

CHERP による選択的 mRNA スプライシング制御

山中靖貴

目次

要旨	2
序論	4
材料と方法	11
結果	
第 1 章 CHERP は選択的 mRNA スプライシングに関与する	
第 1 節 CHERP は核内においてスプライシングに関与する	22
第 2 節 CHERP によるイントロン保持の標的イントロン同定とその性質・特徴	30
第 3 節 CHERP はイントロン保持に関わる標的 pre-mRNA を制御する	36
第 4 節 CHERP による制御を受けるカセットエキソンの同定とその性質・特徴	44
第 5 節 CHERP は標的 pre-mRNA のカセットエキソン インクルージョンとスキッピングを制御する	50
第 2 章 CHERP の細胞周期・細胞分裂への関与	60
考察	67
引用文献	73
謝辞	80

要旨

高等真核生物の遺伝子発現過程において、その遺伝情報はゲノム DNA から未成熟な mRNA 前駆体 (premature-mRNA: pre-mRNA) へと転写された後、5'キャッピング、スプライシング、および 3'ポリアデニル化を受けて成熟 mRNA へと伝達される。成熟 mRNA は核膜を通過し細胞質に輸送され、タンパク質へと翻訳される。スプライシングは mRNA プロセッシング過程の一つで、イントロンが除去されエキソン同士を繋ぎ合わせる反応であり、構成的または選択的スプライシングに分けられる。

Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) は、小胞体や核周辺部における 1,4,5-trisphosphate receptor と共局在し、細胞内カルシウムシグナル伝達において役割を担う。加えて、核局在シグナルを有すると共にスプライシングに関与する arginine/serine dipeptide repeat element に富む RS ドメインを保持することから、核内に局在することやスプライソームと相互作用することが報告されている。しかしながら、その核内における役割は十分には解明されていない。

本研究では、先ず CHERP が核内で局在することを確認し、次に CHERP 減少下の U2OS 細胞においてポリ (A)⁺ RNA が蓄積することを示すことで、CHERP が mRNA プロセッシングまたは核外輸送に関わることを見出した。さらに、CHERP を過剰発現させた HEK293 細胞における生化学解析やイメージング解析により、CHERP が U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) や U2 snRNP 関連タンパク質との相互作用を通して選択的スプライシングに関与する可能性を示した。次に、RNA シークエンス解析を通して、CHERP がカセットエキソン型、相互排他的エキソン型、選択的 5'スプライス部位選択型、選択的 3'スプライス部位選択型およびイントロン保持型といった様々な選択的スプライシングを制御することを明らかとした。これら 5 種類の選択的スプライシングの中でイントロン保持型が最も頻度よく観察されたため、その標的 pre-mRNA について gene ontology (GO) 解析を行ったところ、RNA 代謝に関わる細胞機能が多く検出された。それらの標的 pre-mRNA の性質を対照として用いた参照イントロンと比較したところ、スプライシングの生じやすさを表す指標である 5'および 3'スプライス部位スコア(値)が低いこと、GC 含量が高いこと、およびイントロンの長さが短いといった特徴を見出した。また、CHERP による制御を受ける選択的スプライシングとしてイベント数が最も多かったカセットエキソン型について GO 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂に関係する遺伝子が多く同定された。また、カセットエキソン型の標的 pre-mRNA では参照イントロンと比較して、3'スプライス部位やスプライシングの生じやすさを表す指標の 1 つであるブランチポイント部位のスコアが低いこと、GC 含量は低く、イントロンの長さが長いという特徴が見いだされた。

以上のことから、CHERP は核内で選択的スプライシングの制御に関わることが明らかとなった。

序論

遺伝子の複製、転写と翻訳

高等真核生物の遺伝情報はゲノム DNA に保存され、複製により遺伝情報は保存される。一方で遺伝情報は、ゲノム DNA から未成熟な mRNA 前駆体(pre-mRNA: pre-mRNA) として転写された後、5'末端のキャッピング、スプライシング、3'末端のポリアデニル化を受け成熟 mRNA(以下、mRNA と称す)となる。mRNA は核膜を通過して細胞質に輸送され、タンパク質へと翻訳される。この基本原理をセントラルドグマという(図 1)。

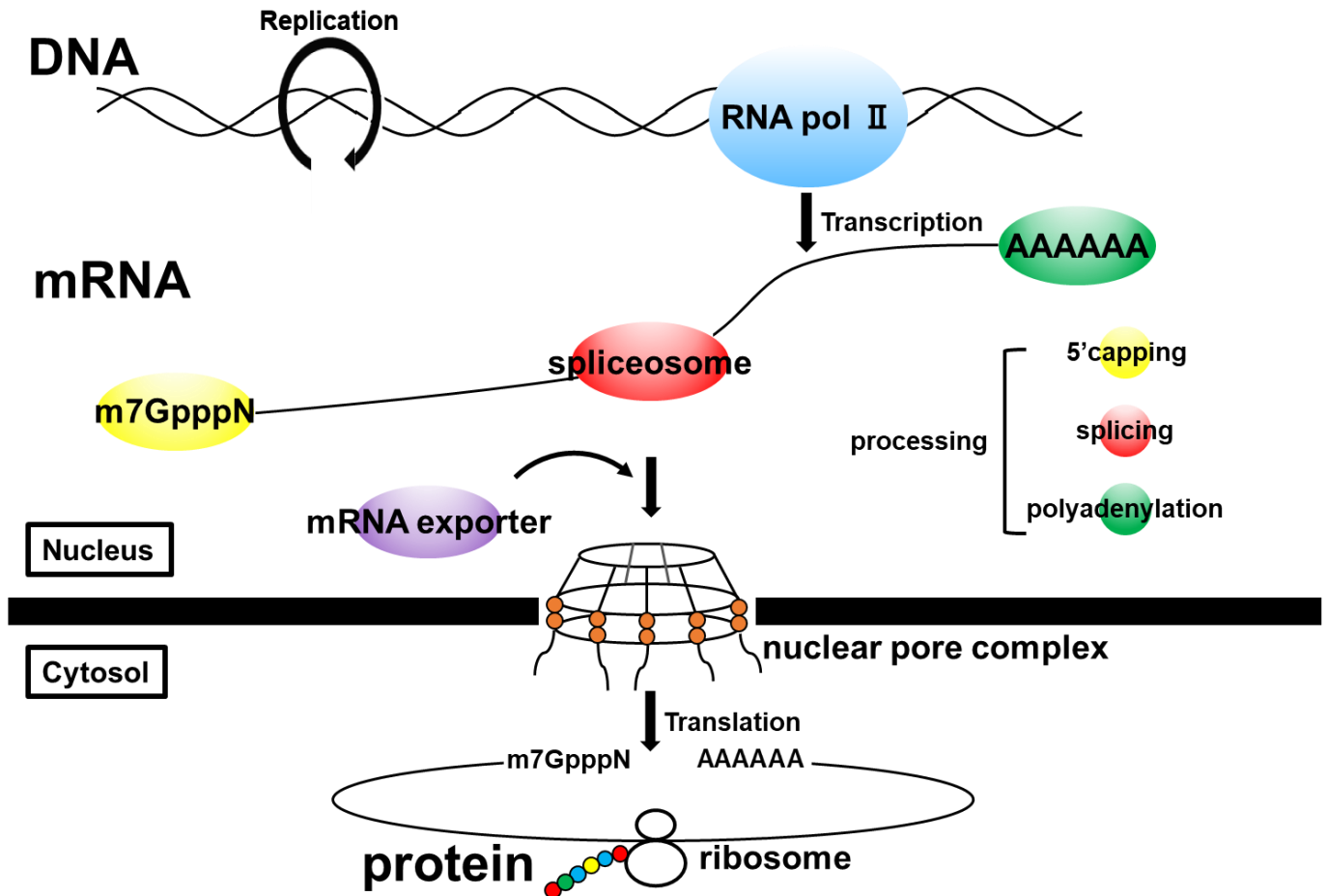


図 1 高等真核生物遺伝子のセントラルドグマと遺伝子発現制御

高等真核生物の遺伝子に関する基本的原理。RNA pol II、RNA polymerase II; m7GpppN、7-methylguanosine

mRNA プロセッシング

原核生物においてゲノム DNA は mRNA に転写された後、mRNA を鋳型としてそのまま翻訳される。一方、真核生物においては転写された pre-mRNA は 3 種類のプロセッシングを受け、核外に輸送された

後に翻訳される。プロセシングの1つ目は5'末端に7-methylguanosineが結合することにより生じるキャッピング、2つ目はスプライシング、3つ目が3'末端の切断とadenineが伸長することにより生じるポリアデニル化である。このように真核生物では遺伝子から転写されたpre-mRNAは、プロセシング過程を経ることでmRNAとなる。mRNAはnuclear RNA export factor 1 (NXF1)を介して、核膜に存在する核膜孔複合体を通過して細胞質に輸送され、リボソームによりタンパク質へと翻訳される。また、転写から核外輸送までの過程において多くのタンパク質が相互に連携して作用する。

mRNA スプライシング

スプライシングはプロセシング過程の一つで、真核生物においてイントロンを含む遺伝子の適切な発現に必須の過程である[1-3]。転写直後のpre-mRNAは、遺伝情報を持つエクソンと、遺伝情報を持たないイントロンが交互に並んだ構造をしている。遺伝子発現が生じるためにはスプライシングによってイントロンが除去され、エクソン同士が繋ぎ合わされたmRNAを生成する必要がある(図2)。イントロンの除去つまりスプライシングが正確に行われるためには、エクソンとイントロンの境界が認識され、それらの境界を識別することが重要である。この反応はエクソンとイントロンの境界に構成されるU1、U2、U4、U5、U6の5種類のU small nuclear RNA (snRNA)と240種類以上のタンパク質から構成されるsmall nuclear ribonucleoprotein (snRNP)によって行われる[4-7]。U snRNPはU1 snRNP、U2 snRNP、U4/U6 snRNP、U5 snRNPに分けられる。また、U4とU6は塩基対合により一つのsnRNPとして数えられる。スプライソソームが触媒するスプライシング反応では[5]、スプライシングを制御する主要な配列であるsplicing signalが5'スプライス部位と3'スプライス部位およびブランチポイント部位周辺に存在し、7-14塩基の短いコンセンサス配列を有している。ヒトにおいて、5'および3'スプライス部位はそれぞれ5'-AG | **GURAGU** および **YAG** | G-3' (| はエクソンとイントロンの境界で5'側が5'スプライス部位、3'側が3'スプライス部位、太字は高度に保存された塩基、Rはpurine、Yはpyrimidine)のコンセンサス配列を有し、特に5'、3'スプライス部位のイントロン側2塩基は厳密に保存されている(GT-AG則)。また、ブランチポイント部位は一般的に3'スプライス部位の21-34塩基上流にありYUNAY(太字のadenine塩基がブランチポイント部位、Nは任意の塩基のコンセンサス配列を有し、ブランチポイント部位の4-24塩基下流にはポリピリミジントラクト部位と呼ばれるpyrimidineが連続する領域が存在する。これらの配列から逸脱した配列はスプライシング不全を生じやすくなる。

スプライシングは、初めにU1 snRNPがpre-mRNAと塩基対を形成することにより、5'スプライス部位が認識されることで開始される。また、3'スプライス部位のエクソンとイントロン境界におけるAGにU2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (U2AF1)が、ポリピリミジントラクト部位にU2 small nuclear RNA

auxiliary factor 2 (U2AF2) が、ブランチポイント部位に splicing factor 1 (SF1) が結合して複合体 E を形成する。次に U2 snRNP が ATP 依存的に SF1 と置換され複合体 A となる。そして 5'、3'スプライス部位が近くに引き寄せられ、U4/U6、U5 (tri-)snRNP が U2 snRNP に集合して複合体 B となる。ここで大きく構造が変化し、U1 snRNP が解離して U6 snRNP に置換される。U4 snRNP が除去された後、U2 snRNP と U6 snRNP は塩基対を形成して結合することで複合体 B*となる。最後に複合体 C において、リン酸エステル転移反応によりブランチポイント(主に adenine)部位 2'位のヒドロキシル基が 5'スプライス部位を求核攻撃して切断し、その末端がブランチポイント部位のヒドロキシル基と 2'-5'のホスホジエステル結合により結合しリアット(投げ縄)構造が形成される。続いてリン酸エステル転移反応により解放された上流エクソン 3'末端の 3'位ヒドロキシル基がイントロン上 3'スプライス部位を求核攻撃し切断させることで両エクソンが連結し、投げ縄構造をしたイントロンが除去される。スプライシングを完了した mRNA 上には、エクソンとエクソン同士の境界より 20-24 塩基上流に約 10 種類のタンパク質からなるエクソンジャンクション複合体が形成される。

構成的スプライシングと選択的スプライシング

スプライシングは構成的スプライシングと選択的スプライシングに分けられる。前者は pre-mRNA がスプライソソームによって効率的に認識され、ただ 1 通りのエクソンの組み合わせで mRNA が生成される。後者はある 1 つの pre-mRNA から特定のエクソンの除去の有無などによって複数の異なる組み合わせのエクソンを持つ mRNA が生成される[2]。したがって、選択的スプライシングにより 1 つの pre-mRNA から異なる複数種の mRNA が合成されることで、翻訳されるタンパク質は多様性を生じる。選択的スプライシングの多くは組織・細胞種、あるいは発生段階依存的に制御されている。また、複数のエクソンを含有しているヒト遺伝子のうち 92~94%が選択的スプライシングにより行われることからその生理的意義が大きいことが推察される[8]。

選択的スプライシングは大まかに分類すると、カセットエクソン型 (cassette exons [skipped exons、SE])、相互排他的エクソン型 (mutually exclusive exons、MXE)、選択的 5'スプライス部位選択型 (alternative 5' splice sites、A5SS)、選択的 3'スプライス部位選択型 (alternative 3' splice sites、A3SS)、イントロン保持型 (intron retention [retained intron、RI]) の 5 種類に分けられる[9,10]。これらの中で最も多用されている SE は、あるエクソンを使用するかしないかという制御である。MXE は 2 つ以上のエクソン中から一つのエクソンのみを選択する制御である。A5SS は 1 つの 3'スプライス部位に対して複数の 5'スプライス部位が存在する制御である。逆に、A3SS は 1 つの 5'スプライス部位に対して複数の 3'スプライス部位が存在する制御である。そして RI はイントロンが残留する機構である。

選択的スプライシングは様々な配列や U snRNP 以外の制御因子によって巧妙に制御されている。各スプライス部位のコンセンサス配列以外にもエキソンやスプライス部位の認識に影響を与える pre-mRNA 上の cis-regulatory element と呼ばれる配列も制御に関わっている。cis-regulatory element は、塩基配列やその位置によりエキソンへの機能が異なる[1]。エキソン上において exonic splicing enhancer (ESE) や exonic splicing silencer (ESS) が、イントロン上では intronic splicing enhancer (ISE) や intronic splicing silencer (ISS) が存在する[1,3]。これら cis-regulatory element に結合しスプライシングを制御する因子である trans-acting factor が存在し[1,3]、その代表例として serine and arginine-rich (SR) タンパク質と heterogeneous nuclear ribo-nucleoproteins (hnRNPs)が同定されている[11-13]。SR タンパク質は N 末端に arginine/serine-rich (RS) ドメインと C 末端に RNA 認識モチーフを有するタンパク質である[11]。RS ドメインは別の RS ドメインと結合することができるため、SR タンパク質同士の相互作用に必要な領域である。SR タンパク質は ESE や ISE に結合し、エキソン認識に促進的に働いてスプライシングを活性化する。現在 SRSF1~12 まで 12 種類が知られており[11]、このうち serine and arginine rich splicing factor 1 (SRSF1) は標的 pre-mRNA の選択的エキソン上における RGAAGAAC 配列に結合してスプライシングを促進する[1]。一方、hnRNP は核内の heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) に結合する RNA 結合タンパク質の総称である。hnRNP は ESS や ISS に結合することによって、エキソンの認識を抑制することによりスプライシングを不活性化する。現在 hnRNP A1~U まで 20 種類が知られている[12]。例えば、hnRNP A1 は標的 pre-mRNA のイントロン上における UAGGGA/U 配列に結合し、スプライシングを抑制する[1]。また SR タンパク質や hnRNP 以外にも 200 を超える RNA 結合タンパク質がスプライシングに関与することが報告されている[14]。以上のように、スプライシングは pre-mRNA 上の 5'や 3'スプライス部位等に加えて様々な cis-regulatory element やこれらに結合する trans-acting factor により巧妙に制御されているが、選択的スプライシング制御機構の完全な解明にはまだ至っていない。

選択的スプライシングが破綻すると筋萎縮性側索硬化症や筋強直性ジストロフィー等の重篤な RNA 病や癌の原因となる[15,16]。したがって選択的スプライシングの機序を解明することは RNA 病の原因解明や治療薬創成にも繋がると期待される。

CHERP

Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) は、細胞質や核周辺部に局在し、1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) と共局在するタンパク質として単離された(図 3)[17]。IP3R は小

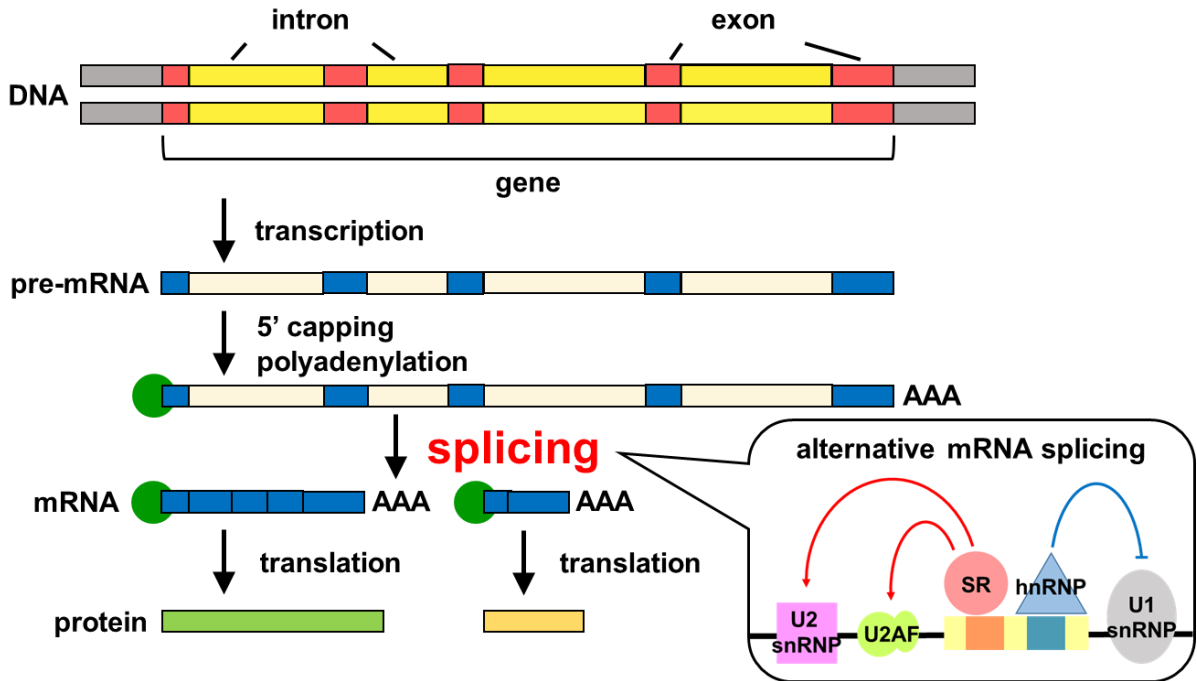


図 2 mRNA スプライシング

スプライシングはプロセシングの 1 つである。スプライシングは構成的スプライシングと選択的スプライシングに分けられる。そのうち、選択的スプライシングは様々な cis-regulatory element や trans-acting factor によって制御される。snRNP: small nuclear ribonucleoprotein; U2 snRNP: U2 small nuclear RNA auxiliary factor; SR: serine and arginine-rich protein; hnRNP: heterogeneous nuclear ribo-nucleoprotein。

胞体膜に局在し、1,4,5-trisphosphate (IP3) に反応して小胞体内の Ca^{2+} を細胞質に放出する役割を持つ。同様に CHERP も小胞体膜タンパク質として、細胞内 Ca^{2+} 濃度を制御することで細胞増殖や細胞成長に関与すると報告されている[17]。また CHERP は Ca^{2+} チャンネルとして働く ryanodine receptor (RyR) のうち、骨格筋で働き、小胞体からの Ca^{2+} を放出することで興奮収縮連関に重要な役割を果たす RyR1 と相互作用することが報告されている[18]。このように CHERP は細胞質や細胞小器官に局在し、 Ca^{2+} チャンネルと共局在することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度制御に働くタンパク質と考えられてきた。一方で、CHERP はスプライソソームと相互作用しており、特に U2 snRNP 関連因子であることも報告されている[19]。さらに、CHERP が核局在シグナルを複数もち核内に局在していることが報告されている[19]。また、CHERP の構造は 5' 端から順に RNA と結合する suppressor of white apricot (SURP) ドメイン、RNA polymerase II の carboxy-terminal domain (CTD) ドメインと相互作用する CTD-interacting domain (CID) ドメイン、RNA を認識し proline に富む proline-rich region (PRR) ドメイン、RS ドメイン、

RNA に結合する glycine-rich motif (G patch) ドメインを保有することが示唆されている[19]。加えて CHERP は、 Ca^{2+} 濃度依存的に Ca^{2+} 結合タンパク質である programmed cell death 6 (PDCD6、ALG-2) と核スペckルに共局在すること、さらに IP3R1 のエクソン 41 とエクソン 42 のスプライシングに関与することが報告されている[20]。また最近、CHERP が RNA-binding motif protein 17 (RBM17) と U2 snRNP-associated SURP domain-containing protein (U2SURP) と相互作用することによりスプライシング制御に関わることも報告された[21]。しかしながら、核内における CHERP の機能は十分には解明されていない。

そこで本研究では CHERP がプロセシングに果たす役割について、CHERP ノックダウンによるポリ(A)⁺ RNA の局在観察、CHERP と相互作用するタンパク質の解析、CHERP が制御する選択的スプライシングの制御などを解析することにより、核内における CHERP の機能を解析することとした。

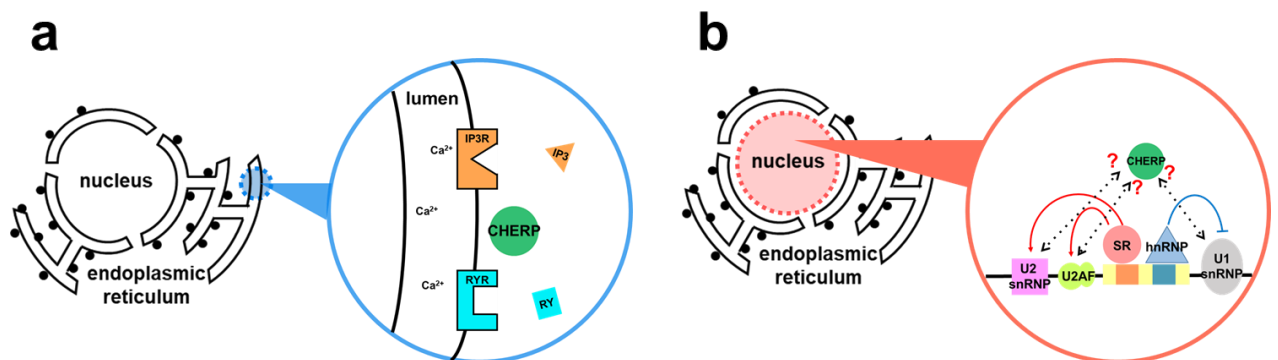


図 3 小胞体と核内における calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP)

(a) 小胞体腔における CHERP は 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) と共局在し、ryanodine receptor 1 (RyR1) と相互作用することで Ca^{2+} 代謝に関わる。IP3:1,4,5-trisphosphate; RY: ryanodine。(b) 核内における CHERP はスプライソソームの 1 つとして働くことが考えられている。

材料と方法

試薬と器具

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 高 glucose、G-418、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、SuperSep™ Ace、および他の一般的な試薬は富士フィルム和光純薬から購入した。胎児ウシ血清 (fetal bovine serum、FBS)、ULTRAhyb™-Oligo Hybridization Buffer、Opti-MEM®、Slow Fade® Antifade Kit は Thermo Fisher Scientific より購入した。細胞培養用ディッシュやプレートは Nunc から購入した。Alexa Fluor 594 標識オリゴ d(T)₄₅ プローブは Molecular Probes より購入した。Lipofectamine® 2000 は Invitrogen から購入した。ウシ血清 albumin、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide は Sigma-Aldrich より購入した。化学発光試薬は Merck Millipore から購入した。Rever Tra Ace®、KOD Fx Neo、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix は東洋紡より購入した。RQ1 DNase-Free DNase は Promega から購入した。制限酵素はタカラバイオより購入した。PlusOne™ Silver Staining Kit、Protein は GE Healthcare から購入した。polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Pall より購入した。発色 ECL 基質は Bio-Rad から購入した。trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、doxycycline、hygromycin、Sepasol® RNA I Super G はナカライテスクより購入した。

プラスミド DNA、siRNA、オリゴ DNA プライマー

本研究で使用したプラスミド DNA、siRNA やオリゴ DNA プライマーはそれぞれ表 1~3 に示した。pcDNA5/FRT/TO と各 siRNA は Invitrogen から、そして左記以外の siRNA と全オリゴ DNA プライマーは Integrated DNA Technologies より購入した。

表 1 本研究で用いたプラスミド DNA

Name	Description
pcDNA5 FRT/TO	
pcDNA5 Flag FRT/TO	Flag inserted in the HindIII site pcDNA5 FRT/TO
pcDNA5 3×Flag FRT/TO	3 × Flag inserted in the HindIII site pcDNA5 FRT/TO
pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO	CHERP(coding sequence), 2751bp inserted in the Asp718 I / EcoRV site pcDNA5 3×Flag FRT/TO
pOG44	
pcDNA5 3×Flag RPGR_e14_e15 FRT/TO	RPGR from exon14 to exon15(including intron14), 948bp inserted in the BamH I / Xho I site of pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO
pcDNA5 3×Flag ARAP2_e23_e25 FRT/TO	ARAP2 from exon23 to exon25(including intron23 and intron24), 4266bp inserted in the BamH I / Xho I site of pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO
pcDNA5 3×Flag ATG16L1_e7_e9 FRT/TO	ATG16L1 from exon7 to exon9(including intron7 and intron8), 1813bp inserted in the BamH I / Xho I site of pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO
pcDNA5 3×Flag PPP1R12A_e12_e14 FRT/TO	PPP1R12A from exon12 to exon14(including intron12 and intron13), 1739bp inserted in the BamH I / Xho I site of pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO
pcDNA5 3×Flag SIK3_e8_e10 FRT/TO	SIK3 from exon8 to exon10(including intron8 and intron9), 990bp inserted in the BamH I site of pcDNA5 3×Flag CHERP FRT/TO

本表は、Creative Commons Attribution (CC BY)のもと *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)*、23 巻、5 号、2555 (2022 年) の Table S2 を改変して作成した。

表 2 本研究で用いた siRNA

Name (Gene symbol)		Nucleotide sequence (5'→3')	Used in the
EGFP	Sense	GGGCACAAGCUGGAGUACAACUACA	(various studies)
	Antisense	UGUAGUUGUACUCCAGCUUGUGCCC	
CAT	Sense	CAAUGAAAGACGGUGAGCUGGUGAU	live cell imaging
	Antisense	(unpublished)	
CHERP#1	Sense	GAGAAGAGAACAAGGCCAUCAGAU	RNA-FISH
	Antisense	(unpublished)	
CHERP#2	Sense	rGrGrUrUrUrArGrGrUrCrUrArGrArArGrArGrArUAC	(various studies)
	Antisense	rGrUrArUrUrCrUrUrCrUrUrCrUrArGrArCrCrUrArArCrCrArA	
UAP56	Sense	CCUGAUGAGAUAGACAUCUCCUCCU	RNA-FISH
	Antisense	(unpublished)	
NXT1	Sense	GAACUGGUUCAAGAUACA AUUCCU	RNA-FISH
	Antisense	(unpublished)	

本表は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022 年) の Table S3 を改変して作成した。

表 3 本研究で用いたオリゴ DNA プライマー

Name		Nucleotide sequence (5'→3')	Used in the	
PGK1	Forward	GTTGCAGACAAGATCCAGCTC	quantification of mRNA expression	
	Reverse	GAAGTGCCAACTCCATGTTG		
CHERP	Forward	CCAATGTGCCTACTTCGAT	quantification of mRNA expression	
	Reverse	TGTA CTCTGATCTTCCAGCTT		
	Forward	TGACAAGCTTGCA TGATGGAGATGCCGCTGC		
tRNA	Forward	GTAGCTGTGGCCGAGTGTTAAG	confirmation of the fractionation	
	Reverse	GTAGTCGGCAGGATTCGAACC		
U6 snRNA	Forward	GTGCTCCCTTCGGCAAGCACTTACACTAAA	confirmation of the fractionation	
	Reverse	CTCAAAAAGGAATGCTTACAAAATTTGCTT		
E2F8	Forward	CGGGGAGGAGAATAAGTACG	confirmation of the fractionation	
	Reverse	CTTGTCTTTGCGGCTGTTTA		
CANT1	Forward	CCCTCCTCACTCAGCTTCC	quantification of increased intron inclusion	
	Reverse	GGTCAGGTAGCCCTTTTCA		
RPGR	Forward	GACGCAGGATACAGCTCTTA	quantification of increased intron inclusion	
	Reverse	TTGAATCCTCTGCTCCTCC		
	Forward	CGCGGATCCAACAACAACAATTGGGAACTGA	construction of minigene wild-type	
	Reverse	ATATCCGCTCGAGCTCTGCTTTGTCTGTAAGGTCATCTGATA		
	Forward	AGATGAGGAAGCAGGTAAGGACACAGGCCA		construction of minigene mutant for 5' splice site
	Reverse	TGGCCTGTGTCTTACTCTGCTTCTCCTC		
ATG16L1	Forward	CGCGGATCCAACAACAACAATTGGGAACTGA	construction of minigene mutant for 3' splice site	
	Reverse	ATATCCGCTCGAGCTCTGCTTTGTCTGTAAGGTCATCTGATA		
	Forward	GAACAACCAACATTGACTTGC	quantification of increased intron inclusion	
	Reverse	CTTTGCTGGTAGGTTTTC		
	DVL3	Forward	TGAGCAGTGAGCTGGAGACC	quantification of decreased intron inclusion
		Reverse	CGCCGCTGTGTCTTCTCATC	
PODXL	Forward	ACCTACCTGCCAGAGACCA	quantification of decreased intron inclusion	
	Reverse	AGGACGAGCTGCTTCTCACTC		
SUPT7L	Forward	TTTGACCGACACAGAATGCCTG	quantification of decreased intron inclusion	
	Reverse	AGTGTGACAAAAGTGTAGGACCA		
ARAP2	Forward	TGGCCTTGGTCTTTTCATCC	quantification of exon inclusion	
	Reverse	CAGTCGGGTTCCCTTCTTTC		
ATG16L1	Forward	TTGAGGTCATTGTGGATGAAAC	quantification of exon inclusion	
	Reverse	ACTGGGAAGGAAGAGACAGA		
	Forward	CGCGGATCCGGATGATGACATTGAGGTCATTGTGGA	construction of minigene wild-type	
	Reverse	CCGCTCGAGGAAGACACACAAGGCAGTAG		
	Forward	CCCTTCCCTCCCTCCCTTTTGTAGTAAGCGACTCTCGC		construction of minigene mutant for 3' splice site
	Reverse	GCGAGAGTCGCTTACTAAAAAGGGAGGGAGGAAAGG		
	Forward	CCATCCTCGCCTCCCTTTTGTAGTAAGCGACTCTCG		
	Reverse	CGAGAGTCGCTTACTAAAGAGGAGCGGAGGATAGG		
	Forward	CGCGGATCCGGATGATGACATTGAGGTCATTGTGGA		
	Reverse	CCGCTCGAGGAAGACACACAAGGCAGTAG		
	ATG16L1	Forward	TTCTGGATTCTACTAATAATCTTTGGGTAAGTTAGAAGACCTTTCTTTTAAATGTG	construction of minigene mutant for 5' splice site
		Reverse	CACATTTAAAAAGGAAAGGCTCTTAAGTACCCAAAGATATTAGTGATAGAATCCAGAA	
Forward		TTCTGGATTCTACTAATAATCTTTGGGTAAGGTTAGAAGACCTTTCTTTTAAATGTG	construction of minigene mutant for 5' splice site	
Reverse		TACACATTTAAAAAGGAAAGGCTCTTACCCAAAGATATTAGTGATAGAATCCAGAA		
Forward		CGCGGATCCGGATGATGACATTGAGGTCATTGTGGA		
Reverse		CCGCTCGAGGAAGACACACAAGGCAGTAG		

(次ページへ続く)

Survivin/baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5) ポリクローナル抗体は Abnova から購入した。マウス抗 aurora kinase B (AURKB) モノクローナル抗体は BD Biosciences より購入した。ウサギ抗 breast cancer type 1 (BRCA1) モノクローナル抗体は Santa Cruz から購入した。Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ抗体は Thermo Fisher Scientific より購入した。horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス、ラット、ウサギ抗体は SeraCare Life Sciences から購入した。ウサギ抗 CHERP ポリクローナル抗体は牧正敏博士(名古屋大学・生命農学研究科)より分与していただいた。マウス抗 U2F2 モノクローナル抗体とウサギ抗 NXF1 ポリクローナル抗体は Robin Reed 博士(ハーバード大学・医学大学院)から分与していただいた。ラット抗 U2 auxiliary factors 65-associated protein (UAP56) ポリクローナル抗体について、以前に報告されたものを使用した[22]。Calnexin (CANX) はウサギポリクローナル抗体を使用した。

組換えプラスミド DNA の作製

安定発現細胞株を作製するため野生型ヒト CHERP cDNA を pcDNA5 FLAG FRT/TO に挿入した。また、全長 CHERP cDNA は牧正敏博士より分与していただいた。野生型ヒト CHERP は PCR により生成した。塩基配列は塩基配列解析により確認した。

ミニ遺伝子スプライシングアッセイをするため、標的領域をヒトゲノム DNA から PCR により増幅させ pcDNA5 3×FLAG FRT/TO にクローン化させた。変異体は点変異導入 PCR により得た。塩基配列は塩基配列解析により確認した。

細胞の培養

細胞株として、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、ヒト子宮頸癌由来 Hela 細胞、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 Flp-In™ T-REx™ 細胞 (Invitrogen)、histone 2B-green fluorescent protein (H2B-GFP) 安定発現 U2OS 細胞を使用した。

全ての細胞は、56°C で 30 分間非働化した FBS を 10% 添加した DMEM 高 glucose 培地を用いて 37°C、5% CO₂ で培養した。

遺伝子導入(トランスフェクション)

Opti-MEM[®]にプラスミド DNA または siRNA をいれて懸濁したものと、Opti-MEM[®]に Lipofectamine[®] 2000 をいれて懸濁したものを混合し、室温で 20 分間静置した。その後、プラスミド DNA の終濃度が 1.25 mg/ml または siRNA の終濃度が 20 nM になるように調製し、混合液を培養細胞に加えた。

安定発現細胞株樹立

CHERP を挿入した発現ベクタープラスミド pcDNA5 3×FLAG-CHERP FRT/TO を HEK293 Flp-In™ T-REx™ 細胞に Lipofectamine® 2000 を用いて導入した。その後、細胞は 10% FBS 含有 DMEM 高 glucose 培地に 100 ng/mL hygromycin を添加して培養した。その後、hygromycin 耐性となった単一コロニーを選択した。次に、FLAG-CHERP の発現を誘導するため 1 µg/mL doxycycline 含有培地で 24 時間培養した。細胞可溶化液はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis、SDS-PAGE) によりタンパク質を分離し Western blot により解析した。

H2B-GFP を挿入した発現ベクタープラスミド pcDNA5/FRT/TO を U2OS 細胞に Lipofectamine® 2000 を用いて導入した。その後、細胞は 10%FBS 含有 DMEM 高 glucose 培地に 100 µg/mL G-418 を添加して培養した。そして、G418 耐性となった単一コロニーについて、核内に GFP 発現が確認できるコロニーを OLYMPUS DP70 カメラ(オリンパス)を搭載した蛍光顕微鏡 Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss) により選択した[22,23]。

細胞質、核小体・クロマチン(染色質)、小胞体膜・核膜(不溶性)画分からのタンパク質調製

細胞を回収し、細胞低張緩衝液 (10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid [HEPES]-KOH [pH 7.9]/10 mM KCl/1.5 mM MgCl₂/0.2 mM phenylmethylsulfonyl [PMSF]/0.5 mM dithiothreitol [DTT]) で洗浄し、緩衝液に置換した[22]。さらに 2 倍量の低張緩衝液を加え、氷上で 10 分間静置した。次にホモジナイザー (WHEATON) を用いて細胞膜を破壊した。その後、10,000 × g で 10 秒間遠心分離し、上清を細胞質画分として回収した。そして、沈殿物の同量の高張緩衝液 (20 mM HEPES-KOH [pH 7.9]/420 mM NaCl/1.5 mM MgCl₂/0.2 mM EDTA/25% glycerol/0.2 mM PMSF/0.5 mM DTT) を添加して懸濁し、氷上で 20 分間静置した。この溶液を 10,000 × g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を核小体・クロマチン画分として回収した。細胞質、核小体・クロマチン画分のタンパク質量は Bradford アッセイ(ナカライテスク)で測定した。残ったものは小胞体膜・核膜を含む(不溶性)画分とした。そして、4 × SDS 緩衝液 (190 mM Tris-HCl [pH 6.8]/40% glycerol/0.8% SDS/0.2% bromophenol blue/40 mM DTT) を混合し、2 分間沸騰した。

免疫染色

細胞を 1 × 10⁵ cells/mL でカバースリップ上に播種し培養した。その 24 時間後に、4% formaldehyde 含有 DMEM 高 glucose 培地で固定した。続いて PBS で洗浄し、6%ウシ血清 albumin を用いて、室温 1 時間ブロッキングした。カバースリップを抗 CHERP 抗血清/2%ウシ血清 albumin/PBS を用いて 4°C

で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ抗体を用いて 37°C で 1 時間インキュベートした。DNA は DAPI を用いて染色した。

RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (RNA-fluorescence *in situ* hybridization, RNA-FISH)

カバーガラス上に播種させた細胞に 10% formaldehyde/PBS を添加し、室温で 20 分間固定した [23,24]。次に 0.1% *t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton™ X100)/PBS を添加した後に室温で 10 分間処理して、細胞膜を透過化した。その後 PBS を用いて室温で 5 分間処理することで洗浄し、それを 3 回繰り返した。次に 2 × NaCl/saline sodium citrate (SSC) 緩衝液を添加し、室温で 5 分間再度洗浄した。そして ULTRAhyb®-Oligo Hybridization Buffer で 42°C、1 時間処理し、Alexa Fluor 594 標識オリゴ d(T)₄₅ プローブを用いて 42°C で一晩反応させた。続いて 2×SSC、0.5×SSC、0.1×SSC の順に 42°C でそれぞれ 20 分、10 分、10 分間処理し洗浄した。DNA は DAPI を用いて染色した。その後、PBS で室温 10 分間の洗浄を 2 回行い、Slow Fade® Antifade Kit を用いて封入した。OLYMPUS DP70 カメラを搭載した蛍光顕微鏡 Zeiss Axioplan 2 により観察した。核と細胞質の分節化とポリ (A)⁺ RNA シグナル定量は CellProfiler cell image analysis software (3.1.5 版) を用いて行った [25]。

免疫沈降 (immunoprecipitation, IP)

マウス抗 FLAG 抗体をプロテイン G ゲル上に架橋するため、0.2 M boric acid (pH 9.0)/60 mM dimethyl pimelimidate (DMP) を添加し室温で 30 分間攪拌した。溶液を遠心分離してゲルを沈殿させた。次いで、ゲルに 0.2 M ethanolamine (pH 8.0) を添加し室温で 1 時間攪拌した。その後、遠心分離をしてゲルを沈殿させた。同様に 100 mM glycine (pH 3.0) を添加し室温で 10 分間攪拌した。続いて、0.2 M ethanolamine を添加し室温で 5 分間攪拌した。そして、PBS-T (PBS/0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate [Tween® 20]/0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) で洗浄し、遠心分離後のゲルを抗 FLAG 抗体架橋ゲルとした。FLAG タグ融合タンパク質を発現させた細胞から得た核抽出物に、タンパク質分解酵素阻害剤混合物 1 μL、RNase A 10 μg、PBS-T 200 μL を加え 30°C で 20 分間処理した。上記で得た核抽出物と抗 FLAG 抗体架橋ゲルを 4°C で 3 時間攪拌した。この溶液を遠心分離し、沈殿物を PBS-T で 4 回洗浄後、4 × SDS 緩衝液を添加して 37°C で 5 分間静置した。ゲルを遠心分離し、上清に終濃度が 0.5 mM になるよう DTT を添加した。そして、上清に溶出したタンパク質を SDS-PAGE で分離した。

銀染色 (silver staining)

5-20% SuperSep™ Ace を用いて SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。ゲルを 40% ethanol/10% acetic acid を用いて室温で 30 分間固定させた。その後、ゲルを 30% ethanol/0.125% glutaraldehyde/0.2% sodium thiosulfate/0.07% sodium acetate で 30 分間反応させた。滅菌水で洗浄後、0.25% silver nitrate/0.015% formaldehyde で 20 分間反応させた。さらに滅菌水で洗浄後、0.025% sodium carboxylate/0.007% formaldehyde でゲルを発色させた。十分に発色が確認された時点で、1.5% disodium dihydrogen ethylenediamine tetra-acetic acid dihydrate を添加して反応を止め、滅菌水を用いて洗浄した。撮影は LAS 1000 (富士フィルム)を用いた。

液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)

前述に示す方法で調製したゲルの泳動部分全てを切り出した。そして、タンパク質分解酵素を用いて処理し、LC-MS/MS により解析した[24]。結果は Mascot software (Matrix Science) で計算された prot matches と prot score で同定されたペプチド数を使用して解析した。protein score は CHERP 発現細胞からコントロール細胞の prot score を減じて計算した。実際の作業、およびタンパク質同定は、渡邊祐三氏 (京都大学・生命科学研究科) が実施した。

Western blot

SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜上にセミドライ式ブロッキング装置 (Bio-Rad) を用いて転写した。PVDF 膜を 5% skim milk/0.1% Tween® 20/PBS に浸して室温で 1-2 時間ブロッキングした。その後、0.1% Tween® 20/PBS で洗浄し、0.1% Tween® 20/PBS で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応した。次に PVDF 膜を 0.1% Tween® 20/PBS に 10 分間 3 回室温で洗浄し、0.1% Tween® 20/PBS で希釈した HRP 標識二次抗体を常温で 1-3 時間反応した。PVDF 膜を 0.1% Tween® 20/PBS で 10 分間を 3 回洗浄した。そして、発色基質を用いて化学発光させ、LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて撮影した。

細胞質、核画分からの RNA 単離

細胞を回収した後に PBS で洗浄し、遠心分離した後に上清を除去した。細胞溶解緩衝液 (20 mM tris[hydroxymethyl]aminomethane [Tris]-HCl [pH 8.0]/200 mM NaCl/1 mM MgCl₂/1% octylphenoxy poly[ethyleneoxy]ethanol [Nonidet™ P-40, NP-40]) で処理し、氷上で 5 分間静置した。これにより細胞膜を透過化して細胞質中の RNA を溶液中に溶出させた。次に、10,000 × g で 1 分間回転して上清を回収し細胞質画分とした。一方、沈殿した部分を核画分とした。

RNA 単離、cDNA 合成、半定量的 RT-PCR (reverse transcription-semi-quantitative PCR: RT- semi-qPCR)

前述のように分画した細胞質画分あるいは核画分、さらに全細胞画分について、Sepasol[®] RNA I super G、chloroform、2-propanol 用いて RNA を回収した。RQ1 RNase-Free DNase を用いて 37°C で 10 分間反応し、ゲノム DNA を除去した。次に単離した RNA をランダム 9 プライマーと Rever Tra Ace[®]を用いて cDNA を合成した。その後、cDNA を KOD Fx Neo を用いて polymerase chain reaction (PCR) を行い、標的を増幅させた。得られた増幅産物を Tris-acetate-EDTA (TAE) 1% agarose electrophoresis または Tris-borate-EDTA (TBE) 8% PAGE により分離して評価した。増幅産物は FAS-IV gel imaging system (ニッポンジェネティクス) で可視化した。増幅産物は塩基配列解析することにより、当該産物が標的配列であることを確認した。

RNA シークエンス (RNA sequencing、RNA-Seq) ライブラリー調製

30%コンフルエントになった U2OS 細胞に終濃度が 20 nM になるように EGFP または CHERP#2 siRNA を Lipofectamine[®] 2000 を用いて 48 時間導入した。全体または細胞質の RNA は上述した方法で単離した。RNA-Seq ライブラリーは Truseq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を使用して調製した。

バイオインフォマティクス解析

独立した 2 回の実験で得られたサンプルを NextSeq High Output sequencer (Illumina) を用いて解析した。全細胞と細胞質から単離・精製した RNA のリード数はそれぞれ約 3,000 万リード/サンプル、約 2,000 万リード/サンプルで解析した。配列リードは STAR (2.5.2b 版) を使用してヒト UCSC hg19 genome annotation database にマッピングした[26]。マッピングされたリードは RSEM (1.2.25 版) と GENCODE (19 版) の GTF ファイルを用いて各転写産物の発現量に変換し[27]、EBSeq (1.2.25 版) を用いて各サンプルに対する遺伝子発現を標準化した[28]。選択的スプライシングは rMATS を使用して解析した[29]。マッピング結果は SAMtools (1.9 版) により指標付けし[30]、Integrative Genomics Viewer (IGV; 2.3 版) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/home>) を用いて可視化した。リード長は全細胞、細胞質サンプルでそれぞれ 150 nt を paired-end、75 nt を single-end で解析した。Gene ontology (GO) 解析は Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; 6.7 版) を用いて実行した[31,32]。5'および 3'スプライス部位スコア(値)は MaxEntScan[33]、ブランチポイント部位とポリピリミジントラクト部位スコアは SVM-Bpfinder を用いて計算した[34]。5'、3'

スプライス部位の境界域におけるエクソン 15 塩基とイントロン 20 塩基の塩基配列を BEDtools (2.24.0 版) により得て[35]、Weblogo (2.8.2 版) を使用して可視化した[36]。

定量的 RT-PCR (reverse transcriptase-quantitative PCR、RT-qPCR)

THUNDERBIRD[®] SYBR qPCR Mix を使用して Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) により qPCR を実行した。各サンプルは 3 回ずつ調製し、mRNA 量は Threshold Cycle (Ct) 値によって測定した。

スプライシングレポーターアッセイ

細胞を 6 ウェルプレートに 15~20%コンフルエントとなるよう播種した。翌日、Lipofectamine[®] 2000 を用いて siRNA を細胞に導入した。48 時間の培養後、Lipofectamine[®] 2000 を用いてミニ遺伝子レポータープラスミド DNA 750 ng/ウェルを細胞に導入した。次の日に細胞を回収し、上述のように RNA を調製した。ミニ遺伝子レポーターの発現は RT-PCR により解析した。

生細胞イメージング

各細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (AGC techno glass) で培養し、前述の通り siRNA を導入した[22,37]。細胞を 36 時間培養した後、Biostation IMq (Nikon) を用いて 37°C 5% CO₂、湿度 100% で、5 分間隔で 16 時間画像を撮影した。

結果

第 1 章 CHERP は選択的 mRNA スプライシングに関与する

第 1 節 CHERP は核内においてスプライシングに関与する

CHERP の局在を確認するため、U2OS 細胞を細胞質、核小体またはクロマチン(染色質)画分、および小胞体膜・核膜(不溶性)画分に分画し、Western blot による解析を行った。その結果、核小体またはクロマチン(染色質)画分に CHERP が発現していることが確認されたため(図 4)、次に核内における CHERP の機能を明らかにしようと考えた。また、これまでの知見から mRNA 代謝と関わると考えられたため、CHERP の核内における mRNA 代謝機能を調べることにした。まず、CHERP#1、または#2 siRNA の 2 種類の siRNA を用いると、それぞれにおいて CHERP のタンパク質発現が顕著に減少することを確認した(図 5a、b)。次に CHERP が核内においてどのような働きをするかについて、ポリ (A)⁺ RNA の局在を RNA-FISH を使用して評価したところ、核内においてポリ (A)⁺ RNA の蓄積を確認した(図 6a、b)。この結果は、UAP56 や NXF1 など既に mRNA のスプライシングや核外輸送に機能することが知られている因子の発現減少(ノックダウン)によって生じる表現型と類似であったため、RNA-FISH を用いることで CHERP の機能が正しく評価できると考えた。なお以降の解析には、ノックダウンによるポリ (A)⁺ RNA の核内蓄積をより強く確認可能であった CHERP #2 siRNA を使用することとした(図 6b)。

続いて CHERP が核内の mRNA 代謝にどのような役割を果たすかを解明するため、CHERP と相互作用するタンパク質の同定を試みた。pcDNA5 3×FLAG-CHERP FRT/TO を導入し、FLAG タグを付した CHERP を安定発現させた HEK293 Flp-In™ T-REx™ 細胞から CHERP を免疫沈降により回収し、LC-MS/MS を用いて相互作用タンパク質を解析したところ(図 7a-c)、CHERP と相互作用すると推察されるタンパク質を多数同定することができた。これらの中で CHERP は U2 snRNP の構成因子の1つである spliceosome factor 3b subunits (SF3B1、SF3B2、SF3B3) および U2 関連タンパク質の U2AF2 や U2SURP と相互作用する可能性が示唆されたため、U2AF1 と U2AF2 について Western blot を用いて実際に相互作用を確認した(図 8)。また、上記の質量分析で検出されたタンパク質について GO 解析を行うと、多くがプロセッシング、特にスプライシングに関連するタンパク質であり、またスプライシング初期の反応に関わる因子が多く見られた。全ての因子について CHERP との相互作用を確認したわけではないために断定することは出来ないが、いくつかの因子で実際に相互作用を検出していることから(図 8)、CHERP がスプライシングの初期段階に役割を持つ可能性が示唆された。(図 9)。

次いで、スプライシングにおける CHERP の機能を評価するため、CHERP ノックダウン下の U2OS 細胞において RNA-Seq 解析を実行した(図 10a、b)。得られたシーケンスデータを rMATS により解

析することで、5つの選択的スプライシング型に分類したところ(図 11a)、SE、MXE、A5SS、A3SS および RI の標的数はそれぞれ 82520、19756、3807、5729、および 4073 個存在していた。このうち false discovery rate (FDR) < 0.05 を有意であるとして取得すると、それぞれ 6047、988、355、436、および 679 個であった。イベント数としては SE が最も多く検出されたが、各選択的スプライシング総数に対する FDR < 0.05 を満たした個数の割合としては、RI が最も高い値を示した(図 11b)。

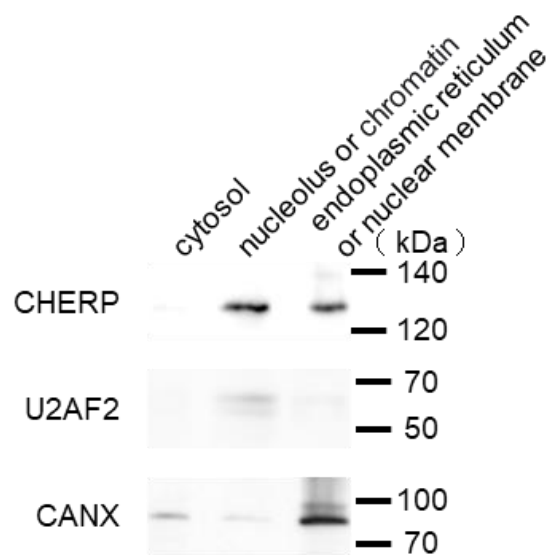
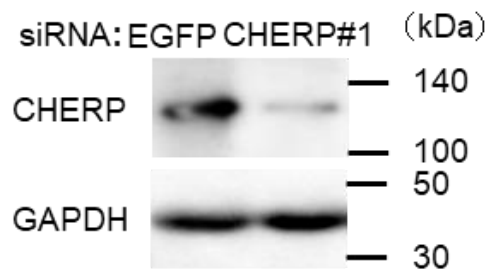


図 4 CHERP の局在

U2OS 細胞から調製した細胞質、核小体またはクロマチン(染色質)および小胞体膜・核膜(不溶性)画分における CHERP の発現を Western blot で解析した。U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 (U2AF2) を核マーカーとして使用し、小胞体膜・核膜の不溶性画分を検出するため、小胞体マーカーとして用いられる Calnexin (CANX) を使用した。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022 年) の Figure 1a を改変して作成した。

a



b

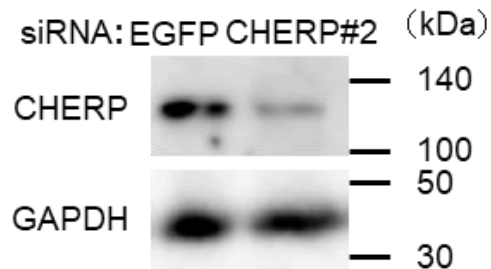


図 5 CHERP 減少(ノックダウン)の確認

(a) U2OS 細胞に EGFP(コントロール)または CHERP#1 siRNA を導入 48 時間後に CHERP のタンパク質発現量を Western blot により解析した。GAPDH を使用して標準化した。(b) CHERP#2 に関して (a) と同様に解析を行った。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 1b、および Figure S1a を改変して作成した。

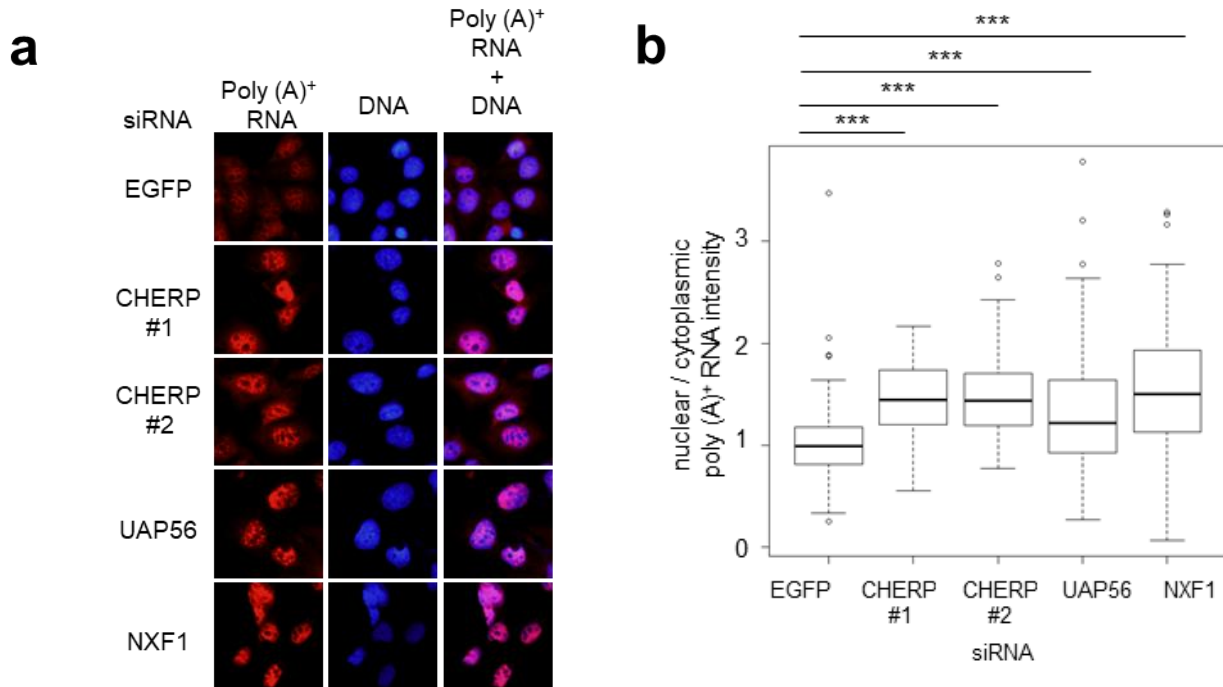
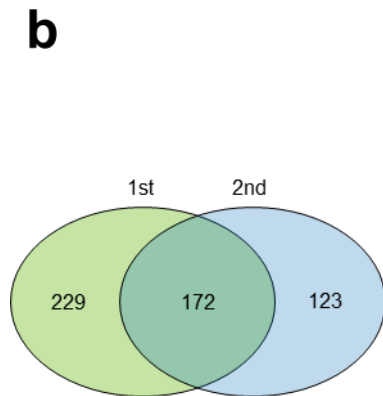
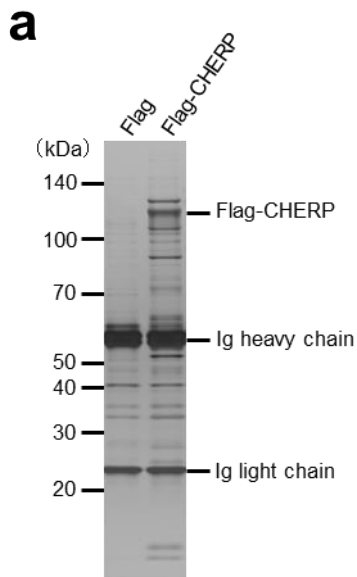


図 6 CHERP ノックダウンによるポリ (A)⁺ RNA の局在

(a) U2OS 細胞に EGFP または CHERP#2 siRNA を導入 48 時間後にポリ (A)⁺ RNA の局在を RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (RNA-fluorescence *in situ* hybridization、RNA-FISH) により解析した。ポリ (A)⁺ RNA は Alexa 594 で標識されたオリゴ d(T)₄₅ プローブを用いて検出した。DNA は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて染色した。スケールバーは 20 μm。(b) (a) で測定したポリ (A)⁺ RNA の核/細胞質比。核内と細胞質のシグナル強度を定量化した (n = 100)。箱は中央値(中心線)と上下の四分位数を示す。髭は最高値と最低値を表す。統計処理は one-way analysis of variance (one way-ANOVA) とそれに伴う Dunnett 検定を使用した。*** p < 0.001。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 1c、d、および Figure S1b を改変して作成した。



c

name (gene symbol)	protein score (1st)	protein score (2nd)	protein score (average)	group
ILF2	590	633	611.5	mRNA binding
SNRPD1	259	103	181	Sm
SNRPD2	161	354	257.5	
SNRPD3	38	53	45.5	
SNRPE	66	181	123.5	
SNRPG	101	91	96	
SNRPA	112	138	125	
PHF5A	78	155	116.5	U1
SF3A1	1062	1598	1330	
SF3A2	565	782	673.5	
SF3A3	1019	1631	1325	
SF3B1	2486	2799	2642.5	
SF3B14	108	161	134.5	
SF3B2	1667	2018	1842.5	
SF3B3	1781	2113	1947	
SF3B4	181	332	256.5	
SF3B5	127	263	195	
SNRPA1	307	666	486.5	
SNRPB2	307	400	353.5	
CHERP	1107	1622	1364.5	U2 rel
DDX46	38	31	34.5	
DHX15	1481	1456	1468.5	
DNAJC8	666	704	685	
RBM17	739	1190	964.5	
SMNDC1	106	140	123	
U2AF1	200	200	200	
U2AF2	783	981	882	
U2SURP	1903	1908	1905.5	
C19orf43	197	563	380	
CCAR1	1670	1961	1815.5	
DDX17	225	192	208.5	
FUS	213	32	122.5	
RBM10	990	1403	1196.5	A
RBM39	92	277	184.5	
RBM5	1226	1819	1522.5	
SF1	655	754	704.5	
SUGP1	914	1610	1262	
EFTUD2	170	145	157.5	
PRPF6	48	161	104.5	
PRPF8	1858	1900	1879	U5
SNRNP200	1276	1944	1610	
PRPF3	30	30	30	U4/U6
HSPA8	817	1019	918	Prp19
PRPF19	171	79	125	
MATR3	588	257	422.5	C2
SRSF1	4	108	56	SR
SRSF10	5	27	16	
SRSF9	351	266	308.5	
TRA2A	46	98	72	
TRA2B	113	134	123.5	
HNRNPA0	99	127	113	
HNRNPA2B1	132	403	267.5	hnRNP
HNRNPC	265	373	319	
HNRNPD	194	87	140.5	
HNRNPH1	45	79	62	
HNRNPH3	102	232	167	
HNRNPM	386	847	616.5	
HNRNPR	553	354	453.5	
HNRNPU	224	19	121.5	
PCBP1	30	100	65	
RALY	125	89	107	
REMX	214	353	283.5	
SYNCRIP	387	450	418.5	MISC
C16orf80	199	207	203	
CIRBP	6	20	13	
ILF3	749	553	651	EJC/TREX
KHDRBS1	402	47	224.5	
A CIN1	46	33	39.5	
SAP18	48	241	144.5	

protein score

high
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
low

図 7 CHERP と相互作用するタンパク質の同定

(a) FLAG-CHERP を発現する HEK293 Flp-In™ T-REx™ 細胞から核抽出物を精製し、CHERP と相互作用するタンパク質を銀染色により解析した。(b) CHERP と相互作用するタンパク質数をベン図で示した。数字は、左から右へ 1 回目のみ、1 回目と 2 回目の両方、および 2 回目だけの解析で得られた CHERP と相互作用するタンパク質の数を示した。(c) FLAG-CHERP に結合したスプライシング関連タンパク質。1 回目、2 回目のみ、および 1 回目と 2 回目の平均について、protein score > 0 のスプライシング関連タンパク質を示した。CHERP は青字で強調した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 1e、および Figure S1c、d を改変して作成した。

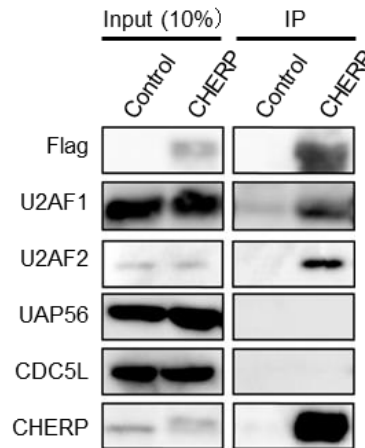


図 8 CHERP と相互作用するタンパク質の評価

CHERP と相互作用するスプライシング関連タンパク質の一部を Western blot により解析した。IP、immunoprecipitation。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure S1f を改変して作成した。

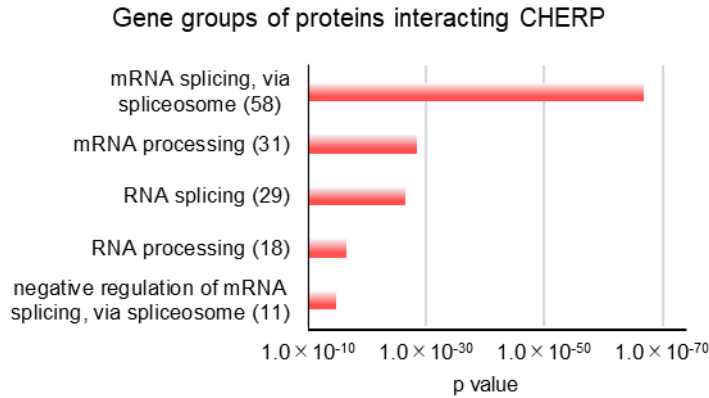


図 9 CHERP と相互作用するタンパク質の機能

FLAG-CHERP と相互作用するタンパク質について、Gene ontology (GO) 解析を行った。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure S1e を改変して作成した。

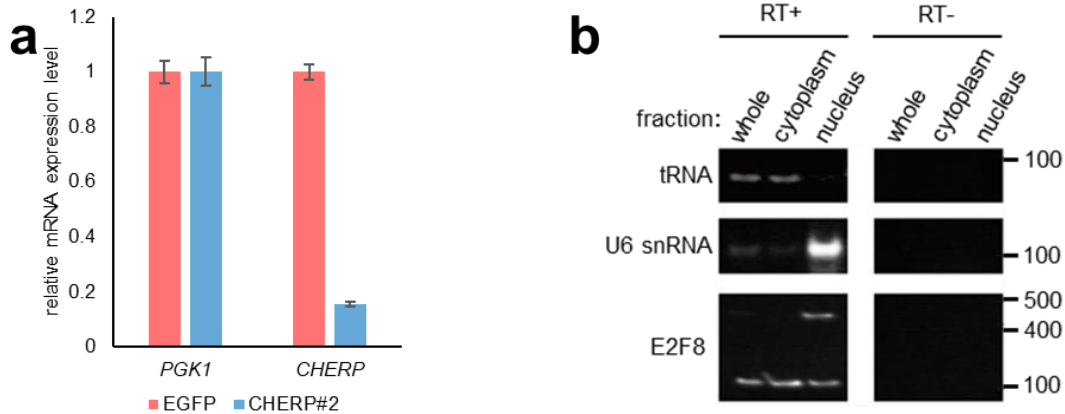


図 10 CHERP ノックダウンの確認と細胞質・核画分評価

(a) U2OS 細胞に EGFP siRNA または CHERP#2 siRNA を導入 48 時間後に CHERP の mRNA 発現を reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) を用いて解析した。発現レベルは *phosphoglycerate kinase 1* (*PGK1*) により標準化した。赤または青バーはそれぞれ EGFP siRNA および CHERP#2 に対する相対的な mRNA 発現量を示す。統計処理は、one-way ANOVA とそれに伴う Dunnett 検定を用いて実行した。*** $p < 0.001$ 。(b) 細胞内画分の指標として、tRNA (主に細胞質画分)、U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) (核画分)、および E2F transcription factor 8 (E2F8) (イントロンを含む転写産物は核画分、イントロンが除去された転写産物は核内と細胞質の両方の画分に存在)を用いて reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) により評価した。RT、reverse transcriptase。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure S1g および h を改変して作成した。

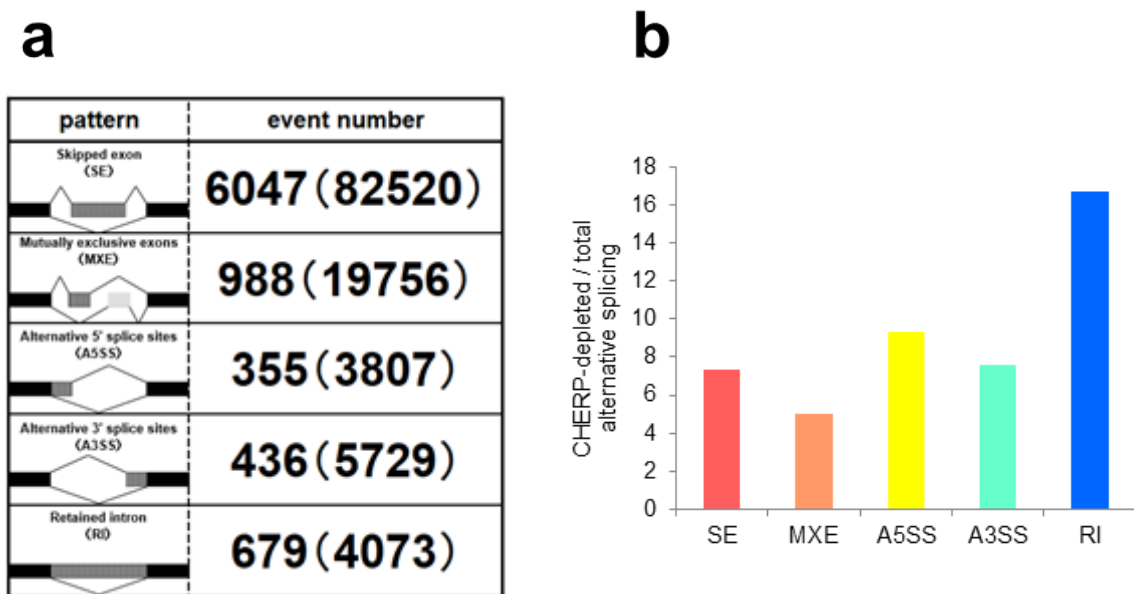


図 11 CHERP 制御による標的 pre-mRNA の分類・個数

(a) U2OS 細胞に EGFP または CHERP#2 siRNA を導入した。導入して 48 時間後に RNA を単離した。選択的スプライシングは、rMATS によって 5 つのスプライシングパターンに分けて解析した。括弧内のイベント数は、スプライシングイベントの総数で、false discovery rate (FDR) < 0.05 を有意なデータとして取り扱った。skipped exons、SE; mutually exclusive exons、MXE; alternative 5' splice sites、A5SS; alternative 3' splice sites、A3SS; retained intron、RI。(b) CHERP ノックダウン細胞におけるスプライシングイベントの総数と FDR < 0.05 を比較して、各選択的スプライシングの頻度を解析した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 1f および g を改変して作成した。

第 2 節 CHERP によるイントロン保持の標的イントロン同定とその性質・特徴

RI はイントロンの保持が促進される increased intron inclusion (III) と抑制される decreased intron inclusion (DII) に分けられる。検出された RI の総数 4073 例のうち FDR < 0.05 で得られた 679 例について分類したところ(図 11a)、III は 290 例および DII は 389 例あった(図 12)。III はイントロンが除去されないために、核内に滞留すると予想される一方で、DII はイントロンの除去が促進されるため細胞質への輸送が効率よく行われ、細胞質での mRNA 発現量が増加すると予想される。そこで、前述の全細胞から単離・精製した RNA を用いた RNA-Seq 解析とは別に、EGFP(コントロール)ノックダウンと CHERP ノックダウンの条件下で細胞質から単離・精製した RNA を用いた RNA-Seq 解析(以後、細胞質 RNA-Seq 解析と表記する)を実施した。全細胞を用いた RNA-Seq 解析結果からは、CHERP ノックダウンにおいて IncLevelDifference の絶対値が比較的大きかった III または DII に属する転写産物を抽出した。細胞質 RNA-Seq 解析においては、III と DII のうち EGFP ノックダウンの条件下に比べて CHERP ノックダウン条件下で細胞質での発現量が大きく増加または減少した転写産物を抽出した(図 13a、b)。その結果、III に分類された転写産物のうち、細胞質での発現量が増加または減少した転写産物の個数はそれぞれ 20 個および 34 個であった一方で、DII に分類された転写産物のうちで細胞質での発現量が増加または減少した転写産物の個数はそれぞれ 72 個および 9 個であった。また、図 13a、b をもとに、III または DII に分類された転写産物について、mRNA 発現量が増加した割合を示すと、予想した通り、CHERP のノックダウンにより III を生じた mRNA の細胞質での発現量は減少する割合が多い傾向がみられる一方で、DII を生じた mRNA の細胞質での発現量は増加する割合が高かった(図 13c)。次に、保持されたイントロンに隣接する連続する 2 つのエキソンを標的とするオリゴ DNA プライマーを用いて RT-PCR を行い、CHERP ノックダウンにおける III と DII を観察することとした(図 14a、b)。図 14a は III を示す転写産物について、図 14b は DII を示す転写産物について示しており、rMATS で解析したうち、FDR < 0.05 の IncLevelDifference の絶対値が比較的大きい標的として calcium-activated nucleotidase 1 (CANT1)、arginine and serine rich protein 1 (RSRP1)、disheveled segment polarity protein 3 (DVL3)、podocalyxin like (PODXL)、STAGA complex 65 subunit gamma (SUPT7L) を選択し、実際に III あるいは DII が生じていることを観察した。これらの結果から、RNA-Seq 解析による III と DII の結果は正しく解析されていると考えられた。III と DII で影響を受ける転写産物が細胞代謝にどのような関連があるかを調べるために、CHERP ノックダウン下で III と DII に属する転写産物の GO 解析を実施した(図 15a、b)。FDR < 0.05 を示した転写産物について解析したところ、III を含む転写産物を示すものは主に RNA 代謝に関わる一方で、DII では様々な細胞機能に関わって

いた。RI 全体として解析した GO の p 値上位グループは、III よりむしろ DII で得られた p 値の上位グループに近い結果であった。CHERP ノックダウン細胞において核内蓄積を生じたポリ (A)⁺ RNA は III として検出されていると考えられる。さらに、RI を III と DII に分割することで核内蓄積を生じたポリ (A)⁺ RNA の性質や特徴をより特異的に解析することが可能であることが分かった。

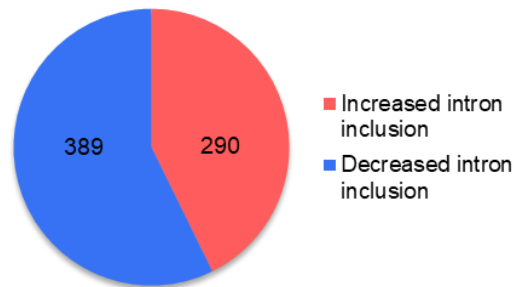


図 12 RI の分類および increased intron inclusion (III) と decreased intron inclusion (DII) の個数

CHERP ノックダウンにより検出された RI に属する標的 pre-mRNA を分類し、標的イントロンの保持が増加または減少した個数を解析した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (III) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (DII) を統計的に有意として取得した。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 2a を改変して作成した。

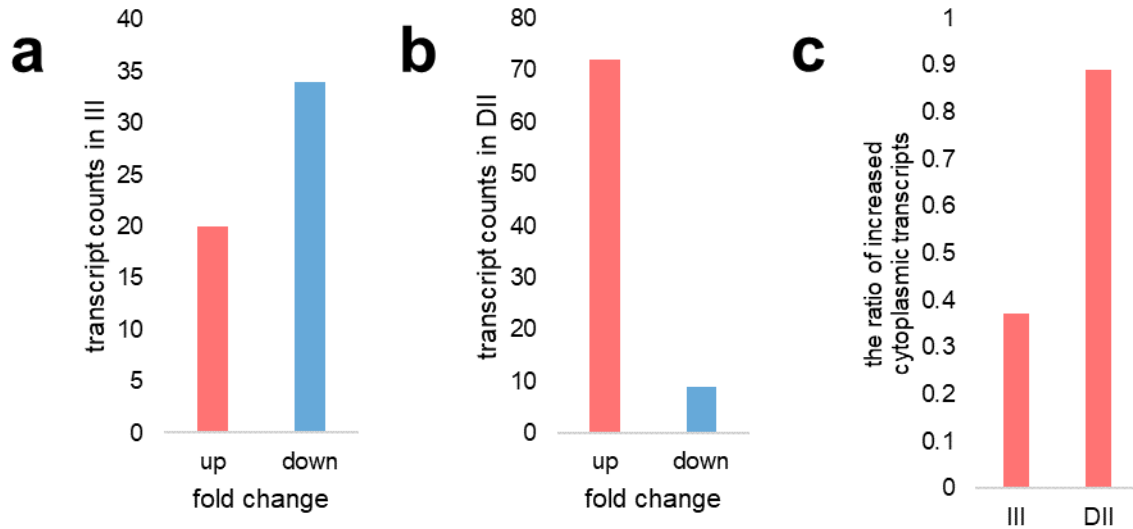


図 13 III または DII に分類される転写産物の細胞質における mRNA 発現量評価

(a) (b) 全細胞から単離・精製した RNA を用いた RNA-Seq 解析により、CHERP ノックダウン時に III または DII に分類される転写産物を検出した。次に細胞質 RNA-Seq 解析を実施し、III と DII のうち、EGFP ノックダウンの条件下に比べて CHERP ノックダウン条件下で細胞質での発現量が増加または減少した転写産物を抽出した。(c) (a) および (b) をもとに、III または DII の細胞質での発現量が増加した個数の割合を示した。RNA-Seq データは、 $FDR < 0.05$ 、 $\text{inclusion or skipping count} \geq 10$ および $\text{IncLevelDifference} \leq -0.1$ (III) または $\text{IncLevelDifference} \geq 0.1$ (DII) を満たす転写産物のうち、 $\text{fold change} > 1.5$ (up)、 $\text{fold change} < 0.67$ (down) を取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 2b を改変して作成した。

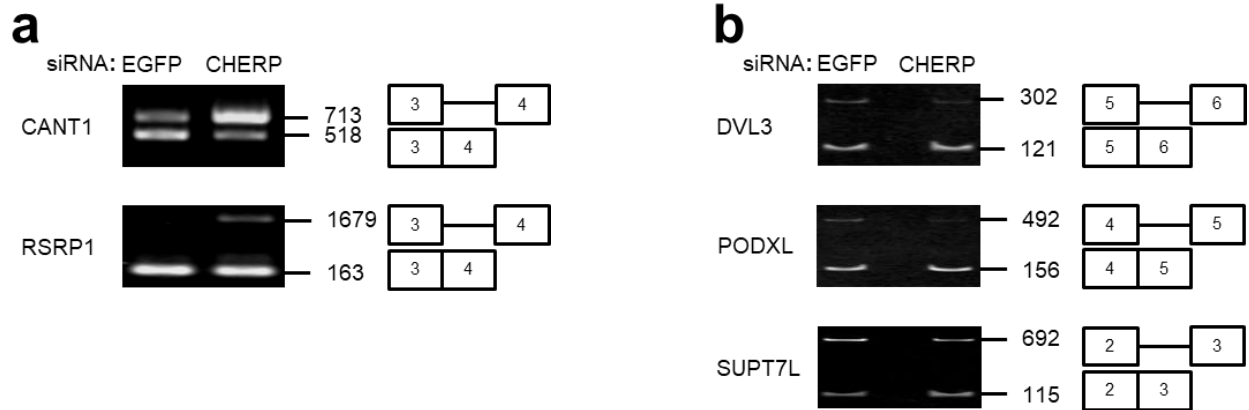


図 14 III と DII に関する標的評価

CHERP ノックダウンによって誘導された III または DII を RT-PCR を用いて検証した。(a) III (b) DII で、RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (III) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (DII) を取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 2c および d を改変して作成した。

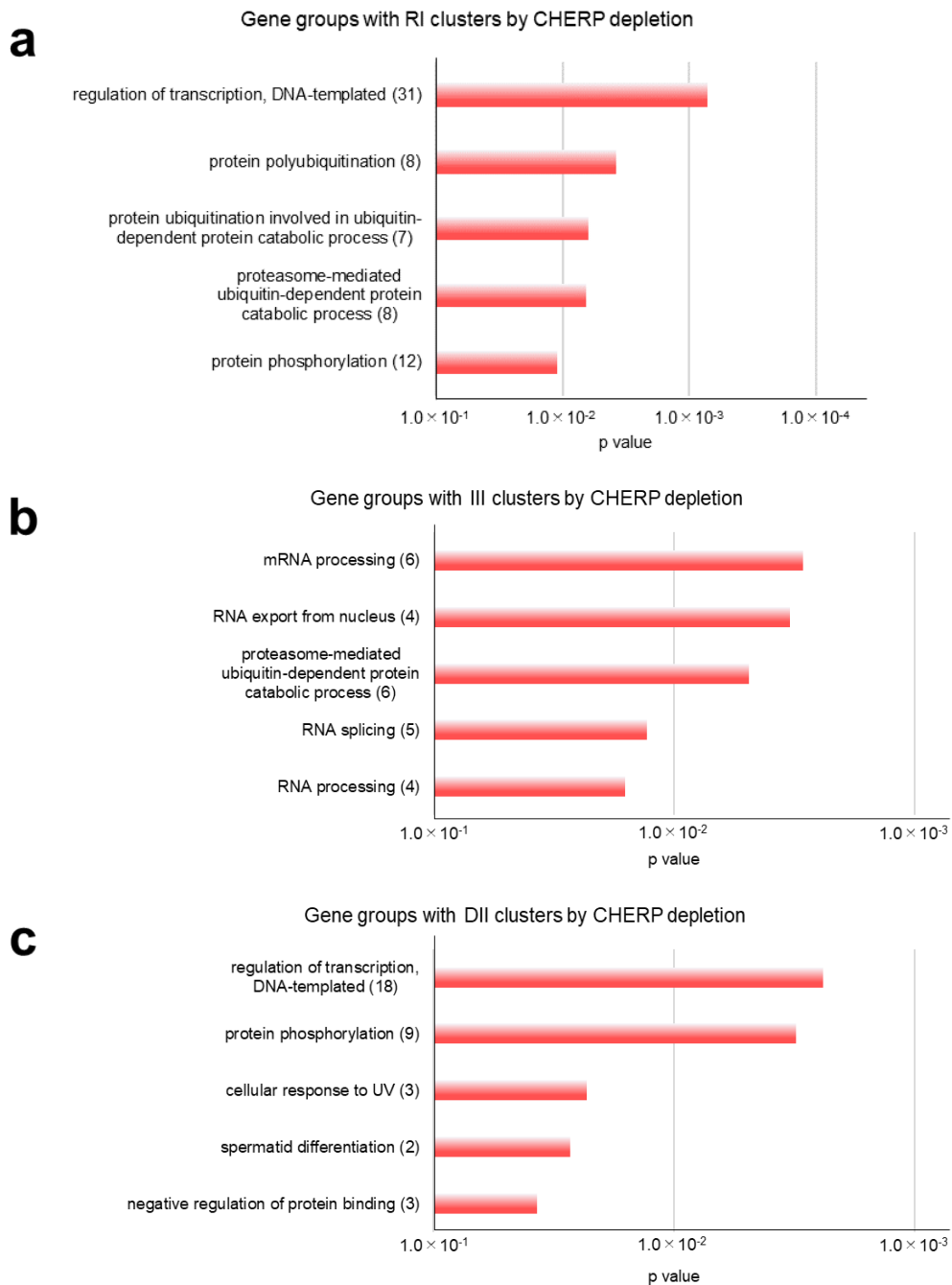


図 15 RI、III または DII に属する標的 mRNA の機能

CHERP ノックダウン後に RI (a) と III (b)、DII (c) に属する転写産物について GO 解析を行った。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $\text{IncLevelDifference} \geq |0.1|$ (RI) および $\text{IncLevelDifference} \leq -0.1$ (III) または $\text{IncLevelDifference} \geq 0.1$ (DII) を統計的に有意として取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 2e、f、および Figure S2b を改変して作成した。

第3節 CHERP はイントロン保持に関わる標的 pre-mRNA を制御する

第2節において RI を III と DII に区別して解析を行うことにより、より詳細な細胞機能への影響を評価することが可能であったため、本節でも III と DII を区別して解析することとした(図 16-19)。まず、III や DII を生じるイントロンの特徴について解析した。イントロンとして認識されるために必要な配列として、5' スプライス部位、3' スプライス部位、ブランチポイント部位そしてポリピリミジントラクト部位が挙げられる。これらに加えて、イントロンの長さや GC 含量もスプライシングに影響を与える可能性がある。そこで III や DII を生じるイントロンについて、これらの特徴を参照イントロンとして全イントロンの特徴を平均化した値を求め、これと比較して解析を行った。それぞれの解析は方法欄に記載されている手法に則って実施した。その結果、III と DII において、CHERP ノックダウンで影響を受けるイントロンについて、スプライシングの生じやすさを表す指標である 5'、3' スプライス部位のスコアが参照イントロンで得られるそれと比較して有意に低くなっている、すなわちスプライシングを受けにくくなっていることが示された(図 16a、c)。III と DII の間には有意差はなかった。また、RI 全体を参照イントロンと比べた場合においても、5'、3' スプライス部位の値が参照イントロンのそれと比較して低いことが示された(図 16b、d)。続いて、ブランチポイント部位の強さについて解析した。ブランチポイント部位については III と DII に分けて解析した場合も、全体として解析した場合も参照イントロンと差はなかった(図 17a、b)。スプライシングの生じやすさを表す指標の 1 つであるポリピリミジントラクト部位のスコアについて解析したところ、III について参照イントロンと有意差は確認されなかったが、DII に対しては有意差が確認された(図 17c、d)。ただし、その差は大きなものではなく III と DII の間に有意差はなかった。次に、イントロンの長さについて解析したところ(図 18)、III および DII のイントロン長は参照イントロンに比べて有意に短いことが示された。RI 全体として比べた場合も、参照イントロンに比べて短いイントロンであった。このことから III や DII に関わらず、RI の生じるイントロンは参照イントロンに比べて短いことが判明した。最後に GC 含量について解析した結果、III と DII ともに参照イントロンに比べて GC 含量が有意に高いことが示された(図 19)。一方で、III と DII の間に差は見られなかった。同様に RI 全体で解析した場合も、GC 含量が高いことが示された。次に、RI を生じるイントロンの特徴を明らかにした。スプライス強度はスプライス部位の配列に依存することから、CHERP 標的転写産物の 5'、3' スプライス部位における塩基配列を解析した(図 20)。その結果、参照遺伝子におけるイントロン配列の両側は thymine に富んでいるのに対して、CHERP ノックダウンにより誘導される III と DII では参照遺伝子と僅かに異なることが分かった。特に III において 5'、3' スプライス部位近傍の塩基配列は参照遺伝子と比較して thymine 以外の塩基を使用する傾向が見られた。また、DII においても 5' スプライス部位近傍の塩基配列に thymine 以外の塩基が使用されていた。この結果に関して、スプライス部位のスコアが減少し弱いスプライス部位となっていることが原因と考え

られた。そこで、CHERP が弱いスプライス部位を標的にしているか調べるため、III の CHERP 標的として retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) のミニ遺伝子を作製した(図 21)。野生型 RPGR ミニ遺伝子を導入すると、CHERP ノックダウンによりイントロンの保持が確認された。これに対して、5'、3'スプライス部位をより強くする変異を導入すると、もはや CHERP に依存せずにイントロンが除去された。DII に関するミニ遺伝子も作製を試みたが、働くものはできなかった。これらのデータから、CHERP が正確なスプライス部位選択に関連する制御因子として機能することが示唆された。

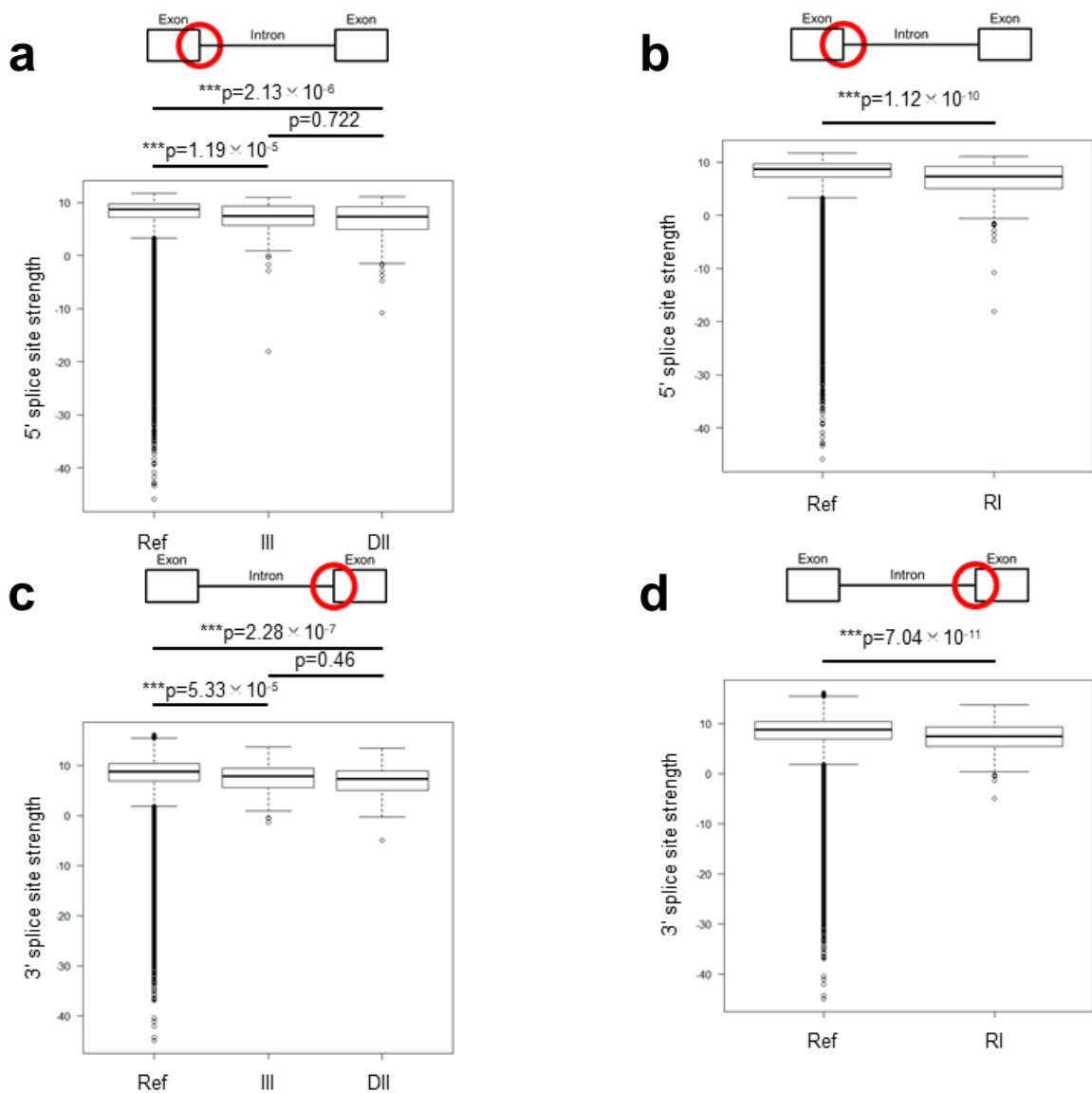


図 16 III、DII および RI における 5'および 3'スプライス部位スコア(値)

MaxEntScan により計算された CHERP ノックダウン後の (a) III と DII における 5'スプライス部位スコア、(b) RI における 5'スプライス部位スコア、(c) III と DII における 3'スプライス部位スコア、(d) RI における 3'スプライス部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (III) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (DII) および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (RI) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。Ref、Reference gene(参照遺伝子)。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3a、b、および Figure S3a、b を改変して作成した。

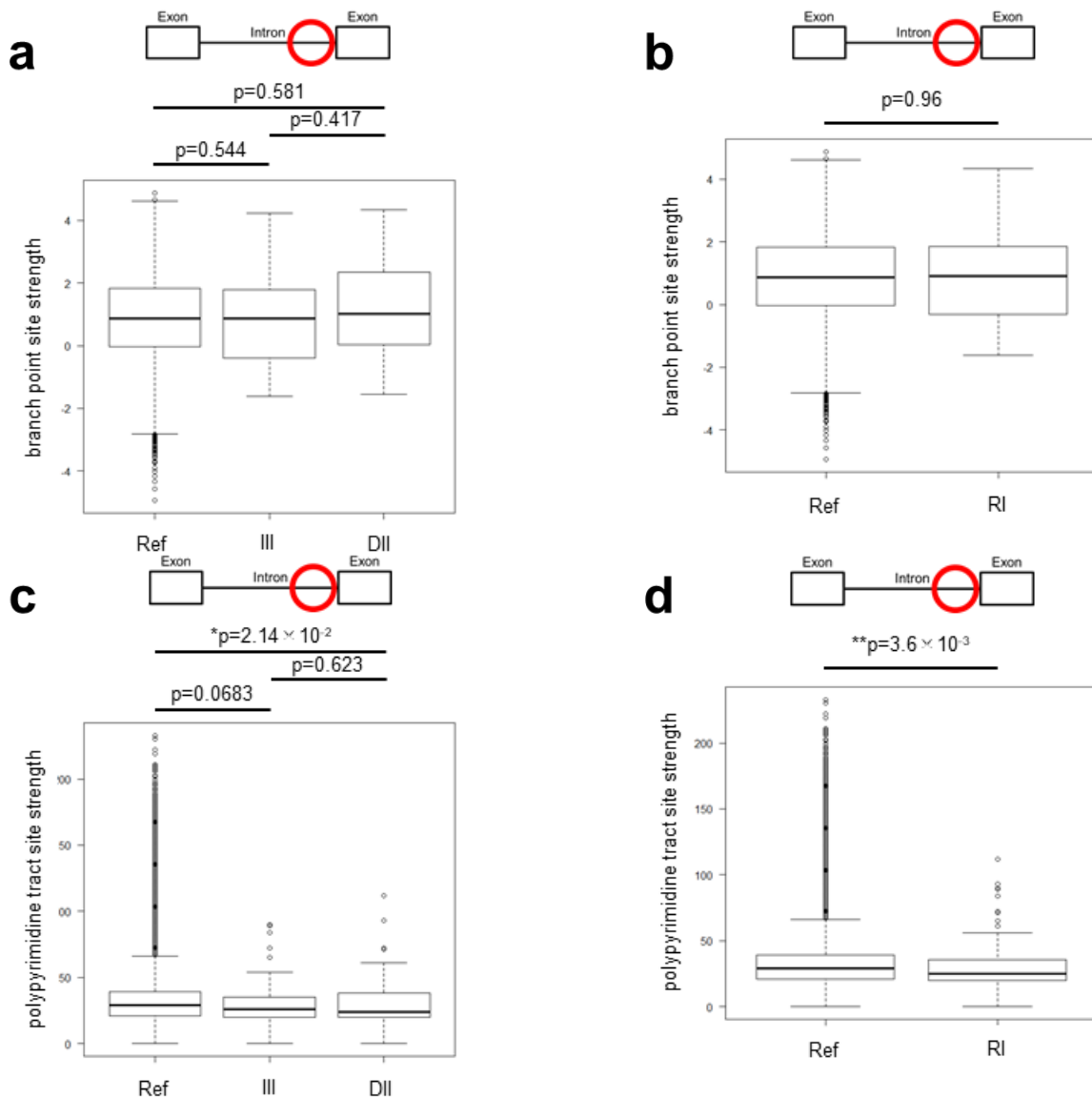


図 17 III、DII および RI におけるブランチポイント、ポリピリミジントラクト部位スコア

SVM-Bpfinder により計算された CHERP ノックダウン後の (a) III と DII におけるブランチポイント部位スコア、(b) RI におけるブランチポイント部位スコア、(c) III と DII におけるポリピリミジントラクト部位スコア、(d) RI におけるポリピリミジントラクト部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $\text{IncLevelDifference} \leq -0.1$ (III) または $\text{IncLevelDifference} \geq 0.1$ (DII) および $\text{IncLevelDifference} \geq |0.1|$ (RI) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3c、d、および Figure S3c、d を改変して作成した。

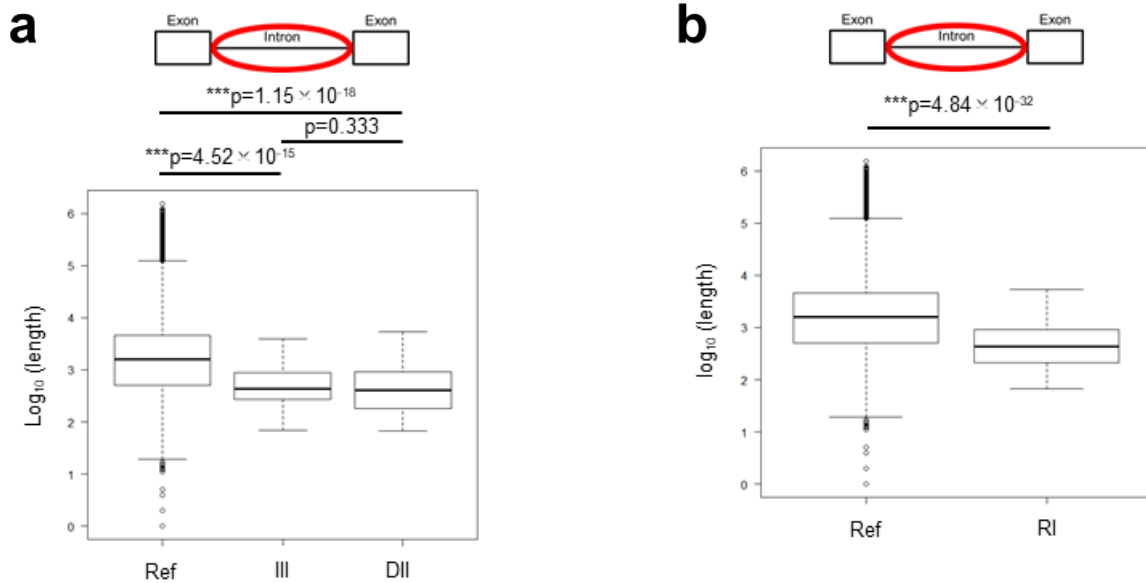


図 18 III、DII および RI におけるイントロンの長さ

BedTools により計算された CHERP ノックダウン後の (a) III と DII におけるイントロンの長さ、(b) RI におけるイントロンの長さ。(a、b) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $\text{FDR} < 0.05$ 、 $\text{inclusion or skipping count} \geq 10$ および $\text{IncLevelDifference} \leq -0.1$ (III) または $\text{IncLevelDifference} \geq 0.1$ (DII) および $\text{IncLevelDifference} \geq |0.1|$ (RI) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3e、および Figure S3e を改変して作成した。

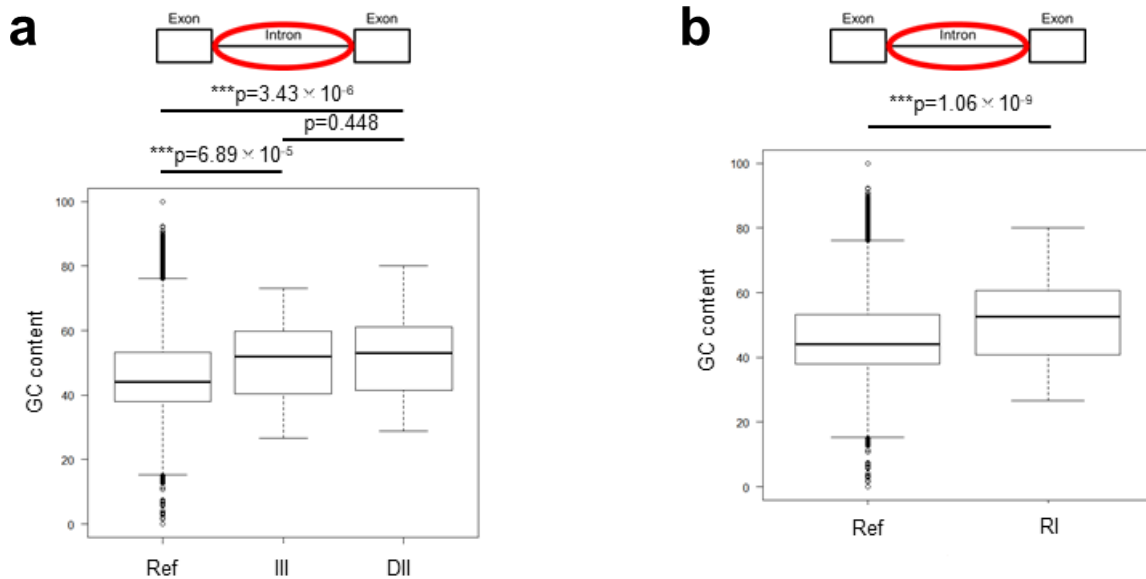


図 19 III、DII および RI におけるイントロンの GC 含量

BedTools により計算された CHERP ノックダウン後の (a) III と DII におけるイントロンの GC 含量、(b) RI におけるイントロンの GC 含量。(a、b) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (III) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (DII) および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (RI) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3f、および Figure S3f を改変して作成した。

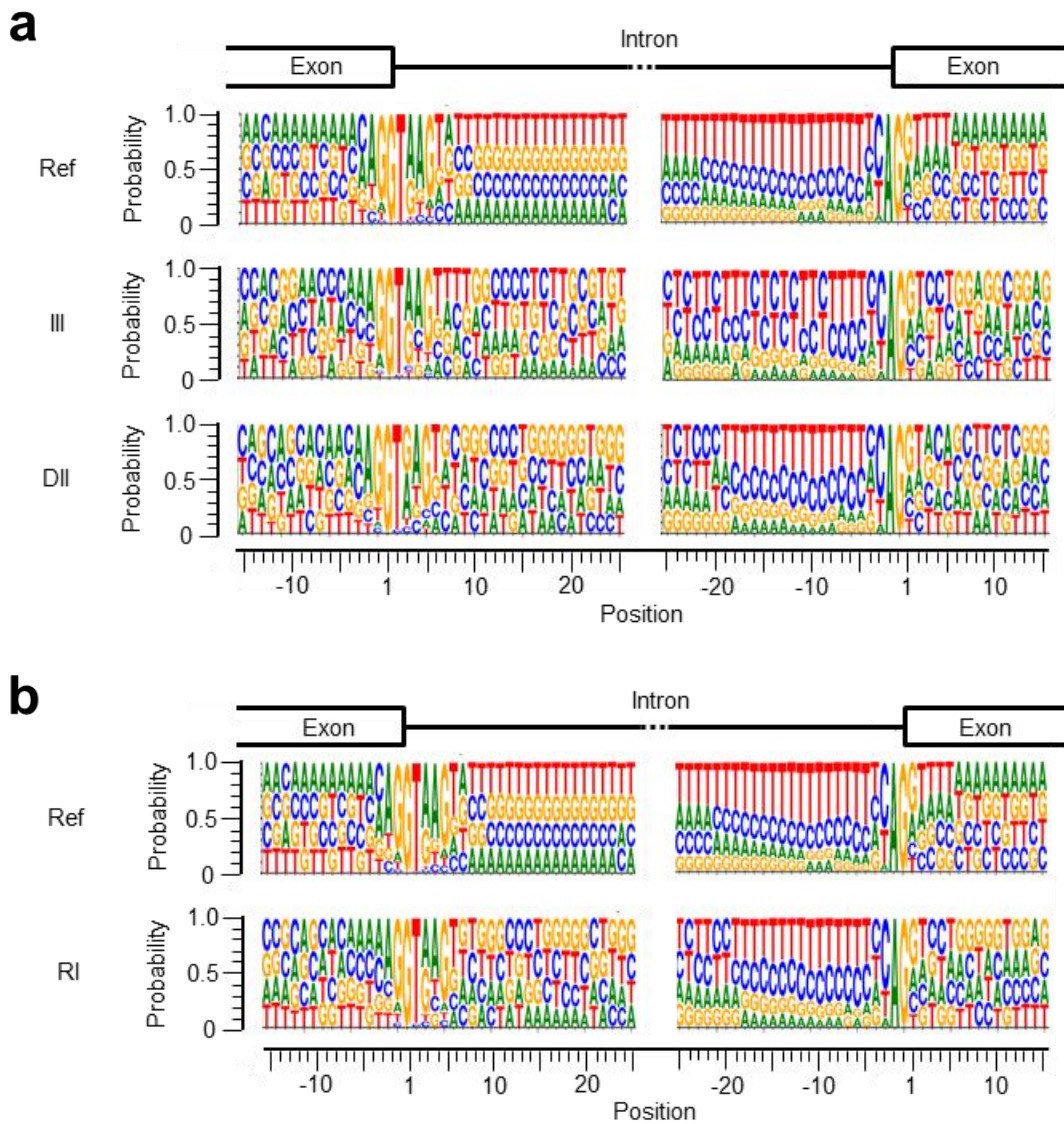


図 20 III、DII および RI におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列

BedTools により計算された CHERP ノックダウン後の (a) III と DII におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列と、(b) RI におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列。(a, b) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3g、および Figure S3g を改変して作成した。

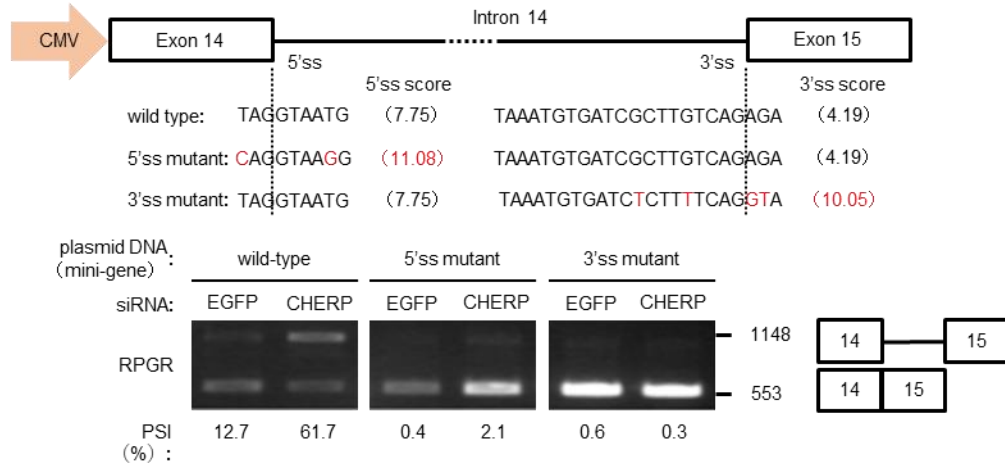


図 21 RIに属する標的 mRNA のスプライシングレポーターアッセイ

CHERP の標的イントロンを含む retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) ミニ遺伝子を使用したスプライシングアッセイ。赤字は変異を導入したことを示している。また、赤文字は変異を導入した塩基、赤数字は野生型から変化したスコアを示している。5'ss、5' splice site; 3'ss、3' splice site。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3h を改変して作成した。

第 4 節 CHERP による制御を受けるカセットエキソンの同定と性質・特徴

第 2 および 3 節では CHERP ノックダウンによって RI が生じる標的とその配列の性質と特徴について明らかにした。本節では、イベント数として最も多く生じた SE について調べたところ(図 11a)、総数として 82520 例、そのうち FDR < 0.05 では 6047 例を検出した。そして、それらのうちでエキソンを保持する exon inclusion (EI) とエキソンを除去する exon skipping (ES) に分類したところ、EI は 2945 例、また ES は 3102 例を確認した(図 22)。EI と ES のイベント数で大きな差が確認されなかったことから、CHERP が EI または ES に選択的な影響を与えないと考えられた。また第 2 節図 13 において実施した解析と同様の解析を、EI または ES に分類される転写産物について行った。RNA-Seq 解析により、CHERP ノックダウンにおいて、IncLevelDifference の絶対値が比較的大きい III または DII に属する転写産物を抽出した。続いて細胞質 RNA-Seq 解析を実施し、RNA-Seq 解析で得られた EI と ES のうち、EGFP ノックダウンの条件下に比べて CHERP ノックダウン条件下で細胞質での発現量が大きく増加または減少した転写産物の数をそれぞれ抽出した(図 23a, b)。その結果、EI に分類された転写産物のうち、細胞質での発現量が増加または減少した個数はそれぞれ 257 個および 121 個であった一方で、ES に分類された転写産物のうちで細胞質での発現量が増加または減少した個数はそれぞれ 94 個および 80 個であった。また、図 23a, b をもとに、EI または ES に分類される転写産物について、細胞質での発現量が増加した割合を示すと、EI に分類された遺伝子の約 7 割の遺伝子は細胞質での mRNA 発現量が増加していた(図 23c)。一方、ES に分類された遺伝子のうち発現量が増加していたのは 5 割強であった。このため SE に分類された遺伝子は、CHERP のノックダウンによって細胞質における mRNA 発現量が増加する遺伝子が多数あることが明らかになった。次に EI と ES を生じる転写産物が実際に細胞質で発現していることを検証するため、標的エキソンに隣接する二つのエキソン上にオリゴ DNA プライマーを設計し、RT-PCR を行った(図 24a, b)。図 24a は EI を示す転写産物について、図 24b は ES を示す転写産物について示しており、rMATS で解析したうち RI と同様(図 14a, b)、FDR < 0.05 の IncLevelDifference の絶対値が比較的大きい標的を解析した。EI については、ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (ARAP2)、autophagy related 16 like 1 (ATG16L1)、cytoplasmic linker associated protein 1 (CLASP1)、integrator complex subunit 13 (INTS13)、mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 (MAP4K2)、MON2 homolog, regulator of endosome-to-Golgi trafficking (MON2)、sorting nexin 14 (SNX14)、zinc finger AN1-type containing 1 (ZFAND1)、zinc finger protein 207 (ZNF207)、STE20 related adaptor alpha (STRADA) を標的とし、ES については aurora kinase B (AURKB)、fibronectin 1

(FN1)、kinectin 1 (KTN1)、myosin IB (MYO1B)、nucleoporin 50 (NUP50)、nucleoporin 62 (NUP62)、O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (OGT)、protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (PPP1R12A)、SIK family kinase 3 (SIK3)、spindle and kinetochore associated complex subunit 3 (SKA3) を標的した。なお、CLASP1、NUP62、PPP1R12A および SKA3 は細胞周期、AURKB は細胞分裂、INTS13 は有糸分裂紡錘体形成、SIK3 と ZNF207 は微小管形成に関わる。RT-PCR 解析の結果、いずれも RNA-Seq 解析を支持する結果が得られた。また GO 解析によると、CHERP ノックダウン後に EI を示す転写産物は細胞周期に関係する細胞代謝経路に関わるものが特に高い値を示す一方で、ES を示すものは細胞周期や細胞分裂に関係する細胞代謝経路に関わるものを検出した(図 25a-c)。

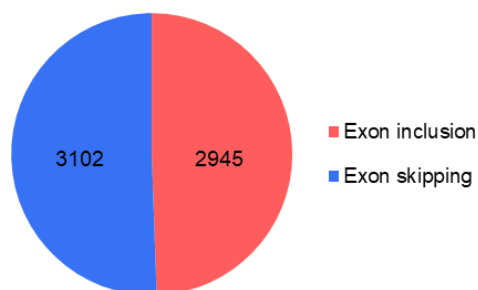


図 22 SE の分類および exon inclusion (EI) と exon skipping (ES) の個数

CHERP ノックダウンにより検出された SE に属する標的 pre-mRNA を分類し、標的エキソンの使用が促進または抑制した個数を解析した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (EI) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (ES) を統計的に有意として取得した。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 4a を改変して作成した。

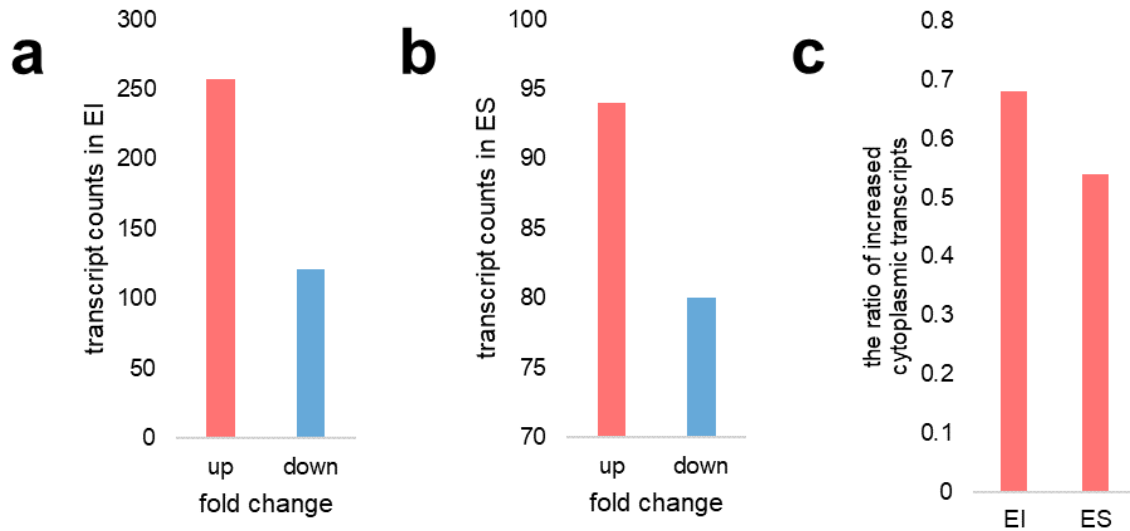


図 23 EI または ES に分類される転写産物の細胞質における mRNA 発現量評価

(a) (b) 全細胞由来の RNA-Seq 解析により、CHERP ノックダウンにおける EI または ES に属する転写産物を抽出した。次に細胞質 RNA-Seq 解析を実施し、EI と ES のうち EGFP ノックダウンの条件下に比べて CHERP ノックダウン条件下で細胞質での転写産物の発現量が増加または減少した転写産物の数を抽出した。(c) (a) および (b) をもとに、EI または ES の細胞質での転写産物の個数が増加した割合を示した。RNA-Seq データは、FDR < 0.05、inclusion or skipping count ≥ 10 および IncLevelDifference ≤ -0.1 (EI) または IncLevelDifference ≥ 0.1 (ES) を満たす転写産物のうち、fold change > 1.5 (up)、fold change < 0.67 (down) を取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 4b を改変して作成した。

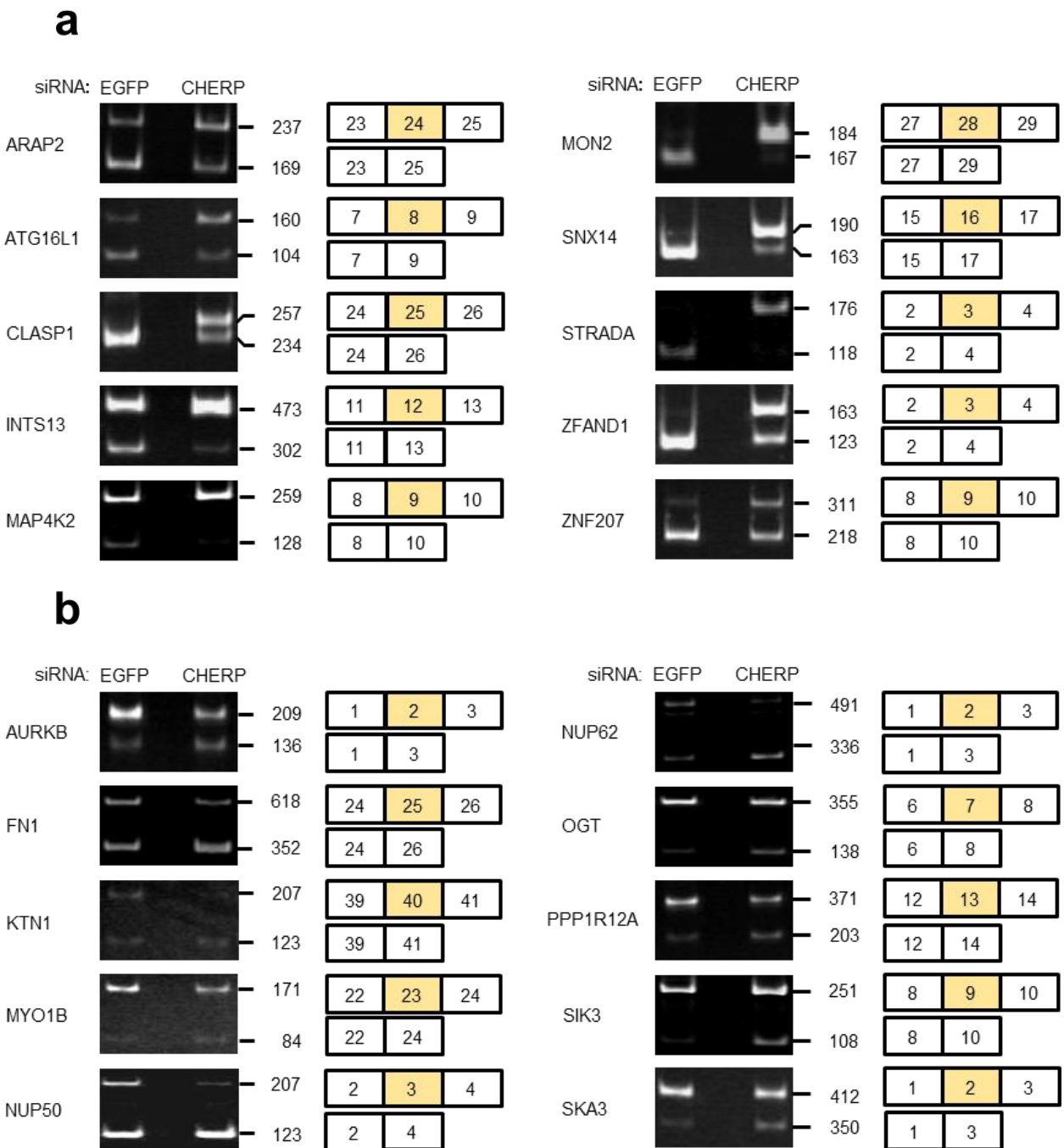


図 24 EI と ES に関する標的評価

CHERP ノックダウンによって誘導された EI または ES を RT-PCR を用いて検証した。(a) EI (b) ES で、RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $\text{IncLevelDifference} \leq -0.1$ (EI) または $\text{IncLevelDifference} \geq 0.1$ (ES) を取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3c、および Figure S3c を改変して作成した。

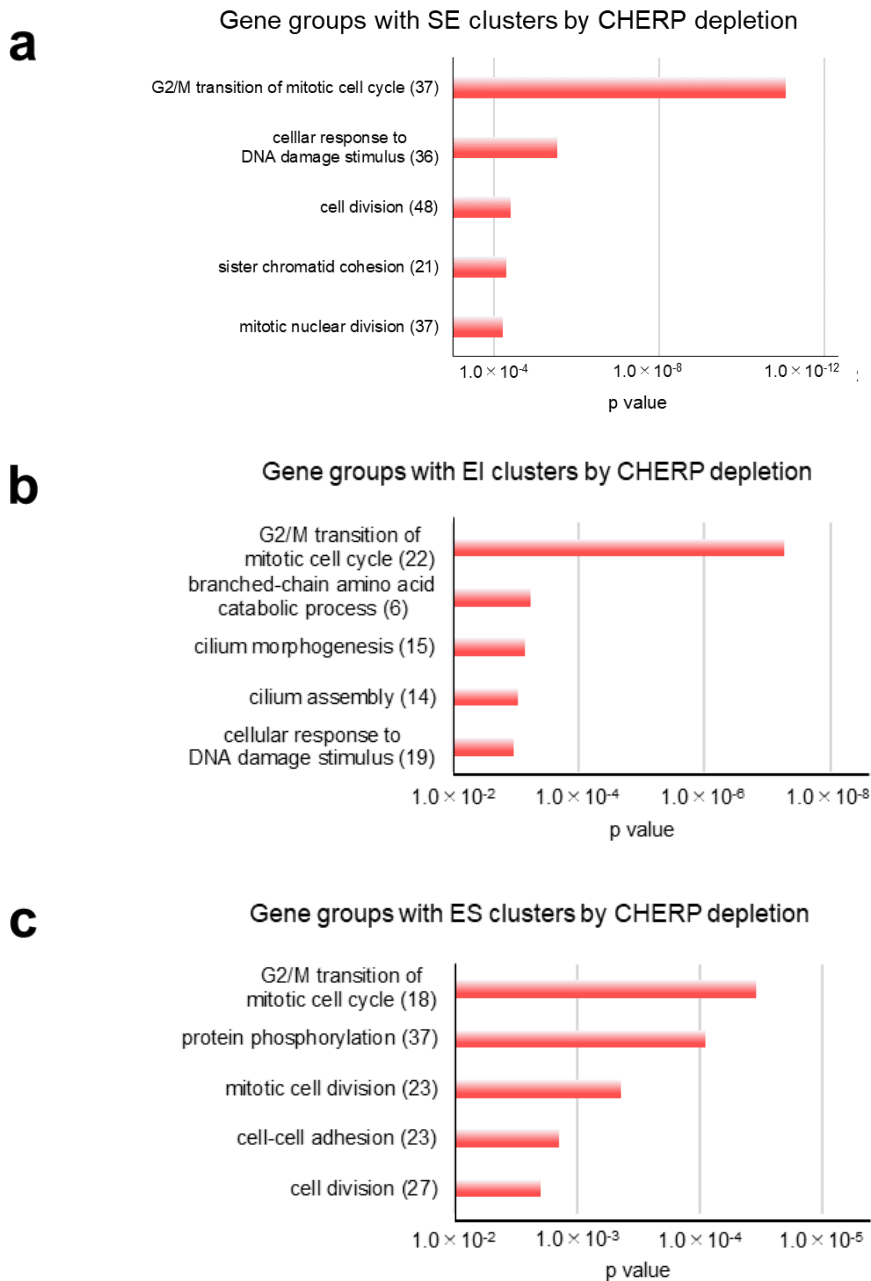


図 25 SE、EIまたはESに属する標的 mRNA の機能

CHERP ノックダウン後に SE (a) と EI (b)、ES (c) に属する転写産物の GO グループを示した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (SE) および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (EI) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (ES) を統計的に有意として取得した。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 3e、f、および Figure S3b を改変して作成した。

第 5 節 CHERP は標的 pre-mRNA のカセットエクソンインクルージョンとスキッピングを制御する

CHERP によるカセットエクソン型選択的スプライシングの特性を解明するため、CHERP に依存または非依存的な遺伝子の間にはどのようなイントロン配列の違いがあるか解析した。第 3 節と同様に、SE を EI と ES に分けて解析した(図 26-31)。また、EI と ES に分類せずに解析した場合も同様に記載した。

EI と ES について、標的エクソンの上流と下流の 2 つのイントロンが存在している。これらのイントロンにおける 5'スプライス部位の強さは、ES における上流イントロンを除いて、参照イントロンのそれらと比較して有意な差はなかった(図 26a-d)。ただし SE 全体として解析したものと比較して、ES のみで有意な差として評価できることから EI と ES を分けて解析する価値があると判断された。これに対して、標的エクソンの上流と下流イントロンにおける 3'スプライス部位は、参照遺伝子のそれらと比較して有意に異なっていた(図 27)。また EI と ES の間には有意な差は見られなかった。CHERP の標的イントロンが 5'スプライス部位と比較して 3'スプライス部位の強さが弱いことは、上流と下流イントロンの 3'スプライス部位への U2 snRNP の集合が関係していると考えられた。CHERP は U2 snRNP ならびにその関連因子と相互作用することから(図 7c)、3'スプライス部位の弱いイントロンに U2 snRNP を集合させるために CHERP が必要であることが示唆された。次いで、標的エクソンの上流と下流イントロンにおけるブランチポイント部位について解析したところ、上流、下流のイントロンのいずれのブランチポイント部位も参照イントロンに比べて弱かった(図 28)。また、上流イントロンのブランチポイント部位の強さは EI が ES と比較して有意に弱かった。一方、ポリピリミジントラクト部位の強度は参照イントロンと比較して大きな変化はなかった(図 29)。次に、CHERP により制御を受ける上流と下流イントロンの長さについて解析したところ、参照イントロンと比較して有意に長かった(図 30)。また、EI と ES の間でも上流、下流のイントロンともに有意な差があった。それゆえ、EI の標的イントロンは ES のそれより長いイントロンを標的していることが明らかとなった。標的エクソンの上流と下流イントロンの GC 含量は参照イントロンのそれと比較して低かった(図 31)。したがって SE においては、より長いイントロンと低い GC 含量を周辺に持つエクソンが CHERP の標的になることが示唆された。次に、CHERP 標的のエクソンから上流と下流のイントロンに対する 5'、3'スプライス部位近傍における塩基配列を解析したところ(図 32)、CHERP が標的とするエクソン近傍の 5'、3'スプライス部位が弱かったにも関わらず、CHERP が標的にする配列は参照イントロンと比較して大きな変化はなかった。それゆえ、参照イントロンと比較して僅かな塩基配列の違いが CHERP 依存的な EI と ES に影響を与えたと考えられた。以上の仮説を検証するため、EI と ES に対してそれぞれ autophagy related 16 like 1 (ATG16L1) と serine/threonine-protein kinase 3 (SIK3) のミニ遺伝子を作製した(図 33)。またそれぞれのミニ遺伝子について、3'スプライス部位に強い

変異を導入した場合は、標的エクソンは CHERP に依存せずエクソンと認識された。反対に弱い変異を導入した場合は、CHERP に関わりなくエクソンと認識されず除去された。同様の結果は、5'スプライス部位においても得られた。これらの結果から、標的エクソンの 5'、3'スプライス部位周囲においてコンセンサス配列と僅かに異なる塩基配列を持つエクソンは CHERP に対して感受性を持つこと、コンセンサス配列に近くなると CHERP に関係なくエクソンと認識されること、逆にコンセンサス配列から遠ざかるとエクソンと認識されないことが示された。

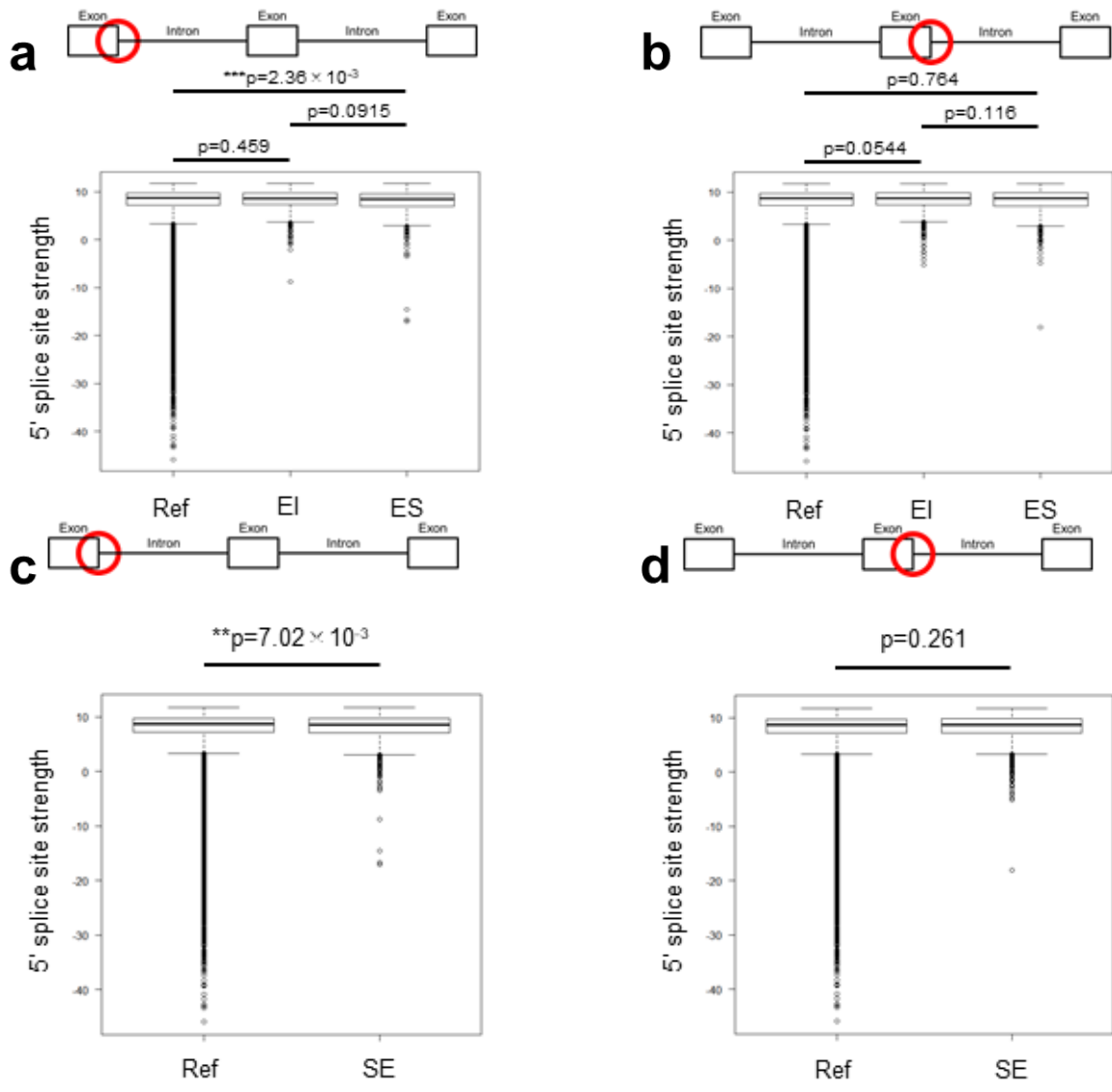


図 26 EI、ES および SE における 5'スプライス部位スコア

MaxEntScan により計算された CHERP ノックダウン後の (a) EI と ES のイントロン上流における 5'スプライス部位スコア、(b) EI と ES のイントロン下流における 5'スプライス部位スコア、(c) SE のイントロン上流における 5'スプライス部位スコア、(d) SE のイントロン下流における 5'スプライス部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (EI) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (ES) および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5a、および Figure S5a を改変して作成した。

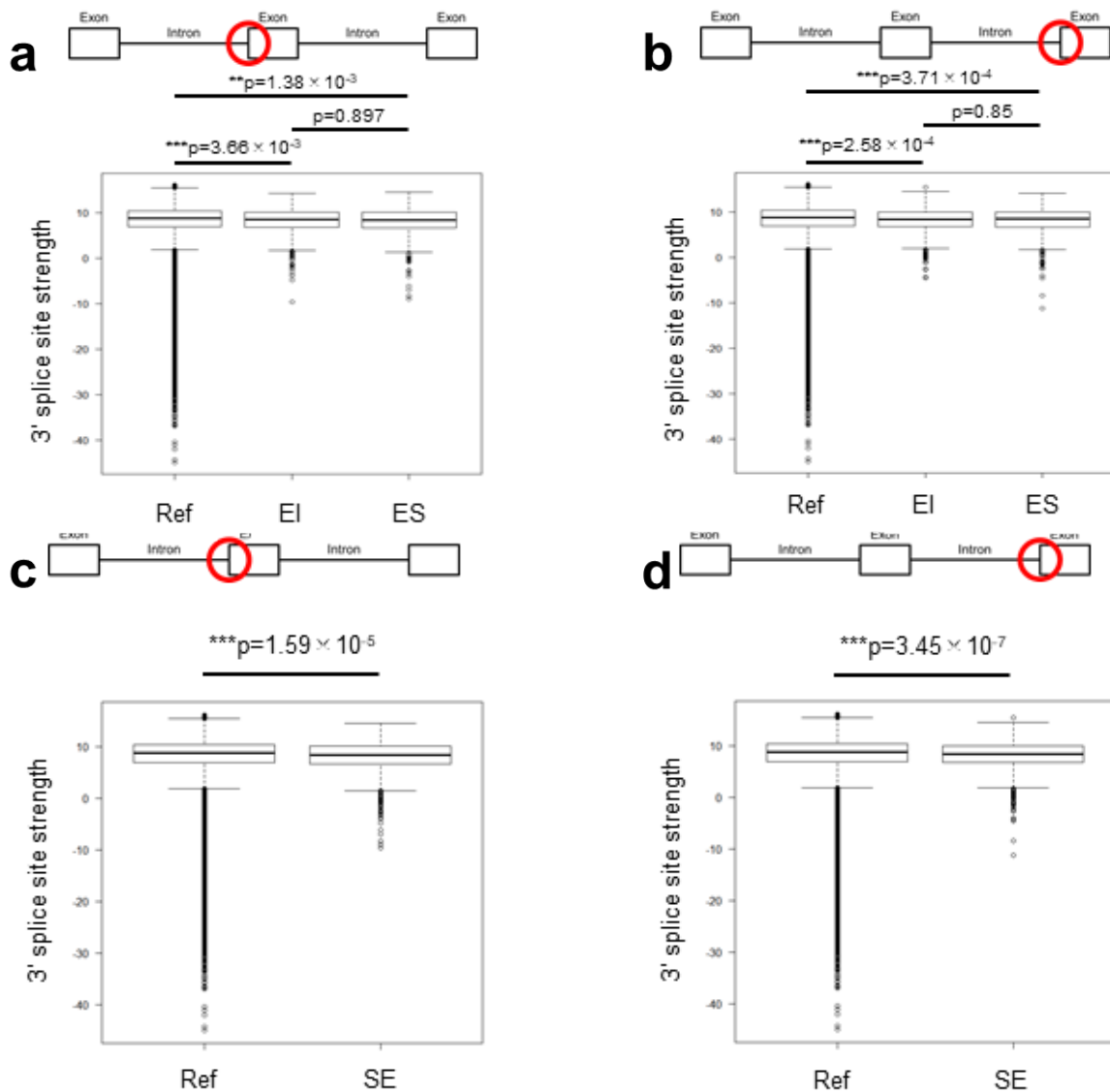


図 27 EI、ES および SE における 3'スプライス部位スコア

MaxEntScan により計算された CHERP ノックダウン後の (a) EI と ES のイントロン上流における 3'スプライス部位スコア、(b) EI と ES のイントロン下流における 3'スプライス部位スコア、(c) SE のイントロン上流における 3'スプライス部位スコア、(d) SE のイントロン下流における 3'スプライス部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (EI) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (ES) および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5b、および Figure S5b を改変して作成した。

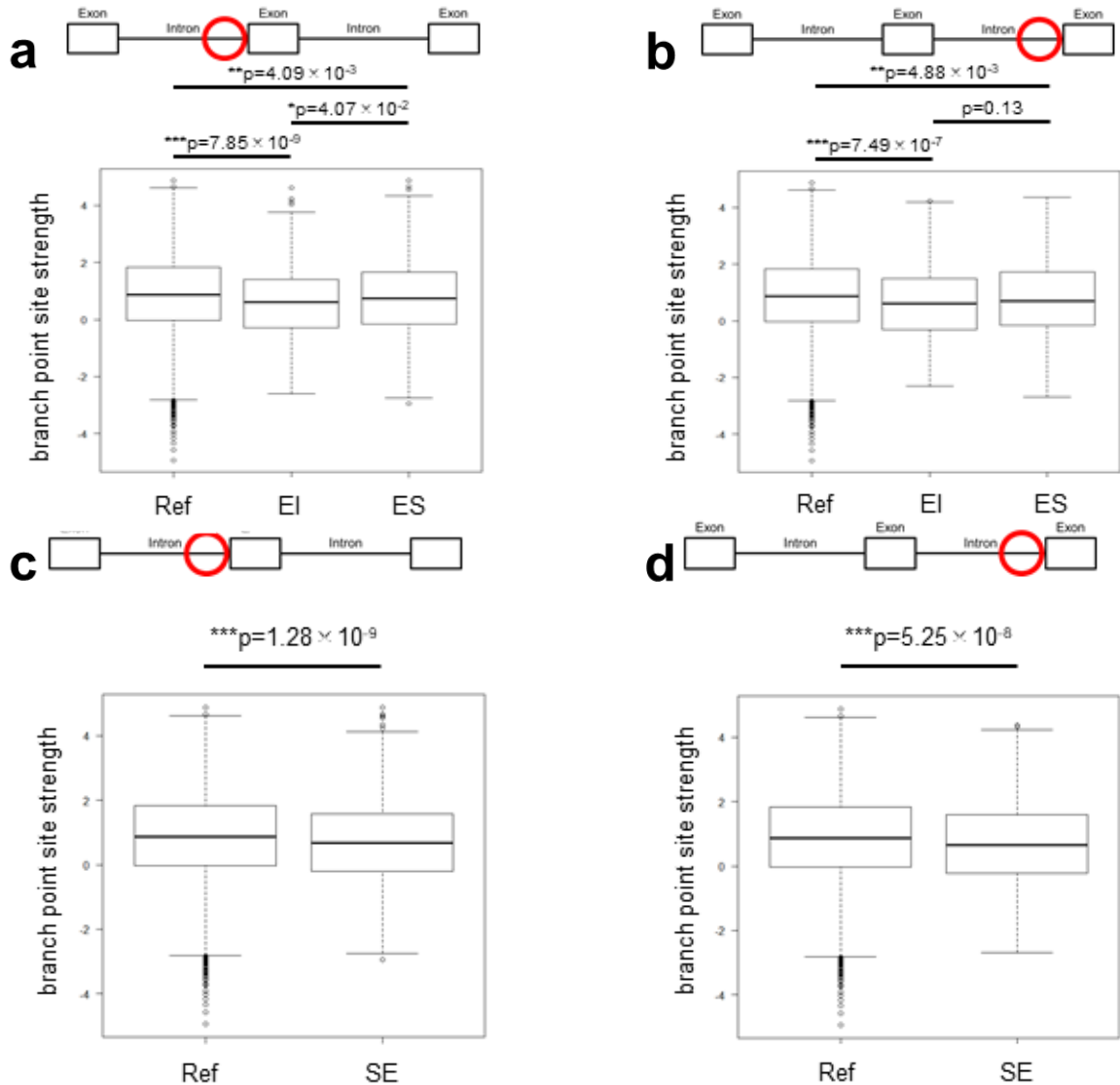


図 28 EI、ES および SE におけるブランチポイント部位スコア

SVM-Bpfinder により計算された CHERP ノックダウン後の (a)EI と ES のイントロン上流におけるブランチポイント部位スコア、(b) EI と ES のイントロン下流におけるブランチポイント部位スコア、(c) SE のイントロン上流におけるブランチポイント部位スコア、(d) SE のイントロン下流におけるブランチポイント部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは FDR < 0.05、inclusion or skipping count ≥ 10 および IncLevelDifference ≤ -0.1 (EI) または IncLevelDifference ≥ 0.1 (ES) および IncLevelDifference $\geq |0.1|$ (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5c、および Figure S5c を改変して作成した。

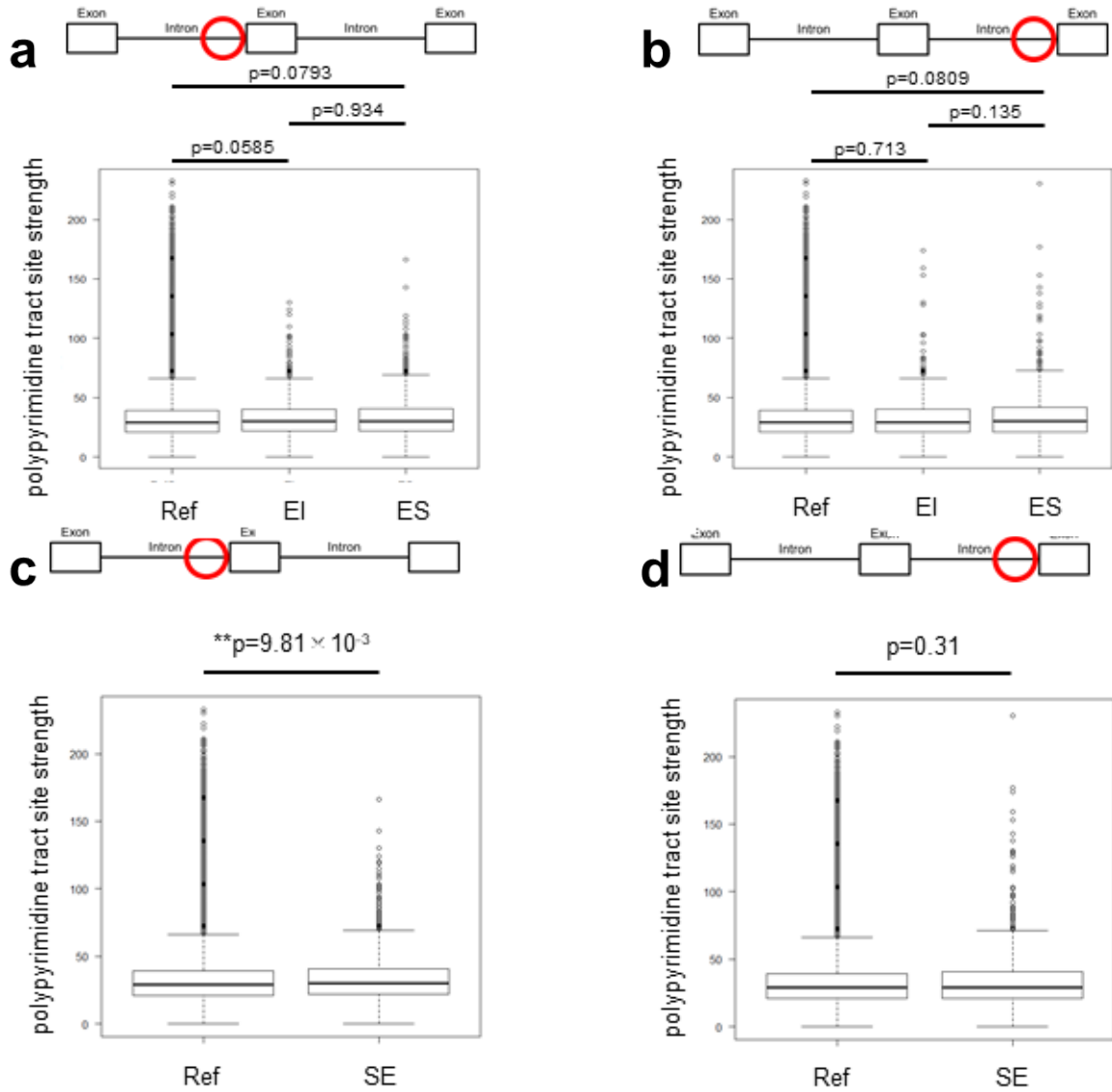


図 29 EI、ES および SE におけるポリピリミジントラクト部位スコア

SVM-Bpfinder により計算された CHERP ノックダウン後の (a)EI と ES のイントロン上流におけるポリピリミジントラクト部位スコア、(b) EI と ES のイントロン下流におけるポリピリミジントラクト部位スコア、(c) SE のイントロン上流におけるポリピリミジントラクト部位スコア、(d) SE のイントロン下流におけるポリピリミジントラクト部位スコア。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは FDR < 0.05、inclusion or skipping count ≥ 10 および IncLevelDifference ≤ -0.1 (EI) または IncLevelDifference ≥ 0.1 (ES) および IncLevelDifference $\geq |0.1|$ (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5d、および Figure S5d を改変して作成した。

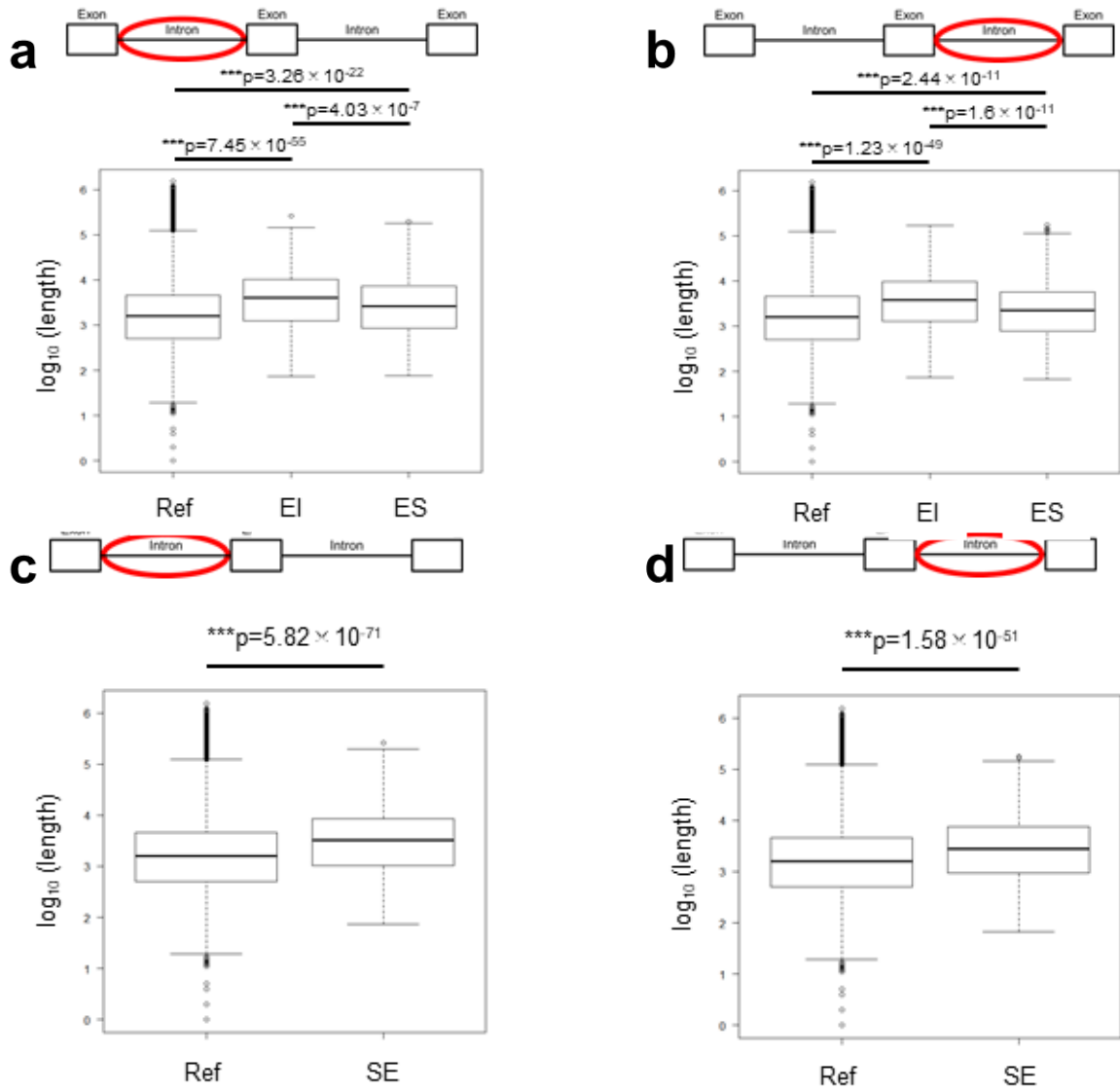


図 30 EI、ES および SE におけるイントロンの長さ

BedTools により計算された CHERP ノックダウン後の (a) EI と ES のイントロン上流におけるイントロンの長さ、(b) EI と ES のイントロン下流におけるイントロンの長さ、(c) SE のイントロン上流におけるイントロンの長さ、(d) SE のイントロン下流におけるイントロンの長さ。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは FDR < 0.05、inclusion or skipping count ≥ 10 および IncLevelDifference ≤ -0.1 (EI) または IncLevelDifference ≥ 0.1 (ES) および IncLevelDifference ≥ |0.1| (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5e、および Figure S5e を改変して作成した。

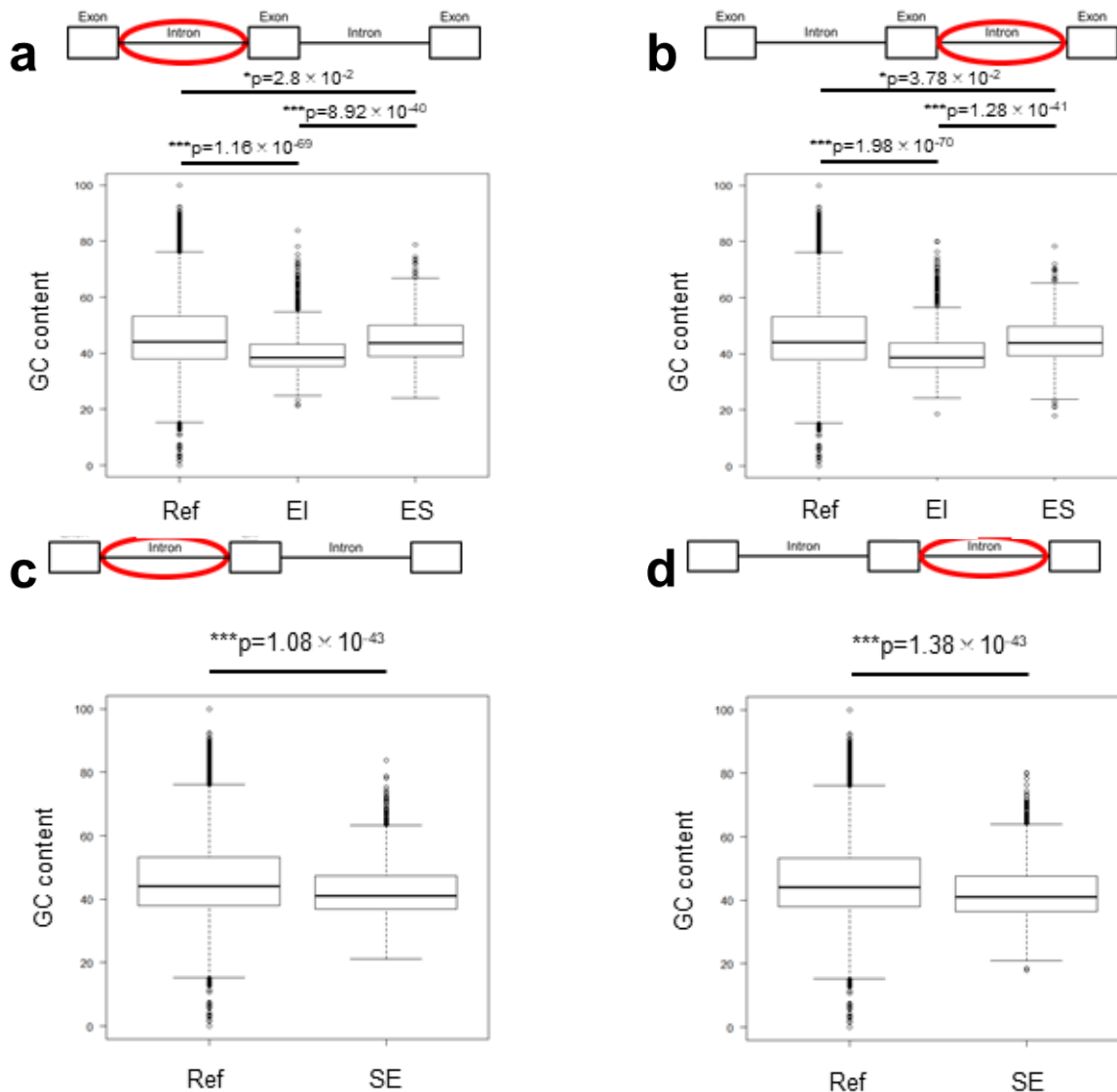


図 31 EI、ES および SE における GC 含量

BedTools により計算された ChERP ノックダウン後の (a) EI と ES のイントロン上流における GC 含量、(b) EI と ES のイントロン下流における GC 含量、(c) SE のイントロン上流における GC 含量、(d) SE のイントロン下流における GC 含量。(a-d) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。RNA-Seq データは $FDR < 0.05$ 、inclusion or skipping count ≥ 10 および $IncLevelDifference \leq -0.1$ (EI) または $IncLevelDifference \geq 0.1$ (ES) および $IncLevelDifference \geq |0.1|$ (SE) を統計的に有意として取得した。統計処理は Wilcoxon 順位和検定を使用した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5f、および Figure S5f を改変して作成した。

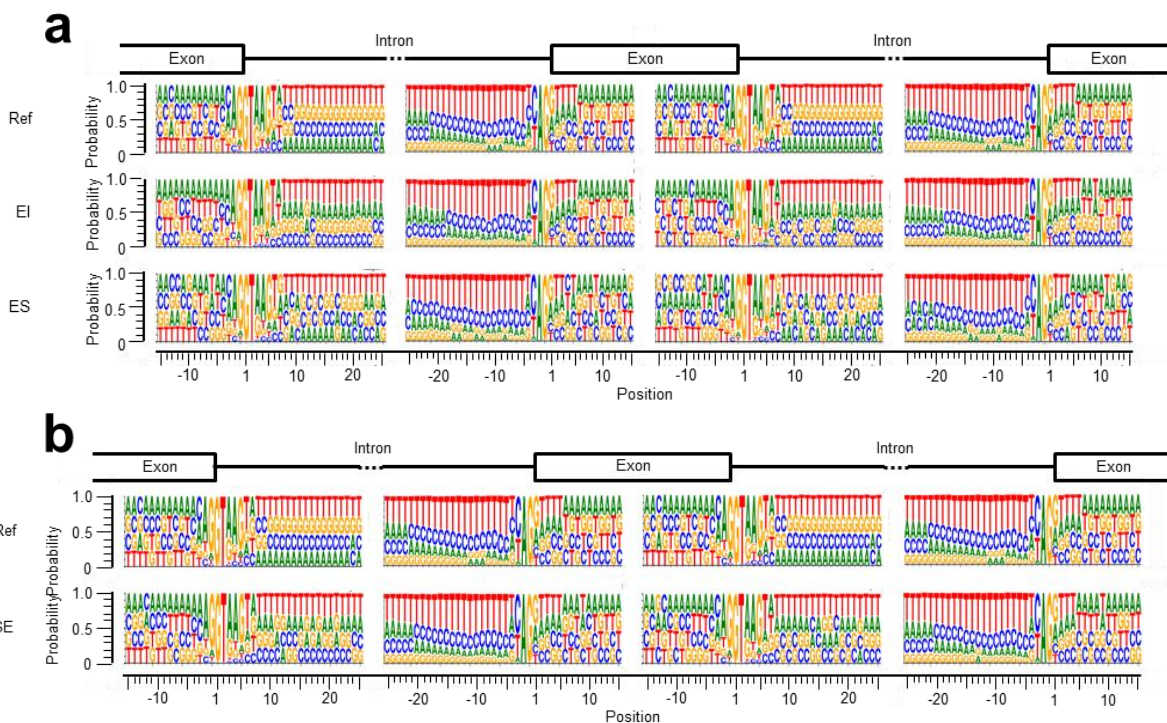


図 32 EI、ES および SE におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列

BedTools により計算された CHERP ノックダウン後の (a) EI と ES におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列と、(b) SE におけるエクソン-イントロン境界の塩基配列。(a、b) 全てのイントロンは参照遺伝子を使用した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5g、および Figure S5g を改変して作成した。

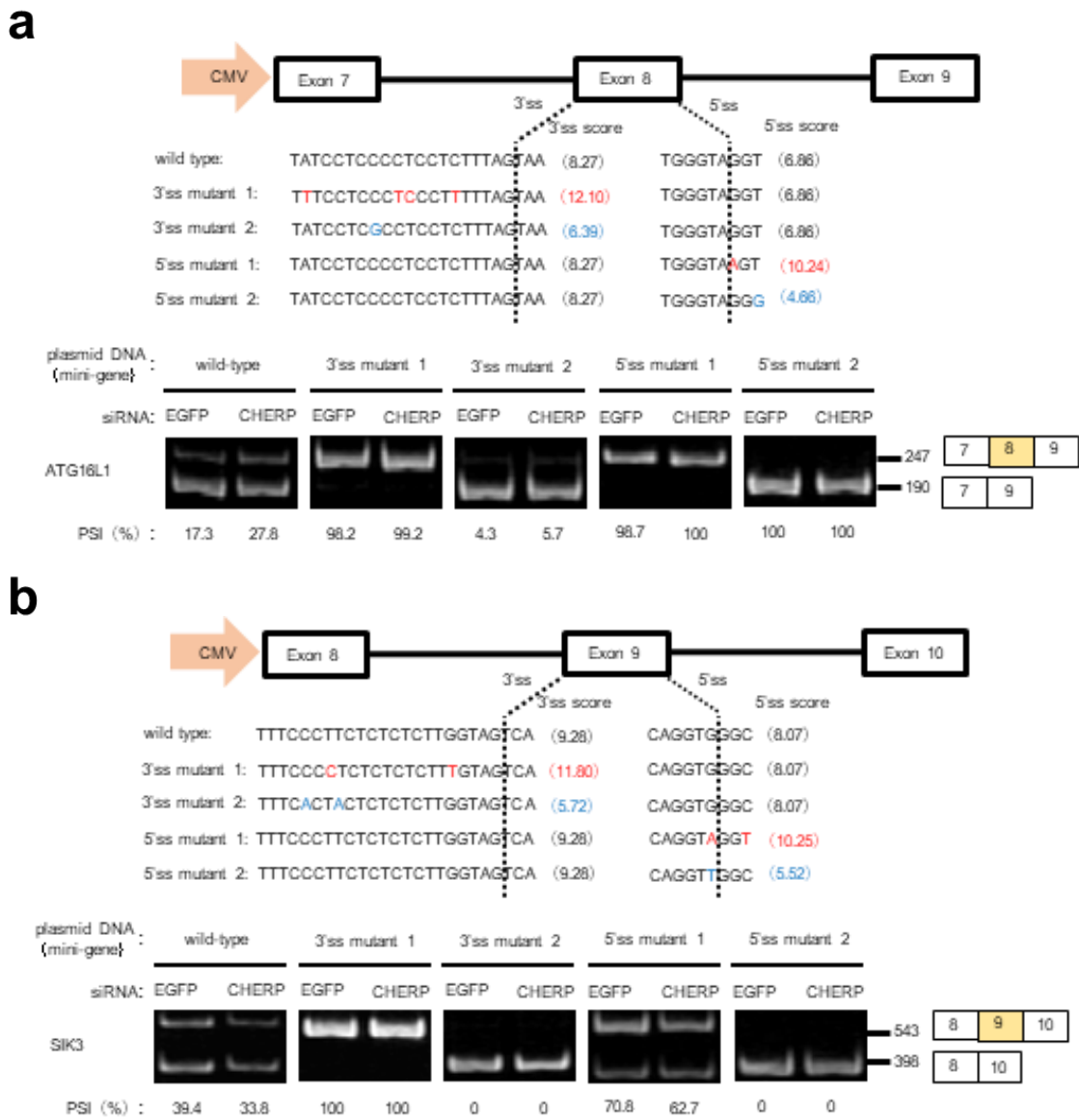


図 33 EI、ES に属する標的 mRNA のスプライシングレポーターアッセイ

CHERP の標的イントロンを含む autophagy related 16 like 1 (ATG16L1) と serine/threonine-protein kinase 3 (SIK3) ミニ遺伝子を使用したスプライシングアッセイ。赤字は 5'または 3'スプライス部位スコアが上がる変異を、青字は下がる変異を導入したことを示している。また、赤字は本スコアが上がる変異を導入した塩基、赤数字は上がったスコアを示している。反対に、青文字は本スコアが下がる変異を導入した塩基、青数字は下がったスコアを示している。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 5h を改変して作成した。

第 2 章 CHERP の細胞周期・細胞分裂への関与

図 25 で実施した GO 解析によると、CHERP ノックダウン下において、EI は細胞周期、ES では細胞周期や細胞分裂に関わる遺伝子の多くが影響を受けていた。このことは CHERP が細胞周期進行とそれに伴う細胞生存に関与する可能性を示唆している。そこで、CHERP の有無で細胞質における mRNA 発現量に影響する標的を明らかにすることとし、新たに細胞質での mRNA 発現量に関する RNA-Seq 解析を実施した。FDR < 0.05 を与えるものを有意として、発現量が増加したのは 3934 例で、減少したのは 2822 例であった(図 34)。そのうち fold change が 1.5 倍以上または 0.67 倍以下の変化を示したものについてそれぞれ GO 解析を行った(図 35)。その結果、発現増加が観察された遺伝子の GO は輸送に関わる機能に富んでいる一方で、発現減少が観察された遺伝子の GO は細胞周期や細胞分裂に関わる機能に富んでいた。

細胞周期や細胞分裂に関わる遺伝子の発現量が減少すると、細胞周期の進行や細胞分裂に異常が生じると予想される。H2B-GFP を安定発現させた U2OS 細胞を使用してタイムラプス観察を実施したところ(図 36)、一部の CHERP ノックダウン細胞において細胞周期 M 期の前中期における染色体が整列せず有糸分裂の遅れが生じていた。CHERP ノックダウンにおいて減少した mRNA のうち、細胞増殖に関わる BIRC5、M 期前中期における染色体整列に重要な役割をもつ AURKB、また細胞分裂に関わる CENPA およびアポトーシスに関与する BRCA1 について、RT-qPCR および Western blot を用いた解析したところ、mRNA およびタンパク質レベルにおいて発現量が減少していた(図 37、38)。また、細胞形態の異常や AURKB と α -Tubulin の誤局在を示す細胞も観察された(図 39)。しかしながら、CHERP をノックダウンした細胞では対照細胞に比べて死滅するものが多く存在したため、最終的な結論は将来別途行うべき定量的実験によって得る必要がある。

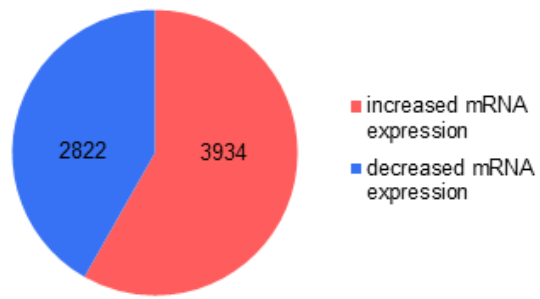
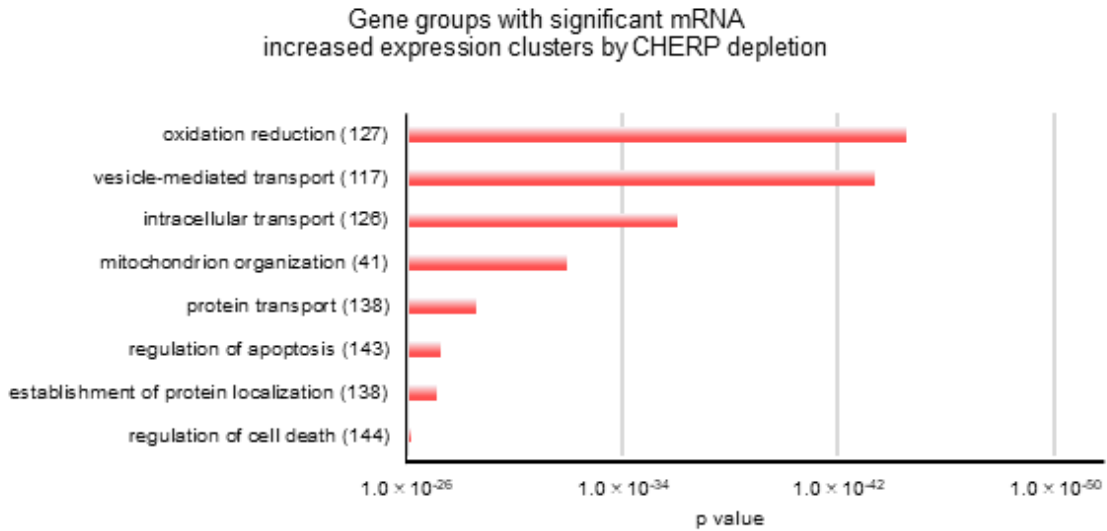


図 34 mRNA 発現量が増加または減少した標的数

CHERP ノックダウン後の mRNA 発現量が増加および減少した標的の数。RNA-Seq データは FDR < 0.05 を統計的に有意として取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 6a を改変して作成した。

a



b

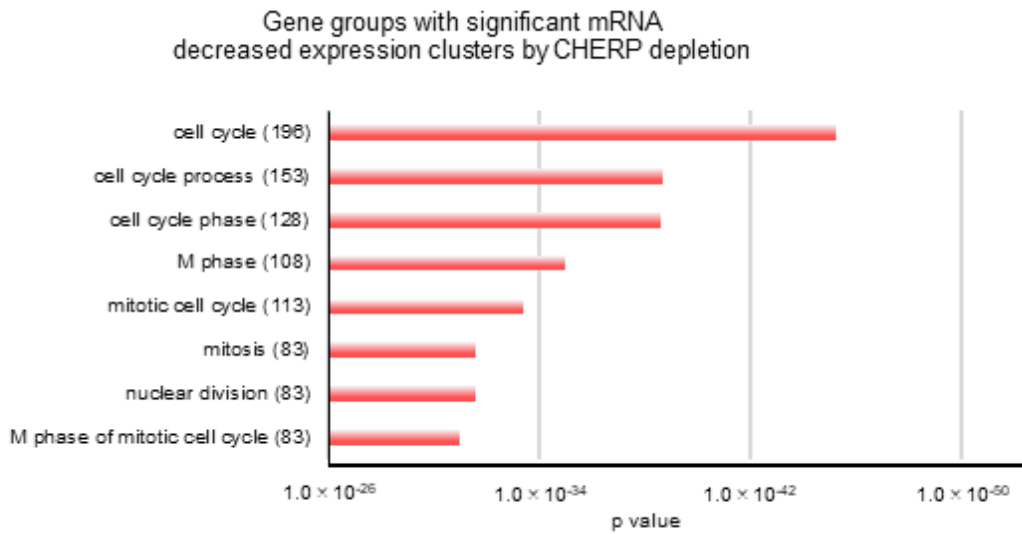


図 35 mRNA 発現量が増加または減少した標的の機能

(a) CHERP ノックダウン後に細胞質における mRNA 発現量が有意に増加した GO グループ。RNA-Seq データの FDR < 0.05 および fold change ≥ 1.5 を取得した。(b) CHERP ノックダウン後に細胞質における mRNA 発現量が有意に減少した GO グループ。RNA-Seq データの FDR < 0.05 および fold change ≤ 0.67 を取得した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure S2a および b を改変して作成した。

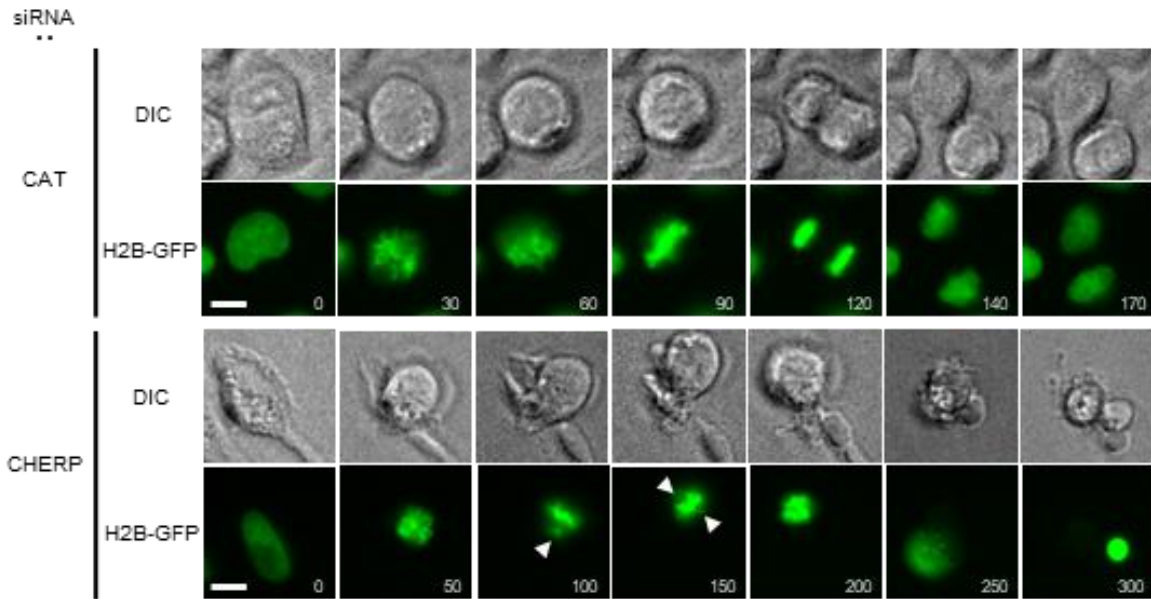


図 36 細胞形態観察

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT; コントロール) または CHERP#2 siRNA を導入した H2B-GFP 安定発現 U2OS 細胞のうち、一部の生細胞についてのタイムラプス写真を掲載した。写真の右下の数字は、核膜崩壊からの時間(分)を示す。矢印は、染色体の位置がずれていることを示す。なお、CHERP#2 siRNA を導入した細胞では対照細胞に比べて死滅するものが多く存在したため、最終的な結論は将来別途行うべき定量的実験によって得る必要がある。スケールバーは10 μm 。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 6b を改変して作成した。

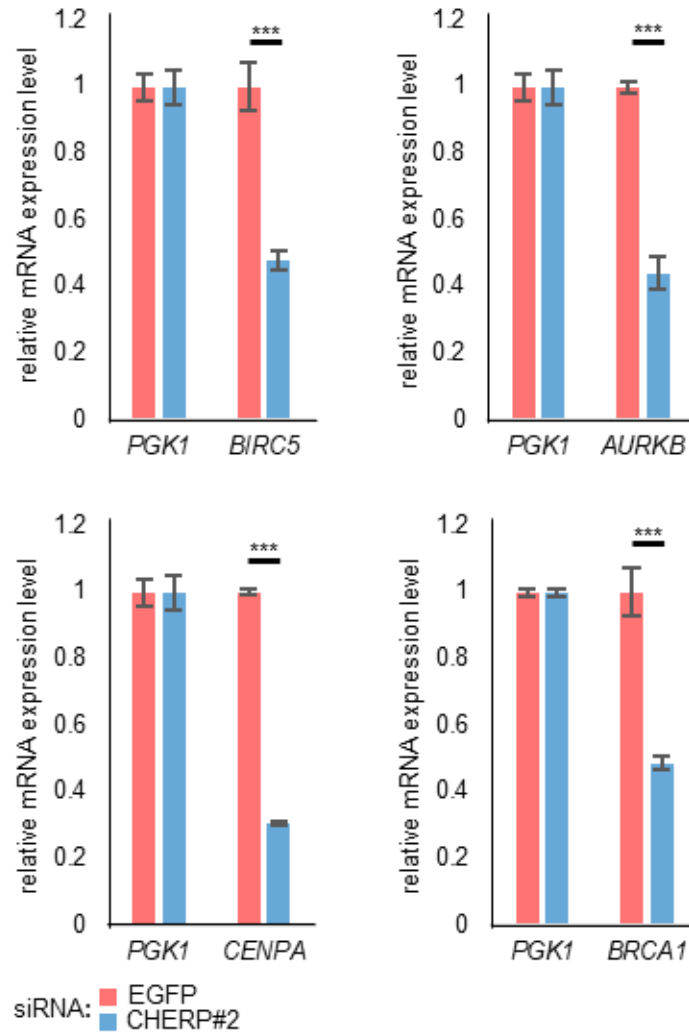


図 37 細胞周期・細胞分裂・アポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現量の評価

CHERP ノックダウン下の細胞質における *Survivin/baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5)*、*aurora kinase B (AURKB)*、*centromere protein A (CENPA)* そして *breast cancer type 1 (BRCA1)* の mRNA 発現量を RT-qPCR により解析した。発現レベルは *PGK1* を用いて標準化した。赤または青バーはそれぞれ EGFP および CHERP#2 siRNA に対する相対的な mRNA 発現量を示す。統計処理は、one way-ANOVA とそれに伴う Dunnett 検定を用いて実行した。*** $p < 0.001$ 。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 6c を改変して作成した。

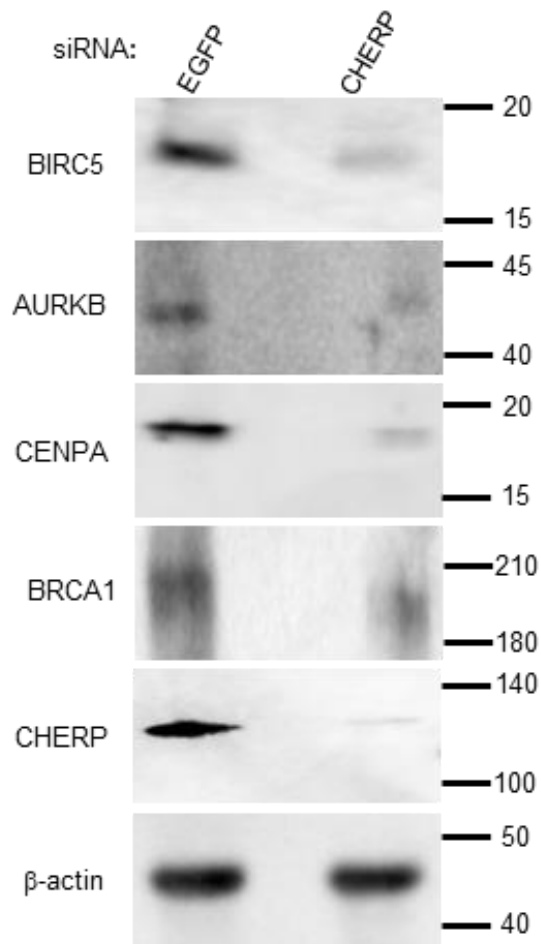


図 38 細胞周期・細胞分裂・アポトーシス関連遺伝子のタンパク質発現量の評価

Western blot を用いて ChERP ノックダウン下の細胞質における BIRC5、AURKB、CENPA、BRCA1 のタンパク質発現量を解析した。発現レベルは β -actin を用いて標準化した。本図は、CC BY のもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 6d を改変して作成した。

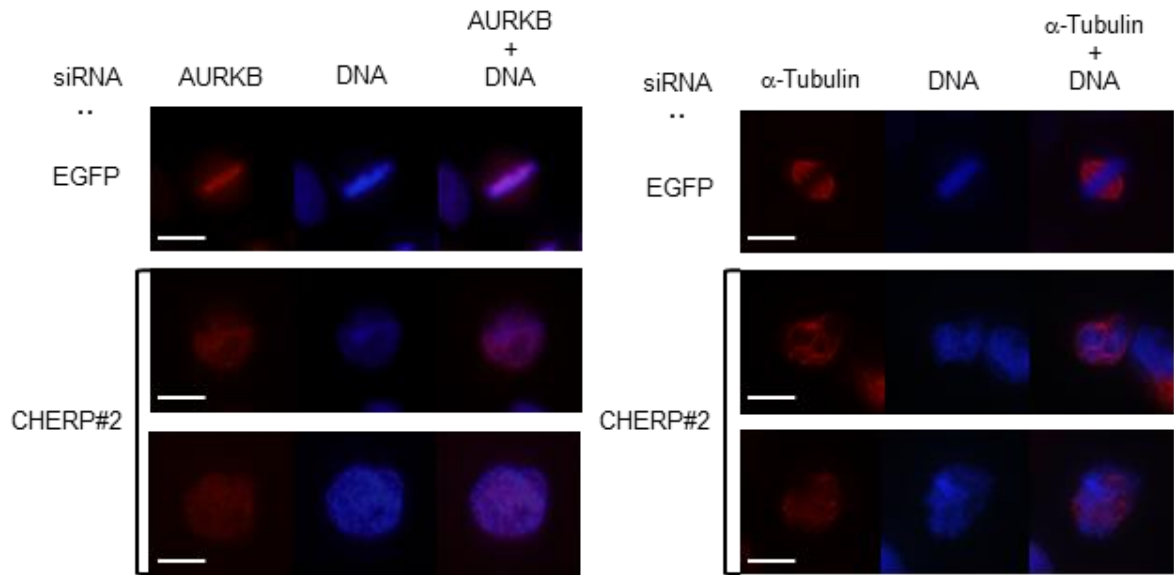


図 39 細胞分裂関連遺伝子の局在

免疫染色を用いて、CHERP ノックダウン下における AURKB および α -Tubulin の細胞内局在を撮影した。スケールバーは 10 μ m。本図は、CC BYのもと *IJMS*、23 巻、5 号、2555 (2022) の Figure 6e を改変して作成した。

考察

CHERP の細胞内局在と核内における機能

本研究は、CHERP の小胞体における機能に加えて、核内における機能を解明することで、その生理機能の理解を深めることを期待して行った。まず、細胞分画を行うことで CHERP が小胞体膜を含む不溶性画分のみならず核内にも局在することを確認した。その後、CHERP ノックダウンを行ったところ、核内においてポリ (A)⁺ RNA の蓄積が確認されたところから[37,38]、RNA 代謝に関わることが示された。この結果は他グループによる報告と一致してした[19,39]。今後、Ca²⁺代謝と RNA 代謝における CHERP の関連性やその機構の解明が待たれる[17]。

CHERP と相互作用するタンパク質の同定とスプライシングへの関与

免疫沈降とそれに続く LC-MS/MS により、CHERP と相互作用する候補因子として様々なスプライシング関連タンパク質が検出された。その中で U2 snRNP および U2 snRNP 関連タンパク質は protein score の高いものが多く、これらのうち U2AF1 と U2AF2 については Western blot により CHERP との相互作用が確認された。U2AF1 と U2AF2 はスプライシングの初期に働くことが知られており、CHERP がスプライシングに関与する可能性が強く示唆された[40,41]。なお、今回の解析では小胞体に局在する IP3R や RYR を構成するタンパク質は検出されなかったが、これは免疫沈降の際に核画分を使用したためであると推察される。

本研究では Flag-CHERP 安定発現 HEK293 細胞を使用しており、結果として SF3B1、SF3B3、U2SURP、pre-mRNA processing factor 8 (PRPF8) および SF3B2 において高い protein score が得られた(図 7c)。他方、Lin-Moshier らが GFP-CHERP 安定発現 HEK293 細胞を使用して得た結果では、SF3B1 が 7 番目、U2SURP が 1 番目、また SF3B2 が 2 番目に高いスコアとして検出されている (SF3B3 の順番は不記載であったが、CHERP による共免疫沈降解析より CHERP と結合することが確認されている。また、PRPF8 の順番は不記載である。)[19]。また De Maio らは、同様の免疫沈降実験により CHERP が RBM17 および U2SURP と複合体を形成してスプライシング反応を誘導することを示しており[21]、本研究の LC-MS/MS 解析においても RBM17 と U2SURP が検出されている(図 7c)。なお、本研究は CHERP ノックダウン細胞の核内におけるポリ (A)⁺ RNA 蓄積を解析の発端としていることから、スプライシングにより関係の深い U2 snRNP との相互作用を重視して解析を進めたため、RBM17 ならびに U2SURP の直接的な結合は評価していない。

LC-MS/MS 解析において高い protein score を示した SF3B1 では、625 番目 arginine または 666 番目 lysine に変異が生じることで構造変化が生じ、結果としてスプライシング異常が発生すること、さらにブドウ膜黒色腫を引き起こすことが報告されている[42]。同様に、CHERP の発現量が変化すると、

SF3B1 を含む U2 snRNP や U2 snRNP 関連タンパク質を含めたスプライソソームの構造が変化する可能性が考えられ、その結果引き起こされるであろうスプライシング異常が癌等の疾患の原因となる可能性が考えられる。前述のように、CHERP は RNA 結合タンパク質である RBM17 および SR タンパク質である U2SURP と複合体を形成することが報告されており[21]、RBM17 と U2SURP は共に U2 関連因子と考えられるため、CHERP はこれらの因子の相互作用を制御することが推察される[43,44]。CHERP 以外にも調節因子として機能するタンパク質複合体が選択的スプライシングを調節する報告があり、例えば RNA binding fox (RBFOX) ファミリーは、RNA binding fox-1 homolog (RBFOX1、RBFOX2、RBFOX3)、hnRNP A1 そして nova alternative splicing regulator 1 (NOVA1) 等の複数のスプライシング因子と相互作用することで、スプライシング制御因子大型構築体を形成して複雑かつ巧妙に選択的スプライシングを制御する[43]。その上、この構築体は RBFOX 凝集や核スペckル局在にも関与する[44]。これらのことから、CHERP も RBM17 と U2SURP、またその他のスプライシング因子と連動することで、RBFOX ファミリーのようにスプライシングあるいはその他の細胞機能に積極的に関与していると考えられる。

CHERP による選択的スプライシングに関わる pre-mRNA の同定とその性質・特徴

RNA-Seq 解析で得られたデータを rMATS で解析することで、スプライシングにおける CHERP の役割をより詳細に調査した結果、選択的スプライシングの中で、RI の生じる割合が最も頻度よく観察された。これは、CHERP の減少が核内におけるポリ (A)⁺ RNA の蓄積を誘導した観察と一致していた。また、代表的な 5 種類の選択的スプライシング過程の全てが CHERP ノックダウンの影響を受けていた。このうち、RI の中で III の標的として RSRP1 が観察されている。RSRP1 の機能は不明であるが、GO 解析から乳癌の予後に関与すると考えられている。CHERP ノックダウンにより RSRP1 pre-mRNA のイントロン保持が増加していることから RSRP1 mRNA は核内に滞留し、細胞質での発現量は減少することが予想される。今後 CHERP が直接的に当該 pre-mRNA に結合し、RI を制御するかについて解析することで RSRP1 のより詳細な働きのみならず乳癌の関連性を含めた知見が得られると期待される。また、上記以外の疾患関連遺伝子にも注目することで癌のみならず、難治性疾患への関与を見出すことができる可能性もある。

CHERP ノックダウンにより、5 種類の選択的スプライシングが影響を受けていたことは De Maio らの結果と一致していた[21]。しかしながら彼らの RI に関する解析では、FDR < 0.05、IncLevelDifference \geq |0.1| で 21 個の標的転写産物が同定されていたのみであったが、本研究では同条件で 220 個の標的転写産物が同定された。この不一致は、両解析で使用された細胞株が異なることが原因である可能

性がある。最近、CHERP ノックダウン下の Hela 細胞においては、頻繁に RI が検出されることが報告されている[39]。これらのことから、細胞種によって CHERP が影響を与える選択的スプライシングは少しずつ異なることが示唆された。

CHERP ノックダウンで生じるイントロンが保持された mRNA の特徴について調べたところ、弱いまたは平均値以下のスプライス部位を有していること、そしてイントロンが高い GC 含量を有すること、およびその長さが短いことが判明した。この結果は、これまでに知られている RI を生じる一般的な性質と合致していた。実際に、他の RNA 結合タンパク質である son DNA and RNA binding protein (SON) のノックダウンでも、同じ特徴を持つイントロンの保持をもたらすと報告されている[45,46]。SON が影響を与える転写産物と CHERP が影響を与える転写産物が相関関係を持つまたは共通する特徴をもつか、あるいは転写産物として別種類であるかを解析することにより RI に影響する機序がより詳細に理解できるかもしれない。また、SON は RI のみならず SE にも関与することから、今後の CHERP の選択的スプライシング制御の解析に参考になり得るスプライシング因子だと考えられる。

CHERP による標的 pre-mRNA への結合

選択的スプライシング機構の 1 つは、cis-regulatory element が trans-acting factor の標的部位になることである[47–55]。本実験において、CHERP ノックダウンによって誘導された EI の上流および下流のイントロンでは特に GC 含量が低いことが明らかとなった。一方、RI で得られたイントロンは、GC 含量が参照イントロンより高いという結果であり、選択的スプライシングの型によってイントロンの GC 含量が異なっていた。現時点でこのような違いを生じた原因は不明であるが、CHERP はエクソン上の特定の adenine に富む配列に結合し、スプライシングの変化を引き起こすことが報告されている[56]。標的となるイントロンやその上流あるいは下流のエクソンに存在する adenine に富む配列が RI と SE では異なるのかもしれない。今後、CHERP が各標的 pre-mRNA のエクソンまたはイントロン上への結合を使い分けることで、RI または SE の制御に違いが生じるかを解析する予定である。また、CHERP は RNA に結合する SURP ドメインと G patch ドメインを有するが、いずれのドメインが標的 pre-mRNA と結合しスプライシングを制御するかを明らかにしたい。加えて、CHERP は他の RS ドメインを有するタンパク質と相互作用する可能性を有しており、RS ドメインを欠損させることでスプライシングにどのように影響が生じるかについても解析したい。このような解析を行うことで CHERP が機能するために必要な領域を明らかにできると考えている。また本研究で解析の対象としたのは、最も頻度よく検出された RI と、最もイベント数の多かった SE についてのみであり、MXE、A5SS や A3SS については解析を行っておらず、今後 RI や SE と同様の解析を進めることで CHERP によるスプライシング制御機構がより詳細に解明さ

れることを期待している。これらのアプローチにより、CHERP による選択的スプライシングへの効果や影響をより詳細に理解することが可能となると考えている。

細胞周期と細胞分裂に関する CHERP の機能

BIRC5、AURKB、CENPA、および BRCA1 は M 期への移行を促進する遺伝子である[22,37]。CHERP を減少させた際に、一部の生細胞の細胞質において、それらの発現が mRNA 量レベルおよびタンパク質量レベルで低下すること、また AURKB と α -Tubulin が誤局在することが確認された。この実験では多くの細胞が死滅していたことから定量的解析が不可能であったが、CHERP ノックダウンによって様々な因子のスプライシングパターンが変化し、AURKB を含めた発現タンパク質の量的および質的な変化が寄与している可能性が推察された。また、免疫沈降とそれに続く LC-MC/MC 解析により、 α -Tubulin を構成する tubulin alpha 1a (TUBA1A) や tubulin alpha 1c (TUBA1C) が CHERP と相互作用することが示唆された(データ不記載)。これらの結果は、CHERP が M 期への進行に関与する因子の mRNA 発現を介してだけでなくタンパク質相互作用を介しても制御していることを意味しており、ES を生じるイントロンや細胞質発現量が減少する mRNA の GO 解析でも一致する結果が得られている。山崎らのマイクロアレイ解析による報告によると[22]、mRNA 核外輸送因子である UAP56 や DExD-box helicase 39A (URH49) をノックダウンするとそれぞれ細胞周期 M 期に関わる複数かつそれぞれの因子に特異的な標的 mRNA の発現量が減少している。さらにそれらの mRNA がコードしているタンパク質発現量の減少に伴って有糸分裂期の特異的な表現型の異常につながっていた。一方、本実験における RNA-Seq 解析では、CHERP をノックダウンすると、細胞周期 M 期に関わる複数の標的 mRNA 発現量が減少した。UAP56 および URH49 をそれぞれノックダウンすると、いずれも細胞周期 M 期の表現型に異常が生じたが、顕著に発現量が減少した標的 mRNA については CHERP と UAP56、および CHERP と URH49 の間で一致しているものはなかった。したがって、それぞれ観察される表現型は異なる遺伝子の影響によるものであると考えられる。

最近、神経芽細胞腫細胞株 BE(2)-C、SK-N-DZ、SK-N-F1 等を使用して、CHERP が細胞増殖やアポトーシスに関与していることがそれぞれフローサイトメトリーや annexin V を用いた解析により示され、CHERP が腫瘍形成の維持に関与することが報告された[57]。今後 CHERP の細胞周期への効果がより詳細に解明できれば、CHERP のスプライシングを介した細胞増殖との関係を明らかにできると期待される。また、選択的スプライシング制御と癌の発生が密接に関連することも報告されていることから、CHERP と癌についての理解が更に深まる可能性がある[23]。

Ca²⁺を介した CHERP によるスプライシング制御

ALG-2 は細胞質と核内の両方に存在する Ca²⁺結合タンパク質であり、Ca²⁺に依存して様々なタンパク質と相互作用する[58]。CHERP は ALG-2 と相互作用するタンパク質の 1 つであり、互いに連携することで IP3R1 における選択的スプライシングの調節に関与する[20]。興味深いことに、Ca²⁺濃度が上昇すると ALG-2 は CHERP と結合することから、CHERP は Ca²⁺シグナルに応答してスプライシングを変化させる可能性がある。今後、ノックダウンなどにより ALG-2 を減少させることで CHERP の局在が変化するかどうか、また今回解析した CHERP による RI や SE といったスプライシング型の変化が生じるかを明らかにできれば、ALG-2 を介した Ca²⁺シグナル伝達と選択的スプライシング機序の関連性を解明できる可能性がある。さらに、Ca²⁺シグナルが細胞内に入った際、CHERP の ALG-2 との結合性や RBM17 および U2SURP との結合性がどのように変化するのか、また、その際に選択的スプライシングがどのように変化するかを調査することで、CHERP の機能についてより理解を深めることができると期待される。また、それらの結果を統合することで、Ca²⁺シグナル伝達が担う受精から細胞死までの幅広い細胞過程の制御についても理解が進むことが期待される[59]。

引用文献

- [1] M. Chen, J.L. Manley, Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 741–754. <https://doi.org/10.1038/nrm2777>.
- [2] H. Keren, G. Lev-Maor, G. Ast, Alternative splicing and evolution: Diversification, exon definition and function, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 345–355. <https://doi.org/10.1038/nrg2776>.
- [3] X.D. Fu, M. Ares, Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 689–701. <https://doi.org/10.1038/nrg3778>.
- [4] M.J. Moore, C.C. Query, P.A. Sharp, Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome, 1993. www.cshlpress.com/copyright.
- [5] M.C. Wahl, C.L. Will, R. Lührmann, The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine, *Cell.* 136 (2009) 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>.
- [6] A.G. Matera, Z. Wang, A day in the life of the spliceosome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>.
- [7] M.E. Wilkinson, C. Charenton, K. Nagai, RNA Splicing by the Spliceosome, *Annu. Rev. Biochem.* 89 (2020) 359–388. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>.
- [8] G.P.S. & C.B.B. Eric T. Wang, Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtukova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F. Kingsmore, Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes, *Nature.* 456 (2008) 470–476. <https://doi.org/10.1038/nature07509.Alternative>.
- [9] D.L. Black, Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing, *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 291–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>.
- [10] E. Kim, A. Goren, G. Ast, Alternative splicing: Current perspectives, *BioEssays.* 30 (2008) 38–47. <https://doi.org/10.1002/bies.20692>.
- [11] Z. Zhou, X.D. Fu, Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases, *Chromosoma.* 122 (2013) 191–207. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0407-z>.
- [12] T. Geuens, D. Bouhy, V. Timmerman, The hnRNP family: insights into their role in health and disease, *Hum. Genet.* 135 (2016) 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>.
- [13] C. Maris, C. Dominguez, F.H.T. Allain, The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression, *FEBS J.* 272 (2005) 2118–2131. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x>.
- [14] Y. Lee, D.C. Rio, S. Biology, C. Biology, Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing, *Annu.Rev.Biochem.* (2015) 291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev->

- biochem-060614-034316.Mechanisms.
- [15] T.A. Cooper, L. Wan, G. Dreyfuss, RNA and Disease, *Cell*. 136 (2009) 777–793. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.011>.
- [16] M.M. Scotti, M.S. Swanson, RNA mis-splicing in disease, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.3>.
- [17] J.M. Laplante, F. O 'rourke, X. Lu, A. Fein, A. Olsen, M.B. Feinstein, Cloning of human Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP): regulated expression of antisense cDNA depletes CHERP, inhibits intracellular Ca²⁺ mobilization and decreases cell proliferation, *Biochem. J.* 348 (2000) 189–199. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480189>.
- [18] T. Ryan, P. Sharma, A. Ignatchenko, D.H. MacLennan, T. Kislinger, A.O. Gramolini, Identification of novel ryanodine receptor 1 (RyR1) protein interaction with calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP), *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17060–17068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197186>.
- [19] Y. Lin-Moshier, P.J. Sebastian, L.A. Higgins, N.D. Sampson, J.E. Hewitt, J.S. Marchant, Re-evaluation of the role of Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein (CHERP) in cellular calcium signaling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 355–367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405761>.
- [20] K. Sasaki-Osugi, C. Imoto, T. Takahara, H. Shibata, M. Maki, Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) Pre-mRNA, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 33361–33375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497479>.
- [21] A. De Maio, H.K. Yalamanchili, C.J. Adamski, V.A. Gennarino, Z. Liu, J. Qin, S.Y. Jung, R. Richman, H. Orr, H.Y. Zoghbi, RBM17 Interacts with U2SURP and CHERP to Regulate Expression and Splicing of RNA-Processing Proteins, *Cell Rep.* 25 (2018) 726-736.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.041>.
- [22] T. Yamazaki, N. Fujiwara, H. Yukinaga, M. Ebisuya, T. Shiki, T. Kurihara, N. Kioka, T. Kambe, M. Nagao, E. Nishida, S. Masuda, The Closely Related RNA helicases, UAP56 and URH49, Preferentially Form Distinct mRNA Export Machineries and Coordinately Regulate Mitotic Progression, *Mol. Biol. Cell.* 21 (2010) 1033–1046. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>.
- [23] K. Fujita, T. Yamazaki, K. Harada, S. Seno, H. Matsuda, S. Masuda, URH49 exports mRNA by remodeling complex formation and mediating the NXF1-dependent pathway,

- Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 1863 (2020) 194480.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194480>.
- [24] M. Kurata, N. Fujiwara, K. Fujita, Y. Yamanaka, S. Seno, H. Kobayashi, Y. Miyamae, N. Takahashi, Y. Shibuya, S. Masuda, Food-Derived Compounds Apigenin and Luteolin Modulate mRNA Splicing of Introns with Weak Splice Sites, *IScience*. 22 (2019) 336–352.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.033>.
- [25] A.E. Carpenter, T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, O. Friman, D.A. Guertin, J.H. Chang, R.A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland, D.M. Sabatini, CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, *Genome Biol.* 7 (2006). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>.
- [26] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*. 29 (2013) 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [27] Bo Li, C.N. Dewey, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome, *BMC Bioinformatics*. 12 (2011).
<https://doi.org/10.1201/b16589>.
- [28] N. Leng, J.A. Dawson, J.A. Thomson, V. Ruotti, A.I. Rissman, B.M.G. Smits, J.D. Haag, M.N. Gould, R.M. Stewart, C. Kendziorski, EBSeq: An empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments, *Bioinformatics*. 29 (2013) 1035–1043.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt087>.
- [29] S. Shen, J.W. Park, Z. Lu, L. Lin, M.D. Henry, Y.N. Wu, Q. Zhou, Y. Xing, rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E5593–E5601.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1419161111>.
- [30] P. Danecek, J.K. Bonfield, J. Liddle, J. Marshall, V. Ohan, M.O. Pollard, A. Whitwham, T. Keane, S.A. McCarthy, R.M. Davies, H. Li, Twelve years of SAMtools and BCFtools, *Gigascience*. 10 (2021) 1–4. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>.
- [31] J.P. Hagan, E. Piskounova, R.I. Gregory, Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 1021–1025.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1676>.
- [32] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>.
- [33] G. Yeo, C.B. Burge, Maximum entropy modeling of short sequence motifs with

- applications to RNA splicing signals, *J. Comput. Biol.* 11 (2004) 377–394.
<https://doi.org/10.1089/1066527041410418>.
- [34] A. Corvelo, M. Hallegger, C.W.J. Smith, E. Eyras, Genome-Wide Association between Branch Point Properties and Alternative Splicing, *PLoS Comput Biol.* 6 (2010) e1001016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001016>.
- [35] A.R. Quinlan, I.M. Hall, BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features, *Bioinformatics.* 26 (2010) 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
- [36] G. Crooks, G. Hon, J. Chandonia, S. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res.* 14 (2004) 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004.1>.
- [37] M. Okamura, Y. Yamanaka, M. Shigemoto, Y. Kitadani, Y. Kobayashi, T. Kambe, M. Nagao, I. Kobayashi, K. Okumura, S. Masuda, Depletion of mRNA export regulator DBP5/DDX19, GLE1 or IPPK that is a key enzyme for the production of IP6, resulting in differentially altered cytoplasmic mRNA expression and specific cell defect, *PLoS One.* 13 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197165>.
- [38] P. Legrain, M. Rosbash, Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm, *Cell.* 57 (1989) 573–583. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90127-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90127-X).
- [39] E. Martín, C. Vivori, M. Rogalska, J. Herrero-Vicente, J. Valcárcel, Alternative splicing regulation of cell-cycle genes by SPF45/SR140/CHERP complex controls cell proliferation, *Rna.* 27 (2021) 1557–1576. <https://doi.org/10.1261/rna.078935.121>.
- [40] P.D. Zamore, M.R. Green, Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 9243–9247.
- [41] A. Hegele, A. Kamburov, A. Grossmann, C. Sourlis, S. Wowro, M. Weimann, C.L. Will, V. Pena, R. Lührmann, U. Stelzl, Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome, *Mol. Cell.* 45 (2012) 567–580. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.034>.
- [42] S. Alsafadi, A. Houy, A. Battistella, T. Popova, M. Wassef, E. Henry, F. Tirode, A. Constantinou, S. Piperno-Neumann, S. Roman-Roman, M. Dutertre, M.H. Stern, Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms10615>.
- [43] A. Damianov, Y. Ying, C.H. Lin, J.A. Lee, D. Tran, A.A. Vashisht, E. Bahrami-Samani, Y. Xing, K.C. Martin, J.A. Wohlschlegel, D.L. Black, Rbfox Proteins Regulate Splicing as Part of a Large Multiprotein Complex LASR, *Cell.* 165 (2016) 606–619.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.040>.
- [44] Y. Ying, X.J. Wang, C.K. Vuong, C.H. Lin, A. Damianov, D.L. Black, Splicing Activation by

- Rbfox Requires Self-Aggregation through Its Tyrosine-Rich Domain, *Cell*. 170 (2017) 312–323.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.022>.
- [45] E.Y. Ahn, R.C. DeKolver, M.C. Lo, T.A. Nguyen, S. Matsuura, A. Boyapati, S. Pandit, X.D. Fu, D.E. Zhang, SON Controls Cell-Cycle Progression by Coordinated Regulation of RNA Splicing, *Mol. Cell*. 42 (2011) 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.014>.
- [46] X. Lu, J. Göke, F. Sachs, P.É. Jacques, H. Liang, B. Feng, G. Bourque, P.A. Bubulya, H.H. Ng, SON connects the splicing-regulatory network with pluripotency in human embryonic stem cells, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 1141–1152. <https://doi.org/10.1038/ncb2839>.
- [47] D. Ray, H. Kazan, E.T. Chan, L.P. Castillo, S. Chaudhry, S. Talukder, B.J. Blencowe, Q. Morris, T.R. Hughes, Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 667–670. <https://doi.org/10.1038/nbt.1550>.
- [48] O. Anczuków, M. Akerman, A. Cléry, J. Wu, C. Shen, N.H. Shirole, A. Raimer, S. Sun, M.A. Jensen, Y. Hua, F.H.T. Allain, A.R. Krainer, SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer, *Mol. Cell*. 60 (2015) 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.005>.
- [49] M. Ajiro, R. Jia, Y. Yang, J. Zhu, Z.M. Zheng, A genome landscape of SRSF3-regulated splicing events and gene expression in human osteosarcoma U2OS cells, *Nucleic Acids Res.* 44 (2015) 1854–1870. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1500>.
- [50] X. Zhou, X. Li, Y. Cheng, W. Wu, Z. Xie, Q. Xi, J. Han, G. Wu, J. Fang, Y. Feng, BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5581>.
- [51] T. Imai, A. Tokunaga, T. Yoshida, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, G. Weinmaster, M. Nakafuku, H. Okano, The Neural RNA-Binding Protein Musashi1 Translationally Regulates Mammalian numb Gene Expression by Interacting with Its mRNA, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 3888–3900. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.12.3888-3900.2001>.
- [52] J.A. Calarco, S. Superina, D. O'Hanlon, M. Gabut, B. Raj, Q. Pan, U. Skalska, L. Clarke, D. Gelinas, D. van der Kooy, M. Zhen, B. Ciruna, B.J. Blencowe, Regulation of Vertebrate Nervous System Alternative Splicing and Development by an SR-Related Protein, *Cell*. 138 (2009) 898–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.012>.
- [53] V. Dauksaite, M. Gotthardt, Molecular basis of titin exon exclusion by RBM20 and the novel titin splice regulator PTB4, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 5227–5238. <https://doi.org/10.1093/nar/gky165>.
- [54] H. Kuroyanagi, Y. Watanabe, M. Hagiwara, CELF Family RNA-Binding Protein UNC-75

- Regulates Two Sets of Mutually Exclusive Exons of the *unc-32* Gene in Neuron-Specific Manners in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003337.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003337>.
- [55] E.G. Bechara, E. Sebestyén, I. Bernardis, E. Eyra, J. Valcárcel, RBM5, 6, and 10 differentially regulate NUMB alternative splicing to control cancer cell proliferation, *Mol. Cell.* 52 (2013) 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.010>.
- [56] Q. Wang, Y. Wang, Y. Liu, C. Zhang, Y. Luo, R. Guo, Z. Zhan, N. Wei, Z. Xie, L. Shen, G. Wu, W. Wu, Y. Feng, U2-related proteins CHERP and SR140 contribute to colorectal tumorigenesis via alternative splicing regulation, *Int. J. Cancer.* 145 (2019) 2728–2739. <https://doi.org/10.1002/ijc.32331>.
- [57] D. Zhang, F. Wang, Y. Pang, X. Ke, S. Zhu, E. Zhao, Down-regulation of CHERP inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis through ER stress induction, 8 (2017) 80956–80970.
- [58] M. Okumura, F. Ichioka, R. Kobayashi, H. Suzuki, H. Yoshida, H. Shibata, M. Maki, Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca²⁺-dependent adaptor that bridges Alix and TSG101, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386 (2009) 237–241.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.015>.
- [59] D.E. Clapham, Calcium Signaling, *Cell.* 131 (2007) 1047–1058.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.

謝辭

本稿の執筆を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 分子応答機構学分野 准教授（現近畿大学 農学部 食品栄養学科 教授）増田誠司博士に心より深甚なる謝意を表します。研究を遂行するにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 分子応答機構学分野 教授 片山高嶺博士、同助教 加藤紀彦博士に謹んで深謝申し上げます。またご指導、ご助言を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 生体情報応答学分野 教授 永尾雅哉博士、同准教授 神戸大朋博士、同助教 西野勝俊博士に謹んで深謝申し上げます。

LC-MS/MS 解析を行っていただきました京都大学大学院 生命科学研究科 蛋白質解析室 渡邊祐三氏に厚く御礼申し上げます。またウサギ抗 CHERP ポリクローナル抗体をご供与頂きました名古屋大学 生命農学研究科 特任教授 牧正敏博士、マウス抗 U2F2 モノクローナル抗体とウサギ抗 NXF1 ポリクローナル抗体をご供与頂きましたハーバード大学 医学大学院 教授 Robin Reed 博士に厚く御礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を賜りました京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野の藤原奈央子氏、藤田賢一氏（現藤田医科大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究部門 助教）、南裕基氏、向井琴美氏、三宅俊太郎氏、原田光太郎氏、石塚高己氏に心より深謝申し上げます。有意義な時間を共に過ごし、多大なご支援を賜りました眞島要輔氏並びにご家族、多大なるご助力を賜りました清水久美子氏に心から深謝申し上げます。

研究生活を送るにあたり終始温かく支えて頂きました京都大学大学院 生命科学研究科 分子応答機構学分野の皆様へ深謝申し上げます。

本稿を執筆するにあたり、多大なるご支援を賜りました京都大学大学院 生命科学研究科 生体情報応答学分野（現名古屋大学大学院 創薬科学研究科 創薬生物科学分野 助教）辻徳治氏、京都大学大学院 農学研究科 酵素化学分野 姫田康平氏に心より深謝申し上げます。

そして、研究のみならず私生活においても多くの時間を共に過ごし多大なるご協力を賜りました名古屋市立大学大学院 医学研究科 口腔外科学分野 倉田雅志氏並びにご家族に心から深謝申し上げます。

本稿を執筆するにあたり多大なるご指導、ご配慮を賜りました地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 公衆衛生部 部長 本村和嗣先生、同微生物部 部長 小笠原準先生、同公衆衛生部健康危機管理課 課長 入谷展弘先生、同微生物部ウイルス課 課長 森治代先生、同公衆衛生部健康危機管理課 主任研究員 梶月由香先生、同主任研究員 柿本健作先生、同公衆衛生部疫学解析研究

課 研究員 三山豪士先生に謹んで深謝申し上げます。

最後に、これまで温かく見守り、励まし続けてくれた家族、とりわけ苦しく困難な際にいつも助けてくれた叔父、谷口昌彦に心から感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yasutaka Yamanaka, Takaki Ishizuka, Ken-ichi Fujita, Naoko Fujiwara, Masashi Kurata and Seiji Masuda

CHERP Regulates the Alternative Splicing of pre-mRNAs in the Nucleus

International Journal of Molecular Sciences, 23, 5, 2555, <https://doi.org/10.3390/ijms23052555>, 2022