

DEAD box 型 RNA ヘリカーゼ UAP56 と URH49 による
複合体リモデリングを介した mRNA 輸送機構に関する研究

藤田 賢一

目次

| | |
|-----|---|
| 要旨 | 2 |
| 略語表 | 4 |
| 序論 | 6 |

結果

| | |
|--|----|
| 第1節 UAP56とURH49は、ATPの有無によって、Apo-複合体とATP-結合型複合体の2つの複合体様式を示す | 11 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 第2節 URH49ノックダウン特異的に生じる細胞質分裂異常の解析と細胞質分裂異常を指標としたApo-AREX構成因子CIP29の機能解析 | 14 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 第3節 UAP56ならびにURH49のmRNA輸送経路におけるNXF1の関与 | 26 |
|--|----|

| | |
|----------|----|
| 考察 | 35 |
| 材料ならびに方法 | 40 |
| 文献 | 45 |
| 謝辞 | 52 |

要旨

真核生物の遺伝子発現において、タンパク質をコードする遺伝子は pre-mRNA として転写され、キャッピング、スプライシング、ポリアデニル化の各プロセッシングを受けて成熟 mRNA となった後に、mRNA 核外輸送因子を介して細胞質に輸送される。

TREX 複合体は mRNA 核外輸送共役因子として、mRNA の各プロセッシングと mRNA 核外輸送を共役する進化的に保存された複合体である。その構成因子として、ヒトにおいては DEAD box 型 RNA ヘリカーゼである UAP56 と、そのパラログとして URH49 が存在する。両者は異なる TREX および AREX 複合体を形成して、異なる mRNA 群の選択的輸送経路を形成することが報告されていた。この過程において、UAP56 は ATP 依存的な複合体のリモデリングを介して、最終的な mRNA 輸送体である NXF1 と結合することで mRNA 輸送が達成される。しかし、URH49 についても同様の機構が存在するかは未解明であった。加えて UAP56 と URH49 の複合体形成様式と、選択的 mRNA 核外輸送過程の詳細は明らかでなかった。

本研究は、UAP56 と URH49 の機能の根幹となる、複合体形成様式、および mRNA 輸送の分子機構を明らかにすることを目的に解析を実施した。

UAP56 と URH49 の免疫沈降から、両者はそれぞれ ATP の有無によって、Apo-複合体と ATP-結合型複合体の2つの複合体様式をとることを明らかにした。ATP 非存在下において、UAP56 は THO 複合体を含むが、ALYREF および CIP29 を含まない Apo-複合体を、URH49 は CIP29 との Apo-複合体を形成することを見出し、それぞれを Apo-TREX 複合体ならびに Apo-AREX 複合体と定義した。加えて、Apo-複合体は ATP の添加により、両複合体とも THO 複合体、ALYREF および CIP29 を含む ATP-結合型複合体へリモデリングすることを発見した。またそれぞれの構成因子は UAP56 と URH49 をのぞいて共通であったことから、この ATP-結合型複合体を ATP-TREX 複合体と定義した。

次いで、これらの複合体形成と mRNA 輸送機能について解析を進めた。これまでの解析から、URH49 をロックダウンすると URH49 が制御する mRNA の輸送の阻害により、細胞質分裂異常の表現型が低頻度に観察されることが HeLa 細胞で報告されていた。今回、この表現型が MCF7 細胞で HeLa 細胞に比べてはるかに顕著に生じることを発見し、輸送標的 mRNA への影響を観察するアッセイ系として使用した。このアッセイ系を使用して、Apo-AREX 複合体である CIP29 が URH49 の mRNA 輸送経路に寄与すること、加えて URH49 の mRNA 輸送に ATP 結合が必須であることを示した。この結果は Apo-複合体の違いが、UAP56 と URH49 の選択的 mRNA 輸送に重要であ

ることを示唆した。

最後に NXF1 のノックダウンにより、UAP56 の mRNA 輸送経路だけでなく、URH49 の mRNA 輸送経路においても異常が生じることを見出した。また NXF1 および ALYREF が、UAP56 と URH49 両方の標的 mRNA 群とゲノムワイドに結合することを見出し、両 mRNA 輸送経路における複合体リモデリングと、NXF1 の寄与の一般性が示唆された。

以上の結果より、UAP56 と URH49 はそれぞれ複合体リモデリングを介して NXF1 依存的に mRNA 群を輸送する分子機構の存在を示した。加えて UAP56 と URH49 が形成する Apo-TREX ならびに Apo-AREX 複合体が、両者による mRNA 輸送の選択性に働く新規機構を提示した。

略語一覽

ADP : Adenosine diphosphate

AREX : Alternative mRNA export

ATP : Adenosine triphosphate

BSA : Bovine serum albumin

CBC : Cap binding complex

CFP : Cyan fluorescent protein

circRNA : circular RNA

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DIC : Defferential interference contrast

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA : Deoxyribonucleic acid

DTT, Dithiothreitol;

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : Fetal bovine serum

GFP : Green fluorescent protein

HRP : Horse Radish Peroxidase

H2B : Histone H2B

iCLIP : individual-nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation

mRNA : messenger RNA

mRNP : mRNA-protein complex

NE : Nuclear extract

PAGE : Poly-acrylamide gel electrophoresis

PBS : Phosphate-buffered saline

PH : Phase contrast

PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride;

qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RBD : RNA-binding domain

PCR : Polymerase chain reaction

RNA : Ribonucleic acid

RNA-FISH : RNA-fluorescence in situ hybridization

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium dodecyl sulfate

siRNA : small interfering RNA

snoRNA : small nucleolar RNA

SSC : Standard saline citrate

TREX : Transcription export

TritonX100 : octylphenol ethoxylate

tRNA : transfer RNA

Tween20 : polyoxyethylene sorbitan monolaurate

YFP : Yellow fluorescent protein

序論

真核細胞の遺伝子発現において、タンパク質をコードする遺伝子は核内で pre-mRNA として転写され、5'キャッピング、スプライシング、3'末端プロセッシングを受ける。これらの各過程は独立して進行するのではなく、転写の進行に伴って密接に連携 (以降、共役と記載する) することで正確に実行される。各プロセッシングには数多くの因子が関わっており、mRNA はタンパク質との複合体 (mRNA-protein complex, mRNP と記載する) として存在する。mRNP は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼをはじめとする RNA ヘリカーゼを介して、様々なタンパク質が集合、離散することでリモデリングし、各プロセッシングは進行する [1][2][3]。mRNA プロセッシング後、成熟した mRNP は核外輸送され、翻訳される。mRNP 核外輸送は他の過程と同様に、遺伝子発現の重要な制御段階であり、TREX 複合体により mRNA 成熟と mRNA 輸送過程は共役して進行する。

TREX 複合体は進化的に保存されたタンパク質複合体であり、mRNA プロセッシングに伴って mRNA 上にリクルートし、最終的な mRNA 輸送体のアダプターとして機能することで各過程の共役因子として働く [4][5][6][7][8][9]。ヒトの TREX 複合体は、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ UAP56 / DDX39B (各遺伝子の別名を/以下に示す)、ALYREF / THOC4、CIP29 / SARNP、CHTOP、PDIP3 / POLDIP3、ZC11A / ZC3H11A と、THOC1 / HPR1、THOC2 / hTHO2、THOC3 / hTEX1、THOC5 / fSAP79、THOC6 / fSAP35 および THOC7 / fSAP24 を含む THO 複合体から構成される [10][11][12][13][14]。これまでの研究からヒトにおいて、スプライシング過程が、TREX 複合体のリクルートメントに重要であることが明らかになっている。その分子機構として、UAP56 と 3'スプライス部位の認識に必要なスプライソソーム構成因子である U2AF65 の相互作用を介して、スプライシング依存的に TREX 複合体が mRNA にリクルートすることが報告されている [6][10][15]。加えて 3'末端プロセッシングとの関係性も報告されている。ALYREF は 3'末端プロセッシング制御因子である PCF11 と相互作用し、その後、3'末端プロセッシングに働く複合体の形成に伴って、UAP56 と相互作用し TREX 複合体に動員される [16][17]。つまりスプライシングと 3'末端プロセッシングの完了に伴って TREX 複合体は mRNA 上に形成される。その後、TREX 複合体は最終的な mRNA 輸送因子である NXF1 のリクルートに機能する [8][13][18]。NXF1 は RNA 結合能を示す RNA-binding domain (RBD と記載する) を有するが、NXF1 単独では RBD が他の domain と分子間内相互作用した状態で存在し、mRNA と結合できない [18]。TREX 複合体は構成因子の ALYREF、THOC5 および CHTOP を介して NXF1 をリクルートするだけでなく、NXF1 の RBD における分子間内相互作用を阻害することで NXF1 の RNA 結合を助ける [8][13][18]。こ

これらの機能によって、TREX 複合体はプロセッシングが完了した mRNA だけを NXF1 に結合させ、輸送させる重要な役割を担っている。さらに TREX 複合体は、ALYREF とキャップ結合複合体 (Cap binding protein complex, CBC と記載する) との相互作用を介して mRNA の 5'キャップ部位にリクルートされる。これにより細胞質への、mRNA の 5'から 3'に方向性を持った核外輸送が達成されると考えられている [19][20][21][22]。このように多岐にわたる TREX 複合体の形成は、UAP56 の ATP 結合によって制御される。具体的には UAP56 の ATP 結合は CIP29、ALYREF、CHTOP、PDIP3、および ZC11A の TREX 複合体へのリクルートに重要であることが報告されている [11][12][13]。加えて UAP56 は ATP 依存的に ALYREF と CHTOP を mRNA にリクルートすることから、TREX 複合体の形成と mRNA へのローディングの両方に機能することが示唆される (図 1)[13]。また CIP29、ALYREF および CHTOP によって UAP56 の ATPase と、それに伴う RNA ヘリカーゼ活性の促進が報告されている [11][13][23]。mRNA 輸送における UAP56 の RNA ヘリカーゼ活性の重要性は明らかでないが、TREX 複合体がリクルートした mRNA の二次構造をほぐすことで、NXF1 のリクルートメントを助けているのかもしれない。よって UAP56 による ATP 依存的な TREX 複合体の形成機構は mRNA 成熟-輸送過程を理解する上で重要であると思われる。

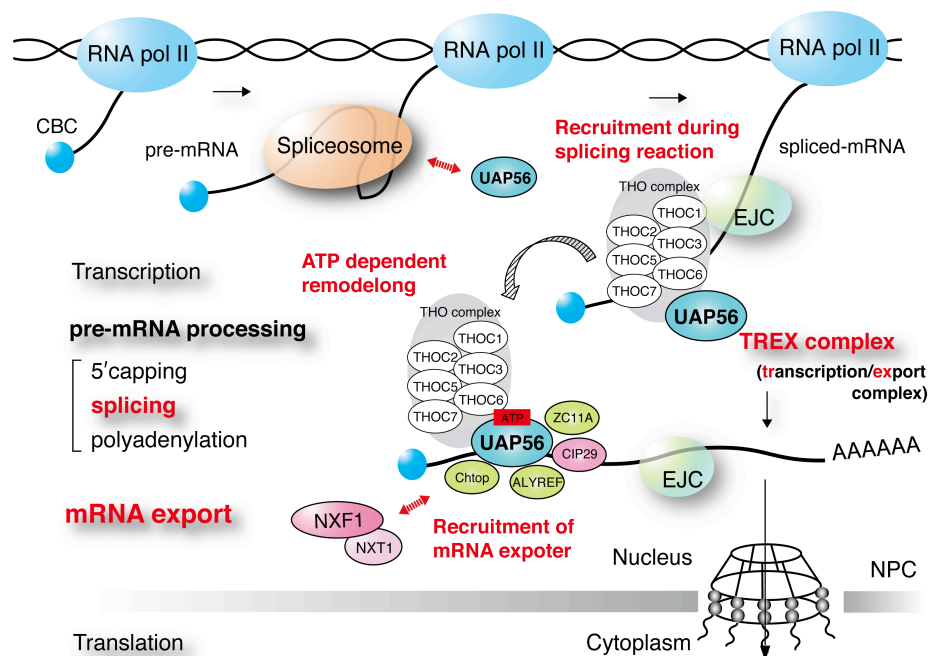


図 1 真核生物における TREX 複合体を介した mRNA 核外輸送機構

RNA ポリメラーゼ II による転写に伴い、種々のプロセッシングを受けた成熟 mRNA は細胞質に輸送される。この過程で mRNA 上には UAP56 をはじめとする TREX 複合体が形成され、核内プロセッシングと輸送の共役が行われる (詳細は本文を参照)。RNA pol II : RNA polymerase II、CBC : Cap binding protein complex、EJC : Exon-junction complex、NPC : Nuclear pore complex

TREX 複合体において、UAP56 ホモログ (*S. cerevisiae* ; Sub2, *C. elegans* ; UAP56, *D. melanogaster* ; Hel25E) は各生物種において生存に必須であることから mRNA 核外輸送において、この RNA ヘリカーゼが重要であることが推測される [24][25][26]。哺乳類においては、UAP56 に加え、別の Sub2 ホモログとして URH49 / DDX39A が存在し、mRNA 輸送に関与することが報告されている [27]。UAP56 と URH49 は 90%の配列同一性と 96%の類似性という高い相同性を示す一方で、両者が制御する mRNA 群はゲノムワイドに異なる (図 2)[28]。特に細胞分裂過程の進行に伴う遺伝子発現において、UAP56 と URH49 が異なる遺伝子群の制御に働くことが報告されている。UAP56 は恒常的に発現する一方で、URH49 は細胞分裂休止期においては発現量が低く、細胞増殖期になるに従って発現量が上昇する [27]。よって URH49 による選択的な mRNA 成熟 / 輸送は細胞増殖に関連した過程であることが予想される。私の所属する研究室では両者が異なる mRNA 群の輸送に働く機構として、UAP56 が CIP29 を除く TREX 複合体を、URH49 は CIP29 と AREX (alternative mRNA export) 複合体を形成して mRNA 発現を制御することを報告した (図 3)[28]。

しかし URH49 の複合体様式については矛盾する研究結果も複数報告されている。 *In vivo* において TREX 複合体構成因子 THOC2 と URH49 の相互作用が報告されている [11]。 *In vitro* においても UAP56 と URH49 のそれぞれが直接的に ALYREF と CIP29 に相互作用することが示されている [29][30]。これらのことから URH49 の複合体様式については明確に理解されておらず、UAP56 との選択的 mRNA 輸送機構は未解明である。UAP56 の TREX 複合体様式が明らかになったことから mRNA 輸送の分子機構について大きく理解が進んだ。よって URH49 が制御する多様な mRNA 輸送機構について理解するために複合体様式を明らかにすることは重要であると考えられる。さらに複合体様式を明らかにすることは、未だ不明である URH49 経路における mRNA 核外輸送に到るまでの分子機構を明らかにする上でも必要である。

本研究を行うにあたり UAP56 が ATP 依存的に複合体様式を変化させることから、UAP56 と URH49 において ATP 非依存的な Apo-複合体と、ATP 結合を介した ATP-結合型複合体が存在すると仮説を立てた (図 3)。本研究の第 1 節では、この 2 つの Apo-複合体と ATP-結合型複合体を区別して解析することで、UAP56 と URH49 の複合体様式について明確にすることを試みた。続いて第 2 節では、URH49 と複合体を形成する CIP29 について、URH49 特異的に生じる表現型や標的遺伝子の発現量減少を指標にしてその重要性を評価した。この結果から Apo-複合体の違いが UAP56 と URH49 の選択的 mRNA 輸送に重要であることが示唆された。加えて URH49 の mRNA 輸送に ATP 結合が必須であることを示した。第 3 節では、これまでの研究で得た複合体形

成様式の情報を元に、mRNA 輸送因子 NXF1 が、UAP56 が制御する mRNA 輸送経路と、URH49 の mRNA 輸送経路の両方に重要であることを明らかにした。また両者による選択的 mRNA 認識機構について知見を得るため、近年報告された circRNA における RNA 長による UAP56 と URH49 の RNA 識別モデルの可能性について検証した。これらの解析より UAP56 と URH49 による Apo 複合体と ATP 結合型複合体を介した新たな mRNA 輸送制御機構モデルを立てた。

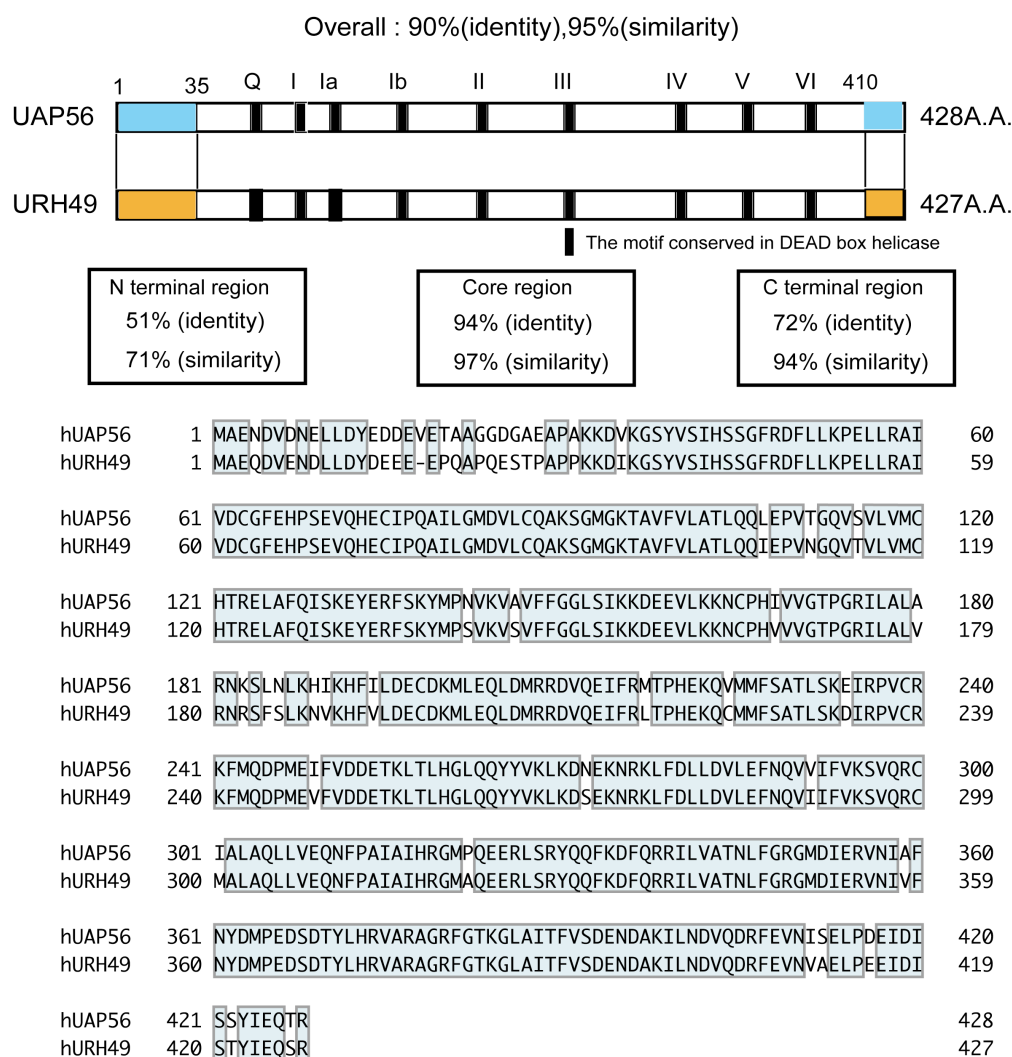


図 2 ヒトの UAP56 と URH49 のアミノ酸配列比較

(上段) ヒト UAP56 とヒト URH49 の相同性を示す概略図。N 末端 (UAP56 では 1-35 残基 (青色)、URH49 では 1-34 残基 (オレンジ色)) と C 末端 (UAP56 では 410-428 残基 (青色)、URH49 では 409-427 残基 (オレンジ色)) の領域は相同性が比較的低い。黒色の領域は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼに保存されたモチーフ (Q~VI) を示す。(下段) UAP56 と URH49 のアミノ酸配列の相同性を示す。青色の網掛けは、アミノ酸が相同であることを示す。

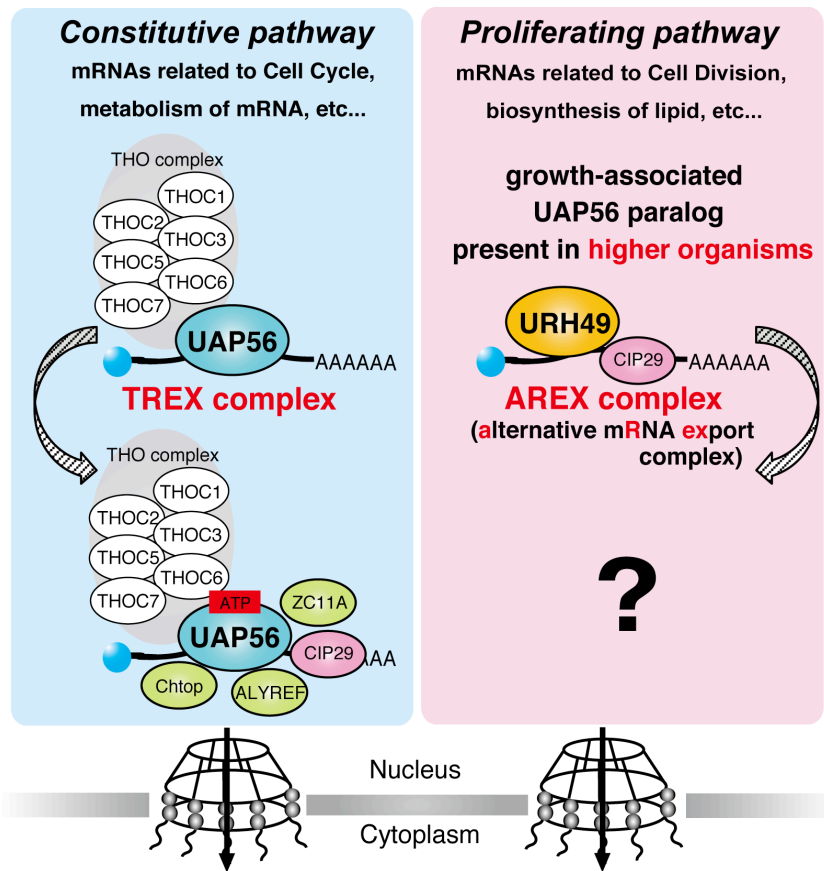


図3 UAP56 と URH49 が形成する TREX 及び AREX 複合体による選択的 mRNA 輸送経路と、複合体形成様式における仮説

ヒト UAP56 は恒常的に発現し、TREX 複合体を形成することで細胞周期や mRNA 代謝に関わる遺伝子群の mRNA 輸送経路の制御に働く。一方でヒト URH49 は細胞増殖期に発現し、TREX と異なる AREX 複合体を形成することで細胞分裂や脂質合成などの遺伝子から転写される mRNA 群の mRNA 輸送経路の制御に働く。しかしこの複合体形成様式について、矛盾する報告も多いことから、本研究においては UAP56 と URH49 において、Apo-複合体と、ATP-結合型複合体の2つの複合体様式が存在するのではないかと仮説を立てた。

結果

第 1 節 UAP56とURH49はATPに依存して、Apo-複合体とATP-結合型複合体の2つの複合体様式をとる

1.1 UAP56、およびURH49のATP非存在下と存在下における複合体の観察

UAP56 と URH49 が形成する複合体を観察するために FLAG-UAP56 および FLAG-URH49 をそれぞれ安定的に発現する 293 Flp-In T-REx 細胞株を樹立し、調製した核抽出物 (nuclear extract, 以下 NE と記載する) を用いて免疫沈降を行った。Apo-複合体と、ATP-結合型複合体を区別して解析するために、ATP 非存在下と、ATP 存在下の二条件で解析を行った。UAP56 は、ATP 非存在下において THOC1 および THOC5 との相互作用が観察された (図 4 A)。加えて以前の報告と同様に [11]、ATP 存在下において UAP56 と ALYREF および CIP29 との相互作用が観察された。一方で UAP56 と異なり、URH49 は ATP 非存在下で CIP29 と相互作用し、ATP 添加により THOC1、THOC5、および ALYREF に結合した。同様に、FLAG-CIP29 の 293 Flp-In T-REx 安定細胞株、および 293 Flp-In T-REx 細胞から、それぞれ調製した NE と FLAG 抗体または CIP29 抗体を用いて免疫沈降を行った。前述の結果と一致して、CIP29 は ATP に依存せずに URH49 と相互作用した。その一方で、ATP 添加によって CIP29 は、UAP56 と THOC1、THOC5、および ALYREF と結合した (図 4 B、C)。これらの結果より、CIP29 と URH49 の相互作用には ATP を必要としない一方で、UAP56 と THOC1、THOC5、および ALYREF との相互作用に ATP を必要とすることが示唆された。つまり UAP56 と URH49 はそれぞれ ATP の有無によって、Apo-複合体と ATP-結合型複合体の2つの複合体様式をとること、加えて ATP の添加により Apo-複合体から ATP-結合型複合体への複合体リモデリングが生じることを見出した。

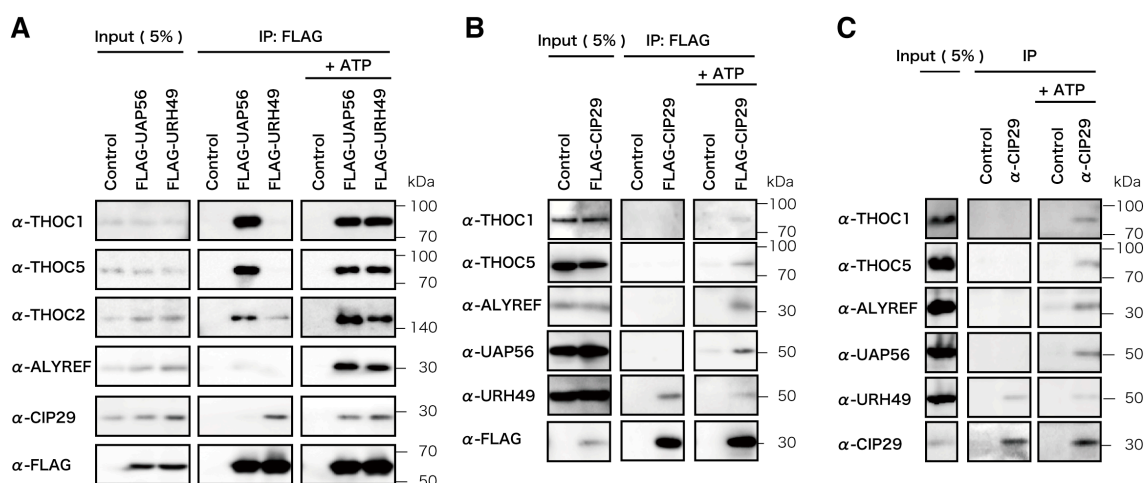


図 4 UAP56 と URH49 が形成する ATP 非存在下における Apo-複合体と ATP 存在下における ATP-結合型複合体

それぞれ抗 DYKDDDDK タグ抗体ビーズ、もしくは CIP29 抗体を用いて免疫沈降した。(A) FLAG-UAP56 または FLAG-URH49 の 293 Flp-In T-Rex 安定発現細胞株を用いた。それぞれの抗体を用いてイムノブロットに供した。(B) FLAG-CIP29 を発現する 293 Flp-In T-REx 安定発現細胞株を用いた。それぞれの抗体を用いてイムノブロットに供した。(C) CIP29 抗体と 293 Flp-In T-REx 細胞を用いて免疫沈降を行った。それぞれの抗体を用いてイムノブロットに供した。

1.2 UAP56 と URH49 への ATP 結合によって、独立した ATP-結合型複合体への複合体リモデリングが達成される

ATP 添加が、直接的に UAP56 と URH49 に影響することを確認するために、過去に報告された UAP56 の ATP 結合欠損変異体である UAP56 K95N [31]と、その相同部位を変異させた URH49 K94N を作成し、安定発現株を取得してそれぞれが形成する複合体を解析した。FLAG-UAP56 K95N と THOC1、THOC5 は相互作用する一方で、ATP 存在下において ALYREF および CIP29 との相互作用は観察されなかった (図 5 A)。加えて FLAG-URH49 K94N は CIP29 と相互作用したが、ATP 存在下において ALYREF、THOC1、THOC5 との相互作用は観察されなかった (図 5 B)。これらの結果は、UAP56 は THO 複合体を含む Apo-複合体を、URH49 は CIP29 を含む Apo-複合体を形成することを示しており、それぞれを Apo-TREX 複合体、ならびに Apo-AREX 複合体と定義した。Apo-AREX 複合体は以前に報告された AREX 複合体 [28]と同じであるが、ATP が結合していない状態であることを強調するために新しく定義した。さらに ATP 添加により、Apo-TREX / AREX 複合体の両方が、ALYREF、CIP29、THO 複合体を含む ATP-結合型複合体にリモデリングすることから、この複合体を ATP-TREX 複合体とし

て定義した。UAP56 と URH49 が形成する ATP-TREX 複合体は非常に相同であることから、両者が同一の ATP-TREX 複合体として存在する可能性を検証した。そのため、UAP56 および URH49 抗体を使用して、FLAG-UAP56 と FLAG-URH49 の免疫沈降物中に、内因性 UAP56 および URH49 が存在するかを検証した。結果、ATP 存在下において FLAG-UAP56 と内在性 URH49、FLAG-URH49 と内在性 UAP56 の相互作用はそれぞれ観察されなかった。このことから UAP56 と URH49 はそれぞれ独立して ATP-TREX 複合体を形成すると結論づけた (図 5 C、D)。

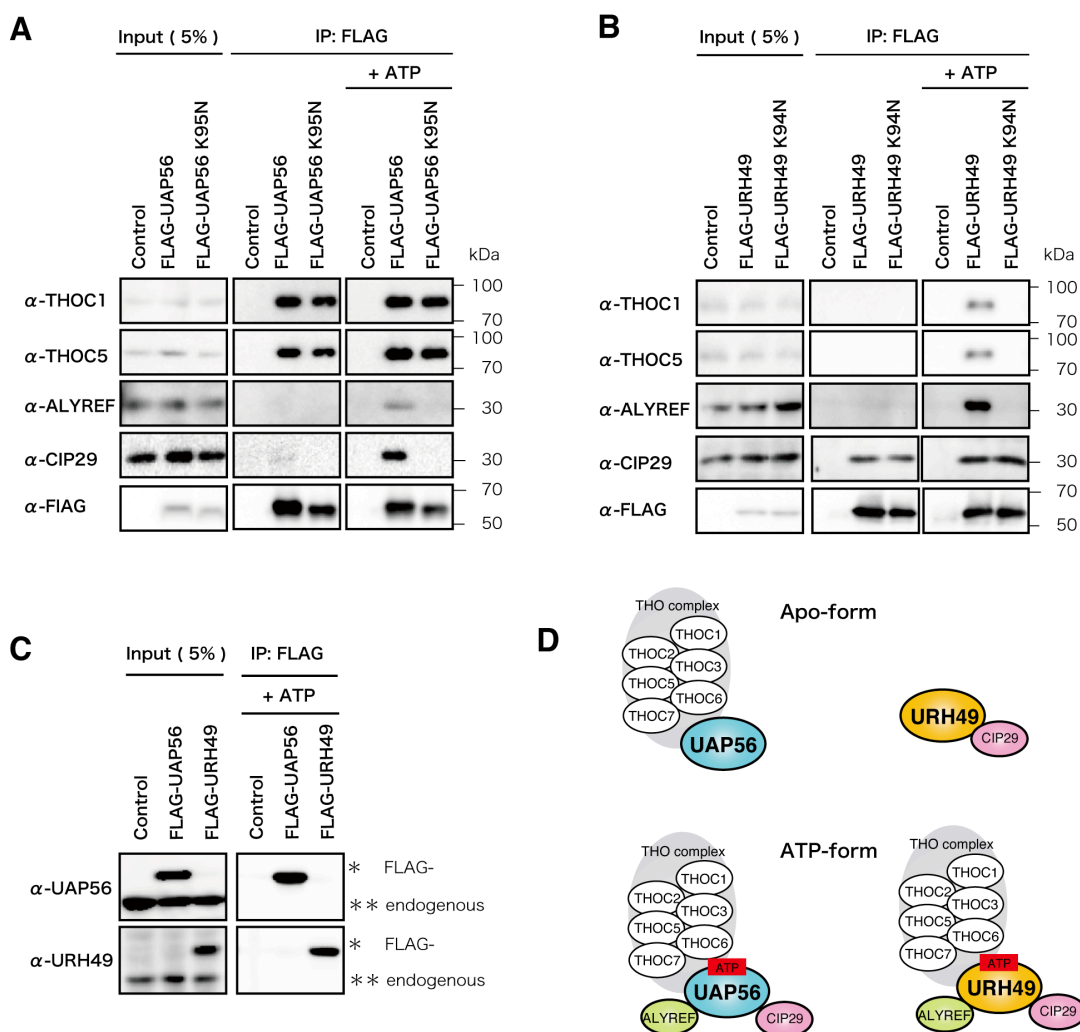


図 5 UAP56 と URH49 が ATP 非依存的に形成する Apo-TREX / AREX 複合体と、ATP 結合に伴って形成する ATP-TREX 複合体の複合体様式

それぞれ抗 DYKDDDDK タグ抗体ビーズを用いて免疫沈降した。(A) FLAG-UAP56 またはその変異体の 293 Flp-In T-REx 安定発現細胞株を用いた。それぞれの抗体を用いてイムノプロットに供した。(B) FLAG-URH49 またはその変異体の 293 Flp-In T-REx 安定発現細胞株を用いた。それぞれの抗体を用いてイムノプロットに供した。(C) FLAG-UAP56 または FLAG-URH49 の 293 Flp-In T-REx 安定発現細胞株を用いた。それぞれの抗体を用いてイムノプロットに供した。(D) Apo-TREX 複合体、Apo-AREX 複合体および ATP-TREX 複合体のモデル。

第2節 URH49ノックダウン特異的に生じる細胞質分裂異常の解析と細胞質分裂異常を指標としたApo-AREX複合体構成因子CIP29の機能解析

2.1 URH49 および Apo-AREX複合体因子 CIP29 のノックダウンによって細胞質分裂異常が生じる

Apo-AREX 複合体として URH49 が制御する mRNA 輸送経路に、CIP29 が寄与するか検証するため、URH49 のノックダウン特異的に生じる表現型の探索を行った。以前の研究より HeLa 細胞において、URH49 ノックダウン特異的に異常な染色体分離および低頻度 (5 %以下) な細胞質分裂異常が報告された [28]。この表現型を高頻度に観察できれば Apo-AREX 複合体としての機能検証の指標になると考え、表現型が顕著に観察される細胞株を探索した。この解析において UAP56 および URH49 のノックダウンに用いる siRNA は以前の研究で報告されているものを用いた [28]。細胞質分裂は I : 染色体分離を伴う切断部位の決定、II : Cleavage furrow (収縮環) の形成、III : 収縮環の収縮による Midbody (分裂溝) の形成、IV : 分裂溝の分断による娘細胞の分離の 4 段階から構成される (図 6) [32]。これらのプロセスに異常が生じると典型的な表現型として細胞の多核化が生じる [33][34]。そこで核膜の構成要素の 1 つである Lamin B と、DAPI による核の染色を行うことで、多核化細胞が生じるかを検証した。その結果、MCF7 細胞において URH49 ノックダウンにより、顕著に細胞質分裂異常が生じることを見出した (図 7 C)。UAP56 及び URH49 はノックダウンによって、共に発現が強く抑制されていることをイムノブロットにて確認した。加えて RNA-fluorescence *in situ* hybridization (以下、RNA-FISH と記載する) により、各因子のノックダウンにより mRNA 輸送阻害に起因する poly (A) +RNA の核内蓄積を観察した (図 7AB)。これらの結果より細胞内で両因子を効率的にノックダウンできていると判断した。URH49 に対して UAP56 ノックダウンにおいては、細胞質分裂異常は観察されなかった (図 7 C)。次いで CIP29 の siRNA を用いることで、MCF7 細胞で特異的なタンパク質発現量の減少、および mRNA 輸送異常が生じることを観察した (図 7AB)。この条件において CIP29 ノックダウン細胞においても多核化細胞が観察された (図 7 C)。この表現型が URH49 ノックダウン特異的であることを示すために 2 つの実験を行った。まず URH49 もしくは UAP56 の過剰発現により、URH49 ノックダウンに基づく細胞質分裂異常が相補されるか検証した。FLAG-URH49 を同因子ノックダウン条件化においても発現させるために、siRNA 標的配列にサイレント変異を導入したプラスミドを構築し、コントロール条件下および URH49 ノックダウン条件下で FLAG-UAP56 および URH49 が発現することを確認した (図 7D)。この条件下において FLAG-UAP56 の発

現では URH49 ノックダウンを相補できない一方、FLAG-URH49 発現によって、細胞質分裂異常の相補が観察された (図 7EF)。続いて異なる配列からなる UAP56、URH49 ならびに CIP29 の siRNA を用いた解析を行った。それぞれの siRNA (#2) により、前述の siRNA を用いた場合と同様のタンパク質発現量の減少を観察した (図 8A)。加えて URH49 と CIP29 のノックダウンによって細胞質分裂異常が生じることを観察した (図 8B)。これらのことから URH49 のノックダウン特異的に細胞質分裂異常が生じ、CIP29 のノックダウンにおいても同様の表現型が観察されることが示唆された。

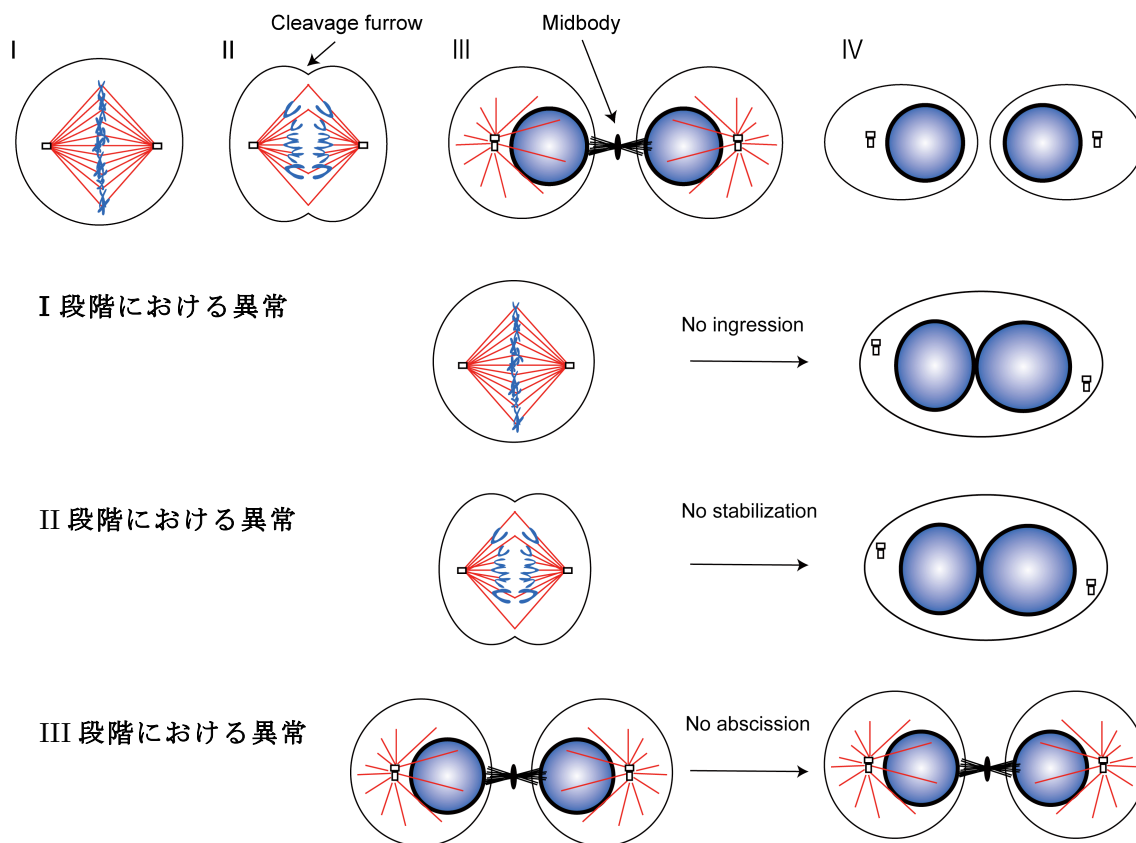


図 6 多段階から構成される細胞質分裂過程の概略図

図は引用文献 [32] を参考として作成した。(上段) 細胞質分裂過程は以下の 4 段階から構成される。I : 染色体分離を伴う切断部位の決定、II : Cleavage furrow (収縮環) の形成、III : 収縮環の収縮による Midbody (分裂溝) の形成、IV : 分裂溝の分断による娘細胞の分離。(下段) 各段階の異常に伴い細胞の多核化が生じる。

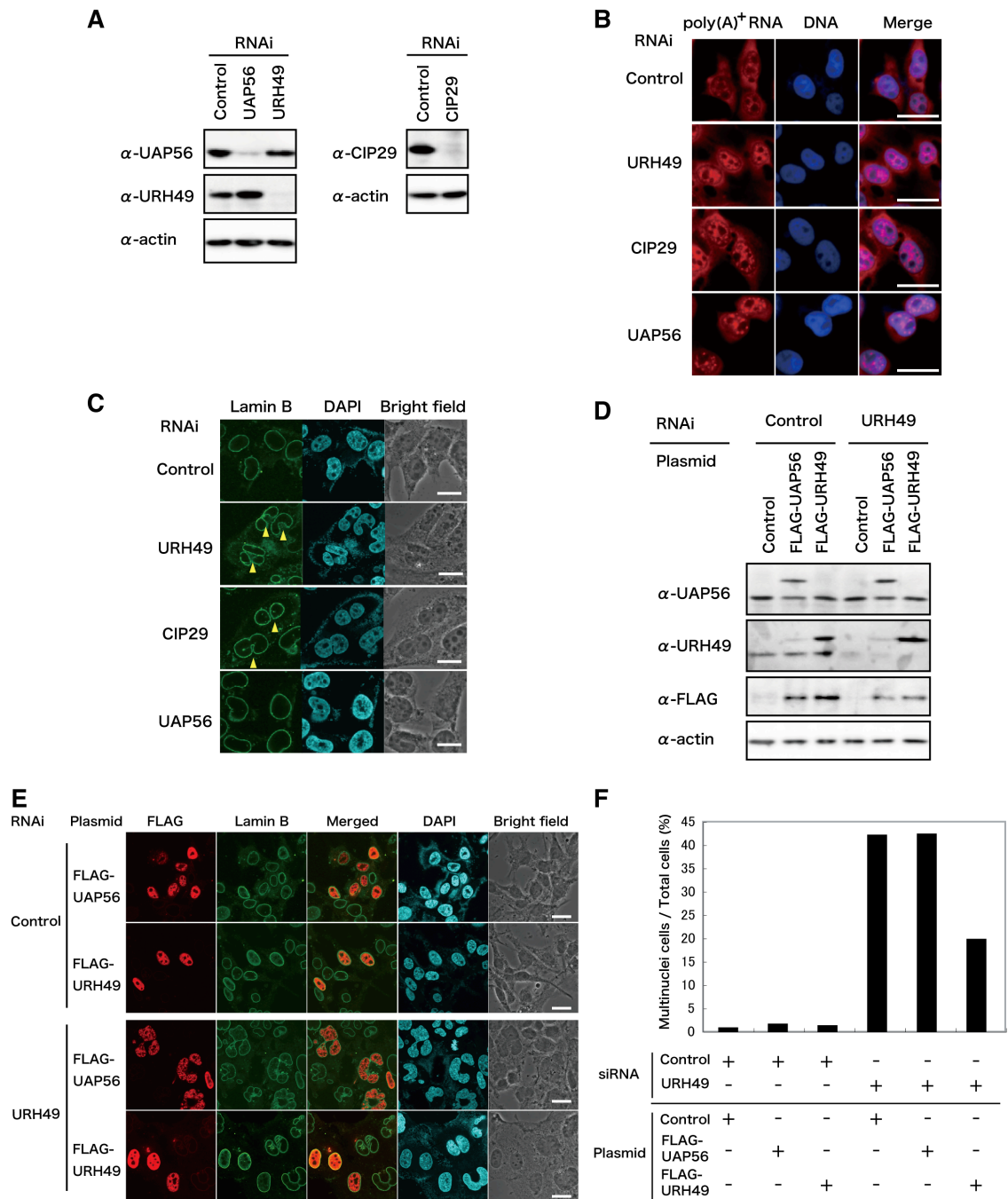


図7 URH49ならびに Apo-AREX 複合体構成因子 CIP29 のノックダウンにより多核化細胞が生じる

(A) それぞれの因子に対する siRNA を用いてノックダウンし、効率的に各因子の発現量が減少していることを、各抗体による免疫プロットにより確認した。(B) 各因子をノックダウンした際の poly (A) + RNA の局在を RNA-FISH 法により検出した。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー=20 μ m。(C) 各因子をノックダウンした際の細胞の様子を核膜構成因子 LaminB の免疫染色により観察した。アローヘッドは細胞質分裂の異常が生じている細胞を示す。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー=10 μ m。(D) それぞれの因子に対する siRNA を用い

てノックダウン、およびプラスミドを用いた発現をイムノブロットにより確認した。(E) それぞれの因子に対する siRNA を用いてノックダウン、およびプラスミドを用いて発現させた際の細胞質分裂を LaminB、および FLAG の免疫染色により観察した。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー20 μm 。(F) 多核化細胞が生じた割合を算出した。

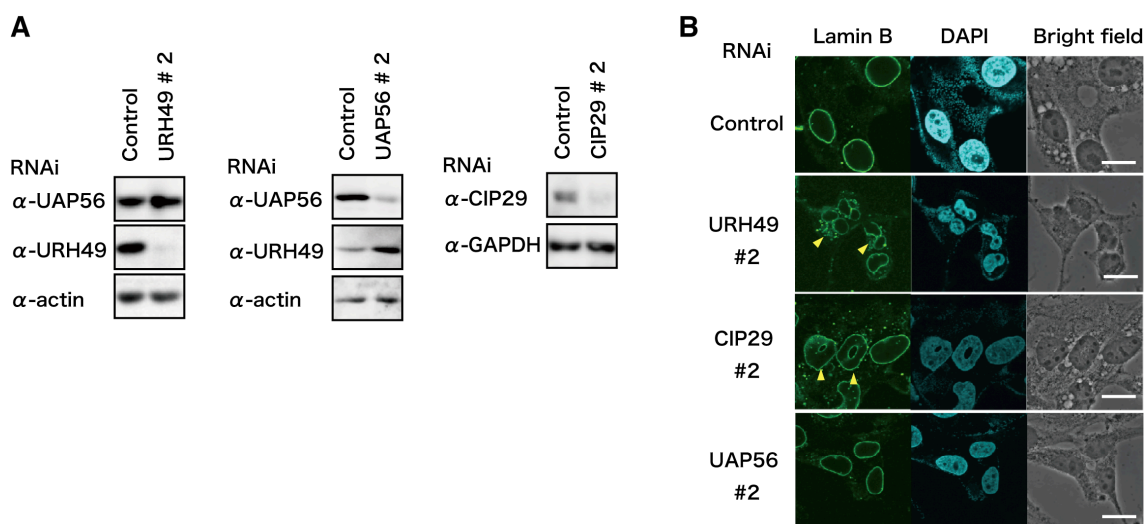


図 8 異なる配列の siRNA を用いた URH49 と CIP29 のノックダウンにおいても多核化細胞が観察される

(A) それぞれの因子に対する siRNA を用いてノックダウンを行い、効率的に各因子の発現量が減少していることをイムノブロットにより確認した。(B) 各因子をノックダウンした際の細胞の様子を核膜構成因子 LaminB の免疫染色により観察した。アローヘッドは細胞質分裂の異常が生じている細胞を示す。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー10 μm 。

URH49 と CIP29 のノックダウンにより生じる細胞質分裂異常を詳細に解析するために生細胞イメージング解析による観察を行った。細胞分裂における細胞核動態を観察するために、ヒストンの構成要素である H2B に GFP を付加した発現ベクターを用いて、MCF7 GFP-H2B 安定発現株を作成し、解析に用いた。コントロールとして EGFP を標的とした siRNA により処理した細胞では、核膜の崩壊から有糸分裂後期への移行が 30~60 分以内に完了する一方で、URH49 および CIP29 ノックダウン細胞では染色体整列の遅延と、ステージⅢからステージⅣの移行が完了せず、細胞質分裂に異常が生じる様子が観察された (図 9A)。異なる siRNA によるノックダウンにおいても同様の結果が観察された (図 10A)。細胞質分裂異常を生じた細胞の割合を算出すると、用いる siRNA によって程度の差はあるものの、CIP29 ノックダウン細胞に比べ、URH49 ノックダウン細胞でより顕著に生じることが示された (図 9B、10B)。UAP56 ノックダウン細胞においては、以前に報告された染色体の整列と M 期進行の遅延が観察された一方で [28]、細胞質分裂の失敗は観察されなかった。同様の観察結果はヒト肺腺ガン由来 H1299 細胞、ヒト大腸ガン由来 HCT116 WT および HCT116 p53^{-/-}細胞においても得られた (図 11)。また、CFP-H2B と YFP-tubulin を共発現する MCF7 安定発現細胞株においても同様に URH49 ノックダウンによってステージⅢの Midbody の形成が観察される一方で、娘細胞の分離が生じない様子が観察された (図 12)。これらの結果から、URH49 ノックダウンにより、様々な細胞で共通して細胞質分裂ステージⅢからⅣへの移行の異常に起因する細胞質分裂の失敗と、多核化細胞の形成が生じることが示唆された。

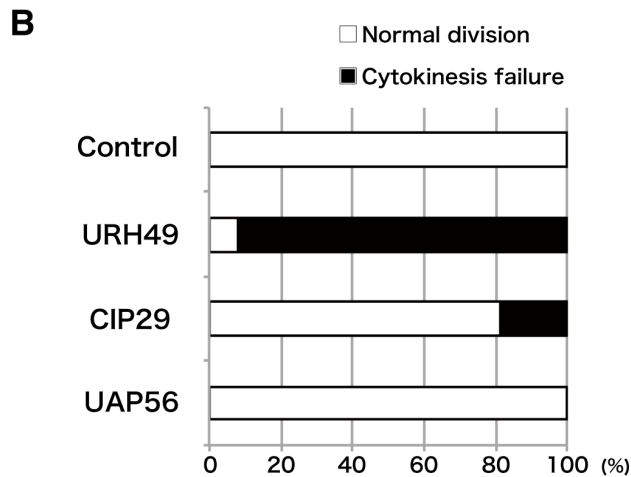
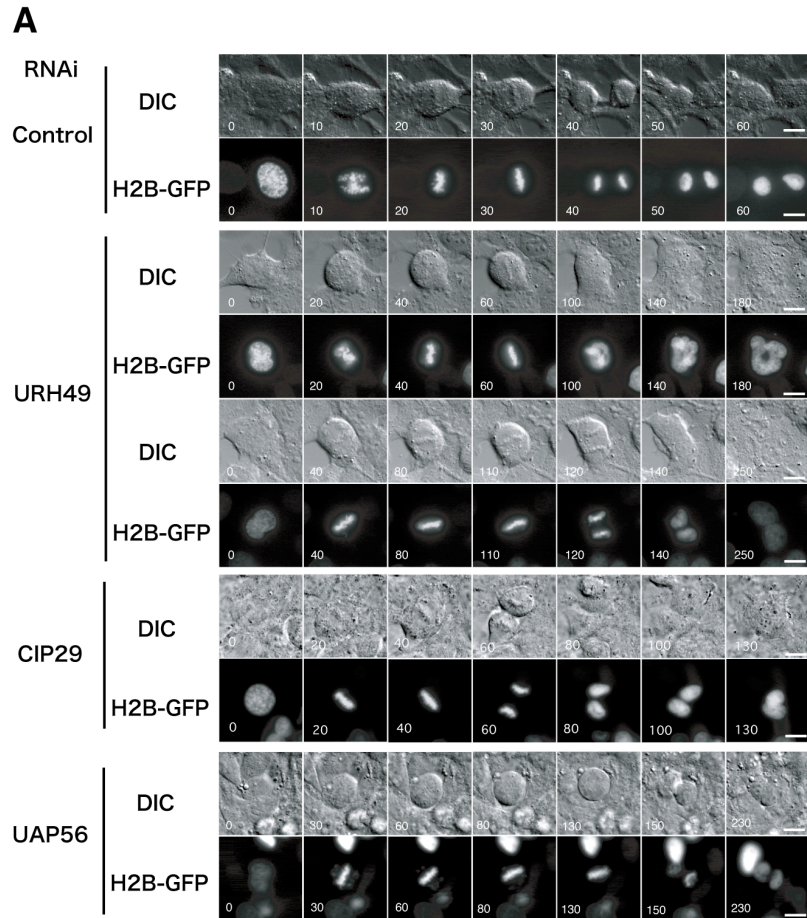


図 9 URH49 と CIP29 ノックダウンにより生じる細胞質分裂異常の生細胞観察

(A) GFP-H2B を発現する MCF7 細胞を用いて、それぞれの因子に対する siRNA を用いてノックダウンし、生細胞観察を行うことで細胞質分裂異常の様子を観察した。左下の数字は核膜崩壊から経過した時間(分)を示す。DIC: Defferential interference contrast. スケールバー10 μm 。(B) 生細胞観察の結果、細胞質分裂異常が観察された頻度を算出した。コントロール、URH49、CIP29、UAP56 ノックダウンのそれぞれで、53、57、96、76 の細胞をカウントし、細胞質分裂異常が生じた割合を算出した。

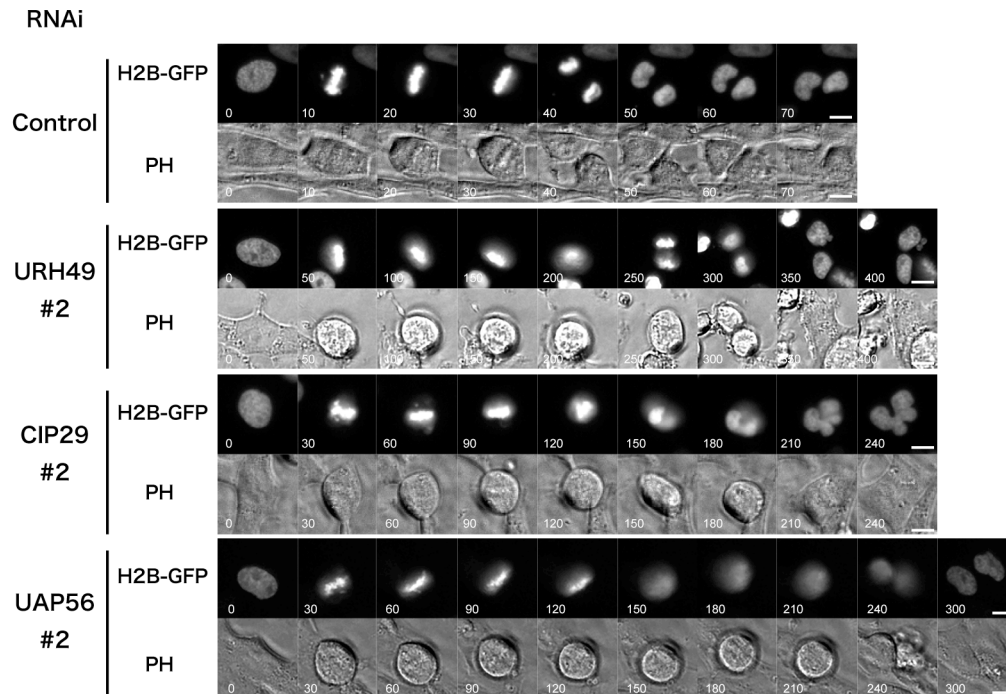
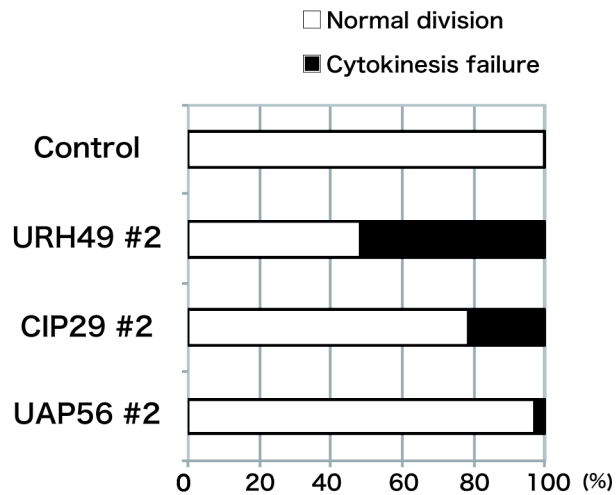
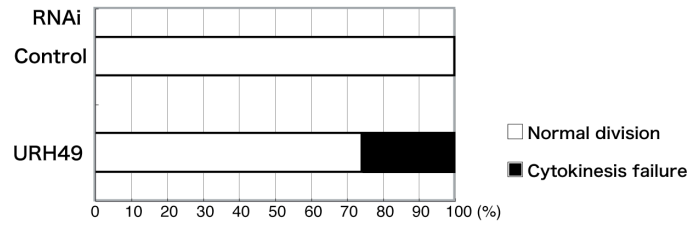
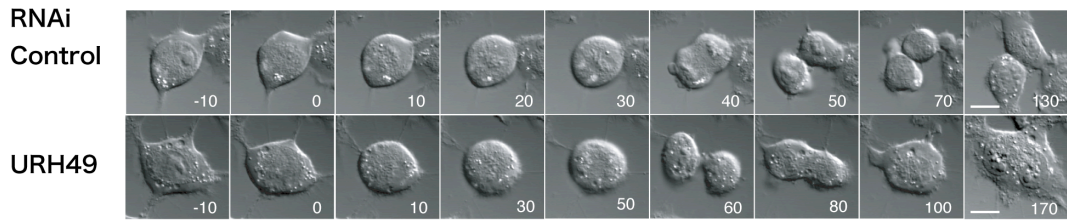
A**B**

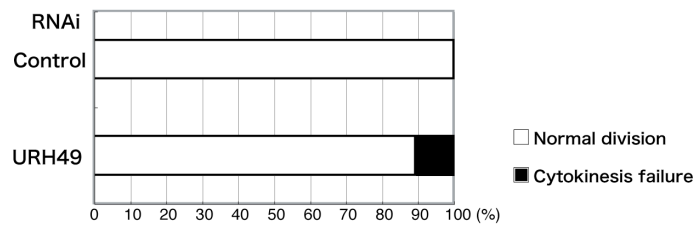
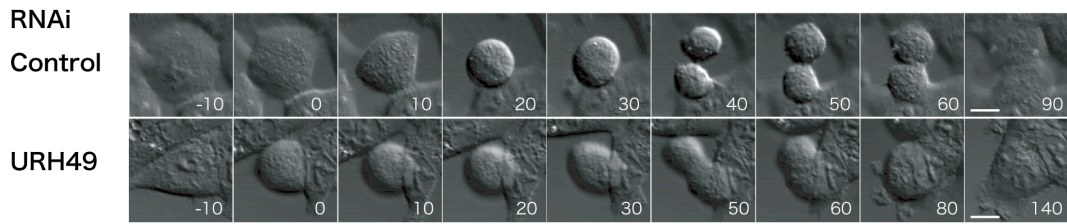
図 10 配列の異なる siRNA を用いた URH49 と CIP29 ノックダウンによって生じる細胞質分裂異常の生細胞観察

(A) 異なる siRNA を用いてノックダウンし、生細胞観察を行った。左下の数字は核膜崩壊から経過した時間 (分) を示す。PH: phase contrast. スケールバー10 μm 。(B) 生細胞観察の結果、細胞質分裂異常が観察された頻度を算出した。コントロール、URH49 #2、CIP29 #2、UAP56 #2 ノックダウンのそれぞれで、30、32、32、80 の細胞をカウントし、細胞質分裂異常が生じた割合を算出した。

H1299 lung cancer cell line (p53 null)



HCT116 WT



HCT116 p53^{-/-}

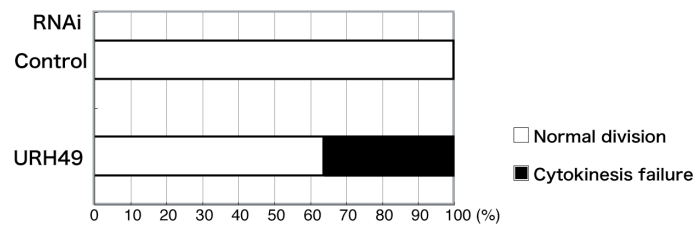
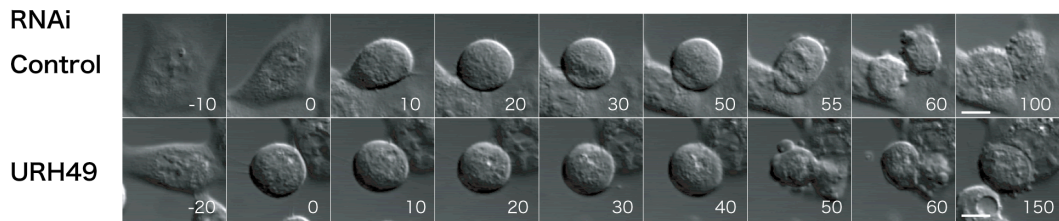


図 11 他細胞株における URH49 ノックダウン下の生細胞観察

H1299 細胞、HCT116 WT および HCT116 p53^{-/-}細胞において URH49 ノックダウン下における生細胞観察を行った。左下の数字は核膜崩壊から経過した時間(分)を示す。DIC: Defferential interference contrast. スケールバー10 μm。生細胞観察の結果、細胞質分裂異常が観察された頻度を算出した。各細胞間でコントロール、URH49 ノックダウンそれぞれでカウントした数は以下の通りである。H1299 細胞: 88、68、HCT116 WT 細胞: 95、85、HCT116 p53^{-/-}細胞: 52、37。これらの細胞において細胞質分裂異常が生じた割合を算出した

RNAi: URH49

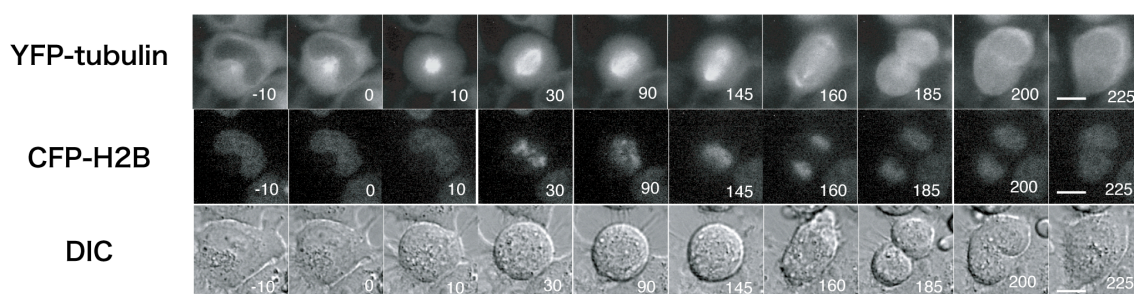


図 12 URH49 ノックダウンにより Midbody 形成が完了せず細胞質分裂異常が生じる

YFP-tubulin および CFP-H2B を共発現する MCF7 細胞を用いて、URH49 ノックダウン下における生細胞観察を行った。左下の数字は核膜崩壊から経過した時間(分)を示す。DIC: Defferential interference contrast. スケールバー10 μm。

2.2 URH49およびApo-AREX複合体因子CIP29のノックダウンによって、**chromosomal passenger**複合体および細胞質分裂制御因子PRC1のmRNA輸送異常が生じる

続いて、URH49 標的遺伝子の発現が細胞質分裂に関連しているかを検証するために、URH49 および CIP29 ノックダウン細胞において、細胞質画分 RNA を調製した。細胞質に局在する tRNA、SNORD104 遺伝子のイントロンから合成され核に局在する snoRNA に属する SHG104、スプライシングが完了したものと未完了の両方の E2F8 を標的とするプライマーを用いた RT-PCR によって分画 RNA を評価した [35][36]。その結果、tRNA は細胞質分画、SHG104 およびスプライス未完了の E2F8 由来の増幅産物は核画分でのみ検出されており、十分に分画できていると判断した (図 13)。

BIRC5 と AURKB は、**chromosomal passenger** 複合体と呼ばれるを形成し、染色体の整列、紡錘体の形成、細胞質分裂、および細胞分裂の進行に関与する因子である [32][37]。PRC1 は細胞質分裂の重要な調節因子であり、Midbody 形成に寄与する [32]。これらの遺伝子は URH49 の標的遺伝子として報告されていることから [28]、これらの遺伝子において qRT-PCR により URH49 および CIP29 をノックダウンした際の影響を検証した。その結果、BIRC5、AURKB、および PRC1 mRNA の発現レベルは、URH49 および CIP29 ノックダウン MCF7 細胞で減少した (図 14A)。一方で UAP56 標的 mRNA として報告されていた BRCA1 の発現量は UAP56 ノックダウン細胞でのみ減少した。同様の結果は HeLa 細胞においても観察された (図 15A-C)。これらの結果と一致して BIRC5、AURKB、および PRC1 のタンパク質発現量は、URH49 および CIP29 ノックダウン細胞で減少することを観察した (図 14B)。BIRC5 および AURKB は細胞周期の進行に伴って発現することが報告されている [34][38][39]。同様に PRC1 の発現レベルは G2/M 期で最大化することが報告されている [40]。URH49 が細胞周期を制御する可能性を考え、有糸分裂による細胞周期の進行に不可欠な因子である CCNB1 (サイクリン B1 とも呼ばれる) の発現量をイムノブロットで検証したが、CCNB1 発現量の変化は UAP56 および URH49 のノックダウンによって観察されなかった (図 14B)。したがって URH49 は、細胞周期を制御せず、直接的に PRC1、BIRC5、AURKB などの遺伝子発現に影響すると考えられる。以上の結果より、URH49 および CIP29 のノックダウンによって、共通して細胞質分裂の必須因子である BIRC5、PRC1、および AURKB の mRNA プロセッシング-輸送の異常を介して、細胞質分裂異常が生じることを見出した。

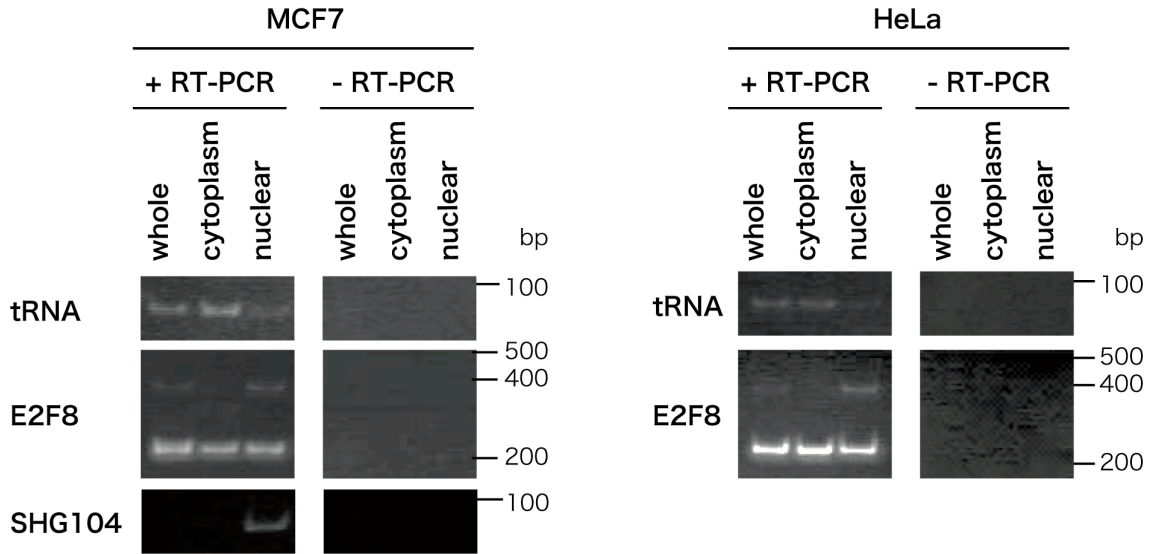


図 13 細胞全体、細胞質、核分画 RNA の検証

MCF7 および HeLa 細胞において、細胞全体、細胞質、核分画 RNA を調製し、RT-PCR を行うことで分画の程度を検証した。細胞質マーカー遺伝子として tRNA、核質マーカー遺伝子として SHG104 を用いた。加えて E2F8 はイントロンが含まれるものは核に、細胞質にはスプライシングが完了しイントロンが除かれたものが豊富に検出される。

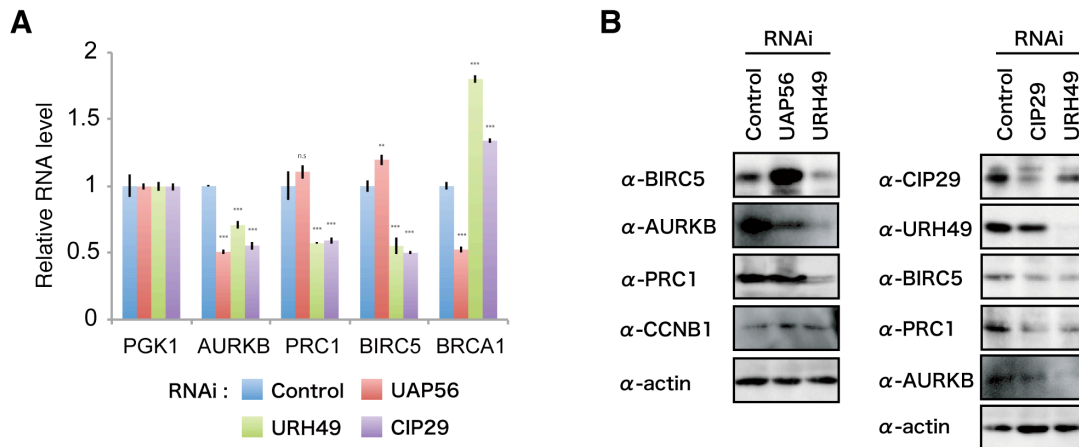


図 14 URH49 と CIP29 ノックダウンによって chromosomal passenger 複合体および細胞質分裂制御因子 PRC1 の発現量が減少する

(A) MCF7 細胞を用いて UAP56、URH49 及び CIP29 をノックダウンし、細胞質分画 RNA を用いて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、one-way ANOVA 及び Dunnett's test を用いた。n.s.: not significant, * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。(B) (A) で検出した各遺伝子についてイムノブロットによって各タンパク質量を検証した。

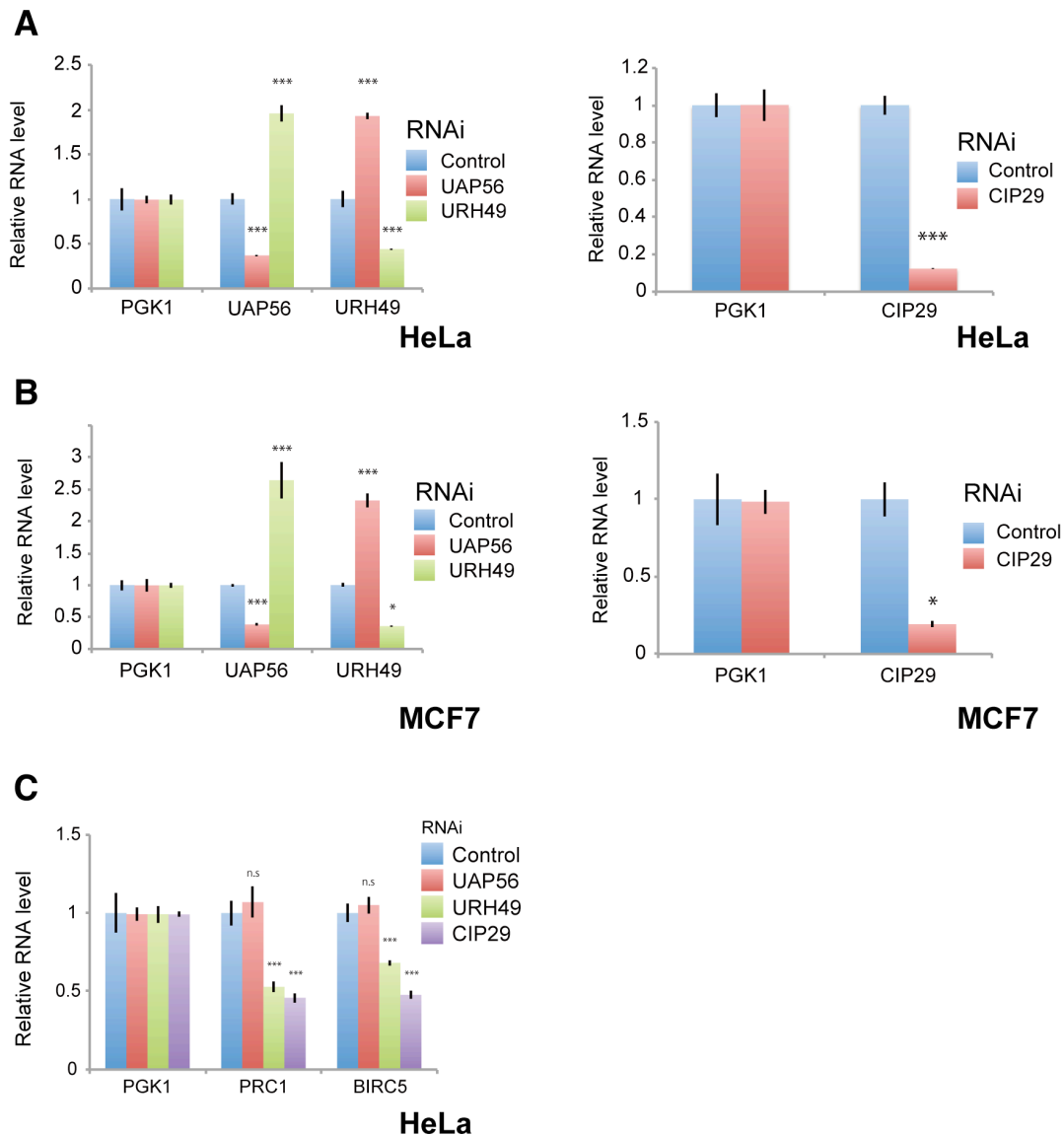


図 15 HeLa 細胞株における URH49 及び CIP29 ノックダウン下の遺伝子発現量の検証

(A) HeLa 細胞を用いて UAP56、URH49 及び CIP29 をノックダウンし、細胞質分画 RNA を用いて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、one-way ANOVA 及び Dunnett's test、もしくは Student's t-test を用いた。n.s.: not significant。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。(B) MCF7 細胞を用いて UAP56、URH49 及び CIP29 をノックダウンし、細胞質分画 RNA を用いて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、one-way ANOVA 及び Dunnett's test、もしくは Student's t-test を用いた。n.s.: not significant。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。(C) HeLa 細胞を用いて各ノックダウンによって細胞質分裂関連遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、one-way ANOVA 及び Dunnett's test を用いた。n.s.: not significant。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

第3節 UAP56ならびにURH49が制御するmRNA輸送経路は、ATP結合による複合体リモデリングを介して、NXF1に統合される

3.1 URH49 による mRNA 輸送経路における ATP-TREX 複合体形成の重要性

ATP 結合欠損 UAP56 変異体の強制発現によって、ヒト培養細胞において β globin-reporter 遺伝子由来の mRNA 輸送阻害、およびアフリカツメガエル卵母細胞において *in vitro* で合成した mRNA の核外輸送阻害がそれぞれ報告されている [23][41]。これらの結果は NXF1 を介した UAP56 の mRNA 輸送経路において、ATP 結合に伴った ATP-TREX 複合体の形成が重要であることを意味する。URH49 が制御する mRNA 輸送経路においても ATP-TREX 複合体の形成が重要であるか検証するために、MCF7 細胞において、ATP 結合欠損変異体 FLAG-UAP56 K95N および FLAG-URH49 K94N を発現させ、mRNA 動態を観察した (図 16A)。ベクターのみを導入したコントロール細胞および FLAG-UAP56、または FLAG-URH49 発現細胞においては、mRNA は主に細胞質に局在していた。一方で ATP 結合欠損 FLAG-UAP56 K95N および FLAG-URH K94N 発現細胞において、それぞれの因子をノックダウンした時と同様に (図 7B)、mRNA の核内蓄積が観察された。同様の表現型は HeLa 細胞においても観察された (図 16D)。イムノブロットによる各 FLAG 融合タンパク質の発現量の検証から、各 ATP 結合欠損は野生型タンパク質より発現量が低いことが観察された (図 16C)。この結果から、ATP 結合欠損変異体の発現により生じた mRNA 輸送異常は、各タンパク質の機能不全に起因することが示唆された。続いて URH49 への ATP 結合が、URH49 が制御する mRNA 輸送経路に重要であることを検証するために、ATP 結合欠損変異体の発現により、細胞質分裂異常が誘導されるか検証した。その結果、FLAG-URH49、FLAG-UAP56 および FLAG-UAP56 K95N の発現では特に影響が見られなかった一方で、FLAG-URH49 K94N 発現によって細胞分裂異常が観察された (図 17)。

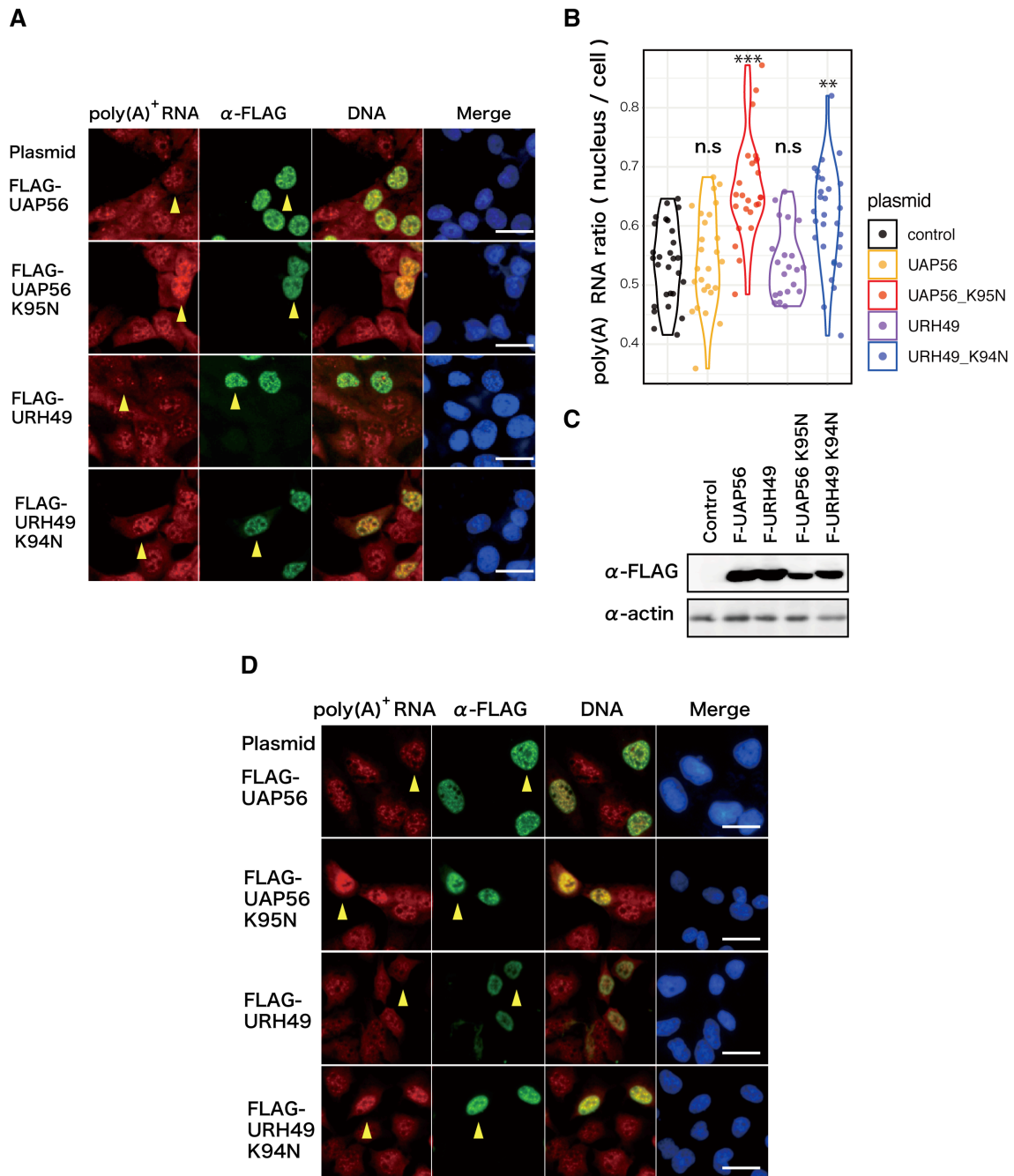


図 16 UAP56 及び URH49 の ATP 結合欠損変異体の発現により mRNA 輸送異常が生じる

(A) MCF7 細胞において FLAG-UAP56、-UAP56 K95N、-URH49 及び-URH49 K94N を各プラスミドにて発現させた際の poly (A)⁺ RNA の局在を RNA-FISH 法により検出した。各因子の発現は FLAG の免疫染色により観察した。アローヘッドは発現が観察された細胞を示す。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー 20 μ m。(B) 各因子の発現が観察された細胞において、ImageJ を用いて poly (A)⁺ RNA の細胞全体および核におけるシグナル強度を定量化し、核局在の比率を算出した。コントロール、FLAG-UAP56、-UAP56 K95N、-URH49 及び-URH49 K94N

発現細胞のそれぞれで 28、26、25、21 および 29 で細胞数をカウントした。統計検定方法として、one-way ANOVA 及び Dunnett's test を用いた。n.s.: not significant, ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$. (C) 各因子の発現の効率を免疫ブロットにより確認した。(D) HeLa 細胞において FLAG-UAP56、-UAP56 K95N、-URH49 及び-URH49 K94N を各プラスミドにて発現させた際の poly (A)+ RNA の局在を RNA-FISH 法により検出した。各因子の発現は FLAG の免疫染色により観察した。アローヘッドは発現が観察された細胞を示す。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー 20 μm 。

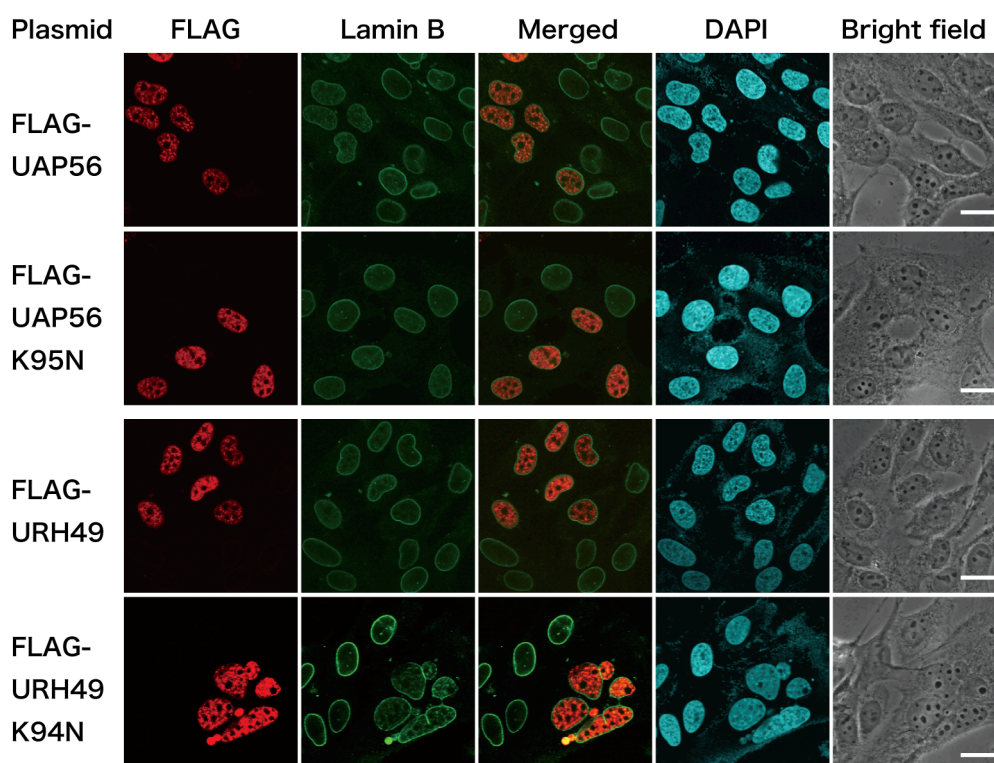


図 17 URH49 の ATP 結合欠損変異体の発現により細胞質分裂異常が生じる

MCF7 細胞において FLAG-UAP56、-UAP56 K95N、-URH49 及び-URH49 K94N を各プラスミドにて発現させた際の細胞質分裂を LaminB、および FLAG の免疫染色により観察した。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー 20 μm 。

3.2 URH49 による mRNA 輸送経路は NXF1 に統合される

UAP56 と同様に URH49 の mRNA 輸送経路においても ATP-TREX 複合体の形成が重要であることから、NXF1 が URH49 の mRNA 輸送経路に寄与しているかを調べるため、NXF1 ノックダウンを行い、UAP56 と URH49 の輸送標的 mRNA の細胞質発現量を検証した (図 18A-E)。MCF 細胞と HeLa 細胞の両細胞において、免疫ブロッキングおよび RNA-FISH によって、NXF1 が効率的にノックダウンできていることを確認した (図 18A、B、D)。この条件下において UAP56 および URH49 の標的 mRNA である BRCA1、CLSPN、BIRC5、および PRC1 の発現量が減少することを qRT-PCR で観察した。この結果は MCF7 と HeLa 細胞の両方で観察された (図 18C、E)。URH49 が制御する mRNA 輸送経路において、NXF1 および ATP 依存的な ATP-TREX 複合体へのリモデリングの寄与が一般的であるか検証するために、NXF1 と、ATP-TREX 複合体構成因子である ALYREF の iCLIP (individual-nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation) の次世代シーケンス解析データ [22] を用いて、ゲノムワイドな UAP56 および URH49 標的 mRNA 群への結合を評価した (図 18F)。iCLIP とは標的因子の結合 RNA 群を高度に精製する近年の解析手法である。UAP56 と URH49 をノックダウンした細胞のマイクロアレイ解析結果より、細胞質側で発現量が 1.5 倍以上減少したものを、UAP56 および URH49 の輸送標的遺伝子群として定義した。また UAP56 と URH49 の両方で減少する遺伝子群と、各因子のノックダウンによっても発現量が変動しなかった遺伝子群についてもそれぞれ定義した。いずれの遺伝子群においても、NXF1 と ALYREF の結合強度には統計的な差がないことが示された。これらの結果から、UAP56 ならびに URH49 が制御する mRNA 輸送経路は、ATP 結合による複合体リモデリングを介して、NXF1 に統合されることが明らかになった。

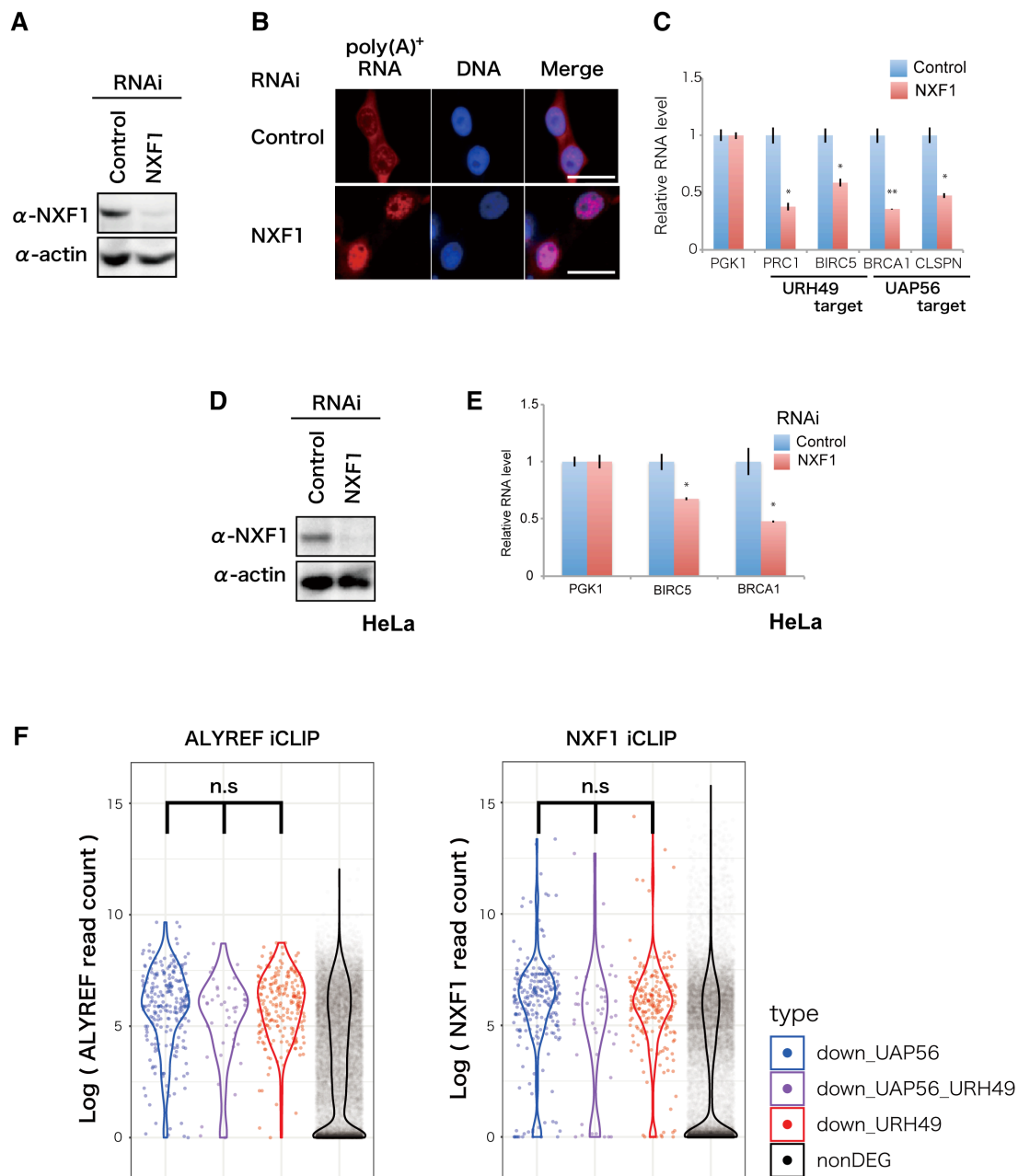


図 18 NXF1 は UAP56 及び URH49 の両 mRNA 輸送経路に関わる

(A) MCF7 細胞において NXF1 に対する siRNA を用いてノックダウンし、効率的に発現量が減少していることを免疫ブロットにより確認した。(B) MCF7 細胞において NXF1 をノックダウンした際の poly (A)+ RNA の局在を RNA-FISH 法により検出した。DNA は DAPI を用いて染色した。スケールバー=20 μ m。(C) MCF7 細胞において NXF1 をノックダウンし、細胞質分画 RNA を用いて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、Student's t-test を用いた。n.s.: not significant。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。(D) HeLa 細胞において NXF1 に対する siRNA を用いてノックダウンし、効率的に発現量が減少していることを免疫ブロットにより確認した。(E) HeLa 細胞において NXF1 をノックダウンし、細胞質分画 RNA を用いて各遺伝子の発現量を qRT-PCR 法により定

量した。PGK1 はノーマライズのために用いた。統計検定方法として、Student's t-test を用いた。n.s.: not significant。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。(F) UAP56 と URH49 のノックダウン細胞におけるアレイ解析 [28] から 1.5 倍以上発現量が減少した遺伝子群をそれぞれ UAP56、URH49 標的遺伝子群 (down_UAP56、down_URH49) とした。また UAP56 と URH49 ノックダウンの両方で発現量が減少した遺伝子群と、各ノックダウンで発現量が 1.5 倍以上変化しない遺伝子群をそれぞれ down_UAP56_URH49、nonDEG として区別した。それぞれに対する ALYREF および NXF1 iCLIP の結合強度は、Htseq-count および DESeq2 ソフトウェアによって算出し、バイオリンプロットで示した。統計検定方法として、各群に対する Student's t-test 及び Bonferroni corrections for multiple testing を用いた。n.s.: not significant。

3.3 UAP56 と URH49 は RNA 長非依存的に異なる mRNA 群を認識する

UAP56 と URH49 は mRNA だけでなく、circRNA の核外輸送に関与することが近年報告された [42]。circRNA の核外輸送において、UAP56 は比較的長い circRNA 群の輸送に、URH49 は比較的短い circRNA 群の輸送に関わることが明らかになっている。したがって UAP56 および URH49 による選択的 mRNA 輸送が mRNA および pre-mRNA の長さによって制御される可能性を検証した。上述のマイクロアレイ解析結果から定義した UAP56 と URH49 の標的遺伝子群について、ゲノムにコードされている長さを pre-mRNA として、エクソンの部分のみを繋ぎ合わせたものを mRNA として区別して解析を行った。また各遺伝子から発現する mRNA isoform は遺伝子ごとに異なり、組織や培養細胞によっても発現するものが変化するため、取り扱うのが困難である。そこで最も短い isoform と、最も長い isoform のそれぞれについて評価した。その結果、UAP56 および URH49 の標的遺伝子において、いずれの isoform でも pre-mRNA および mRNA 長の統計的な違いは観察されなかった (図 19)。このことから UAP56 と URH49 による選択的 mRNA 輸送制御において、RNA の長さは重要でないことが示唆された。以上の研究結果から UAP56 および URH49 が形成する Apo / ATP 複合体を介した選択的 mRNA 輸送の作業モデルを提案した (図 20)。ヒトでは UAP56 は THO 複合体と Apo-TREX 複合体を形成し、URH49 は CIP29 と Apo-AREX 複合体を形成する。この段階における異なる複合体形成様式は両者による mRNA 輸送の選択性に重要であることが示唆される。続いて UAP56 と URH49 に対して ATP が結合することにより、それぞれの Apo 複合体は独立して ATP-TREX 複合体へリモデリングする。最終的に各 ATP-TREX 複合体から NXF1 へ mRNA が受け渡されることで、UAP56 と URH49 が制御する mRNA 輸送経路は統合され mRNA 核外輸送が達成される。

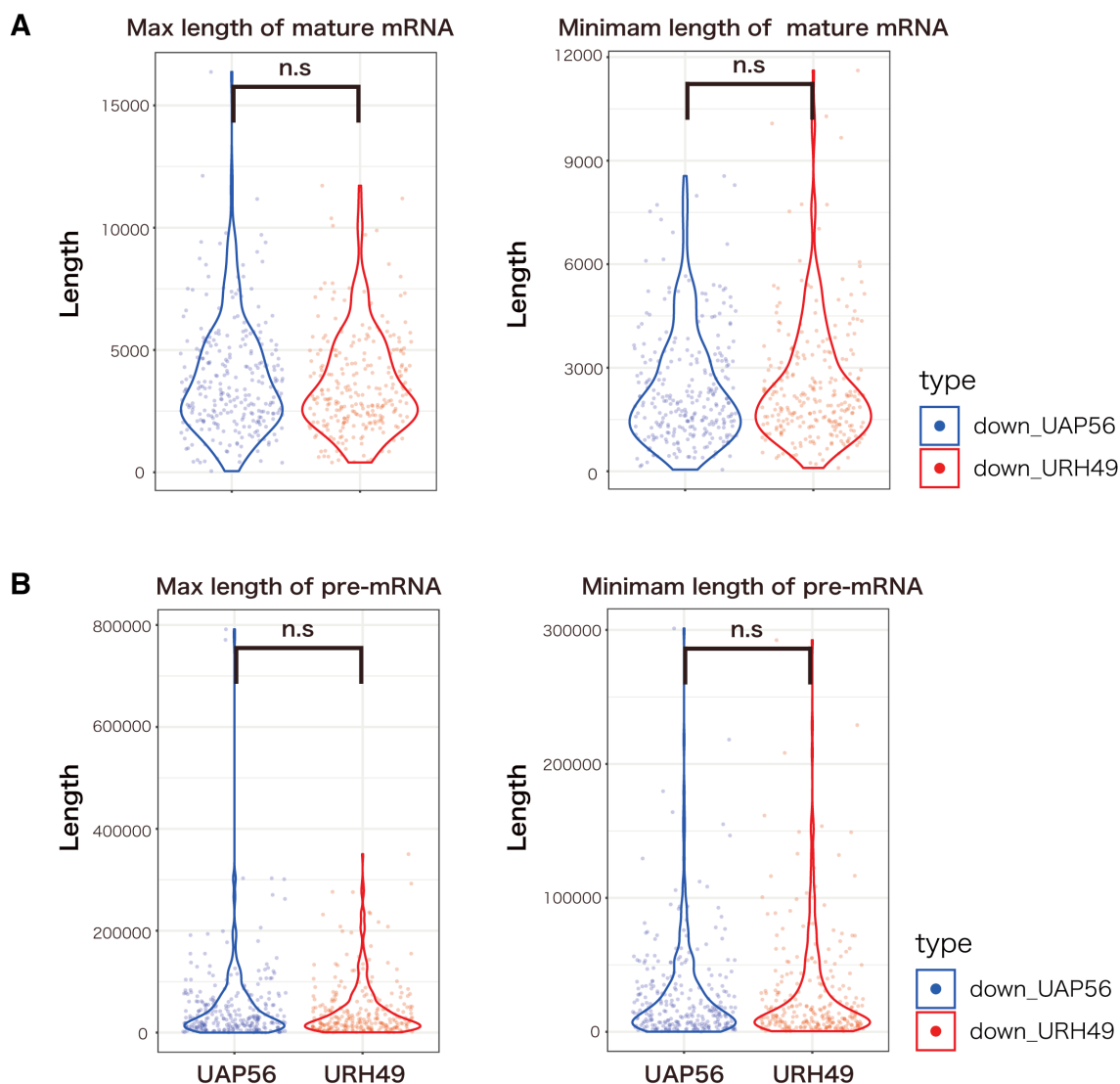


図 19 UAP56 及び URH49 の mRNA 輸送経路選択性における RNA 長の関与

(A) 上述の解析で使用した UAP56、URH49 標的遺伝子群 (down_UAP56、down_URH49) よりイントロンを除いた成熟 mRNA の長さを算出し、バイオリンプロットで示した。左は各遺伝子から最も長い isoform における RNA 長、右は最も短い isoform における RNA 長から算出した。統計検定方法として、Wilcoxon-Mann-Whitney test を用いた。 n.s.: not significant。

(B) UAP56、URH49 標的遺伝子群 (down_UAP56、down_URH49) よりイントロンを含んだ pre-mRNA の長さを算出し、バイオリンプロットで示した。左は各遺伝子から最も長い isoform における RNA 長、右は最も短い isoform における RNA 長から算出した。統計検定方法として、Wilcoxon-Mann-Whitney test を用いた。 n.s.: not significant。

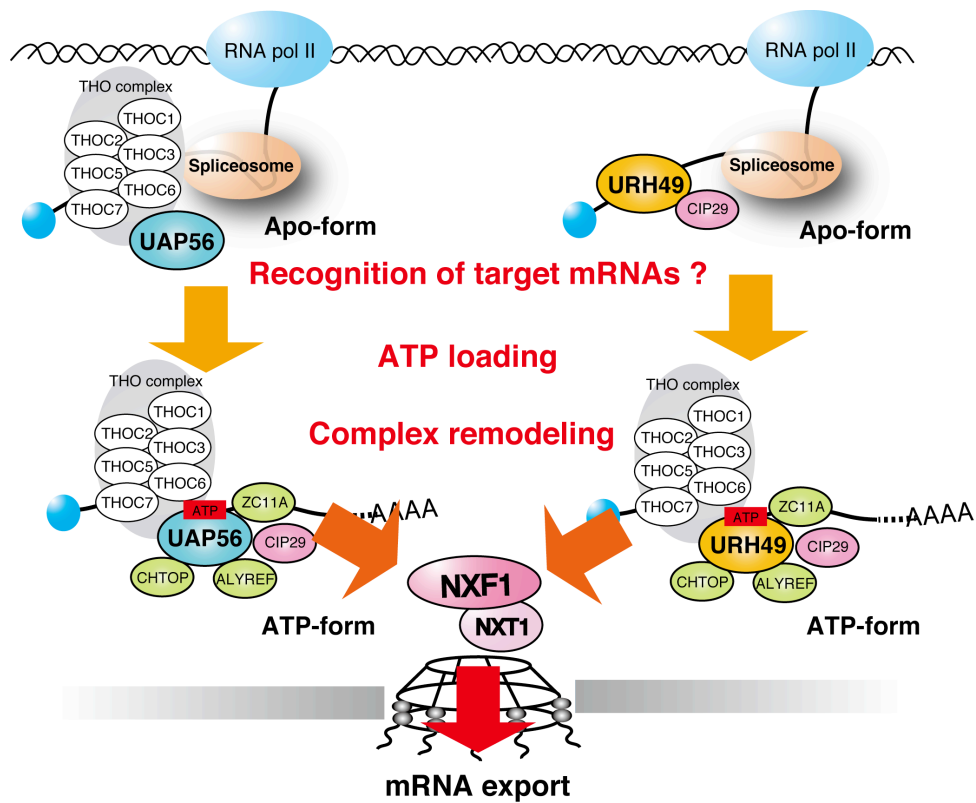


図 20 UAP56 及び URH49 による新規選択的 mRNA 輸送機構モデル

ヒトでは、UAP56 及び URH49 は Apo-TREX 複合体および Apo-AREX 複合体の異なる複合体を形成する。この段階は両者による mRNA 輸送の選択性に重要であることが予想される。続いて UAP56 と URH49 に対して ATP が結合することにより、両 Apo 複合体から ATP-TREX 複合体への複合体リモデリングが誘導される。最終的に各 ATP-TREX 複合体から NXF1 へ mRNA が受け渡されることで、UAP56 と URH49 が制御する mRNA 輸送経路は統合される。

考察

Apo-複合体及び ATP-結合複合体による mRNA 輸送機構

高い相同性に示す DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼである UAP56 と URH49 は、ヒトにおいてそれぞれ TREX 複合体と AREX 複合体を形成することにより、異なる遺伝子群の核内 mRNA 成熟及び細胞質への輸送に関与する [28]。一方で UAP56 と URH49 の複合体様式について ATP 非存在下、及び存在下で比較した研究例はなく、複合体様式と mRNA 輸送機構の関係性は未解明のままであった。

本研究では、UAP56 と URH49 が、それぞれ ATP の非存在下、存在下に応じて 2 つの複合体様式を示すことを明らかにした。ATP 非存在下において、UAP56 は THO 複合体と共に Apo-TREX 複合体を、一方で URH49 は CIP29 と相互作用し、Apo-AREX 複合体を形成した。ATP 添加によって両 Apo-複合体は、非常に類似した ATP 結合複合体である、ATP-TREX 複合体にリモデリングし、ALYREF、CIP29 および THO 複合体を含むことが示された。また、これまで URH49 の mRNA 輸送経路において最終的な mRNA 輸送因子は不明であったが、URH49 は ATP-TREX 複合体へのリモデリングを介して、NXF1 による mRNA 輸送を行うことが示唆された。URH49 は原索動物では発見されておらず、脊椎動物で同定されていることから進化に伴って UAP56 と URH49 に分岐したと予想される。両者の機能分担において両者が異なる Apo-複合体を形成することが、選択的な mRNA 輸送経路としての分子進化に重要であったと考えられる。加えて両経路における mRNA 輸送の達成のために、Apo-複合体の ATP-TREX 複合体へのリモデリング機構は進化的に保存されたことが示唆される。

CIP29 は、ATP 非存在状態でも URH49 と相互作用し、URH49 と CIP29 はいずれも細胞質分裂関連遺伝子の発現に重要であることを見出した。このことから ATP 非存在下で形成される Apo-複合体構成因子の違いが、UAP56 と URH49 が標的とする mRNA 群の認識に関わる可能性が示唆された。UAP56 と URH49 は DEAD box 型 RNA ヘリカーゼファミリーに属する。多くの DEAD box 型ヘリカーゼは、相互因子と共に基質 RNA を認識し、様々な細胞内の RNA 代謝に関与する [43]。この点は、Apo-複合体構成因子が標的 mRNA 認識に重要であるという考えと一致しており、Apo-AREX 複合体構成因子である CIP29 の機能解析は、URH49 が制御する mRNA 輸送経路における RNA 認識機構の理解に必須であると予想される。これまでの解析から CIP29 は UAP56 ならびに URH49 と同様に、スプライシングに依存した成熟 mRNA への結合が報告されている [11][21]。加えて UAP56 や URH49 と共に CIP29 を含む複合体構成因子は、核内 mRNA プロセッシング因子が多く存在する核スペckルに局在する

[11][28]。これらの事実は CIP29 がスプライシングや、他の核内プロセッシングに関与して、Apo-AREX 複合体による基質選択に働く可能性を示唆する。

Apo-複合体及び ATP-結合複合体形成を支える分子機構

UAP56 および URH49 を含む DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼは、一般的に高度に保存されたヘリカーゼコアを含む 2 つのドメインと、それをつなぐリンカー構造から構成される [43][44]。様々な DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼの構造学的な知見として、各ドメイン構造は非常に相同である一方で、Apo 型状態においてはタンパク質ごとに、各ドメインが異なる部位に配位して様々な Open 構造を示すことが報告されている。一方で ATP および RNA 結合に依存して、Open 構造から、各ドメインが 1 つの球状に内包された Closed 構造にリモデリングすることが報告されている [43][45][46][47]。UAP56 においては、結晶作成のために用いられた部分欠損体である UAP56 Δ N (アミノ酸 44 ~ 428) の Apo 型状態と、ATP 結合時の模倣状態として Mg²⁺ および ADP を含むものの結晶構造が報告されている [44]。この研究において、他の DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼと比較して、UAP56 Δ N の立体構造は比較的内包された Open 構造を示し、ADP 結合状態においては Closed 構造を示すことが報告されている。つまり UAP56 においても ATP 結合依存的な立体構造の変化が生じることが示唆されている。URH49 の立体構造はまだ明らかでないが、本研究から UAP56 と URH49 は明確に異なる Open 構造を持つことで異なる Apo-複合体を形成する分子機構が予想される。また Apo-AREX 複合体から ATP-TREX 複合体へのリモデリング過程は、より多くの構成因子の集合が観察されることから、Apo-TREX 複合体のリモデリング過程よりも動的であることが予想される。つまり URH49 は Apo 型状態で UAP56 よりも開いた Open 構造を示し、ATP 結合により UAP56 の ATP 結合型と同様な Closed 構造への変化が誘導されることが、Apo-AREX 複合体から ATP-TREX 複合体へのリモデリングを支える分子機構として存在すると思われる。

UAP56 と URH49 が制御する circRNA 輸送と mRNA 輸送における相違点

UAP56 および URH49 は mRNA に加えて circRNA の核外輸送に関わることが報告されている [42]。この研究において circRNA は RNA 長に応じて UAP56 と URH49 は輸送経路が選別されているというアイデアが提唱されている。そこで UAP56 と URH49 の選択的 mRNA 輸送経路においても標的 RNA を長さが重要であるか検証したが、この考えを裏付ける証拠を見出すことは出来なかった。これらの事実から考えられることとして circRNA と mRNA との間で輸送機構が異なる可能性を考えている。

circRNA 輸送において、UAP56 と URH49 の ATP 結合能及び、ヘリカーゼ活性の両方が不要であることが報告されている。その一方で UAP56 による mRNA 輸送においては、それぞれの必要性が以前に報告されており [41]、本研究についても UAP56 と URH49 の両方で mRNA 輸送における ATP 結合の重要性が観察されている。加えてシヨウジョウバエ由来の DL1 細胞株での研究から、NXF1 および TREX 複合体は mRNA 輸送に重要である一方で、各因子のノックダウンはいずれも circRNA の核外輸送阻害を誘導しないことが報告されている [42]。これらの事実より、circRNA 核外輸送機構はまだ未解明ではあるが、mRNA 核外輸送機構と異なることが予想される。

Apo-AREX 複合体を介した mRNA 成熟 / 輸送経路による細胞増殖と細胞質分裂関連遺伝子の発現制御の関連性

mRNA 輸送関連因子のノックダウンは、さまざまな段階で細胞分裂異常を誘導することが報告されている。例えば NXF1 を mRNA にリクルートする GANP のノックダウンにより、有糸分裂の初期段階における姉妹染色分体の解離が生じる [48]。また核膜孔複合体の細胞質側で NXF1 を含む mRNP のリモデリングに働く DDX19 と、その活性を制御する因子である GLE1 のノックダウンに伴い、紡錘体異常の発生と細胞分裂遅延が観察されている [36]。同様に UAP56 ノックダウンにより姉妹染色分体の接着異常および、URH49 ノックダウンにより姉妹染色分体腕部の乖離異常が報告されている [28]。これらの事実は細胞分裂に関与する遺伝子発現は、mRNA 輸送機構によって高度に調節されており、各因子ノックダウンによる表現型の違いは、それぞれが標的とする mRNA 群が異なることに由来すると考えられる。

これらに続いて本研究結果は、URH49 と CIP29 が、PRC1 と chromosomal passenger 複合体構成因子である BIRC5 ならびに AURKB の遺伝子発現を制御することにより、細胞質分裂に重要であることを示唆する。一方で、UAP56 ノックダウンでは細胞質分裂異常は観察されなかったことから、これらの遺伝子発現は Apo-AREX 複合体により特異的に制御されることが明らかになった。AURKB の mRNA 量は UAP56、URH49 及び CIP29 ノックダウンで同程度の発現減少が観察されている。一方でタンパク質発現量においては URH49 及び CIP29 のノックダウンで、UAP56 の場合よりもシビアな減少が観察された。AURKB の発現量は chromosomal passenger 複合体構成因子の BIRC5 によって制御されることが報告されている [49]。よって URH49 及び CIP29 のノックダウン細胞においては、AURKB の mRNA 発現量低下に加え、BIRC5 の発現量が低下したことで、UAP56 ノックダウン細胞よりも AURKB の発現量が低下し、chromosomal passenger 複合体の破綻が誘導されたことが考えられる。興味深い

ことに、PRC1、BIRC5、および AURKB の mRNA およびタンパク質発現に先立って、URH49 および CIP29 の mRNA 発現量が G0 から G1 への移行中および細胞増殖期に増加することが報告されている [27][50]。また以前の研究から HeLa 細胞の細胞分裂期において UAP56、URH49、および CIP29 は、細胞質分裂関連因子が局在する染色体、中央体付近には局在しないことが観察されている [28]。また URH49 により制御される mRNA 輸送経路には、脂質合成など細胞質分裂に関与する遺伝子も含まれる [28]。これらの結果から、細胞周期の進行に伴って URH49 と CIP29 の発現量が増加することで、細胞質分裂に関連する各遺伝子の mRNA 輸送が促進され、同調的に発現誘導されることが考えられる。細胞質分裂異常の程度の違いは MCF7 と HeLa 細胞で大きく異なっていたことから、標的遺伝子の発現における Apo-AREX 複合体の依存性が異なる可能性について検討したが、ロックダウン効率は同様であり、両細胞間で標的遺伝子への影響の大きな違いは観察されなかった。今回検証した遺伝子以外にも、MCF7 において細胞分裂に関わるノンコーディング RNA が Apo-AREX 複合体に強く依存して制御されている可能性も考えられる。また細胞株によって細胞質分裂異常を監視する機構の程度が異なるのかもしれない。これらの可能性は現在までのところ排除できていないが、H1299 細胞や HCT116 細胞においても MCF7 細胞同様、細胞質分裂異常が観察されていることから、URH49 が CIP29 と共に Apo-AREX 複合体の機能を介して細胞質分裂に関わる遺伝子発現を制御するという現在の作業仮説が妥当であると考えられる。細胞質分裂異常において、URH49 ノックダウンよりも、CIP29 ノックダウンの際に穏やかな表現型が観察され、これはいくつかの細胞株で共通していた。また両因子のノックダウンによってもたらされる mRNA 輸送異常の程度についても同様の傾向が観察された。ノックダウンによって URH49 と CIP29 の発現はそれぞれ強く抑制されていたことから、単なるノックダウン効率の違いには起因しないことが考えられる。CIP29 は URH49 の RNA ヘリカーゼ活性を制御するという報告もあることから [51]、URP49 は Apo-AREX 複合体において中心的な役割を果たし、CIP29 は補助因子として機能することが考えられる。

URH49 と CIP29 の発現量はいくつかのガン種で大きく増加することが観察されており、URH49 はガン細胞のバイオマーカーとしても同定されている [52][53][54][55][56]。さらに URH49 および CIP29 と、いくつかのガンの進行に関連が実証されている [52][57]。同様に BIRC5、PRC1、および AURKB の発現量増加は、いくつかのガン細胞株において観察されており [58][59][60][61]、抗がん剤の標的ターゲットとして認識されている [58][59][62]。これらのことを踏まえると、URH49 および CIP29 から構成される AREX 複合体を介した mRNA 輸送経路の理解は、細胞増殖と細胞質分裂を支え

る遺伝子発現調節機構としてだけでなく、ガン細胞の生存、増殖の抑制にも関連することが予想される。

総括と今後の展望

本研究により、UAP56 と URH49 が Apo-複合体と ATP-結合型複合体の2つの複合体様式をとることで mRNA 輸送に働くという分子機構が明らかになった。今後、UAP56 と URH49 の Apo 型及び、ATP 結合型の構造解析を行うことができれば、より詳細な複合体様式変化の分子機構を解明できると考えられる。一方で UAP56 と URH49 がどのように標的 mRNA 群を認識しているか不明な点が多い。Apo-複合体と ATP-結合型複合体の分離が可能になったことから、今後の展望として両者の Apo-複合体による標的 mRNA 群の認識機構の解明が重要であると考えられる。そのために質量分析による Apo-複合体構成因子の網羅的同定を行っており、Apo-AREX 複合体特異的な構成因子を同定し、その機能解析を進めている。加えて、UAP56 と URH49 が標的 mRNA 群のどの領域に結合しているのか解析することで、多様な mRNA 種がどのように選別されているかの分子機構の理解への道が開けると考えている。UAP56 と URH49 による選択的な mRNA 成熟-輸送過程の解明は、複雑な遺伝子発現制御の理解に繋がるだけでなく、非常に相同な分子種が進化の過程でどのようにして異なる細胞内機能を有するに至ったのかを考える点でも非常に興味深く、今後の解析が期待される。

材料ならびに手法

本研究で使用した試薬と抗体

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) は和光純薬から購入した。マウス FLAG M2 抗体と、マウス β -actin 抗体は Sigma-Aldrich から購入した。マウス GAPDH-HRP 結合抗体は和光純薬から購入した。マウス AURKB 抗体は BD Transduction Laboratories から購入した。ヤギ LaminB 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。ウサギ BIRC5 antibody 抗体は Abnova から購入した。マウス PRC1 抗体およびマウス CCNB1 抗体は BioLegend から購入した。ウサギ THOC1 抗体、ウサギ THOC5 抗体、ウサギ ALYREF 抗体、ラット CIP29 抗体、ラット UAP56 抗体、ラット URH49 抗体は以前に報告されたものを使用した [6][28]。

細胞培養ならびに遺伝子導入、安定発現株の樹立

HeLa 細胞、MCF7 細胞、293 Flp-In T-Rex 細胞、H1299 細胞、HCT116 WT、および HCT116 p53^{-/-}細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Wako) に非働化処理 (56°C, 30 分インキュベート) した 10% Fetal bovine serum (FBS) を添加して、37°C、5% CO₂ 条件下で継代培養した。siRNA (終濃度 : 20 nM) およびプラスミド (終濃度 : 0.8 μ g / ml) のトランスフェクションは Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

FLAG-UAP56、FLAG-URH49、および FLAG-CIP29 の 293 Flp-In T-Rex 安定発現細胞は、それぞれ pOG44 と pcDNA5-3 \times FLAG-UAP56、pcDNA5-3 \times FLAG-URH49 または pcDNA5-3 \times FLAG-CIP29 のトランスフェクションし、薬剤耐性を獲得して生育した細胞株を選択して解析に用いた。H2B-GFP の MCF7 安定発現細胞は、リニアライズした H2B-EGFP 発現プラスミドのトランスフェクションし作成した。YFP-tubulin と CFP-H2B の MCF7 安定発現細胞は、リニアライズした YFP-tubulin と CFP-H2B 発現プラスミドのトランスフェクションによって作成した。

プラスミドコンストラクションと本研究で使用した siRNA

pcDNA5-3 \times FLAG-UAP56、pcDNA5-3 \times FLAG-URH49、pcDNA5-3 \times FLAG-CIP29 はそれぞれ 3 \times FLAG-UAP56、3 \times FLAG-URH49、および 3 \times FLAG-CIP29 を pcDNA5 の AspI-XhoI 部位および BamHI-XhoI 部位に導入し作成した。ATP 結合欠損変異体は、プライマーを用いて、PCR によって点変異を導入した PCR 断片を導入し作成した。本研究で使用したプライマーと siRNA は、Invitrogen 及び Integrated DNA technologies

で合成されたものを用いた。表 1、2 に配列を示す。

イムノプロットングならびに免疫沈降

Large scale 及び Small scale の核抽出物 (NE) の調製は、以前に報告された方法 [28] に従い行った。ATP 非存在化及び存在下における免疫沈降は、以前に報告された方法 [6][11][12] に簡単な変更を加え行った。まず NE に存在する内在性の ATP を枯渇させるために、NE 100 μ L を、0.1% TritonX100、0.2 mM PMSF、および 0.5 mM DTT を含む 400 μ L PBS と混合し、その後、30°C で 20 分間インキュベートした。次に、RNaseA (100 ng / μ L) と ATP (500 μ M)、MgCl₂ (3.2 mM)、creatine phosphate (20 mM) を NE に加えた。サンプルを 30°C で 30 分間インキュベート後、遠心分離して沈殿物を除去し、上清を免疫沈降に用いた。ATP 非存在サンプルにおいては、ATP、MgCl₂、および creatine phosphate を除いて同様の処理を行った。各上清に 10 μ L の抗 DYKDDDDK タグ抗体ビーズ (和光) を混合した。CIP29 抗体による免疫沈降では、protein G Sepharose (GE Healthcare Japan) に結合させたものを用いた。混合物を 4°C で一晩反応させた後、ビーズを 0.1% TritonX100、0.2 mM PMSF および 0.5 mM DTT を含む PBS で 4 回洗浄した。ビーズに付着したタンパク質は SDS サンプルバッファー (250 mM Tris-HCl、1% SDS、0.002% bromophenol blue、40% Glycerol) に溶解した後、37°C で 10 分間インキュベートし遠心分離にて上清を新しいチューブに回収した。その後、DTT を最終濃度 10 mM になるように加え、2 分間煮沸しサンプルとした。このサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Bio-Rad Trans-Blot cell (BIO-RAD, CA) を使用して PVDF 膜 (Pall, MI) に転写した。PVDF 膜を、0.1% Tween20 を含む 5% スキムミルク / PBS で室温 1 時間振盪し、4°C で一晩回転させながら一次抗体と反応させた。その後 PVDF 膜は 0.1% Tween20 / PBS で各 10 分間 3 回洗浄し、HRP 結合二次抗体に室温で 2 時間反応させた。続いて PVDF 膜を 0.1% Tween20 / PBS で 10 分間 3 回洗浄し、イモビロン (Immobilon) ウェスタン化学発光 HRP 基質 (Millipore) と反応させ、LAS 4000 mini (GE Healthcare Japan) で化学発光を検出した。

蛍光免疫染色

12 ウェルプレートで細胞 (5×10^4 cells / mL) をカバーガラス上で 24 時間培養し、5% ~10% コンフルエントになった細胞に siRNA またはプラスミドをトランスフェクションした。48 時間培養後、4% formaldehyde / PBS で室温 20 分間静置し、固定した。その後 0.1% Triton X-100 / PBS で室温 10 分間静置し、透過処理した。6% BSA / PBS

で室温 1 時間静置しブロッキングした後、続いて 2% BSA / PBS 中で一次抗体を室温で 1 時間処理し、PBS で 3 回洗浄後、Alexa-488 または Alexa-594 を結合した二次抗体 (Molecular Probes) を室温で 1 時間反応させ染色を行った。DNA は DAPI を用いて染色した。最後に Slowfade Antifade kit (Molecular Probes) を用いて封入した。

***in situ* hybridization による RNA 蛍光染色(RNA-FISH)**

siRNA またはプラスミドをトランスフェクションした細胞を 4% formaldehyde / PBS で室温 20 分間で固定し、その後 0.1% Triton X-100 / PBS で室温 10 分間静置し、透過処理を行った。その後 PBS で 10 分間 3 回洗浄を行い、2×SSC で 5 分間処理した。次に ULTRAhyb-Oligo Hybridization Buffer (Ambion) で 42°C 1 時間プレハイブリダイゼーションし、10 pmol になるよう Hybridization Buffer で希釈した Alexa Fluor 594 標識 Oligo-dT45 probe (Molecular Probes) を一晩反応させた。続いて 2×SSC、0.5×SSC、0.1×SSC の順で 42°C で 20 分間ずつ洗浄した。DNA は DAPI を用いて染色した。最後に Slowfade Antifade kit (Molecular Probes) を用いて封入した。蛍光写真は Olympus DP70 camera (Olympus) を搭載した Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss) を使用して取得した。核および全細胞の poly (A) + RNA シグナルの測定は、ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて定量化した。

各分画 RNA の抽出及び逆転写反応、半定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

細胞質の分画のため、調製した細胞を溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% NP-40) を加え、氷上で 5 分間、静置した後、数秒 10000 x g で遠心分離し、上清画分を細胞質画分とした。また沈殿画分を核画分とした。全細胞、もしくは上述の方法で得た分画サンプルより Sepasol-RNA I super G (Nacalai Tesque) のプロトコルに従い RNA をした。

cDNA は ReverTraAce (Toyobo) と random 9 primer を用いて合成した。半定量リアルタイム PCR (qRT-PCR と記載する) は TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio) を用いて Thermal Cycler Dice real-time system II (Takara Bio) にて解析した。PGK1 はノーマライズのために使用し、各遺伝子の発現量は threshold cycle (Ct) values を元に $2^{[Ct(TBP) - Ct(each\ mRNA)]}$ の算出方法に従って計算した。解析に用いたプライマーの配列を表 2 に示す。

生細胞イメージング

35 mm ガラスボトムディッシュ (Greiner) で各細胞を培養し、siRNA をトランスフ

エクシオンした。細胞を 36 時間培養した後、IX-81 顕微鏡を搭載した time-lapse imaging system (Olympus)、もしくは BIO Station IMQ (Nikon) を用いて 37°C、5% CO₂、湿度 100%の条件において、5 分間隔で画像を取得した。

本研究に使用した iCLIP データとデータ解析手法

Gene Expression Omnibus Database に GSE113953 として保存されている NXF1 および ALYREF iCLIP データを解析に用いた。Fastq ファイルは Sequence Read Archive からダウンロードし、分割されていたデータは 1 つのファイルにマージした (SRR7087900 - SRR7087907 を Alyref-FLAG R1,2,3, SRR7087916 - SRR7087923 を Nxf1-FLAG R1,2,3 とした)。低品質の塩基情報と短いリード配列のトリミングには TrimGalore-0.6.1 を用いた得られたリードより、STAR 2.6.1a を用いて、Ensembl 75 より得た hg19 ゲノム情報を元にマッピングを行った。マッピングされたリードより Htseq-count 0.11.2 を用いて、Ensembl 75 より得た gtf ファイルを元に、各転写産物における存在量を算出した。各リプライケイト間のノーマライズは DESeq2 (version 1.24.0) を用いて行った。発現量が 0 の遺伝子は解析対象から除外した。UAP56 または URH49 ノックダウンにより発現量が減少した遺伝子のリストは以前の報告より取得した [28]。統計検定方法として、各群に対する Student' s t-test 及び Bonferroni corrections for multiple testing を用いた。

UAP56 と URH49 が輸送標的とする mRNA および pre-mRNA 群における RNA 長の比較解析

UAP56 または URH49 ノックダウンにより発現量が減少した遺伝子のリストは以前の報告より取得した [28]。pre-mRNA と mRNA 長さについて、それぞれ以下のように定義した。pre-mRNA : 転写開始位置と終了位置の間の長さ、mRNA : 各エクソンの長さの合計。様々な遺伝子において、選択スプライシングに由来する数多くの転写産物が報告されていることから、これらの転写バリエーションによるバイアスを回避するために、最長および最短の転写産物のみを Bioconductor の TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene パッケージで“knownGene” track が記載されているものに基づいて UCSC hg19 genome annotation database より取得して解析に用いた。各群の中央値に差があるかの統計検定方法として、Wilcoxon-Mann-Whitney test を用いた。

表 1 本研究で用いたプライマー

| Name | Aim of the primer | | Nucleotide sequence (5'→3') |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------|---|
| KpnI-UAP56-CDS start | Construction | Forward | ACTCGGTACCATGGCAGAGAACGATGTGGA |
| UAP56-CDS end-XhoI | | Reverse | CCGCTCGAGCTACCGTGTCTGTTCATGT |
| KpnI-URH49-CDS start | Construction | Forward | CTACTCGGTACCATGGCAGAACAGGATGTG |
| URH49-CDS end-XhoI | | Reverse | CCGCTCGAGTTACCGGCTCTGCTCGATGT |
| UAP56 siRNA-resistant mutagenesis | Construction | Forward | TAGTGAGCTGCCAGACGAAATTGATATAAGTAGTTACATTGAACA |
| | | Reverse | TGTTCAATGTAAGTACTTATATCAATTTGGTCTGGCAGTCACTA |
| URH49 siRNA-resistant mutagenesis | Construction | Forward | GTGCTGGCCACATTGCAACAAATCGAACAGTGAACGGACAGGTG |
| | | Reverse | CACCTGTCCGTTCACTGGTTCGATTTGTGCAATGTGCCAGCAC |
| UAP56 K95A mutagenesis | Construction | Forward | TCGGGCATGGGAAATACAGCAGTGTGTTGTC |
| | | Reverse | GACAAACACTGCTGTATTCCCATGCCCGA |
| URH49 K94A mutagenesis | Construction | Forward | TCCGGGATGGCAACACAGCGGTCTTCGTC |
| | | Reverse | GACGAAGACCGCTGTGTTGCCATCCCGGA |
| PGK1 | Real time PCR | Forward | GTTGCAGACAAGATCCAGCTC |
| | | Reverse | GAAGTCCCAATCCCATGTTG |
| UAP56 | Real time PCR | Forward | TGGGAATGGATGCTCCTGTGC |
| | | Reverse | ACAGACACCTGCCAGTAAC |
| URH49 | Real time PCR | Forward | ACCCTACAGCAGATTGAGCC |
| | | Reverse | GAACACAGACACCTTGACGC |
| CIP29 | Real time PCR | Forward | ATGCTCTGCTCGTGGTTGG |
| | | Reverse | TTTGCCTCCTCGCATG |
| AURKB | Real time PCR | Forward | CAATGTCCAGCCACAGCTGCC |
| | | Reverse | TTGCCTTTGCCAGAGGACGCC |
| PRC1 | Real time PCR | Forward | GATTGAGGCAATTCGAGTGGAGCTGG |
| | | Reverse | AGCATCGTGGAGCTGGAGCAGAC |
| BIRC5 | Real time PCR | Forward | ACTGGACAGAGAAAGGCCAAG |
| | | Reverse | AATCCATGGCAGCCAGCTG |
| CLSPN | Real time PCR | Forward | ACGAGAGCAGTGGCTTCGGGA |
| | | Reverse | GGCGACTGGCATTCTTTCGAGTG |
| BRCA1 | Real time PCR | Forward | CGGCGTGAGCTCGCTGAGACTTC |
| | | Reverse | TGTTCCAATGAACCAGAGCAGAGGGTG |
| tRNA | RT-PCR to confirm the fractionation | Forward | GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAG |
| | | Reverse | GTAGTCGGCAGGATTCGAACC |
| E2F8 | RT-PCR to confirm the fractionation | Forward | CGGGGAGGAGAATAAGTACG |
| | | Reverse | CTTGTCTTTGCGGCTGTTTA |
| SHG104 | RT-PCR to confirm the fractionation | Forward | TCTATCACTCTCGTTCTGTAGCTC |
| | | Reverse | ACTTTATTGACGGGAATGGGGTG |

表 2 本研究で用いた siRNA

| Name | | Nucleotide sequence (5'→3') | Source |
|-------------|---------|--|------------|
| EGFP (Ctrl) | Forward | 5' -GGGCACAAGCUGGAGUACAACUACA-3' | Invitrogen |
| UAP56 #1 | Forward | 5'-CCUGAUGAGAUAGACAUCUCCUCCU-3' | Invitrogen |
| URH49 #1 | Forward | 5'-CCCUACAGCAGAUUGAGCCUGUCA-3' | Invitrogen |
| CIP29 #1 | Forward | 5'-CAAAGCCCAUUGAGCUCCUGUCA-3' | Invitrogen |
| UAP56 #2 | Forward | 5'-CGAAUUCUUGUGGCUACCAACCUAU-3' | Invitrogen |
| URH49 #2 | Forward | 5'-rGrUrUrGrArGrArGrArGrCrUrArGrArGrArUrUrGrUrArUrGAG-3' | IDT |
| | Reverse | 5'-rCrUrCrArUrArCrArUrCrUrCrUrCrArGrCrUrUrCrUrCrArArCrArG-3' | |
| CIP29 #2 | Forward | 5'-rGrCrUrUrCrUrUrArCrUrCrUrCrArGrCrUrCrArCrArGrUrU-3' | IDT |
| | Reverse | 5'-rCrUrGrUrGrArGrCrUrUrGrGrArGrArGrUrArGrArArAdGdC-3' | |
| NXF1 | Forward | 5'-GAACUGGUUCAAGAUUACAAUCCU-3' | Invitrogen |

文献

- [1] G. Orphanides, D. Reinberg, A unified theory of gene expression., *Cell*. 108 (2002) 439–451. doi:10.1016/S0092-8674(02)00655-4.
- [2] T. Maniatis, R. Reed, An extensive network of coupling among gene expression machines, *Nature*. 416 (2002) 499–506. doi:10.1038/416499a.
- [3] S. Komili, P.A. Silver, Coupling and coordination in gene expression processes: A systems biology view, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 38–48. doi:10.1038/nrg2223.
- [4] S. Jimeno, A.G.Rondon., R. Luna, A. Aguilera, The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability, *EMBO J.* 21 (2002) 3526–3535. doi:10.1093/emboj/cdf335.
- [5] K. Stäßer, S. Masuda, P. Mason, J. Pfannstiel, M. Oppizzi, S. Rodriguez-Navarro, A.G. Rondón, A. Aguilera, K. Struhl, R. Reed, E. Hurt, TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export, *Nature*. 417 (2002) 304–308. doi:10.1038/nature746.
- [6] S. Masuda, R. Das, H. Cheng, E. Hurt, N. Dorman, R. Reed, Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing, *Genes Dev.* 19 (2005) 1512–1517. doi:10.1101/gad.1302205.
- [7] R. Reed, H. Cheng, TREX, SR proteins and export of mRNA, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 269–273. doi:10.1016/j.ceb.2005.04.011.
- [8] J. Katahira, H. Inoue, E. Hurt, Y. Yoneda, Adaptor Aly and co-adaptor Thoc5 function in the Tap-p15-mediated nuclear export of HSP70 mRNA, *EMBO J.* 28 (2009) 556–567. doi:10.1038/emboj.2009.5.
- [9] C.G. Heath, N. Viphakone, S.A. Wilson, The role of TREX in gene expression and disease, *Biochem. J.* 473 (2016) 2911–2935. doi:10.1042/BCJ20160010.
- [10] B. Chi, Q. Wang, G. Wu, M. Tan, L. Wang, M. Shi, X. Chang, H. Cheng, Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 1294–1306. doi:10.1093/nar/gks1188.
- [11] K. Dufu, M.J. Livingstone, J. Seebacher, S.P. Gygi, S.A. Wilson, R. Reed, ATP is required for interactions between UAP56 and two conserved mRNA export proteins, Aly and CIP29, to assemble the TREX complex, *Genes Dev.* 24 (2010) 2043–2053. doi:10.1101/gad.1898610.

- [12] E.G. Folco, C.S. Lee, K. Dufu, T. Yamazaki, R. Reed, The proteins PDIP3 and ZC11A associate with the human TREX complex in an ATP-dependent manner and function in mRNA export, *PLoS One*. 7 (2012) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0043804.
- [13] C.-T. Chang, G.M. Hautbergue, M.J. Walsh, N. Viphakone, T.B. van Dijk, S. Philipsen, S. a Wilson, Chtop is a component of the dynamic TREX mRNA export complex., *EMBO J*. 32 (2013) 473–486. doi:10.1038/emboj.2012.342.
- [14] S. Younis, W. Kamel, T. Falkeborn, H. Wang, D. Yu, R. Daniels, M. Essand, J. Hinkula, G. Akusjärvi, L. Andersson, Multiple nuclear-replicating viruses require the stress-induced protein ZC3H11A for efficient growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 115 (2018) E3808–E3816. doi:10.1073/pnas.1722333115.
- [15] J. Fleckner, M. Zhang, J. Valcárcel, M.R. Green, U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction, *Genes Dev*. 11 (1997) 1864–1872. doi:10.1101/gad.11.14.1864.
- [16] S.A. Johnson, H. Kim, B. Erickson, D.L. Bentley, The export factor Yra1 modulates mRNA 3' end processing, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 18 (2010) 1164–1171. doi:10.1038/nsmb.2126.
- [17] S.A. Johnson, G. Cubberley, D.L. Bentley, Cotranscriptional Recruitment of the mRNA Export Factor Yra1 by Direct Interaction with the 3' End Processing Factor Pcf11, *Mol. Cell*. 33 (2009) 215–226. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.007.
- [18] N. Viphakone, G.M. Hautbergue, M. Walsh, C. Te Chang, A. Holland, E.G. Folco, R. Reed, S.A. Wilson, TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, *Nat. Commun*. 3 (2012) 1006–1011. doi:10.1038/ncomms2005.
- [19] H. Cheng, K. Dufu, C.S. Lee, J.L. Hsu, A. Dias, R. Reed, Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA, *Cell*. 127 (2006) 1389–1400. doi:10.1016/j.cell.2006.10.044.
- [20] T. Nojima, T. Hirose, H. Kimura, M. Hagiwara, The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export, *J. Biol. Chem*. 282 (2007) 15645–15651. doi:10.1074/jbc.M700629200.
- [21] A.M. Gromadzka, A.L. Steckelberg, K.K. Singh, K. Hofmann, N.H. Gehring, A short conserved motif in ALYREF directs cap- and EJC-dependent

- assembly of export complexes on spliced mRNAs, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 2348–2361. doi:10.1093/nar/gkw009.
- [22] N. Viphakone, I. Sudbery, L. Griffith, C.G. Heath, D. Sims, S.A. Wilson, Co-transcriptional Loading of RNA Export Factors Shapes the Human Transcriptome, *Mol. Cell.* 75 (2019) 310–323.e8. doi:10.1016/j.molcel.2019.04.034.
- [23] I. Taniguchi, M. Ohno, ATP-dependent recruitment of export factor Aly/REF onto intronless mRNAs by RNA helicase UAP56., *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 601–608. doi:10.1128/MCB.01341-07.
- [24] K. Sträßer, E. Hurt, Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p, *Nature.* 413 (2001) 648–652. doi:10.1038/35098113.
- [25] A. Herold, L. Teixeira, E. Izaurralde, Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*, *EMBO J.* 22 (2003) 2472–2483. doi:10.1093/emboj/cdg233.
- [26] M. Margaret, B. Chad, B. Thomas, UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*, *RNA.* 9 (2003) 847–857. doi:10.1261/rna.5480803.and.
- [27] A. Pryor, L. Tung, Z. Yang, F. Kapadia, T.H. Chang, L.F. Johnson, Growth-regulated expression and G0-specific turnover of the mRNA that encodes URH49, a mammalian DExH/D box protein that is highly related to the mRNA export protein UAP56, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1857–1865. doi:10.1093/nar/gkh347.
- [28] T. Yamazaki, N. Fujiwara, H. Yukinaga, M. Ebisuya, T. Shiki, T. Kurihara, N. Kioka, T. Kambe, M. Nagao, E. Nishida, S. Masuda, The Closely Related RNA helicases , UAP56 and URH49 , Preferentially Form Distinct mRNA Export Machineries and Coordinately Regulate Mitotic Progression, *Mol. Biol. Cell.* 21 (2010) 2953–2965. doi:10.1091/mbc.E09.
- [29] C.L. Leaw, E.C. Ren, M.L. Choong, Hcc-1 is a novel component of the nuclear matrix with growth inhibitory function, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 2264–2273. doi:10.1007/s00018-004-4205-x.
- [30] A.P. Golovanov, G.M. Hautbergue, A.M. Tintaru, L.-Y. Lian, S. a Wilson, The solution structure of REF2-I reveals interdomain interactions and regions

- involved in binding mRNA export factors and RNA., *RNA*. 12 (2006) 1933–1948. doi:10.1261/rna.212106.
- [31] J. Shen, L. Zhang, R. Zhao, Biochemical characterization of the ATPase and helicase activity of UAP56, an essential pre-mRNA splicing and mRNA export factor, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22544–22550. doi:10.1074/jbc.M702304200.
- [32] G. Normand, R.W. King, Understanding cytokinesis failure, *Adv. Exp. Med. Biol.* 675 (2010) 27–55. doi:10.1007/978-1-4419-6199-0_3.
- [33] S. Ruchaud, M. Carmena, W.C. Earnshaw, Chromosomal passengers: Conducting cell division, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 798–812. doi:10.1038/nrm2257.
- [34] M. Tatsuka, H. Katayama, T. Ota, T. Tanaka, S. Odashima, F. Suzuki, Y. Terada, Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the Aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells, *Cancer Res.* 58 (1998) 4811–4816.
- [35] Y.B. Beaulieu, C.L. Kleinman, A.-M. Landry-Voyer, J. Majewski, F. Bachand, Polyadenylation-Dependent Control of Long Noncoding RNA Expression by the Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1, *PLOS Genet.* 8 (2012) e1003078. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003078>.
- [36] M. Okamura, Y. Yamanaka, M. Shigemoto, Y. Kitadani, Y. Kobayashi, T. Kambe, M. Nagao, I. Kobayashi, K. Okumura, S. Masuda, Depletion of mRNA export regulator DBP5/ DDX19, GLE1 or IPPK that is a key enzyme for the production of IP6 resulting in differentially altered cytoplasmic mRNA expression and specific cell defect, *PLoS One.* 13 (2018) 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0197165.
- [37] G. Vader, R.H. Medema, S.M.A. Lens, The chromosomal passenger complex: Guiding Aurora-B through mitosis, *J. Cell Biol.* 173 (2006) 833–837. doi:10.1083/jcb.200604032.
- [38] F. Li, G. Ambrosini, E.Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P.C. Marchisio, D.C. Altieri, Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin, *Nature.* 396 (1998) 580–584. doi:10.1038/25141.
- [39] Y. Terada, M. Tatsuka, F. Suzuki, Y. Yasuda, S. Fujita, M. Otsu, AIM-1: A mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis, *EMBO J.*

- 17 (1998) 667–676. doi:10.1093/emboj/17.3.667.
- [40] W. Jiang, G. Jimenez, N.J. Wells, T.J. Hope, G.M. Wahl, T. Hunter, R. Fukunaga, PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis, *Mol. Cell.* 2 (1998) 877–885.
- [41] K.P. Kota, S.R. Wagner, E. Huerta, J.M. Underwood, J. a Nickerson, Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 1526–1537. doi:10.1242/jcs.021055.
- [42] C. Huang, D. Liang, D.C. Tatomer, J.E. Wilusz, A length-dependent evolutionarily conserved pathway controls nuclear export of circular RNAs, *Genes Dev.* 32 (2018) 639–644. doi:10.1101/gad.314856.118.
- [43] S. Ozgur, G. Buchwald, S. Falk, S. Chakrabarti, J.R. Prabu, E. Conti, The conformational plasticity of eukaryotic RNA-dependent ATPases, *FEBS J.* 282 (2015) 850–863. doi:10.1111/febs.13198.
- [44] R. Zhao, J. Shen, M.R. Green, M. MacMorris, T. Blumenthal, Crystal structure of UAP56, a DExD/H-Box protein involved in pre-mRNA splicing and mRNA export, *Structure.* 12 (2004) 1373–1381. doi:10.1016/j.str.2004.06.006.
- [45] T. Sengoku, O. Nureki, A. Nakamura, S. Kobayashi, S. Yokoyama, Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein *Drosophila* Vasa, *Cell.* 125 (2006) 287–300. doi:10.1016/j.cell.2006.01.054.
- [46] F. Bono, J. Ebert, E. Lorentzen, E. Conti, The Crystal Structure of the Exon Junction Complex Reveals How It Maintains a Stable Grip on mRNA, *Cell.* 126 (2006) 713–725. doi:10.1016/j.cell.2006.08.006.
- [47] H. Von Moeller, C. Basquin, E. Conti, The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 247–254. doi:10.1038/nsmb.1561.
- [48] N. Okamoto, K. Kuwahara, K. Ohta, M. Kitabatake, K. Takagi, H. Mizuta, E. Kondo, N. Sakaguchi, Germinal center-associated nuclear protein (GANP) is involved in mRNA export of Shugoshin-1 required for centromere cohesion and in sister-chromatid exchange, *Genes to Cells.* 15 (2010) 471–484. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01396.x.
- [49] A. Carvalho, M. Carmena, C. Sambade, W.C. Earnshaw, S.P. Wheatley, Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa

- cells, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 2987–2998. doi:10.1242/jcs.00612.
- [50] S. Fukuda, D.W. Wu, K. Stark, L.M. Pelus, Cloning and characterization of a proliferation-associated cytokine-inducible protein, CIP29, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 593–600. doi:10.1006/bbrc.2002.6680.
- [51] T. Sugiura, K. Sakurai, Y. Nagano, Intracellular characterization of DDX39, a novel growth-associated RNA helicase, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 782–790. doi:10.1016/j.yexcr.2006.11.014.
- [52] G.J. Kang, M.K. Park, H.J. Byun, H.J. Kim, E.J. Kim, L. Yu, B. Kim, J.G. Shim, H. Lee, C.H. Lee, SARNP, a participant in mRNA splicing and export, negatively regulates E-cadherin expression via interaction with pinin, *J. Cell. Physiol.* (2019) 1–13. doi:10.1002/jcp.29073.
- [53] K. Kikuta, D. Kubota, T. Saito, H. Orita, A. Yoshida, H. Tsuda, Y. Suehara, H. Katai, Y. Shimada, Y. Toyama, K. Sato, T. Yao, K. Kaneko, Y. Beppu, Y. Murakami, A. Kawai, T. Kondo, Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor, *J. Proteomics.* 75 (2012) 1089–1098. doi:10.1016/j.jprot.2011.10.005.
- [54] D. Kubota, T. Okubo, T. Saito, Y. Suehara, A. Yoshida, K. Kikuta, H. Tsuda, H. Katai, Y. Shimada, K. Kaneko, A. Kawai, T. Kondo, Validation study on pifetin and ATP-dependent rna helicase DDX39 as prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumour, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 42 (2012) 730–741. doi:10.1093/jjco/hys092.
- [55] K.G. Calderón-González, M.L. Valero Rustarazo, M.L. Labra-Barrios, C.I. Bazán-Méndez, A. Tavera-Tapia, M.E. Herrera-Aguirre, M.M. Sánchez del Pino, J.L. Gallegos-Pérez, H. González-Márquez, J.M. Hernández-Hernández, G. León-Ávila, S. Rodríguez-Cuevas, F. Guisa-Hohenstein, J.P. Luna-Arias, Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry, *J. Proteomics.* 124 (2015) 50–78. doi:10.1016/j.jprot.2015.04.018.
- [56] V. Dobrotkova, P. Chlapek, M. Jezova, K. Adamkova, P. Mazanek, J. Sterba, R. Veselska, Prediction of neuroblastoma cell response to treatment with natural or synthetic retinoids using selected protein biomarkers, *PLoS One.*

- 14 (2019) 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0218269.
- [57] T. Zhang, Z. Ma, L. Liu, J. Sun, H. Tang, B. Zhang, Y. Zou, H. Li, DDX39 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through activating Wnt/ β -catenin pathway article, *Cell Death Dis.* 9 (2018). doi:10.1038/s41419-018-0591-0.
- [58] S.P. Wheatley, D.C. Altieri, Survivin at a glance, *J. Cell Sci.* 132 (2019) jcs223826. doi:10.1242/jcs.223826.
- [59] A. Tang, K. Gao, L. Chu, R. Zhang, J. Yang, J. Zheng, Aurora kinases: novel therapy targets in cancers, *Oncotarget.* 8 (2017) 23937–23954. doi:10.18632/oncotarget.14893.
- [60] P. Zhan, B. Zhang, G. min Xi, Y. Wu, H. bing Liu, Y. fang Liu, W. jian Xu, Q. qing Zhu, F. Cai, Z. jun Zhou, Y. ying Miu, X. xia Wang, J. jia Jin, Q. Li, L. ping Qian, T. feng Lv, Y. Song, PRC1 contributes to tumorigenesis of lung adenocarcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Mol. Cancer.* 16 (2017) 1–15. doi:10.1186/s12943-017-0682-z.
- [61] J. Chen, M. Rajasekaran, H. Xia, X. Zhang, S.N. Kong, K. Sekar, V.P. Seshachalam, A. Deivasigamani, B.K.P. Goh, L.L. Ooi, W. Hong, K.M. Hui, The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway, *Gut.* 65 (2016) 1522–1534. doi:10.1136/gutjnl-2015-310625.
- [62] C. Dominguez-Brauer, K.L. Thu, J.M. Mason, H. Blaser, M.R. Bray, T.W. Mak, Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies, *Mol. Cell.* 60 (2015) 524–536. doi:10.1016/j.molcel.2015.11.006.

謝辞

本研究を行うにあたり、数多くの方々のご協力を賜りました。まず研究の進め方や有益な議論、また今後研究を進めていく上での考え方など、懇切丁寧に直接ご指導いただきました、京都大学大学院生命科学研究准教授 増田誠司博士には心より御礼申し上げます。本研究を行う機会を与えて頂き、また多くの建設的な助言を頂いた京都大学大学院生命科学研究科教授 片山高嶺博士に心より感謝の意を表します。京都大学大学院生命科学研究科教授 永尾雅哉博士、同准教授 神戸大朋博士、同助教 加藤紀彦博士には、様々な機会に触れ、数多くの助言を頂きました。深く感謝致します。

大阪大学大学院情報科学研究科准教授 瀬尾茂人博士には、様々なバイオインフォマティクス解析につきまして多大なるご協力とご助言を頂きました。心より御礼申し上げます。京都大学大学院生命科学研究科教授 松本智裕博士には、細胞質分裂の解析に必須であったプラスミドをご供与頂きました。深く感謝致します。Robin Reed 博士には TREX 複合体構成因子ならびに NXF1 に対する抗血清を頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力ならびに有意義な議論を頂きました、京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学の皆様に深く感謝致します。特に原田光太郎さん、池田宥哉さん、吉岡英恵さんには多くの実験にご協力頂きました。大変有難うございました。本研究の先駆けとなる研究を実施して下さった山崎智弘氏（現北海道大学）にも深く感謝致します。皆様のご協力なしにはこの論文は完成しませんでした。研究を行うにあたり、研究室での様々な雑務を行って頂いた、事務補佐員、清水久美子氏と嶋林かほる氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、長期にわたり研究に専念できる環境を与えて頂き、応援し続けてくれた両親に、心より感謝致します。

令和2年1月21日

藤田 賢一

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

Ken-ichi Fujita, Tomohiro Yamazaki, Kotaro Harada, Shigeto

Seno, Hideo Matsuda, Seiji Masuda.

URH49 exports mRNA by remodeling complex formation and mediating the NXF1
-dependent pathway.

BBA - Gene Regulatory Mechanisms., in press, doi: 10.1016/j.bbagrm.2020.194480