

U snRNA の核外輸送複合体の形成に
関与する因子の解析

和泉 光人

2014年1月7日

目次

| | |
|--|----|
| 論文要旨 | 1 |
| 序論 | |
| 1. RNA の核外輸送 | 3 |
| 2. U snRNA の核-細胞質間輸送 | 8 |
| 3. 核外輸送における RNA の識別機構 | 10 |
| 4. mRNA と U snRNA の識別機構 | 12 |
| 5. RNA の長さを測る分子機構 | 14 |
| 6. 本研究の目的 | 16 |
| 結果 | |
| 1. 核内 RNA 結合タンパク質 p54nrb は PHAX と RNA の結合を促進する | 17 |
| 2. p54nrb と PSF は U snRNA/CBC/PHAX の三者複合体である pre-complex の形成を促進する | 20 |
| 3. p54nrb と PSF は export-complex の形成を促進する | 23 |
| 4. p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送を促進する | 25 |
| 5. p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体と共に細胞質へは輸送されない | 29 |
| 考察 | |
| 1. U snRNA の核外輸送における p54nrb と PSF の役割 | 32 |
| 2. 多様な機能を持つ p54nrb と PSF の制御について | 33 |
| 3. 細胞内での p54nrb と PSF による U snRNA 核外輸送複合体の形成促進について | 36 |
| 4. 総括 | 39 |
| 実験の材料と方法 | 40 |
| 参考文献 | 47 |
| 謝辞 | 55 |

論文要旨

真核細胞において、核内で転写された多くの RNA は核から細胞質へと輸送される。このとき、mRNA、rRNA、tRNA など RNA の種類によって異なる組み合わせの輸送因子群が RNA 上にリクルートされ、RNA 種ごとに異なる核外輸送複合体を形成することが明らかとなっている。輸送因子群は単に RNA を細胞質へと運び出すだけではなく、細胞質へ輸送された後の RNA の機能にも関与している。つまり、RNA が適切に機能するためには、RNA 種ごとに適切な核外輸送複合体を形成することが重要となる。mRNA 前駆体のスプライシングに働く U snRNA も成熟化のために細胞質へと輸送され、成熟化の後に再び核へと輸送される。U snRNA においても U snRNA 特異的な核外輸送複合体を形成する必要があり、例えば mRNA 特異的な輸送因子群によって運ばれた U snRNA は核内への再輸送が行われなくなることが知られている。

以前に本研究室において、U snRNA 核外輸送複合体の構成因子の一つである PHAX と RNA の結合を促進する活性が HeLa 細胞核抽出液 (HNE) 中に存在することが発見された。さらに、この活性が HNE から生化学的に精製された結果、活性の候補因子として p54nrb と呼ばれる核内 RNA 結合タンパク質が同定された。しかし、このタンパク質が実際に同活性を担っているかについて詳細な解析は行われていなかった。そこで、本研究では p54nrb が U snRNA 核外輸送複合体の形成に関与するかどうかを明らかにすることとした。

その結果、確かに p54nrb は PHAX と RNA の結合を増強したが、HNE 中の活性に比べてはるかに低いものであった。そのため、p54nrb 以外の別の因子もこの活性に関与することが示唆された。これまでに、p54nrb は PSF と呼ばれる RNA 結合タンパク質と二量体を形成し、核内の様々な機能に関与していることが報告されている。そのため、p54nrb と

共に PSF が同活性に関与していることが考えられた。実際に、p54nrb と PSF の両者を同時に用いて解析したところ PHAX と RNA の結合が強く促進されることが明らかとなった。また、p54nrb と PSF は PHAX を含む U snRNA 核外輸送複合体の構成因子と結合し、U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進し、その結果として U snRNA の核外輸送を促進することが明らかとなった。

以上により、p54nrb と PSF は核内において U snRNA 核外輸送複合体の形成に働き、U snRNA が正しい経路で輸送され、細胞質で機能することを保証していると考えられる。

序論

1. RNA の核外輸送

真核細胞の大きな特徴の一つとして核と呼ばれる細胞小器官を持つことが挙げられる。核膜孔複合体と呼ばれる構造体が核膜を貫通しており、この孔構造を通して核と細胞質の間の生体分子の輸送が行われている。核内には遺伝情報として DNA が詰め込まれており、遺伝子発現の際には核内において DNA から RNA が転写される。続いて、RNA は細胞質へと運び出され、リボソームによってタンパク質に翻訳される。このように真核細胞は遺伝子発現の場を核と細胞質の二つの区画に分けることにより、遺伝子発現を時間的、空間的に制御することが可能となった。しかし、転写された RNA を核から翻訳の場である細胞質へと運び出す機構が必要となった。なぜなら、RNA は単独では核膜孔複合体を通過できないからである。そのため、真核細胞は核外輸送因子と呼ばれるタンパク質を用いて RNA を細胞質へと運び出している。核外へ輸送される RNA として、マイクロ RNA (miRNA)、転移 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、ウリジンリッチ核内低分子 RNA (U snRNA)、メッセンジャー RNA (mRNA) など様々な種類の RNA が存在する。これら種々の RNA は単一の核外輸送因子によって細胞質へと運ばれるわけではなく、異なる RNA 分子は異なる組み合わせの核外輸送因子群によって輸送されることが明らかとなっている。本研究の主役である U snRNA の核-細胞質間輸送については後ほど詳述するが、その前にそれ以外の主要な RNA の核外輸送について簡単に述べる (図 1)。

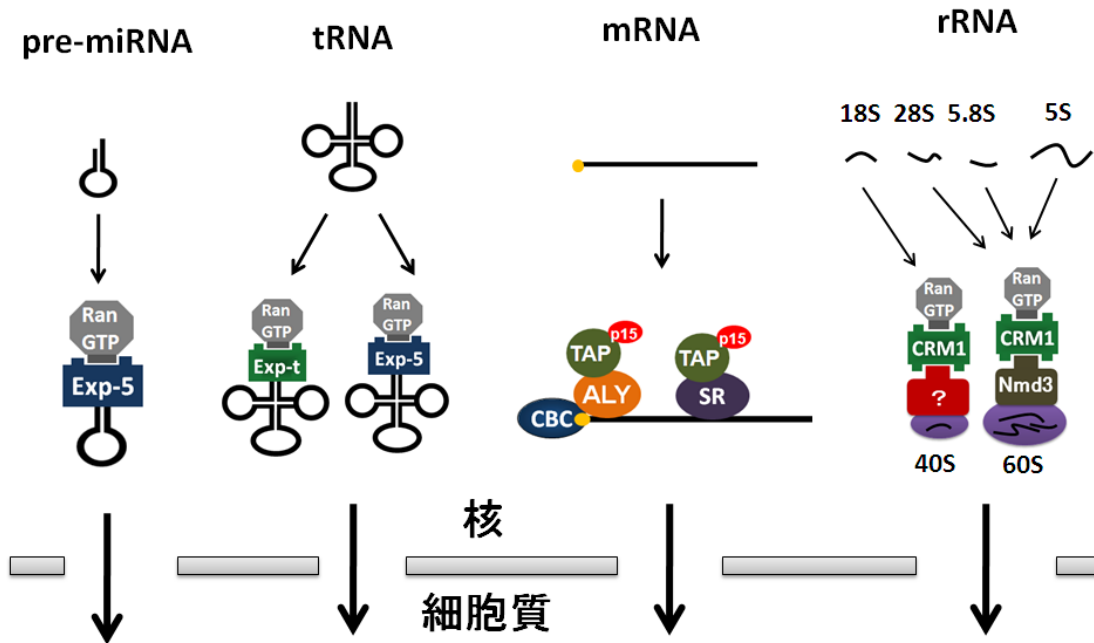


図1 様々なRNAの核外輸送機構

異なる種類のRNAは異なる組み合わせの核外輸送因子群によって、細胞質へと運ばれる

・miRNA

miRNAはタンパク質をコードしない19~23塩基の低分子RNAであり、細胞質においてmRNAの不安定化や切断、あるいは翻訳抑制を行うことによって遺伝子発現を制御している。ゲノムにコードされたmiRNAはまず一次転写産物(primary miRNA: pri-miRNA)として核内で転写される。pri-miRNAは、RNaseであるDroshaと二本鎖RNA結合タンパク質DGCR8(DiGeorge syndrome Critical Region gene 8)を含むmicroProcessorと呼ばれる複合体によって、miRNA前駆体(pre-miRNA)へとプロセッシングされる(Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003)。プロセッシングの結果、pre-miRNAは2~3塩基の3'突出末端を持つヘアピン構造をとる。この特徴的な構造を核外輸送因子であるExportin-5がRan-GTP依存的に認識し、pre-miRNAを細胞質へと輸送する(Bohnsack et al., 2004; Lu and Cullen, 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003)。

細胞質へと輸送された pre-miRNA は Dicer と呼ばれる RNase により切断され、21 塩基程度の miRNA へと成熟する (Bernstein et al., 2001)。最終的に miRNA は Argonaute タンパク質と共に RISC (RNA induced silencing complex) と呼ばれる複合体を形成し、標的 mRNA の切断などにより遺伝子発現の調節を行う。

・ tRNA

tRNA は RNA ポリメラーゼ III によって転写され、タンパク質翻訳の際に必要なアミノ酸をリボソームに運搬しタンパク質の合成に関与する。tRNA は核内で転写された後、5' 末端と 3' 末端の余分な配列が除去され、さらに 3' 末端への CCA 付加などの一連の成熟過程を経る。

tRNA の主要な核外輸送因子として Exportin-t が明らかとなっている (Arts et al., 1998a,b; Kutay et al., 1998)。Exportin-t は成熟過程を経た tRNA の持つ立体構造を認識し、Ran-GTP 依存的に tRNA に結合する。さらに、Exportin-t とは別に Exportin-5 も tRNA の核外輸送に関与することが知られている (Bohnsack et al., 2002; Calado et al., 2002)。

・ rRNA

rRNA はタンパク質合成の場となるリボソームの構成因子であり、まず、RNA ポリメラーゼ I によって 35S rRNA が転写される。転写された 35S rRNA は切断され、さらに 18S、5.8S、28S rRNA となる。また、RNA ポリメラーゼ III によって別途 5S rRNA が転写される。この内、28S、5.8S、5S rRNA は 60S リボソームサブユニット、18S rRNA は 40S リボソームサブユニットの構成因子となる。60S リボソームサブユニットは、アダプター分子である Nmd3 を介して Ran-GTP 依存的に CRM1 が結合し (Johnson et al., 2002; Tschochner et al., 2003) 核外へ輸送される (Gadal et al., 2001; Ho et al., 2000; Trotta et al., 2003)。近年、酵母において Mtr2-Mex67 の二量体や、Arx1 などの輸送因子も 60S リ

ボソームサブユニットの核外輸送に関与することが明らかとなった(Yao, W.et al., 2007)。40S リボソームサブユニットも CRM1 によって核外へと輸送されるが、アダプター分子などについては不明である。

• mRNA

タンパク質翻訳の鋳型として働く mRNA は、RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5'末端への m⁷G キャップ構造の付加、スプライシング反応、3'末端の切断とポリ A 付加といった一連のプロセッシング反応を受けて核外へと輸送される。mRNA の主要な核外輸送因子は TAP-p15 の二量体であり(Segref et al., 1997; Katahira et al., 1999)、RNA 結合タンパク質である Aly/REF によって mRNA 上にリクルートされる(Strasser and Hurt, 2000; Stutz et al., 2000)。Aly/REF はスプライシングによって形成されるエキソン連結部位の 20 塩基上流に集合する EJC(Kim et al., 2001; Kim and Dreyfuss, 2001; Le Hir et al., 2000)の構成因子である。そのため、mRNA は成熟化し輸送される準備が整ったときのみ、TAP-p15 と結合できる (図 2A)。また、Aly/REF だけではなく mRNA 前駆体のスプライシングに働く SR タンパク質も TAP-p15 と mRNA を仲介するアダプターとして機能している (Hung and Steitz, 2005)。

このように mRNA の核外輸送はスプライシングと共役して行われている。ではイントロンを持たない mRNA はどのように細胞質へと輸送されるのだろうか。イントロンを含まない mRNA の場合においても Aly/REF が核外輸送のアダプターとして働いており、この際には RNA ヘリカーゼである UAP56 が重要な働きを担っている。UAP56 は ATP 依存的に Aly/REF を mRNA 上にリクルートし (Taniguchi and Ohno, 2007)、スプライシングに依存せずに mRNA 上に核外輸送複合体を形成させると考えられている (図 2B)。

また、酵母の場合には転写と共役して核外輸送に関与するアダプタータンパク質が mRNA 上にリクルートされる。酵母の転写伸長複合体 (Tho complex) には Yra1 (Aly/REF

の酵母ホモログ) や Sub2p (UAP56 の酵母ホモログ) が含まれており、TREX (Transcription-Export) と呼ばれる巨大な複合体を形成し (Strasser et al., 2002)、転写中の mRNA 上に Yra1 および Mex67 (TAP の酵母ホモログ) がリクルートされる (図 2C)。TREX 複合体は高等真核細胞においても同定されているが、酵母とは異なり mRNA の 5' 近傍のスプライシングに依存してリクルートされているらしい (Masuda et al., 2005; Cheng et al., 2006)。また、イントロンを持たない mRNA であっても TREX がリクルートされている可能性が示唆されている (Lei et al., 2011)。TREX にも Aly/REF が含まれており (図 2A)、TREX は mRNA の核外輸送を促進するが、TREX と EJC との関連は不明である。

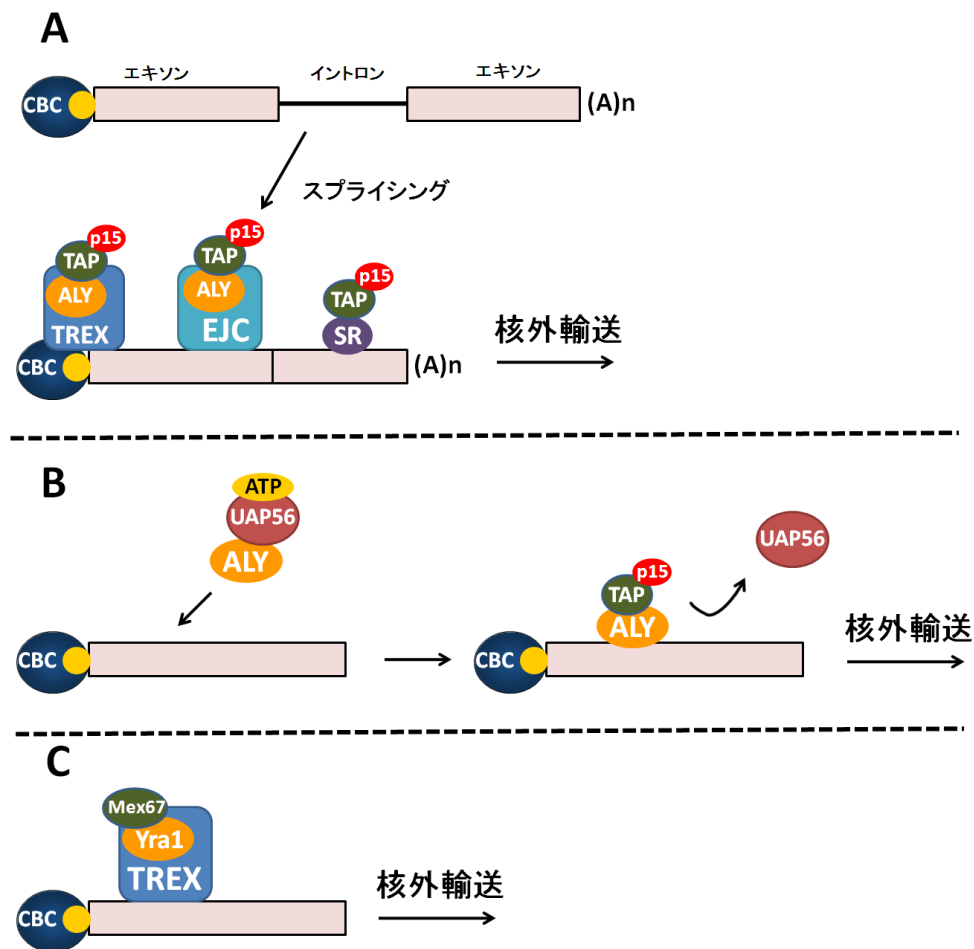


図 2 高等真核細胞と酵母の mRNA 輸送

- (A) 真核細胞におけるイントロンを持つ mRNA の核外輸送。
- (B) 真核細胞におけるイントロンを持たない mRNA の核外輸送。
- (C) 酵母における転写と共役した mRNA の核外輸送。

2. U snRNA の核-細胞質間輸送

前駆体 mRNA のスプライシングに働く U snRNA は、ウリジンに富んだ核内低分子 RNA の略称であり、U1、U2、U4、U5 など多種類の RNA を含む。U snRNA は RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5'末端に m⁷G キャップ構造が付加された後(Hamm and Mattaj, 1990)、機能成熟のために一旦細胞質へと輸送される(図 3、Mattaj et al., 1988)。核外輸送の第一段階として、m⁷G キャップ構造に CBC (Cap Binding Complex) と呼ばれるタンパク質複合体が結合する (Izaurralde et al., 1995; Izaurralde et al., 1994; Izaurralde et al., 1992)。続いて、U snRNA と CBC の両者に結合することにより PHAX (Phosphorylated Adaptor for RNA export) と呼ばれるアダプタータンパク質が参入し、RNA、CBC、PHAX の三者複合体である pre-complex が形成される(Ohno et al., 2000)。この pre-complex の形成はおそらく核内構造体であるカハール体で行われ、適正な pre-complex のみがカハール体から抜け出し、次の輸送複合体形成の段階に進むことができる(Suzuki et al., 2010)。次いで、pre-complex 中の PHAX が持つ核外輸送シグナル配列 (Nuclear Export Signal ;NES) に、CRM1 が Ran-GTP 依存的に結合することにより、U snRNA 核外輸送複合体 (以下 export-complex と述べる) が形成され細胞質に輸送される (Fornerod et al., 1997; Ohno et al., 2000)。輸送後、Ran-GTP の加水分解と PHAX の脱リン酸化により export-complex は解体する。

細胞質で核外輸送因子と解離した U snRNA は、次に RNA 結合タンパク質である Sm タンパク質群 (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF, SmG) から構成されるへ

テロ 7 量体と複合体を形成する (Massenet et al., 2002; Mouaikel et al., 2003)。Sm タンパク質は、U snRNA 内の Sm 部位と呼ばれる配列に結合するが、この U snRNA と Sm タンパク質の複合体の形成は SMN 複合体 (the Survival of Motor Neurons protein complex) によって行われる (Pellizzoni et al., 2007)。SMN 複合体によって、適切な RNA-タンパク質複合体 (Sm コア) が形成されると m⁷G キャップ構造のジメチル化によりトリメチルグアノシン (TMG) キャップ構造が形成され、さらに U snRNA の 3'末端の余分な配列が除去される (Mouaikel et al., 2002)。その後、TMG キャップ構造に snurportin-1 (SPN1) が結合し、SPN1 と Sm コアの両方を核内輸送因子である importin β が認識し、U snRNA は核に再輸送される (Huber et al., 1998)。核内へと輸送された U snRNA はカハール体でさらなる修飾を経て、mRNA のスプライシングに関与する。核内でのスプライシング反応に働く U snRNA が、なぜ一旦細胞質へと輸送されるのかについては不明な点が多いが、機能不全の U snRNA が核内に蓄積することを防ぐことが示唆されている (Yong et al., 2004)。

U6 snRNA もスプライソソームの構成因子であり、スプライシングに働くがその成熟過程は他の U snRNA とは異なっている。U6 snRNA は RNA ポリメラーゼ III によって転写されるため、m⁷G キャップ構造が付加されず核外輸送因子による細胞質への輸送は行われず。そのため、U6 snRNA の成熟過程は核内でのみ進行する (Wolin and Cedervall, 2002; Spiller et al., 2007)。

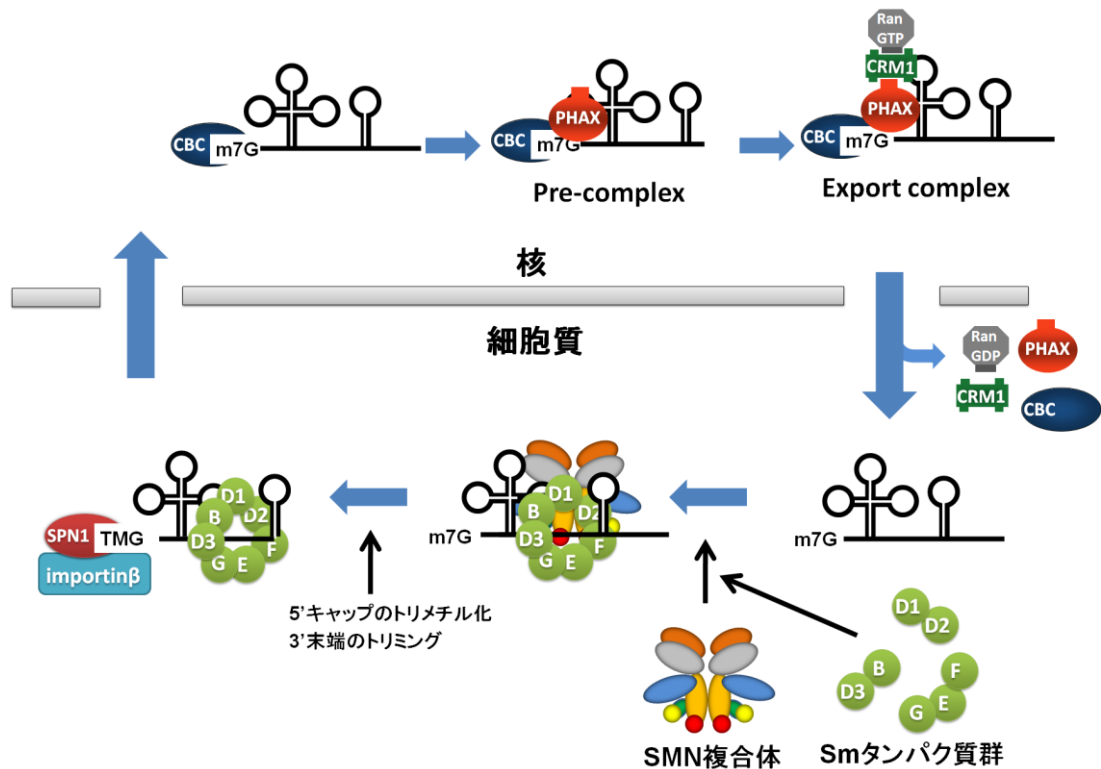


図3 U snRNA の成熟過程

核内で転写された U snRNA は細胞質へと輸送され、一連の成熟過程を経る。そして、再び核へと再輸送されてスプライシングに働く。

3. 核外輸送における RNA の識別機構

前述のように異なる種類の RNA は、異なる種類の核外輸送因子によって細胞質へと輸送される。RNA が細胞質で正しく機能するためには、RNA 種ごとに適切な核外輸送複合体を形成することが重要である。そのため、RNA は自身の輸送経路を規定する特徴も保有しており、これにより RNA は正しい輸送経路を経ることができる。この輸送経路を規定する特徴の一つとして RNA の立体構造が挙げられる。pre-miRNA や tRNA は特徴的な立体構造をとり、この構造を核外輸送因子である Exportin-t や Exportin-5 が直接認識することによって細胞質へと輸送している。

また、RNA 上の特定の塩基配列も RNA の輸送経路を規定する特徴として働く。例え

ばレトロウイルスである HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1)は宿主に感染後、ウイルス粒子の形成のため mRNA を核から細胞質へと輸送する必要がある。HIV-1 のゲノムから転写された mRNA には RRE (Rev response element) と呼ばれる特徴的な塩基配列が存在し、この配列にウイルス因子である Rev (Regulator of Virus expression) が結合する。Rev は核外輸送シグナル配列である NES を持つため、CRM1 が Ran-GTP 依存的に Rev に結合し、HIV-1 ゲノム由来の mRNA は細胞質へと輸送される (Malim et al., 1989; Pollard and Malium, 1998)。さらに一部の mRNA、例えばヒストン H2A mRNA やサイトカインをコードする mRNA なども核外輸送に必要な特徴的な塩基配列を持つ。ヒストン H2A mRNA の場合には、RNA 上に intronless transport element と呼ばれる配列があり、この配列上に SR タンパク質を介して Tap-p15 などの核外輸送因子がリクルートされる (Huang and Carmichale, 1997)。一方、サイトカインをコードする mRNA は、3'非翻訳領域に ARE (AU-rich element)と呼ばれる塩基配列を持っており、この配列に HuR、pp32、APRIL が結合する。pp32 と APRIL は NES を持つため、サイトカイン mRNA は CRM1 によって細胞質へと輸送される (Brennnan et al., 2000; Gallouzi and Steitz, 2001)。

このように、核外輸送に先立って RNA を識別するために RNA の持つ特徴的な立体構造や塩基配列が目印として用いられている。しかし、大部分の mRNA や U snRNA は必ずしも特徴的な立体構造や塩基配列を持つわけではない。さらに、mRNA と U snRNA は共に RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5'末端への m⁷キャップ構造の付加、CBC の結合など多くの共通点を持つ。これらの共通点を持つにも関わらず、mRNA と U snRNA は明確に区別され、異なる核外輸送因子によって細胞質へと輸送されている。そのため、次に mRNA と U snRNA の識別機構について、これまでに明らかになっていることを述べる。

4. mRNA と U snRNA の識別機構

mRNA と U snRNA の大きな違いとして、まずイントロンの有無が挙げられる。そして、核外輸送においてもイントロンを持つ RNA が mRNA として認識され細胞質へと輸送されることが明らかとなっている (Ohno et al., 2002)。これまで述べたように U snRNA は、PHAX が核外輸送のアダプターとして働き CRM1 によって輸送される。しかし、U snRNA に mRNA のイントロンを挿入したキメラ RNA はスプライシングを受けた後、CRM1 ではなく mRNA の核外輸送因子である TAP-p15 によって輸送されることが明らかとなった (図 4A)。これは、スプライシングを受けたキメラ RNA 上に Aly/REF を含む EJC や TREX 複合体がリクルートされ、その結果 TAP-p15 による核外輸送が行われたと考えられる (Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2001; Masuda et al., 2005; Cheng et al., 2006)。また TAP-p15 によって核外輸送されたキメラ RNA は塩基配列的には U snRNA と同じでありながら、核内への再輸送が行われなかった (Ohno et al., 2002)。このことから、RNA が適切に機能するためには RNA 種ごとに適切な輸送経路を経ることが重要であると言える。

しかし、高等真核生物においても全ての mRNA にイントロンが含まれているわけではない。では、イントロンを持たない mRNA と U snRNA はどのように識別されているのだろうか。mRNA と U snRNA のもう一つの違いとして、長さが異なるということが挙げられる。一般的に mRNA は 2000nt 以上であり、U snRNA は 200nt 以下である。この RNA の長さが、RNA の核外輸送を規定するかどうかを調べるために以下の実験が行われた。

U snRNA に立体構造をとらないような 50nt から 300nt の塩基配列を挿入し、アフリカツメガエル卵母細胞核への顕微注入実験により、RNA の核外輸送経路にどのような変化が生じるのか解析された。その結果、U snRNA に挿入する塩基配列を長くすると PHAX ではなく Aly/REF が結合し mRNA 型の核外輸送に切り替わることが明らかとなった。

また、逆にイントロを含まない mRNA を短くしたところ、Aly/REF ではなく PHAX が結合し U snRNA 型の核外輸送に切り替わることが明らかとなった (図 4B)。そして、この核

外輸送の切り替えは 200nt から 300nt の長さを境目として行われることが明らかとなった (Masuyama et al., 2004)。

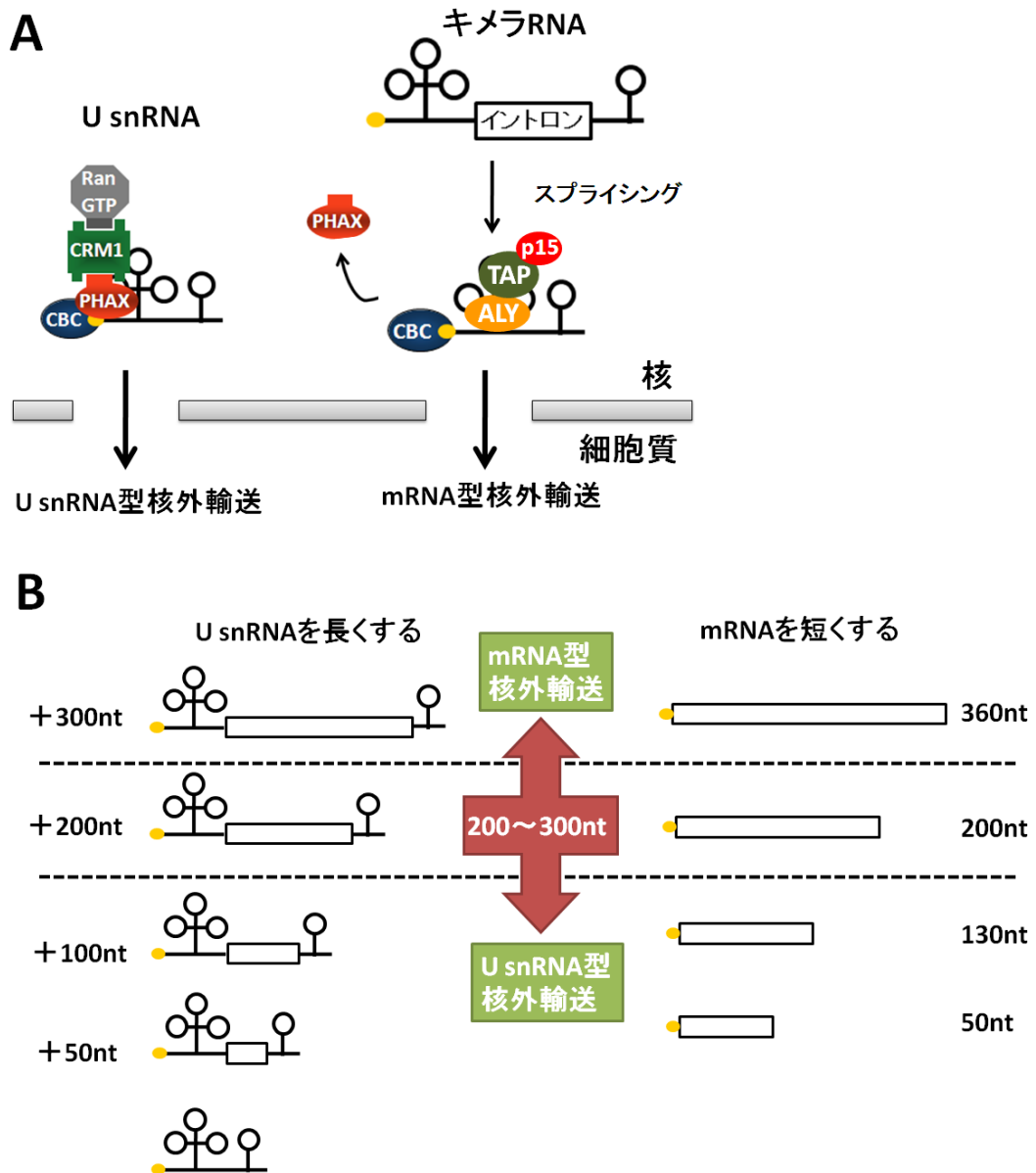


図4 核外輸送における mRNA と U snRNA の識別機構

- (A) イントロンを含み、スプライシングを受けた RNA が mRNA として認識され輸送される。
- (B) 200~300nt を境目として、これより長い RNA が mRNA、短い RNA が U snRNA として認識され輸送される。

5. RNA の長さを測る分子機構

RNA の核外輸送を規定する特徴の一つとして、RNA の長さが働いていることが明らかになったが、その分子機構については長らく不明であった。そして近年、本研究室によってこの RNA の長さを測る分子機構についての解析が行われた。このために、まず前述した RNA の長さによる核外輸送の切り替えが *in vitro* で再現できるかどうか調べられた。

大腸菌で発現、精製したレコンビナント GST-PHAX と CBC を様々な長さの RNA と混合し、GST pull-down を行ったところ短い RNA だけではなく長い RNA も沈降することが明らかとなった (図 5A、5B レーン 2)。このように *in vitro* では長い RNA にも U snRNA 型の輸送複合体が形成され、*in vivo* においてみられた RNA の長さによる核外輸送因子の切り替えを再現することができなかった。しかし、上記の *in vitro* の実験系にさらに HeLa 細胞核抽出液 (HNE) を加えたところ、長い RNA と PHAX の結合が阻害され (mRNA 化活性)、短い RNA と PHAX の結合が増強する (U snRNA 化活性) ことが明らかとなった (図 5B レーン 2-4)。このことから HNE 中には RNA の長さによって PHAX の結合を切り替える因子が存在することが考えられた。さらにカラムクロマトグラフィーによって HNE から活性の精製が行われたところ mRNA 化活性の候補因子として hnRNPC1/C2 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2) と呼ばれる核内 RNA 結合タンパク質が同定された。その後の詳細な解析により、hnRNPC1/C2 は 200~300nt より長い RNA と PHAX の結合を阻害し、長さに応じて RNA の輸送経路を切り替えることが明らかとなった (McCloskey et al., 2012)。

また、このとき短い RNA と PHAX の結合を増強する U snRNA 化活性の候補因子として核内 RNA 結合タンパク質である p54nrb が同定された (図 5C)。しかし、本研究以前には p54nrb が短い RNA と PHAX の結合を増強するかについて詳しい解析はなされていなかった。

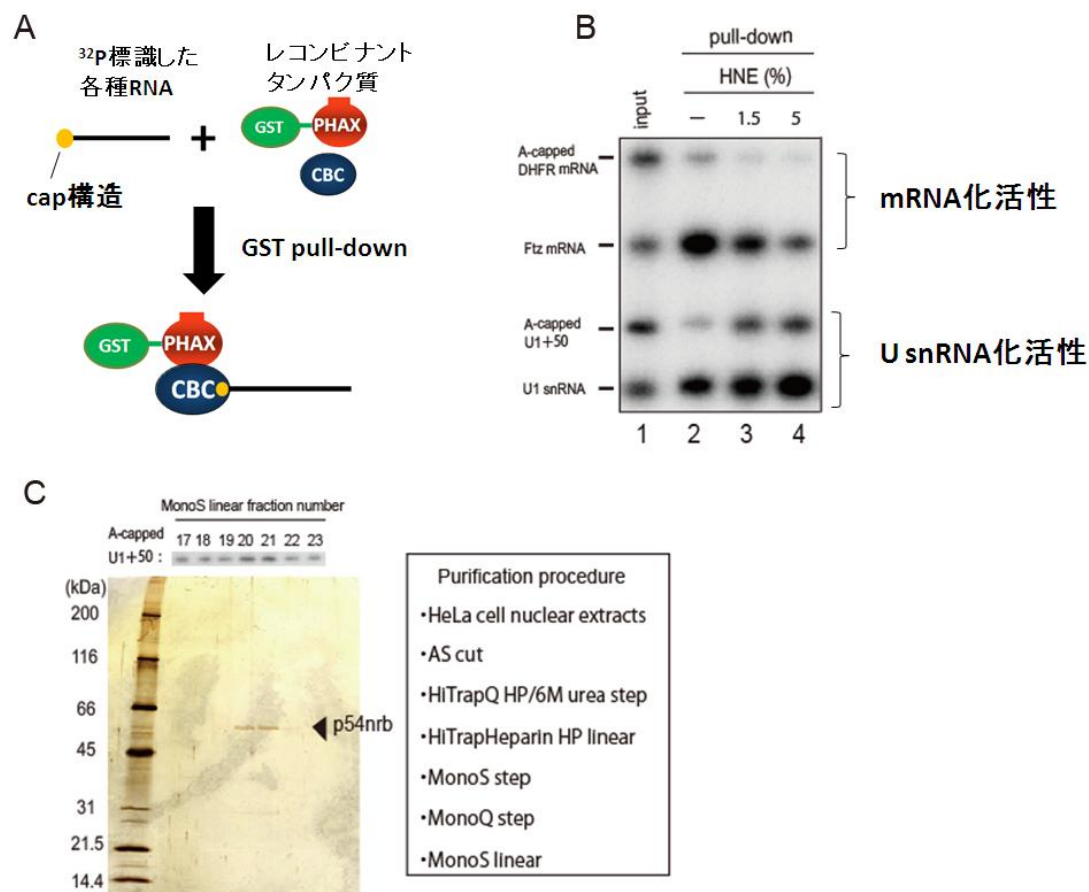


図 5 HeLa 細胞核抽出液 (HNE) 中には RNA の長さに応じて核外輸送因子の結合を規定する活性が存在する

- (A) ^{32}P 標識した様々な長さの RNA とレコンビナント GST-PHAX、CBC を用いた *in vitro* の実験系。
- (B) 図 3A の実験系に HNE を加えない(レーン 2)、あるいは加えた条件(レーン 3、4)で解析を行った。その後の解析により mRNA 化活性は hnRNPC1/C2 と呼ばれる RNA 結合タンパク質が担っていることが明らかとなった。A-cap は CBC と結合しないコントロールの RNA として用いた。
- (C) カラムクロマトグラフィーによる U snRNA 化活性の最終精製画分を用いて SDS-PAGE を行い、銀染色によりタンパク質を検出した。

6. 本研究の目的

前述したように、RNA の長さも RNA の輸送経路を規定する上で重要な特徴であり、hnRNPC1/C2 が RNA の長さを測る責任因子であることが明らかとなった。また、これとは別に HNE 中には短い RNA と PHAX の結合を増強する活性が存在することが明らかとなった。そしてこの活性の候補因子として p54nrb と呼ばれる RNA 結合タンパク質が同定されたが、実際に p54nrb が RNA と PHAX との結合を増強するかについては不明であった。そのため、本研究ではまず p54nrb が RNA と PHAX の結合にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的として解析を行った。

p54nrb はこれまでに DNA 修復や転写、スプライシングなど核内の様々な機能に関与する多機能タンパク質であることが報告されている (Yaron and Zipori, 2002)。特に p54nrb は RNA と核内タンパク質との相互作用を高め、RNA-タンパク質複合体の形成を安定化することが知られている。例えば、p54nrb は RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメインである CTD と結合し、CTD と RNA との親和性を高めることが明らかとなっている (Andrew et al., 2002)。また p54nrb はエキソヌクラーゼである XRN2 を RNA 上にリクルートし、XRN2 が RNA 上で効率よく機能できるように補助している (Kaneko et al., 2007)。さらに、p54nrb は U snRNA の一つである U5 snRNA のステムループと効率よく結合することが明らかとなっている (Peng et al., 2002)。これらのことから、p54nrb は PHAX と U snRNA の結合を増強し、U snRNA 核外輸送複合体の形成の安定化に働く可能性が十分にあると考えた。

結果

1. 核内 RNA 結合タンパク質 p54nrb は PHAX と RNA の結合を促進する

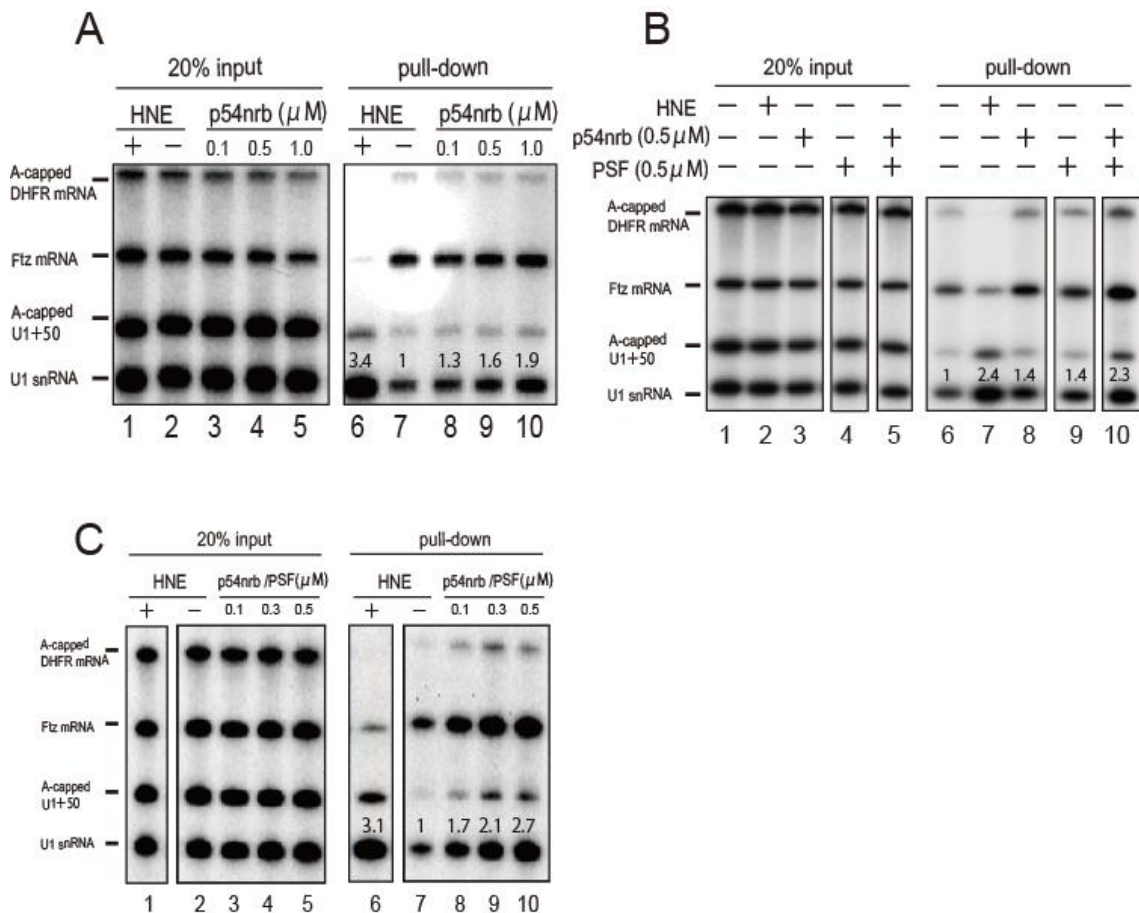
序論でも述べたように HNE 中から短い RNA と PHAX との結合を促進する活性 (U snRNA 化活性) が発見された。そして、生化学的手法により U snRNA 化活性の候補因子として核内 RNA 結合タンパク質である p54nrb が同定された。そのため、まず p54nrb が U snRNA 化活性の責任因子なのかを明らかにすることとした。大腸菌で発現、精製したレコンビナント GST-PHAX、CBC と ^{32}P 標識した各種 RNA を用いた GST pull-down の実験系 (図 5A) に、大腸菌で発現、精製したレコンビナント p54nrb を加えて沈降する RNA 量を解析した。その結果、p54nrb を加えることにより沈降する RNA 量が増加した (図 6A レーン 7-10)。このことから p54nrb は RNA と PHAX の結合を促進することが分かった。しかし、p54nrb の活性は HNE を加えたときにみられる活性よりもはるかに低いものであった (図 6A レーン 6、レーン 8-10)。

生化学的手法により HNE から U snRNA 化活性を精製する過程で、大幅な活性の低下がみられた (図 5C)。そのため、U snRNA 化活性には p54nrb 以外の別の因子も関与しているが精製の過程で失われた可能性が考えられた。これまでに p54nrb は核内 RNA 結合タンパク質である PSF (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor) とヘテロ二量体を形成し、核内で様々な働きをすることが知られている (Yaron and Zipori,

2002)。そこで、U snRNA 化活性に p54nrb だけではなく PSF も関与すると考え解析を行った。上記の GST pull-down の実験系に大腸菌で発現、精製したレコンビナント PSF 加えたところ沈降する RNA 量が増加することから、PSF も RNA と PHAX の結合を増強することが分かった (図 6B、6C)。このとき、p54nrb や PSF をそれぞれ単独で実験系に加えるよりも、両者を同時に加えたときにより強い U snRNA 化活性が見られたことから、p54nrb と PSF は協調的に働き RNA と PHAX の結合を高めることが示唆された (図 6B)。また、レコンビナント p54nrb と PSF を加えることにより U1 snRNA 以外の RNA の沈降

量も増加したことから(図 6B、6C)、p54nrb と PSF は短い RNA だけでなく様々な長さの RNA と PHAX の結合を促進することが考えられる。

次に HNE でみられた主要な U snRNA 化活性が p54nrb と PSF に依存しているのかを調べた。そのため、p54nrb と PSF の両者を同時にノックダウンした HeLa 細胞から HNE を作製し(図 6D)、これまでと同様 GST pull-down による実験系を用いて解析を行った。その結果、p54nrb と PSF をノックダウンした HNE では U snRNA 化活性がほとんど失われることが分かった(図 6E レーン 5、7)。また、p54nrb と PSF をノックダウンした HNE において、レコンビナントにより p54nrb と PSF の量をコントロール KD の HNE と同程度にすると U snRNA 化活性が完全に回復した(図 6E レーン 6-8)。このことから、やはり HNE 中の U snRNA 化活性の大部分は p54nrb と PSF の二つの核内 RNA 結合タンパク質が担っていることが示唆された。



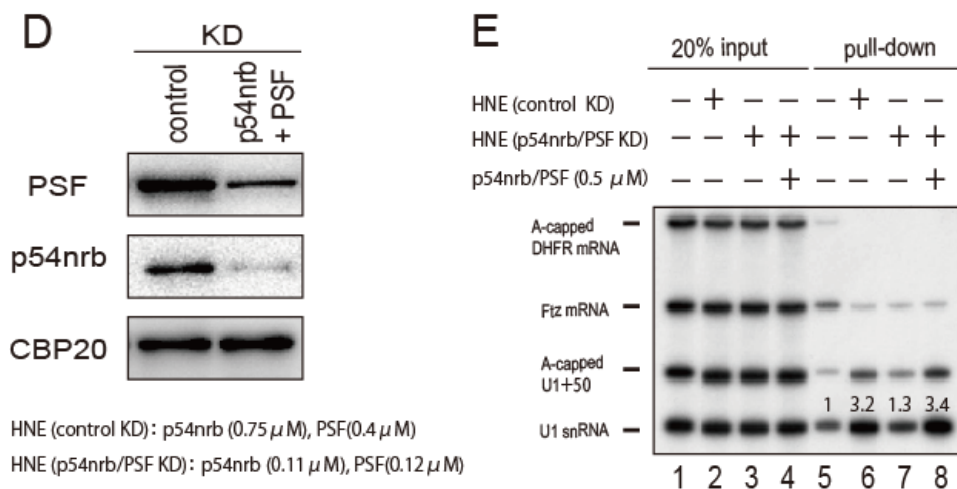


図 6 U snRNA 化活性を持つと考えられる因子の解析

- (A) 図 5A と同様の実験系を用いて、p54nrb が U snRNA 化活性を持つのか解析した。コントロールの U1 snRNA の沈降量を 1 とし (レーン 7)、HNE や p54nrb を加えたときのそれぞれの U1 snRNA の沈降量を算出した。
- (B) 図 5A と同様の実験系を用いて、p54nrb と共に PSF が U snRNA 化活性を持つのかを解析した。図 6A と同様に沈降した U1 snRNA 量を算出した。
- (C) 図 5A と同様の実験系を用いて、p54nrb と PSF の濃度に依存して U snRNA 化活性が影響を受けるのかを解析した。図 6A と同様に沈降した U1 snRNA 量を算出した。
- (D) p54nrb と PSF をノックダウンした HeLa 細胞から HNE を作製し、ウエスタンブロッティングにより HNE 中の p54nrb と PSF の濃度を算出した。CBP20 はローディングコントロールとして用いた。
- (E) 図 6D で作製した HNE を用いて、図 5A と同様の実験系で解析を行った。図 6A と同様に沈降した U1 snRNA 量を算出した。

2. p54nrb と PSF は U snRNA/CBC/PHAX の三者複合体である pre-complex の形成を促進する

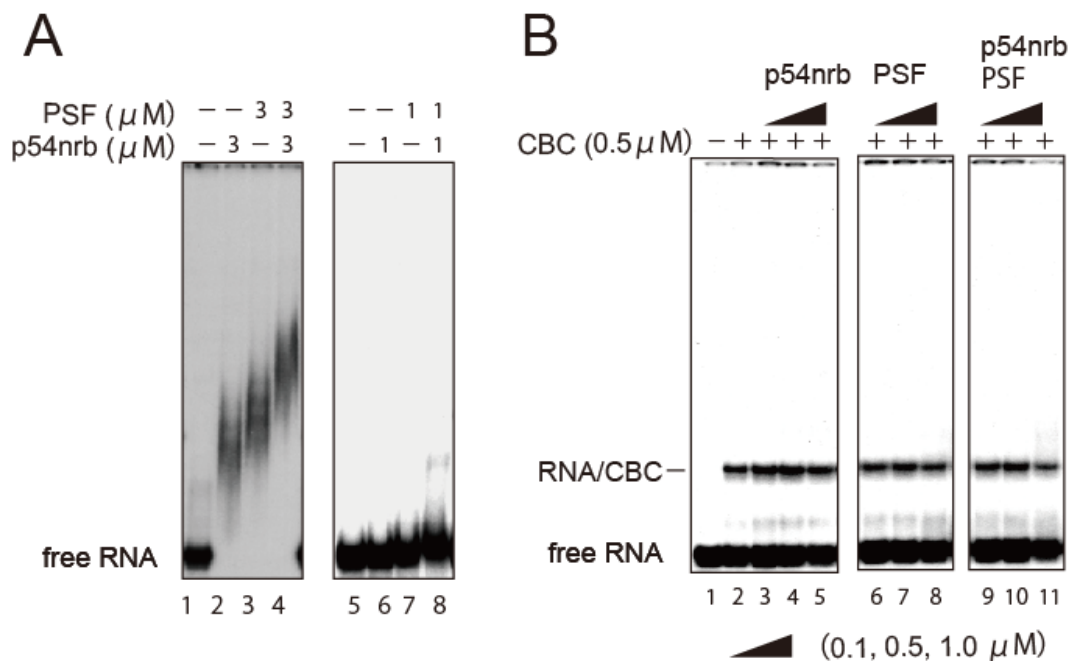
p54nrb と PSF は RNA と PHAX の結合を増強することから、U snRNA の核外輸送複合体の形成に関与することが考えられた。序論でも述べたように、U snRNA の核外輸送複合体は少なくとも 3 段階のステップを経て形成されると考えられる。まず、U snRNA/CBC からなる複合体ができ、次いで U snRNA/CBC/PHAX の三者複合体である pre-complex が形成される。そして、pre-complex に CRM1 と Ran-GTP が結合した export-complex が形成される(図 3)。そこで、まず p54nrb と PSF が U snRNA/CBC の複合体や U snRNA/CBC/PHAX、の三者複合体である pre-complex の形成に与える影響を、以前の報告を参考にゲルシフト法を用いて解析を行った (Ohno et al., 2000)。その結果、p54nrb と PSF は U1 snRNA/CBC の複合体の形成には影響を与えなかったが (図 7B レーン 2-11)、pre-complex の形成を促進することが分かった (図 7C レーン 3-6)。また、p54nrb や PSF をそれぞれ単独で加えるよりも両者を同時に加えたときに、より強く pre-complex の形成が促進された (図 7C レーン 4-6)。これは p54nrb と PSF が協調して機能するというこれまでの結果と一致する (図 6B、6C)。

これまでに p54nrb と PSF のヘテロ二量体は RNA 上にタンパク質をリクルートし、RNA-タンパク質複合体の形成を補助することが報告されている (Kaneko et al., 2007; Peng et al., 2002)。このことから、p54nrb と PSF は U snRNA/CBC 複合体上に PHAX をリクルートし、pre-complex の形成を促進することが考えられた。そのため、次に p54nrb と PSF が U snRNA や PHAX に結合するかどうかを解析した。まず、p54nrb と PSF が U1 snRNA に結合するかゲルシフト法で調べたところ、p54nrb と PSF は U1 snRNA に結合することが分かった (図 7A)。PHAX と p54nrb または PSF の相互作用については、レコンビナント GST-PHAX とレコンビナント p54nrb、PSF を用いた GST pull-down により解析した。その結果、PHAX は p54nrb や PSF と結合することが分かった (図 7D、図 7E)。

また、RNaseA 存在下でも PHAX が p54nrb や PSF に結合するという結果が得られた (図 7D レーン 6、図 7E レーン 6)。このことから PHAX と p54nrb または PSF は RNA を介さずにタンパク質どうしが直接結合することが示唆された。

次に細胞内においても PHAX が p54nrb、PSF と相互作用するかどうかを解析した。このために、N 末に FLAG タグを付加した FLAG-PHAX を HeLa 細胞で発現させ FLAG に対する抗体で免疫沈降を行った。その結果、細胞内においても PHAX は p54nrb や PSF と相互作用することが分かった (図 7F)。

これらの結果から p54nrb と PSF は PHAX と U snRNA の両者に結合し、U snRNA/CBC 複合体上に PHAX をリクルートすることにより pre-complex の形成を促進することが考えられる。また、ゲルシフト法において p54nrb と PSF を加えても pre-complex のバンドはシフトしないことから、*in vitro* において p54nrb と PSF は pre-complex と安定的に結合するわけではないと考えられる (図 7C レーン 3-6)。



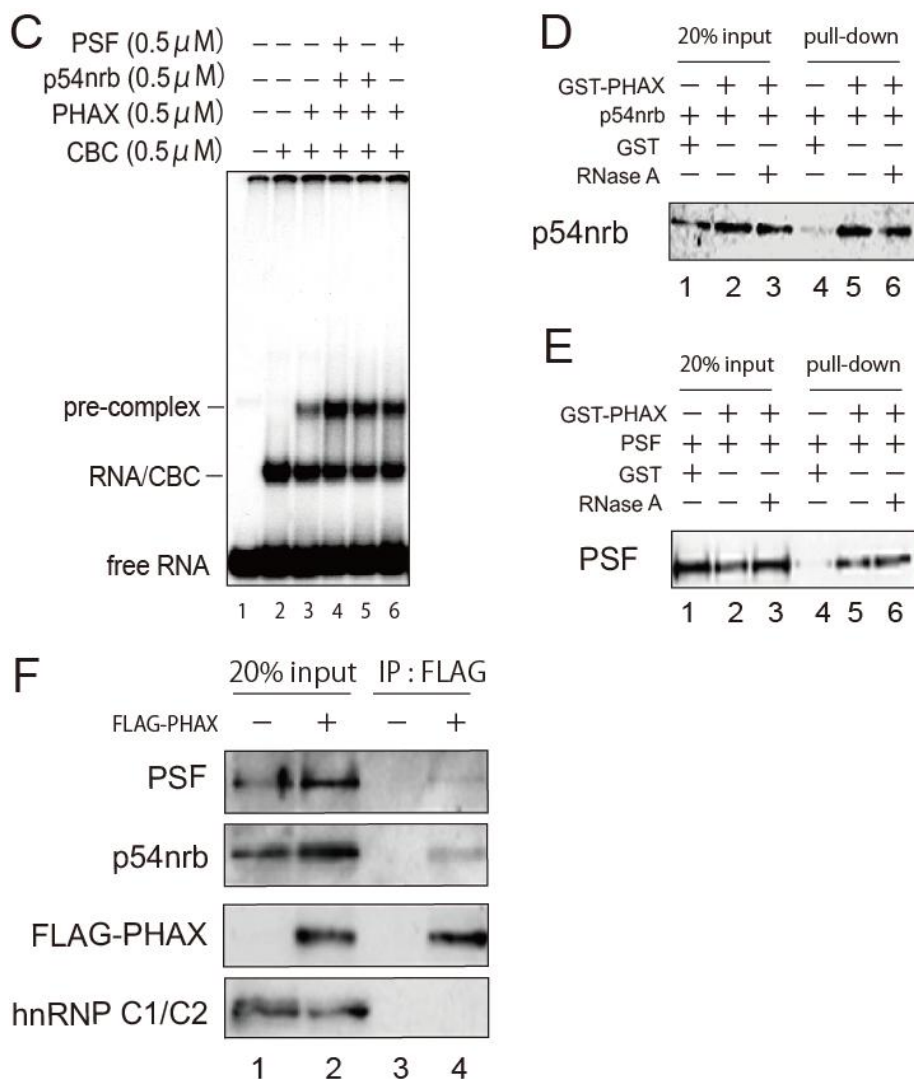


図7 p54nrb と PSF が pre-complex の形成に与える影響

- (A) 32 P 標識した U1snRNA とレコンビナント p54nrb、PSF を用いてゲルシフト法により U1 snRNA と p54nrb、PSF との結合を解析した。
- (B) 図 7A と同様の実験系を用いて p54nrb と PSF が U1snRNA/CBC 複合体の形成に与える影響を解析した。
- (C) 図 7A と同様の実験系を用いて p54nrb と PSF が pre-complex の形成に与える影響を解析した。
- (D) レコンビナント GST-PHAX と p54nrb を用いて GST pull-down を行い、共沈降するタンパク質をウエスタンブロッティングにより解析した。
- (E) 図 7D と同様の実験系を用いて、PHAX と PSF の相互作用を解析した。
- (F) FLAG-PHAX を HeLa 細胞で発現させ、FLAG に対する抗体で免疫沈降を行い共沈降するタンパク質をウエスタンブロッティングにより解析した。

3. p54nrb と PSF は export-complex の形成を促進する

p54nrb と PSF は pre-complex の形成を促進することが明らかとなったが、次に p54nrb と PSF が U snRNA/CBC/PHAX/CRM1/Ran-GTP から構成される export-complex の形成にどのような影響を与えるのかを解析した。この解析のために、まず p54nrb と PSF が CRM1 や Ran と相互作用するのかを調べた。試験管内においてレコンビナント p54nrb、PSF、CRM1、Ran、hnRNAPA1 を混合し、p54nrb、PSF または hnRNAPA1 に対する抗体で免疫沈降を行った。このとき、RNA 結合タンパク質である hnRNP1 をコントロールとして用いた。その結果、p54nrb や PSF は CRM1 や Ran と結合することが分かった (図 8A レーン 1-3)。

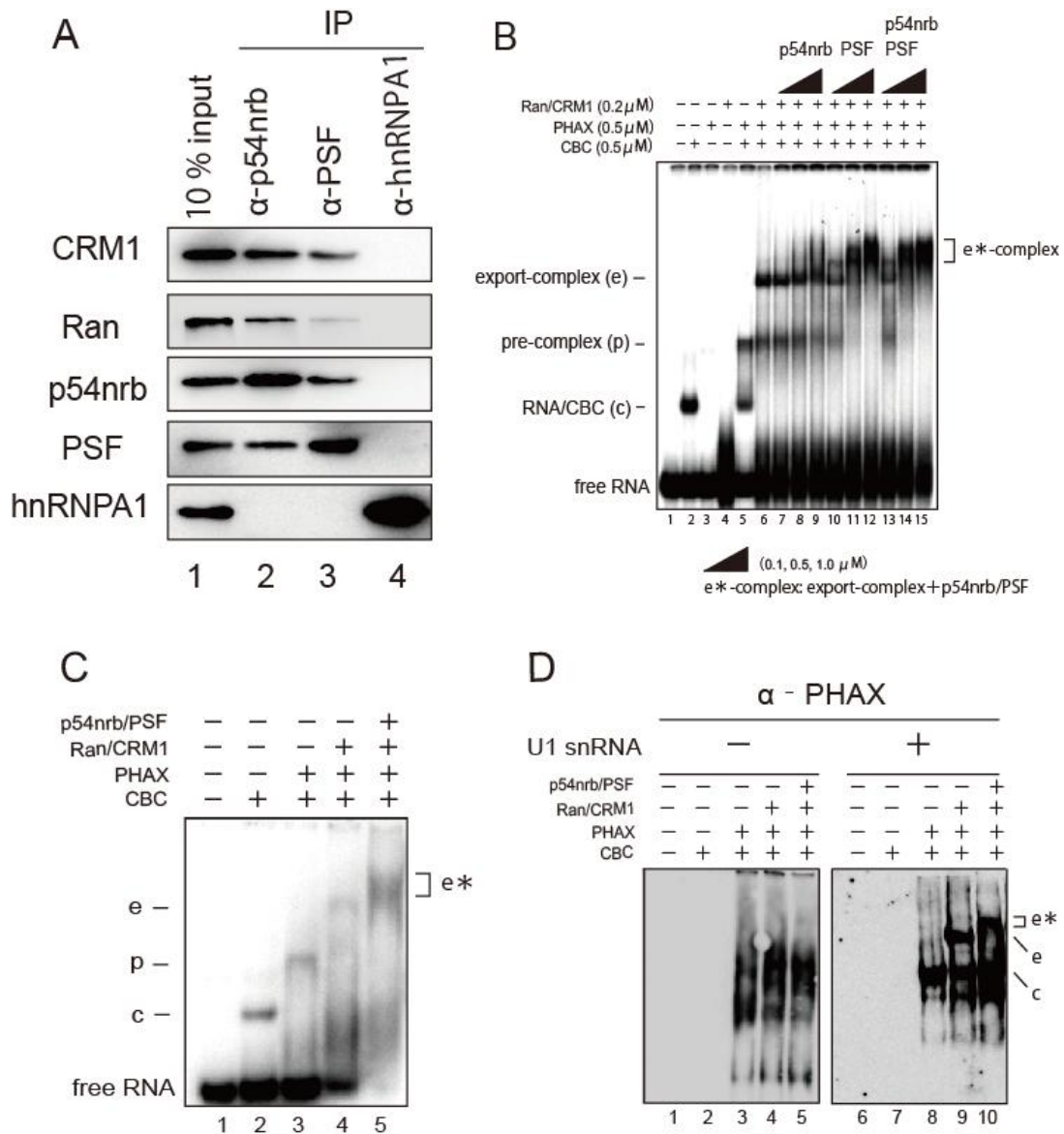
次に、p54nrb と PSF が export-complex の形成にどのような影響を与えるのかについて、pre-complex の形成を調べたときと同様にゲルシフト法による解析を行った。その結果、p54nrb と PSF を加えることにより、pre-complex のバンドが消失し、上方にスーパーシフトすることが分かった (図 8B レーン 13-15)。このことから、p54nrb と PSF は pre-complex の形成反応だけでなく、pre-complex から export-complex の形成反応をも促進することが示唆された。また、p54nrb と PSF を加えることにより export-complex よりも上方にバンドが形成されることから、export-complex に p54nrb と PSF を含むような複合体が形成されていることが考えられた (図 8B: e*-complex)。そのため、次にこのシフトしたバンド(図 8B: e*-complex)の正体について解析することにした。そこでまず、非標識の U1 snRNA とレコンビナントタンパク質を用いてゲルシフト法を行った。電気泳動後にゲルを核酸の検出試薬である SYBR Gold で染色すると ³²P 標識した U1 snRNA を用いた場合と同様に、U1 snRNA/CBC (c)、pre-complex(p)、export-complex(e)、e*-complex(e*) が形成されることを確認した (図 8C レーン 2-5)。次に、ゲルからニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写し、ウエスタンブロッティングにより e*-complex にどのようなタンパク質が含まれるのかを解析した。その結果、e*-complex は PHAX や CRM1、Ran などの既知の U

snRNA 核外輸送因子のほかにも p54nrp や PSF も含むことが分かった(図 8D-H)。

このことから、ゲルシフト法によって確認された e*-complex は

U snRNA/CBC/PHAX/CRM1/Ran-GTP/p54nrp/PSF から構成される複合体であることが

示唆され、U snRNA 核外輸送に関連した複合体であることが強く示唆された。



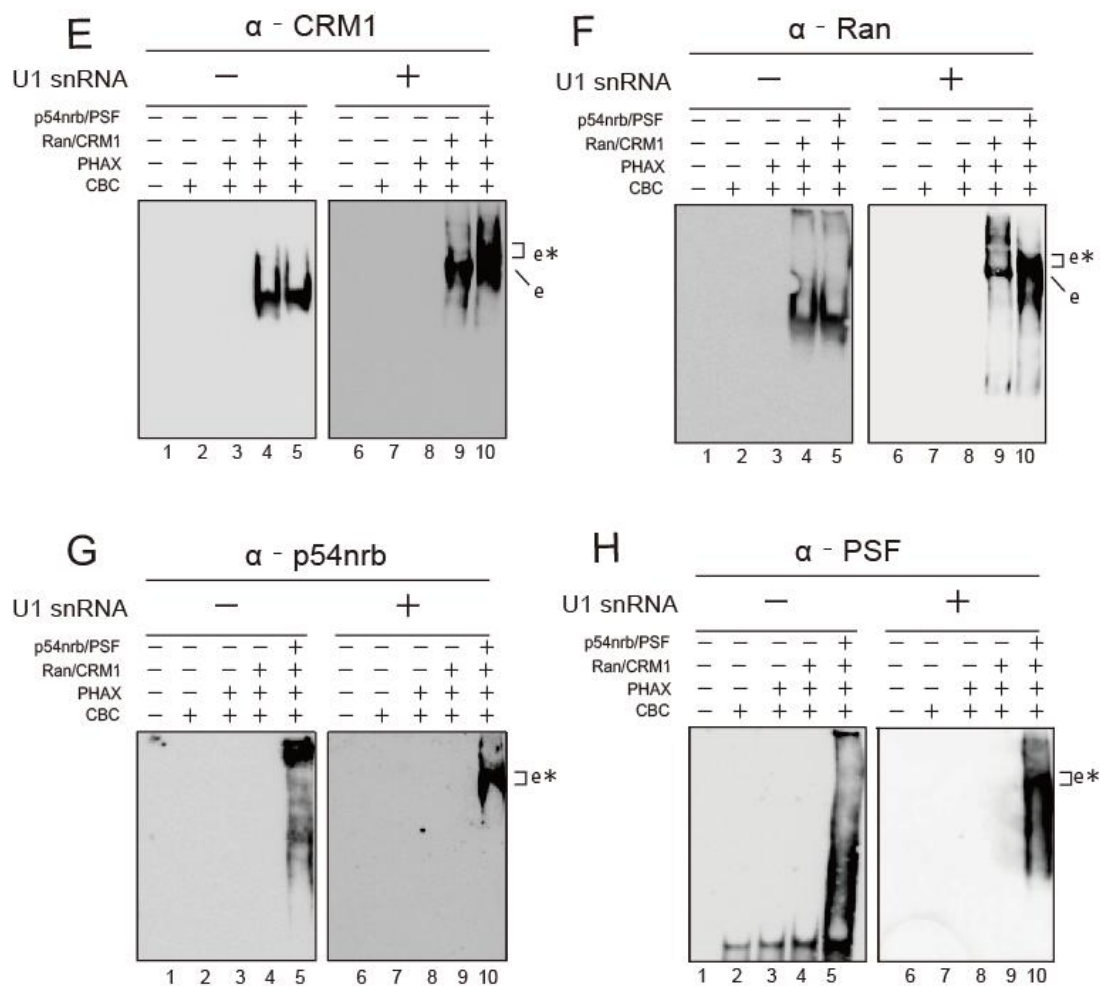


図8 p54nrb と PSF が export-complex の形成に与える影響

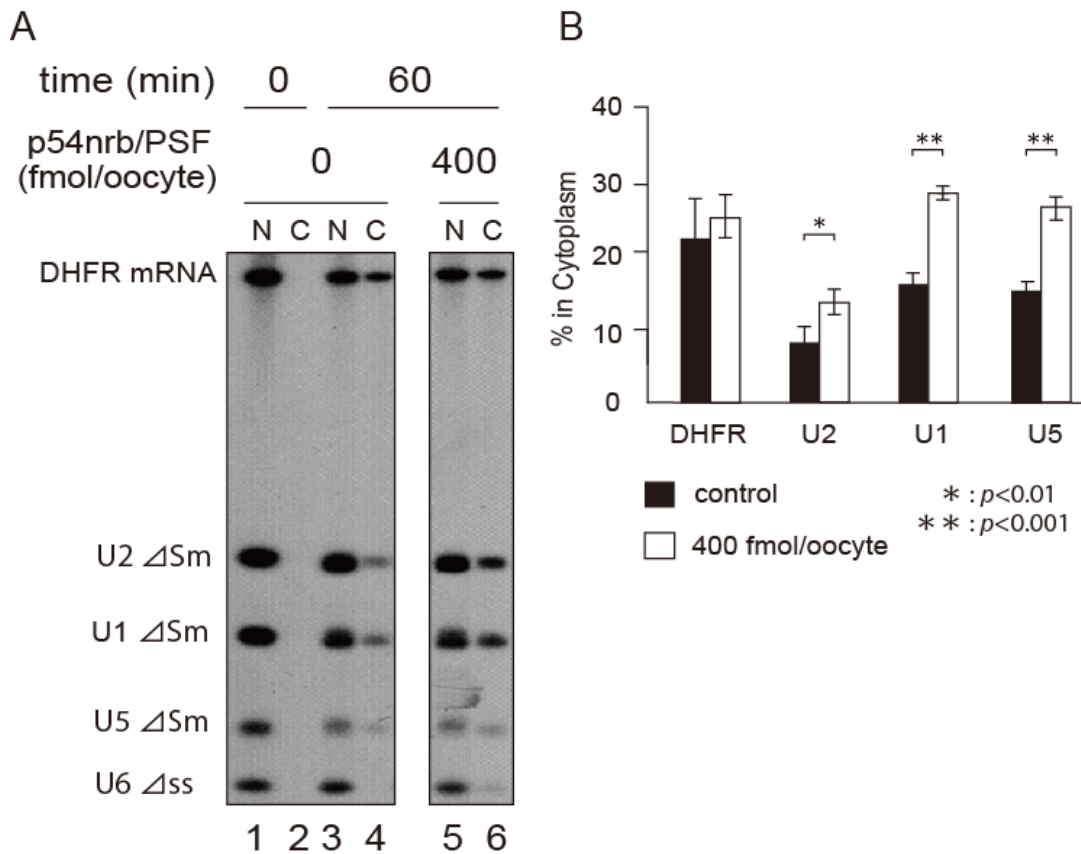
- (A) レコンビナント p54nrb、PSF、CRM1、Ran、hnRNPA1 を用いて、免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングによりタンパク質の相互作用を解析した。
- (B) 図 7A と同様の実験系を用いて、p54nrb と PSF が export-complex の形成に与える影響を解析した。
- (C) 非標識の U1 snRNA を用いて、図 8A と同様にゲルシフト法を行った。ゲルを SYBR Gold で染色し、U1 snRNA を検出した。
- (D)-(H) 図 8C のゲルからニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写し、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。

4. p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送を促進する

これまでの結果から、p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送に関連した複合体の形成を促進することが示唆された。では、p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送そのものによつたような影響を与えるのだろうか。これを解析するためにアフリカツメガエル卵母細胞を用いた顕微注入実験を行った。³²P 標識した各種 RNA をアフリカツメガエル卵母細胞の核に顕微注入し、保温後、核と細胞質のそれぞれの画分に存在する RNA を定量することにより、RNA の核外輸送効率を調べることができる。しかし、序論でも述べたように U snRNA は細胞質へと輸送された後、再び核へと輸送される。そのため本研究では Sm タンパク質結合部位を欠損し、細胞質に輸送されるが核内へは再輸送されない U snRNA Δ Sm を用いた (Hamm and Mattaj, 1990)。また、U6 snRNA Δ ss を細胞質に輸送されないコントロールの RNA として用いた。この実験系を用いて、RNA と共に p54nrb と PSF を顕微注入すると、U snRNA の輸送が促進された (図 9A レーン 3-6、9B)。このとき、p54nrb と PSF は DHFR mRNA の核外輸送には影響を与えなかった。このことから、p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進し、U snRNA の核外輸送を特異的に促進すると考えられる。

次に HeLa 細胞を用いて、p54nrb と PSF が U snRNA の核外輸送にどのような影響を与えるのかを解析した。核内で転写された直後の U snRNA は 3'末端が長い pre-U snRNA として存在し、核外輸送後に細胞質で 3'末端が切断される (Yong et al., 2010)。そのため、U snRNA の核外輸送が阻害された場合には pre-U snRNA の量も増加すると考えられる。そこで、HeLa 細胞において PHAX、p54nrb または PSF をそれぞれノックダウンし (図 9C)、リアルタイム PCR により pre-U snRNA 量を解析した。予想通り、PHAX をノックダウンすると pre-U snRNA 量が増加した (図 9D、9E)。また、p54nrb と PSF をノックダウンしても pre-U snRNA 量が増加したため (図 9D、9E)、哺乳細胞においても p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送に関与することが考えられた。

先程述べたように、U snRNA は細胞質へと輸送された後に再び核へと再輸送される。そのため、培養細胞において内在性の U snRNA の核外輸送を調べることは困難である。そこで、U1 snRNA Δ Sm を発現するようなコンストラクトを用いて培養細胞での U snRNA の核外輸送効率を調べることにした。まず、HeLa 細胞において PHAX または p54nrb のノックダウンを行い、その後 U1 snRNA Δ Sm を発現するようなコンストラクトを導入した。続いて、HeLa 細胞を核と細胞質に分画し、リアルタイム PCR により U1 snRNA Δ Sm の核外輸送効率を調べた。この実験系では PSF をノックダウンした HeLa 細胞は弱ってしまうため、PSF については解析を行うことができなかった。p54nrb をノックダウンすると PHAX ノックダウンと同様、GAPDH mRNA の輸送に影響を与えなかったが、U snRNA の核外輸送効率が低下した (図 9F)。このことから、哺乳細胞においても p54nrb は U snRNA の核外輸送に関与することが示唆された。



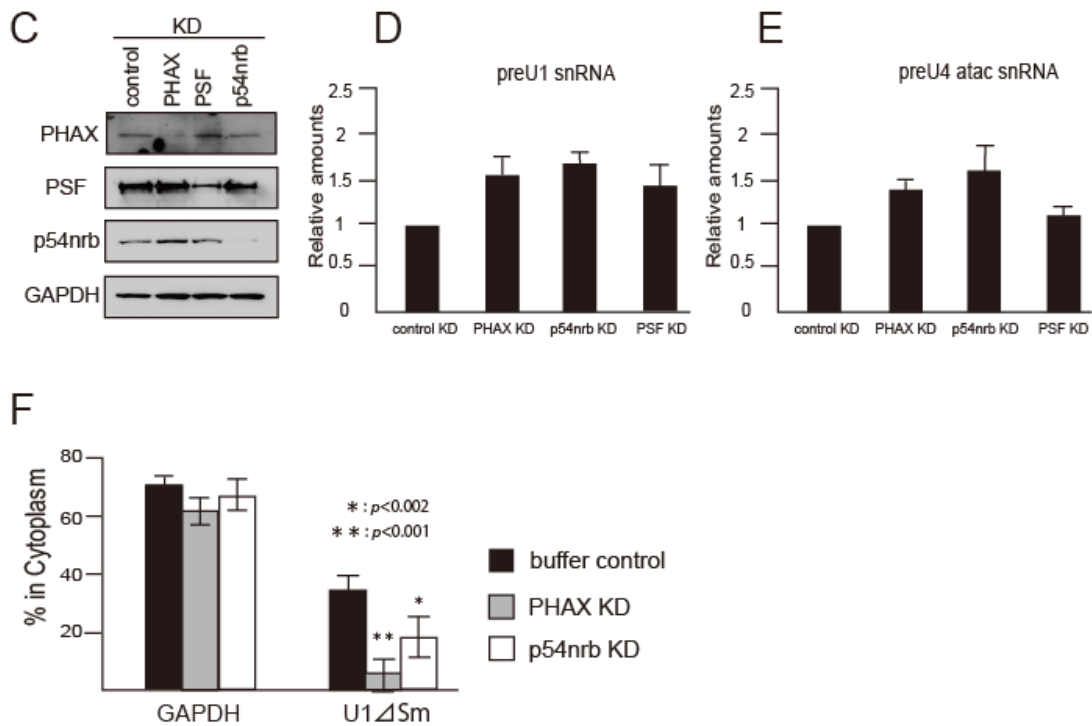


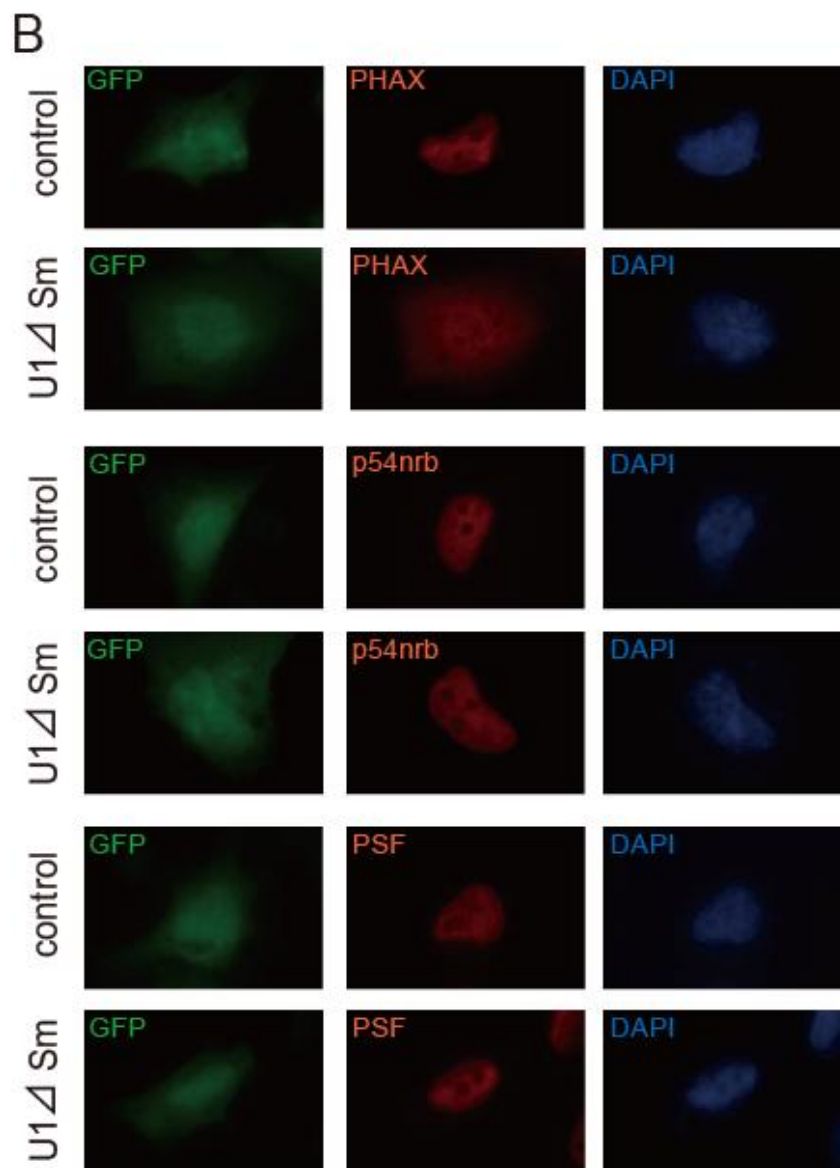
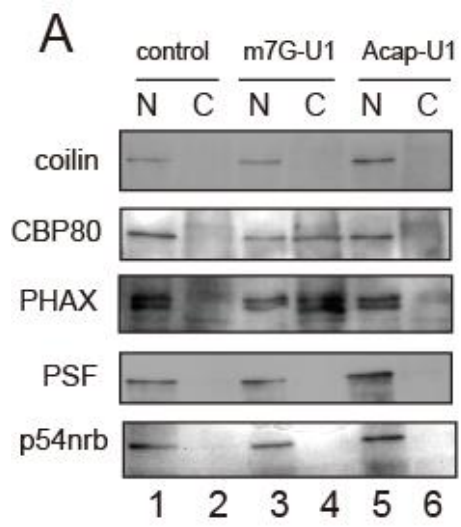
図9 p54nrp と PSF が U snRNA の核外輸送に与える影響

- (A) ^{32}P 標識した各種 RNA とレコンビナント p54nrp、PSF をアフリカツメガエル卵母細胞の核内に顕微注入した。顕微注入後、核画分と細胞質画分から RNA をそれぞれ回収し変性ゲルにて電気泳動後、オートラジオグラフィーにて解析した。
- (B) 図 9A の定量結果。
- (C) HeLa 細胞において PHAX、p54nrp または PSF をノックダウンし、ウェスタンブロットティングによりタンパク質を検出した。
- (D) (E) HeLa 細胞において PHAX、p54nrp または PSF をノックダウン後、total RNA を抽出し、リアルタイム PCR により pre-U snRNA を定量した。
- (E) HeLa 細胞において、PHAX または p54nrp をノックダウン後、U1 snRNA Δ Sm を発現するコンストラクトを導入した。核画分と細胞質画分から total RNA をそれぞれ抽出し、リアルタイム PCR により U1 snRNA Δ Sm を定量し、核外輸送効率を算出した。

5. p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体と共に細胞質へは輸送されない

これまでの結果から p54nrb と PSF は export-complex に結合し e*-complex を形成することが明らかとなった。そのため、次に p54nrb と PSF が U snRNA 核外輸送複合体と共に細胞質へ輸送されるかについて、以前に報告された方法を参考に解析を行った (Ohno et al., 2000)。アフリカツメガエルの卵母細胞において、PHAX や CBC の構成因子である CBP80 はそのほとんどが核に局在している (図 10A レーン 1、2)。卵母細胞の核内に過剰量の m⁷G キャップ付きの U1 snRNA Δ Sm を顕微注入すると U snRNA と共に核外輸送複合体を形成した PHAX や CBP80 が細胞質に輸送される様子を観察することができる (図 10A レーン 3、4)。この実験系を用いて、U1 snRNA Δ Sm と共にレコンビナント p54nrb と PSF を核内に顕微注入し、p54nrb と PSF の局在を解析した。その結果、PHAX や CBP80 が細胞質へと輸送される条件においても、p54nrb と PSF は核局在のみを示すことが分かった (図 10A レーン 3、4)。このことから、p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体と共に細胞質へは輸送されず、核内で解離することが示唆された。

次に、哺乳細胞を用いて p54nrb と PSF が U snRNA と共に細胞質へ輸送されるかどうかを解析した。HeLa 細胞においても、アフリカツメガエル卵母細胞の時と同様に PHAX は核局在を示し、ここに U1 snRNA Δ Sm を過剰量発現するようなコンストラクトを導入すると PHAX は細胞質でも観察されるようになった (図 10B-D)。しかし、U1 snRNA Δ Sm を過剰量発現させた条件下であっても、PHAX とは異なり p54nrb と PSF は核局在のみを示した (図 10B-D)。このことから、哺乳細胞においても p54nrb と PSF は U snRNA と共に細胞質へは輸送されないことが示唆された。



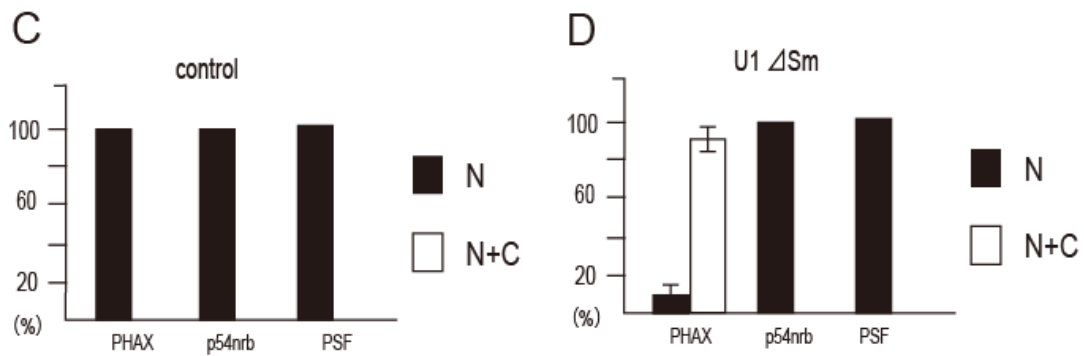


図 10 p54nrb と PSF が U snRNA と共に細胞質へと輸送されるのかを解析した

- (A) U1 snRNA Δ Sm をアフリカツメガエル卵母細胞の核内に顕微注入した。顕微注入後、核と細胞質に分画し、ウエスタンブロッティングによりタンパク質を検出した。核局在を示すマーカータンパク質として coilin を用いた。また、Acap-U1 は細胞質へと輸送されないコントロールの RNA として用いた。
- (B) HeLa 細胞において U1 snRNA Δ Sm、または GFP を発現するコンストラクトを同時に導入した後、免疫染色により PHAX、p54nrb または PSF の局在を観察した。GFP の発現の有無により、U1 snRNA Δ Sm が細胞内に導入されたかどうかを確認した。
- (C) (D) 図 10B においてタンパク質が核のみに局在する細胞と、核と細胞質の両方に局在する細胞数を定量した。

考察

1. U snRNA の核外輸送における p54nrb と PSF の役割

以前に本研究室に置いて、HeLa 細胞核抽出液 (HNE)中に長い RNA から PHAX を取り除く活性 (mRNA 化活性)と短い RNA と PHAX の結合を増強する活性 (U snRNA 化活性)が存在することが見出された。mRNA 化活性については hnRNPC1/C2 と呼ばれる RNA 結合タンパク質が責任因子であることが明らかとなっていた (McCloskey et al., 2012)。しかし、U snRNA 化活性の候補因子として同定された p54nrb についてはこれまで詳しい解析はなされていなかった。本研究によって p54nrb が U snRNA 化活性の責任因子であり、さらに p54nrb と共に PSF と呼ばれる核内 RNA 結合タンパク質が同活性を担っていることを明らかにした (図 6A、6B)。また、p54nrb と PSF を KD した HNE ではほとんど U snRNA 化活性が失われたことから、HNE 中の主要な U snRNA 化活性にはこの二つのタンパク質が寄与していると考えられる (図 6E)。

次に p54nrb と PSF が U snRNA 核外輸送複合体の形成にどのような影響を与えるのかを解析したところ、p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進することが明らかとなった (図 7C、8B)。p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体の構成因子と U snRNA の両者に結合することから (図 7A、7D、7E、8A)、これらの構成因子と U snRNA の結合を安定化することにより pre-complex やその後の export-complex の形成を促進すると考えられる。しかし、p54nrb と PSF は U snRNA/CBC 複合体の形成には影響を与えなかった (図 7B)。本研究では CBC と p54nrb、PSF の相互作用については解析を行わなかったが、どうやらこれらのタンパク質は直接結合しないらしい (Buxadé et al., 2008)。そのため、p54nrb と PSF は U snRNA/CBC 複合体の形成には関与していないと考えられる。

また、p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進するだけでなく、その後の U snRNA の核外輸送も促進することが明らかとなった。そして、おそらく p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体が細胞質へ輸送される前に、核内で解離すると考えられる (図 11)。

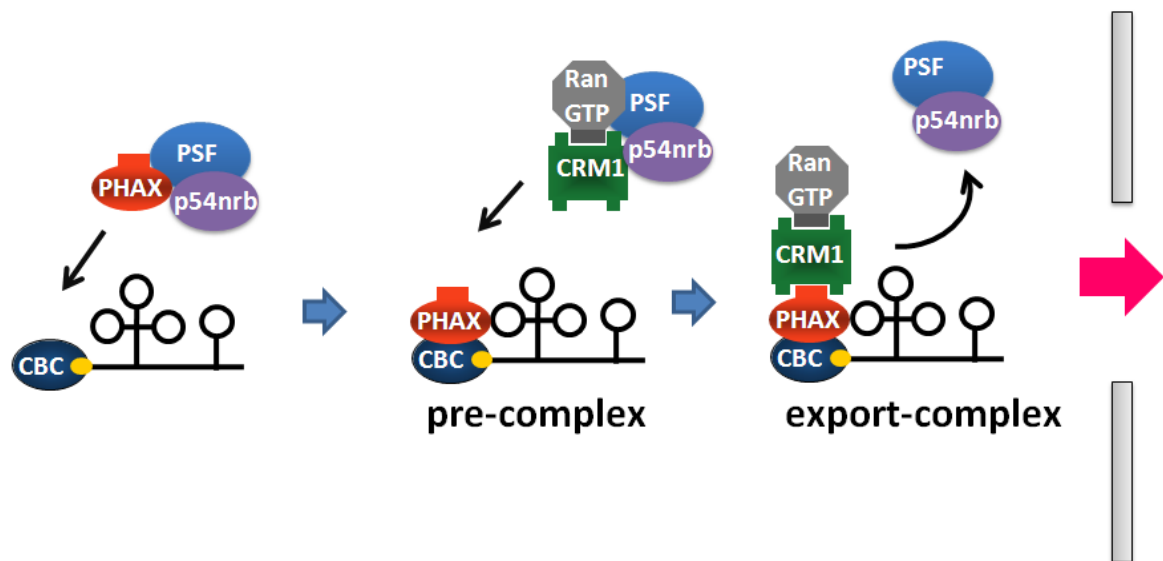


図 11 U snRNA の核外輸送における p54nrb と PSF の役割

p54nrb と PSF は U snRNA 核外輸送複合体の形成を促進し、その後の U snRNA の核外輸送も促進する。

2. 多様な機能を持つ p54nrb と PSF の制御について

p54nrb は短い RNA と PHAX の結合を増強する活性の候補因子として同定された。確かに試験管内の実験系において、大腸菌で発現、精製したレコンビナント p54nrb、そして PSF はキャップ構造や RNA の長さに依存せずに RNA と PHAX の結合を増強することが明らかとなった。(図 6A-C)。このことから、*in vitro*において p54nrb と PSF には RNA の長さを測り、短い RNA のみに PHAX を結合させるような機能はないと考えられる。HNE 中において p54nrb と PSF が長い RNA と PHAX の結合を増強しなかったのは、HNE 中

に存在する hnRNPC1/C2 によって長い RNA と PHAX の結合が阻害されたためだと考えられる (図 5B)。このように、本研究では p54nrb と PSF は様々な RNA と PHAX の結合を増強するという結果を得た。しかし、これまで述べたように p54nrb と PSF は核内において様々な役割を担っている。そのため、細胞内において p54nrb と PSF は RNA ごとに異なる機能を発揮していると考えられる。例えば、p54nrb と PSF は mRNA 上においてはスプライシングや 3'末端のプロセッシングに働いている (Li et al., 2009; Hata et al., 2008)。では、p54nrb と PSF は RNA ごとにどのようにして、その機能を使い分けているのだろうか。

一つの可能性として、リン酸化などの翻訳後修飾により p54nrb と PSF の機能を制御するということが挙げられる。例えば、p54nrb は CDK1 によってリン酸化され、イソメラーゼである Pin1 と結合するようになる (Proteau et al., 2005)。また、PSF は Mnk (MAP kinase signal integrating kinase) と呼ばれるタンパクキナーゼによってリン酸化され、p54nrb と共に 3'非翻訳領域に ARE を持つ mRNA との結合が増強することが明らかとなっている (Buxadé et al., 2008)。さらに p54nrb と PSF は、RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメインである CTD と結合し、CTD 上の p54nrb と PSF は U1 snRNP を介してスプライシングに働くことが示唆されている (Kameoka et al., 2004)。このとき大腸菌で発現、精製した p54nrb と PSF は CTD とは結合せず、HeLa 細胞から精製した p54nrb と PSF のみ CTD と結合する。このことから、p54nrb と PSF が CTD と結合するためには翻訳後修飾が必要だと考えられている。一方、U snRNA 核外輸送複合体の形成促進に働く p54nrb、PSF に関しては大腸菌で発現、精製したレコンビナントで十分機能するので翻訳後修飾などは必要ない可能性が考えられる (図 6)。このように、p54nrb と PSF はリン酸化などの翻訳後修飾によりタンパク質や RNA との親和性を調節し、RNA 種に応じて適切な機能を発揮していると考えられる (図 12)。

また、別の可能性として p54nrb と PSF は核内での局在部位によって、その機能を制

御するということが挙げられる。核内には、リボソームの生合成の場として働く核小体をはじめ、U snRNA の成熟の場であるカハール体、スプライシング因子の貯蔵・会合の場である核スペックルなど様々な核内構造体が存在する。そして近年、核スペックルの近傍にパラスペックルと呼ばれる新たな核内構造体が発見された (Fox et al., 2002)。パラスペックルはタンパク質をコードしない長鎖ノンコーディング RNA である NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) と p54nrb、PSF などのタンパク質から構成されている (Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009; Clemson 2009 et al., Chen et al., 2009)。パラスペックルに局在する p54nrb や PSF の機能として高度にイノシン化された RNA と結合し、イノシン化した RNA をパラスペックル内に係留することが報告されている (Bound and Fox 2009; Fox and Lamond 2010)。

このように、p54nrb と PSF は自身の修飾状態や核内での局在部位を変えることにより RNA ごとに適切な機能を発揮しているのではないかと考えられる (図 12)。

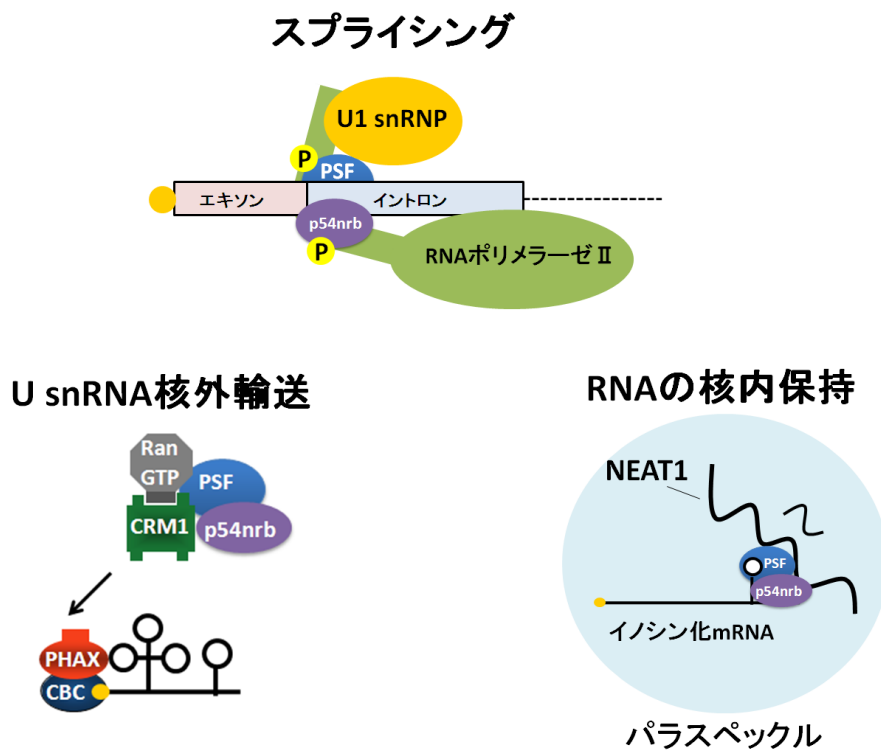


図 12 RNA に応じた p54nrb と PSF の使い分けモデル

3. 細胞内での p54nrb と PSF による U snRNA 核外輸送複合体の形成促進について

本研究によって p54nrb と PSF は U snRNA/CBC/PHAX の三者複合体である pre-complex や、さらに pre-complex に CRM1 と Ran が結合した export-complex の形成を促進することが明らかとなった。序論でも述べたように、U snRNA は転写後にキャップ構造が付加された後に CBC が結合するが、本研究での *in vitro* での結果 (図 7B) からおそらくこの段階ではまだ p54nrb と PSF は働かないと考えられる。次に U snRNA は pre-complex の形成のためにカハール体へと移行する。PHAX が結合せず pre-complex を形成できない U snRNA はカハール体に蓄積することから、カハール体には適切な pre-complex の形成を監視する品質管理機構が備わっていることが示唆されている (Suzuki et al., 2010)。そのため、p54nrb と PSF はカハール体において pre-complex の形成を促進する可能性が考えられる。しかし、現在までに p54nrb と PSF がカハール体の構成因子であるという報告はなく、本研究においても HeLa 細胞を用いて免疫染色による解析を行ったが、p54nrb と PSF がカハール体に局在するというデータは得られていない (データは示さず)。

では、p54nrb と PSF は U snRNA の核外輸送過程のどの時点で、U snRNA 核外輸送複合体の形成に寄与しているのだろうか。カハール体において pre-complex を形成した U snRNA は、次に核質へと移行する。核質に移動した pre-complex に CRM1 が Ran-GTP 依存的に結合し、export-complex の形成後、細胞質へと輸送され U snRNA の核外輸送が完了する。p54nrb と PSF は核質には存在するため、p54nrb と PSF はカハール体から核質に移行してきた pre-complex の形成補助や、その後の export-complex の形成に働くのではないかと考えられる。試験管内においては pre-complex の安定性は低いが、export-complex まで形成されると大幅にその安定性が増す。そのため、核内においてもカハール体のように PHAX が濃縮した場に U snRNA を移行させ、安定性の低い pre-complex

の形成を補助していると考えられる。しかし、**export-complex** 形成のためには **pre-complex** の形成に適したカハール体から、再び核質へと戻らなければならない。そこで、核質での **pre-complex** の形成を保証するために **p54nrb** と **PSF** が働いていると考えられる。さらに **p54nrb** と **PSF** は **pre-complex** から **export-complex** の形成反応も促進することにより、**U snRNA** 核外輸送複合体が核質において安定的に存在できるようにしているのではないだろうか。そして、役目を終えた **p54nrb** と **PSF** は核内において **export-complex** から解離するため、**export-complex** と共に細胞質へは輸送されないと考えられる (図 13)。

本研究によって、**p54nrb** と **PSF** は核内において **export-complex** から解離するということが示唆された。では、どのようにして **p54nrb** と **PSF** は **export-complex** から解離するのだろうか。ゲルシフト法の結果から、**e*-complex** は一本のバンドとしてではなく、スメア状に検出されることが明らかとなった (図 8B)。このことから、**e*-complex** の安定性は低いと考えられる。そのため、核内において **p54nrb** と **PSF** は **U snRNA** 核外輸送複合体の形成促進後に **export-complex** から自然に解離することが考えられる。またこれまで述べたように、**p54nrb** や **PSF** はリン酸化などの翻訳後修飾により RNA やタンパク質との親和性を調節することが知られている (Buxadé et al., 2008; Proteau et al., 2005)。そのため、例えば **p54nrb** と **PSF** はリン酸化により、**U snRNA** 核外輸送複合体から離れるのではないかと考えられる。**U snRNA** 核外輸送複合体から解離した **p54nrb** と **PSF** は脱リン酸化され、再び輸送複合体の形成に機能するとも考えられが、リン酸化状態の **p54nrb** や **PSF** は mRNA との結合が増強され、スプライシングに働くことが示唆されている (Kameoka et al., 2004)。そのため、**U snRNA** の核外輸送に機能した **p54nrb** と **PSF** は続いて、スプライシング反応に関与する可能性が考えられる。このように、**p54nrb** と **PSF** は段階的に進む遺伝子発現機構の諸過程に沿って自身の機能を調節することにより、より効率的な遺伝子発現の進行に貢献しているのではないだろうか。

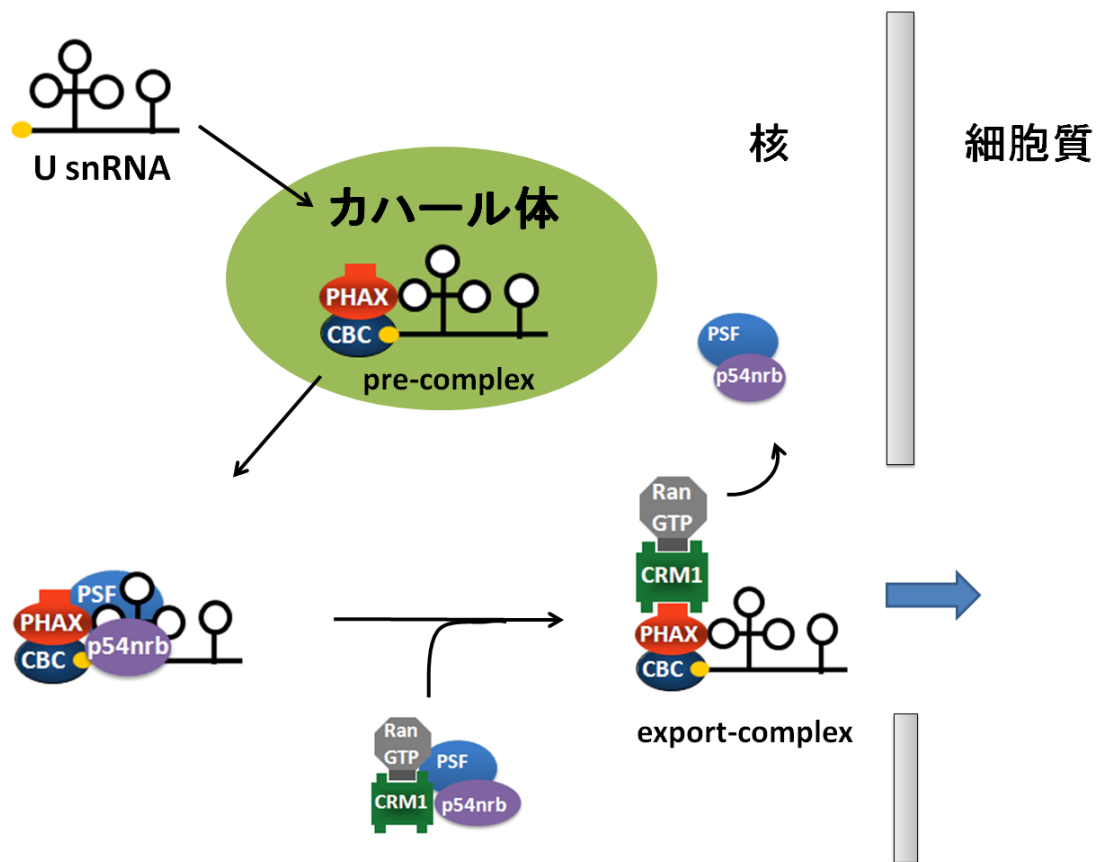


図 13 核内における p54nrb と PSF による U snRNA 核外輸送複合体形成モデル

4. 総括

遺伝子発現において RNA は様々な役割を担っている。タンパク情報を運ぶ mRNA をはじめ、タンパク合成装置として働く rRNA、アミノ酸を運搬する tRNA、スプライシングに働く U snRNA、そして遺伝子発現を調節する miRNA など RNA 種ごとに全く異なる機能を持っている。このように、RNA が多様な機能を持つことができるのは RNA 種ごとに異なるタンパク質との複合体である RNP (ribonucleoprotein) を形成するからである。そのため、細胞内には適切な RNP を形成させる機構が存在する。例えばリボソームやスプライソソームなどの非常に巨大な RNP の形成には ATP や GTP の加水分解や、分子シャペロンなどの補助因子が働いている (Fleckner et al., 1997; Pellizzoni et al., 2007)。序論で述べた SMN 複合体も分子シャペロンとして働いており、U snRNA の Sm 配列上にヘテロ 7 量体から構成される Sm タンパク質群をリクルートする。おそらく、本研究で解析を行った p54nrb と PSF も分子シャペロンのように機能し、U snRNA 核外輸送複合体である輸送 RNP の形成を保証しているのではないかと考えられる。

近年のトランスクリプトーム解析により、タンパク質をコードしない転写産物 (ノンコーディング RNA) が非常に多く存在することが明らかとなった (Carninci et al., 2005)。ヒトにおいては、ゲノムの約 98% 以上がタンパク質をコードしない領域である。そして、このノンコーディング RNA が生物の複雑さを生み出しているのではないかと考えられるようになった (Mattick et al., 2004)。しかし、大半のノンコーディング RNA に関してはゲノムから転写されているということが分かっただけであり、その機能については不明な点が多い。そのため、今後この新たな RNA の機能を明らかにしていく際にも、これらのノンコーディング RNA がどのような RNP 形成するのか、またどのように RNP が形成されるのかを研究していくことが重要であると考えられる。そして、このような機能未知のノンコーディング RNP の形成にも p54nrb や PSF が関与する可能性が十分に考えられ、大変興味深い。

実験の材料と方法

DNA コンストラクトの作成

・ pGEX-6p-p54nrb

このプラスミドは本研究室の谷ロー博士から分与していただいた。ヒト p54nrb は HeLa cDNA library から PCR により増幅し、pGEX-6p ベクターの BamH I および Xho I 認識部位に挿入した。

・ pET15-PSF

このプラスミドは産業技術総合研究所の富田耕三博士から分与していただいた。

・ pUC118-U1 Δ Sm

U1 Δ Sm を発現するコンストラクトから EcoRV と HindIII によって切り出し、pUC ベクターの同認識部位に挿入した。さらに U1 プロモーターをヒトゲノムから PCR により増幅し、pUC118-U1 Δ Sm の EcoR I および EcoRV 認識部位に挿入した。

レコンビナントタンパク質の発現と精製

・ レコンビナント p54nrb

ヒトの p54nrb cDNA がクローニングされた pGEX-6p-1 ベクター (Amersham Bioscience) をタンパク質発現用の大腸菌 BL21(DE3)codon plus-RIL (STRATAGENE) に形質転換した。そしてその大腸菌を 2l の LB/Amp 培地中で OD600 が 0.6 になるまで振盪培養し、IPTG を最終濃度 0.1mM になるように加え、さらに 30°C で 6 時間培養した。その後、大腸菌を 5,000rpm, 10 分間遠心を行うことにより回収した。大腸菌を PBS でけん濁、洗浄後、再び遠心により回収し、凍結保存した。大腸菌を融解後、bufferA (20mM Tris-HCL[pH7.5], 500mM NaCl, 1mM DTT, 1mMEDTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol) にけん濁した。そして、大腸菌をフレンチプレスにより破碎後、15,000rpm、30 分間遠心

し、上清を回収した。あらかじめ、bufferA で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) ビーズに、回収した上清を加え、4°Cで1時間転倒混和した。その後、ビーズをbufferAで4回洗浄後、bufferB(20mM Tris-HCL[pH7.5]、100mM NaCl、1mM DTT、1mMEDTA、10% glycerol) で2回洗浄した。p54nrbを精製するために、タンパク質をビーズに結合させたまま、*PreScission*proteaseを添加し、4°Cで2日間保温し、GST タグを切断した。さらに、HiTrap His カラムによりさらに精製した。精製後、bufferB に対して透析し、凍結保存した。

・レコンビナント PSF

ヒトの PSF cDNA がクローニングされた pET-15 ベクターをタンパク質発現用の大腸菌 BL21(DE3)codon plus-RIL (STRATAGENE) に形質転換した。そしてその大腸菌を 2l の LB/Amp 培地中で OD600 が 1.0 になるまで振盪培養し、IPTG を最終濃度 0.1mM になるように加え、さらに 20°Cで20時間以上培養した。その後、大腸菌を 5,000rpm、10 分間遠心を行うことにより回収した。大腸菌を PBS でけん濁、洗浄後、再び遠心により回収し、凍結保存した。大腸菌を融解後、bufferC (50mM Tris-HCL[pH8.0]、500mM NaCl、1mM DTT、2mM be-ta-mercaptoethanol、20mM Imidazol、0.1% NP-40、10% glycerol) にけん濁した。そして、大腸菌をフレンチプレスにより破碎後、15,000rpm、30 分間遠心し、上清を回収した。あらかじめ、bufferC で平衡化した Ni-NTA (QIAGEN) ビーズに、回収した上清を加え、4°Cで1時間転倒混和した。その後、ビーズをbufferCで4回洗浄後、imidazol濃度が500mMのbufferCで溶出した。最後にbufferD(20mM Tris-HCL[pH8.5]、250mM NaCl、6mM be-ta-mercaptoethanol、10% glycerol) に対して透析し、凍結保存した。

・レコンビナント PHAX、CRM1、Ran、CBP20、CBP80

これらのレコンビナントの発現・精製は以前に行われた方法に従った(Ohno et al.,2000)。

GST プルダウン

Glutathione Sepharose 4B に ^{32}P 標識した A-cap DHFR mRNA、Ftz mRNA、A-cap U1+50 snRNA、U1 snRNA および、10% HNE、GST-PHAX (0.2 μM)、CBC (0.2 μM)、tRNA (0.8mg/ml) と PBS を加え 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、転倒混和しビーズに GST-PHAX を固定した。その後、ビーズを RSB100N (10mM Tris-HCl、2.5mM MgCl₂、100mM NaCl、0.1% NP-40) で 4 回洗浄し、HomoMix (50mM Tris[pH7.4]、5mM EDTA、1.5% SDS、300mM NaCl、1.5mg/ml Proteinase K) にビーズをけん濁、振倒し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。以上のように抽出した RNA を RNA dye (95% Formamide、0.05% SDS、0.05% Xylenecyanol FF、0.05% Bromophenol blue) に溶かし、7M の尿素を含む変性ポリアクリルアミドゲル (PAGE) で電気泳動し、オートラジオグラフィで解析を行った。

ゲルシフトアッセイ

^{32}P 標識した U1 snRNA とレコンビナントタンパク質、T buffer (40 mM Hepes-KOH [pH 7.3], 110 mM KOAc, 6 mM Mg(OAc)₂)、0.8mg/ml tRNA、を混合し、25 $^{\circ}\text{C}$ で 40 分間保温した。保温後、サンプルを非変性 6% のアクリルアミドゲルに泳動し、オートラジオグラフィで解析を行った。シグナルの解析は、BAS-2500 (FujiFilm) を用いて行った。

タンパク質相互作用の解析

GST-PHAX を固定した Glutathione Sepharose 4B に、レコンビナント p54nrb、PSF および RSB100N を加え、を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間転倒混和した。その後、ビーズを RSB100N (10mM Tris-HCl、2.5mM MgCl₂、100mM NaCl、0.1% NP-40) で 4 回洗浄しビーズからタンパク質を 2 \times SDS PAGE サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl (pH6.8)、10% β -

メルカプトエタノール、4%SDS、10%スクロース、0.004%プロモフェノールブルー) で溶出し、SDS-PAGE を行った。シグナルの検出はウエスタンブロッティング法により行った。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE 終了後、ゲル中に存在するタンパク質を Nitrocellulose Transfer Membrane(Schleicher & Schuell)に転写した。転写は 0.8 から 2mA/cm² で 1 時間程度行った。次に、メンブレンをスキムミルク溶液 (5% non-fat dry milk) で 1 時間ブロッキング後、1 次抗体と 1 時間室温で保温した。そして、メンブレンを 0.1%の NP40 を含んだ PBS で 3 回洗浄し、HRP (Horseradish Peroxidase) を標識したマウスの IgG に対する抗体を 2 次抗体として(Jackson ImmunoResearch)、室温で 1 時間保温した。その後、メンブレンを先ほどと同様に 3 回洗浄し、最後に PBS で洗浄後、ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)でシグナルを検出した。

免疫沈降法

レコンビナント p54nrb、PSF、CRM1、Ran、hnRNPA1 とそれぞれの抗体を結合させた Protein A Sepharose (GE Health care)と混合し 1mg/ml RNase A 存在下で、4℃、60 分間転倒混和した。その後 Protein A Sepharose を RSB150N で洗浄し、ウエスタンブロッティングにより解析を行った。

FLAG 抗体を用いた免疫沈降法

FLAG-PHAX を発現するプラスミドを Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に HeLa 細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% ホルムアルデヒドで 10 分間クロスリンクを行った。終濃度が 0.15M になるように glycine (pH 7.0)を加え 5 分間保温した。その後、PBS で 2 回洗浄し HeLa 細胞を回収した。

ANTI-FLAG M2 Agarose from mouse(SIGMA)をRSB100Nで2回洗浄後、HeLa細胞の細胞抽出液を加え4℃、60分間転倒混和した。その後、アガロースをRSB100Nで4回洗浄し、2×SDS PAGE サンプルバッファーでタンパク質を溶出し、SDS-PAGE で分離した。そして、ウエスタンブロッティング法によりシグナルを検出した。

抗体

FLAF ペプチド、hnRNP C1/C2、p54nrb、PSF、GAPDH に対するモノクローナル抗体はそれぞれ、M2 (Sigma)、4F4 (Sigma)、3/p54nrb (BD)、B92 (Sigma)、HyTest (6C5)を用いた。PHAX に対するポリクローナル抗体は His-PHAX で免疫したラビットから血清を回収し、GST-PHAX を用いてアフィニティー精製を行い調整した。

試験管内転写

試験管内転写は、T7 RNA ポリメラーゼ (Promega) を用いて、10 μ l の反応系で行った。0.1 μ g/ μ l の DNA、0.5mM ATP、0.5mM CTP、0.5mM GTP、0.5mM UTP、1mM m7GpppG RNA cap structure Analog (NEB)、1.2U/ μ l RNasin (Promega)、1.5U/ μ l RNA ポリメラーゼ、 $[\alpha$ -32P]UTP (GE Healthcare)、ポリメラーゼに添付の buffer を混合し、37℃で 60 分間保温した。キャップ構造を付加しない RNA の転写反応の場合は、Cap Structure Analog を除き、0.5mM GTP の反応条件で行った。

アフリカツメガエル卵母細胞の摘出

アフリカツメガエルを 0.4 パーセントの MS222 に 15 分間浸し麻酔処理を行い、腹部より卵母細胞を摘出した。卵母細胞を Barth buffer (10mM HEPES[pH7.6]、88mM NaCl、1mM KCl、0.82mM MgSO₄、2.4mM NaHCO₃) で洗浄の後に、5mg/ml の Collagenase B (Roche) 処理を 60 分間室温で行った。Barth+Ca buffer (Barth buffer+4mM CaCl₂、

3.4mM Ca(NO₃)₂、10µg/ml Ampicillin、10µg/ml Streptomycin) で洗浄し、19°Cで2時間以上保温し、顕微鏡注入実験を行った。

アフリカツメガエル卵母細胞への RNA の微量注入

RNA の微量注入実験は以前に行われた方法に従った (Jarmolowski et al.,1994)。以下に簡単に示す。試験管内転写によって合成した RNA を、RNasin 2U/µl、Blue Dextran (MW 2,000,000、Sigma) を 7.5 µg/µl になるように加えて顕微注入のサンプルを調製した。卵母細胞にサンプル約 33nl を微量注入した。一定時間の保温後、J buffer (10mM Hepes[pH7.6]、70mM NH₄Cl、7mM MgCl₂、0.1mM EDTA、10%glycerol) 内で卵母細胞を核と細胞質とにピンセットにより分離し、HomoMix (50mM Tris[pH7.4]、5mM EDTA、1.5%SDS、300mM NaCl、1.5mg/ml Proteinase K) にそれぞれ画分をけん濁、振倒し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。以上のように抽出した RNA を RNA dye (95% Formamide、0.05% SDS、0.05% Xylenecyanol FF、0.05% Bromophenol blue) に溶かし、7M の尿素を含む変性ポリアクリルアミドゲル (PAGE) で電気泳動し、オートラジオグラフィで解析を行った。

リアルタイム PCR

HeLa 細胞からの total RNA の抽出は SepasolRNAI Super (Nacalai Tesque)を用いて行った。抽出した RNA は、RQ1RNase-Free DNase (Promega) により処理した。

リアルタイム PCR は SuperScriptIII Platinum SYBRGreen One-Step qRT-PCR (Invitrogen) を使い、7500 RealTime PCR System(Applied Biosystems)で検出した。使用したプライマーは以下に示す。

Pre-U1: CAGGGCGAGGCTTATCCATTG, AACTCCAGAAAGTCAGGGGAAAG.

Pre-U4atac: GGCAGTACTGCTAACGCCTG, CTGCTGTTTGAAGTATAAG.

GAPDH: ATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAA, AGTCCTTCCACGATACCAAAGTT.

siRNA を用いたノックダウン

Stealth™RNAi は invitrogen から購入した。それぞれの標的配列は以下に示す。

Stealth™RNAi の HeLa 細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen)を用いて行った。

p54nrb ; GGUGCAUUCCUGAAGUCUCUAAUGU

PSF ; GGAGGCCCGCCGCCUCCGCCCGCGG

PHAX ; ,UUCAUUUCUGGUCUGUCCCUAGCC

control ; GCAUCGAAGUAUCCGCGUACGAAG

免疫染色

HeLa 細胞を 8-well glass chamber slide (Nunc) で培養し、PBS+4%ホルムアルデヒドで 20 分間固定処理を行った。PBS+0.5% Triton X-100 で透過処理をし、PBS で室温 10 分×2 回洗浄した後に、PBS+3% BSA で 30 分間ブロッキングした。一次抗体を加え一時間保温した後に TBS+0.1% Tween-20 で洗浄した。二次抗体として Alexa569-または Alexa400-を用い DAPI 染色を行った。抗体反応したのちのスライドは Fluorescent Mounting Media (CALBIOCHEM) でマウントした。

顕微鏡観察は倒立顕微鏡で室温にて行った(Axio Observer Z1; Carl Zeiss, Inc.)。画像は AxioVision software (version 4.7; Carl Zeiss, Inc.)を使い、カメラ(AxioCam MRm; Carl Zeiss, Inc.)で撮影した。

参考文献

- Arts, G.J., Fornerod, M., and Mattaj, I.W. (1998a). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* 8, 305-314.
- Arts, G.J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B., and Mattaj, I.W. (1998b). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J* 17, 7430-7441.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6.
- Bohnsack, M.T., Regener, K., Schwappach, B., Saffrich, R., Paraskeva, E., Hartmann, E., and Gorlich, D. (2002). Exportin 5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J* 21, 6205-6215.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-91
- Bond CS, Fox AH. Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. (2009). *J Cell Biol* 186, 637-44.
- Buxadé M, Morrice N, Krebs DL, Proud CG. (2008). The PSF, p54^{nrb} complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 283, 57-65.
- Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz JA. (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* 151, 1-14.
- Calado, A., Treichel, N., Muller, E.C., Otto, A., and Kutay, U. (2002). Exportin 5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J* 21, 6216-6224
- Mol Cell*. 2009 Aug 28; 35(4):467-78. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.027.

The transcriptional landscape of the mammalian genome.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* *309*,1559-63.

Chen LL, Carmichael GG.(2009). Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell* *35*,467-78.

Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A, Reed R.(2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* *127*,1389-400. *RNA*.2002 Sep;8(9):1102-11.

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB.(2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* *33*,717-26.

Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, Blencowe BJ, Ingles CJ.(2002). Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* *8*,1102-11.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* *90*,1051-1060.

Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI.(2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* *12*,13-25.

Gadal, O., Strauss, D., Kessel, J., Trumpower, B., Tollervy, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* *10*,3405-3415.

Gallouzi IE, Steitz JA.(2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* *294*,1895-901.

Hamm, J., and Mattaj, I. W. (1990). Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* *63*, 109-118.

Hata K, Nishimura R, Muramatsu S, Matsuda A, Matsubara T, Amano K, Ikeda F, Harley VR, Yoneda T. (2008). Paraspeckle protein p54nrb links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice. *J Clin Invest* *118*, 3098-108.

Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* *151*, 1057-1066.

Huang Y, Carmichael GG. (1997). The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs.

Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., and Luhrmann, R. (1998). Snurportin-1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* *17*, 4114-4126.

Huang Y, Steitz JA. (2005). SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell*. *17*, 613-5.

Izaurralde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C., and Mattaj, I. W. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* *376*, 709-712.

Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* *78*, 657-668.

Izaurralde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1992). A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J Cell Biol* *118*, 1287-1295.

Johnson, A.W., Lund, E., and Dahlberg, J. (2002). Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends. Biochem Sci* 27, 580-585

Kaneko S, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Manley JL. (2007). The multifunctional protein p54^{nrb}/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev* 21, 1779-89.

Katahira J, Strässer K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JU, Hurt E. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* 18, 2593-609.

Kim, V.N. and Dreyfuss, G. (2001). Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. *Mol Cells* 12, 1-10.

Kim, V.N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M.D., and Dreyfuss, G. (2001). The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J* 20, 2062-2068.

Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hatmann, E., and Gorlich, D. (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* 1, 359-369.

Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E. and Moore, M.J. (2000). The spliceosome deposits multiple protein 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19, 6860-6869.

Li S, Kuhne WW, Kulharya A, Hudson FZ, Ha K, Cao Z, Dynan WS. (2009). Involvement of p54^(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance. *Nucleic Acids Res* 37, 6746-53.

Lu S, Cullen BR. (2004). Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol.* 78, 12868-76.

- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U.(2004).Nuclear export of microRNAPrecursors.Science303,95-8.
- McCloskey A, Taniguchi I, Shinmyozu K, Ohno M.(2012)hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export.Science335,1643-6.
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR.(1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA.Nature338,254-7.
- Maris C, Dominguez C, Allain FH.(2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression.FEBS J 272, 2118-31.
- Masuda S, Das R, Cheng H, Hurt E, Dorman N, Reed R.(2005). Recruitment of the humanTREXcomplex to mRNA during splicing.Genes Dev 19,1512-7.
- Masuyama K, Taniguchi I, Kataoka N, Ohno M.(2004). RNA length defines RNA export pathway.Genes Dev 18,2074-85.
- Massenet,S.,Pellizzoni,L.,Paushkin,S.,Mattaj,I.W.,and Dreyfuss,G.(2002).The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. Mol Cell Biol 22 ,6533-6541.
- Mattaj,I.W.(1988).UsnRNP assembly and transport.In Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. In,M.L.Birnsriel,ed. (Springer-Verlag),pp.100-114.
- Mattick JS.(2004). RNA regulation: a new genetics?Nat Rev Genet5,316-23. Review.
- Mouaikel,J.,Narayanan,U.,Verheggen,C.,Matera,A.G.,Bertrand,E.,Tazi,J.,and Bordonne,R.(2003).Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron.EMBO Rep 4,616-622.

- Mouaikel,J.,Verheggen,C.,Bertrand,E.,Tazi,J.,and Bordonne,R.(2002).
Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol Cell* *9*,891-901
- Ohno,M.,Segref,A.,Bachi,A.,Wilm,M.,and Mattaj,I.W.(2000). PHAX,a mediator of UsnRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* *101*, 187-198
- Patel SB, Bellini M. (2008)The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle.*Nucleic Acids Res* *36*,6482-93.
- Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease.(2007). *EMBO Rep**8*,340-5.
- Peng R, Dye BT, Pérez I, Barnard DC, Thompson AB, Patton JG.(2002). PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA.*RNA* *8*,1334-47.
- Pollard VW, Malim MH.(1998)The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol**52*,491-532. Review.*J Mol Biol*. 2005 Mar 4;*346*(4):1163-72. Epub 2005 Jan 12.
- ProteauA, Blier S, Albert AL, Lavoie SB, Traish AM, Vincent M.(2005). The multifunctional nuclear protein p54nrb is multiphosphorylated in mitosis and interacts with the mitotic regulator Pin1.*J Mol Biol**346*,1163-72.
- Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T.(2009).MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009*6*,2525-30.
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Lührmann R, Hurt E.(1997).Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores.*EMBO J* *16*,3256-71.

Sewer MB, Waterman MR.(2002). cAMP-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A. *J Mol Endocrinol* *29*,163-74.

Shav-Tal Y, Zipori D.(2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* *531*,109-14.

Stanek D, Neugebauer KM.(2006) The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* *115*,343-54.

Strässer K, Hurt E.(2000).Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *19*,410-20.

Strässer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondón AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E.(2002)TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* *417*,304-8.

Spiller MP, Boon KL, Reijns MA, Beggs JD.(2007). The Lsm2-8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA. *Nucleic Acids Res.* *35*,923-9.

Stutz,F.,Bachi,A.,Doerks,T.,Braun,I.C.,Seraphin,B.,Wilm,M.,Bork,P.,and Izaurralde,E.(2000).REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA* *6*,638-650.

Suzuki,T.,Izumi,H.,Ohno,M.(2010).Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J.Cell Biol.* *190*,603-612.

Genome Res. 2009 Mar;*19*(3):347-59. doi: 10.1101/gr.087775.108. Epub 2008 Dec 22.

Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL.(2009). MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res* *19*,347-59.

Taniguchi I, Ohno M.(2007)ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56. *Mol Cell Biol* *28*,601-8.

Thomas,F.,and Kutay,U.(2003).Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway.*J Cell Sci* *116*,2409-2419.

Trotta,C.R.,Lund,E.,Kahan,L.,Johnson,A.W.,and Dahlberg,J.E.(2003).Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J* *22*, 2841-2851

Tschochner,H.,and Hurt,E.(2003).Pre-ribosome on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* *13*,255-263.

Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggerbauer B, Fischer U.(2005). Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy.*Genes Dev* *19*,2320-30.

Wolin SL, Cedervall T.(2002).The Laprotein.*Annu Rev Biochem.* *71*,375-403.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR.(2003).Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.*Genes Dev* *17*,3011-6. E

Yong J, Wan L, Dreyfuss G.(2004). Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes?*Trends Cell Biol* *14*:226-32. Review.

Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forkert R, Wirth B.(1995). Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy.*Lancet* *346*,1162.

Zhang Z, Carmichael GG.(2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* *106*,465-75

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変熱心にご指導くださいました大野睦人先生に、心より感謝いたします。

北畠真博士と谷口一郎博士には本研究を行うにあたり様々な助言や、丁寧な指導をいただきました。感謝の意を表します。

京都大学ウイルス研究所情報高分子化学研究分野の皆様には、研究を行う上でさまざまなお指摘をいただきました。本当にありがとうございました。

産業技術総合研究所の富田耕三博士には pET15-PSF 分与していただきました。感謝いたします。

最後に、様々な面で研究生活を支えてくださいました家族や友人の皆様に感謝いたします。本当にありがとうございました。