRNAが形成される過程に著しい遅延が認められた。一方、40Sリボソームを構成する18S rRNAや、ほかの経路で合成される5S rRNAの生成には影響が認められなかった。以上の結果から、NVL2は60Sリボソームの形成過程において、rRNA前駆体のプロセシングの機構に関与し、その作用機序にはATPの結合および加水分解のサイクルを伴う分子シャペロンとしての働きが重要であると考えられた。

また本研究を進める過程で、出芽酵母を対象としたEd Hurtらの研究から、リボソームの生合成過程で働くAAA-ATPaseとして初めて、Rix7の働きが報告された(前述)<sup>10)</sup>。アミノ酸配列および機能の類似性から、Rix7はNVL2のオルソログであると考えられる。しかし、両者の核における局在様式やrRNA前駆体のプロセシングにおける作用などにはいくつかの違いが認められる。これらの点については、さらに詳細な検討が必要と思われる。

#### 5. 核エキソソームおよびTRAMP様複合体とNVL2の相互作用

NVL2がrRNA前駆体のプロセシングに寄与するための、具体的な分子機序はどのようなものであろうか？ リボソーム生合成の過程において進行する、rRNA前駆体の系統的なプロセシング反応では、多数の因子による段階的な複合体構築やそれらの高次構造変換(リモデリング)のプロセスが連続的に進行する。したがって、分子複合体の脱会合制御を基本機能とするAAAファミリーの一員であるNVL2が、このような過程に寄与することは容易に想像できる。筆者らは、この過程でNVL2が作用する分子複合体を明らかにするための第一歩として、酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングを行い、NVL2と特異的に相互作用するDEXD/H-box型RNAヘリカーゼであるMTR4/DOB1を同定した<sup>22)</sup>。興味深いことに、出芽酵母では、このヘリカーゼ(Mtr4/Dob1)が、5.8S rRNA形成の最終段階において、前駆体RNAの3'末端に残された延長

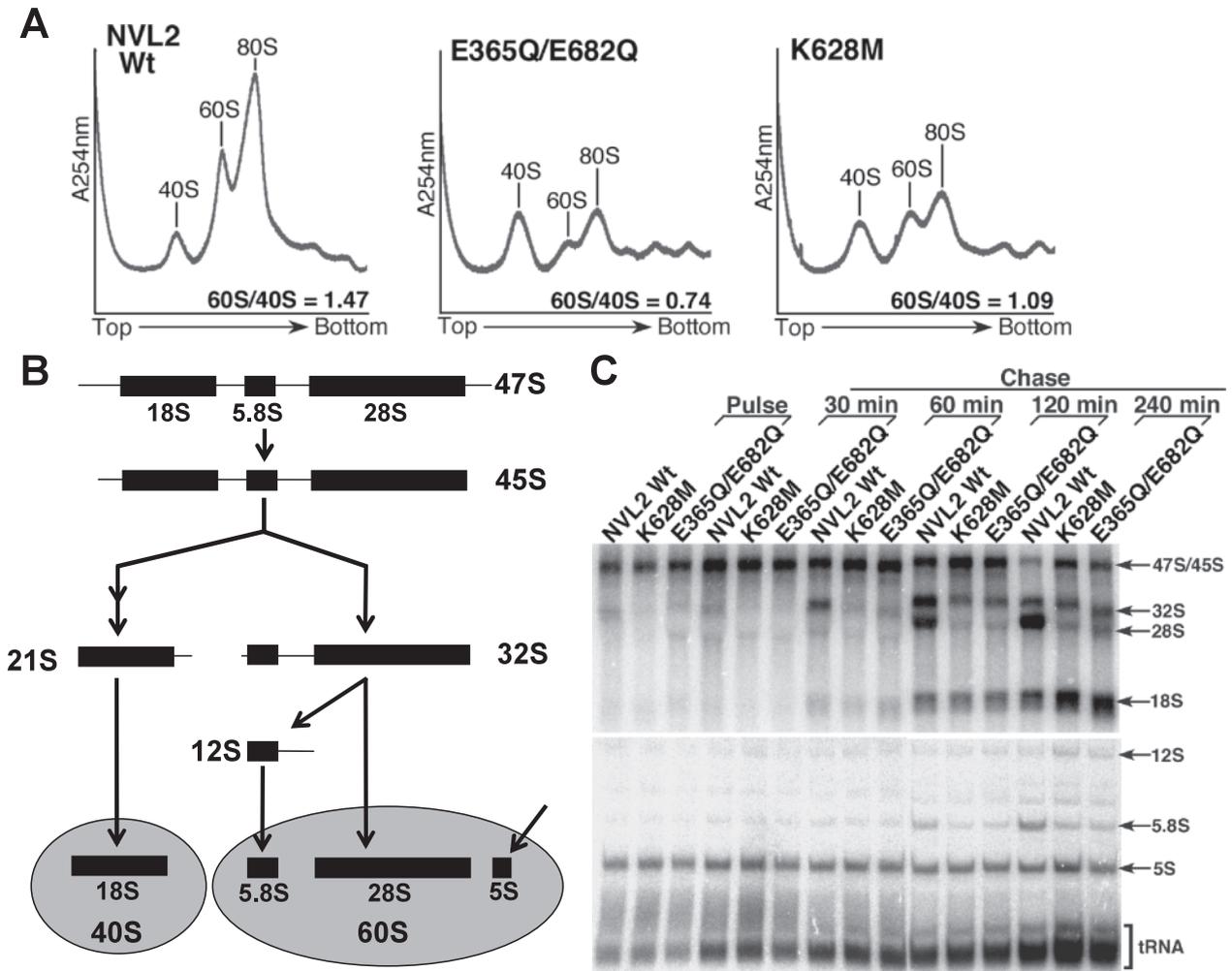


図3 NVL2のリボソーム生合成における機能

(A) 野生型または変異型 NVL2 を発現させた HEK293 細胞のリボソームを、シヨ糖密度勾配遠心法により分画した。(B) ヒト細胞におけるリボソーム RNA 生成経路の概略図。(C) 野生型または変異型 NVL2 を発現させた HEK293 細胞において、 $[^{32}\text{P}]$ 無機リン酸を用いたパルスチェイス実験を行い、rRNA 前駆体のプロセッシング過程への影響を調べた。

配列を切除する反応に必要であった<sup>23)</sup>。

またその後の研究から Mtr4/Dob1 は、mRNA, tRNA, snoRNA, マイクロ RNA (miRNA) などさまざまな RNA の生合成や、異常 RNA の分解・品質管理などに働くことが示された<sup>24,25)</sup>。これらの過程において Mtr4/Dob1 は、細胞内で主要な 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を担う複合体であるエキソソームと協同して働く。エキソソームは核と細胞質においてそれぞれ機能し(核エキソソームおよび細胞質エキソソーム)、それらは9個のサブユニットから構成されるリング状のコア(コアエキソソーム)と、これと選択的に結合する複数の触媒サブユニット(Rrp6, Dis3)およびコファクターから構築される巨大な複合体である<sup>26,27)</sup>。Rrp6 と Dis3 はコアエキソソームの異なる領域に結合し、特に Rrp6 は核エキソソームにおいて特異的に機能する触媒サブユニットである。高等真核細胞においてもこれと同様の複合体は存在し、ヒトの核エキソソームでは、触媒サ

ブユニットとして RRP6 (PM/Scf-100) が、またコファクターとして MTR4/DOB1 のほかに、RNA 結合タンパク質である RRP47 (C1D) や MPP6 などの因子が結合している<sup>28)</sup>。筆者らは siRNA を用いたノックダウンおよび共免疫沈降などの解析から、NVL2 が MTR4/DOB1 を介して核エキソソームと相互作用すること、またこの相互作用には RRP6 および MPP6 の存在が重要であることを見いだした。MTR4/DOB1 は、基質 RNA の 3'末端の高次構造を解きほぐすことにより、エキソソームによる分解を補助すると考えられている。NVL2 は、この過程を制御するものと予想される。

さらに、近年の酵母における研究から、Mtr4/Dob1 は TRAMP (Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation complex) と呼ばれる、RNA 3'末端のポリアデニル化を担う複合体を核内で形成することが示された<sup>29-31)</sup>。TRAMP 複合体は、Mtr4/Dob1 に加えて、ポリ(A)ポリメラーゼの一種 Trf4/

Trf5, および Zn フィンガー型 RNA 結合タンパク質 Air1/Air2 の 3 個のサブユニットから構成され, エキソソームと協同して種々の RNA 分解および品質管理に機能する. すなわち, 基質 RNA の 3'末端にまず TRAMP 複合体が作用して短いポリ(A)鎖が付加され, 次にこれを足場として核エキソソームがリクルートされることにより, RNA の分解が進行すると考えられている. この一連の行程において Mtr4/Dob1 は, 基質 RNA の「ポリアダニル化」とそれに続く「3'-5'分解」の各反応にあずかる複合体に共通の構成因子として機能することから, 両複合体の機能連携にとり重要であると考えられる. このような機構は, 酵母以外の高等真核細胞においても保持されていると考えられる. しかし現在まで, 動物細胞の RNA 代謝において TRAMP 様の複合体が機能しているという明確な証拠は得られていない.

ヒトの TRAMP 様複合体を構成するサブユニットは, これまでに述べてきた MTR4/DOB1 がすでに知られていたものの, Trf4/5 および Air1/2 に対応する因子は明らかではなかった. アミノ酸配列のわずかな相同性から, Trf4/5 には PAPD5 (PAP-associated domain-containing protein 5), また Air1/2 には ZCCHC7 (zinc finger CCHC domain-containing protein 7) という機能未知のヒトタンパク質が対応するものと予想されたが, 最近になりそれらの部分的な機能解析が報告されている (図 4A)<sup>32-35</sup>. 筆者らも, PAPD5 および ZCCHC7 が, MTR4/DOB1 や核エキソソーム, さらに NVL2 とも相互作用を示すことを確認し, これらのタンパク質がヒト細胞において TRAMP 様の複合体を形成しているものと考えている. NVL2 は分子シャペ

ロンとして, TRAMP および核エキソソーム複合体のリモデリングに関与し, RNA 代謝における両複合体の機能連携制御に寄与しているのではないかと予想される (図 4B).

## 6. NVL2 が制御する新たな RNA 代謝複合体因子の同定

NVL2 はリボソームの生合成過程において, リボソーム前駆体粒子上の特定の因子をエネルギー依存的に脱会合に導き, 前駆体粒子の成熟化サイクルを促す分子駆動装置としての役割を果たすと考えられる. エキソソームや TRAMP 様複合体などの, MTR4/DOB1 を構成因子に含む複合体は, NVL2 が作用する標的候補として考えられる. では, NVL2 の ATPase 活性を介して, これらの複合体から脱会合される因子を実際に見いだすことが可能であろうか. 我々は, 前述のドミナントネガティブ変異体を用いて, この問題に取り組んだ. AAA-ATPase の機能が欠損した細胞では, 本来速やかに解離して新たな反応サイクルに利用される複合体タンパク質が, 結合したままの状態細胞内に滞留・蓄積し, 細胞機能に異常が生じる. 変異型 NVL2 を発現させた細胞では, リボソーム前駆体粒子の成熟過程における特定の段階が阻害され, 構成成分の異常なリボソーム前駆体粒子や, それに付随する複合体が核内に蓄積すると予想される.

そこで筆者らは, このような異常複合体に特異的に含まれるタンパク質を分離・同定するための実験を行った. まず, ドキシサイクリンの添加により変異型 NVL2 の発現が誘導可能な HEK293 細胞を作製した. 次にこれらの細胞に, 複合体をアフィニティー精製するための FLAG タグ付加 MTR4/DOB1 をさらに安定発現させた. この細胞

## A TRAMP 複合体

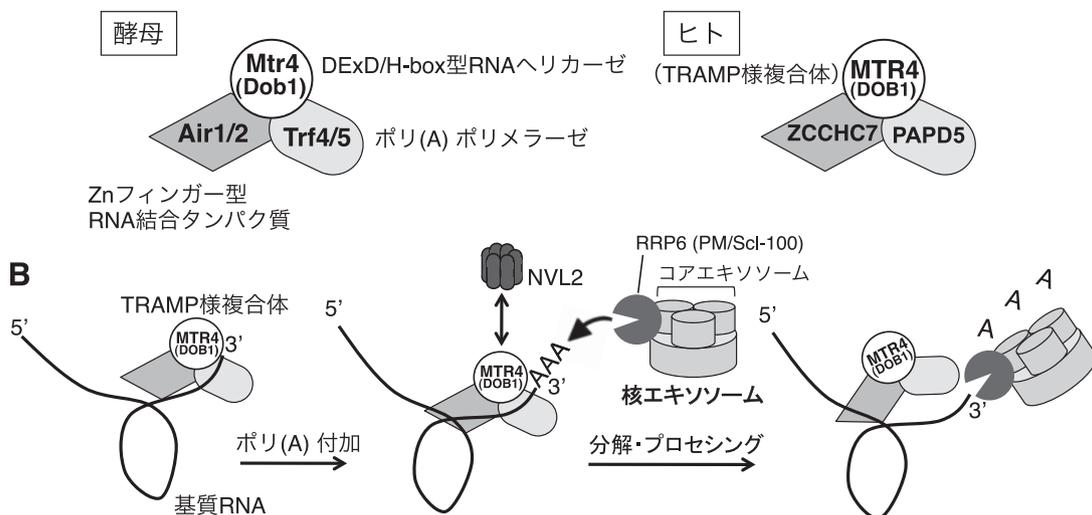


図 4 RNA ヘリカーゼ MTR4/DOB1 が形成する RNA 代謝複合体 TRAMP およびエキソソーム (A) 酵母における TRAMP 複合体およびヒトにおける TRAMP 様複合体のサブユニット構造. (B) ヒトにおける TRAMP 様複合体と核エキソソームの機能連携による, RNA の 3'-5'分解またはプロセッシングの機構モデル.

では、ドキシサイクリンの添加により、60S リボソームの生成に関わる分子複合体の異常が誘発されると考えられる。そこでそのような複合体の異常因子を分離・同定するために、変異型 NVL2 を発現誘導し細胞およびしていない細胞から、坑 FLAG 抗体ビーズを用いて FLAG-MTR4/DOB1 を構成成分とする複合体をそれぞれ精製した。そして、得られた複合体の全タンパク質をそれぞれ異なる蛍光色素で標識した後に、ディファレンシャル二次元電気泳動 (2D-DIGE) 法により、構成タンパク質の違いを定量的に比較した。また同時に、それらのタンパク質を質量分析法により網羅的に同定した (図 5A)。

その結果、それぞれの細胞から分離された複合体は大部分において共通の因子から構成されており、それらにはエキソソームのサブユニットなど既知の MTR4/DOB1 相互作用因子が含まれていた。一方、図 5B の矢印で示すように、変異型 NVL2 発現細胞から分離された複合体のみで有意な増加傾向を示す複数のタンパク質スポットを見いだ

すことができた。それらを同定して明らかにされた NVL2 制御性因子の中には、WD リpeatファミリーに属するタンパク質 WDR74 が含まれていた。WD リpeatは、Trp-Asp (WD) 配列を末尾に有する約 40 アミノ酸からなる特徴的配列の繰り返しにより構成されるモチーフで、タンパク質間の相互作用を仲介するための足場として機能することが知られている。高等真核細胞において、WDR74 の果たす役割は明らかにされていない。しかし興味深いことに、WDR74 はアミノ酸配列の相動性から、酵母で 60S リボソームの生成に働くトランス作用因子 Nsa1 のオルソログであると予想された。実際に、WDR74 はヒト細胞において 60S リボソームの生成に必要であることを、我々は確認した。先に述べたように、Nsa1 は Rix7 (酵母の NVL2 オルソログ) の働きによって、成熟過程の 60S 前駆体粒子から引きはがされる因子であり、このステップは以降の前駆体粒子の成熟化にとり重要であることが知られている。

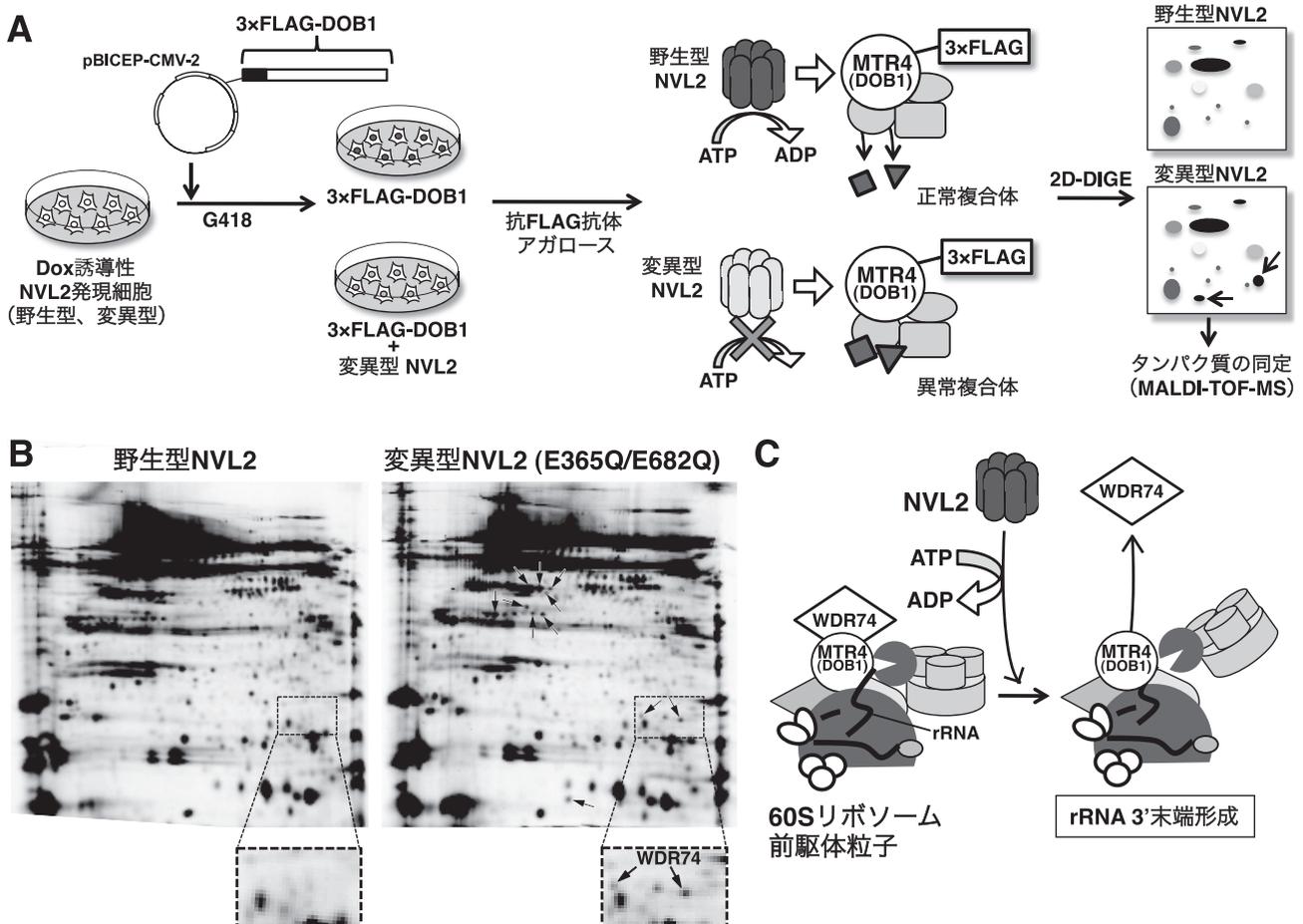


図 5 NVL2 が制御するリボソーム生成複合体因子の同定

(A) NVL2 により脱会合制御を受ける、MTR4/DOB1 含有複合体の構成成分を分離・同定するための実験の流れ。Dox: ドキシサイクリン。(B) 蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法 (2D-DIGE) により同定された、NVL2 変異体発現により特異的増加を示す MTR4/DOB1 含有複合体の構成タンパク質。(C) 60S 前駆体粒子における、NVL2 による WDR74 の解離作用と、MTR4/DOB1 含有 RNA 代謝複合体の機能制御モデル。

これらの知見を合わせると、次のような仮説を立てることができ(図5C)。すなわち、WDR74(Nsa1)は60S前駆体粒子において、MTR4/DOB1を構成因子とするエキソソームまたはTRAMP様複合体に結合して存在している。この結合は、リボソーム前駆体粒子が成熟する特定の段階で、NVL2(Rix7)の作用により解除される必要がある。このWDR74/Nsa1の解離は、エキソソーム-TRAMP系の働きによるrRNA前駆体のプロセッシング・分解の制御に重要な意味を持つのではないかと予想される。つまりこの機構は、リボソーム前駆体粒子の成熟過程で刻々と変化を続ける分子会合の状態と、その中で進行する前駆体RNAの代謝反応制御との関係を適切に同調させるための仕組みとして機能しているのではないだろうか。

## 7. おわりに

真核細胞のリボソーム生合成がこれほどまでに複雑な分子機構から成り立っていることは、一見するときわめて非効率な現象にも思われる。しかし、細胞環境の変化にตอบสนองして、リボソームの供給を制御するという観点からすると、このことにはその手段に多様性をもたらす大きな利点があると考えられる。そのため真核細胞では、膨大なエネルギー消費を伴うにも関わらず、このように複雑な仕組みを発達させてきたのではないだろうか。実際、ヒトなどの高等真核細胞では、リボソームの生合成過程における異常が、細胞増殖やアポトーシスなどの高次生体機能の制御やさまざまな臓器特異的疾患などに関連することが知られてきている。これまで真核細胞のリボソーム生合成は、出芽酵母を用いた研究からさまざまな知見が蓄積されてきたが、疾患機序の解明などに通じる高等真核細胞における解析は緒についたばかりといえる。これらの解析を通して、NVL2を含むAAAファミリーATPaseをはじめとした、分子シャペロンによるリボソームアセンブリーの制御機構や、その生物学的意義がさらに明らかにされていくことが期待される。

## 謝辞

本稿で述べた筆者らによる研究は、これまでに筆者が所属した東京薬科大学、徳島大学、明治薬科大学における研究環境を通して育まれてきたものである。その間お世話になった先生方および学生諸氏の助言と協力に感謝いたします。特に、約4年前に筆者が着任した明治薬科大学生体分子学教室において研究室の立ち上げから多大な協力と貢献をいただいた石田洋一助教および研究室の所属学生諸氏に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Strunk, B.S. & Karbstein, K. (2009) *RNA*, **15**, 2083-2104.
- 2) Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 673-683.
- 3) Panse, V.G. & Johnson, A.W. (2010) *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 260-266.
- 4) Mullineux, S.-T. & Lafontaine, D.L.J. (2012) *Biochimie*, **94**, 1521-1532.
- 5) Kressler, D., Linder, P., & de La Cruz, J. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7897-7912.
- 6) Albanese, N., Reissmann, S., & Frydman, J. (2010) *J. Cell Biol.*, **189**, 69-81.
- 7) Meyer, A.E., Hoover, L.A., & Craig, E.A. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 961-968.
- 8) Kressler, D., Hurt, E., Bergler, H., & Baßler, J. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 92-100.
- 9) Ogura, T. & Wilkinson, A.J. (2001) *Genes Cells*, **6**, 575-597.
- 10) Gadal, O., Strauss, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D., & Hurt, E. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3695-3704.
- 11) Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., & Hurt, E. (2008) *J. Cell Biol.*, **181**, 935-944.
- 12) Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Teng, M., Jacquier, A., Liebming, E., Nobis, B., Kappel, L., van der Klei, I., Hogenauer, G., Fromont-Racine, M., & Bergler, H. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 6581-6592.
- 13) Lo, K.Y., Bussiere, Z.U.C., Bresson, S., Marcotte, E.M., & Johnson, A.W. (2010) *Mol. Cell*, **39**, 196-208.
- 14) Nissan, T.A., Galani, K., Maco, B., Tollervey, D., Aebi, U., & Hurt, E. (2004) *Mol. Cell*, **15**, 295-301.
- 15) Galani, K., Nissan, T.A., Petfalski, E., Tollervey, D., & Hurt, E. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 55411-55418.
- 16) Ulbrich, C., Diepholz, M., Baßler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., & Hurt, E. (2009) *Cell*, **138**, 911-922.
- 17) Baßler, J., Kallas, M., Ulbrich, C., Thoms, M., Pertschy, B., & Hurt, E. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 712-721.
- 18) Germain-Lee, E.L., Obie, C., & Valle, D. (1997) *Genomics*, **44**, 22-34.
- 19) Nagahama, M., Hara, Y., Seki, A., Yamazoe, T., Kawate, Y., Shinohara, T., Hatsuzawa, K., Tani, K., & Tagaya, M. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5712-5723.
- 20) Wang, Q., Song, C., & Li, C.C. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 253-260.
- 21) Ye, Y., Meyer, H.H., & Rapoport, T.A. (2003) *J. Cell Biol.*, **162**, 71-84.
- 22) Nagahama, M., Yamazoe, T., Hara, Y., Tani, K., Tsuji, A., & Tagaya, M. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 1075-1082.
- 23) de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., & Linder, P. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1128-1140.
- 24) Anderson, J.S. & Parker, R. (1998) *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
- 25) Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., & Tollervey, D. (1999) *EMBO J.*, **18**, 5399-5410.
- 26) Mitchell, P. & Tollervey, D. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 843-846.
- 27) Butler, J.S. (2002) *Trends Cell Biol.*, **12**, 90-96.
- 28) Sloan, K.E., Schneider, C., & Watkins, N.J. (2012) *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 850-855.

- 29) LaCava, J., Houseley, J., Saveann, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., & Tollervey, D. (2005) *Cell*, **121**, 713–724.
- 30) Wyers, F., Rougermille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., & Jacquier, A. (2005) *Cell*, **121**, 725–737.
- 31) Vanáčová, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., & Keller, W. (2005) *PLoS Biol.*, **3**, 986–997.
- 32) Rammelt, C., Bilen, B., Zavolan, M., & Keller, W. (2011) *RNA*, **17**, 1737–1746.
- 33) Lubas, M., Chritensen, M.S., Kristiansen, M.S., Domanski, M., Falkenby, L.G., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Dziembowski, A., & Jensen, T.H. (2011) *Mol. Cell*, **43**, 624–637.
- 34) Fasken, M.B., Leung, S.W., Banerjee, A., Kodani, M.O., Chavez, R., Bowman, E.A., Purohit, M.K., Rubinson, M.E., Rubinson, E.H., & Corbett, A.H. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 37429–37445.
- 35) Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.P., Hüttelmaier, S., & Wahle, E. (2012) *RNA*, **18**, 958–972.
-