

MPP6によるヒト核内エキソソーム複合体の
活性および基質特異性の制御機構

藤原 奈央子

目次

要旨	2
略語表	4
序論	5
結果	
第1節 MPP6はRRP6とDIS3によるMTR4感受性のpoly(A) ⁺ RNA基質サブセットの分解を促進する	13
第2節 MPP6の維持するMTR4とエキソソームコア間の相互作用は至適なpoly(A) ⁺ RNA基質分解に必須である	30
第3節 MPP6はコアへとリクルートするMTR4複合体の種類を規定することでヒト核内エキソソームの基質特異性を制御する	45
考察	57
材料と方法	65
引用文献	79
謝辞	93
論文目録	94

要旨

ゲノム情報の正確な発現において、適切な RNA 分解は不可欠である。RNA エキソソーム（以後、エキソソーム）は真核生物において主要な 3'-5'エキソリボヌクレアーゼ活性を担う複合体であり、RNA 代謝の幅広い局面を制御している。エキソソームは、コアと呼ばれるヌクレアーゼ活性を持たないリング状の構造を基本とし、コアに付随するヌクレアーゼや補因子を複数種持つことで多様な基質 RNA に対応している。ヒト核内では、RRP6 と DIS3 がヌクレアーゼとしてコアに直接結合する。また、核特異的な補因子である RNA ヘリカーゼ MTR4 は、現在までに同定された複数のエキソソーム補因子複合体に共通して含まれており、核内でのエキソソームによる基質分解に必須の因子である。In vitro における複合体の再構成解析から、RRP6 および核特異的な補因子の一つである MPP6 は、それぞれコアと MTR4 に同時に結合することで MTR4-コア間の相互作用に介在し、MTR4 依存性の基質 RNA 分解を活性化することが示されている。一方、実際の細胞内における MTR4-コア間の相互作用の重要性についての知見は未だ非常に乏しい。また、補因子 MPP6 の細胞内におけるエキソソーム機能への関与についても、古くにヒトの rRNA プロセッシング異常や酵母の遺伝学的相互作用を指標とした研究で示唆されたのみで、その作用機序や MPP6 が分解に寄与する基質 RNA の範囲等についての詳細は不明であった。

本論文では、ヒト核内エキソソームによる基質 RNA 分解における MPP6 の役割の解明を目指し解析を行った。エキソソームに付随するヌクレアーゼや補因子を単独あるいは同時にノックダウンし、基質 RNA 分解および MTR4-コア間相互作用への影響を観察することで、エキソソーム複体内における各因子の機能および因子間の機能的な相互作用を評価した。その結果、MPP6 は RRP6 と DIS3 による MTR4 依存性の poly(A)⁺ RNA 基質分解のそれぞれを促進することを明らかにした。また、MPP6 はヒト核内においても MTR4 とコアの結合に介在し、その結合様式はこれまでに in vitro 解析で明らかにされたものとよく合致することを明らかにした。一方、RRP6 による MTR4 のコアへのリクルート量が維持されている状況でも、MTR4 依存性の poly(A)⁺ RNA 基質分解は MPP6 ノックダウンで阻害されることから、MPP6 と RRP6 それぞれが介在する MTR4-コア間相互作用の間に機能的な差異を見出した。これは比較的単純な基質 RNA を扱ってきたこれまでの in vitro 解析では捉えられてこなかった結論で、ヒト細胞を用いて多様かつ複雑な基質 RNA への影響を評価することにより初めて見出された成果である。さらに、MPP6 が標的とする基質 RNA の範囲とその特徴を把握することを目的として、次世代シーケンシング解析を行い、各エキソソーム構成因子ノックダウンに対する感受性に基づいて基質 RNA を分類した。そ

の結果、エキソソームの基質 RNA のうち、MPP6 が分解を促進する基質 RNA 群には、難抽出性、特定のエキソソーム補因子複合体への高い感受性、短い転写ユニット由来といった特徴が観察された。つまり MPP6 は、エキソソームによる RNA 分解活性全体に広く関与するのではなく、エキソソーム複合体が取りうる複数の形態のうちの 1 つを構成する因子として、限られた基質 RNA サブセットの分解に機能することが示唆された。近年の構造解析の結果から、MTR4 への結合において MPP6 と競合関係にある補因子の存在が示唆されており、本解析結果は、MPP6 がコアと結合する MTR4 補因子複合体の種類を規定することにより、ヒト核内においてエキソソームの基質特異性を制御するという新しいモデルを提示するものである。

略語一覽

mRNA: messenger RNA

rRNA: ribosomal RNA

tRNA: transfer RNA

snRNA: small nuclear RNA

snoRNA: small nucleolar RNA

TRAMP: TRf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation

NEXT: Nuclear EXosome Targeting

PAXT: Poly(A) tail eXosome Targeting

ETS: External Transcribed Spacer

hTR: human Telomerase RNA

PAP: Poly(A) Polymerase

PAS: PolyAdenylation Signal

PROMPTs: PROMoter upstream Transcripts

eRNA: enhancer RNA

PCPA/IPA: Premature Cleavage and PolyAdenylation/Intronic PolyAdenylation

SNHG: small nucleolar RNA host gene

CBC: Cap Binding Complex

KD: KnockDown

FISH: Fluorescence *In Situ* Hybridization

siRNA: small interfering RNA

RNAi: RNA interference

PML body: ProMyelocytic Leukemia protein body

GST: Glutathione S-transferase

ppt: precipitate

NGS: Next Generation Sequencing

AGPC: Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform

hp: hot phenol

rlog: regularized log

CLIP: Cross-Linking ImmunoPrecipitation

FDR: False Discovery Rate

FC: Fold Change

序論

次世代シーケンシングをはじめとする近年の技術革新により、真核生物ゲノムはその大半の領域が転写されており、従来よく解析されてきた mRNA や rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA といった比較的安定な RNA 分子だけでなく、非常に寿命の短い RNA も生産されていることが明らかとなった(1, 2)。これら短寿命の転写物については、単なる転写のノイズではなく、アンチセンス RNA の転写促進、クロマチン制御、DNA 切断修復、細胞運命決定の制御、多能性など、様々な細胞内プロセスを制御する分子として機能することが明らかになりつつある(3, 4)。RNA 分解活性は、前駆体として生産される RNA を適切にプロセッシングして機能を持つ RNA に成熟させる際に、また、短寿命の RNA を迅速かつ特異的に分解する際にも働いており、ゲノム情報の正確な発現のために不可欠の活性である。細胞内にはこの活性を担う多数のヌクレアーゼが存在している(3-7)。

このうち、エキソソームは真核細胞において必須かつ高度に保存された 3'-5' エキソヌクレアーゼ複合体であり、細胞質及び核内の幅広い RNA 分解プロセスで機能することが知られている(4, 6, 8)。エキソソームの「コア」と呼ばれる構造は、9つの因子からなる樽状の形状をしており、この構造自体はヌクレアーゼ活性を持たず、細胞質と核の両方に存在する[(9-12), 図 1]。コアを構成する 9つの因子のうち 6つは RNase PH-like タンパク質であり、6量体のリングを形成している。このリングの上部に S1/KH ドメインを含む 3つのタンパク質が結合することで中央のチャンネル構造を形成している[(9-11), 図 1]。出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではこのコア構造に、エキソソームの触媒分子としてヌクレアーゼである Rrp44p が結合している。Rrp44p は N 末端ドメインのシステインに富んだモチーフを介して、コアの底にある PH-like ドメインに結合する(13-20)。Rrp44p は C 末端の RNase II/R (RNB) ドメインに由来する processive(基質に結合したまま連続的に分解する)型の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性と N 末端の PilT N-terminal (PIN) ドメインが示すエンドヌクレアーゼ活性の両方を持つ酵素である(12, 14, 19-21)。これら 2つの活性は細胞内で協調的に機能しており、それぞれの活性を不活化する変異は出芽酵母において合成生育阻害を示す(14, 18)。出芽酵母では核と細胞質の両方で Rrp44p がコアに結合する一方、ヒト細胞においては Rrp44p のホモログである DIS3 と DIS3L1 がそれぞれ核と細胞質においてコアに結合している[(19, 20), 図 1, 補足図 1]。ヒト細胞の細胞質には、もう一つの Rrp44p ホモログである DIS3L2 も存在するが、このタンパク質は PIN ドメインを欠くため、エキソソームには結合しない(22-24)。これらの Rrp44p ホモログの他に、出芽酵母では Rrp6p、ヒトでは RRP6 という RNase D ファミリーに属する

distributive(基質についたり離れたりしながら断続的に分解する)型の 3'-5'エキソヌクレアーゼが核内においてコアに結合している[(25-27), 図 1]。RRP6 は、その C 末端領域を介してコアと相互作用し、N 末端はコアの S1/KH キャップ側に位置しており、複合体内ではコアを挟んで DIS3 とは反対側に配位している(28-31)。

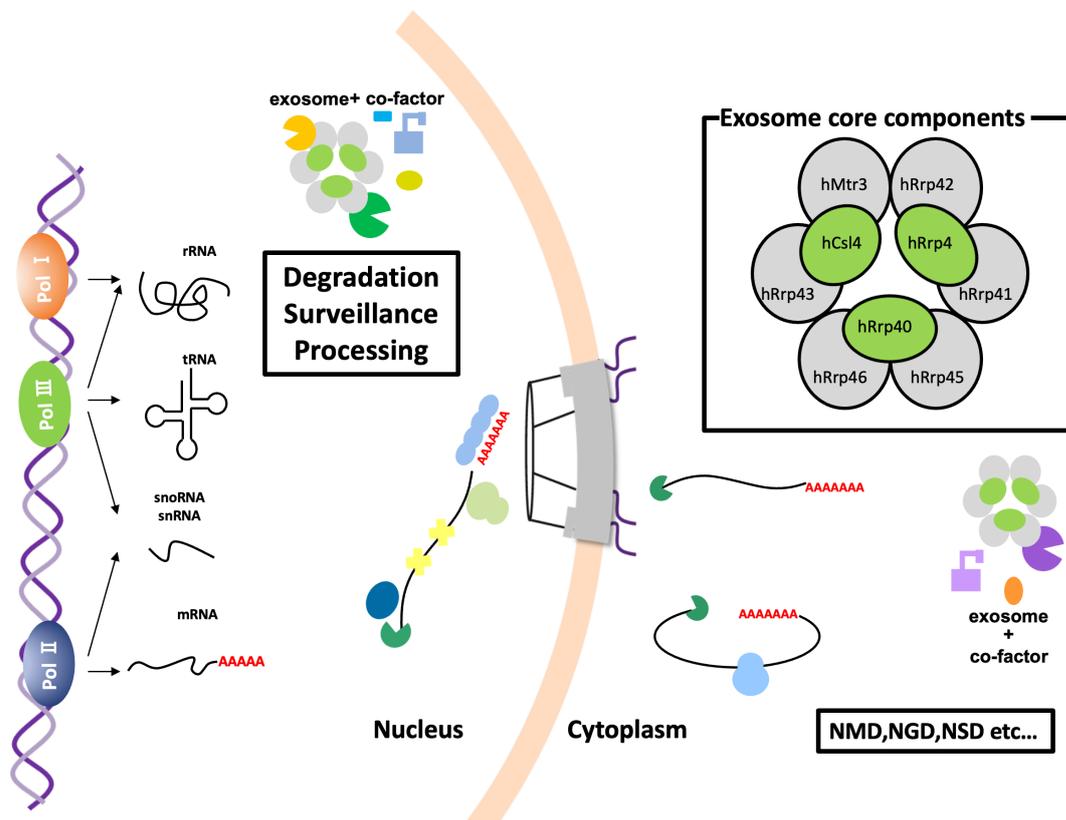


図 1. 真核細胞内の各コンパートメントにおけるエキソソームの構造と機能

エキソソームの非触媒成分であるコア構造は核と細胞質のいずれにも存在する。ヒト細胞においては、ヌクレアーゼとして DIS3 と RRP6 が核において、DIS3L1 が細胞質においてコアと結合して機能する。エキソソームはヌクレアーゼの他、コンパートメント特異的な補因子を伴うことで各コンパートメント特有かつ多様な RNA 代謝プロセスに機能している。

出芽酵母では、Rrp44p と Rrp6p はともに幅広い RNA を基質として働くことが捉えられており、Rrp44p と Rrp6p それぞれのエキソヌクレアーゼ活性との間に合成致死性が観察されることから、これらの分子が共通の基質に作用することが示唆されている(9, 32)。一方ヒトにおいては、DIS3 は核小体から排除されて核質内に分布しているのに対し、RRP6 は特に核小体内に濃縮した局在を示す[(19, 33), 図 2]。このようなヌクレアーゼ間のコンパートメント分布の違いを反映して、エキソソームによる核質の基質分解のほとんどは通常 DIS3 が担っているとされ、RRP6 の関与が示されているのはこれまでのところ rRNA や snoRNA のプロセッシングなどの少数の基質に限られている(34-37)。

上記のようなコンパートメント特異的なヌクレアーゼの使い分けに加えて、エキソソームは様々な補因子を伴うことによって幅広い基質特異性を発揮している(4, 6, 8)。例えば細胞質における RNA ターンオーバー、異常 RNA の監視機構、RNA 干渉などの RNA 分解プロセスにおいて、Ski2-Ski3-Ski8 (Ski)複合体がエキソソームに随伴して機能することが知られている(38)。出芽酵母では核内基質の分解に TRF4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) 複合体が広く関与している一方、ヒト核内では基質の多様化を反映し、TRAMP 複合体に加えて Nuclear EXosome Targeting (NEXT) 複合体と Poly(A) tail eXosome Targeting (PAXT)複合体もエキソソーム補因子として同定されている[(39–47), 図 2, 補足図 1]。

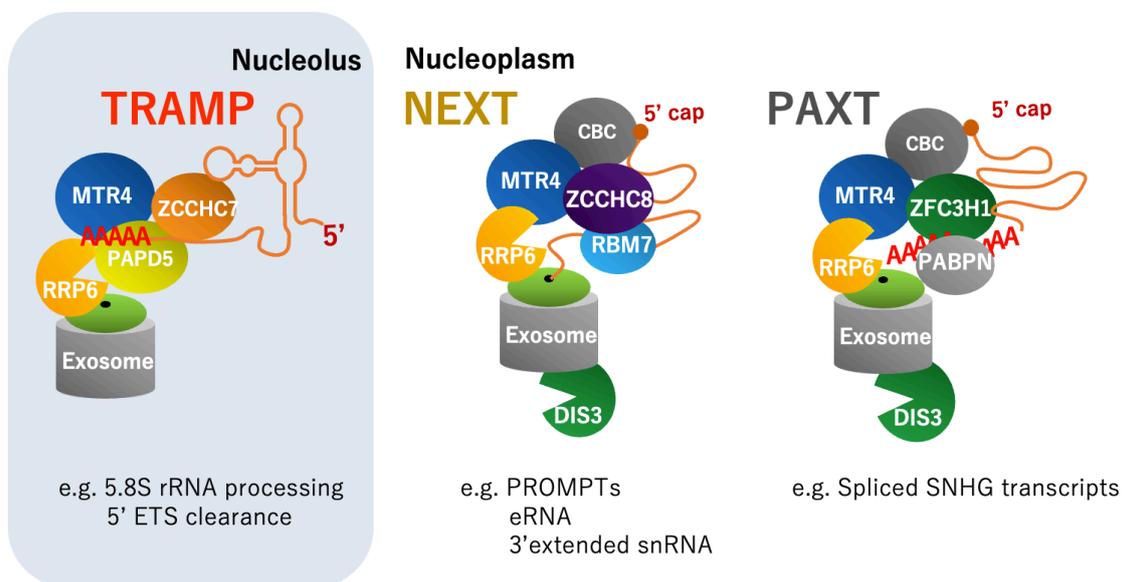


図 2. ヒト核内エキソソームの補因子とその核内分布および同定されている基質分子

ヒトでは RRP6 は核小体に濃縮されており、DIS3 は核質に主に局在している。核小体内では TRAMP 複合体が補因子としてエキソソームに付随して rRNA のプロセッシング過程に機能する。核質においては NEXT 複合体と PAXT 複合体の二つの補因子が同定されており、NEXT 複合体が 3'末端に poly(A)⁺ 鎖を持たない基質を標的にするのに対し、PAXT 複合体は poly(A)⁺ 鎖付与された 3'末端を持つ基質を分解する。TRAMP、NEXT、PAXT 複合体のいずれにも MTR4 ヘリカーゼが含まれている。

ヒトの TRAMP 複合体は核小体に濃縮され、rRNA のプロセッシング過程における 5' External Transcribed Spacer (ETS) のクリアランスとテロメラーゼ RNA (hTR) の分解に関与することが示されている(48–52)。このプロセスには、TRAMP 内の因子である PAPD5 によって 5' ETS または hTR の 3'末端へ継続的にアデニン付加されることが必須である(48, 50, 51)。PAPD5 (TRF4-2, TENT4B と呼ばれる)は、Polyadenylation Signal (PAS)を介した poly(A)⁺ 鎖付加を伴う転写終結に機能している PAPOLA (PAP A) や PAPOLG (PAP G)のような canonical poly(A) polymerase (PAP)に対して non-canonical

PAP と呼ばれ、その付与する poly(A)⁺ 鎖は、canonical PAP の付与する poly(A)⁺ 鎖に比べて比較的短く、また付与される塩基にはアデニンだけでなくグアニンも含まれることが知られている(53–58)。

ヒト核質内では、PROMoter upstream Transcripts/upstream antisense RNAs (PROMPTs/uaRNAs)、エンハンサー配列由来の双方向エンハンサーRNA (eRNAs)、イントロンにコードされた snoRNA など、保護されていない 3'末端を持つ RNA の分解に、NEXT 複合体を伴ったエキソソームが機能している(46, 59–63)。NEXT 複合体は、Zinc フィンガータンパク質 ZCCHC8 と、ポリピリミジンに親和性を持つ RNA 結合モチーフタンパク質 7 (RBM7)を構成因子として含み、転写後間もない標的 RNA に結合してエキソソームによる分解へと導く[(46, 61), 図 2]。一方、3'末端のプロセッシングを終え、canonical PAP によって poly(A)⁺ 鎖を付加された RNA は、Zinc フィンガータンパク質である ZFC3H1 と poly(A)⁺ 鎖に親和性のある PABPN1 を含む PAXT 複合体に結合したエキソソームによって分解される[(47, 64–68), 図 2]。PROMPT や eRNA または variant snRNA のうち poly(A)⁺ tail を持つもの、Premature Cleavage and Polyadenylation/Intronic Polyadenylation (PCPA/IPA)の産物、pre-mRNA のサブセット、snoRNA ホスト遺伝子 (SNHG)由来の転写物などの比較的長い noncoding RNA が、PAXT 複合体依存的に分解される基質として特定されている(65–77)。これらの基質はエキソソームの阻害により安定化されると、エキソソーム非感受性の poly(A)⁺ RNA よりも長い poly(A)⁺ 鎖を有するようになることが観察されている(66)。また PAXT 複合体は、基質の分解を促進するだけではなく、基質分子を核内に繫留することによっても標的の効率的なサイレンシングに寄与することが知られている(78, 79)。このように、NEXT 複合体と PAXT 複合体の標的となる転写物に見られる特徴は大きく異なっているにも拘らず、一つの転写物が必ずしも単一の補因子に感受性を示すとは限らない。例えば数多くの PROMPT 分子について、NEXT による認識を迂回した場合は、post-transcriptional に転写物配列内に存在する PAS が利用されて poly(A)⁺ 鎖を獲得し、その後 PAXT 複合体に認識されて分解されることが示されている(80)。このような分解経路の複雑さを反映してか、核エキソソームの基質として同定された転写物には、補因子への感受性が曖昧なものも多い(81, 82)。

上記の TRAMP、NEXT、PAXT 複合体の核内補因子の間に共通して見られる成分であり、核内エキソソームの広汎な機能に必須の因子として RNA ヘリカーゼである MTR4 が知られている[(46, 47, 49, 83, 84), 図 2, 図 3]。一本鎖 RNA は部分的な RNA/RNA ハイブリッドなどの高次構造をとりやすいため、MTR4 の RNA ヘリカーゼ活性はこうした構造をほどこいてエキソソームによる効率的な RNA 分解を支持してい

る。MTR4 は RNA の 5'末端にある Cap Binding Complex (CBC)に結合して RNA をエキソソームによる分解へと導く(75)。mRNA 上では、この結合は mRNA プロセッシング因子である ALY/REF と競合しており、この競合の結果で転写物が成熟するか分解されるかが決定される[(82, 85–87), 図 3]。核スペckルに局在する NRDE2 は、MTR4 との結合を介して MTR4 の CBC およびエキソソームとの相互作用を阻害することが報告されている(88)。このため NRDE2 の濃縮された核スペckルはエキソソームの活性が抑制された、mRNA の成熟ステップの完了に重要な領域と考えられている。またエキソソーム補因子の間にも MTR4 との結合において競合関係が示唆されており(89–91)、MTR4 の形成する補因子複合体の比率によってエキソソームの基質特異性が制御される可能性もある。

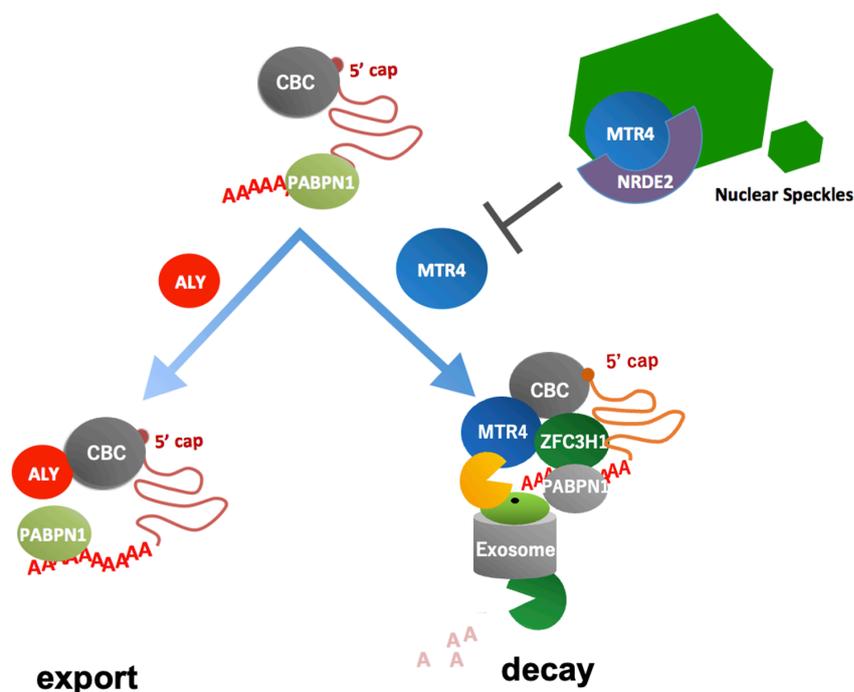


図 3. RNA の運命を決定する MTR4 の競合的複合体形成

MTR4 エキソソーム複合体と Cap Binding Complex(CBC)との結合は mRNA 成熟因子である ALY/REF と競合する。NRDE2 は MTR4 と結合することで、MTR4 と CBC およびエキソソームとの結合を阻害する。NRDE2 は核スペckルに局在しており、このためスペckルはエキソソーム活性については抑制的な領域と考えられる。

最近の *in vitro* 再構成系からの詳細な構造解析により、MTR4 がコアの上部、すなわちエキソソームの S1/KH ドメイン側に動員される分子機構が明らかになりつつある(図 4)。S1/KH キャップ上部に位置する RRP6 の N 末端 PMC2NT ドメインは、補因子の一つである C1D と結合して MTR4 の N 末端への結合面を提示している[(92, 93), 図 4]。さらに、別の補因子である MPP6 (別名 MHOPSPH6) は、内部領域でコアの

S1/KH ドメインと相互作用し、N 末端領域で MTR4 の RecA ドメインと結合する[(94–97)。*In vitro* での再構成実験において、RRP6 あるいは MPP6 を介してコアに結合している MTR4 はいずれも、コアを挟んで反対側、すなわちコアの下部 PH ドメインに配置している DIS3 による RNA 分解を支持できることが観察されている(94–97)。

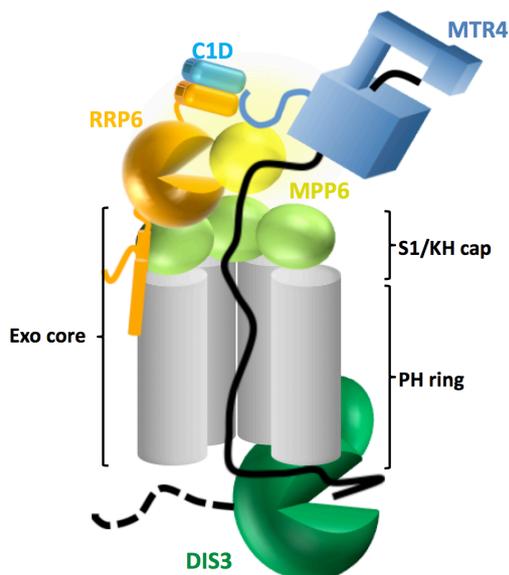


図 4. ヒト核内におけるエキソソームコアと核内補因子の結合様式

コア構造の断面図を示す。RRP6 と MTR4 はコアの上部 S1/KH キャップ側に位置する。DIS3 はコアを挟んで RRP6 および MTR4 とは反対側に配位している。RRP6 は C 末端領域でコアに巻きつく形で結合し、N 末端領域で補因子 C1D と結合することで MTR4 との結合面を形成している。*In vitro* での解析結果から、MPP6 は S1/KH キャップにその内部領域で結合し、同時に N 末端領域で MTR4 に結合している。また、MPP6 と RRP6 によってリクルートされる MTR4 のいずれもがチャネル構造を介した DIS3 による基質分解を支持できることが観察されている。

このように、MPP6 と RRP6 が MTR4 とコア間の結合を支持することは *in vitro* での精力的な再構成解析により明らかにされつつある一方、両者の支持する MTR4-コア間結合が実際の細胞内においてエキソソーム機能にどの様に寄与しているかについての知見は限られている。特に MPP6 のエキソソームに関連した機能については、rRNA のプロセッシングに必須であることがヒト細胞を用いた解析で最初に報告された後、出芽酵母でいくつかの報告があるのみである(33, 92, 98–100)。これら出芽酵母での報告内では Mpp6p は広い範囲の核内基質 RNA の分解に関与することが示されており、*mpp6Δ*が *rrp6Δ*または *rrp47Δ* (*Rrp47p* は C1D の出芽酵母ホモログであり、*Rrp6p* と相互依存的に発現する)と合成致死性を示すことから、Mpp6p と Rrp6p の間に機能的な重複の存在が示唆されている(92, 98–100)。しかし Rrp6p は Mtr4p とコアの橋渡し分子であると同時にヌクレアーゼでもあるため、観察された *rrp6Δ*と *mpp6Δ* 間の合成致死性が、Rrp6p と Mpp6p による Mtr4p とコア間の結合を支持する能力それぞれをどの程度反映しているかは不明である。このように実際の細胞内、特にヒト細胞において MPP6 が標的とする基質の範囲やその基質特異性の決定要因、および MPP6 が介在する MTR4 コア複合体の機能的な重要性についての知見はこれまでのところ極めて限られていた。

本解析内で扱った核内エキソソームの関連因子について表 1 に示す。本論文では、ヒト核内において MPP6 が MTR4 をエキソソームコアに適切に配位することにより、RRP6 と DIS3 それぞれのヌクレアーゼによる poly(A)⁺ RNA 基質分解を促進していることを明らかにした。さらに MPP6 はエキソソームの基質分解に広汎に寄与するというよりは、特定の特徴を持つ限られた基質サブセットの分解に特化しており、コアへとリクルートされる MTR4 補因子複合体の種類を MPP6 が規定している可能性を示唆した。本研究の結果は、エキソソームコアへの MTR4 の動員様式がエキソソーム複合体の基質特異性に影響するという、エキソソーム活性の調節メカニズムにおける新たな視点を与えるものである。

表 1. 本解析で扱った核内エキソソーム関連因子

因子	説明	エキソソーム複合体内の位置	局在	エキソソームに関連した機能、補因子による代表的な基質分解
RRP45	エキソソームコア構成因子	PH-like ring コアの下側のリングを形成	細胞質/核質/核小体	ヌクレアーゼ活性なし、チャンネル構造を形成、ヌクレアーゼと補因子結合の足場
RRP41				
RRP46				
RRP43				
RRP42		S1/KH cap コアの上側のリングを形成		
MTR3				
RRP4				
RRP40				
CSL4				
DIS3	エンドヌクレアーゼ/ processive型3'-5'エキソヌクレアーゼ	コアの下部	核質	核質におけるエキソソーム基質分解
RRP6	distributive型 3'-5'エキソヌクレアーゼ	コアの上部	核小体/核質	核小体におけるエキソソーム基質分解、C末端でコアに巻きつくと同時にN末端でC1Dと結合してMTR4との結合面を形成
C1D	核特異的補因子	コアの上部	核小体/核質	RRP6のN末端領域と結合、MTR4との結合面を形成 酵母におけるホモログはRRP47
MPP6	核特異的補因子	コアの上部	核小体/核質	MTR4とコアに同時に結合することで両者の結合を支持、MTR4との結合についてZCCHC8と競合関係の可能性
MTR4	PAXT/NEXT/TRAMP複合体構成因子	コアの上部	核小体/核質	RNAヘリカーゼ、高次構造をもったRNAをほどこいて分解を促進
ZFC3H1	PAXT構成因子	コアの上部	核質	3'末端にpoly(A) ⁺ 鎖を持つ基質の分解および核内繫留[poly(A) ⁺ 鎖を持つPROMPTや <i>vU1snRNA</i> , <i>SNHG</i> などのnoncoding RNA, pre-mRNAの分解]
PABPN1				
ZCCHC8	NEXT複合体構成因子	コアの上部	核質	比較的転写後間もない3'末端の保護されていない基質の分解[poly(A) ⁺ 鎖をもたないPROMPTやeRNAの分解, snRNAの3'末端プロセッシング]、ZCCHC8はMTR4との結合についてMPP6と競合関係の可能性
RBM7				
ZCCHC7	TRAMP複合体構成因子	コアの上部	核小体	核小体における基質分解、基質にはPAPD5によって短いアデニン鎖が付与されながら分解される(rRNAプロセッシングやhTRの分解)
PAPD5				
PAP A	canonical poly(A) polymerase	コアとの結合の報告はなし	核質	PAXT補因子の基質へのpoly(A) ⁺ 鎖付与
PAP G				

結果

第1節 MPP6はRRP6とDIS3によるMTR4感受性poly(A)⁺ RNA基質サブセットの分解を促進する

1.1 ヒト核内エキソソームの阻害によって安定化したpoly(A)⁺ RNA基質は未知の核内ドメインに顕著な凝集体を形成する

私の所属していたグループでは以前より、ヒト細胞においてエキソソームのコア因子をロックダウン(KD)すると顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が起こることを見出していた(79, 81, 101)。この表現型が核特異的なエキソソームの機能不全の特徴であるかどうかを明らかにするために、U2OS 細胞株をモデルとして、エキソソームコアのいくつかの成分と核に特異的なエキソソーム補因子、および細胞質特異的補因子を KD し、各条件における poly(A)⁺ RNA の細胞内局在を解析した (図 5 A-C)。Poly(A)⁺ RNA の局在は、5' 末端を蛍光標識したオリゴ dT₄₅ プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)により可視化した(図 5 B,C)。コントロール KD 細胞では、poly(A)⁺ RNA は主に細胞質に分布し、核内では弱いスペckル状の局在を示した。一方、エキソソームコアの構成要素である RRP45、RRP41、RRP4 それぞれの KD 時には、poly(A)⁺ RNA は核内に点状の凝集体として顕著に蓄積した(図 5 B-D)。核内エキソソームに特異的に結合するヌクレアーゼである RRP6 または DIS3 を単独で KD しても poly(A)⁺ RNA の細胞内局在に顕著な変化は観察されなかったが、RRP6 と DIS3 を同時に KD した場合(RRP6/DIS3 KD)には、核内に顕著な poly(A)⁺ RNA の凝集体が出現した。一方、細胞質のエキソソームに付随する、あるいは結合能のないヌクレアーゼである DIS3L1 と DIS3L2 のそれぞれを単独または RRP6 と同時に KD しても、poly(A)⁺ RNA の顕著な蓄積は見られなかった(図 6 A,B)。また、核エキソソームに特異的な補因子である MTR4 を KD すると顕著な poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型が観察される一方、細胞質エキソソームの特異的補因子である SKI2、SKI3、SKI8 を KD してもこのような表現型は惹起されなかった(図 5 B,C, 図 6 C,D)。これらのデータは、核特異的エキソソームの阻害によって poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型が生じることを示唆している。外因性に発現させた RNAi 耐性変異体を用いたレスキュー実験および異なる siRNA 配列を用いた KD 実験により、この poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型が各因子の特異的な KD に由来することを確認した(図 6 E-K)。

エキソソーム因子の KD によって誘導される poly(A)⁺ RNA 凝集体は、MTR4 KD 由来の poly(A)⁺ RNA 凝集体を例外として、核スペckル、核小体、パラスペckル、Cajal body、PML body といった既知の核内非膜性構造体とは異なる領域

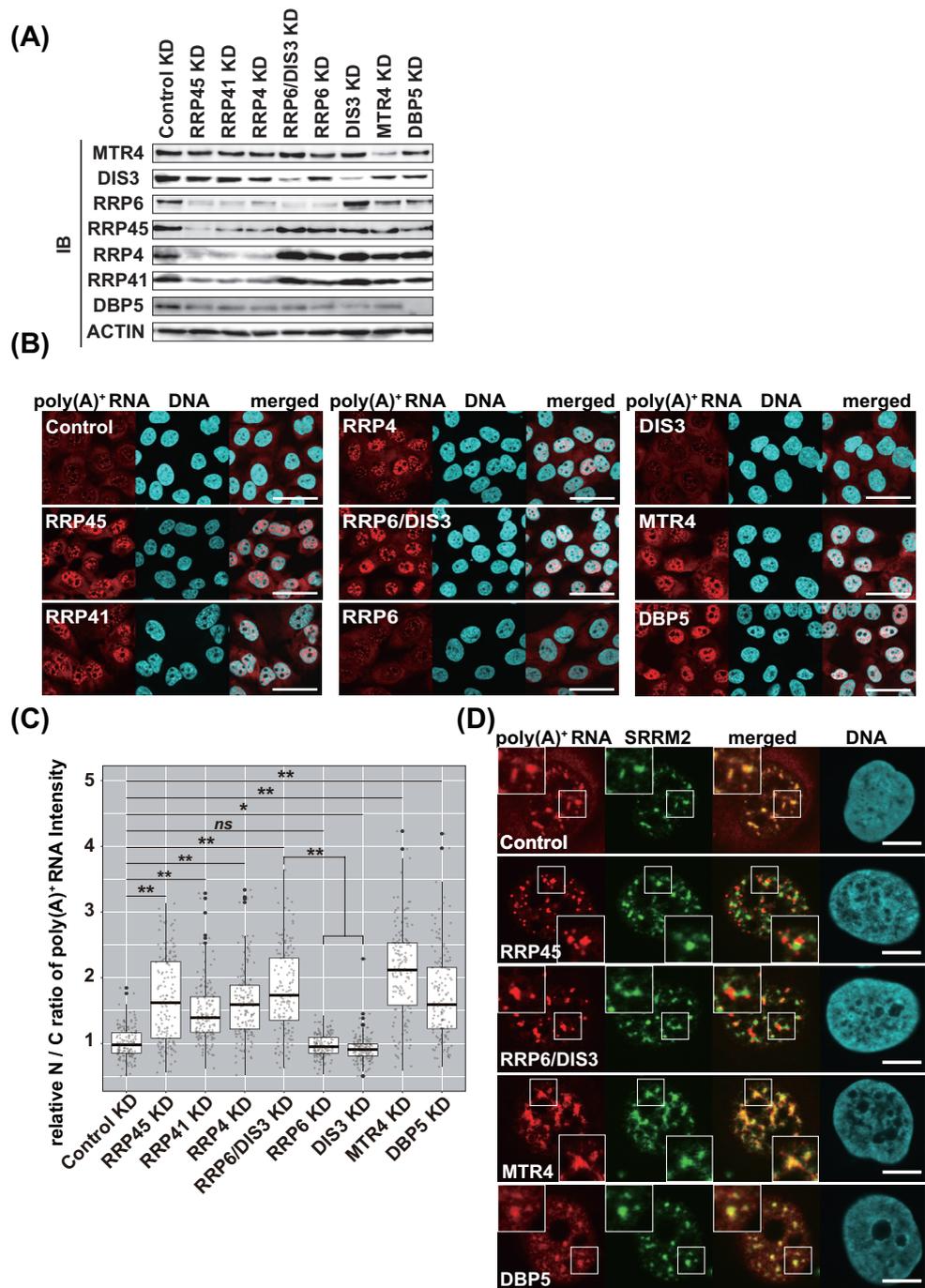


図 5. ヒト核内エキソソーム阻害条件における poly(A)+ RNA 核内蓄積の様子

(A)-(C) U2OS 細胞において、核内エキソソーム阻害により顕著な poly(A)+ RNA 核内蓄積が誘発される。(D) U2OS 細胞における poly(A)+ RNA 凝集体の核内局在。(A)核抽出物のイムノブロット解析により、各エキソソーム構成因子の特異的な KD を確認した。導入した siRNA および使用した抗体はパネル上部と左部にそれぞれ示した。(B) poly(A)+ RNA の細胞内局在を FISH 法により可視化した。KD した因子はパネル内部に示した。Scale bar = 50 μm 。(C) (B) の実験から得られた FISH シグナル強度の核/細胞質 (N/C) 比の定量化。Control KD の平均値で正規化した相対的な値を示した。統計解析は Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel-Dwass test を用いて行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns : not significant, $n = 100$ 。(D) U2OS 細胞において免疫染色と poly(A)+ RNA FISH により、核スペckルのマーカである SRRM2 と poly(A)+ RNA を同時に可視化した。KD した因子はパネル内に示した。一部拡大したものを挿入図に示した。Scale bar = 10 μm 。

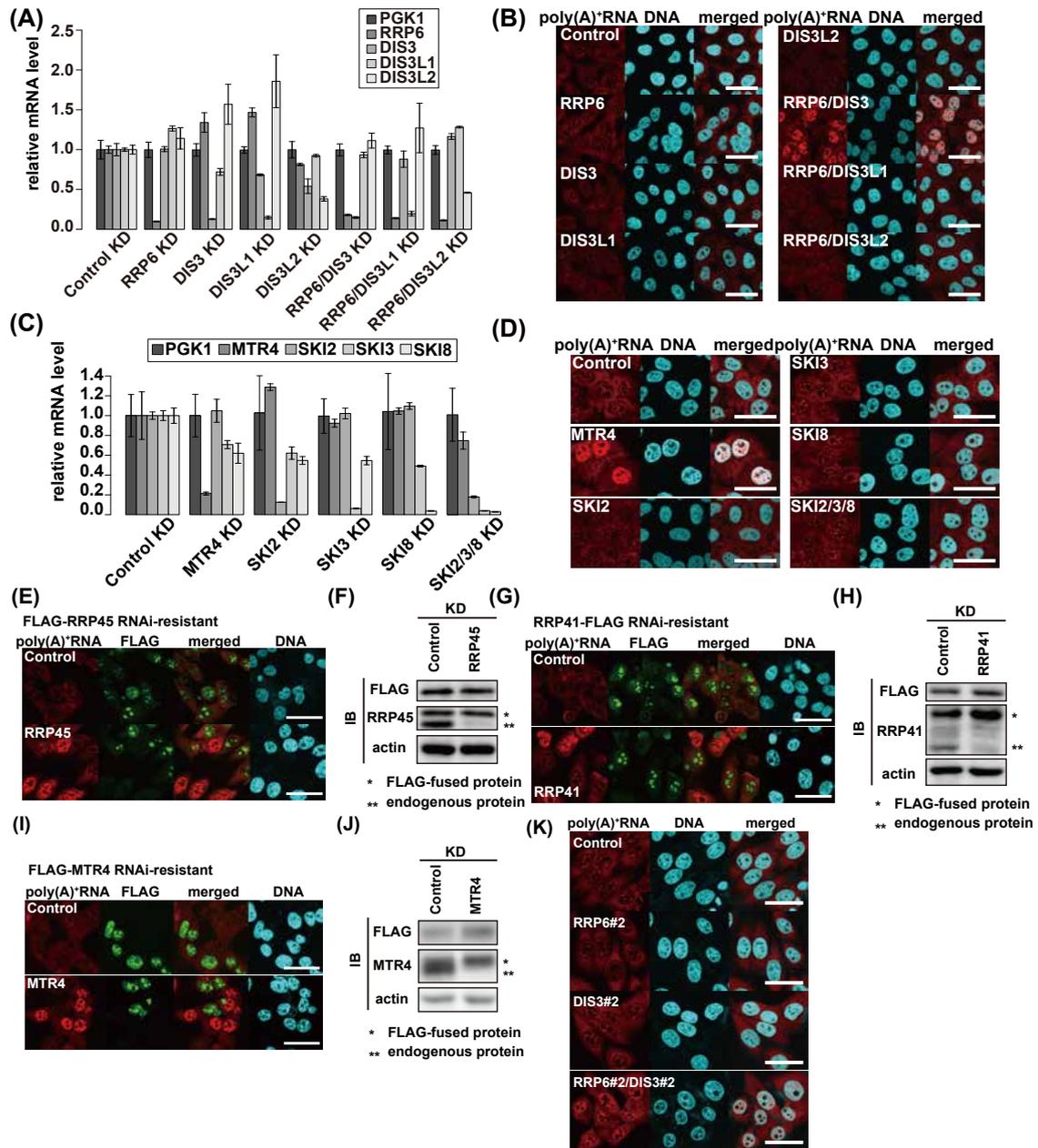


図 6. ヒト核/細胞質エキソソーム阻害が poly(A)+ RNA 細胞内局在に与える影響

(A)-(D) U2OS 細胞で細胞質エキソソームを阻害しても顕著な poly(A)+ RNA 核内蓄積はみられない。(E)-(K) 外因性に発現させた RNAi 耐性変異体を用いたレスキュー実験、および図 5 で用いたものとは異なる siRNA を用いた RRP6 および DIS3 の KD 実験。(A),(C) RT-qPCR によりパネル下部に示した因子の特異的な KD を確認した。qPCR は whole cell より抽出した total RNA から random9 をプライマーに用いて合成した cDNA に対して行った。挿入図に記載の通りに棒グラフを転写物ごとに色分けした。PGK1 および Control KD サンプルの値を用いて正規化した各転写物の相対量を示す。n = 3。(B),(D),(K) poly(A)+ RNA FISH 実験。KD した因子はパネル内に表示する。Scale bar = 50 μm。(E),(G),(I) U2OS 細胞における内在性(E) RRP45, (G) MTR4, (I) RRP41 の KD による poly(A)+ RNA の核内蓄積は、各因子の FLAG タグ付き RNAi 耐性変異体を一過性に発現することで回復した。KD した因子はパネル内部に示す。発現させたタンパク質は FLAG 染色により可視化した。Scale bar = 50 μm。

に局在していた(図 7 A, 図 5 D, 第 1 節 1.2 で後述)。一方、mRNA の核外輸送に必須の因子である DBP5 を KD した細胞では mRNA 核外輸送の阻害に由来すると考えられる顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が観察されたが、その局在は核スペckルに濃縮して観察された[(102), 図 5 D]。また、細胞で一過性に発現させた β グロビン mRNA レポーターの細胞質への輸送を RNA-FISH により特異的プローブを用いて評価したところ、エキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が顕著に見られる細胞においてもコントロール細胞と同様にレポーター mRNA は細胞質へと効率よく輸送される様子が観察された(図 7 B)。一方 DBP5 KD 細胞では、発現させたレポーター mRNA はバルク poly(A)⁺ RNA と同様に核内に蓄積した(図 7 B)。これらの結果から、エキソソーム KD 条件で観察された poly(A)⁺ RNA の核内蓄積は mRNA の輸送障害によるものではなく、エキソソームによって通常分解されるべき poly(A)⁺ RNA 基質が安定化して顕在化したものであると考えられた。また、poly(A)⁺ RNA 核内蓄積は RRP6 と DIS3 の単独 KD では観察されず、同時 KD でのみ顕著に誘発されたことから(図 5 A-C)、RRP6 と DIS3 の 2 つのヌクレアーゼはこれら基質を冗長的に分解していると示唆された。本実験内でエキソソームコア因子を KD した際、他のコア因子や RRP6 の co-depletion も観察された(図 5 A)。コア KD 時には、タンパク質量の減少する RRP6 のみならず、タンパク質量には変化のみられない DIS3 についても足場となるコア構造の消失に伴って基質分解に機能できなくなるため、エキソソームの機能は完全に阻害されて顕著な表現型に至ると考えられる。

続いて核内エキソソーム阻害時に安定化する基質が持つ poly(A)⁺ 鎖の由来について調査した。核内のエキソソーム基質で最も豊富に存在するのは rRNA と考えられ、rRNA のプロセッシング過程においては TRAMP 複合体がエキソソームに付随して機能する(図 2)。TRAMP 複体内の non-canonical PAP である PAPD5 (TRF4-2) を KD してもエキソソーム阻害によって引き起こされる poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積に減弱は認められなかった(図 8 A,B)。一方、canonical PAP である PAPOLA(PAP A) と PAPOLG(PAP G) を同時に KD すると、エキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積は解消された(図 8 A,B)。この結果から、核内エキソソーム阻害時に安定化する基質への poly(A)⁺ 鎖付与は canonical PAP によって行われると示唆された。また、PAP A と PAP G の単独 KD はエキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA の核内蓄積表現型を回復しなかったことから、これら 2 つの PAP は基質への poly(A)⁺ 鎖付与に重複して機能すると考えられた(図 8 C-E)。このように canonical PAP によって poly(A)⁺ 鎖が付与されており、また核小体ではエキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA 蓄積は観察されないことから(図 7 A)、これらの poly(A)⁺ RNA 基質は RNA polymerase II (pol

II)によって転写された分子と考えられた。

以上の結果から、ヒト核質内において RRP6 と DIS3 が重複して分解に機能する poly(A)⁺ RNA 基質サブセットが存在しており、エキソソームの機能阻害時には安定化したこれらの基質 RNA が核内の未知の領域に凝集体を形成することが明らかとなった。

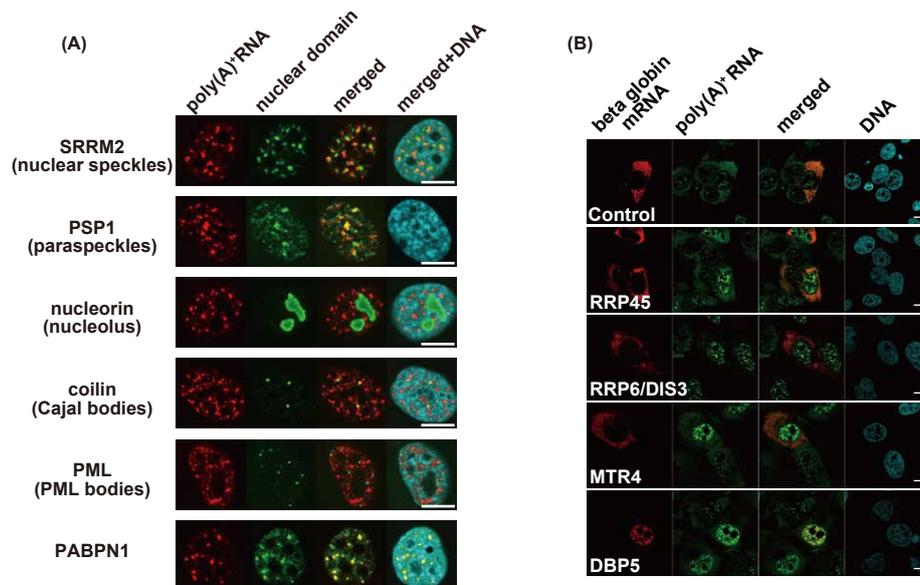


図 7. 核内エキソソーム阻害由来 poly(A)⁺ RNA 蓄積箇所と mRNA 核外輸送への影響

(A) RRP6/DIS3 KD U2OS 細胞における poly(A)⁺ RNA 核内凝集体の局在。既知の核内非膜性構造体と poly(A)⁺ RNA とを同時に可視化した。免疫染色に用いた各構造体のマーカータンパク質とマーカーで可視化した構造体をパネルの左部に示す。Scale bar = 10 μ m。(B) 一過性発現させた β グロビン mRNA の核外輸送に対するエキソソーム構成因子 KD の影響。 β グロビン mRNA は Alexa594 で標識した特異的プローブで、poly(A)⁺ RNA は Alexa488 で標識した dT₄₅ プローブでそれぞれ可視化した。KD した因子は各パネル内に記載した。Scale bar = 10 μ m。

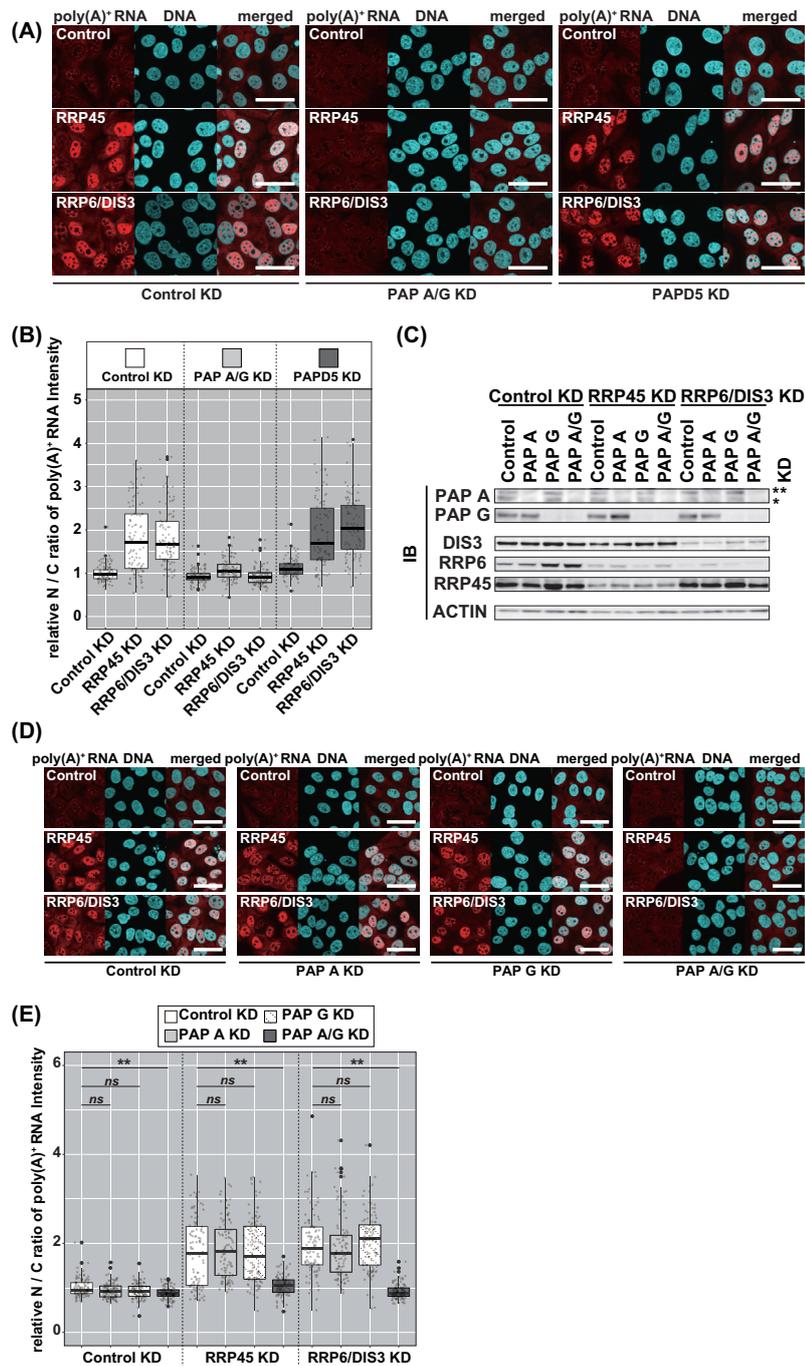


図 8. 核内エキソソーム阻害時に安定化する poly(A)⁺ RNA 基質への poly(A)⁺ 鎖付与活性

(A)-(E) 核内エキソソーム阻害に由来する poly(A)⁺ RNA へのアデニン付与は PAP A と PAP G によって重複して行われる。(A),(D) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。KD したエキソソーム構成因子をパネル内部に、KD した PAP をパネル下部に記す。Scale bar = 50 μm。(B),(E) (A),(D) で得られた poly(A)⁺ RNA FISH シグナル強度の核/細胞質 (N/C) 比の定量化。KD したエキソソーム構成因子をパネル下部に、KD した PAP は挿入図の通りに box を色分けした。いずれのエキソソーム構成因子も PAP も KD していない Control サンプル(Control KD/Control KD)の平均値で正規化した相対値を示した。統計解析には Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel-Dwass test を用いて行った。***p* < 0.01, ns: not significant, *n* = 100。(C) 核抽出物のイムノブロット解析により各因子の特異的 KD を確認した。KD した因子はパネル上に示す。アスタリスク(*)は非リン酸化 PAP A 由来のシグナルを示し、ダブルアスタリスク(**)はリン酸化 PAP A 由来のシグナルを示す。

1.2 ヒト核内エキソソーム阻害由来 poly(A)⁺ RNA 凝集体は MTR4 感受性の基質から成る

上記の U2OS 細胞を用いた解析では MTR4 KD 時に顕著な poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積が観察されたが、ヒト細胞における MTR4 KD 由来の表現型についてはこれまでに 2 つのグループからそれぞれ異なる表現型が報告されている(79, 81)。一方の報告では、本解析の結果と同様に poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が顕著であるのに対し、他方では poly(A)⁺ RNA 核内蓄積は観察されていない。後者の表現型を生じるメカニズムについては、PAXT 複合体の構成因子である MTR4 を KD することにより基質を核内に繫留する PAXT の機能が破綻し、安定化した基質 poly(A)⁺ RNA が細胞質に漏出するためと説明されている(図 2, 78, 79)。MTR4 KD がこのような異なる表現型を生じる原因をより深く理解するため、HeLa、U2OS、A549 および MCF7 といった複数の細胞株に対する MTR4 KD の効果を調べることにした。各細胞株における MTR4 KD の効率をイムノブロッティングにより確認した(図 9 A)。RRP6/DIS3 KD は実験したすべての細胞株において顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積を引き起こしたが、MTR4 KD 時の poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型は HeLa および A549 細胞に比べて U2OS および MCF7 細胞でより顕著であった(図 9 B,C)。また、観察された MTR4 KD 由来の poly(A)⁺ RNA 核内蓄積は、RRP6/DIS3 KD で誘発された poly(A)⁺ RNA foci とは異なり、核スペckルと共局在する傾向が見られた(図 5 D)。

これと相似の poly(A)⁺ RNA の核スペckルへの局在は、U2OS 細胞において PAXT 複合体の構成因子である ZFC3H1 または PABPN1 それぞれをエキソソームコア因子 RRP45 と同時に KD した際にも観察された(図 10 A-D)。ZFC3H1 および PABPN1 の KD 効率は、PAXT 複合体の代表的な標的分子である *SNHG19 spliced* 転写物の安定化により確認した(図 10 E-G)。ZFC3H1 あるいは PABPN1 をそれぞれ単独で KD した際に観察される poly(A)⁺ RNA 蓄積は微弱であることから(図 10 C)、RRP45/PABPN1 KD および RRP45/ZFC3H1 KD によって核スペckルに局在する形で顕著に蓄積した poly(A)⁺ RNA の多くは RRP45 KD によって安定化したものと考えられる。すなわち、RRP45 単独 KD 時には未知の核内ドメインに foci 状に繫留されていた poly(A)⁺ RNA 基質が PAXT 因子の同時 KD によって局在を変え、核スペckルに集積するようになったと考えられる。

これらの結果から PAXT 因子の KD 条件では、顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積表現型を呈さない HeLa や A549 細胞だけでなく、試験したすべての細胞株において基質 poly(A)⁺ RNA を未知の核内ドメインに繫留するシステムは破綻していると考えられた。しかしその一方で、U2OS や MCF7 などの特定の細胞株では安定化した

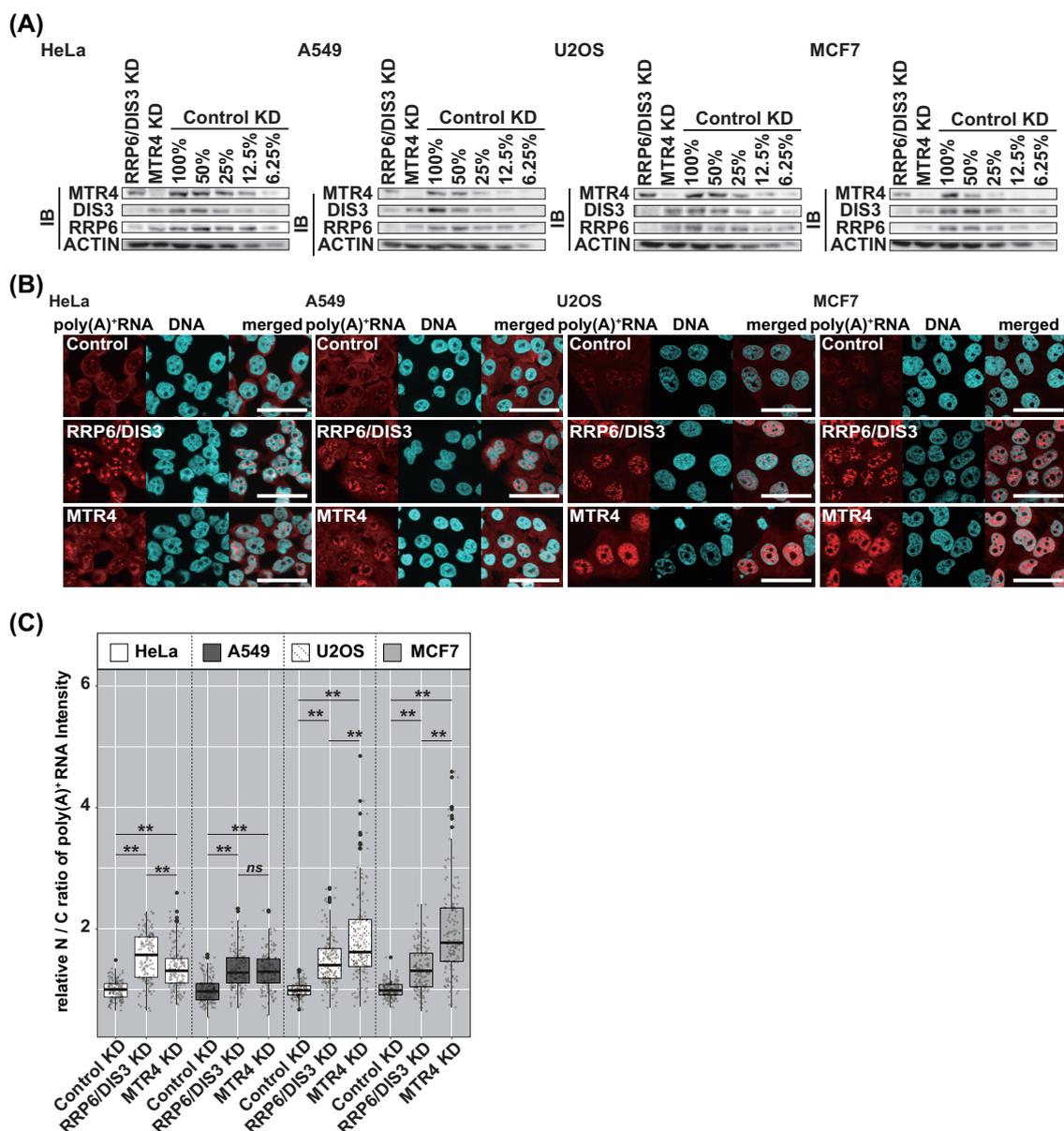


図 9. MTR4 KD が poly(A)⁺ RNA 細胞内局在に与える影響は細胞株によって異なる

(A)-(C) HeLa, A549, U2OS, MCF7 の各細胞株における poly(A)⁺ RNA 細胞内局在に対する MTR4 KD の効果。(A) 核抽出物のイムノプロット解析によりパネル上部に示した因子の特異的な KD を確認した。KD の効率を評価できるように、Control KD サンプルについては核抽出物をパネル上部に示した割合 (RRP6/DIS3 KD サンプルおよび MTR4 KD サンプル比) でも解析した。検出したタンパク質はパネル左部に記す。(B) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。細胞株、KD した因子は、パネルの上部と内部にそれぞれに記載した。Scale bar = 50 μm。(C) (B) の定量化。poly(A)⁺ RNA FISH シグナル強度の核/細胞質 (N/C) 比は各細胞株内の Control KD の平均値で正規化した。統計解析は各細胞株内で Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel-Dwass 検定を用いて行った。** $p < 0.01$, *ns*: not significant, $n = 150$ 。

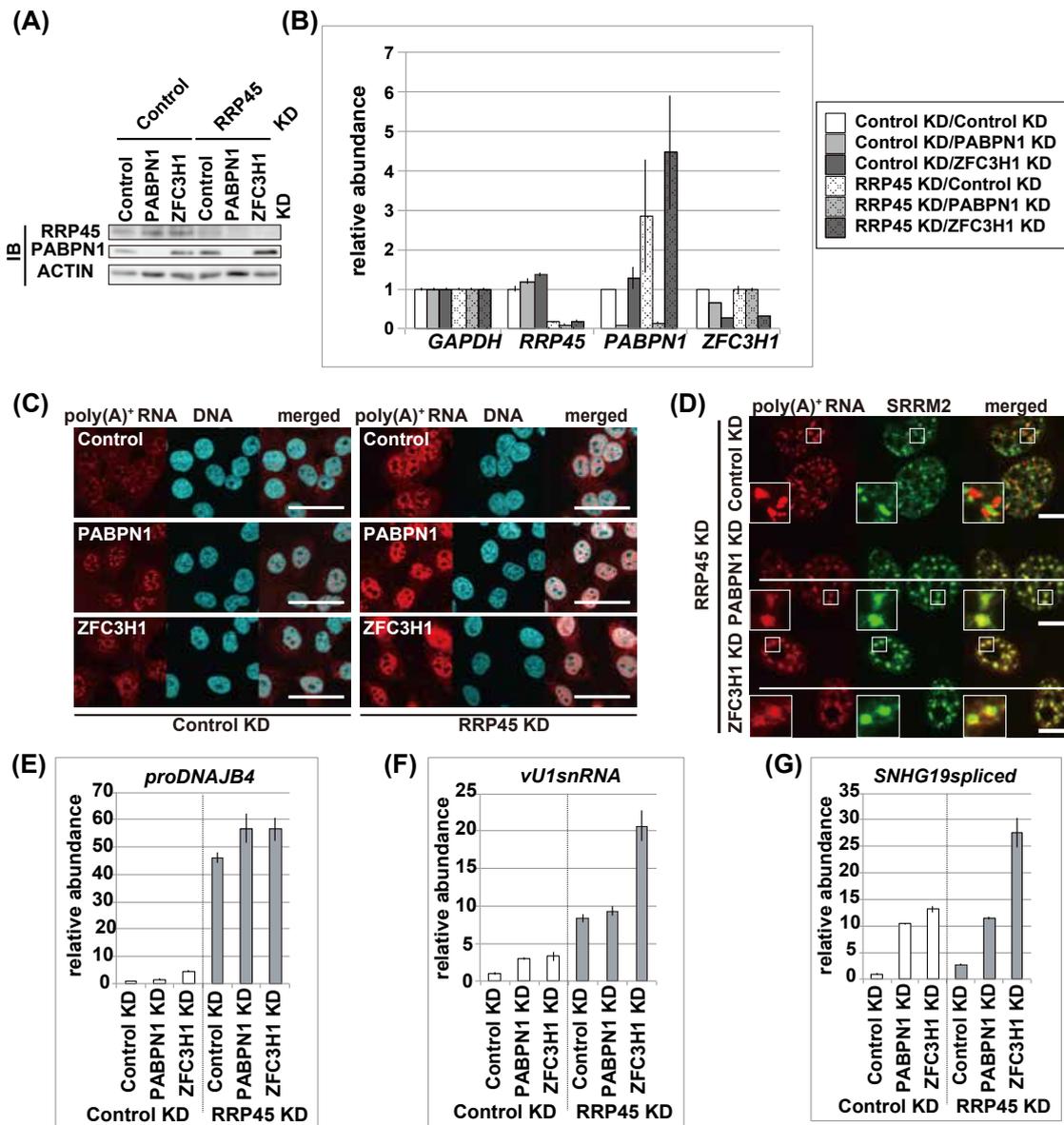


図 10. U2OS 細胞における PAXT 因子 KD のエキソソーム基質分解への影響

(A)-(G) ZFC3H1 KD および PABPN1 KD が poly(A)⁺ RNA 基質の分解および局在に与える影響。(A) イムノプロット解析によるパネル上部に示した因子の特異的 KD の確認。(B) RT-qPCR によるパネル下部に示した因子の特異的 KD の確認。挿入図に記す通り、棒グラフを KD 条件ごとに色分けした。*GAPDH* および Control KD/Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示す。棒グラフとエラーバーは平均値±SD を表す。 $n = 3$ 。whole cell 由来 total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA に対して qPCR を行った。(C) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。KD した因子はパネル内部と下部に記した。Scale bar = 50 μm。(D) PAXT KD はエキソソーム阻害で安定化した poly(A)⁺ RNA 基質の局在をスペckルへと変化させた。核スペckルマーカーである SRRM2 と poly(A)⁺ RNA を同時に可視化した。KD した因子はパネル左側に記した。一部拡大したものを挿入図に示す。Scale bar = 10 μm。(E)-(G) whole cell より抽出した total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA を用いて RT-qPCR を行い、(H) *proDNAJB4*, (I) *vU1snRNA*, (J) *SNHG19 spliced* の定量を行った。KD した因子は下部に記載した。*GAPDH* および Control KD/Control KD サンプルの値を用いて正規化した各転写物の相対量を示す。 $n = 3$ 。

poly(A)⁺ RNA 基質のかなりの部分が依然として核内に保持されていることが示唆された。U2OS や MCF7 では、別の厳しい核内繫留システムの存在やこれら基質に対する核外輸送効率の低さが予想されるが、その正確なメカニズムを明らかにするにはさらなる解析が必要である。

このように MTR4 KD で引き起こされる表現型は細胞株によって異なる一方、いくつかのデータは MTR4 がエキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA foci に含まれるエキソソーム基質の分解に関与することを支持している。*proDNAJB4*、*vU1snRNA*、*SNHG19 spliced* は、エキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA foci に検出される基質として報告されている(79)。これらの基質について、顕著なバルク poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型を示さない MTR4 KD 条件の HeLa 細胞においても RRP6/DIS3 KD 時と同様に大きな安定化が観察された(図 11 A-C)。さらにエキソソームコアである RRP45 KD 細胞において poly(A)⁺ RNA foci への MTR4 の集積が観察されたのに対し、DBP5 KD による mRNA 核外輸送の阻害に起因する poly(A)⁺ RNA 凝集体では観察されなかった(図 11 D)。また、ヘリカーゼ活性を持たない MTR4 の変異体である Q144A を過剰発現させると、poly(A)⁺ RNA foci を形成するドミナントネガティブ表現型が誘発され、この foci には Q144A の集積が観察された(図 11 E-G)。この Q144A 発現に由来する poly(A)⁺ RNA foci の局在は核スペckルとは一致せず(図 11 F)、また foci 内に含まれる poly(A)⁺ RNA への poly(A)⁺ 鎖付与は PAPA と PAPG の canonical PAP によって重複して行われることが明らかとなった(図 11 I,J)。このようなエキソソーム阻害由来 poly(A)⁺ RNA foci の性状との類似性から、Q144A 発現で生じる poly(A)⁺ RNA foci についてもエキソソームの機能低下により安定化した poly(A)⁺ RNA 基質に由来すると考えられる。このように MTR4 KD によって惹起される poly(A)⁺ RNA 核内蓄積の程度は細胞株間で異なるものの、エキソソーム阻害時に凝集体として顕在化する poly(A)⁺ RNA 基質のうち、少なくとも一部は MTR4 依存的に分解されていると考えられる。

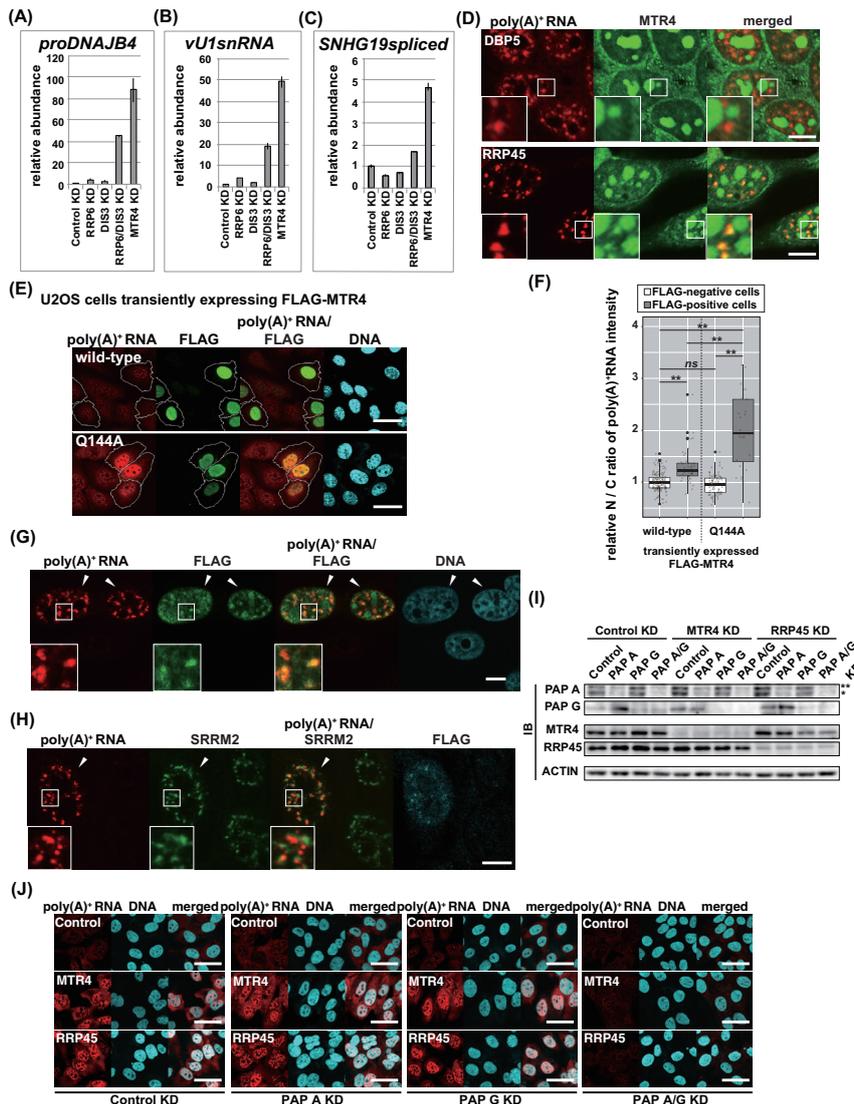


図 11. エキソソーム阻害で poly(A)⁺ RNA 凝集体として顕在化する基質の MTR4 感受性

(A)-(C) HeLa 細胞における MTR4 KD 条件での poly(A)⁺ RNA 基質の安定化。(D)エキソソーム阻害に由来する poly(A)⁺ RNA foci への MTR4 の集積。(E)-(H) MTR4 のヘリカーゼ活性欠失変異体である Q144A を一過性に発現させた U2OS 細胞における poly(A)⁺ RNA foci の性状。(I),(J) MTR4 感受性をもつ poly(A)⁺ RNA 基質への PAP A/G による poly(A)⁺ 鎖付与。(A)-(C)Whole cell 由来 total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA に対して(A)*proDNAJB4*, (B)*vU1snRNA*, (C) *SHNG19 spliced* の qPCR を実施した。*GAPDH* および Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示す。n = 3。(D) U2OS 細胞を用い、MTR4 は免疫染色により poly(A)⁺ RNA と同時に可視化した。KD した因子はパネル内部に記す。一部の拡大を挿入図に示した。Scale bar = 10 μm。(E) poly(A)⁺ RNA の細胞内局在。用いた細胞株と発現タンパク質はパネルの上部と内部それぞれに記載した。一過性に発現した FLAG-MTR4 を FLAG 染色で可視化し、細胞を「FLAG-positive」と「FLAG-negative」のいずれかに分類した。白線は「FLAG-positive」細胞の輪郭を示す。Scale bar = 50 μm。(F) (E)の定量化。poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの核/細胞質 (N/C)比は、「FLAG-negative」の野生型 MTR4 発現細胞の平均値で正規化した。統計解析は、Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel-Dwass 検定を用いて行った。**p < 0.01, ns: not significant, FLAG-negative wild-type MTR4; n = 157, FLAG-positive wild-type MTR4; n = 42, FLAG-negative Q144A MTR4; n = 82, FLAG-positive Q144A MTR4; n = 24。(G), (H)一過性に発現した Q144A を poly(A)⁺ RNA と同時に可視化した。(H)では核スペckルマーカーである SRRM2 を免疫染色した。arrowhead は「FLAG-positive」細胞を示す。一部の拡大を挿入図に示した。Scale bar = 10 μm。(I)核抽出物のイムノブロット解析によってパネル上部に示した因子の特異的 KD を確認した。アスタリスク(*)は非リン酸化 PAP A 由来のシグナルを示し、ダブルアスタリスク(**)はリン酸化 PAP A 由来のシグナルを示す。(J) U2OS 細胞において MTR4 KD に由来する poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型は PAP A/G の同時 KD により回復した。KD した因子はパネル内部と下部に記す。Scale bar = 50 μm。

以上から、特定の poly(A)⁺ RNA 基質サブセットは MTR4 のヘリカーゼ活性を經由してコア構造に到達することが予想された。そこで次に、これらの基質が MTR4 でほどかれた後、MTR4 とコアを挟んで反対側に配位している DIS3 に至る経路についても調査を行った。エキソソームの基質が DIS3 に至る経路には、コアの形成するチャンネル構造を介するものとチャンネルを通らずに直接 DIS3 へと至る経路があると示唆されている(103–109)。poly(A)⁺ RNA 基質の分解におけるチャンネル構造の寄与を評価するために、チャンネル構造を閉塞させる RRP41 変異 R62E/A63D/R94E/R95E (4M)を利用した[(17, 104, 105), 図 12 A-F]。

まず、4M 変異型および野生型 RRP41 の C 末端に FLAG を融合させた RNAi 耐性変異体をドキシサイクリン誘導性に発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株を樹立した。4M 変異型 RRP41 がエキソソーム複合体に導入されると中央のチャンネル構造が閉塞し、*in vitro* および *in cellulo* の両方において、チャンネルを介した基質 RNA の DIS3 へのアクセスが阻害される(17, 29, 104, 105)。一方で、基質が RRP6 に到達する際に利用されるチャンネル上部の S1/KH キャップの表面構造は維持されているので、この細胞株でも RRP6 による基質分解は維持されていると予測される(17, 29, 104, 105)。ドキシサイクリン添加により発現を誘導した 4M 変異型 RRP41-FLAG は、野生型 RRP41-FLAG と同様に、主に核小体に濃縮した局在を示し、核質と細胞質にも比較的弱い局在を示した(図 12 A)。また核内エキソソーム複合体にも効率よく取り込まれた(図 12 C,D)。この 4M 変異型 RRP41-FLAG 発現細胞において RRP6 を KD したところ、顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積を生じた(図 12 A,B)。一方、コントロール細胞や野生型 RRP41-FLAG 発現細胞における RRP6 KD 条件では poly(A)⁺ RNA の蓄積は観察されなかった。また RRP41 KD によって生じる核内 poly(A)⁺ RNA 蓄積は、野生型 RRP41-FLAG 発現と同様に 4M 変異型 RRP41-FLAG 発現によっても回復した。これは RRP41 の KD によって減少する RRP6 量が 4M 変異型 RRP41-FLAG の発現で維持されたことに起因すると考えられる(図 12 E,F)。この考えを裏付けるように、RRP6/RRP41 KD 由来の poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型は野生型 RRP41 の発現によって解消できる一方、4M 変異型 RRP41 の発現では回復しなかった(図 12 A,B)。これらのデータから、チャンネルの閉塞している 4M 変異型 RRP41 発現細胞においては RRP6 がこれらの poly(A)⁺ RNA の分解を独占的に担うことが示唆された。つまり、これら基質はチャンネル構造に依存して DIS3 に到達すると考えられた。

以上の結果から、ヒト核内においてエキソソーム阻害時に顕在化する poly(A)⁺ RNA foci は MTR4 感受性の基質を含み、これらの基質は通常の細胞内では MTR4 ヘリカーゼでほどかれながらチャンネルを通して DIS3 に至り分解されることが

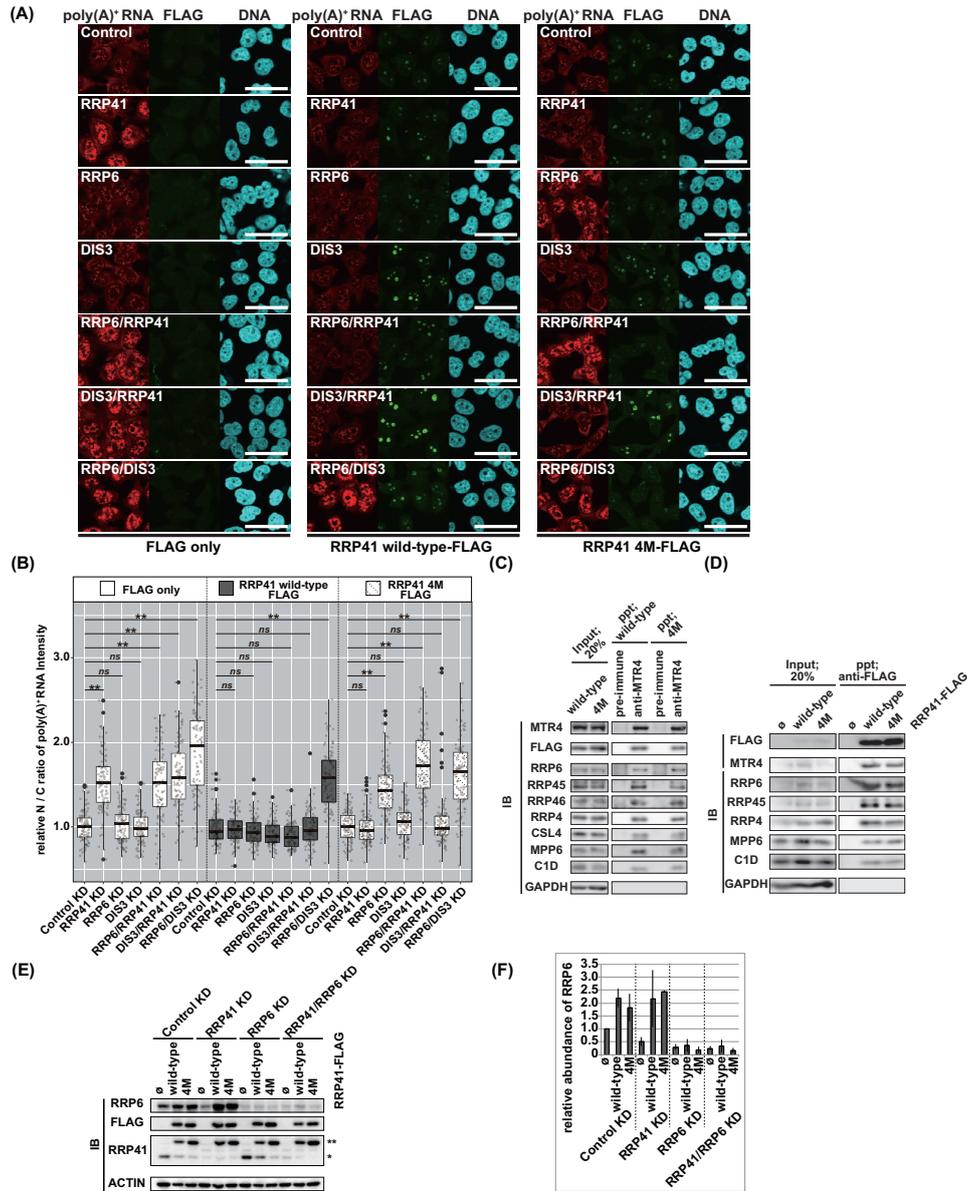


図 12. poly(A)⁺ RNA 基質はチャネル構造を介して DIS3 へと至る

(A),(B)チャネル閉塞 4M 変異型 RRP41-FLAG を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株では RRP6 が poly(A)⁺ RNA 基質の分解を独占的に担う。(C),(D) 発現させた野生型および 4M 変異型 RRP41-FLAG の複合体形成。(E),(F) 4M 変異型 RRP41-FLAG 発現による RRP41 KD 条件での RRP6 発現量の維持。(A) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。発現させた RRP41-FLAG は poly(A)⁺ RNA と同時に FLAG 染色で可視化した。KD した因子と発現させた RRP41-FLAG の種類はパネル内部および下部にそれぞれ示した。Scale bar = 50 μm。(B) (A)の実験から得られた poly(A)⁺ RNA シグナル強度の核/細胞質 (N/C)比の定量化。各細胞株内の Control KD の平均値で正規化した相対値を示す。統計解析は Kruskal-Wallis 検定と Steel 検定を用いて行った。**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ns: not significant, *n* = 100。(C),(D)発現させた RRP41-FLAG はエキソソーム複合体に取り込まれることを免疫沈降実験により確認した。(C) 抗 MTR4 抗血清と (D) 抗 FLAG 抗体を用いて行った免疫沈降実験のコントロールとして (C) および (D) でそれぞれ、ウサギ非免疫血清 (pre-immune) と FLAG のみ発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株由来の核抽出物 (ppt) を使用した。ppt = precipitate。(E),(F) 核抽出物のイムノブロット解析。(E) KD した因子および発現させた RRP41-FLAG の種類はパネルの上部に示した。アスタリスク (*) は内在性 RRP41 由来のシグナル、ダブルアスタリスク (**) は外因性 RRP41-FLAG 由来シグナルを示す。(F) (E) を含む 2 つの独立したイムノブロット解析の定量化。ACTIN に対して正規化した RRP6 の相対的な量を示す。値はさらに FLAG のみ発現させた Control KD サンプルに対して正規化した。発現させた RRP41-FLAG と KD 条件はパネル下部に示す。棒グラフとエラーバーは平均値 ± SD。

示唆された。

1.3 MPP6 は RRP6 と DIS3 による poly(A)⁺ RNA 基質分解の双方を促進する

続いて、上記解析で見出した poly(A)⁺ RNA の核内蓄積を核内エキソソームの機能不全の指標として利用し、補因子 MPP6 の核内エキソソーム活性への関与を評価した。U2OS 細胞および HeLa 細胞において MPP6 を含むエキソソーム補因子やヌクレアーゼを単独または同時に KD し、poly(A)⁺ RNA の蓄積が誘導されるか観察した(図 13 A-C, HeLa 細胞についてはデータ省略)。その結果、RRP6/DIS3 KD 時と同様に、RRP6/MPP6 KD 時にも顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が観察された(図 13 B,C)。RRP6/MPP6 KD 時に形成される poly(A)⁺ RNA foci は、核スペckルとの局在の不一致、PAP A/G 依存性の poly(A)⁺ 鎖付与、MTR4 タンパク質の集積といったエキソソーム阻害由来の poly(A)⁺ RNA foci に特徴的な性状を備えていた(図 13 D-F)。また、*proDNAJB4*、*vU1snRNA*、*SNHG19 spliced* といったエキソソームの典型的な基質についても RRP6/DIS3 KD 時と同程度の安定化が観察されたことから(図 13 G-I)、RRP6 が存在しない場合には、DIS3 によるこれらの基質分解に MPP6 の存在が必須であることが示唆された。

一方、MPP6 を単独で KD した場合には、RRP45 KD または RRP6/DIS3 KD 細胞で見られるものよりも軽微ではあるものの poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が観察された(図 13 B,C)。RRP6 と DIS3 は、MPP6 の存在下ではそれぞれ単独でこれらの基質を効率的に分解することができるので(図 5 B,C)、この結果は MPP6 が RRP6 と DIS3 による基質分解の双方に対して促進的な機能を持つことを示している。また、MPP6/DIS3 の KD で生じる poly(A)⁺ RNA の核内蓄積は RRP6/MPP6 KD 時に比べて微弱であったことから(図 13 B,C)、RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質の分解は MPP6 の不在下でも完全には阻害されないと考えられる。MPP6 KD 時にも RRP6 の活性が維持されていることは、4M チャネル閉塞変異体発現細胞において MPP6 KD 時の poly(A)⁺ RNA の蓄積が軽度であることから窺える(図 14 A,B)。

また、MPP6 を C1D と同時に KD した際にも顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が観察された(図 14 C)。出芽酵母において Rrp6p と Rrp47p との間には相互依存性の発現様式が報告されており、本解析でヒト細胞内においても RRP6 KD は C1D の消失を誘発し、また C1D KD は RRP6 量を大幅に減少させることを観察した[(33, 99, 100), 図 14 D]。RRP6 と C1D の相互依存的な発現を反映して、RRP6 の代わりに C1D を KD した C1D KD、C1D/DIS3KD、C1D/MPP6 KD でも、RRP6 KD、RRP6/DIS3 KD、RRP6/MPP6 KD それぞれと相似の効果がみられ(図 14 C)、

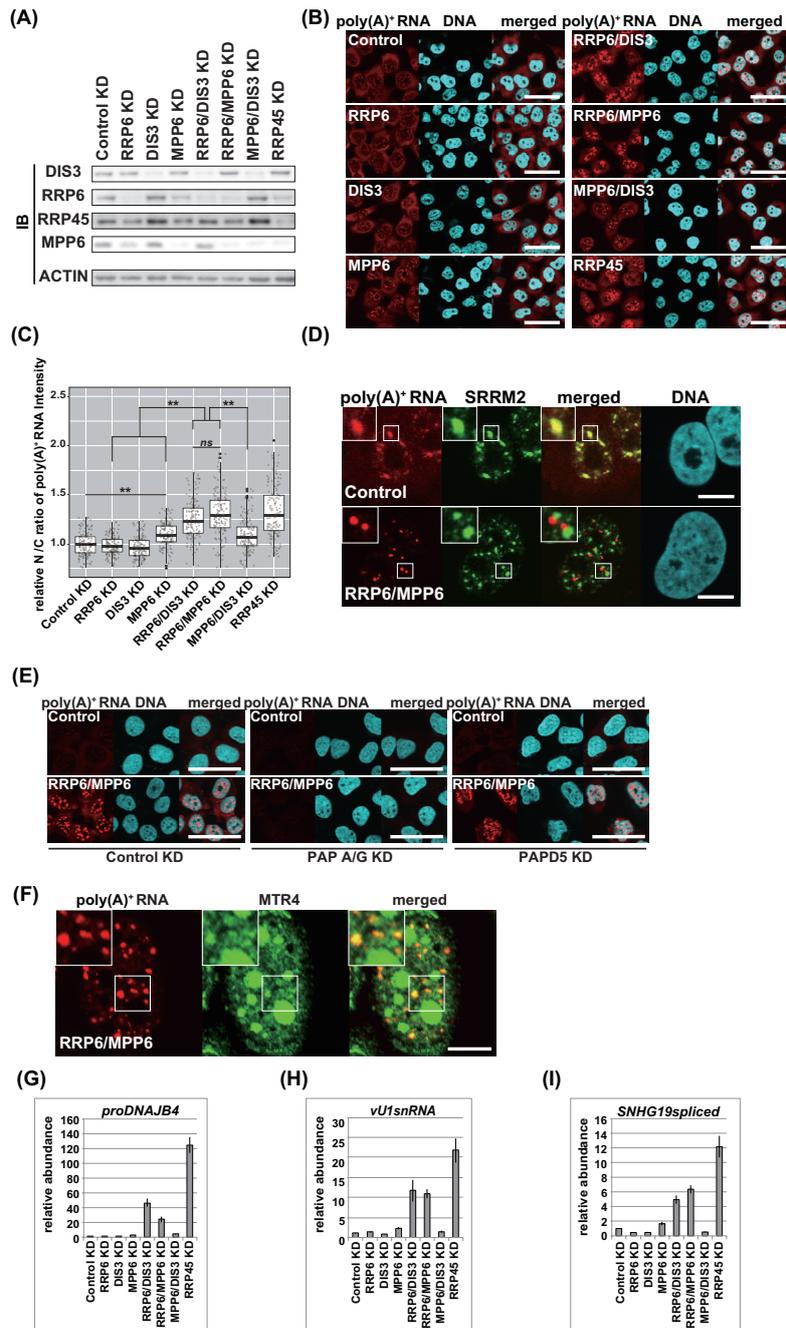


図 13. MPP6 は DIS3 と RRP6 による核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解を促進する

(A)-(C) U2OS 細胞におけるバルクの poly(A)⁺ RNA 基質分解に対する MPP6 KD の影響。(D)-(F) RRP6/MPP6 KD により U2OS 細胞核内に形成された poly(A)⁺ RNA foci の特性。(F)-(H) 個別の基質の安定化に対する MPP6 KD の影響。(A) U2OS 核抽出物のイムノブロット解析により、パネル上部に記載した因子の特異的 KD を確認した。(B), (E) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。KD した因子はパネル内部と (E) では下部にも記載した。Scale bar = 50 μ m。(C) (B) の定量化。poly(A)⁺ RNA シグナルの相対的な核/細胞質 (N/C) 比は Control KD サンプルの平均値を用いて正規化した。統計解析は Kruskal-Wallis 検定に続く Steel-Dwass 検定を用いて実施した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant, $n = 150$ 。(D), (F) poly(A)⁺ RNA は (D) SRRM2, (F) MTR4 と同時に可視化した。KD した因子をパネル内に示す。一部拡大したものを挿入図に示した。Scale bar = 10 μ m。(G)-(I) whole cell 由来の total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA に対して (G) *proDNAJB4*, (H) *vU1snRNA*, (I) *SNHG19spliced* を qPCR により定量した。値は *GAPDH* および Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量。棒グラフとエラーバーは、平均値 \pm SD を示す。

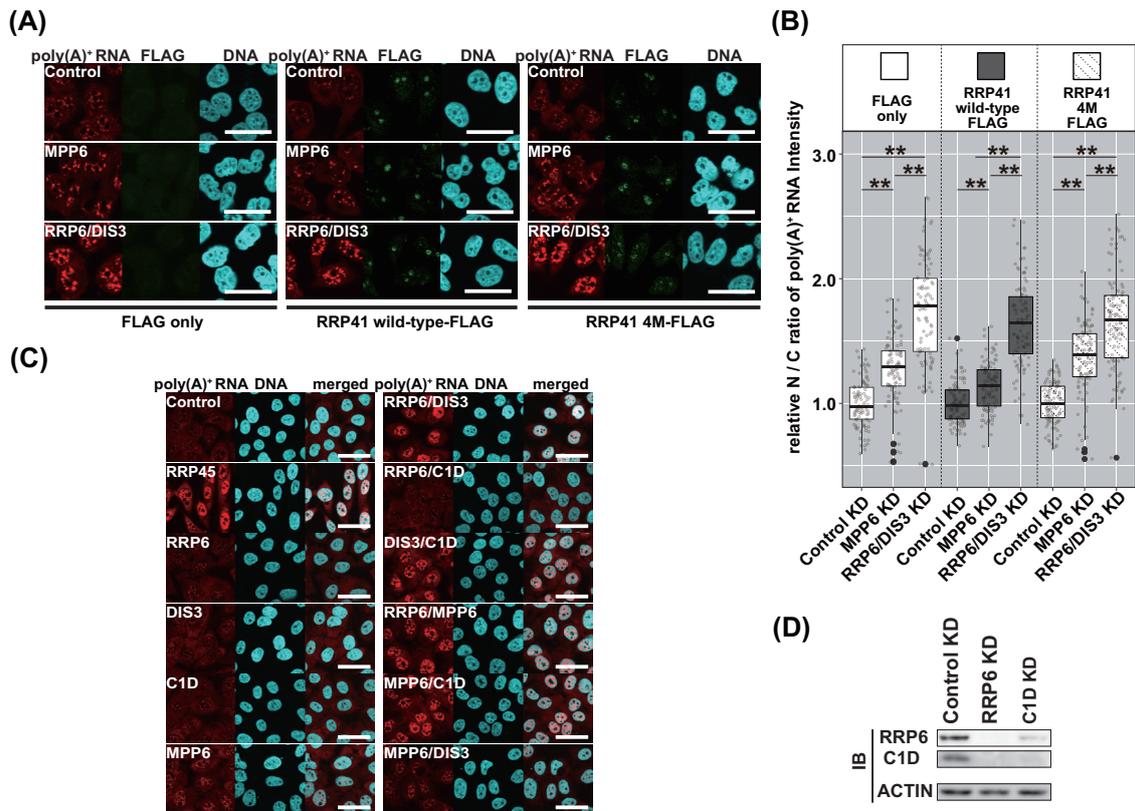


図 14. MPP6 は核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解において RRP6 と冗長的に機能する

(A),(B) チャネル閉塞 4M RRP41-FLAG 発現細胞における MPP6 KD の poly(A)⁺ RNA 基質分解への影響。(C),(D) MPP6 と同時に C1D を KD すると、顕著な poly(A)⁺ RNA 基質安定化が誘起される。(A),(C) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。KD した因子はパネル内部に記す。(C)ではパネル下部に使用した細胞株を記載した。Scale bar = 50 μ m。(B) (C)の結果の定量。細胞株ごとに Control KD サンプルの平均値を用いて正規化した poly(A)⁺ RNA シグナルの相対的な核/細胞質 (N/C)比を示す。統計解析は、Kruskal-Wallis 検定に続く Steel-Dwass 検定で実施した。 $**p < 0.01$, $n = 100$ 。(D) RRP6 と C1D の相互依存的な発現。RRP6 KD U2OS 細胞および C1D KD U2OS 細胞の核抽出液に対して免疫ブロット解析を行った。

RRP6/C1D が DIS3 および MPP6 と重複して poly(A)⁺ RNA 基質の分解に機能することがさらに裏付けられた。

以上の結果より、MPP6 は RRP6 と DIS3 による poly(A)⁺ RNA 基質分解をそれぞれ促進していることが明らかとなった。RRP6 による効率的な poly(A)⁺ RNA 基質分解に MPP6 は必要だが、MPP6 および DIS3 がなくても完全に阻害されることはないと考えられる。一方 RRP6 がいない場合には、DIS3 による poly(A)⁺ RNA 基質分解に MPP6 は必須となることが示唆された。

上記図 13 の実験を実施した際、MPP6 を長期に渡って枯渇させると、DIS3 の量に変化は認められないのに対し、RRP6 の量は減少した(図 15 A)。この際、RRP6 の転写物量および細胞内局在に顕著な変化は認められないため(図 15 B,C)、RRP6 は転写後調節されていると考えられた。この現象の影響を最小限に抑えるため、実験は

MPP6 KD による RRP6 量への影響があまり見られない siRNA トランスフェクション後 72 時間の時点で実施した。しかし、この時点での微量な RRP6 の減少が MPP6 KD 条件における poly(A)⁺ RNA 基質の分解に対する RRP6 の活性低下として捉えられている可能性も完全に排除することはできず、ここまでの結果で RRP6 のヌクレアーゼとしての活性に対する MPP6 の促進的な機能の貢献度を明確にすることはできなかった (第 2 節 2.3 で後述)。

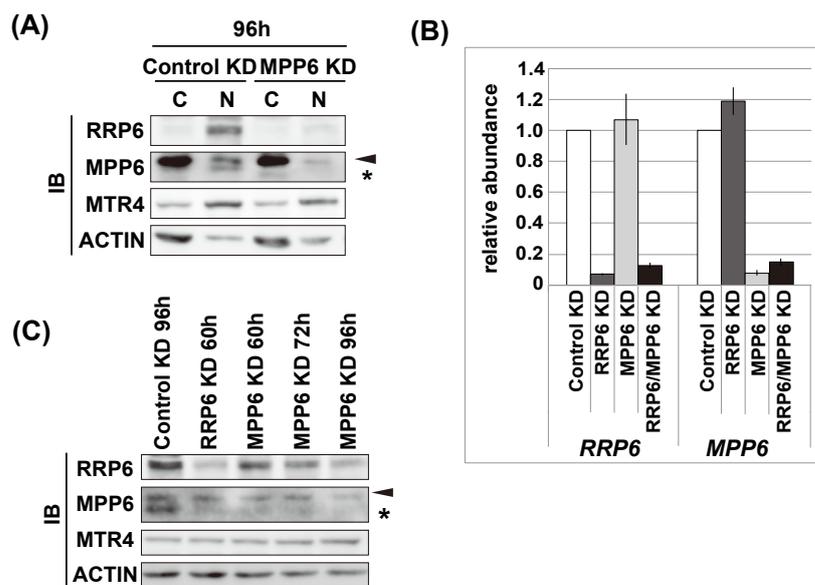


図 15. MPP6 KD 条件下での RRP6 量の転写後ダウンレギュレーション

(A)-(C) 長期 MPP6 KD は核内 RRP6 の減少を引き起こす。(A),(C)イムノプロット解析。(A)では細胞質および核抽出物の両方、(C)では核抽出物に対して解析を行った。パネル上部に KD した因子と siRNA トランスフェクションからの経過時間を示した。(A)では細胞質および核抽出物の別をパネル上部に「C」および「N」とそれぞれ記した。アスタリスク (*) は、内因性 MPP6 由来シグナル。arrowhead は一次抗体由来の非特異的なバンド。(A)では、核と細胞質それぞれのマーカーである MTR4 と ACTIN の分布から、適切な分画を確認した。(B) MPP6 KD による RRP6 の転写物量の減少は見られなかった。グラフの下部に KD した因子を記載した。Whole cell 由来の total RNA から random9 をプライマーに用いて合成した cDNA に対して qPCR を行い、RRP6 と MPP6 の転写物量を定量した。定量した標的はパネル最下部に記した。GAPDH および Control KD 値で正規化した各転写物の相対量を示す。棒グラフとエラーバーは平均値 ± SD、n = 3。

第2節 MPP6の維持するMTR4とエキソソームコア間の相互作用は至適な poly(A)⁺ RNA基質分解に必須である

2.1 MPP6はMTR4とコアに異なる領域で同時に結合する

核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解における MPP6 のより正確な機能を調べるため、いくつかの MPP6 変異体を構築してその機能を評価した。本解析を開始した当時は MPP6 の立体構造についての情報はまだなかったため、ヒト MPP6 と出芽酵母 Mpp6p 間のアミノ酸配列相同性および MPP6 の予測二次構造を利用した(図 16,17)。MPP6 の塩基配列は生物種間であまり保存されていないが、Multalin version 5.4.1(110)を用いてアライメントを行うと N 末端領域の保存性が比較的高いことがわかった(図 17 A)。そこで、N 末端の 35 アミノ酸を欠失させた変異体を作製した(図 16 A)。この領域内の二次構造予測に基づき Δ N4、 Δ 5-18、 Δ 19-35 変異体をさらに作製し、加えていくつかの C 末端切断変異体(Δ C11 および Δ C33)と内部領域を欠失した変異体 (Δ 48-67 および Δ 81-105)も作製した(図 16 A)。

まず RNAi 耐性を持つ各変異体を安定的に発現する細胞株の樹立を試みたが、内部領域を欠失した変異体はヒトの細胞では発現しないか極めて発現量が少なかった(図 16 B,C)。MPP6 の発現維持には RRP6 と同様にコアが必要であることを本解析内で既に観察していたことから(図 13 A, 図 16 D)、これらの MPP6 内部領域はエキソソームコアとの相互作用に重要であると推測した。そこで MPP6 内部領域を欠失した変異体について複合体形成の様子を評価するために、GST プルダウンアッセイを行った(図 16 E-H)。GST を融合した MPP6 変異体を大腸菌内で産生させて GST-MPP6 融合タンパク質として精製し、FLAG-RRP45 を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞から調製した核抽出液とインキュベートした。その結果、MPP6 の N 末端および C 末端を欠失させても RRP6 やコア構成因子との結合性は変化しなかったが、内部領域 (48-67 および 81-105) を欠失させるとコア成分との結合は著しく減少したことから、MPP6 の内部領域がコアとの結合に重要であることが明らかとなった(図 16 E,F)。一方、これらの内部領域欠失 MPP6 には相当量の RRP6 および MTR4 が結合しており(図 16 E,G,H)、MPP6 はコアと相互作用する領域とは別のドメインで RRP6 および MTR4 と結合することが示唆された。加えてこの実験では、 Δ N35 変異体が MTR4 と結合しないことも判明した(図 16 E,H)。

この結果を検証するために、FLAG を融合した完全長の MPP6 ならびに、 Δ N35、 Δ N4、 Δ N5-18、 Δ N19-35 変異型 MPP6 をそれぞれ発現させた細胞から調製した核抽出液に対して、MTR4 または RRP46 を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈

降実験を行った(図 16 I-L)。その結果、MPP6 の N 末端 35 残基を欠失させると MTR4 と MPP6 との間の相互作用は消失した(図 16 I,J)。また、 Δ N5-18 および Δ N19-35 変異型 MPP6 は MTR4 と相互作用しなかったが、 Δ N4 は完全長の MPP6 と同様に MTR4 と効率的に結合した。これらの結果より、MPP6 と MTR4 との結合には MPP6 の N 末端 5-35 残基が重要であると示唆された。一方エキソソームコアとの結合については、プルダウン実験の結果と合致して(図 16 E,F)、N 末端欠失の影響は見られず(図 16 K,L)、MPP6 が MTR4 とコアの両方に異なる領域で結合することがさらに確かめられた。

MTR4 への結合に重要であると判明した MPP6 の N 末端 5-35 残基には、出芽酵母とヒトの間で高度に保存された残基が集中している(図 17 A)。そこで、これらの保存された残基、L9、S10、M16、K17、F18、M19 の機能について、アラニン置換変異体である L9A/S10A(LS) および M16A/K17A/F18A/M19A(MKFM) をそれぞれ作製して評価した(図 17 B)。両変異体とも MTR4 とは結合しなかった一方、コア構成因子とは効率よく結合し、これらの保存された残基が MTR4 と MPP6 の相互作用に重要であると示唆された。また上記実験ではプルダウンの結果から予測された通り(図 16 E-H)、MTR4 およびコアとのいずれの相互作用に対しても MPP6 の C 末端の欠失による影響は観察されなかった(図 17 C-F)。

これらの結果から、MPP6 は MTR4 とはその N 末端領域で、エキソソームコアには内部領域を用いて同時に結合することがわかった。本実験で明らかにした MPP6 の MTR4 とエキソソームコアへの結合様式は、最近クライオ電子顕微鏡による単粒子解析で明らかにされた MPP6 と MTR4 の双方を含む *in vitro* 再構成エキソソーム複合体の構造と非常によく合致するものであった(96)。

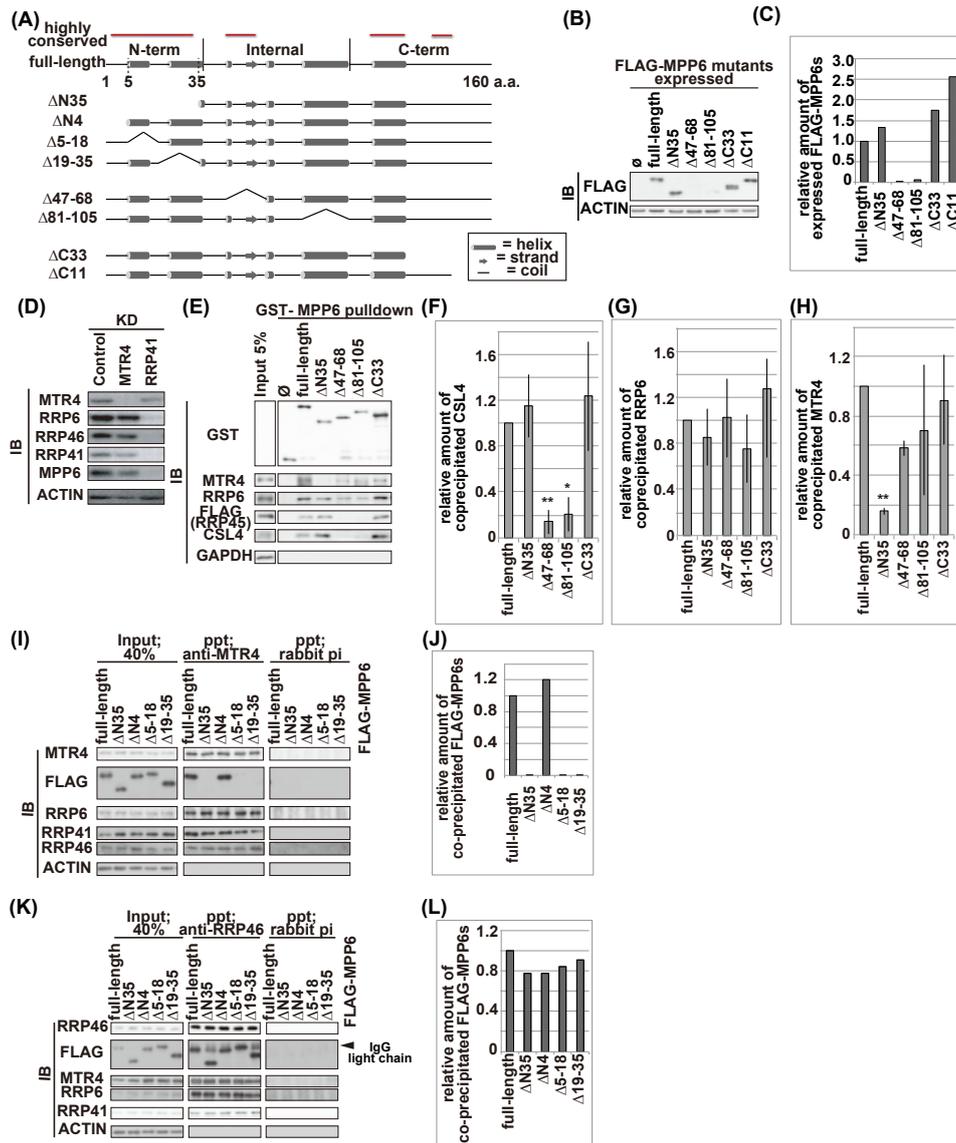


図 16. MTR4 およびコアとの相互作用に必要な MPP6 内のドメイン

(A) MPP6 変異体の構築のための予測二次構造と種間配列保存性を示した模式図。(B),(C) FLAG-MPP6 変異体を安定発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株からの核抽出物を用いたイムノブロット解析。(D)エキソソームコア因子である RRP41 の KD による MPP6 量の減少。(I)-(L) エキソソーム構成因子との結合に必要な MPP6 ドメイン同定のための免疫沈降実験。(A) PSIPRED によって予測された 2 次構造の模式図。種間保存性の高い領域は上部に赤線で示した。予測された構造と配列保存性から、MPP6 は N 末端(1-35 a.a.),内部(36-105 a.a.),C 末端(105-160 a.a.)の 3 つのドメインに分けた。a.a. = amino acid。(B) 発現させた FLAG-MPP6 は上部に記す。∅ は FLAG のみの発現を表す。(C) (B)の化学発光シグナルの定量化。ACTIN および FLAG-MPP6 完全長(full-length)の値で正規化した各 MPP6 変異体の相対量を示す。(D) HeLa 細胞からの核抽出物を用いたイムノブロット解析。KD した因子はパネル上部に示した。(E) FLAG-RRP45 を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株からの核抽出物に対するプルダウンアッセイ。(F)-(H) (E)を含む 3 つの独立した GST-プルダウンアッセイ結果の定量化。(F)CSL4,(G)RRP6,(H)MTR4 に対する、各 GST-MPP6 タンパク質の Input 量と GST-MPP6 完全長(full-length)の値を用いて正規化した相対的共沈量を示す。棒グラフとエラーバーは平均値±SD。Dunnett's test により統計解析を行った。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。(I),(K)各 FLAG-MPP6 変異体を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株由来の核抽出物に対して(I)抗 MTR4 抗体,(K)抗 RRP46 抗体を用い免疫沈降実験を行った。ウサギの非免疫血清(pi: preimmune)をコントロールに使用した。ppt = precipitate。(J),(L) (I),(K)それぞれの化学発光シグナルの定量化。沈降物中の各 FLAG-MPP6 変異体の(I)MTR4,(K)RRP46 に対する比率を、Input 内の (I)MTR4,(K)RRP46 に対する FLAG-MPP6 変異体の量比と FLAG-MPP6 完全長(full-length)サンプルの値で正規化した相対量を示す。

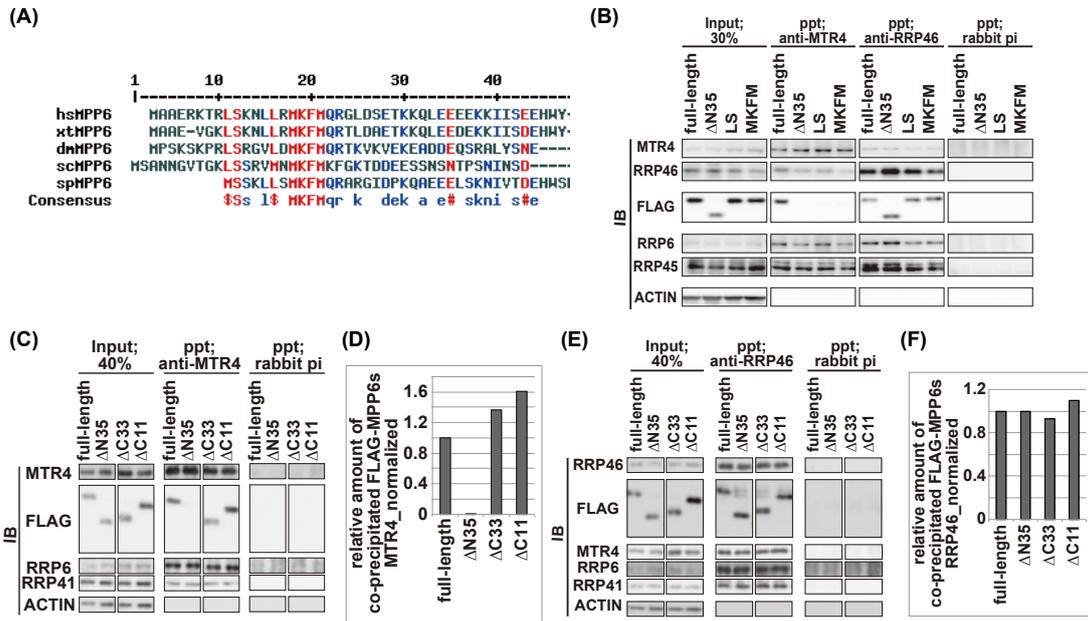


図 17. ドメイン欠失およびアミノ酸置換 MPP6 変異体の複合体形成

(A) MPP6 の N 末端領域内の種間配列保存性。(B) N 末端領域アミノ酸置換変異型 MPP6 と MTR4 およびエキソソームコアとの相互作用。(C)-(F) MPP6 から C 末端領域を削除しても MTR4 およびエキソソームコアとの結合には影響が見られない。(A) Multalin v5.4.1 によるアラインメントを行った。hs: *Homo Sapiens*, xt: *Xenopus tropicalis*, dm: *Drosophila melanogaster*, sc: *Saccharomyces cerevisiae*, sp: *Schizosaccharomyces pombe* の MPP6 ホモログ配列を入力として使用した。(B), (C), (E) FLAG 融合 MPP6 変異体を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株由来の核抽出物に対して (B), (C)抗 MTR4 抗体,(B), (E)抗 RRP46 抗体を用いて免疫沈降実験を実施した。ウサギの非免疫血清(pi: preimmune)を免疫沈降のコントロールとして使用した。発現させた FLAG-MPP6 の種類はパネルの上部に記載した。ppt = precipitate。(D),(F) (C), (E) それぞれの定量化。沈降物中の各 FLAG-MPP6 変異体と(D)MTR4 または (F)RRP46 の比を、Input の各 FLAG-MPP6 変異体と(D)MTR4 または(F)RRP46 の比と FLAG-MPP6 完全長(full-length)サンプルの値で正規化した各 FLAG-MPP6 変異体の相対的沈降量を示す。

2.2 MPP6はコアとMTR4の相互作用を維持する

このように MPP6 は MTR4 とコアに同時に結合しうる性質を持つことから、実際の細胞内においても MTR4 とコア間の相互作用維持に寄与する可能性が高いと考えられた。これまでの知見から、RRP6 が N 末端で MTR4 と結合し、同時に C 末端領域でコアに巻きつくことが MTR4 とコア間の相互作用においては特に重要であると考えられていた(28, 29, 46, 111)。一方、細胞内でのエキソソーム複合体形成における MPP6 の関与についての知見は極めて限られている。エキソソームコアと外因性に発現した FLAG-MTR4 との相互作用が MPP6 KD により減弱する報告はあるものの(112)、この報告内では MPP6 KD により RRP6 と MTR4 間の相互作用も大きく低下しており、MPP6 は RRP6 と MTR との相互作用における補助的因子と結論づけられている。しかし、最近の *in vitro* 構造解析では RRP6 と MPP6 がそれぞれ独立して MTR4 をエキソソームコアへとリクルートする様子が観察されている(94, 96)。そこで

内在性の RRP6 と MPP6 が MTR4 とコア間の相互作用に対してそれぞれどの程度寄与しているのかを評価することを目的として、ヒト細胞において RRP6 または MPP6 を KD した上で内在性の MTR4、RRP46、RRP45 それぞれに対して特異的抗体を用いた免疫沈降実験を行った(図 18 A-D)。

その結果、RRP6 KD だけでなく MPP6 KD 条件においても MTR4 とコアの相互作用減少が観察された。MTR4-コア間の相互作用の減少の程度は RRP6 KD 条件の方が MPP6 KD 時よりも大きかった(図 18 A-D)。また RRP6 と MPP6 を同時に KD することで、それぞれの単独 KD に比べて MTR4-コア間の相互作用により大きな減少が見られた(図 18 A-D)。しかし RRP6 や MPP6 の KD はエキソソーム構成因子の量に影響を与えることが多いため、共沈した因子を正確に定量することは困難である。この問題を解決するために GST-MTR4 プルダウンアッセイを実施した(図 18 E,F)。その結果 MPP6 KD によって GST-MTR4 とコアとの相互作用は低下し、またその程度は RRP6 KD 時より低いことが観察されたことから、免疫沈降法の結果が裏付けられた。これらの結果を総合すると、MPP6 は RRP6 よりも量的には少ない程度にはあるが、ヒト細胞内において MTR4 とコア間の相互作用を維持していると考えられた。以前の *in vitro* の再構成実験においても RRP6 と MPP6 はそれぞれ単独で MTR4 をコアにリクルートし、かつそのリクルート量については RRP6 の方が MPP6 よりも多いことが観察されている(95)。

さらに内在性 MPP6 KD に起因する MTR4-コア間相互作用の減少は、外因性に発現させた完全長の MPP6 で回復する一方、MTR4 との結合能を欠く Δ N35 変異体の発現では回復しなかったことから(図 18 G-J)、MPP6 によるコアと MTR4 間の相互作用維持において、MPP6 の N 末端を介した MTR4 との結合が重要であると示唆された。

2.3 MPP6とMTR4の結合はヒト核内におけるRRP6とDIS3によるpoly(A)⁺ RNA基質分解に重要である

続いて、MPP6 によって支持される MTR4-コア間の結合が実際のヒト細胞内でエキソソームによる poly(A)⁺ RNA 基質分解にどの程度寄与しているかについて評価を行った。MTR4 との結合能を欠く Δ N35、 Δ N5-18、 Δ 19-35、LS、MKFM の変異型 MPP6、あるいは MTR4 と結合できる野生型および Δ N4、 Δ C11、 Δ C35 の変異型 MPP6 それぞれを、ドキシサイクリン存在下において FLAG タグ融合の RNAi 耐性型で安定発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株を樹立した。いずれの変異型 MPP6 も野生型 MPP6 と同様に、主に核小体に濃縮した核局在を示した[(33), 図 19 A, LS および

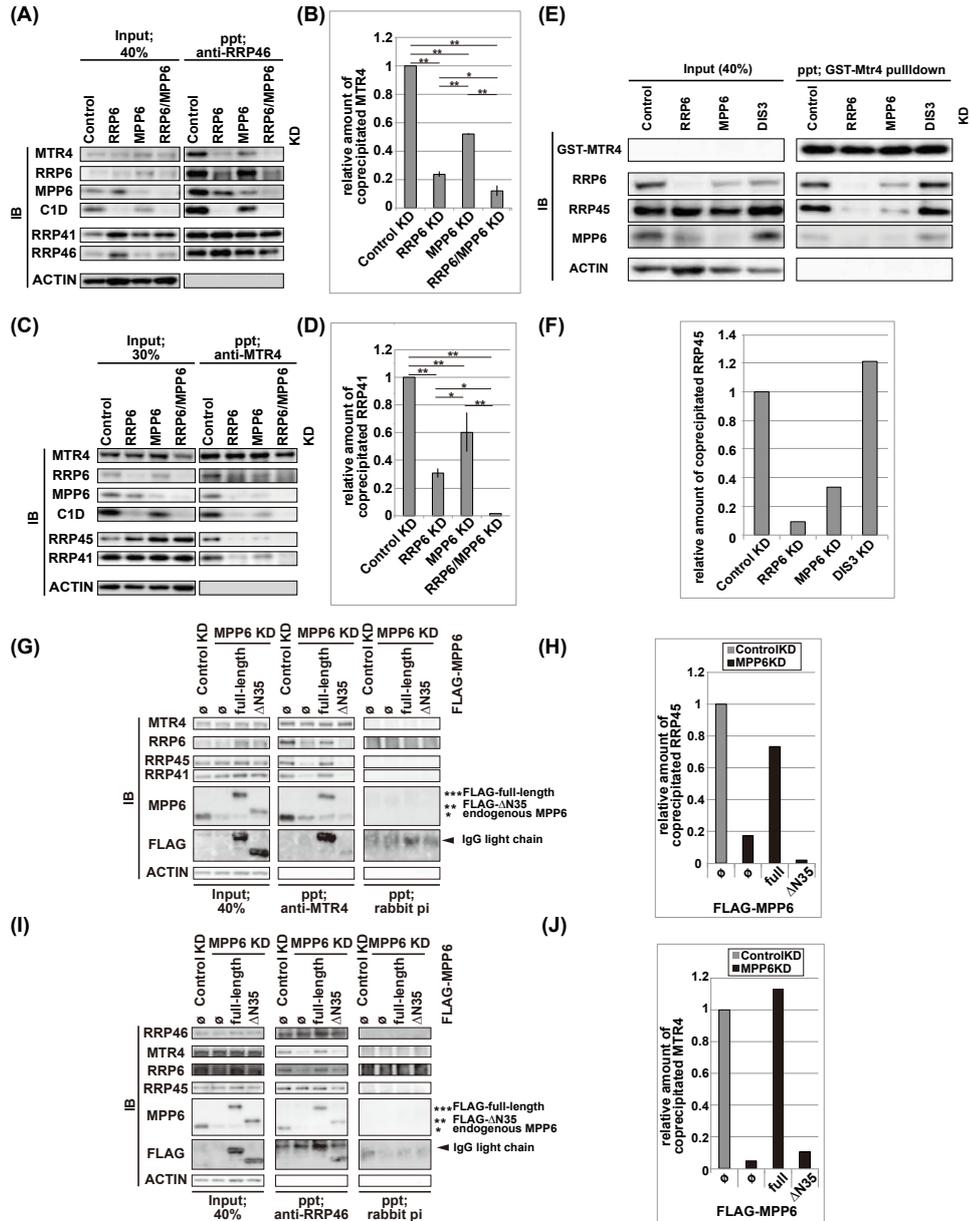


図 18. RRP6 と MPP6 それぞれの MTR4-コア間相互作用維持における寄与

(A)-(F) RRP6 KD, MPP6 KD, RRP6/MPP6 KD が MTR4-コア間相互作用に及ぼす影響。(G)-(J) MPP6 の N 末端領域 35 残基は MTR4 とコア間の相互作用を維持するために必須である。(A),(C) HeLa 細胞の核抽出物に対して(A)抗 RRP46 抗体,(C)抗 MTR4 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。KD した因子をパネル上部に示した。(B),(D) (A),(C)を含む 2つの独立した抗 RRP46 免疫沈降実験および抗 MTR4 免疫沈降実験それぞれの定量化。各サンプルにおける(B)MTR4/RRP46,(D)RRP41/MTR4 の比を、Input 内の(B)MTR4/RRP46,(D) RRP41/MTR の比および Control KD サンプルの値で正規化した(B)MTR4,(D)RRP41 の相対共沈量を示す。棒グラフとエラーバーは、平均値±SD。統計解析は、one-way ANOVA 検定に続いて Holm test を用いて実施した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant。(E) GST-MTR4 プルダウンアッセイ。GST-MTR4 を GSH ビーズに付着させ、RRP6、MPP6 または DIS3 を KD した HeLa 細胞由来の核抽出物と混合した。(F) (E)の定量化。沈降した RRP45 の量を Input 内 RRP45 量と GST-MTR4 の量で正規化した相対量を示す。(G),(I) 核抽出物に対して行った(G)抗 MTR4 抗体,(I)抗 RRP46 抗体を用いた免疫沈降実験。核抽出物は各 FLAG-MPP6 を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞からパネル上部に記載した条件で調製した。○は FLAG のみを表す。免疫沈降ステップのコントロールとしてウサギの非免疫抗血清(pi: preimmune)を使用した。ppt = precipitate。(H),(J) (G),(I)それぞれの定量化。沈降物における(H)RRP45/MTR4,(J)MTR4/RRP46 の比を Input 内の(H)RRP45/MTR4,(J)MTR4/RRP46 の比と Control KD FLAG のみの発現サンプルの値で正規化した相対値を示す。

MKFM 変異型 MPP6 についてはデータ省略]。野生型または $\Delta N4$ 変異型 MPP6 の発現は、MPP6 KD に由来する比較的軽度の poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積を効果的に解消した一方、MTR4 との結合能を欠く $\Delta N35$ 、 $\Delta N5-18$ 、 $\Delta 19-35$ 、および LS と MKFM の変異型 MPP6 発現では回復しなかった(図 19 A-E, LS および MKFM 変異型 MPP6 についてはデータ省略)。この実験で、外因性に発現させた $\Delta N35$ 変異型 MPP6 は内在性 MPP6 KD による RRP6 量の低下を野生型 MPP6 と同程度まで回復したことから、 $\Delta N35$ 変異型 MPP6 発現細胞で MPP6 KD 時に観察される poly(A)⁺ RNA 基質分解阻害は、RRP6 の co-depletion に由来するものではなく、基質分解を促進する MPP6 の機能不全を反映したものと考えられた(第 1 節 1.3 で上述, 図 20 A,B)。すなわちこの結果は、ヒト核内において MPP6 が RRP6 と DIS3 による poly(A)⁺ RNA 基質分解それぞれを MTR4 との結合を介して促進していることを示唆する。実際に、RRP6/MPP6 KD に起因する顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積は、野生型 MPP6 や $\Delta N4$ および C 末端欠失変異型 MPP6 の外因性発現によって効果的に解消される一方、MTR4 との結合能を持たない変異型 MPP6 の発現では回復しなかった(図 19 A-E, LS および MKFM 変異型 MPP6 についてはデータ省略)。これらの結果から、RRP6 不在時の MPP6 による DIS3 分解経路の維持には MPP6 を介する MTR4 とコアとの相互作用が必須であると示唆された。

さらに、MPP6 の不在によって部分的に弱体化した RRP6 の基質分解活性を反映すると考えられる MPP6/DIS3 KD 由来の軽度な poly(A)⁺ RNA 蓄積についても、 $\Delta N35$ 、 $\Delta N5-18$ 、 $\Delta 19-35$ 、および LS と MKFM 変異型 MPP6 の発現では回復せず、野生型または $\Delta N4$ 変異型 MPP6 を発現させると解消したことから(図 19 A-E, LS および MKFM 変異型 MPP6 についてはデータ省略)、RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質の至適な分解においても MPP6 の MTR4 との結合能が必須であると考えられた。

また、内在性の MPP6 の KD を行わなくても、RRP6 KD や DIS3 KD の条件で $\Delta N35$ 、 $\Delta N5-18$ 、 $\Delta 19-35$ 、LS、MKFM 変異型 MPP6 を発現させると poly(A)⁺ RNA 核内蓄積についてドミナントネガティブな表現型が有意に確認され(図 19 A-E, LS および MKFM 変異型 MPP6 についてはデータ省略)、MPP6 によって支持される MTR4-コア間結合が DIS3 と RRP6 それぞれによる poly(A)⁺ RNA 基質分解に重要であるとさらに裏付けられた。

上記実験において、RRP6 KD によって核小体に濃縮した FLAG-MPP6 の局在が消失する様子を観察した(図 19 A)。この現象は FLAG 融合タンパク質発現量の低下に由来するものではなく(図 20 C)、発現している FLAG 融合 MPP6 が野生型であるか変異型であるかに依らず誘発された(図 19 A)。さらに FLAG-MPP6 の主な局在が

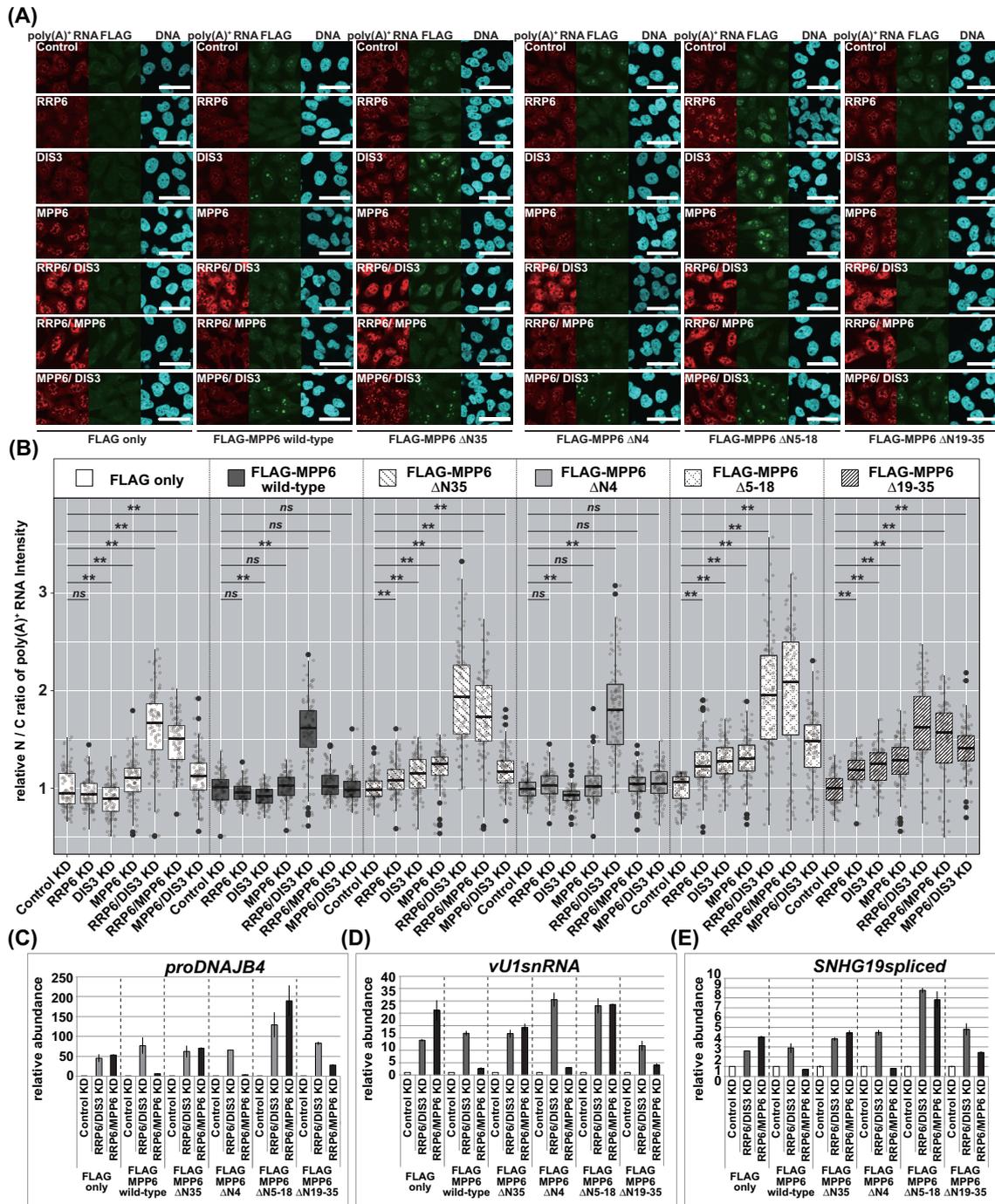


図 19. MPP6 の poly(A)⁺ RNA 基質分解の促進機能には MTR4 と MPP6 の結合が必要である

(A)-(E) FLAG-MPP6 N 末端欠失変異体の poly(A)⁺ RNA 基質分解に対する機能評価。(A),(B) FLAG-MPP6 変異体を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株における poly(A)⁺ RNA FISH 解析。(A) 発現させた FLAG-MPP6 の種類をパネルの下部に、KD した因子をパネル内部に記載した。Scale bar = 50 μ m。(B) (A) の定量化。細胞株ごとに Control KD 細胞の平均値で正規化した poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの相対的な核/細胞質 (N/C) 比を示す。Kruskal-Wallis 検定に続く Steel test で統計解析を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant, $n = 100$ 。(C)-(E) RT-qPCR により、個別の poly(A)⁺ RNA 基質分解における MPP6 の N 末端領域内の各サブ領域の重要性を評価した。whole cell に由来する total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA について (C) *proDNAJB4*, (D) *vU1snRNA*, (E) *SNHG19 spliced* を qPCR により定量した。発現させた FLAG-MPP6 の種類と KD した因子をパネル下部に示す。細胞株ごとに *GAPDH* と Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示した。 $n = 3$ 。

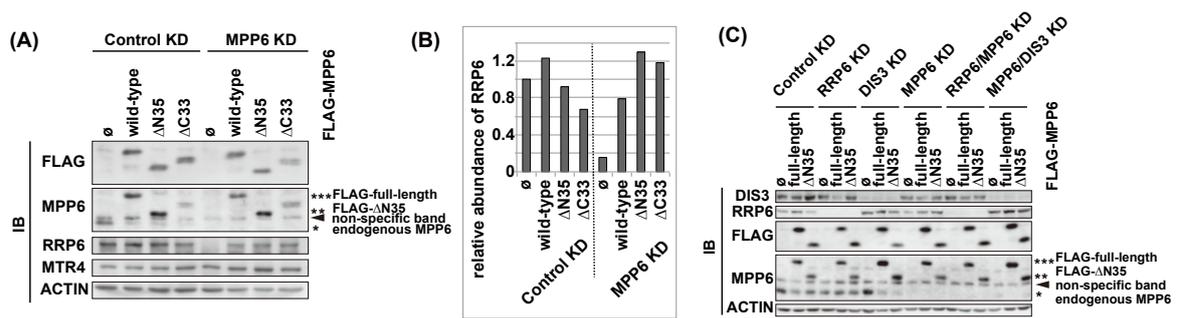


図 20. 外因性 MPP6 変異体発現による RRP6 発現量の維持

(A), (B) 外因性に発現させた $\Delta N35$ 変異型 MPP6 は野生型および $\Delta C33$ 変異型 MPP6 と同様に MPP6 KD 細胞における RRP6 の発現量を維持する。(C) 図 19 で poly(A)⁺ RNA 基質分解への影響を評価した各 KD 条件における MPP6 変異体の発現。(A), (C) FLAG-MPP6 変異体を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株由来核抽出物の免疫プロット解析。パネル上部に発現させた FLAG-MPP6 の種類と KD 条件を記した。Ø は FLAG のみの発現を表す。(B) (A)における RRP6 の定量。ACTIN と Control KD の FLAG のみ発現サンプルの値で正規化した RRP6 の相対量を示す。

核小体である条件でも poly(A)⁺ RNA 基質の蓄積は観察されることから(図19 A,B)、外因性に発現させたMPP6のRRP6 KDによる局在変化そのものはエキソソーム活性不全の直接的な原因ではないと考えられる。しかしながらこの局在変化により、発現させた機能喪失MPP6変異体の核質における存在量が増加してより深刻な表現型が誘発されている可能性は否定できない。

2.4 ヒト核内でMPP6とRRP6によってコアへとリクルートされるMTR4は機能的に等価ではない

ここまでのデータで、RRP6 不在時には MPP6 の MTR4 との結合が DIS3 によって実行される poly(A)⁺ RNA 基質分解に必須となることが示唆された。しかし RRP6 はヌクレアーゼであると同時に MTR4 とコアの間の橋渡し分子でもあるため、MPP6 との間に観察された機能的な冗長性が RRP6 のいずれの機能を反映したものであるかを推定することは困難であった。最近の *in vitro* の再構成解析において、ヌクレアーゼ活性のない RRP6 と C1D とで協調的に形成された結合面を介した MTR4 のコアへのリクルートがあれば、MPP6 の不在下でも基質はコア内のチャンネル構造を通過して DIS3 へと至り分解されることが示されている(95, 96)。もし生体内でも RRP6 に結合した MTR4 と MPP6 に結合した MTR4 が機能的に同等であるとすれば、野生型 RRP6 のみならずヌクレアーゼ活性のない RRP6 を発現させることでも RRP6/MPP6 KD に由来する poly(A)⁺ RNA 基質の蓄積を効果的に回復すると期待される。RRP6 と MPP6 のリクルートする MTR4 それぞれの正確な機能を明らかにするため、FLAG タグを融合した RNAi 耐性 RRP6 (野生型およびヌクレアーゼ活性欠失 Y436A 変異型 RRP6) のドキシサイクリン誘導性安定発現株を樹立して解析を行った(図 21)。野生

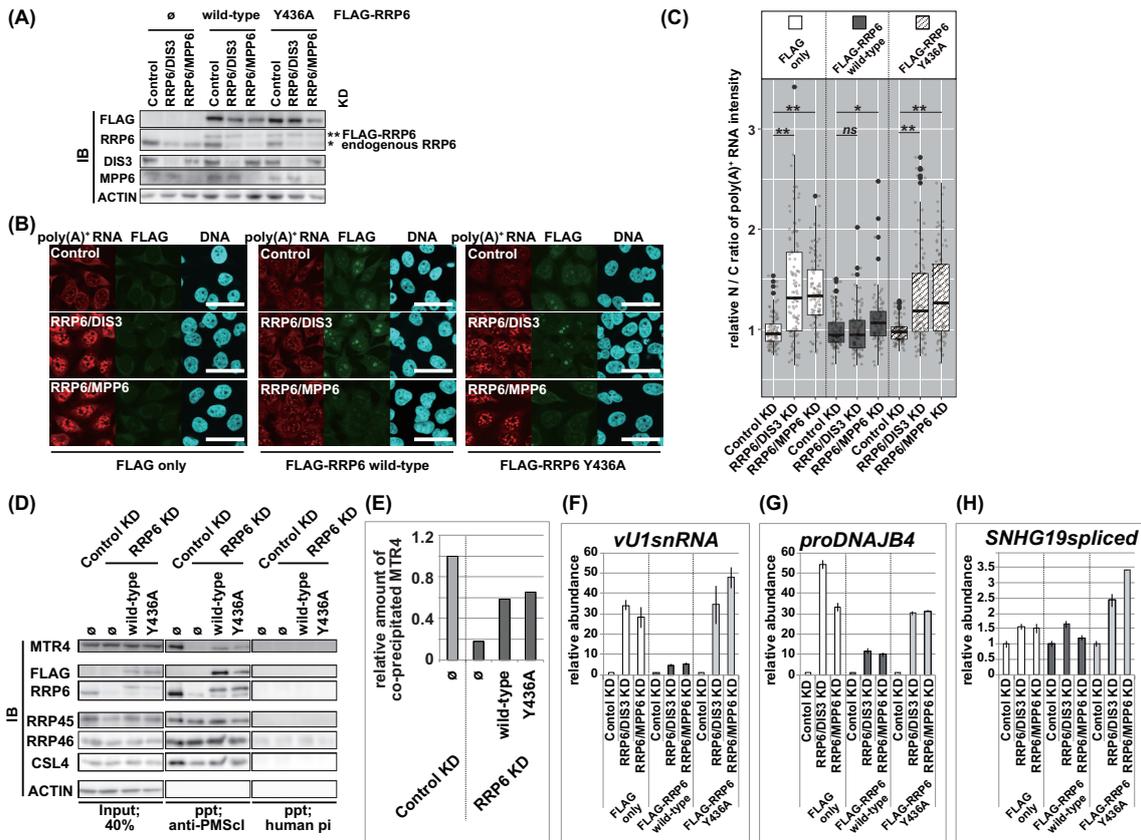


図 21. ヒト核内における MPP6 結合型 MTR4 と RRP6 結合型 MTR4 の機能的な差異

(A)-(H) ヌクレアーゼ不活性な RRP6 Y436A 変異体は poly(A)⁺ RNA 基質分解における MPP6 との機能冗長性を発揮できない。(A) 核抽出液のイムノプロット解析。細胞株と KD した因子はパネル上部に示した。∅は FLAG のみを表す。(B) poly(A)⁺ FISH 実験。発現させた FLAG-RRP6 の種類と KD した因子はパネル内部と下部のそれぞれに記載した。Scale bar = 50 μ m。(C) (B)の定量化。poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの核/細胞質 (N/C)比を細胞ごとに Control KD 細胞の平均値を用いて正規化した相対値を示す。Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel test を行い、統計解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant, $n = 100$ 。(D),(E) Y436A 変異体は MTR4-コア間相互作用を支持する。(D) 抗 PM-Scl 抗血清を用いた免疫沈降実験。免疫沈降ステップのコントロールとしてヒトの非免疫血清(pi: preimmune)を使用した。発現させた FLAG-RRP6 の種類と KD 条件はパネルの上部に示した。∅は FLAG のみの発現を示す。(E) (D)の定量。沈降物における MTR4/RRP45 の比を Input の MTR4/RRP45 の比で正規化し、さらに FLAG のみ発現する Control KD サンプルの値で正規化した相対的な MTR4 沈降量を示す。(F)-(H) whole cell に由来する total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA について (F) *proDNAJB4*, (G) *vU1snRNA*, (H) *SNHG19 spliced* を qPCR により定量した。細胞株ごとに *GAPDH* と Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示す。

型 RRP6 を発現させると、RRP6/DIS3 KD だけでなく、RRP6/MPP6 KD に由来する poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積は解消した(図 21 A-C, F-H)。一方、RRP6 KD に由来する MTR4-コア間結合の減少は Y436A の発現によって野生型と同程度に回復したにも拘らず(図 21D,E)、RRP6/DIS3 KD または RRP6/MPP6 KD 由来のいずれの poly(A)⁺ RNA 基質蓄積表現型も回復しなかった(図 21 A-C, F-H)。別のヌクレアーゼ活性欠失変異体である E315A についても同様の結果が得られた(データ省略)。これらの結果から、RRP6 を介して MTR4 がコアにある程度の量リクルートされている状態でも、

MPP6 がなければ DIS3 は poly(A)⁺ RNA 基質を効率よく分解できないことが示唆された。

MPP6 によってリクルートされた MTR4 が DIS3 による poly(A)⁺ RNA 基質分解に不可欠であることをさらに裏付けるため、エキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性の両方を欠く DIS3 変異体が呈するドミナントネガティブ表現型を利用した解析を行った[(37, 113), 図 22, 図 23]。DIS3 は processive(基質に結合したまま連続的に分解する)型のエキソヌクレアーゼであるため、この活性が正常に機能しない場合には、基質の 3'末端はこの酵素に固着することが予想される。このような基質は通常 DIS3 のエンドヌクレアーゼ活性によって断ち切られて再び解放される。このため、基質が DIS3 だけでなく RRP6 によっても分解されうる場合は、DIS3 のエキソヌクレアーゼ活性がない状況でもエンドヌクレアーゼ活性で解放された末端は RRP6 によって分解されて基質は蓄積しないと考えられる。一方、基質分解が DIS3 のみに依存している場合は、DIS3 のエキソヌクレアーゼ活性の不在により基質は安定化すると期待される。核内エキソソーム阻害時に foci として顕在化してくる poly(A)⁺ RNA 基質は RRP6 と DIS3 によって冗長的に分解される基質サブセットであるので、DIS3 のエキソヌクレアーゼ活性のみを阻害してもこれらの poly(A)⁺ RNA 基質は安定化せず、エキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性の両方を阻害することで安定化すると推測した。

この仮説を裏付けるように、FLAG タグを融合した DIS3 のエキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性双方を欠く変異体(DIS3^{endo-exo}: DIS3 D146N D177N D487N)を HeLa 細胞において一過性に発現させると、poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が顕著に見られる一方、野生型の DIS3(DIS3^{WT})、DIS3 のエンドヌクレアーゼ不活性変異体(DIS3^{endo}: DIS3 D146N D177N)、DIS3 のエキソヌクレアーゼ不活性変異体(DIS3^{exo}: DIS3 D487N)のいずれを発現させても、poly(A)⁺ RNA 核内蓄積においてドミナントネガティブな表現型は引き起こされなかった(図 22 A)。同様の結果は、EGFP 融合野生型および変異型 DIS3 のドキシサイクリン誘導性安定発現 HeLa Flp-In T-REx 細胞株でも得られた(図 22 B-D)。ただし EGFP-DIS3^{exo}については poly(A)⁺ RNA 蓄積において弱いドミナントネガティブな表現型を誘導した。これは N 末端 EGFP タグの付与により DIS3 のエンドヌクレアーゼ活性が阻害されたためと考えられる。DIS3 のエキソヌクレアーゼ活性が核質における poly(A)⁺ RNA 基質の分解に不可欠であることを反映し、DIS3^{endo-exo}および DIS3^{exo}を発現させても、RRP6/DIS3 KD によって誘発された poly(A)⁺ RNA 蓄積の表現型を回復しない一方、野生型および DIS3^{endo}を発現すると効果的に回復した(図 22 C,D)。

この EGFP-DIS3^{endo-exo}発現に由来する poly(A)⁺ RNA 基質の核内蓄積は、MPP6 を KD するとコントロール細胞あるいは EGFP-DIS3^{WT}発現細胞において MPP6 を KD した場合と同程度にまで減少した(図 23 A-E)。この実験において、MPP6 KD による外因性 EGFP-DIS3 の発現量に大幅な減少が確認された(図 23 F,G)。そこで、ドキシサイクリン添加濃度の調整によって EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体の発現量を調節しながら poly(A)⁺ RNA の核内蓄積の程度を評価した(図 23 F-I)。EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体の発現量を MPP6 KD 細胞と同程度に減少させた際にも poly(A)⁺ RNA の蓄積表現型は依然として観察されたことから、EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体発現細胞における poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型が MPP6 KD によって大幅に緩和したのは、EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体発現量の減少に起因するものではないと考えられた(図 23 F-I)。したがってこれらの結果は、RRP6 によって MTR4 とコアの相互作用の量がある程度維持されていても、MPP6 の不在下では基質が効率的に DIS3 に到達できないことを示唆するものである(補足図 1 ix, v)。

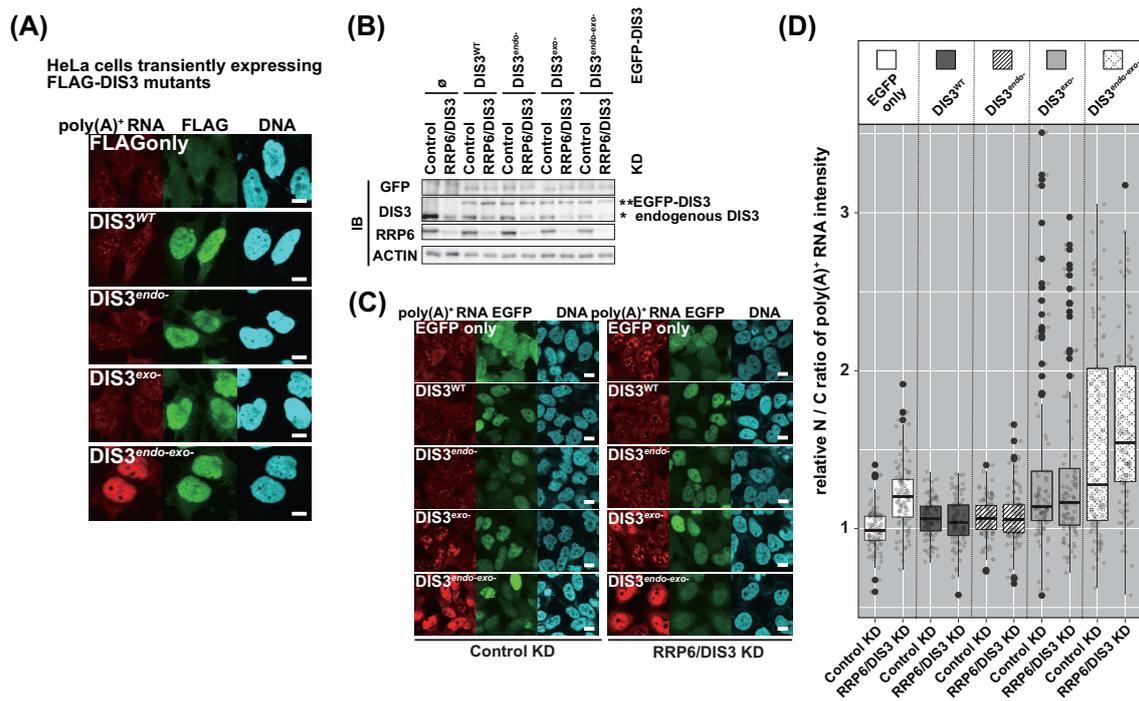


図 22. poly(A)⁺ RNA 基質分解における DIS3 のエンドおよびエキソヌクラーゼ活性の機能
 (A)-(D) エンドヌクラーゼとエキソヌクラーゼの両方の活性を欠く DIS3 変異体 DIS3^{endo-exo}は、poly(A)⁺ RNA の核内蓄積においてドミナントネガティブ表現型を示す。(A) HeLa 細胞における FLAG-DIS3 ヌクラーゼ活性変異体の一過性発現が poly(A)⁺ RNA 基質分解に与える影響を poly(A)⁺ RNA FISH で検証した。発現させた FLAG-DIS3 の種類をパネル内部に示す。FLAG-DIS3 は免疫染色によって可視化した。Scale bar = 10 μm。(B) 各 EGFP-DIS3 変異体を発現する HeLa Flp-In T-REx 細胞株由来核抽出物のイムノブロット解析。発現させた EGFP-DIS3 の種類と KD した因子はパネル上部に示した。∅は EGFP のみを表す。(C) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。EGFP に由来する蛍光で EGFP-DIS3 の発現と局在を観察した。発現させた EGFP-DIS3 の種類をパネル内部に、KD 条件をパネル下部に記す。Scale bar = 10 μm。(D) (C) の定量化。poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの核/細胞質 (N/C)比を EGFP のみ発現する Control KD 細胞の平均値を用いて正規化した相対値を示す。n = 100。

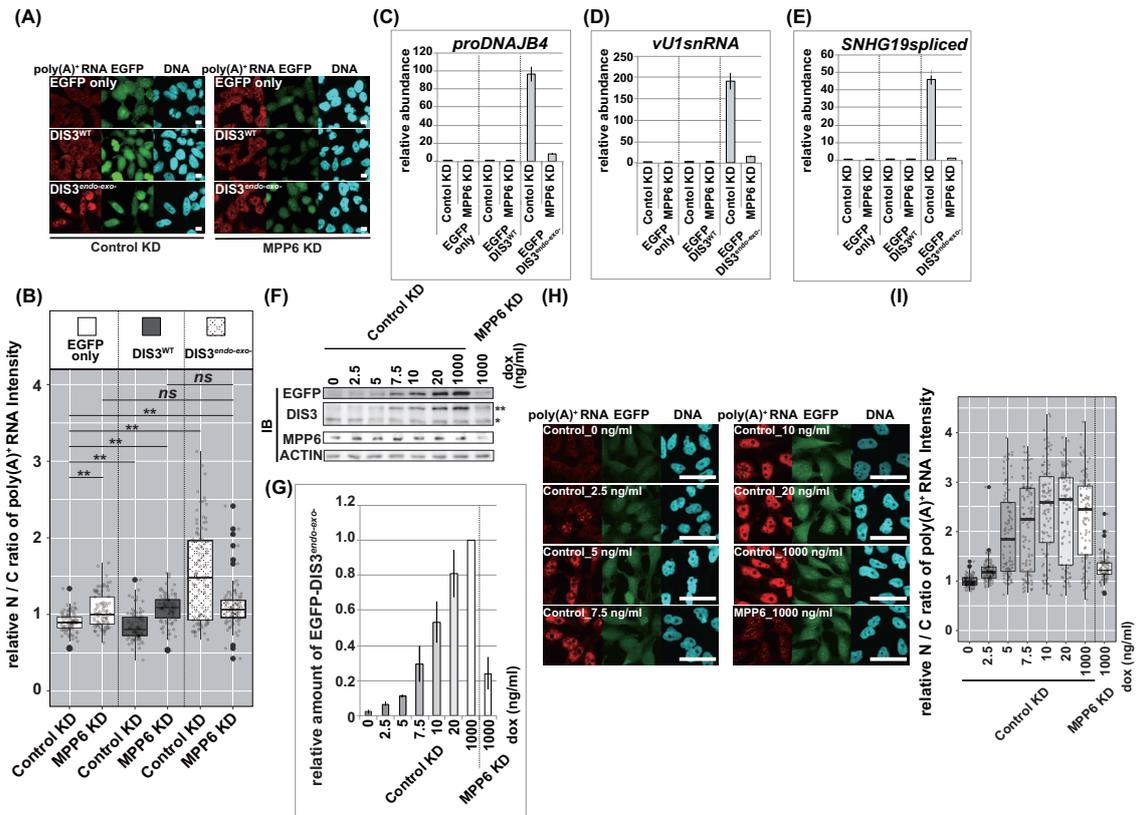


図 23. DIS3^{endo-exo}変異体は MPP6 に依存して poly(A)⁺ RNA 基質蓄積表現型を呈する
 (A)-(E) EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体の発現に由来する poly(A)⁺ RNA 基質蓄積は MPP6 KD により解消する。
 (F)-(G) 培地中のドキシサイクリン(dox)濃度の調整による EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体発現量の調節と各条件での poly(A)⁺ RNA 核内蓄積の様子。(A) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。外因性に発現させた EGFP-DIS3 の種類と KD した因子をパネルの内部と下部にそれぞれ記載した。EGFP-DIS3 の発現と局在は EGFP に由来する蛍光で観察した。Scale bar = 10 μ m。(B) (A)の定量。poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの核/細胞質 (N/C)比を EGFP のみ発現する Control KD サンプルの平均値を用いて正規化した相対値を示す。Kruskal-Wallis 検定に続いて Steel-Dwass test によって統計解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *ns*: not significant, $n = 100$ 。(C)-(D) whole cell に由来する total RNA から dT₂₅ をプライマーに用いて合成した cDNA について (C) *proDNAJB4*, (D) *vU1snRNA*, (E) *SNHG19 spliced* を qPCR により定量した。*GAPDH* と EGFP のみ発現する Control KD サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示す。(F) 培地中 dox 濃度を調整して培養した EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体発現細胞に由来する核抽出物のイムノブロット解析。添加した dox 濃度と KD 条件をパネル上部に示す。アスタリスク(*)は内在性 DIS3 に由来するシグナルを示し、ダブルアスタリスク(**)は発現させた EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体由来するシグナルを示す。(G) (F)の定量。ACTIN と 1000 ng/ml dox 添加 Control KD サンプルの値で正規化した EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体の相対量を示す。棒グラフは 2 つの technical replicate の平均値、エラーバーは \pm SEM を表す。(H) (F)のサンプル調製時に同時に行った poly(A)⁺ RNA FISH 実験。EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体発現誘導の条件をパネル内部に示す。EGFP-DIS3^{endo-exo}変異体の発現と局在は EGFP 由来の蛍光で観察した。Scale bar = 50 μ m。(I) (H)の定量。poly(A)⁺ RNA FISH シグナルの核/細胞質 (N/C)比を dox 0 ng/ml 添加条件の Control KD 細胞の平均値を用いて正規化した相対値を示す。

さらに、RRP6 によってコアへとリクルートされる MTR4 が、RRP6 がヌクレアーゼとして実行する poly(A)⁺ RNA 基質の分解にどの程度寄与しているかについても評価した。ここまでの結果で、MPP6 と MTR4 の結合は RRP6 による至適な poly(A)⁺ RNA 基質分解に不可欠であることが示唆された一方で、MPP6/DIS3 KD 条件や 4M チャネル閉塞変異型 RRP41 発現細胞において MPP6 KD 条件で観察される

poly(A)⁺ RNA 核内蓄積は微弱であった(図 13 B,C, 図 14 A, 図 19 A, B)。このことから、RRP6 を介してリクルートされた MTR4 は MPP6 の不在下でも RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質分解をある程度支持できると考えられる。RRP6 を介した MTR4-コア間の結合が RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質分解に寄与していることを確かめるため、野生型 MTR4、ヘリカーゼ活性のない変異型 MTR4 である Q144A 変異体、RRP6 と相互作用しない N 末端欠失変異型 MTR4 である Δ N75 変異体のそれぞれを FLAG 融合タンパク質としてドキシサイクリン誘導性に安定発現する U2OS Flp-In T-REx 細胞株を樹立した[(93), 図 24 A-E]。U2OS 細胞株でみられたように、U2OS Flp-In T-REx 細胞株でも内在性 MTR4 KD により顕著な poly(A)⁺ RNA の核内蓄積が誘導された(図 24 A-C)。内在性 MTR4 KD による poly(A)⁺ RNA の核内蓄積は、 Δ N75 変異型 MTR4 を発現させると野生型 MTR4 発現条件と同程度に効率よく回復した一方、Q144A 変異型 MTR4 の発現はむしろ poly(A)⁺ RNA 核内蓄積表現型を増強した(図 24 A-C)。この結果より、 Δ N75 変異型 MTR4 はヘリカーゼ活性を保持しており、また MTR4 が MPP6 でコアにリクルートされる場合には、MTR4-RRP6 間の結合は poly(A)⁺ RNA 基質分解に必須ではないことが示唆された。一方、 Δ N75 変異型 MTR4 は野生型 MTR4 に比べて、MTR4/DIS3 KD に由来する poly(A)⁺ RNA の核内蓄積を効果的に回復できなかった(図 24 A-C)。つまり、RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質分解が至適に行われるためには RRP6 と MTR4 の相互作用が必要と考えられる(補足図 1 vi)。また、MTR4/DIS3 を KD した Δ N75 変異型 MTR4 発現細胞においてさらに MPP6 を KD することで poly(A)⁺ RNA の蓄積に増強が観察された(図 24 A-C)。このことから、RRP6 と MTR4 の結合がない条件においては、MPP6 によってコアへとリクルートされた MTR4 が RRP6 による poly(A)⁺ RNA 基質分解を支持していると考えられる。以上の結果から、RRP6 が poly(A)⁺ RNA 基質分解活性を最大限に発揮するためには、MTR4 が RRP6 と MPP6 の双方に結合することが必要と結論づけられた。

以上のデータから、MPP6 と RRP6 は MTR4 とヌクレアーゼ活性を複合体内で結びつける上で物理的な結合量の維持にのみ機能しているのではなく、それぞれがエキソソーム複合体内において MTR4 を異なる配位状態に維持しており、その結果、RRP6 と DIS3 の各ヌクレアーゼによる基質分解に対しては MPP6 と RRP6 では異なる寄与を示すと考えられた。

第3節 MPP6はコアへとリクルートするMTR4複合体の種類を規定することでヒト核内エキソソームの基質特異性を制御する

3.1 ヒト核内エキソソームの基質 poly(A)⁺ RNA 同定のための新規解析手法の開発

続いて、MPP6がヒト核内で標的とする基質の範囲を明らかにするために、様々なエキソソーム補因子 KD 条件下 (Control KD, RRP6 KD, DIS3 KD, RRP6/DIS3 KD, RRP6/MPP6 KD, MTR4 KD, MPP6 KD, 図 25 A-C)における核内 poly(A)⁺ RNA トランスクリプトーム取得を目的とした次世代シーケンシング(NGS: Next Generation Sequencing)解析を行うことにした。エキソソームや補因子の基質についての網羅的解析は、これまでその多くが HeLa 細胞を用いて行われてきたため (46, 47, 61, 80, 81, 88, 114)、これらの解析結果を参照できるように本解析についても HeLa 細胞を用いて行った。エキソソームの阻害時に生じる poly(A)⁺ RNA foci には PABPN1 が結合しており、疾患の原因となる PABPN1 の凝集体で観察されるような抽出性の低い強固な構造体を連想させた(115, 116)。細胞からの RNA 抽出時に加熱を伴う Acid Guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform(AGPC)抽出法を用いると、このような凝集体内の RNA、特に architectural noncoding RNA と呼ばれる非膜性構造体の足場となる RNA の抽出効率を向上できることが報告されている(117)。しかし、エキソソームの阻害により生じた poly(A)⁺ RNA 凝集体内の転写物を抽出するためにこの方法で十分かどうかは不明であった。そこでまず、超音波と加熱を併用した過酷な抽出方法 (sonic 法) を試し、この方法が核エキソソームの代表的な基質の抽出効率をさらに高めるかどうか検討した(図 25 D)。既報の通り、加熱した AGPC 法 (hp 法; Hot Phenol 法) はパラスペックルに関連する architectural noncoding RNA である *NEAT1_2* の抽出効率を大きく向上させた[(117)図 25 D]。この方法によって、エキソソームの基質である *SNHG19* や *SNHG10* についても抽出効率の向上がわずかながら観察された(図 25 D)。加熱に加えて超音波処理を行うと、*SHNG19* と *SNHG10* の相対量はさらに増加したことから、抽出率が極めて低いこれらのエキソソーム基質 RNA にも超音波処理は有効であることが示唆された(図 25 D)。

しかし、超音波処理を施すこの方法を用いることで確かに基質 RNA の抽出効率は向上した一方、調製した RNA の品質を示す指標である RNA Integrity Number の低下を伴う大幅な RNA 分解が観察された(図 25 E, パネル左下)。このような品質の低下は hp 法で調製した RNA では見られなかった(図 25 E, パネル左上)。また、超音波処理サンプルでは *NEAT1_2* と *PGK1* の qPCR による検出量は減少した(図 25 D)。これらの転写物については断片化の影響が抽出効率向上の影響を上回った

と考えられる。このような RNA の断片化はシーケンスに供する cDNA ライブラリーの調製に影響して得られる結果の定量性を損なう可能性がある。そこで、この断片化の影響を最小限に抑えるため、3'末端の poly(A)⁺ tail の上流の狭い領域に限定した配列の cDNA ライブラリーを作製することにした(材料と方法 10)。調製した cDNA ライブラリーのサイズ分布は、超音波処理により断片化した total RNA でも hp 法で抽出した total RNA から調製した cDNA ライブラリーと類似していた(図 25 E, パネル右上)。合成された cDNA ライブラリーについて Hiseq2500 によるシーケンスにより塩基配列を取得した。所得した配列はトリミング後、hg19 ヒトリファレンスゲノムにマッピングした。

用いた cDNA ライブラリーはゲノム上の解析対象とする領域が狭いため、遺伝子長を用いたリードカウントの正規化は不適切である。さらに、イントロンとエクソンの両方を含む「遺伝子」のアノテーションを用いた単純なリードカウント(gene feature counting)を発現変動解析の入力に用いると、低密度のリードで覆われた長いイントロンに由来する偽陽性基質を検出する傾向が見られた(図 26 A-C)。そこで本解析では、このようなノイズを避け、かつ解釈を単純化するために、「エクソン」のアノテーションに限定してリードカウントを取得した(exon feature counting)。マッピングされたリードのカウントデータを用いて DESeq2 による発現変動解析を行った [(118), 図 27]。FDR(False discovery rate) <0.05 かつ $\log_2FC(\log_2 \text{ Fold Change}) > 0.85$ という基準を満たした遺伝子由来の転写物を有意に安定化した基質と定義した。(118)

その結果、hp 法で調製したサンプルについて RRP6/DIS3 KD により安定化した基質のほとんどは、sonic 法で調製したサンプル内においても RRP6/DIS3 KD 時に安定化した基質として検出された(図 27 A-C)。また、RRP6/DIS3 KD により安定化した基質の数は sonic 法で調製したサンプルでは hp 法サンプルに比べて大幅に増加した(図 27 A-C)。さらに、hp 法と sonic 法の両方で安定化した基質についても、その安定化の度合いは hp 法に比べて sonic 法で全体的に高い傾向が観察された(図 27 A-C)。これらの結果から、sonic 処理は核内エキソソーム機能の低下により安定化した基質の抽出効率を大幅に改善すると考えられた。

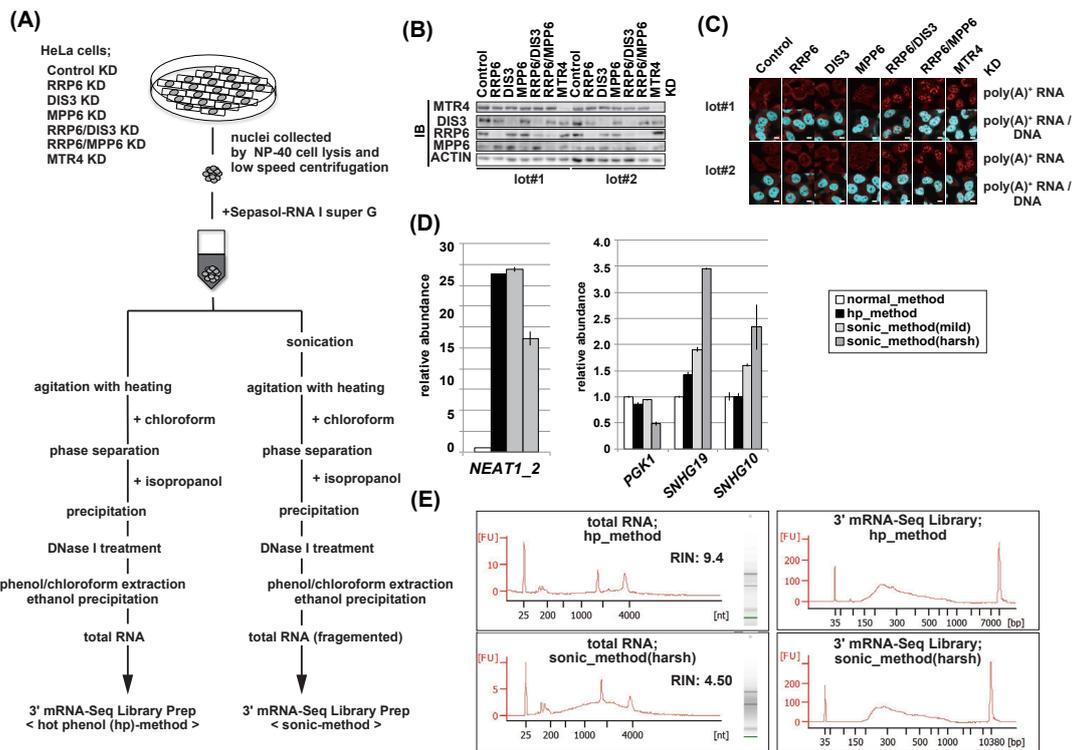


図 25. ヒト核内エキソソーム poly(A)⁺ RNA 基質同定のための NGS サンプル調製

(A) NGS サンプルの調製のワークフロー。(B),(C) 本解析で用いた NGS サンプルの lot チェック。サンプルは replicate = 2 で調製した。(D), (E) RNA 抽出ステップにおける超音波処理の効果。(B) HeLa 抽出物のイムノブロット解析。KD した因子をパネルの上部に記載した。(C) poly(A)⁺ RNA FISH 実験。KD した因子をパネルの上部に記載した。Scale bar = 10 μ m。(D) RRP6/DIS3 KD HeLa 細胞の核から抽出した *PGK1*, *SNHG19*, *SNHG10*, *NEAT1_2* の RT-qPCR による定量。RNA 抽出は、normal 法、hp 法、sonic 法のいずれかを行い、sonic 法については、1 秒間の sonication と 1 秒間の静止を 20 回繰り返す harsh 法と、同じサイクルを 10 回繰り返す mild 法についても比較した。抽出と RT-qPCR はそれぞれ 2 つの technical replicate について実施した。値は、GAPDH と normal 法サンプルの値で正規化した各転写物の相対量を示す。棒グラフおよびエラーバーは、平均値 \pm SEM を示す。(E) HeLa 細胞から抽出した total RNA のサイズ分布(左側パネル)と、その結果得られた 3' mRNA-seq cDNA ライブラリーのサイズ分布(右側パネル)を電気泳動により観察した。上段は hp 法のサンプル、下段は sonic 法のサンプルのデータ。縦軸は蛍光量、横軸は分子サイズを示す。RIN: RNA Integrity Number。

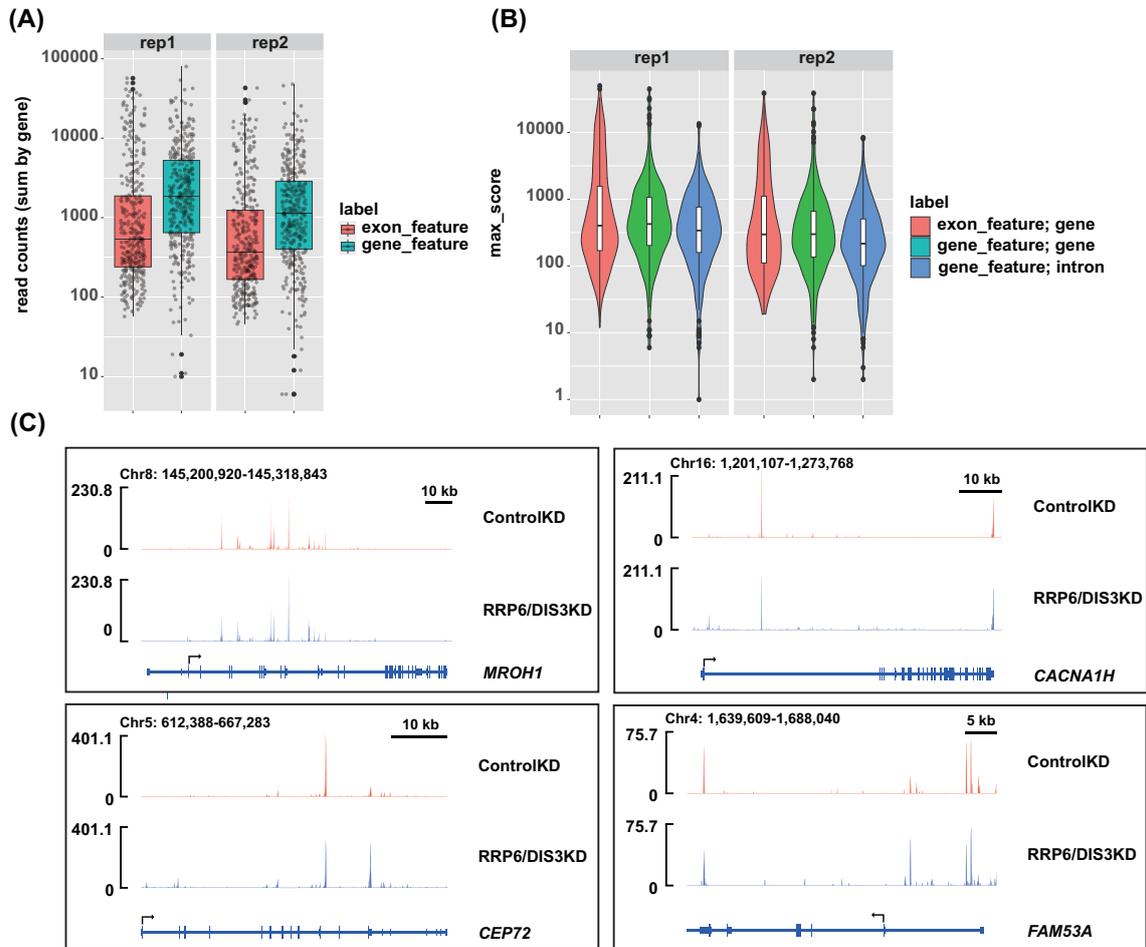


図 26. 遺伝子単位の解析では低密度のリードで覆われた長いイントロン由来の偽陽性基質が検出されやすい

(A) exon feature を用いて取得したリードカウントから同定したエキソソーム基質 (362 遺伝子) と gene feature counting を用いて取得したリードカウントから同定したエキソソーム基質 (373 遺伝子) の総リード数を遺伝子ごとに比較した。リードカウントは RRP6/DIS3 KD サンプル由来のものを用い、各 replicate、rep1、rep2 内で比較した。(B) exon あるいは gene feature それぞれを用いたリードカウントデータから同定されたエキソソーム基質の遺伝子の最大リードカバレッジスコアのバイオリンプロット。(A) で見られるように、同定したエキソソーム基質における遺伝子ごとの総リード数では gene feature counting が exon feature counting を圧倒しているにも拘らず、遺伝子ごとの最大リードカバレッジスコアは gene feature counting は exon feature counting に比べて小さい傾向にあった。gene feature counting で同定したエキソソーム基質遺伝子のイントロンにおける最大リードカバレッジスコアは特に低い傾向にあった。すなわち gene feature counting では低密度のリードに覆われた長いイントロンを持つ遺伝子を発現上昇遺伝子として検出しやすい傾向があった。遺伝子内で比較的長い領域であるイントロンにおけるリードの密度の低さが遺伝子全体としての低いリードカバレッジの要因である可能性がある。(C) gene feature counting によって同定された複数の偽陽性遺伝子のゲノムブラウザビュー。ゲノム上の位置はトラックの上部に、遺伝子名と構造は下部に記載した。リードカウントはトラックの左側に表示した。2 つの replicate のオーバーレイを示す。Control KD サンプルは赤で、RRP6/DIS3 KD サンプルは青で表示した。

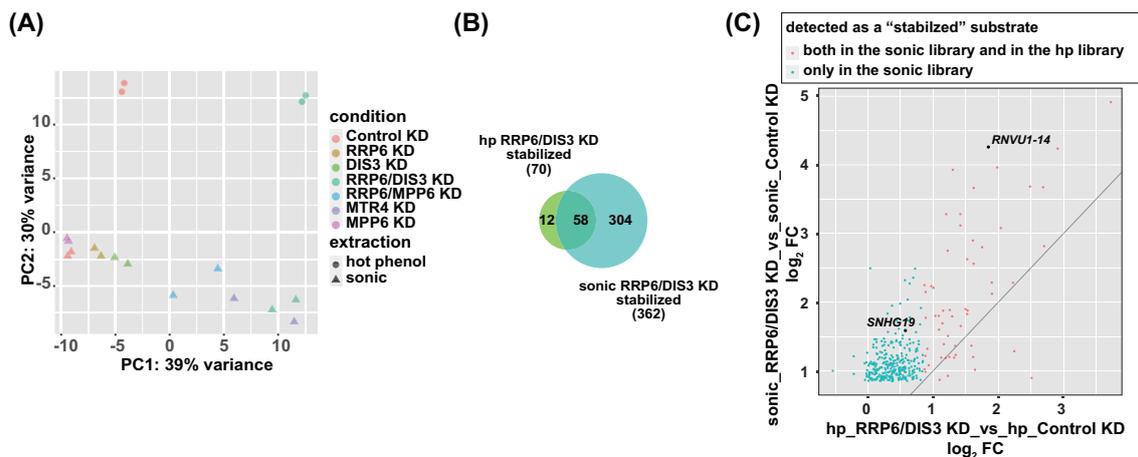


図 27. hp 法と sonic 法の比較

(A) NGS サンプルの主成分分析(PCA)。サンプル間のコントロールとして ERCC spike-in controls でリードカウントを正規化し、regularized log count(rlog カウント)を取得した。これら rlog カウントを用いて PCA を行った。サンプル作製条件の色分けを右に示す。抽出方法は○印と△印で区別した。(B) hp 法と sonic 法で調整した RRP6/DIS3 KD サンプルそれぞれから同定した安定化基質を比較したベン図。数値は各カテゴリーの基質の数を示す。(C) sonic RRP6/DIS3 KD サンプルで安定化した基質について、hp RRP6/DIS3 KD サンプルにおける log₂ Fold Change (log₂ FC) を sonic RRP6/DIS3 KD サンプルにおける log₂ FC と比較プロットした。図中の線は、y = x を示す。

sonic 法サンプルにおいて RRP6/DIS3 KD によって安定化する基質として検出されたもの、すなわち本解析で解析対象とするゲノム領域内における核内エキソソームの poly(A)⁺ RNA 基質全体を、RRP6 または DIS3 に対する感受性に応じて 4 つのクラスに分類した(図 28 A)。クラス 1 : RRP6 の単独 KD で安定化し、DIS3 の KD では安定化しないエキソソーム基質、クラス 2 : DIS3 の単独 KD で安定化し、RRP6 の KD では安定化しないエキソソーム基質、クラス 3 : RRP6 あるいは DIS3 いずれかの単独 KD で安定化するエキソソーム基質、クラス 4 : RRP6 と DIS3 の両方を KD した場合にのみ安定化するエキソソーム基質。これらのうちクラス 4 は、RRP6 と DIS3 が冗長的に分解に機能するバルクの poly(A)⁺ RNA 基質群に相当する。適用した基準下では、クラス 1 とクラス 2 に分類された基質はごくわずかであった。クラス 1 は RRP6 によって特異的に分解されるエキソソーム基質から構成されると考えられ、以前の報告と合致して、このクラスには 45S rRNA 前駆体が含まれていた[(34–36)クラス 2 は DIS3 によって特異的に分解されるエキソソーム基質群と考えられる。このクラスの標的が DIS3 の非存在下で RRP6 活性の影響を受けない理由は今の所不明だが、今回の解析でこのクラスに分類された標的については以前の解析でも DIS3 の核内基質として同定されている[(36), 図 28 B]。クラス 3 については、RRP6 と DIS3 が同一の基質について異なる分解ステップを担っているようなメカニズムが予想されるが、本解析の基準でこのクラスに分類されたものはなかった。最も大きなクラスであるクラス 4 内の標的はこれまでの解析で報告されているエキソソーム基質分子を豊富に含

んでいた[(47, 65, 67, 68, 72, 76, 77, 82, 119, 120), *SNHGs*, *proDNAJB4*, *vU1snRNAs*, *RNU5Es*, *pseudo U2snRNAs*, *U4ATAC*, *PCF11 IPA transcripts*, *DNAJC30*, *c12orf57*, *MIR17HG*, *SNORD83A*, *LINC01311*, *RNF139-AS*など]。また、本解析でエキソソーム基質として同定された標的について既報の CLIP-seq (Cross-linking immunoprecipitation sequencing) データを再解析した結果、DIS3 との物理的な結合も確認された[(36, 37), 図 28 D]。

これらのデータから、今回開発した解析手法は新たな核内エキソソームの基質 RNA を探索する上で有効だけでなく、従来の解析法で同定された基質も検出可能とする妥当な解析手法であると考えられた。このため、以降の解析は基本的に sonic 法で調製したサンプルについて実施した。

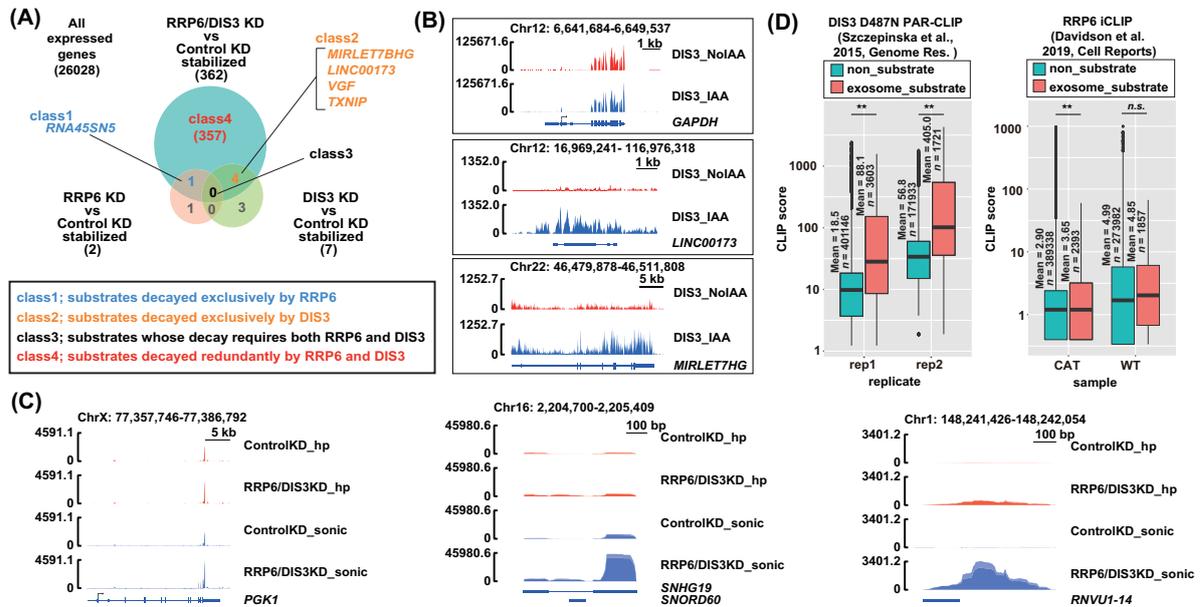


図 28. 核内エキソソーム poly(A)+ RNA 基質同定における sonic 法の有効性

(A) RRP6 と DIS3 への感受性に基づくエキソソーム基質分類。挿入図に各クラスの説明を記載した(本文参照)。(B) 公開データ(GSE120574)の再解析。オーキシンドグロン法による DIS3 の急速な枯渇に伴う class2 内エキソソーム基質の *LINC00173* と *MIRLET7HG* の安定化。 *GAPDH* はコントロールとして使用した。遺伝子領域のゲノムブラウザービューは図 26 (C)と同様に示した。DIS3_NoIAA はコントロールサンプル、DIS3_IAA は DIS3 を枯渇させたサンプルをそれぞれ表す。(C) 図 27 (C)の黒字で示した遺伝子および対照の *PGK1* についてのゲノムブラウザービュー。図 26 (C)と同様に示した。hp 法のサンプルは赤、sonic 法のサンプルは青で記載した。(D) DIS3(GSE64332) および RRP6(GSE120574)の公開 CLIP データを再解析し、sonic RRP6/DIS3 KD で発現上昇の見られた遺伝子と見られなかった遺伝子、すなわち「エキソソーム基質」と「非基質」の間で CLIP スコアを基質ごとに比較した。DIS3 の CLIP データについては、replicate(rep1 および rep2)ごとにスコアを比較した。CAT および WT は、それぞれヌクレアーゼ不活性な RRP6 および野生型 RRP6 を示す。CAT と WT については、replicate をマージしたデータを示した。統計解析は連続性の補正を用いた Wilcoxon 順位和検定で行った。

3.2 MPP6 の標的となるエキソソーム poly(A)⁺ RNA 基質の内容解析

RRP6 KD、MPP6 KD および RRP6/MPP6 KD サンプルで得られたデータを解析した結果、RRP6/MPP6 KD によって安定化した 53 個の poly(A)⁺ RNA 基質のうち 48 個について、RRP6 と MPP6 の単独 KD では安定化せず、同時 KD 条件でのみ安定化が観察された(図 29 A)。ここまでのデータから、MPP6 KD 条件では DIS3 は poly(A)⁺ RNA 基質にアクセスできないと考えられるため、これらの基質は RRP6 と DIS3 の活性によって冗長的に分解される基質群と考えられた。実際にこれらの基質の多く(53 個の基質のうち 45 個)は、先述のクラス 4 : RRP6 と DIS3 の両方を KD した場合にのみ安定化するエキソソーム基質群に属していた(図 29 B)。一方、核内エキソソームの基質全体(RRP6/DIS3 KD 安定化基質)に占める RRP6/MPP6 KD で安定化する基質の割合は非常に限定されたものだった(図 29 B)。エキソソーム基質における全体的な安定化は RRP6/DIS3 KD 時よりも RRP6/MPP6 KD 時の方が小さい傾向にあったが、個別のエキソソーム基質ごとに評価すると、RRP6/DIS3 KD 時と同程度に RRP6/MPP6 KD で安定化するものもあれば、RRP6/DIS3 KD 時にのみ安定化して RRP6/ MPP6 KD では安定化の見られない基質もあった(図 29 C)。例えば、snRNA に分類されるエキソソーム基質については RRP6/DIS3 KD 時と RRP6/MPP6 KD 時の両方で安定化が見られるのに対し、snoRNA に分類されるエキソソーム基質については RRP6/MPP6 KD 時には安定化するものは少なかった。つまり RRP6/ MPP6 KD で安定化する基質の範囲の狭さは必ずしも全体的な安定化の程度の小ささによるものではなく、RRP6 と MPP6 が標的とする分子の特異性を反映したものと考えられた。

この様に比較的限られた基質の範囲が窺えるにも拘らず、RRP6/MPP6 KD 時には顕著な poly(A)⁺ RNA 核内蓄積が見られることから、これらの RRP6/ MPP6 KD 感受性の基質は安定化すると凝集体を形成しやすい傾向を持つと予想された。この仮説を支持するように、sonic 法による抽出効率の向上は RRP6/ MPP6 KD 感受性のエキソソーム基質分子の方が RRP6/ MPP6 KD 非感受性のエキソソーム基質に比べて大きい傾向にあった(図 30 A)。また特異的プローブを用いた FISH 法によって、同定した RRP6/ MPP6 KD 感受性のエキソソーム基質のうち *RNVU1-20* と *RNVU1-14* について細胞内局在を観察したところ、エキソソーム阻害条件で誘導される poly(A)⁺ RNA 凝集体内に含まれる様子が観察された(図 30 B)。

これらの結果から、RRP6/ MPP6 KD 感受性の基質群は、エキソソームの poly(A)⁺ RNA 基質のうち、凝集体を形成しやすい特定のサブセットを構成していると考えられる。

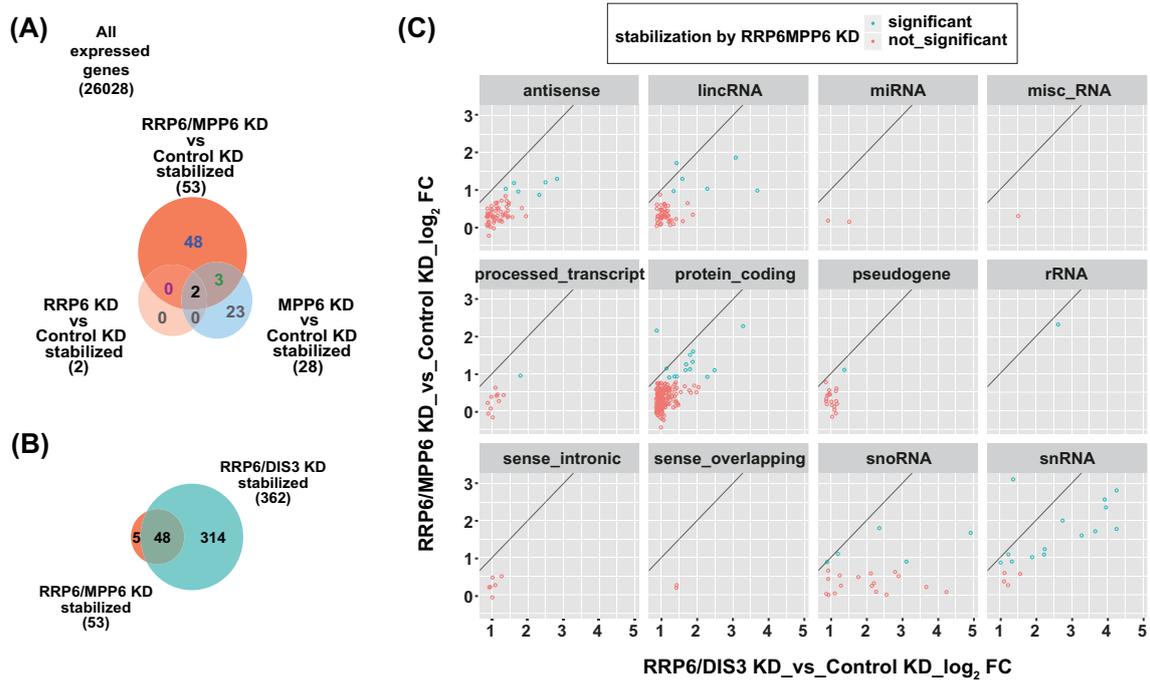


図 29. RRP6 と MPP6 が重複して分解する poly(A)+ RNA 基質

(A) RRP6 と MPP6 への感受性に基づく poly(A)+ RNA 基質の分類。(B) RRP6/DIS3 KD と RRP6/MPP6 KD サンプル間で安定化 poly(A)+ RNA 基質を比較したベン図。(C) RRP6/DIS3 KD サンプルで安定化したエキソソーム poly(A)+ RNA 基質について、RRP6/DIS3 KD と RRP6/MPP6 KD による基質ごとの発現変動 (\log_2 FC) を gene-biotype ごとに分類してプロットした。図中の線は $y = x$ を示す。

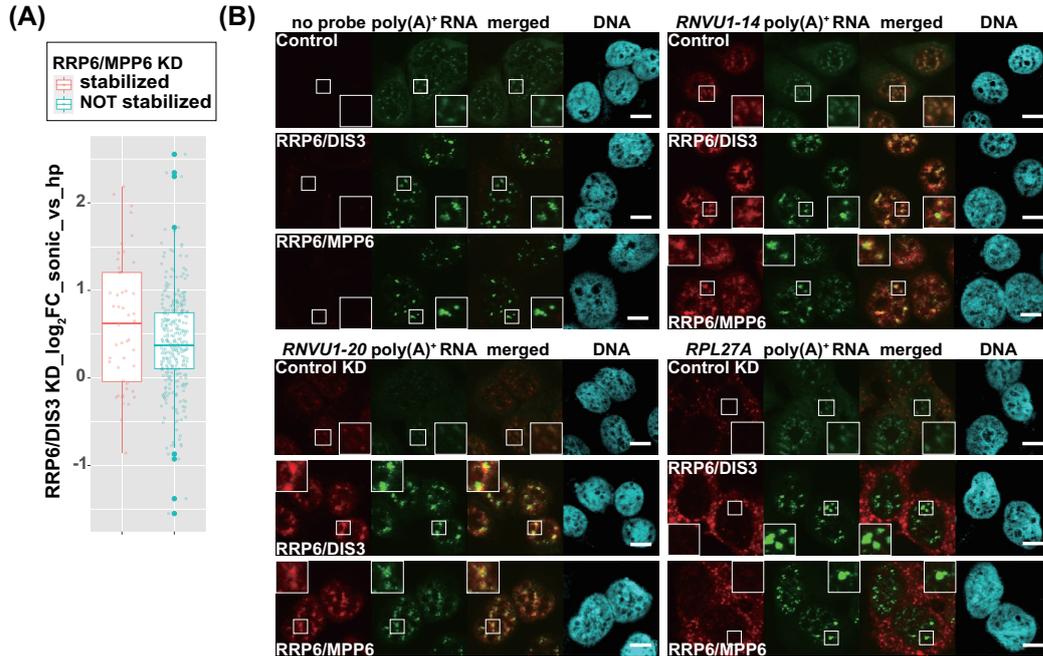


図 30. RRP6/ MPP6 KD 感受性の poly(A)⁺ RNA 基質は安定化すると凝集体を形成しやすい
 (A) エキソソーム基質(RRP6/DIS3 KD で安定化する基質)を RRP6/MPP6 KD で安定化するものと安定化しないものに分類し、両者の間で超音波処理が抽出効率に与える影響を比較した。基質ごとの sonic 法サンプルの log₂ FC (hp 法サンプル比)をプロットした。(B) DIG 標識 RNA プローブを用いて *RNVU1-14*, *RNVU1-20*, *RPL27A* を poly(A)⁺ RNA と同時に可視化した。KD した因子はパネル内に記載。一部拡大したものを挿入図に示す。Scale bar = 10 μm。 *RNVU1-20* 由来のシグナルはコントロール KD 細胞では極めて低く、RRP6/DIS3 KD および RRP6/ MPP6 KD 条件で poly(A)⁺ RNA foci と共局在して増強した。一方 *RNVU1-14* 由来のシグナルはコントロール KD 細胞でもスペckル様の局在を弱く示したが、これは *RNVU1-14* の配列が U1snRNA の配列に高い相同性を持つために *RNVU1-14* に対するプローブが核内に豊富に存在する U1snRNA を検出したためと考えられる。*RNVU1-14* についても RRP6/DIS3 KD および RRP6/ MPP6 KD 条件でシグナルは強くなり、スペckル様の局在とは別に、poly(A)⁺ RNA foci と共局在する様子が観察された。一方、核内エキソソームの基質 poly(A)⁺ RNA のうち、RRP6/MPP6 KD 時には安定化のみられなかった *RPL27A* については RRP6/DIS3 KD および RRP6/ MPP6 KD 条件でシグナルの増大は観察されたものの、その主な局在は細胞質であり、poly(A)⁺ RNA foci とは共局在しなかった。

3.3 MPP6 感受性のエキソソーム poly(A)⁺ RNA 基質の特徴

続いて RRP6/ MPP6 KD 感受性のエキソソーム poly(A)⁺ RNA 基質にみられる特徴の抽出を試みた。gene-biotype の内訳をみると、RRP6/ MPP6 KD で安定化する poly(A)⁺ RNA にはエキソソームの基質 poly(A)⁺ RNA 全体に比べて long noncoding RNA が多かった(図 31 A)。最も濃縮が見られたのは snRNA であり、同定した 14 個の snRNA 基質のうち 13 個は正規の snRNA ではなく、variant snRNA あるいは pseudo gene に分類されていた。また、RRP6/ MPP6 KD 感受性で protein-coding に分類される基質の内容を精査すると、その多くはヒストンタンパク質をコードするものだった(同定した 14 個の protein-coding 基質のうち 12 個)。正規の snRNA およびヒストン mRNA が適切なプロセッシング過程を経る場合は、その 3'末端は poly(A)⁺ 鎖を付加されることはない。しかし variant snRNA の場合やヒストン

mRNA のプロセッシングが適切に行われない場合には、これらの転写物の 3'末端は poly(A)⁺鎖付加を受け、正規の転写産物とは異なる運命を辿ることが報告されている (61, 76, 77, 120–122)。variant snRNA とヒストン mRNA は RRP6/MPP6 KD で安定化した基質の半数以上を占めていた。

さらに、RRP6/MPP6 KD で安定化するエキソソーム基質を MTR4 に対する感受性に基づいて分類した(図 31 B)。その結果ほとんどが MTR4 KD 感受性を示したことから、MPP6 が支持する形で RRP6 と DIS3 によって冗長的に行われる基質分解は、MTR4 活性に強く依存すると考えられた。一方、基質全体および RRP6/MPP6 KD 感受性が低い基質 (図 31 B RRP6/MPP6 KD NOT stabilized) では MTR4 感受性が比較的低かった。しかし、NGS 解析に供した HeLa 細胞の MTR4 KD 条件では基質の核内繫留システムは弱まっていると考えられるため(図 9, 図 10)、核内の poly(A)⁺RNA を対象とする本解析ではこれらのエキソソーム基質の分解における MTR4 の寄与度が過小評価されている可能性は排除できない。

このように、RRP6/MPP6 KD で安定化するエキソソーム基質の範囲は核内エキソソーム基質全体に対して非常に限られていたことから、MPP6 に依存しないエキソソーム活性の存在が予想された。そこで細胞内のどの補因子複合体が関与するエキソソームによる分解プロセスを MPP6 が促進しているか調査することにした。具体的には、PAXT 複合体と NEXT 複合体それぞれに特異的な感受性を示す PROMPT 分子の分解における MPP6 の機能を評価した(図 31 C)。PROMPT 分子および、その PAXT 複合体と NEXT 複合体への感受性に関するアノテーションは既に報告されているものを利用した(80)。その結果、本解析でエキソソーム基質として有意に安定化した PROMPT の数は非常に限られていたため(図 31 C, LiftOvered PROMPT 全 5582 個中 88 個)、統計的に有意な差としては検出されなかったものの、NEXT 複合体に感受性をもつ PROMPT(NEXT-PROMPT)よりも PAXT 複合体に特異的な感受性を示す PROMPT(PAXT-PROMPT)の方が、RRP6/MPP6 KD 時には大きく安定化する傾向にあった。一方、エキソソーム活性が完全に阻害されていると考えられる RRP6/DIS3 KD 時には、NEXT-PROMPT と PAXT-PROMPT 間で安定化の程度に差は見られなかった。この結果より、PAXT 複合体感受性の基質は NEXT 複合体感受性の基質に比べて、MPP6 の支持するエキソソーム活性の標的になりやすいと考えられる(80)(114)。これらの結果から、MPP6 を動員したエキソソーム複合体は、広汎な基質分解を支持するというよりは、特定のエキソソーム基質サブセットの分解を担う特異的な装置として機能することが示唆された(図 32)。

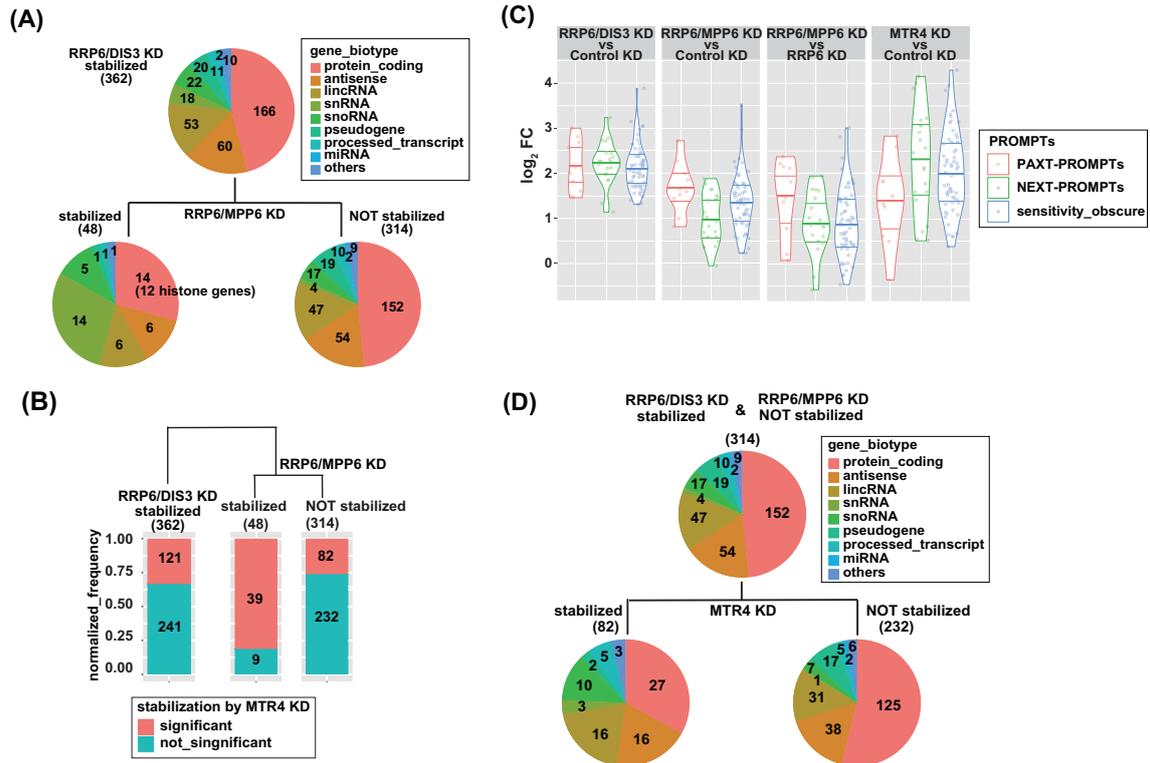


図 31. MPP6 に感受性をもつエキソソーム poly(A)+ RNA 基質の特徴

(A) RRP6/DIS3 KD で安定化した poly(A)+ RNA 基質(核内エキソソームの poly(A)+ RNA 基質全体に相当する)を RRP6/MPP6 KD 感受性に基づいてサブクラスに分類し、基質の gene-biotype の内訳を示した。Others は、sense intron RNA、sense overlapping RNA、misc RNA、rRNA をコードする遺伝子に分類されたものの総和。数値は各カテゴリーの基質の数を示す。(B) (A) と同じサブクラス間の MTR4 に対する感受性比較。数値は各カテゴリーの基質の数を示す。(C) PAXT-PROMPT および NEXT-PROMPT の安定化に対する RRP6/MPP6 KD の影響。パネル上部に記載した条件で各 PROMPT に見られた発現変動 log₂ FC をバイオリンプロットで示す。RRP6/DIS3 KD サンプルにおいて発現が安定化した PROMPT のみについて解析した。(D) RRP6/DIS3 KD 安定化基質内の RRP6/MPP6 KD 非感受性サブクラスをさらに MTR4 KD 感受性に基づいて分類し、各クラスにおける基質の gene-biotype の内訳を示した。Others は、sense intron RNA、sense overlapping RNA、misc RNA、rRNA をコードする遺伝子に分類されたものの総和。数値は各カテゴリーの基質の数を示す。

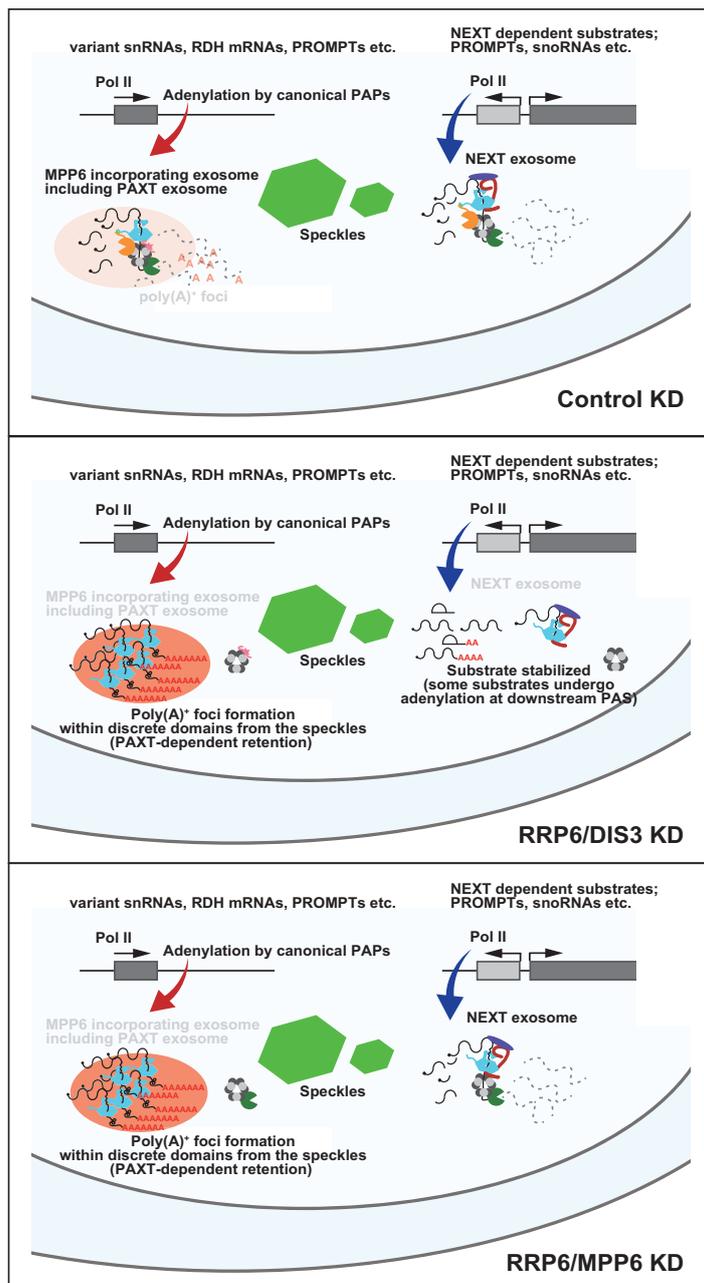


図 32. ヒト核内での MTR4 依存的なエキソソーム poly(A)⁺ RNA 基質分解における MPP6 機能のモデル

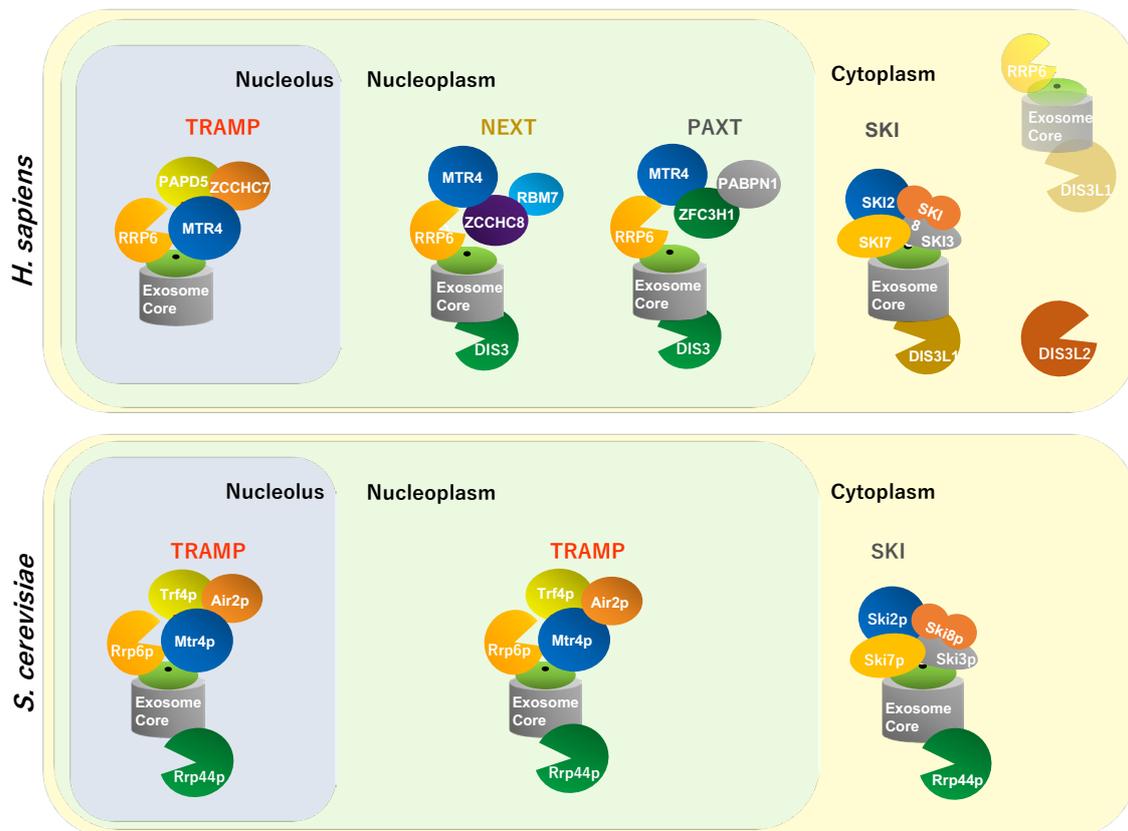
(Control KD) Control KD 細胞核内では、MPP6 結合型のエキソソーム複合体(PAXT 複合体随伴エキソソームを含む)が、ARS2 を介した短い転写単位 (TU) の転写終結によって生じた variant snRNA やヒストン(RDH)コード mRNA などの poly(A)⁺ 鎖の付与された形態の基質を分解する(考察の項も参照)。MPP6 に依存しないエキソソーム複合体も存在し、他の基質分解に機能している。代表的な例として、イントロンにコードされた snoRNA や NEXT-PROMPT の分解に機能する NEXT 複合体随伴エキソソームについて描写した。(RRP6/DIS3 KD) RRP6/DIS3 KD はエキソソーム基質全体を安定化させる。poly(A)⁺ RNA 基質は、通常の状態では MPP6 が組み込まれたエキソソーム複合体によって分解されるが、RRP6/DIS3 KD 時には安定化されて PAXT 複合体依存的に核スペックルとは別の未知の核内ドメインに繫留され、MTR4 の集積した poly(A)⁺ RNA foci が形成される。NEXT 複合体の標的の一部は安定化すると、配列内に潜在するポリアデニル化シグナル(PAS)が post-transcriptional に利用され、poly(A)⁺ 鎖付加されると考えられる。(RRP6/MPP6 KD) RRP6/MPP6 KD 条件下では、RRP6/DIS3 KD 細胞の核内で観察されるような poly(A)⁺ RNA foci が出現する一方、NEXT 複合体に依存した基質分解は維持されている。

考察

補因子 MPP6 がエキソソームコアと重要な核内補因子である MTR4 との物理的相互作用を支持する能力を持つことは、これまでの *in vitro* 再構成実験で明快に示されている一方(94–97)、実際の細胞内でのエキソソーム複合体形成や基質分解における MPP6 の重要性は不明であった。本解析では、ヒト細胞核内において MTR4 とコアとの相互作用を MPP6 が維持する分子機構について、*in vitro* の解析結果とよく一致する形で再現するとともに、細胞内においては RRP6 と MPP6 それぞれがコアへリクルートした MTR4 には機能的な差異のあることを明らかにした。また、MPP6 はエキソソーム基質のうち特定の基質サブセットの分解を担っており、このサブセットへの特異性は MPP6 が特定の MTR4 を含む補因子複合体とコアとの結合を支持することで生じている可能性が示唆された。

ヒト核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解における RRP6 と DIS3 の機能的冗長性

本解析結果は RRP6 と DIS3 の 2 つのヌクレアーゼそれぞれが核質内のエキソソーム基質の分解に冗長的に機能し得ることを示している。以前の報告では、核質内のエキソソーム基質分子については主に DIS3 によって分解されることが示唆されていた(36, 37)。本解析で同定したエキソソーム基質についても RRP6 ではなく DIS3 と有意に結合することが CLIP データの再解析から示された。さらにオーキシシゲロン法を用いた DIS3 の急速な枯渇によって同定したエキソソーム基質の安定化が引き起こされることも公開データの再解析から確認された。したがってこれらのエキソソーム基質は通常 DIS3 によって分解されており、RRP6 は DIS3 KD 時にのみ分解に機能するようである。このような RRP6 による DIS3 機能の補填は、以前にいくつかの PROMPT 分子についてのみ観察されており、そのメカニズムは DIS3 の不在時に RRP6 が主な局在箇所である核小体から核質へと局在を変化させる機構によって説明されている(36)。本解析では RRP6 の細胞内分布にそのような顕著な変化は検出されなかったが、DIS3 KD 時には RRP6 を含む他のエキソソーム因子の発現量に幾分増加が観察された(図 5 A, 図 13 A)。この発現上昇により、RRP6 の組み込まれたエキソソーム複合体が核質において増加した可能性がある。DIS3 KD 条件では poly(A)⁺ RNA 強度の核/細胞質比がしばしば有意に低下することからも(図 5 B,C, 図 12 A,B)、RRP6 動員型のエキソソーム複合体は核質において効率的に poly(A)⁺ RNA 基質を分解する能力を持つと考えられる。



補足図 1. ヒトと酵母の細胞内各コンパートメントにおけるエキソソーム複合体の構成
 出芽酵母では核と細胞質の双方でヌクレアーゼ Rrp44p がコアの下部に結合しているのに対し、ヒトにおいては Rrp44p のホモログである DIS3L1 と DIS3 が細胞質と核のそれぞれでコアに結合して機能している。ヒトにおける Rrp44p のもう一つのホモログである DIS3L2 は細胞質に局在しているが、コアとは結合しない。コア上部に結合する酵母の Rrp6p およびヒトの RRP6 は核質にも存在するが、その局在は特に核小体に濃縮して観察される。ヒトやハエにおいては、細胞質における少量の RRP6 の存在よびその機能を示唆する報告がある(19, 123–126)。細胞質エキソソームの特異的な補因子である SKI 複合体は RRP6 と競合する形でコアに結合している(127)。酵母では核内の広汎なエキソソーム機能に TRAMP 複合体が補因子として機能する一方、ヒトにおいては基質である RNA の多様性に対応するため、エキソソームは核小体内では TRAMP 複合体、核質では PAXT 複合体と NEXT 複合体の複数の補因子を動員している。

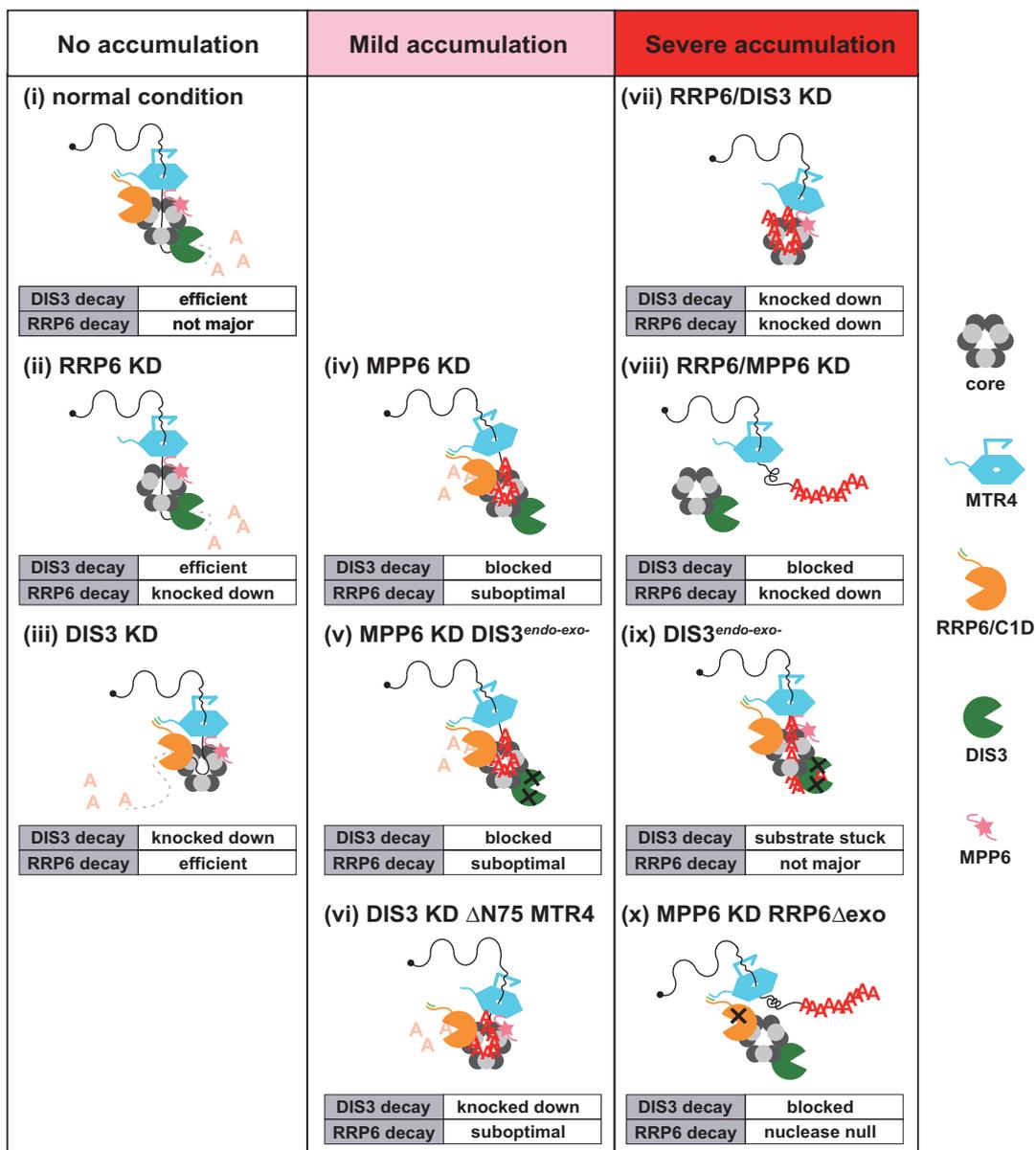
ヒト核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解における MPP6-MTR4 間相互作用の重要性

MPP6 は異なる領域で MTR4 とコアに同時に結合し、この能力は DIS3 と RRP6 による基質分解を促進的する上で不可欠である。RRP6 が実行する poly(A)⁺ RNA 基質分解については、MPP6 と MTR4 の結合は至適な分解活性に必要ではあるが、RRP6 のみに結合した MTR4 によっても部分的な活性は維持される(補足図 2 iv)。一方、DIS3 が実行する poly(A)⁺ RNA 基質分解については MPP6 結合型の MTR4 が必須であり、RRP6 でリクルートされた MTR4 ではこのプロセスを支持できないと考えられる(補足図 2 iv, v, x)。本解析内で、RRP6 KD 条件では MPP6 KD に比べて MTR4 とコアの結合量はより大きく減少し(図 18 A-F)、かつ MPP6 量にも微弱ではあるが減少が見られるのにも拘らず(図 13 A, 図 15 C)、poly(A)⁺ RNA 基質の蓄積は

MPP6 KD 条件の方が RRP6 KD 時より顕著であった(図 13 B, C)。つまり、DIS3 による poly(A)⁺ RNA の分解は MPP6 が相当量減少しない限り維持されると考えられ、MPP6 によって支持される MTR4・コア間結合の重要性が窺える。このように少なくとも一部の基質の分解において、MPP6 によりリクルートされた MTR4 は RRP6 がリクルートする MTR4 では代替できない機能を有することを本解析結果は示している(補足図 2 x)。しかし以前の *in vitro* 解析で観察されたように、RRP6 でコアへとリクルートされる MTR4 が、本解析では対象としていない poly(A)⁺ 鎖を持たない基質について DIS3 による分解プロセスを支持する可能性も否定できない(94-97)。

MPP6 感受性基質サブセットが顕著な poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型を呈する原因

NGS 解析から、MPP6 はエキソソーム基質のうち限られたサブセットの分解に参与していることが示された。このように基質の範囲は狭いにも拘らず、これらの基質は安定化すると非常に強固な poly(A)⁺ RNA の蓄積として顕れる。本解析内で観察された各基質の安定化時の発現量は、RRP6/MPP6 KD 感受性の基質の方が非感受性の基質に比べて高い傾向にあった(補足図 3 A)。しかしながら、RRP6/MPP6 KD 非感受性基質サブセットはその遺伝子数において感受性基質を圧倒しており、RRP6/MPP6 KD 感受性基質の高発現だけで顕著な poly(A)⁺ RNA シグナルを説明することは困難である。現在のところ顕著な poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型の原因を結論づけることはできないが、poly(A)⁺ 鎖の伸長や凝集体形成による多数の基質の空間的濃縮など、発現量以外にもエキソソーム阻害条件で基質の獲得しうる特性が顕著な表現型に帰結している可能性も十分考えられる(66, 79, 128, 129)。poly(A)⁺ 鎖の伸長や強固な凝集体形成は PAXT 複合体に感受性を示す基質が安定化した際にみられる特徴であり、本解析で同定した MPP6 が標的とする基質についても PAXT 複合体感受性の高い傾向が見られるため、こういった特性を備える可能性は高いと考えられる。実際に MPP6 感受性の基質について難抽出性が観察され(図 30 A)、いくつかの基質については poly(A)⁺ RNA foci の形成も確認された(図 30 B)。一方この可能性に加えて、本解析の解析範囲である「エクソン」の外側にマッピングされた poly(A)⁺ 鎖を持つ多くの 3'末端が、RRP6/MPP6 KD 時の顕著な poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型に貢献している可能性もある(リードの約半数は「エクソン」外にマッピングされていた、補足図 3 B)。これら未解析の 3'末端についてもエキソソーム補因子に対する感受性を調査し、さらに今回の NGS ライブラリーにはなかったグローバルな poly(A)⁺ 鎖の状態に関する情報を含んだ解析も加えれば、MPP6 感受性基質の示す顕著な poly(A)⁺ RNA 蓄積表現型の原因を明らかにできるかもしれない。



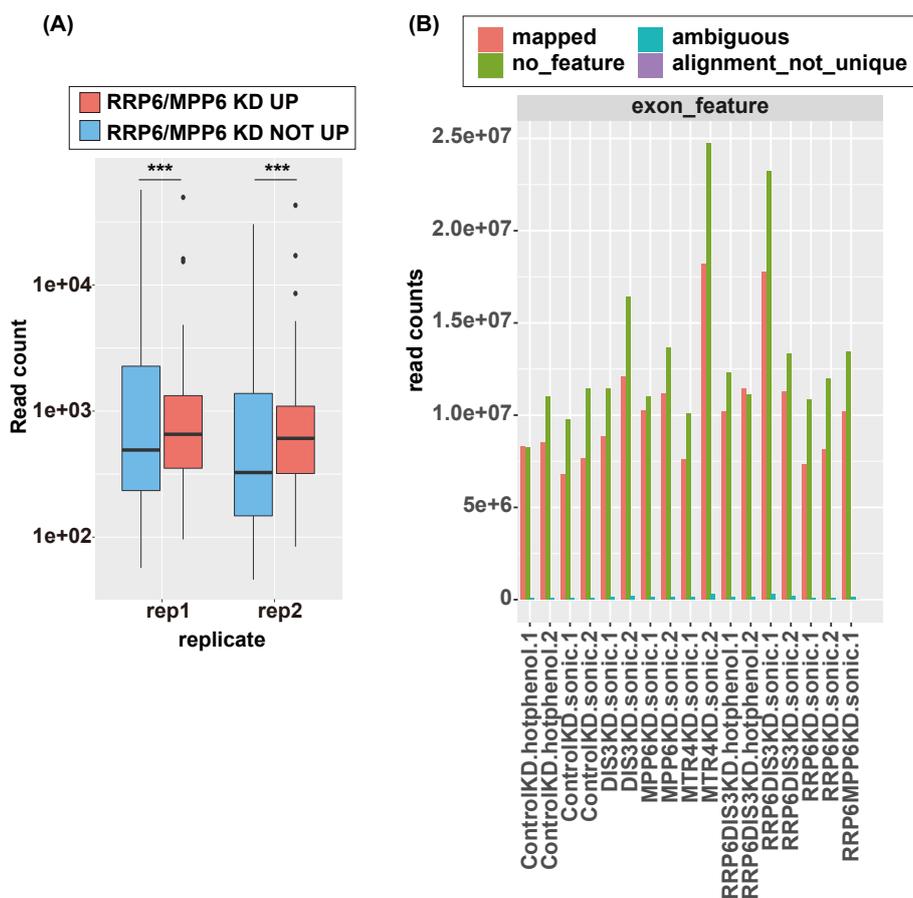
補足図 2. 本解析結果に基づいて推測される様々な環境下でのエキソソームによる核内 poly(A)⁺ RNA 基質分解
 通常的环境下では主に DIS3 によって poly(A)⁺ RNA 基質は分解されている(i)。RRP6 が枯渇した状態でも DIS3 により効率的に基質が分解される(ii)。DIS3 の KD 時には RRP6 が DIS3 の機能を補う(iii)。MPP6 が不在の場合、基質は DIS3 に到達しないため(iv, v, x)、MPP6 KD は DIS3^{endo-exo-}の発現由来の poly(A)⁺ RNA 基質蓄積の表現型を抑制する (v, ix)。RRP6 の最適な基質分解活性のためには、RRP6 と MPP6 の双方に MTR4 が結合していることが必要である(iv, v, vi)

MPP6 による核内エキソソームの基質特異性制御

NGS 解析の結果では、RRP6/MPP6 KD により安定化する基質の内容として、variant snRNA や Replicate Dependent Histone (RDH) をコードする RNA など、比較的短い転写単位 (Transcription Unit: TU) からの転写物が多く検出された。転写物の短さが MPP6 感受性の決定要因であるかどうかについては今の所不明だが、

安定化時に poly(A)⁺ foci を形成しやすい基質サブセットに短い TU 由来の転写物が濃縮されていることを裏付けるデータはいくつか存在する。ARS2 は短い TU 由来の転写終結に機能している因子で、ARS2 がないと本来の転写終結点より下流まで転写伸長することが報告されている(85, 120)。ARS2 を KD すると、エキソソームの阻害に由来する poly(A)⁺ RNA の核内蓄積は大きく解消した(補足図 4 A,B)。この結果は、ARS2 の機能で生じた poly(A)⁺末端をもつ転写物がエキソソーム KD 由来の poly(A)⁺ RNA foci を構成する可能性を示唆している。また、長さの短い Pol II 転写産物の核外輸送にはトランスポーター複合体である PHAX/CRM1 が機能すると報告されている(130, 131)。CRM1 を特異的な阻害剤であるレプトマイシン B (LMB)で処理すると(132)、HeLa および A549 細胞における MTR4 KD 条件での poly(A)⁺ RNA の核内蓄積に著しい増強が観察された(補足図 4 C,D)。この結果から、HeLa や A549 細胞で MTR4 KD 時に安定化して核外に輸送される基質は、CRM1 が輸送担体として機能するような長さの短い転写物を多く含む可能性がある。これらの可能性を踏まえると、転写物の長さが短いこと、あるいは短い転写物の生成に関連する機構が、MPP6 に対する感受性を高める要因になっているかもしれない。

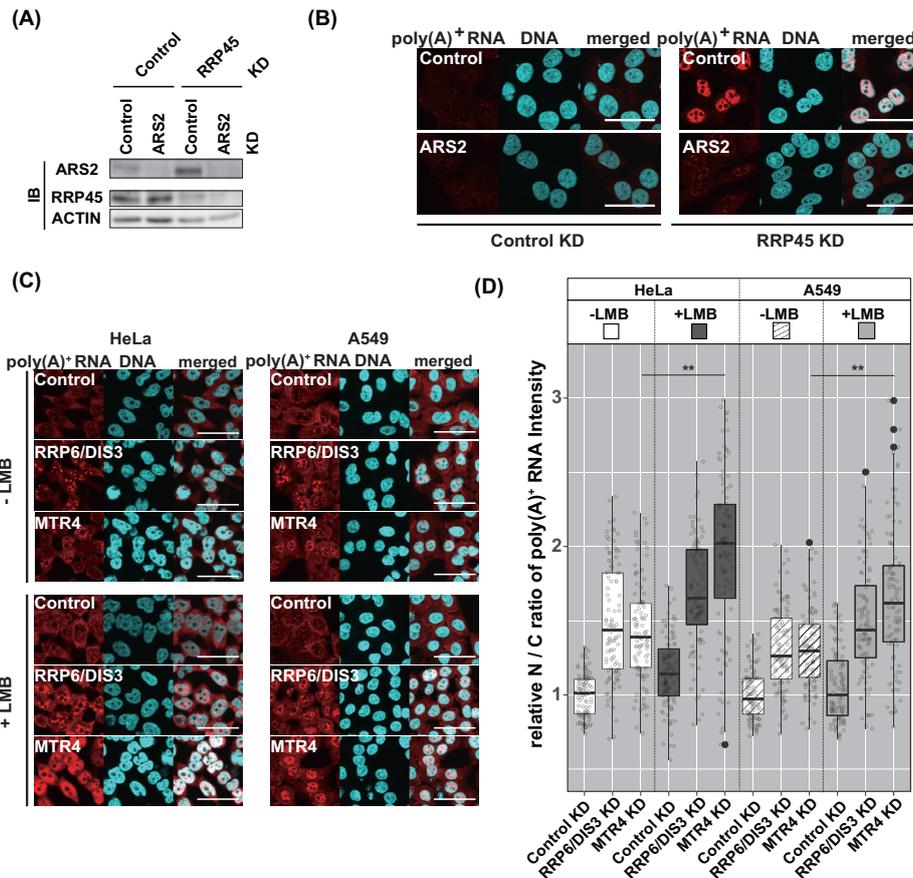
本解析結果は、MPP6 が PAXT 複合体に依存した基質分解に働くことを示唆するものである。しかし、バルク poly(A)⁺ RNA の核内蓄積および *vU1snRNA* や *proDNAJB4* の安定化が RRP6/MPP6 KD で顕著に観察されるのに対し、PAXT 複合体構成因子である ZFC3H1 または PABPN1 を U2OS 細胞において単独で KD した際のこれら poly(A)⁺ RNA 基質の蓄積は微弱であった。これに対し、ZFC3H1 または PABPN1 と RRP45 の同時 KD 時には顕著な poly(A)⁺ RNA 核内蓄積と *vU1snRNA* や *proDNAJB4* の安定化が観察されることから、ZFC3H1 または PABPN1 の KD 条件でも基質への poly(A)⁺ 鎖の付加は行われており、ZFC3H1 または PABPN1 の単独 KD 時に poly(A)⁺ RNA 基質の蓄積が微弱であるのは基質分子自体が少ないことに由来すると考えられる。すなわち必ずしも PAXT 複合体がこれら MPP6 感受性の基質分解を独占的に担っているわけでもなさそうである。これらの基質分解において PAXT 複合体とは異なる未同定の MPP6 依存性補因子が特異的に働いているのか、あるいは PAXT 複合体を含む複数の MPP6 依存性の補酵素が重複して機能しているのかは現在のところ不明である。



補足図 3. RRP6/MPP6 KD 感受性基質の安定時の発現の高さと本解析でエクソン外にマップされたリード

(A) RRP6/DIS3 KD によって安定化した基質を RRP6/MPP6 KD 感受性によりサブクラスに分類し、クラス間の遺伝子ごとのリードカウントを比較した。カウントは RRP6/DIS3 KD サンプルの replicate ごと (rep1 および rep2) に比較した。統計解析は連続性の補正を用いた Wilcoxon 順位和検定で行った。(B) HT-seq count の exon feature counting から出力されたリードカウントの棒グラフ。exon feature にマッピングされたリード数(mapped)と、exon feature 外にマッピングされたリード数(no_feature, ambiguous, alignment_not_unique)をカテゴリーごとに合計した。replicate ごとのリードカウントを示す。

本解析において、本来 3'末端に poly(A)⁺鎖を持たないはずの NEXT-PROMPT の一部について poly(A)⁺鎖が付与された状態で安定化したものを検出した。解析に用いた NEXT-PROMPT の分類は、NEXT 複合体因子である ZCCHC8 の単独 KD への感受性と PAXT 複合体構成因子である ZFC3H1 の単独 KD への非感受性に基づいており、NEXT 複合体と PAXT 複合体間の機能的冗長性は考慮されていない。このため Wu らが報告しているように、これらの NEXT-PROMPT 分子が NEXT 複合体による認識を免れた後に poly(A)⁺鎖を獲得し、PAXT 複合体によるバックアップ機構で認識されてエキソソームで分解されている可能性は十分考えられる(80)。NEXT 複合体と PAXT 複体のいずれの機能も阻害されている RRP6/DIS3 KD 時や MTR4 KD 時には、この機構によって分解されている PROMPT 分子が poly(A)⁺鎖付加され



補足図 4. エキソソームの poly(A)+ RNA 基質における短い TU 転写物濃縮の可能性

(A), (B) ARS2 KD はエキソソーム阻害に由来する核内 poly(A)+ RNA 蓄積表現型を緩和する。(C), (D) レプトマイシン B (LMB) 処理により、HeLa および A549 細胞における MTR4 KD 時の poly(A)+ RNA 分布の核/細胞質(N/C)比は著しく増加する。(A) パネル上部に示した因子の特異的な KD をイムノブロット解析により確認した。(B) U2OS 細胞における poly(A)+ RNA FISH 実験。KD した因子をパネル内部および下部に示した。Scale bar = 50 μ m。(C) poly(A)+ RNA FISH 実験。LMB 処理の条件をパネル左側に、KD した因子をパネル内に示す。Scale bar = 50 μ m。(D) (C)の定量化。LMB 処理なしの Control KD サンプルによって各細胞株内で正規化された poly(A)+ RNA FISH シグナルの相対的な N/C 比を示す。統計解析は Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 検定で行った。** $p < 0.01, n = 100$ 。

た状態で安定化して検出されたものと思われる。このような例は PROMPT だけではなく、NEXT 複合体随伴エキソソームの標的であり本来 poly(A)+ 鎖を持たない snoRNA について、エキソソーム活性が比較的長時間にわたって阻害されると 3'末端に poly(A)+ 鎖付与された状態で安定化することも最近報告されている(114)。本解析内では RRP6/DIS3 KD や MTR4 KD 条件が同様の状況に相当すると考えられ、実際にこれらの条件では poly(A)+ 鎖をもつ snoRNA が安定化基質として検出された(図 31 A, D)。一方、RRP6/MPP6KD における poly(A)+ 形態の snoRNA の安定化は RRP6/DIS3 KD や MTR4 KD 条件に比べて顕著ではない(図 29 C, 図 31 A)。本解析で検出した poly(A)+ 鎖を持つ PROMPT や snoRNA 分子そのものは最早 NEXT 複合

体の標的分子ではないかもしれないが、RRP6/MPP6 KD 条件においてはこれら poly(A)⁺ 形態分子の出現は抑制されていることから、これら分子出現の上流に位置する poly(A)⁺ 鎖を持たない分子が分解されていると仮定すると、RRP6/MPP6 KD 時にも NEXT 複合体随伴エキソソームは活性を維持していると考えられる。

しかしながら、本解析では poly(A)⁺ 鎖付与された基質のみを解析対象としたため、本来 poly(A)⁺ 鎖を持たない転写物を標的とする NEXT 複合体を介した基質分解における MPP6 の機能を正確に評価できているとは言い難い。これまでの構造解析のデータでは、コアと MTR4 が NEXT 複合体の成分である ZCCHC8 に結合する領域は MPP6 との結合領域と共通であることが示されており(91, 96)、MPP6 結合型のエキソソームと NEXT 複合体随伴エキソソームがそれぞれ独立した複合体として存在している可能性が考えられる。これは本解析結果を支持するモデルである(図 32)。その一方で最新の NEXT 複合体随伴エキソソーム複合体の構造解析では、ZCCHC8 は MTR4 下部に位置する RNA の出口を覆っている(『蓋』構造とする)ことが示されている(133, 134)。このため NEXT 複合体随伴エキソソーム複体内では ZCCHC8 が形成する『蓋』構造を開くリモデリング過程が基質分解に先立ち必要であると予想される。MTR4 及びコアとの結合において ZCCHC8 と競合関係にある MPP6 が、この NEXT 複合体随伴エキソソーム内でのリモデリング過程に機能する仮説も提示されている(128, 129)。このように MPP6 に依存しない NEXT 複合体随伴エキソソーム活性の存在について結論づけるにはまだ課題は多く、今後 poly(A)⁺ RNA 基質だけでなく poly(A)⁺ 鎖を持たない基質についても、PAXT 複合体や NEXT 複合体を含む補因子に対する感受性および、安定化した際の poly(A)⁺ 鎖付与状態について明らかにすることで、MPP6 が細胞内で各補因子が支持する基質分解にどのように機能しているかをさらに理解することができると思われる。

近年、RNA exosomopathies と総称されるような疾患の原因となるエキソソーム変異が数多く同定されており、エキソソームの非触媒的な構造サブユニット、特にコア上部 S1 キャップに多く発見されている(94, 135, 136)。そのうちのいくつかは既に MPP6 との結合に影響することが報告されており、細胞生理における MPP6 の支持するエキソソーム活性の重要性が窺える(94, 136)。また、MPP6 は細胞周期 M 期において高いリン酸化状態をとることが知られている(137)。こういった MPP6 の修飾状態や発現量の変動が核内エキソソームの複合体形成や基質特異性にどのように影響しているか非常に興味深い。今後、MPP6 そのものの制御機構を含めた解明がすすめば、核内エキソソーム活性の制御における MPP6 の重要性や機能メカニズムのより深い理解につながると期待される。

材料と方法

1. 抗体、siRNA、プラスミド

本解析で用いた一次および二次抗体、siRNA、プラスミドおよびプラスミド構築に用いた primer について表 2、表 3、表 4、表 5 にそれぞれ示す。プラスミドの構築は基本的に以下のように行った。ヒト cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 増幅を行い、目的の配列を含む断片を得た。増幅された断片は適切な制限酵素で切断して発現ベクターとライゲーションした。pcDNA5/FRT/TO/FLAG ベクターは、p3 x FLAG-CMV-10 (MilliporeSigma, Burlington, MA) から 3 x FLAG Coding Sequence (CDS)断片を PCR により増幅した後 HindIII で切断し、次いで HindIII サイトを用いて pcDNA5/FRT/TO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)とライゲーションすることにより作製した。pcDNA5/FRT/TO/RRP41-FLAG 発現ベクターを構築するために、まず pcDNA5/FRT/TO/FLAG から HindIII サイトを使って切り出した 3 x FLAG CDS を、HindIII 切断した pCMV-Tag4 a (Agilent Technologies, CA) とライゲーションし、これをテンプレートとして 3 x FLAG CDS の 3'末端に停止コドンが付加するための PCR を行った。得られた 3 x FLAG CDS 断片 (EcoRI と XhoI で切断) と PCR で増幅した RRP41 CDS 断片 (KpnI と EcoRI で切断) を KpnI と XhoI で切断した pcDNA5/FRT/TO にライゲーションした。pcDNA5/FRT/TO/EGFP-DIS3 発現ベクターは、BamHI と XhoI の認識サイトを用いて BglIII と SalI で切断した pEGFP-C1 に DIS3 CDS を挿入し、これを鋳型に PCR 増幅した EGFP-DIS3 CDS 断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて HindIII と XhoI 切断した pcDNA5/FRT/TO に挿入して作製した。得られたコンストラクトは全てシーケンスで確認した。

抗血清を得るための動物実験は、京都大学動物実験委員会のガイドラインに従って行った (許可番号: Lif-K14004)。

2. 細胞培養ならびに遺伝子導入、安定発現株の樹立

目的の各 CDS を含む pcDNA5/FRT/TO ベクターとフリップパーゼ発現用の pOG44 (Thermo Fisher Scientific)を同時にトランスフェクションすることにより、目的の各遺伝子を安定的に発現する Flp-In T-REx 細胞株を樹立した。トランスフェクションした細胞は、100 µg/ml Hygromycin B (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)を含む DMEM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)で選択し、耐性クローンを得た。EGFP 発現 HeLa Flp-In T-REx 細胞株

は、pEGFP-C1 をトランスフェクションした細胞を、10 µg/ml Puromycin (InvivoGen、San Diego、CA)を含む培地中で選択した。

Flp-In T-REx 細胞における各目的遺伝子の発現誘導は、ドキシサイクリン (dox、MilliporeSigma)を 1 µg/ml で DMEM に添加して行なった。siRNA トランスフェクションと組み合わせたレスキュー実験では、dox をトランスフェクション後 6 時間で添加したが、FLAG-RRP6 を用いたレスキュー実験では、dox を siRNA トランスフェクションの 48 時間前に添加し、トランスフェクション直前に dox を培地交換により一時的に除去し、トランスフェクションした 6 時間後に再び添加した。

レプトマイシン B (Cayman Chemical、Ann Arbor、MI)処理は 10 ng/ml の濃度で培地に添加し、その状態で 10 時間培養した細胞を固定し観察に供した。

3. 蛍光免疫染色と poly(A)⁺ RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

カバーガラス上で培養した細胞を PBS に希釈した 10% ホルムアルデヒド内で 20 分間室温において固定し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて 10 分間室温で透過化処理した。その後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、6% ウシ血清アルブミン (BSA)/PBS でブロッキングした。1% BSA/PBS に希釈した一次抗体で、4°C で一晩サンプルをインキュベートし、PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、その後、1% BSA/PBS で希釈した Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 または Alexa Fluor 405 を結合した二次抗体とインキュベートした。染色したサンプルは、4% ホルムアルデヒド/PBS で室温 10 分間固定し、PBS で洗浄後、続く蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。poly(A)⁺ RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション[poly(A)⁺ RNA FISH]には、Alexa Fluor 594 標識を 5' 末端に結合した dT₄₅ プローブを用い、Fujiwara らの方法に従って実施した(101)。poly(A)⁺ RNA と同時に β-グロビン mRNA を検出する際には、Alexa Fluor 594 で標識した特異的 DNA オリゴプローブ (5'-CTTCATCCACGTT CACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTGCA CCAT-3')を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを Valencia らの方法に従って行い(138)、その後 5'末端 Alexa Fluor 488 標識の dT₄₅ プローブを用いた poly(A)⁺ RNA FISH を行なった。核 DNA は 4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI、Thermo Fisher Scientific)で染色した。蛍光画像はレーザー走査共焦点顕微鏡 FV10i (Olympus、Tokyo、Japan)で、60 倍の対物レンズを使用して取得した。核と細胞質の分割とその後の poly(A)⁺ RNA シグナルの定量化は、CellProfiler ソフトウェア v3.1.5(139)を用いて実施した。FLAG 染色からの蛍光シグナルに基づく細胞の分類は、Random Forest Classifier を用いた CellProfiler Analyst v2.2.1 (140)により行なった。

ラインプロット解析には FV10-ASW v4.1 software (Olympus)を用いた。

4. Total RNA の単離、逆転写およびリアルタイム PCR

Total RNA は、Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて、製造元のプロトコルに従って抽出した。一部実験では以下のように抽出ステップに変更を加えて実施した。細胞 (~ 2×10^6 cells) をトリプシン処理して遠心分離により回収し、PBS で洗浄した。250 μ l の Sepasol-RNA I Super G を加え、55°C での 30 秒間のインキュベートと 30 秒間のボルテックスの抽出サイクルを 10 回繰り返した。抽出した RNA を RNase-free RQ DNase I (Promega, Madison, WI) に溶解し、クエン酸緩衝フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出した後、再度エタノール沈殿により回収した。

250 ng の DNase I 処理済み total RNA を 25 pmol dT₂₅ プライマーと混合し、65°C で 5 分間インキュベートしたのち直ちに氷上で冷却した。この混合物に、Superscript III (Thermo Fisher Scientific) を用いて、23°C 10 分、55°C 60 分、75°C 15 分のステップで逆転写を行った。Random9 primed cDNA 合成は、ReverTraAce (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、メーカーの説明書に従って行った。リアルタイム PCR は TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio Inc.) を用いて行い、Thermal Cycler Dice real time system II (Takara Bio Inc.) で解析した。リアルタイム PCR 時に用いたプライマーセットは、表 6 に記載した。

5. 細胞質および核抽出物を用いたイムノブロットティング

細胞抽出液は、Folco らの方法に従って調製した(141)。細胞は PBS で洗浄後にトリプシンで消化し、遠心分離で回収した。細胞ペレットの体積 Packed Cell Volume(PCV)を推定し、細胞ペレットを 5 x PCV 容量の A solution (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT)に慎重に懸濁し、100 x *g* で 10 分間遠心分離した。上清除去後、細胞ペレットを再び 3 x PCV 容量の A solution に注意深く懸濁し、氷上で 10 分間インキュベートした。懸濁した細胞を 10 秒間のボルテックスによりホモジナイズし、1500 x *g* で 10 分間遠心分離後上清を回収し、細胞質抽出液として保存した。残りの核ペレットは 1/2 x PCV 容量の Low Salt buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT)に再懸濁し、そこに 1/2 x PCV 量の High Salt buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 1.4 M KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT)を加えた後、

サンプルをゆっくりと攪拌させながら 4°C で 30 分間インキュベーションした。その後、遠心分離後の上清を核抽出物として回収した。細胞質抽出物および核抽出物中の総タンパク質濃度は、ブラッドフォードアッセイ (Nacalai Tesque) により測定した。

タンパク質サンプルは 4 x SDS サンプルバッファー (190 mM Tris-HCl pH 6.8、40% glycerol、0.8% SDS、0.2% bromophenol blue、40 mM DTT) と混合し、2 分間 98°C で加熱処理した。変性したサンプルを SDS-PAGE で分離し、Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad、Hercules、CA) を用いて PVDF 膜に転写した。ブロット膜は、0.1% Tween-20/PBS (PBS-T) に溶かした 5% スキムミルクで室温 1 時間のブロッキングを行い、PBS-T ですすぎ、4°C で一晩、穏やかに回転しながら一次抗体とインキュベートした。ブロット膜を PBS-T で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、PBS-T に希釈した HorseRadish Peroxidase (HRP) 結合の二次抗体と室温で 90 分間インキュベートした後、PBS-T で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。PVDF 膜を化学発光試薬 (MilliporeSigma) で発光させ、LAS 4000 mini (GE Healthcare Bioscience、Piscataway、NJ) を用いて検出した。ローディングコントロールとして ACTIN と GAPDH を使用した。定量は Image J v1.53a (National Institutes of Health) を用いて行った。

6. 免疫沈降実験

免疫沈降は、Masuda らの方法に従って行った(142)。150~200 µg の核抽出物を 2 倍量の Nuclear Extract dilution buffer (20mM HEPES-KOH、pH7.9、0.2mM EDTA、20%グリセロール、0.1% Triton X-100、0.2mM PMSF、0.5mM DTT) と混合した。これを 5 µl の抗体結合ビーズと混合し、4°C で 3 時間ローテートしながら反応させた。ビーズを 0.1% Triton X-100、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT を含む PBS で 4 回洗浄し、4 x SDS サンプルバッファーで溶出し、2 分間の 98°C 加熱処理により変性した。イムノブロッティングは材料と方法 5 に記載のように行った。

7. プルダウンアッセイ

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を大腸菌で生産させ、Masuda らの方法に従ってグルタチオン(GSH)ビーズで精製した(142)。0.1% Triton X-100、0.2mM PMSF、0.5mM DTT を含む PBS で希釈した核抽出物を GSH ビーズとプレインキュベートして相互作用するタンパク質をあらかじめ除去し、ビーズに結合しなかった Flow Through を GST 融合タンパク質結合ビーズと 4°C 3 時間ローテートしながら反応させた。ビーズを 0.1% Triton X-100、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT を含む PBS で 4 回洗浄後、4 x SDS サンプルバッファーで溶出し、2 分間

の 98°C 加熱処理により変性した。イムノブロッティングは材料と方法 5 に記載のように行った。

8. MPP6 の二次構造予測とアライメント

MPP6 の二次構造予測は、ヒト MPP6 配列 (NP_005783.2) を入力として、Web ツール PSIPRED v4.0(143)を用いて実施した。また、複数の種間での MPP6 ホモログ配列のアライメントは、*Homo sapiens* (NP_005783.2)、*Xenopus tropicalis* (NP_001016703.1)、*Drosophila melanogaster* (NP_001286116.1)、*Saccharomyces cerevisiae* (NP_014421.3) および *Schizosaccharomyces pombe* (NP_593967.1) の MPP6 配列を入力情報として Multalin v5.4.1(110)で実施した。

9. NGS 用の nuclear total RNA サンプルの調製

NGS 用サンプルの作製時には、目的の siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞をトランスフェクションした 6 時間後にトリプシン処理し、10 cm ディッシュと 12 ウェルディッシュのカバーガラス上に分割した。トランスフェクション後 72 時間で、カバーガラス上の細胞を固定し、材料と方法 3 に記載の方法で *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。同時に 10cm ディッシュの細胞をトリプシン処理で回収し、PBS で洗浄した後、サンプルを 2 つに分けた。そのうち一方については材料と方法 5 に記載の方法で核抽出物を抽出し、ノックダウン効率を確認するためのイムノブロットに供した。もう一方のサンプルは、250 μ l の氷冷した Nonidet P-40 (NP-40) 含有バッファー [50 mM Tris-Cl pH 8.0、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.5% NP-40、1 mM DTT、20 units/ml Recombinant RNase Inhibitor (Takara Bio Inc.)] 内で 5 分間氷上インキュベートし、4°C で 5 分間、300 x *g* で遠心を行なった。上清を注意深く除去し、細胞質画分タンパク質サンプルとして保存した。核ペレットを 250 μ l の氷冷した NP-40 含有バッファーに再懸濁し、その懸濁液の 50 μ l を核画分タンパク質サンプルとして別のチューブに保存した。同数の細胞由来の細胞質および核タンパク質サンプルは、4 x SDS サンプルバッファーによって変性させて細胞の分画確認用のイムノブロットに供した。残りの懸濁液から核を 4°C、300 x *g*、5 分間の遠心分離で集め、250 μ l の Sepasol-RNA I Super G に懸濁した。この懸濁液について、ソニケーション法 (sonic 法) の RNA 抽出ステップでは、Q125 ソニケーター (Qsonica、Newtown、CT) を用いて 50% の出力で 1 秒間超音波処理し 1 秒間静止するサイクルを 20 回繰り返した後、55°C 30 秒間インキュベートし 30 秒間ボルテックスのサイクルを 10 回繰り返すことにより RNA 抽出を行った。超音波処理を行わないホットフェノ

ール法 (hp 法) の抽出工程は上記のように行った。抽出した RNA を DNase I 処理し、クエン酸緩衝フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで再度抽出し、エタノール沈殿により回収した。Control KD と RRP6/DIS3 KD のサンプルは、hp 法と sonic 法の両方のサンプルを調製するため、二倍のスケールで実験を行なった。

10. NGS ライブラリーの調製とシーケンス

サンプルは、2 つの biological replicate を調製した。上記のように調製した nuclear total RNA を、Agilent RNA 6000 Nano キット (Agilent Technologies) を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) により解析した。50 ng/ μ l の nuclear total RNA 10 μ l に、1:100 に希釈した ERCC Spike-in Control (Thermo Fisher Scientific) を 1 μ l 加えた。QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit (FWD) (LEXOGEN, Vienna, Austria) を用いてバーコード付 cDNA ライブラリーを製造元のプロトコルに従って作製した。作製したライブラリーは、High sensitivity DNA kit (Agilent Technologies) を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer で解析し、qPCR で定量した。各ライブラリーを 3 nM ずつ混合し、このプールライブラリー (合計 18 サンプルを含む) を GENEWIZ 社 (South Plainfield, NJ) の HiSeq2500 (Illumina inc, San Diego, CA) を用いて 150 塩基ペアエンドで配列決定し、合計 149,605 G bases (4,986,834,027 リード) を得た。取得した配列は、インデックス情報をもとにデマルチプレックスを行った。配列データは GEO の GSE184274 に登録した。

11. 取得リードの品質管理およびマッピング

TrimGalore v0.6.5 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.5127899>) を用いて、リードの 3' 末端から低品質の塩基コールを除去し、i7 index (AGATCGGAAGAGC) を検出、除去した後 20 塩基より短いトリミングリードについては廃棄した。残った R1 リードは STAR aligner v2.5.3a (116) で `--outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 1` のオプションを用いて、ERCC Spike-in Control 配列を結合した GRCh37.75 にシングルエンドリードとしてマップし、bam ファイルを生成した。bam ファイルのインデックスは samtools v1.3.1 (144) を用いて作成した。

12. リードカウントと発現差異解析

マッピングされたリードのカウント取得には、HTseq htseq-count v0.9.5(145) の、`-m intersection-nonempty -s yes -f bam -r pos (feature type to count: default, exon)` のオプションと、ENSEMBL GRCh37.75 と ERCC Spike-in Control

のアノテーションを利用した。遺伝子ごとに全サンプルの合計で 10 リード以上というカットオフフィルターをかけた後、各サンプル由来のリードカウントについて replicate を区別しながら DESeq2 v1.24.0 を用いて下流の解析に供した。ERCC のカウントをコントロールに正規化した対数変換 (regularized log; rlog) カウントを、主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) に供した。DESeq2 差分発現解析の入力には Raw count を使用した。adjusted p-value < 0.05、log2 FC > 0.85 の条件を満たす遺伝子を、有意な発現上昇のみられる遺伝子として定義した。データの可視化は、R ソフトウェアの ggplot2 [R Development Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput.] (146)を用いて行った。特定領域のゲノム内のマッピングリードの可視化には、deeptools v3.4.3(147)により bam ファイルから生成した bedgraph を入力に、SparK v2.6.2(148)を用いた。

13. CLIP データの再解析

DIS3 の PAR-CLIP データと RRP6 の iCLIP データは GSE64332 と GSE120574 からそれぞれ入手した。提供されている RRP6 の bigwig ファイルを bedgraph に変換し、hg19 に liftover した。得られた bedgraph と ENSEMBL から取得した GRCh37.75 のゲノムアノテーションを入力として、R パッケージの ChIPseeker (149)を用いて CLIP ピークのアノテーションを行った。ピークのスコアを遺伝子ごとに合計し [5'UTR、3'UTR、exon、intron、downstream (≤300 bp)の領域を解析]、エキソソーム基質と非基質との間で比較した。

14. In vitro DIG 標識プローブ合成

RNVU1-14、*RNVU1-20*、*RPL27A* を検出するための特異的プローブは、T7 RNA polymerase (Takara Bio Inc.)と DIG RNA labeling mix (Millipore Sigma)を用いた in vitro 転写によって合成した。*RNVU1-14*と *RPL27A* の T7 プロモーター付与鋳型配列は、RRP45 KD HeLa 細胞の cDNA から PCR により増幅し、塩基配列をシーケンスにより確認した。*RNVU1-20* の T7 プロモーター付与鋳型配列は pcDNA5/FRT/IRES-dsRed ベクターにクローニングした *RNVU1-20* 遺伝子から PCR により増幅した。鋳型 DNA テンプレートは DNA Clean & Concentrator-25 columns (Zymo Research、Irvine、CA)を用いて精製し、合成した標識プローブは NucleoSpin RNA Clean-up XS columns (Takara Bio Inc.)を用いて精製した。

15. 特異的 RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

細胞の固定化、透過化は、材料と方法 3 に記載の poly(A)⁺ RNA FISH と同様に行なった。特異的 RNA FISH 実験は、ハイブリダイズした DIG 標識プローブを検出するためにチラミドシグナル増幅を用いた以外は、Yamazaki らの手順に従って行った(150)。ハイブリダイズした DIG 標識プローブの検出は以下のように行った。サンプルを PBS で 1 回洗浄し、6% BSA/PBS で室温 1 時間のブロッッキングを行い、1% BSA/PBS で希釈した抗 DIG マウスモノクローナル抗体と室温で 3 時間インキュベートした。その後、サンプルを PBS で 10 分ずつ 3 回洗浄し、続いて 1% BSA/PBS で希釈した HRP 結合二次抗体とインキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、サンプルを 150 mM NaCl を含む pH7.4 の 100 mM Tris-HCl 緩衝液で 1 回洗浄し、150 mM NaCl と 0.0015%過酸化水素(Nacalai Tesque)を含む pH7.4 の 100 mM Tri-HCl 緩衝液で希釈した Alexa Fluor 594 Tyramide Reagent (Thermo Fisher Scientific) とともに室温で 10 分インキュベートした。サンプルは PBS で 3 回、2 x SSC で 1 回洗浄した後、材料と方法 3 に記載の方法で Alexa Fluor 488 dT₄₅ プローブを用いた poly(A)⁺ RNA FISH を行った。

16. NEXT/PAXT 感受性 PROMPT の解析

PROMPT 分子のアノテーションは、以前に発表されたデータから得た(80)。座標は LiftOver で変換し、hg19 における GTF を生成した。この GTF を用いて HTseq htseq-count v0.12.4 でリードをカウントした。Pseudocount +1 を適用したリードカウントは、上述の方法で DESeq2 を用いた発現差解析に供した。解析は RRP6/DIS3 KD により有意に安定化した PROMPT について行った。

表 2. 本研究で用いた一次および二次抗体

NAME	Target	host animal/clonarity	Obtained from	product code	used in
DIS3	DIS3	rabbit/polyclonal	ProteinTech	14689-1-AP	NA
RRP6	RRP6	rabbit/polyclonal	Dr.Targoff	NA	10.1172/JCI115895
RRP45	RRP45	mouse/polyclonal	in this study	NA	NA
RRP41	RRP41	rabbit/polyclonal	Dr.Pruijn	NA	10.1074/jbc.M007603200
RRP4	RRP4	rabbit/polyclonal	Dr.Nagahama	NA	10.1016/j.bbrc.2015.07.032
CSL4	CSL4	rabbit/polyclonal	Sigma-Aldrich	HPA038370	NA
RRP46#1	RRP46	rabbit/polyclonal	Dr.Pruijn	NA	10.1074/jbc.M007603200
RRP46#2	RRP46	rabbit/polyclonal	Bethyl Laboratories	A303-887A	NA
MTR4	MTR4	rabbit/polyclonal	Dr.Nagahama	NA	10.1016/j.bbrc.2006.06.017
MPP6#1	MPP6	rabbit/polyclonal	Dr.Pruijn	NA	10.1093/nar/gki982
MPP6#2	MPP6	rat/polyclonal	in this study	NA	NA
PM-Scl	RRP45	human/polyclonal	Dr.Pruijn	NA	10.1002/art.20056
C1D	C1D	rat/polyclonal	in this study	NA	NA
PABPN1	PABPN1	rabbit/polyclonal	MBL	PN023PW	NA
PAP A	PAP A	rabbit/polyclonal	Sigma-Aldrich	HPA001788	NA
PAP G	PAP G	rat/polyclonal	in this study	NA	NA
DBP5	DBP5	rabbit/polyclonal	Dr.Reed	NA	NA
ARS2	ARS2	rat/polyclonal	in this study	NA	NA
UAP56	UAP56	rabbit/polyclonal	Dr.Reed	NA	10.1101/gad.1302205
SRRM2	SRRM2	mouse/monoclonal	Sigma-Aldrich	S4045	NA
5-42A	nucleolin	mouse/monoclonal	Dr.Yoshimura	NA	0.1016/j.yexcr.2013.07.021
ACTIN	beta-actin	rabbit/polyclonal	Sigma-Aldrich	A2066	NA
GAPDH	GAPDH	mouse/polyclonal	wako	019-25471	NA
TUBULIN	beta-tubulin	mouse/monoclonal	Sigma-Aldrich	T7816	NA
M2	FLAG	mouse/monoclonal	Sigma-Aldrich	F1804	NA
GFP	GFPTag	mouse/monoclonal	nacalai tesque	04363-24	NA
GST	GST	mouse/monoclonal	nacalai tesque	GS019	NA
HA11	HAtag	mouse/monoclonal	Biologend	901501	NA
DIG	digoxigenin	mouse/monoclonal	Abcam	21H8	10.1016/j.molcel.2018.05.019

NAME	Ttarget	host animal/clonarity	Obtained from	product code
HRP conjugated anti-mouse IgG	mouse IgG	goat/polyclonal	SeraCare	5220-0341
HRP conjugated anti-rat IgG	rat IgG	goat/polyclonal	SeraCare	5220-0364
HRP conjugated anti-rabbit IgG	rabbit IgG	goat/polyclonal	SeraCare	5220-0336
Alexa488-conjugated anti-mouse IgG	mouse IgG	goat/polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-11001
Alexa405-conjugated anti-mouse IgG	mouse IgG	goat/polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-31553
Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG	rabbit IgG	goat/polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-11008
Alexa594-conjugated anti-mouse IgG	rabbit IgG	goat/polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A-11005

表 3. 本研究で用いた siRNA

Gene name		Nucleotide sequence (Bases marked with 'd' are DNA)	supplier/siRNA
EGFP	sense(5'-3')	GGGCACAAGCUGGAGUACAACUACA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UGUAGUUGUACUCCAGCUUGUGCCC	invitrogen/stealth
RRP45	sense(5'-3')	GGCAAUACGUGUAGACCUACAUUU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AAAUGUAGGUCUACACGUUUUGCC	invitrogen/stealth
RRP41	sense(5'-3')	CUCCCAGAUUGAUUCUAUrUGCdAdG	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	CUGCACAUAGAUUCAUCUGGGAGCG	iDT/DsiRNA
RRP4	sense(5'-3')	GAUGAGCCUCCAGUGGCUCGAdAdG	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	CUUGCGAGCCACUGGAAGCCUCAUCUC	iDT/DsiRNA
RRP6	sense(5'-3')	CACAGUUUGGCGAUGAGUAUGAUUU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AAAUCAUACUCAUCGCCAAACUGUG	invitrogen/stealth
DIS3	sense(5'-3')	UGGAGAGAAAGAGACUGAAACAGAA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UUCUGUUUCAGUCUCUUUCUCUCCA	invitrogen/stealth
DIS3L1	sense(5'-3')	GGGCAAGAUCUUGAUGAAUGGUUU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AAACCAUUCUCAAGGAUCUUGCCC	invitrogen/stealth
DIS3L2	sense(5'-3')	CGUUGCAUUCUGACGGAGUUUUUU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AAAUAACUCCGUCAGAUUGCAACG	invitrogen/stealth
PAPD5	sense(5'-3')	CCGGAUAAAGGAUGGUGUUCAUAU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AUAUGAACCAUCCUUUAUCCGG	invitrogen/stealth
MTR4	sense(5'-3')	GCCAAUUGGGUAAAGAAUUGAdAdG	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	CUUCAUUUCUUACCCAAUUUGCAA	iDT/DsiRNA
DBP5	sense(5'-3')	CAAGGUGUUUGUUCUGGAUGAGGdCdT	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	AGCCUCAUCCAGAACAAACACCUUGAU	iDT/DsiRNA
PABPN1	sense(5'-3')	GGCUGUGGUUCAGUCAACCGUGUUA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UAACACGGUUGACUGAACCCAGCC	invitrogen/stealth
ZFC3H1	sense(5'-3')	CAGCCACCCACUUACCACAGUGdCdA	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	UGCCACUGUGGUAAAGUGGGUGCUGCC	iDT/DsiRNA
ARS2	sense(5'-3')	CCUUCGACCGCAGUGUUAACAUUAA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UUAAUGUUAACACUGCGGUCGAAGG	invitrogen/stealth
RRP6 #2	sense(5'-3')	GACCUCAGCUCUAGUUUCGAGAGAA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UUCUCUCGAAACUUGAGCUGAGGUC	invitrogen/stealth
DIS3 #2	sense(5'-3')	AACCAGCUGCAAGUUUUCUUAUAA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UUUUGAAGAUAAUCUUGCAGCUGGUU	invitrogen/stealth
SKI2	sense(5'-3')	GCAUCAACCGCAUUGGGAGUGAdTdC	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	GAUCACUCCCAAUGCGUUGUGAUGCUC	iDT/DsiRNA
SKI3	sense(5'-3')	GGAUGACUUGCCUGGUGUUUACCdAdA	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	UUGGUAAACACCAGGCAAGUCAUCCUU	iDT/DsiRNA
SKI8	sense(5'-3')	CAACCAGUACGGUAUUCUCUUCAdAdA	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	UUUGAAGAGAAUACCGUACUGGUUGGU	iDT/DsiRNA
PAPA	sense(5'-3')	AAGAGGCAUUCGUACCAGUUUUAA	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	UUAAUAAUCUGGUACGAAUGCCUCUU	invitrogen/stealth
PAPG	sense(5'-3')	ACUACUUGAGCCACCGAAUUUCUdTdT	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	AAAGAAAUUCGGUGGCUCAAGUAGUUU	iDT/DsiRNA
C1D	sense(5'-3')	UGAAGACCAUGAUGUCUGUUUCUAdAdG	iDT/DsiRNA
	antisense(5'-3')	CUAGAAACAGACAUCAUGGUCUUCAGC	iDT/DsiRNA
MPP6	sense(5'-3')	CCAGAGCUUAAAGAGAAAGAGAGUU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AACUCUCUUUCUCUUUAAGCUCUGG	invitrogen/stealth
TAP	sense(5'-3')	GAACUGGUUCAAGAUUACAAUCCU	invitrogen/stealth
	antisense(5'-3')	AGGAAUUGUAAUCUUGAACCCAGUUC	invitrogen/stealth

表 4. 本研究で用いたプラスミド

NAME	Vector	Gene	Inserted sites	Tag	Remarks
FLAG-MTR4	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MTR4</i>	KpnI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant
pcDNA5/FRT/TO	pcDNA5/FRT/TO	-	-	-	Invitrogen
pcDNA5/FRT/TO/FLAG	pcDNA5/FRT/TO	<i>FLAG</i>	HindIII-HindIII	x3FLAG(N-term)	-
RRP41-FLAG	pcDNA5/FRT/TO/C_FLAG	<i>RRP41</i>	KpnI-EcoRI	x3FLAG(C-term)	RNAi resistant
RRP41-FLAG-4M	pcDNA5/FRT/TO/C_FLAG	<i>RRP41</i>	KpnI-EcoRI	x3FLAG(C-term)	RNAi resistant, 4M mutant
GST-MPP6	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	wild type, antibody generation
GST-MPP6 delN35	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
GST-MPP6 del48-67	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
GST-MPP6 del81-105	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
GST-MPP6 1-127	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
GST-MPP6 delC33	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
GST-MPP6 delC11	pGEX-6P-2	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	GST	deletion mutant of MPP6
FLAG-RRP6	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>RRP6</i>	BamHI-EcoRV	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant
FLAG-RRP6 Y436A	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>RRP6</i>	BamHI-EcoRV	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, Y436A
FLAG-RRP6 E315A	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>RRP6</i>	BamHI-EcoRV	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, E315A
FLAG-MPP6	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant
FLAG-MPP6 delN35	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 delN4	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 del5-18	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 del19-35	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 del5-18	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 delC33	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 de C11	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MPP6
FLAG-MPP6 LS	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, LS
FLAG-MPP6 MKFM	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, MKFM
FLAG-MTR4 Q144A	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MTR4</i>	KpnI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, Q144A
FLAG-MTR4 delN75	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>MTR4</i>	KpnI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, deletion mutant of MTR4
FLAG-DIS3WT	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>DIS3</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant
FLAG-DIS3endo-	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>DIS3</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, D146N/D177N
FLAG-DIS3exdo-	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>DIS3</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, D487N
FLAG-DIS3endo-exdo-	pcDNA5/FRT/TO/FLAG	<i>DIS3</i>	BamHI-XhoI	x3FLAG(N-term)	RNAi resistant, D146N/D177N/D487N
EGFP-DIS3WT	pcDNA5/FRT/TO	<i>DIS3</i>	HindIII-XhoI	EGFP(N-term)	RNAi resistant
EGFP-DIS3endo-	pcDNA5/FRT/TO	<i>DIS3</i>	HindIII-XhoI	EGFP(N-term)	RNAi resistant, D146N/D177N
EGFP-DIS3exdo-	pcDNA5/FRT/TO	<i>DIS3</i>	HindIII-XhoI	EGFP(N-term)	RNAi resistant, D487N
EGFP-DIS3endo-exdo-	pcDNA5/FRT/TO	<i>DIS3</i>	HindIII-XhoI	EGFP(N-term)	RNAi resistant, D146N/D177N/D487N
pEGFP-C1	pEGFP-C1	<i>EGFP</i>	-	EGFP	Clontech
MBP-RRP45antigen	pMAL-c2X	<i>RRP45</i>	EcoRI-XhoI/SalI	MBP	RRP45_301-439
GST-C1D	pGEX-6P-2	<i>C1D</i>	SmaI-XhoI	GST	C1D_full-length
GST-PAP G	pMAL-c2X	<i>PAP G</i>	BamHI-SalI	MBP	PAP G_448-737
MBP-MPP6	pMAL-c2X	<i>MPP6</i>	BamHI-XhoI/Sa	MBP	MPP6_full-length
GST-MTR4	pGEX-6P-2	<i>MTR4</i>	BamHI-XhoI	GST	MTR4_full-length
pOG44	pOG44	<i>FLP</i>	-	-	Invitrogen
ARS2 anitgen	pGEX-4T-1	<i>ARS2</i>	EcoRI-XhoI	GST	ARS2_648-868
<i>beta-globin</i>	pcDNA5/FRT/TO	<i>beta-globin</i>	KpnI-HindIII	-	10.1016/j.isci.2019.11.033
pCMV-Tag 4A	pCMV-Tag 4A	-	-	-	Agilent Technologies
px3FLAG-CMV-10	px3FLAG-CMV-10	-	-	-	Sigma-Aldrich
pcDNA5/FRT/TO/IRES-dsRed	pcDNA5/FRT/TO/	<i>IRES-dsRed</i>	BamHI-EcoRV	dsRed	dsRed expressed under IRES regulation
RNVU1-20	pcDNA5/FRT/IRES-dsRed	<i>RNVU1-20</i>	BglII-BamHI	-	<i>RNVU1-20</i>

表 5. プラスミド構築に用いた primer

Gene name		Nucleotide sequence 5'-3'	description
RRP41	forward	TGTAGTTCTCCGCGGCTCAGAGAA	for cloning from cDNA library
	reverse	AGAGGAGGGTTTTATTCTGGACATGGGTGG	
RRP41	forward	GGGGTACCTCAGTCCCCCAGCAAGATAGAG	for adding restriction enzyme sites
	reverse	GGGAATTCGTCCCCCAGCAAGATAGAGGCCCTCACG	
RRP41	forward	GTCAAATAGACATTTACGTTCAAGTGCTACAGGCAGATGGTGGGA	for mutagenesis; RNAi-resistant mutation
	reverse	ACGTAATGTCTATTTGACTCCTTGGGTGCAGCTGTGTGAGGATG	
RRP41	forward	GGGCTCCGAGGATCGAGCCCTGCCGGACAG	for mutagenesis; 4M mutation (R62E/A63D)
	reverse	GGCTCGATCCTCGGAGCCCCGGATCTCGTG	
RRP41	forward	GGGGACGAAGAGTCCTGTGAGATGGCCCTG	for mutagenesis; 4M mutation (R94E/K95E)
	reverse	ACAGGACTCTTCGTCCCATGTGGCCGTCG	
MTR4	forward	ATGGCGGACGCATTCCGAGATG	for cloning from cDNA library
	reverse	CTACAAGTAGAGGCTGGCAGCAAACAC	
MTR4	forward	AAGTACCATGGCGGACGCATTCGG	for adding restriction enzyme sites
	reverse	GGCTCGAGCTACAAGTAGAGGCTGGCAGC	
MTR4	forward	AGCAGCTTGCAAAGTTAGGAAAGGAGATAGAGGAATATAT	for mutagenesis; RNAi-resistant mutation
	reverse	ATATATTCCTCTATCTCCTTTCTAACTTGAAGCTGCT	
MTR4	forward	TCTTGATGCTTTTGCAAGAGAGGCCATTCA	for mutagenesis; Q144A mutation
	reverse	TGAATGGCCTCTCTTGCAAAGCATCAAGA	
MPP6	forward	ATGGCGGCCGAGCGAAAAGACAAGGTTG	for cloning from cDNA library
	reverse	TTAATCCTGGGGCTTTAAGAACATCTTCTT	
MPP6	forward	CCGGATCCATGGCGGCCGAGCGAAAAGAC	for adding restriction enzyme sites
	reverse	CCCTCGAGTTAATCCTGGGGCTTTAAGAAC	
MPP6	forward	CCTGAATTAAGGAAAAGGAATCATTGATAATAGAAGCAGAGTTTCT	for mutagenesis; RNAi-resistant mutation
	reverse	AATGATTCCTTTTCTTTAATTACAGGCAAATCCAAGTACCAGTGCTCTT	
MPP6	forward	CCGGATCCAAGAAAATCATTAGTGAAGAGC	for mutagenesis; ΔN35 mutation
	reverse	CCCTCGAGTTAATCCTGGGGCTTTAAGAAC	
MPP6	forward	AGCACTGGTACTTGGATCTTCTGTATGGAAGAATG	for mutagenesis; Δ47-68 mutation
	reverse	TCCATAGAGAAGATCCAAGTACCAGTCTCTTCCAC	
MPP6	forward	CATTCAGAGGATTTGAGCTTGATGTGCAGATGA	for mutagenesis; Δ81-105 mutation
	reverse	TGACACATCAAGCTCAAATCCTCTGAATGACATTC	
MPP6	forward	CCGGATCCATGGCGGCCGAGCGAAAAGAC	for mutagenesis; ΔC33 mutation
	reverse	GTCACCTCGAGTTATTTCCCAATTGCCCCACCAAG	
MPP6	forward	CCGGATCCATGGCGGCCGAGCGAAAAGAC	for mutagenesis; ΔC11 mutation
	reverse	GGCTCGAGCTAAATTGGTGTATGTCTCCATTT	
MPP6	forward	AAGACAAGGGCGGCCAAGAATCTACTGCGCATG	for mutagenesis; SL mutation
	reverse	GTAGATTCTTGGCCGCCCTTGTCTTTCGCTCGGC	
MPP6	forward	CTACTGCGCGCGCGGCTGCCGAAAAGGGACTGGACTCA	for mutagenesis; MKFM mutation
	reverse	TCCCCTTTGCGCAGCCGCCGCGCAGTAGATTCTTGGAC	
MPP6	forward	AAGGATCCCGAAAAGACAAGGTTGTCCAAGA	for mutagenesis; ΔN4 mutation
	reverse	CCCTCGAGTTAATCCTGGGGCTTTAAGAAC	
MPP6	forward	AAGGATCCATGGCGGCCGAGATGCAAAGGGGACTGGACTCA	for mutagenesis; ΔN5-18 mutation
	reverse	CCCTCGAGTTAATCCTGGGGCTTTAAGAAC	
MPP6	forward	TGCGCATGAAGTTTAAGAAAATCATTAGTGAAGAGCAC	for mutagenesis; ΔN19-35 mutation
	reverse	TAATGATTTTCTTAAACTTACTGCGCAGTAGATTC	
RRP6	forward	CCATGGCGCCACCAGTACCCGGGAGCCCA	for cloning from cDNA library
	reverse	CCCTATCTCTGTGGCCAGTTGTACCTGAAG	
RRP6	forward	CCGGATCCATGGCGCCACCAGTACCCGGG	for adding restriction enzyme sites
	reverse	GGGATATCCTATCTCTGTGGCCAGTTGTACCTGAAG	
RRP6	forward	GGGCCTACCGCAATTCGGTGACGAATACGACTTTTACCGA	for mutagenesis; RNAi-resistant mutation
	reverse	TCGGTAAAAGTCGATTCGTCACCGAATTGCGGTAGGCC	
RRP6	forward	GATGCTCAGCGCCGCCGGGATG	for mutagenesis; Y436A mutation
	reverse	CATCCGGGCGGGCTGAGCATC	
RRP6	forward	CAGTTGACTTGGCGCACCACTCTT	for mutagenesis; E315A mutation
	reverse	AAGAGTGGTGCCCAAGTCAACTG	

Gene name		Nucleotide sequence 5'- 3'	description
DIS3	forward	ATGCTCAAGTCCAAGACGTTCTTAAAAAAG	for cloning from cDNA library
	reverse	CTATTTTCCAAGCTTCATCTTCTTTTCTT	
DIS3	forward	CCGGATCCATGCTCAAGTCCAAGACGTTCT	for adding restriction enzyme sites
	reverse	GGCTCGAGCTATTTTCCAAGCTTCATCTTC	
DIS3	forward	AGGTGAAAAGGAAACAGAGACTGAGGTTTTGTTACTTGAACACGA	for mutagenesis; RNAi-resistant mutation
	reverse	CCTCAGTCTCTGTTTCCTTTTACCTACATCACGTAATTTCTCA	
DIS3	forward	GACAGGAATAATAGAGCGATTCCGAGTAGCA	for mutagenesis;D146N mutation
	reverse	TCGCTCTATTATTCCTGTCTATTAGCATTTT	
DIS3	forward	ATAACAAATAACAGGAGAAACAAAGAGAAA	for mutagenesis;D177N mutation
	reverse	TTCTCCTGTTATTTGTTATGAAGATAACTT	
DIS3	forward	ACTGATATAACGATGCTCTACATTGTCGA	for mutagenesis;D487N mutation
	reverse	GAGCATCGTTTATATCAGTACATCCTGGTG	
DIS3	forward	GTTTAAACTTAAGCTATGGTGAAGCAAGGGCAGGAGC	for Infusion cloning
	reverse	GCCCTCTAGACTCGACTATTTTCCAAGCTTCATCTTC	
MTR4	forward	CCGGTACCTTTGGAAAGAAGCCAGGATAGAAGAG	for mutagenesis; ΔN75 mutation
	reverse	TAATGATTTTCTTAACTTACTGCGCAGTAGATTC	
ARS2	forward	CGGAATTCATGCCCAACCGCTGTGGCAT	for antigen production (cloned from mouse cDNA)
	reverse	CCGCTCGAGTCAAAGAAGTCAACATCAT	
C1D	forward	AACCCGGGATGGCAGGTGAAGAAATTAATG	for antigen production
	reverse	GGCTCGAGTTAACTTTTACTTTTTCCTTTA	
3xFLAG (Cterm)	forward	AAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCAC	for x3FLAG(C-term) construction
	reverse	GGCTCGAGCTAGTCATCGTCATCCTTGTA	
3xFLAG (Nterm)	forward	GGAAGCTTATGGACTACAAGACCATGAC	for x3FLAG(N-term) construction
	reverse	GCAAGCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATC	
RNVU1-20	forward	GGGATCCAGAAGGCGTTGTC	for cloning from genomic library
	reverse	CACCTTATTTGACCACACTGAC	
RNVU1-20	forward	TCGGGAGATCAGATCAGATCTGGGATCCAGAAGG	for Infusion cloning (cloned into BglI and BamHI digested pcDNA5/FRT/TO/IRES-dsRed)
	reverse	GGGGGGATCCCCCGGCACCTTATTTGACCAC	

表 6. 本解析で用いた qPCR 用 primer set

Gene name		Nucleotide sequence	Annealing temperature	resorce
GAPDH	forward(5'-3')	GTCAGCCGCATCTTCTTTTG	52	10.1126/science.1164096
	reverse(5'-3')	GCGCCCAATACGACCAAATC		
proDNAJB4	forward(5'-3')	TTTCTGGCGTTTCTGATTGA	52	10.1261/rna.048090.114.
	reverse(5'-3')	ACCAAAACGCAGGTTGTTTA		
SNHG19spliced	forward(5'-3')	CGTCCAGGCCTGGCCTAC	52	10.1016/j.molcel.2016.09.025
	reverse(5'-3')	GCTCGCGACGAAACCTGC		
vU1snRNA	forward(5'-3')	GAATCTCGACTACATAATTTGTGGCAG	57	10.1101/gr.142968.112
	reverse(5'-3')	CAGCAAACAAAATCCACTTTTAAACGAC		
PGK1	forward(5'-3')	GTTGCAGACAAGATCCAGCTC	57	10.1091/mbc.e09-10-0913
	reverse(5'-3')	GAAGTGCCAATCTCCATGTTG		
RRP6	forward(5'-3')	TGGAACCGTAAGGGCAGCAGAATATGGC	57	in this study
	reverse(5'-3')	TCTCTCGAAACTTGAGCTGAGGTCGG		
DIS3	forward(5'-3')	TGCAAGCTGTGTAATTCTGTTT	57	in this study
	reverse(5'-3')	GACATCTGCGTATCTTCTAATGGG		
DIS3L1	forward(5'-3')	GACGCTATATCCAGGAATTCTG	57	in this study
	reverse(5'-3')	AGCGGTTTCGAGCCTTCATC		
DIS3L2	forward(5'-3')	TCTGCTGAAGATGCAGAAGCAC	57	in this study
	reverse(5'-3')	CTCTTATCGTGTTTTGGGGCT		
MTR4	forward(5'-3')	CGCTGTAGCAAAGAGAGCTTG	57	in this study
	reverse(5'-3')	AACTGGGACAACCTGCATCTC		
SK12	forward(5'-3')	TGTCGAGCGTGGGGTCTGTG	57	in this study
	reverse(5'-3')	CAGTCAGCAAACCTCAAGGGCGTTGG		
SK13	forward(5'-3')	TGGAGGAAGGTGTTATGGTCCG	57	in this study
	reverse(5'-3')	ATGTTGCTGCCTGTTTCTGC		
SK18	forward(5'-3')	TTTGGTCAGTTGCTTGGGGG	57	in this study
	reverse(5'-3')	GCCTCTCATCAGCCATTTC		
RRP45	forward(5'-3')	AACTGCGAACGCCCTTCTAC	57	in this study
	reverse(5'-3')	TCCAAGTTCCACAATGCAGCATCCG		
PABPN1	forward(5'-3')	ATATGAGTCCACCTCCAGGC	57	in this study
	reverse(5'-3')	GCACCATAGTCCACATTGCC		
ZFC3H1	forward(5'-3')	CACATCCTGTGCCAAGAAGC	57	in this study
	reverse(5'-3')	GCTTTGGAAGCGAGATCACAG		
MPP6	forward(5'-3')	AGATGAATGCTAAGCACAAAGCAG	57	in this study
	reverse(5'-3')	CACCAAGGTCTCATATCTTCTAGC		
SNHG10	forward(5'-3')	GTTATTGACTTCTACCCAGCA	52	10.1016/j.molcel.2016.09.025
	reverse(5'-3')	CTGGAATCAATGAATCACGTTT		
NEAT1_2	forward(5'-3')	GTAGCTCGCTTATCCACAG	57	in this study
	reverse(5'-3')	CTGCCGATGAAGCAACAAAG		

引用文献

1. Birney,E., Stamatoyannopoulos,J.A., Dutta,A., Guigó,R., Gingeras,T.R., Margulies,E.H., Weng,Z., Snyder,M., Dermitzakis,E.T., Thurman,R.E., *et al.* (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, **447**, 799–816.
2. Djebali,S., Davis,C.A., Merkel,A., Dobin,A., Lassmann,T., Mortazavi,A., Tanzer,A., Lagarde,J., Lin,W., Schlesinger,F., *et al.* (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature*, **489**, 101–108.
3. Nair,L., Chung,H. and Basu,U. (2020) Regulation of long non-coding RNAs and genome dynamics by the RNA surveillance machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **21**, 123–136.
4. Ogami,K., Chen,Y. and Manley,J.L. (2018) RNA surveillance by the nuclear RNA exosome: mechanisms and significance. *Noncoding RNA*, **4**, 8.
5. Łabno,A., Tomecki,R. and Dziembowski,A. (2016) Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1863**, 3125–3147.
6. Kilchert,C., Wittmann,S. and Vasiljeva,L. (2016) The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **17**, 227–239.
7. Doma,M.K. and Parker,R. (2007) RNA Quality Control in Eukaryotes. *Cell*, **131**, 660–668.
8. Zinder,J.C. and Lima,C.D. (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev*, **31**, 88–100.
9. Dziembowski,A., Lorentzen,E., Conti,E. and Séraphin,B. (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 15–22.
10. Lorentzen,E., Walter,P., Fribourg,S., Evguenieva-Hackenberg,E., Klug,G. and Conti,E. (2005) The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 575–581.
11. Liu,Q., Greimann,J.C. and Lima,C.D. (2006) Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell*, **127**, 1223–1237.
12. Lorentzen,E., Basquin,J. and Conti,E. (2008) Structural organization of the RNA-degrading exosome. *Curr Opin Struct Biol*, **18**, 709–713.

13. Wang,H.-W., Wang,J., Ding,F., Callahan,K., Bratkowski,M.A., Butler,J.S., Nogales,E. and Ke,A. (2007) Architecture of the yeast Rrp44 exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 16844–16849.
14. Lebreton,A., Tomecki,R., Dziembowski,A. and Séraphin,B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*, **456**, 993–996.
15. Schaeffer,D., Reis,F.P., Johnson,S.J., Arraiano,C.M. and van Hoof,A. (2012) The CR3 motif of Rrp44p is important for interaction with the core exosome and exosome function. *Nucleic Acids Res*, **40**, 9298–9307.
16. Schneider,C., Leung,E., Brown,J. and Tollervey,D. (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1127–1140.
17. Bonneau,F., Basquin,J., Ebert,J., Lorentzen,E. and Conti,E. (2009) The Yeast Exosome Functions as a Macromolecular Cage to Channel RNA Substrates for Degradation. *Cell*, **139**, 547–559.
18. Schaeffer,D., Tsanova,B., Barbas,A., Reis,F.P., Dastidar,E.G., Sanchez-Rotunno,M., Arraiano,C.M. and van Hoof,A. (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 56–62.
19. Tomecki,R., Kristiansen,M.S., Lykke-Andersen,S., Chlebowski,A., Larsen,K.M., Szczesny,R.J., Drazkowska,K., Pastula,A., Andersen,J.S., Stepień,P.P., *et al.* (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J*, **29**, 2342–2357.
20. Staals,R.H.J., Bronkhorst,A.W., Schilders,G., Slomovic,S., Schuster,G., Heck,A.J.R., Raijmakers,R. and Pruijn,G.J.M. (2010) Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J*, **29**, 2358–2367.
21. Lorentzen,E., Basquin,J., Tomecki,R., Dziembowski,A. and Conti,E. (2008) Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Mol Cell*, **29**, 717–728.
22. Chang,H.-M., Triboulet,R., Thornton,J.E. and Gregory,R.I. (2013) A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28–let-7 pathway. *Nature*, **497**, 244–248.
23. Malecki,M., Viegas,S.C., Carneiro,T., Golik,P., Dressaire,C., Ferreira,M.G. and

- Arraiano,C.M. (2013) The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J*, **32**, 1842–1854.
24. Lubas,M., Damgaard,C.K., Tomecki,R., Cysewski,D., Jensen,T.H. and Dziembowski,A. (2013) Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *EMBO J*, **32**, 1855–1868.
 25. Briggs,M.W., Burkard,K.T.D. and Butler,J.S. (1998) Rrp6p, the Yeast Homologue of the Human PM-Scl 100-kDa Autoantigen, Is Essential for Efficient 5.8 S rRNA 3' End Formation. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 13255–13263.
 26. Allmang,C., Petfalski,E., Podtelejnikov,A., Mann,M., Tollervey,D. and Mitchell,P. (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' right-arrow 5' exonucleases. *Genes Dev*, **13**, 2148–2158.
 27. Januszyk,K., Liu,Q. and Lima,C.D. (2011) Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA*, **17**, 1566–1577.
 28. Makino,D.L., Baumgärtner,M. and Conti,E. (2013) Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature*, **495**, 70–75.
 29. Wasmuth,E., Januszyk,K. and Lima,C.D. (2014) Structure of an Rrp6–RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. *Nature*, **511**, 435–439.
 30. Makino,D.L., Schuch,B., Stegmann,E., Baumgärtner,M., Basquin,C. and Conti,E. (2015) RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature*, **524**, 54–58.
 31. Zinder,J.C., Wasmuth,E. and Lima,C.D. (2016) Nuclear RNA Exosome at 3.1 Å Reveals Substrate Specificities, RNA Paths, and Allosteric Inhibition of Rrp44/Dis3. *Mol Cell*, **64**, 734–745.
 32. Schneider,C., Kudla,G., Wlotzka,W., Tuck,A. and Tollervey,D. (2012) Transcriptome-wide Analysis of Exosome Targets. *Mol Cell*, **48**, 422–433.
 33. Schilders,G. (2005) MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6795–6804.
 34. Sloan,K.E., Mattijssen,S., Lebaron,S., Tollervey,D., Pruijn,G.J.M. and Watkins,N.J. (2013) Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *Journal of Cell Biology*, **200**, 577–588.
 35. Kobyłecki,K., Drażkowska,K., Kuliński,T.M., Dziembowski,A. and Tomecki,R. (2018) Elimination of 01/A'–A0 pre-rRNA processing by-product in human cells involves cooperative action of two nuclear exosome-associated nucleases: RRP6

- and DIS3. *RNA*, **24**, 1677–1692.
36. Davidson,L., Francis,L., Cordiner,R.A., Eaton,J.D., Estell,C., Macias,S., Cáceres,J.F. and West,S. (2019) Rapid Depletion of DIS3, EXOSC10, or XRN2 Reveals the Immediate Impact of Exoribonucleolysis on Nuclear RNA Metabolism and Transcriptional Control. *Cell Rep*, **26**, 2779-2791.e5.
 37. Szczepińska,T., Kalisiak,K., Tomecki,R., Labno,A., Borowski,L.S., Kulinski,T.M., Adamska,D., Kosinska,J. and Dziembowski,A. (2015) DIS3 shapes the RNA polymerase II transcriptome in humans by degrading a variety of unwanted transcripts. *Genome Res*, **25**, 1622–1633.
 38. Weick,E.-M. and Lima,C.D. (2021) RNA helicases are hubs that orchestrate exosome-dependent 3'-5' decay. *Curr Opin Struct Biol*, **67**, 86–94.
 39. Kadaba,S., Krueger,A., Trice,T., Krecic,A.M., Hinnebusch,A.G. and Anderson,J. (2004) Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNAMet in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, **18**, 1227–40.
 40. LaCava,J., Houseley,J., Saveanu,C., Petfalski,E., Thompson,E., Jacquier,A. and Tollervey,D. (2005) RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex. *Cell*, **121**, 713–724.
 41. Wyers,F., Rougemaille,M., Badis,G., Rousselle,J.-C., Dufour,M.-E., Boulay,J., Régnauld,B., Devaux,F., Namane,A., Séraphin,B., *et al.* (2005) Cryptic Pol II Transcripts Are Degraded by a Nuclear Quality Control Pathway Involving a New Poly(A) Polymerase. *Cell*, **121**, 725–737.
 42. Vaňáčová,Š., Wolf,J., Martin,G., Blank,D., Dettwiler,S., Friedlein,A., Langen,H., Keith,G. and Keller,W. (2005) A New Yeast Poly(A) Polymerase Complex Involved in RNA Quality Control. *PLoS Biol*, **3**, e189.
 43. Delan-Forino,C., Spanos,C., Rappsilber,J. and Tollervey,D. (2020) Substrate specificity of the TRAMP nuclear surveillance complexes. *Nat Commun*, **11**, 3122.
 44. Vasiljeva,L. and Buratowski,S. (2006) Nrd1 Interacts with the Nuclear Exosome for 3' Processing of RNA Polymerase II Transcripts. *Mol Cell*, **21**, 239–248.
 45. Tudek,A., Porrua,O., Kabzinski,T., Lidschreiber,M., Kubicek,K., Fortova,A., Lacroute,F., Vanacova,S., Cramer,P., Stefl,R., *et al.* (2014) Molecular Basis for Coordinating Transcription Termination with Noncoding RNA Degradation. *Mol Cell*, **55**, 467–481.
 46. Lubas,M., Christensen,M.S., Kristiansen,M.S., Domanski,M., Falkenby,L.G.,

- Lykke-Andersen,S., Andersen,J.S., Dziembowski,A. and Jensen,T.H. (2011) Interaction Profiling Identifies the Human Nuclear Exosome Targeting Complex. *Mol Cell*, **43**, 624–637.
47. Meola,N., Domanski,M., Karadoulama,E., Chen,Y., Gentil,C., Pultz,D., Vitting-Seerup,K., Lykke-Andersen,S., Andersen,J.S., Sandelin,A., *et al.* (2016) Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Mol Cell*, **64**, 520–533.
48. Shcherbik,N., Wang,M., Lapik,Y.R., Srivastava,L. and Pestov,D.G. (2010) Polyadenylation and degradation of incomplete RNA polymerase I transcripts in mammalian cells. *EMBO Rep*, **11**, 106–111.
49. Sudo,H., Nozaki,A., Uno,H., Ishida,Y. and Nagahama,M. (2016) Interaction properties of human TRAMP-like proteins and their role in pre-rRNA 5'ETS turnover. *FEBS Lett*, **590**, 2963–2972.
50. Tseng,C.-K., Wang,H.-F., Burns,A.M., Schroeder,M.R., Gaspari,M. and Baumann,P. (2015) Human Telomerase RNA Processing and Quality Control. *Cell Rep*, **13**, 2232–2243.
51. Nguyen,D., Grenier St-Sauveur,V., Bergeron,D., Dupuis-Sandoval,F., Scott,M.S. and Bachand,F. (2015) A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep*, **13**, 2244–2257.
52. Shukla,S., Schmidt,J.C., Goldfarb,K.C., Cech,T.R. and Parker,R. (2016) Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nat Struct Mol Biol*, **23**, 286–292.
53. Rammelt,C., Bilen,B., Zavolan,M. and Keller,W. (2011) PAPD5, a noncanonical poly(A) polymerase with an unusual RNA-binding motif. *RNA*, **17**, 1737–1746.
54. Berndt,H., Harnisch,C., Rammelt,C., Stohr,N., Zirkel,A., Dohm,J.C., Himmelbauer,H., Tavanez,J.-P., Huttelmaier,S. and Wahle,E. (2012) Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, **18**, 958–972.
55. Schmidt,M. and Norbury,C.J. (2010) Polyadenylation and beyond: emerging roles for noncanonical poly(A) polymerases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **1**, 142–151.
56. Topalian,S.L., Kaneko,S., Gonzales,M.I., Bond,G.L., Ward,Y. and Manley,J.L. (2001) Identification and Functional Characterization of Neo-Poly(A) Polymerase, an

- RNA Processing Enzyme Overexpressed in Human Tumors. *Mol Cell Biol*, **21**, 5614–5623.
57. Shi,Y. and Manley,J.L. (2015) The end of the message: multiple protein–RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev*, **29**, 889–897.
58. Lim,J., Kim,D., Lee,Y., Ha,M., Lee,M., Yeo,J., Chang,H., Song,J., Ahn,K. and Kim,V.N. (2018) Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation. *Science (1979)*, **361**, 701–704.
59. Tseng,C.-K., Wang,H.-F., Schroeder,M.R. and Baumann,P. (2018) The H/ACA complex disrupts triplex in hTR precursor to permit processing by RRP6 and PARN. *Nat Commun*, **9**, 5430.
60. Gable,D.L., Gaysinskaya,V., Atik,C.C., Talbot,C.C., Kang,B., Stanley,S.E., Pugh,E.W., Amat-Codina,N., Schenk,K.M., Arcasoy,M.O., *et al.* (2019) ZCCHC8 , the nuclear exosome targeting component, is mutated in familial pulmonary fibrosis and is required for telomerase RNA maturation. *Genes Dev*, **33**, 1381–1396.
61. Lubas,M., Andersen,P.R., Schein,A., Dziembowski,A., Kudla,G. and Jensen,T.H. (2015) The Human Nuclear Exosome Targeting Complex Is Loaded onto Newly Synthesized RNA to Direct Early Ribonucleolysis. *Cell Rep*, **10**, 178–192.
62. Hrossova,D., Sikorsky,T., Potesil,D., Bartosovic,M., Pasulka,J., Zdrahal,Z., Stefl,R. and Vanacova,S. (2015) RBM7 subunit of the NEXT complex binds U-rich sequences and targets 3'-end extended forms of snRNAs. *Nucleic Acids Res*, **43**, 4236–4248.
63. Falk,S., Finogenova,K., Melko,M., Benda,C., Lykke-Andersen,S., Jensen,T.H. and Conti,E. (2016) Structure of the RBM7–ZCCHC8 core of the NEXT complex reveals connections to splicing factors. *Nat Commun*, **7**, 13573.
64. Banerjee,A., Apponi,L.H., Pavlath,G.K. and Corbett,A.H. (2013) PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS Journal*, **280**, 4230–4250.
65. Beaulieu,Y.B., Kleinman,C.L., Landry-Voyer,A.-M., Majewski,J. and Bachand,F. (2012) Polyadenylation-Dependent Control of Long Noncoding RNA Expression by the Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. *PLoS Genet*, **8**, e1003078.
66. Bresson,S.M. and Conrad,N.K. (2013) The Human Nuclear Poly(A)-Binding Protein Promotes RNA Hyperadenylation and Decay. *PLoS Genet*, **9**, e1003893.
67. Bresson,S.M., Hunter,O., Hunter,A.C. and Conrad,N.K. (2015) Canonical Poly(A)

- Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs. *PLoS Genet*, **11**, e1005610.
68. Muniz,L., Davidson,L. and West,S. (2015) Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human Pre-mRNAs. *Mol Cell Biol*, **35**, 2218–2230.
 69. Kaida,D., Berg,M.G., Younis,I., Kasim,M., Singh,L.N., Wan,L. and Dreyfuss,G. (2010) U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*, **468**, 664–668.
 70. Chiu,A.C., Suzuki,H.I., Wu,X., Mahat,D.B., Kriz,A.J. and Sharp,P.A. (2018) Transcriptional Pause Sites Delineate Stable Nucleosome-Associated Premature Polyadenylation Suppressed by U1 snRNP. *Mol Cell*, **69**, 648-663.e7.
 71. So,B.R., Di,C., Cai,Z., Venters,C.C., Guo,J., Oh,J.-M., Arai,C. and Dreyfuss,G. (2019) A Complex of U1 snRNP with Cleavage and Polyadenylation Factors Controls Telescripting, Regulating mRNA Transcription in Human Cells. *Mol Cell*, **76**, 590-599.e4.
 72. Kamieniarz-Gdula,K., Gdula,M.R., Panser,K., Nojima,T., Monks,J., Wiśniewski,J.R., Riepsaame,J., Brockdorff,N., Pauli,A. and Proudfoot,N.J. (2019) Selective Roles of Vertebrate PCF11 in Premature and Full-Length Transcript Termination. *Mol Cell*, **74**, 158-172.e9.
 73. Almada,A.E., Wu,X., Kriz,A.J., Burge,C.B. and Sharp,P.A. (2013) Promoter directionality is controlled by U1 snRNP and polyadenylation signals. *Nature*, **499**, 360–363.
 74. Ntini,E., Järvelin,A.I., Bornholdt,J., Chen,Y., Boyd,M., Jørgensen,M., Andersson,R., Hoof,I., Schein,A., Andersen,P.R., *et al.* (2013) Polyadenylation site–induced decay of upstream transcripts enforces promoter directionality. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 923–928.
 75. Andersen,P.R., Domanski,M., Kristiansen,M.S., Storvall,H., Ntini,E., Verheggen,C., Schein,A., Bunkenborg,J., Poser,I., Hallais,M., *et al.* (2013) The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 1367–1376.
 76. Lardelli,R.M. and Lykke-Andersen,J. (2020) Competition between maturation and degradation drives human snRNA 3' end quality control. *Genes Dev*, **34**, 989–1001.
 77. Kawamoto,T., Yoshimoto,R., Taniguchi,I., Kitabatake,M. and Ohno,M. (2021) ISG20

- and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants. *Genes to Cells*, **26**, 18–30.
78. Ogami,K., Richard,P., Chen,Y., Hoque,M., Li,W., Moresco,J.J., Yates,J.R., Tian,B. and Manley,J.L. (2017) An Mtr4/ZFC3H1 complex facilitates turnover of unstable nuclear RNAs to prevent their cytoplasmic transport and global translational repression. *Genes Dev*, **31**, 1257–1271.
 79. Silla,T., Karadoulama,E., Makosa,D., Lubas,M. and Jensen,T.H. (2018) The RNA Exosome Adaptor ZFC3H1 Functionally Competes with Nuclear Export Activity to Retain Target Transcripts. *Cell Rep*, **23**, 2199–2210.
 80. Wu,G., Schmid,M., Rib,L., Polak,P., Meola,N., Sandelin,A. and Jensen,T.H. (2020) A Two-Layered Targeting Mechanism Underlies Nuclear RNA Sorting by the Human Exosome. *Cell Rep*, **30**, 2387-2401.e5.
 81. Fan,J., Kuai,B., Wang,K., Wang,L., Wang,Y., Wu,X., Chi,B., Li,G. and Cheng,H. (2018) mRNAs are sorted for export or degradation before passing through nuclear speckles. *Nucleic Acids Res*, **46**, 8404–8416.
 82. Fan,J., Kuai,B., Wu,G., Wu,X., Chi,B., Wang,L., Wang,K., Shi,Z., Zhang,H., Chen,S., *et al.* (2017) Exosome cofactor hMTR4 competes with export adaptor ALYREF to ensure balanced nuclear RNA pools for degradation and export. *EMBO J*, **36**, 2870–2886.
 83. Weir,J.R., Bonneau,F., Hentschel,J. and Conti,E. (2010) Structural analysis reveals the characteristic features of Mtr4, a DEXH helicase involved in nuclear RNA processing and surveillance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 12139–12144.
 84. Jackson,R.N., Klauer,A.A., Hintze,B.J., Robinson,H., van Hoof,A. and Johnson,S.J. (2010) The crystal structure of Mtr4 reveals a novel arch domain required for rRNA processing. *EMBO J*, **29**, 2205–2216.
 85. Hallais,M., Pontvianne,F., Andersen,P.R., Clerici,M., Lener,D., Benbahouche,N.E.H., Gostan,T., Vandermoere,F., Robert,M.-C., Cusack,S., *et al.* (2013) CBC–ARS2 stimulates 3'-end maturation of multiple RNA families and favors cap-proximal processing. *Nat Struct Mol Biol*, **20**, 1358–1366.
 86. Giacometti,S., Benbahouche,N.E.H., Domanski,M., Robert,M.-C., Meola,N., Lubas,M., Bukenborg,J., Andersen,J.S., Schulze,W.M., Verheggen,C., *et al.* (2017) Mutually Exclusive CBC-Containing Complexes Contribute to RNA Fate. *Cell Rep*,

- 18, 2635–2650.
87. Schulze,W.M., Stein,F., Rettel,M., Nanao,M. and Cusack,S. (2018) Structural analysis of human ARS2 as a platform for co-transcriptional RNA sorting. *Nat Commun*, **9**, 1701.
 88. Wang,J., Chen,J., Wu,G., Zhang,H., Du,X., Chen,S., Zhang,L., Wang,K., Fan,J., Gao,S., *et al.* (2019) NRDE2 negatively regulates exosome functions by inhibiting MTR4 recruitment and exosome interaction. *Genes Dev*, **33**, 536–549.
 89. Thoms,M., Thomson,E., Baßler,J., Gnädig,M., Griesel,S. and Hurt,E. (2015) The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. *Cell*, **162**, 1029–1038.
 90. Lingaraju,M., Johnsen,D., Schlundt,A., Langer,L.M., Basquin,J., Sattler,M., Heick Jensen,T., Falk,S. and Conti,E. (2019) The MTR4 helicase recruits nuclear adaptors of the human RNA exosome using distinct arch-interacting motifs. *Nat Commun*, **10**, 3393.
 91. Puno,M.R. and Lima,C.D. (2018) Structural basis for MTR4–ZCCHC8 interactions that stimulate the MTR4 helicase in the nuclear exosome-targeting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, E5506–E5515.
 92. Stead,J.A., Costello,J.L., Livingstone,M.J. and Mitchell,P. (2007) The PMC2NT domain of the catalytic exosome subunit Rrp6p provides the interface for binding with its cofactor Rrp47p, a nucleic acid-binding protein. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5556–5567.
 93. Schuch,B., Feigenbutz,M., Makino,D.L., Falk,S., Basquin,C., Mitchell,P. and Conti,E. (2014) The exosome-binding factors Rrp6 and Rrp47 form a composite surface for recruiting the Mtr4 helicase. *EMBO J*, **33**, 2829–2846.
 94. Falk,S., Bonneau,F., Ebert,J., Kögel,A. and Conti,E. (2017) Mpp6 Incorporation in the Nuclear Exosome Contributes to RNA Channeling through the Mtr4 Helicase. *Cell Rep*, **20**, 2279–2286.
 95. Wasmuth,E., Zinder,J.C., Zattas,D., Das,M. and Lima,C.D. (2017) Structure and reconstitution of yeast Mpp6-nuclear exosome complexes reveals that Mpp6 stimulates RNA decay and recruits the Mtr4 helicase. *Elife*, **6**, 1–24.
 96. Weick,E.-M., Puno,M.R., Januszyk,K., Zinder,J.C., DiMattia,M.A. and Lima,C.D. (2018) Helicase-Dependent RNA Decay Illuminated by a Cryo-EM Structure of a Human Nuclear RNA Exosome-MTR4 Complex. *Cell*, **173**, 1663-1677.e21.

97. Gerlach,P., Schuller,J.M., Bonneau,F., Basquin,J., Reichelt,P., Falk,S. and Conti,E. (2018) Distinct and evolutionary conserved structural features of the human nuclear exosome complex. *Elife*, **7**, 1–22.
98. Milligan,L., Decourty,L., Saveanu,C., Rappsilber,J., Ceulemans,H., Jacquier,A. and Tollervey,D. (2008) A Yeast Exosome Cofactor, Mpp6, Functions in RNA Surveillance and in the Degradation of Noncoding RNA Transcripts. *Mol Cell Biol*, **28**, 5446–5457.
99. Feigenbutz,M., Jones,R., Besong,T.M.D., Harding,S.E. and Mitchell,P. (2013) Assembly of the Yeast Exoribonuclease Rrp6 with Its Associated Cofactor Rrp47 Occurs in the Nucleus and Is Critical for the Controlled Expression of Rrp47. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 15959–15970.
100. Feigenbutz,M., Garland,W., Turner,M. and Mitchell,P. (2013) The Exosome Cofactor Rrp47 Is Critical for the Stability and Normal Expression of Its Associated Exoribonuclease Rrp6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, **8**, e80752.
101. Fujiwara,N., Yoshikawa,M., Yamazaki,T., Kambe,T., Nagao,M. and Masuda,S. (2010) A Screening Method Tuned for mRNA Processing Factors in Human Cells by Evaluation of the Luciferase Reporter Activity and the Subcellular Distribution of Bulk Poly(A) + RNA. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 1512–1516.
102. Tieg,B. and Krebber,H. (2013) Dbp5 - From nuclear export to translation. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, **1829**, 791–798.
103. Malet,H., Topf,M., Clare,D.K., Ebert,J., Bonneau,F., Basquin,J., Drazkowska,K., Tomecki,R., Dziembowski,A., Conti,E., *et al.* (2010) RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Rep*, **11**, 936–942.
104. Wasmuth,E. and Lima,C.D. (2012) Exo- and Endoribonucleolytic Activities of Yeast Cytoplasmic and Nuclear RNA Exosomes Are Dependent on the Noncatalytic Core and Central Channel. *Mol Cell*, **48**, 133–144.
105. Drazkowska,K., Tomecki,R., Stodulás,K., Kowalska,K., Czarnocki-Cieciura,M. and Dziembowski,A. (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res*, **41**, 3845–3858.
106. Liu,J.-J., Bratkowski,M.A., Liu,X., Niu,C.-Y., Ke,A. and Wang,H.-W. (2014) Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by

- EM. *Nat Struct Mol Biol*, **21**, 95–102.
107. Han,J. and van Hoof,A. (2016) The RNA Exosome Channeling and Direct Access Conformations Have Distinct In Vivo Functions. *Cell Rep*, **16**, 3348–3358.
108. Delan-Forino,C., Schneider,C. and Tollervy,D. (2017) RNA substrate length as an indicator of exosome interactions in vivo. *Wellcome Open Res*, **2**, 34.
109. Delan-Forino,C., Schneider,C. and Tollervy,D. (2017) Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLoS Genet*, **13**, e1006699.
110. Corpet,F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, **16**, 10881–10890.
111. Wasmuth,E. and Lima,C.D. (2017) The Rrp6 C-terminal domain binds RNA and activates the nuclear RNA exosome. *Nucleic Acids Res*, **45**, 846–860.
112. Yoshikatsu,Y., Ishida,Y., Sudo,H., Yuasa,K., Tsuji,A. and Nagahama,M. (2015) NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing. *Biochem Biophys Res Commun*, **464**, 780–786.
113. Tomecki,R., Drazkowska,K., Kucinski,I., Stodus,K., Szczesny,R.J., Gruchota,J., Owczarek,E.P., Kalisiak,K. and Dziembowski,A. (2014) Multiple myeloma-associated hDIS3 mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Res*, **42**, 1270–1290.
114. Gockert,M., Schmid,M., Jakobsen,L., Jens,M., Andersen,J.S. and Jensen,T.H. (2022) Rapid factor depletion highlights intricacies of nucleoplasmic RNA degradation. *Nucleic Acids Res*, **50**, 1583–1600.
115. Tavanez,J.P., Calado,P., Braga,J., Lafarga,M. and Carmo-Fonseca,M. (2005) In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA*, **11**, 752–62.
116. Klein,P., Oloko,M., Roth,F., Montel,V., Malerba,A., Jarmin,S., Gidaro,T., Popplewell,L., Perie,S., Lacau St Guily,J., *et al.* (2016) Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids Res*, **44**, 10929–10945.
117. Chujo,T., Yamazaki,T., Kawaguchi,T., Kurosaka,S., Takumi,T., Nakagawa,S. and Hirose,T. (2017) Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs. *EMBO J*, **36**, 1447–1462.

118. Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, **15**, 1–21.
119. Wang, R., Zheng, D., Wei, L., Ding, Q. and Tian, B. (2019) Regulation of Intronic Polyadenylation by PCF11 Impacts mRNA Expression of Long Genes. *Cell Rep*, **26**, 2766–2778.e6.
120. Iasillo, C., Schmid, M., Yahia, Y., Maqbool, M.A., Descostes, N., Karadoulama, E., Bertrand, E., Andrau, J.-C. and Jensen, T.H. (2017) ARS2 is a general suppressor of pervasive transcription. *Nucleic Acids Res*, **45**, 10229–10241.
121. Gruber, J.J., Olejniczak, S.H., Yong, J., la Rocca, G., Dreyfuss, G. and Thompson, C.B. (2012) Ars2 Promotes Proper Replication-Dependent Histone mRNA 3' End Formation. *Mol Cell*, **45**, 87–98.
122. Narita, T., Yung, T.M.C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y. and Handa, H. (2007) NELF Interacts with CBC and Participates in 3' End Processing of Replication-Dependent Histone mRNAs. *Mol Cell*, **26**, 349–365.
123. Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L.E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*, **12**, 675–687.
124. van Dijk, E.L., Schilders, G. and Pruijn, G.J.M. (2007) Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *Rna*, **13**, 1027–1035.
125. Graham, A.C., Kiss, D.L. and Andrulis, E.D. (2006) Differential Distribution of Exosome Subunits at the Nuclear Lamina and in Cytoplasmic Foci. *Mol Biol Cell*, **17**, 1399–1409.
126. Haile, S., Cristodero, M., Clayton, C. and Estévez, A.M. (2007) The subcellular localisation of trypanosome RRP6 and its association with the exosome. *Mol Biochem Parasitol*, **151**, 52–58.
127. Kowalinski, E., Kögel, A., Ebert, J., Reichelt, P., Stegmann, E., Habermann, B. and Conti, E. (2016) Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex. *Mol Cell*, **63**, 125–134.
128. Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. and Jensen, T.H. (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature*, **413**, 538–542.

129. Wang,Y., Fan,J., Wang,J., Zhu,Y., Xu,L., Tong,D. and Cheng,H. (2021) ZFC3H1 prevents RNA trafficking into nuclear speckles through condensation. *Nucleic Acids Res*, **49**, 10630–10643.
130. Masuyama,K., Taniguchi,I., Kataoka,N. and Ohno,M. (2004) RNA length defines RNA export pathway. *Genes Dev*, **18**, 2074–2085.
131. McCloskey,A., Taniguchi,I., Shinmyozu,K. and Ohno,M. (2012) hnRNP C Tetramer Measures RNA Length to Classify RNA Polymerase II Transcripts for Export. *Science (1979)*, **335**, 1643–1646.
132. Kudo,N., Matsumori,N., Taoka,H., Fujiwara,D., Schreiner,E.P., Wolff,B., Yoshida,M. and Horinouchi,S. (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 9112–9117.
133. Puno,M.R. and Lima,C.D. (2022) Structural basis for RNA surveillance by the human nuclear exosome targeting (NEXT) complex. *Cell*, **185**, 2132-2147.e26.
134. Gerlach,P., Garland,W., Lingaraju,M., Salerno-Kochan,A., Bonneau,F., Basquin,J., Jensen,T.H. and Conti,E. (2022) Structure and regulation of the nuclear exosome targeting complex guides RNA substrates to the exosome. *Mol Cell*, **82**, 2505-2518.e7.
135. de Amorim,J., Slavotinek,A., Fasken,M.B., Corbett,A.H. and Morton,D.J. (2020) Modeling Pathogenic Variants in the RNA Exosome HHS Public Access.
136. Sterrett,M.C., Enyenihi,L., Leung,S.W., Hess,L., Strassler,S.E., Farchi,D., Lee,R.S., Withers,E.S., Kremisky,I., Baker,R.E., *et al.* A Budding Yeast Model for Human Disease Mutations in the EXOSC2 Cap Subunit of the RNA Exosome Complex Running Title: A Budding Yeast Model for EXOSC2 mutations.
137. Matsumoto-Taniura,N., Pirollet,F., Monroe,R., Gerace,L. and Westendorf,J.M. (1996) Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning. *Mol Biol Cell*, **7**, 1455–1469.
138. Valencia,P., Dias,A.P. and Reed,R. (2008) Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 3386–3391.
139. McQuin,C., Goodman,A., Chernyshev,V., Kamentsky,L., Cimini,B.A., Karhohs,K.W., Doan,M., Ding,L., Rafelski,S.M., Thirstrup,D., *et al.* (2018) CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol*, **16**,

e2005970.

140. Dao,D., Fraser,A.N., Hung,J., Ljosa,V., Singh,S. and Carpenter,A.E. (2016) CellProfiler Analyst: interactive data exploration, analysis and classification of large biological image sets. *Bioinformatics*, **32**, 3210–3212.
141. Folco,E.G., Lei,H., Hsu,J.L. and Reed,R. (2012) Small-scale Nuclear Extracts for Functional Assays of Gene-expression Machineries. *Journal of Visualized Experiments*, 10.3791/4140.
142. Masuda,S., Das,R., Cheng,H., Hurt,E., Dorman,N. and Reed,R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev*, **19**, 1512–7.
143. Jones,D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, **292**, 195–202.
144. Danecek,P., Bonfield,J.K., Liddle,J., Marshall,J., Ohan,V., Pollard,M.O., Whitwham,A., Keane,T., McCarthy,S.A., Davies,R.M., *et al.* (2021) Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, **10**, 1–4.
145. Anders,S., Pyl,P.T. and Huber,W. (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**, 166–169.
146. R Development Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*.
147. Ramírez,F., Ryan,D.P., Grüning,B., Bhardwaj,V., Kilpert,F., Richter,A.S., Heyne,S., Dündar,F. and Manke,T. (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res*, **44**, W160–W165.
148. Kurtenbach,S. and William Harbour,J. (2019) SparK: A Publication-quality NGS Visualization Tool. *bioRxiv*, 10.1101/845529.
149. Yu,G., Wang,L.G. and He,Q.Y. (2015) ChIP seeker: An R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics*, **31**, 2382–2383.
150. Yamazaki,T., Souquere,S., Chujo,T., Kobelke,S., Chong,Y.S., Fox,A.H., Bond,C.S., Nakagawa,S., Pierron,G. and Hirose,T. (2018) Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol Cell*, **70**, 1038-1053.e7.

謝辞

本研究を行うにあたり多くの方々のご助力を賜りました。

まず、博士後期課程の中途より今春までの長期に渡って直接ご指導を賜りました、京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野の前准教授で現在近畿大学農学部教授の増田誠司博士に深く感謝いたします。本研究に限らず、研究における考え方や技術について普段から丁寧にご教授いただきました。

研究生生活の初めにご指導を戴いた、当時京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野准教授の故岩井裕子博士には研究に向き合う真摯な姿勢を教えていただきました。その後ご指導賜りました京都大学京都大学大学院医学研究科の岩井一宏教授には研究の魅力、面白さを改めて教えていただきました。京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野の永尾雅哉教授ならびに神戸大准教授には研究や進路について学部生の頃より多くの助言を戴きました。

京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学分野の片山高嶺教授ならびに加藤紀彦助教には本研究を継続するためにご助力賜り、快適な研究環境をご提供いただきました。

本研究にご協力および有意義な議論をいただきました、大阪大学大学院情報科学研究科の松田秀雄教授ならびに瀬尾茂人准教授、明治薬科大学生体分子学研究室教授の長浜正己教授、藤田医科大学医科学研究センターの藤田賢一助教、一緒に研究してくれた重本真紀さん、平山瑞季さんに深く感謝いたします。また、京都大学生命科学研究科生体情報応答学および分子応答機構学分野のその他の皆様にも普段より様々な面で助けていただきました。心より御礼申し上げます。

最後に、これまで本当に長い間、心配しつつも見守り応援してくれた両親に心より感謝します。

令和4年12月12日

藤原 奈央子

論文目録

本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

Naoko Fujiwara, Maki Shigemoto, Mizuki Hirayama, Ken-Ichi Fujita, Shigeto Seno,
Hideo Matsuda, Masami Nagahama, Seiji Masuda

**MPP6 stimulates both RRP6 and DIS3 to degrade a specified subset of MTR4-sensitive
substrates in the human nucleus**

Nucleic Acids Res. 2022 Aug 26;50(15):8779-8806. doi: 10.1093/nar/gkac559.