

U snRNA の成熟と分解の
分子機構の研究

川本 崇仁

目次

要旨	1
序論	2
1. mRNA 前駆体 (pre-mRNA) の生物学的な存在意義	2
1-1. Pre-mRNA の生物学的な存在意義	2
1-2. Pre-mRNA の発見	4
1-3. Pre-mRNA スプライシングの生物学的意義	5
2. Pre-mRNA スプライシング反応	6
2-1 Pre-mRNA スプライシング反応	6
2-2 Pre-mRNA スプライシング反応における U snRNA の重要性	10
3. U snRNP 成熟過程	12
3-1 U snRNA・U snRNP の発見	12
3-2 U snRNP の成熟過程	14
3-3 真核生物における U snRNA の 3'末端形成	16
3-4 Pre-U snRNA 3'-end trimming 反応の起こる場	20
3-5 ヒト Trimmer	23
3-6 ヒト U snRNA の品質管理	24
4. 研究目的	25
研究結果	26
1. U1 snRNA 前駆体を基質 RNA とした <i>in vitro</i> 3'-end trimming アッセイ系の構築	26
2. HNE 中の Trimmer 精製手法の検討	30
3. HNE 中の Trimmer の精製	32

4. HNE 中の Trimmer の同定	35
5. ヒト培養細胞において ISG20, EXO10 が Trimmer として機能するかの検証	38
6. ヒト培養細胞において RNA exosome complex が Trimmer として機能するかの検証	43
7. ヒト培養細胞において ISG20 と EXO10 が U snRNA を分解するかの検証	46
考察	50
1. ヒト U snRNA の品質管理	50
2. ヒト U snRNA の生合成過程と品質管理	50
3. ヒト U snRNA に対する TOE1 の役割	52
4. ヒト U snRNA に対する RNA exosome complex の役割	53
5. U snRNA に対する ISG20 の役割	54
6. ISG20 と RNA exosome complex によるヒト U snRNA の分解	56
7. <i>In vitro</i> 反応系を基盤とした新規因子の同定, およびその限界	57
8. 総合的考察	58
材料と手法	62
引用文献	76
謝辞	89

要旨

真核生物中に複数存在する U snRNP は、それらが触媒する pre-mRNA スプライシング反応に必須である。したがって、U snRNP の成熟過程、および品質管理機構についての正しい知識は、pre-mRNA スプライシング反応のより深い理解に繋がるだろう。

本研究は、ヒト U snRNP 成熟過程の一つである「pre-U snRNA の 3'-end trimming」を行う因子 (Trimmer) の同定を当初の目的としたが、その達成前に別グループより deadenylase TOE1 が Trimmer として機能すると報告され、本研究の新規性は損なわれてしまった。しかしながら、TOE1 を唯一の Trimmer とした場合、過去の複数の報告と矛盾することに気付いた。

そこで一切の先入観を排した上で、ヒト Trimmer を同定することを目指した。その手始めとして 3'-end trimming の試験管内反応系を構築し、その反応が TOE1 に依存したものかを評価した。その結果、活性の一部は TOE1 に依存しておらず、少なくとも *in vitro* で Trimmer として機能できる因子が TOE1 以外にも存在することが示唆された。次に、*in vitro* の活性を司るタンパク質を生化学的手法により精製した。その結果 Trimmer の候補タンパク質として、ISG20、および EXO10 を含む RNA exosome complex を獲得した。しかしながら、各因子のノックダウン条件下のヒト培養細胞において、U1 snRNA の 3'末端形成への影響は認められず、それらを Trimmer とする結果は得られなかった。その代わりに、U snRNA と、通常分解されると考えられる U1 variant の各新生鎖が顕著に蓄積した。これらの結果は、ISG20 や EXO10、また EXO10 を含む RNA exosome complex が、3'-end trimming ではなく、分解を介して U snRNA の品質管理を行うことを示唆した。本研究は当初の目的は達成できなかったが、U snRNA の生合成に関わると考えられる新規因子の同定に成功した。

序論

本研究は、ヒト U snRNP 成熟過程の一つである「U snRNA 前駆体の 3'-end trimming 反応」の新規実行因子の同定を当初の目的とした。序論では U snRNP が適切な成熟過程を経て機能を獲得することの重要性について、過去報告のあるさまざまな実験結果を交えて言及することで、当該分野における本研究の位置づけを述べる。

1. mRNA 前駆体 (pre-mRNA) の生物学的な存在意義

1-1 Pre-mRNA の生物学的な存在意義

私たちヒトは約十兆もの膨大な数の「細胞」で構成される。また、その 1 つ 1 つは「細胞核」と呼ばれる、遺伝物質である DNA 分子の貯蔵庫としての側面を持つ構造体を含む。それら遺伝物質の中でも、「タンパク質」のような、さまざまな生命現象に関与する因子を合成するための情報は「遺伝子」と呼称される。それゆえ「遺伝子」はしばしば生命の設計図とも表現される。しかしながら、「遺伝子」の DNA 情報を直接用いて「タンパク質」が合成されるわけではない。その仲介役として、DNA のコピーである「伝令 RNA [messenger RNA (mRNA)]」が存在する。

これらの遺伝子発現プロセスを最も端的に示した概念が、「分子生物学のセントラルドグマ」である (Crick 1958)。1958 年に Crick F. H. C. が提唱したこの概念に従えば、タンパク質をコードする DNA 情報は、DNA → mRNA → タンパク質の順に伝達し、最終的に生物自身を形作る膨大な数のタンパク質が合成される (Crick 1958)。この概念がタンパク質発現の全てを網羅するのであれば、タンパク質とそれらをコードする DNA と mRNA はそれぞれ同等数存在するはずだが、実際はそうではない。2003 年に完了したヒ

トゲノム計画は、ヒトの全 DNA 配列だけでなく、タンパク質をコードする遺伝子数が 2 万種ほどしかないことを明らかにした。この数は、20 万種とも言われるヒトタンパク質数と比べ圧倒的に少ないものであった。

では、何故遺伝子数の約 10 倍も存在するタンパク質の合成が可能なのか？ その一端を担うのが、「mRNA 前駆体 [precursor mRNA (pre-mRNA)]」の存在である。実は前述セントラルドグマにおける mRNA は、pre-mRNA と呼ばれる DNA のほぼ完全なコピーが加工（スプライシング）され、生成したものであることが後に明らかとなった（図 1.1）。従ってこの加工パターンが幾通りも存在すれば、限られた数の遺伝子からより多くの mRNA やタンパク質の産生が可能となる。

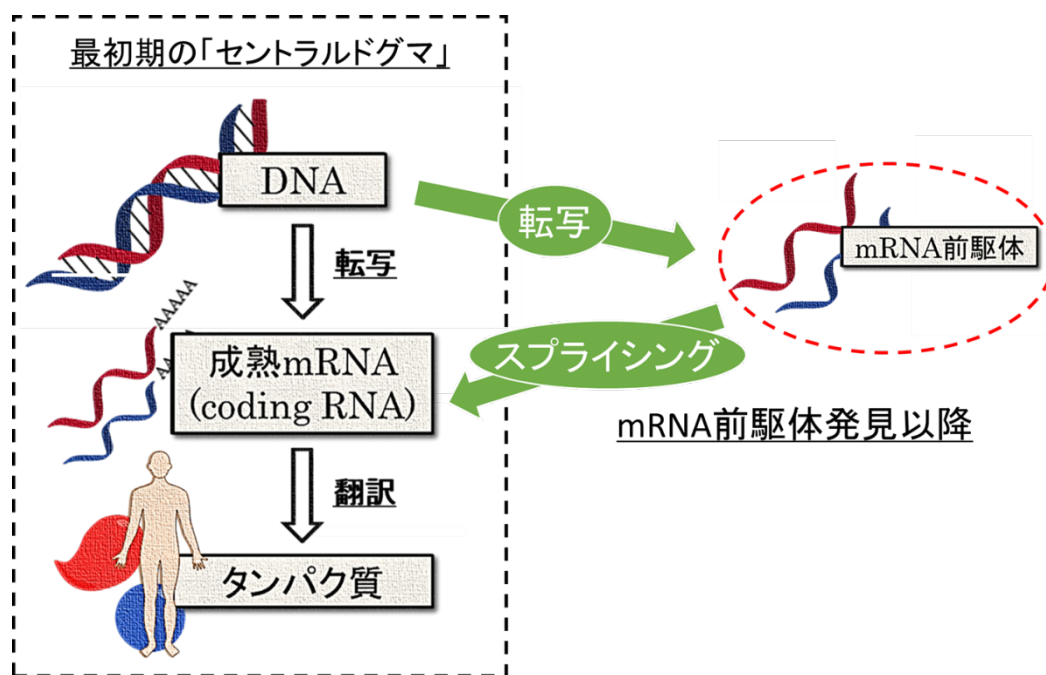
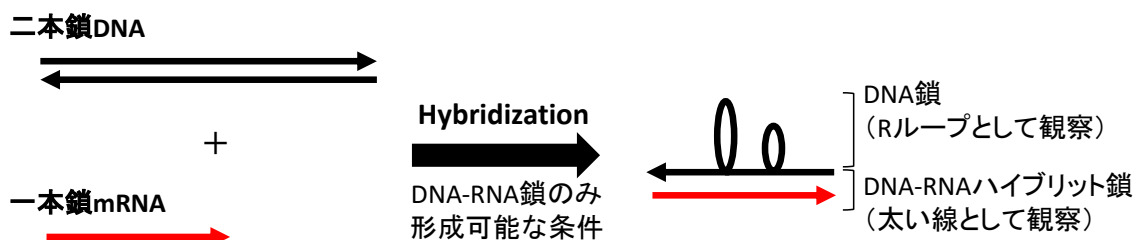


図 1.1 mRNA 前駆体 (pre-mRNA) 発見前後の「セントラルドグマ仮説」の比較

1-2 Pre-mRNA の発見

1970年代後期 Sharp P. A., また Roberts R. J.のグループは, アデノウイルス-2 (Ad-2) を感染させたヒト培養細胞から抽出した Ad-2 Hexon mRNA と, Ad-2 Hexon をコードする領域を含む DNA 断片を試験管内 (*in vitro*) でハイブリダイズさせた (図 1.2) 後, その構造を電子顕微鏡で観察した (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). この実験は, 相補的な配列を持つ DNA-RNA ハイブリット鎖の形成は可能だが, DNA-DNA ハイブリット鎖は形成できない条件 (in 70% formamide and 0.2–0.7 M NaCl; reviewed in Berk 2016) で行われた. それゆえ, DNA-RNA 鎖は太い線として, DNA 鎖は細い線 (R ループ) として観察される (図 1.2). 各グループの実験結果は, Hexon DNA-mRNA 鎖から成る太い線の途中に, 複数の R ループが存在することを見出した (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). これは R ループとして観察された DNA 配列が, mRNA 生成時には除去されていることを示した. さらに同様の手法により, 単一 DNA とハイブリダイズ可能な mRNA が複数存在すること, それら DNA-mRNA 鎖内の R ループの位置が mRNA の種類ごとに異なることが明らかとなった (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977). 以上のことは, mRNA よりもいくらか長い前駆体 (pre-mRNA) の存在のみならず, pre-mRNA から mRNA が産生する機構 (pre-mRNA スプライシング) や, pre-mRNA 内の特定配列を取捨選択することで複数の mRNA (スプライシングバリエント) の産生が可能であることを示唆し, その後実証された.



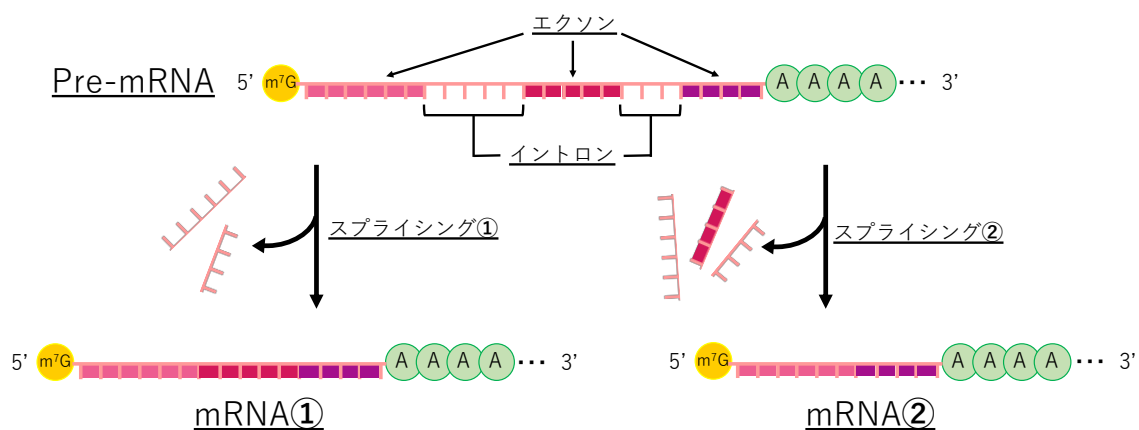
出典: Berk 2016, Figure 1

図 1.2 DNA-mRNA ハイブリット鎖内に見られる R ループ

1-3 Pre-mRNA スプライシングの生物学的意義

真核生物において転写により生じた pre-mRNA は、タンパク質をコードする領域（エクソン）がコードしない領域（イントロン）により分断された状態で存在する。それゆえ、タンパク質合成のためには、pre-mRNA 内のイントロンを除去し、エクソンを連結することで、mRNA を産生する必要がある。これは一般に、「pre-mRNA スプライシング」と呼ばれる機構である。

「Pre-mRNA スプライシング」は、その機構を介して産生する mRNA の多様性をもたらす。多くの場合、単一 pre-mRNA 内には複数のエクソンが存在しており、それゆえ各エクソンの組み合わせの数だけ mRNA の産生が可能になる（選択的スプライシング; 図 1.3）。例えばヒトゲノム中には、233,785 個のエクソンと 207,344 個のイントロンが見出されており、これらを一遺伝子当たりで換算すると、平均 8.8 個のエクソンと 7.8 個のイントロンが存在することになる (Sakharkar et al. 2004)。これら多数存在するエクソンの取捨選択により産生する mRNA が膨大な数になることは容易に想像できる。また、ヒトタンパク質数に対し、それらをコードする DNA 数が 1/10 程度しかないことから、選択的スプライシングの重要性を窺い知ることができる。



出典: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/eukaryotic-pre-mrna-processing>

図 1.3 選択的スプライシング反応の模式図

2. Pre-mRNA スプライシング反応

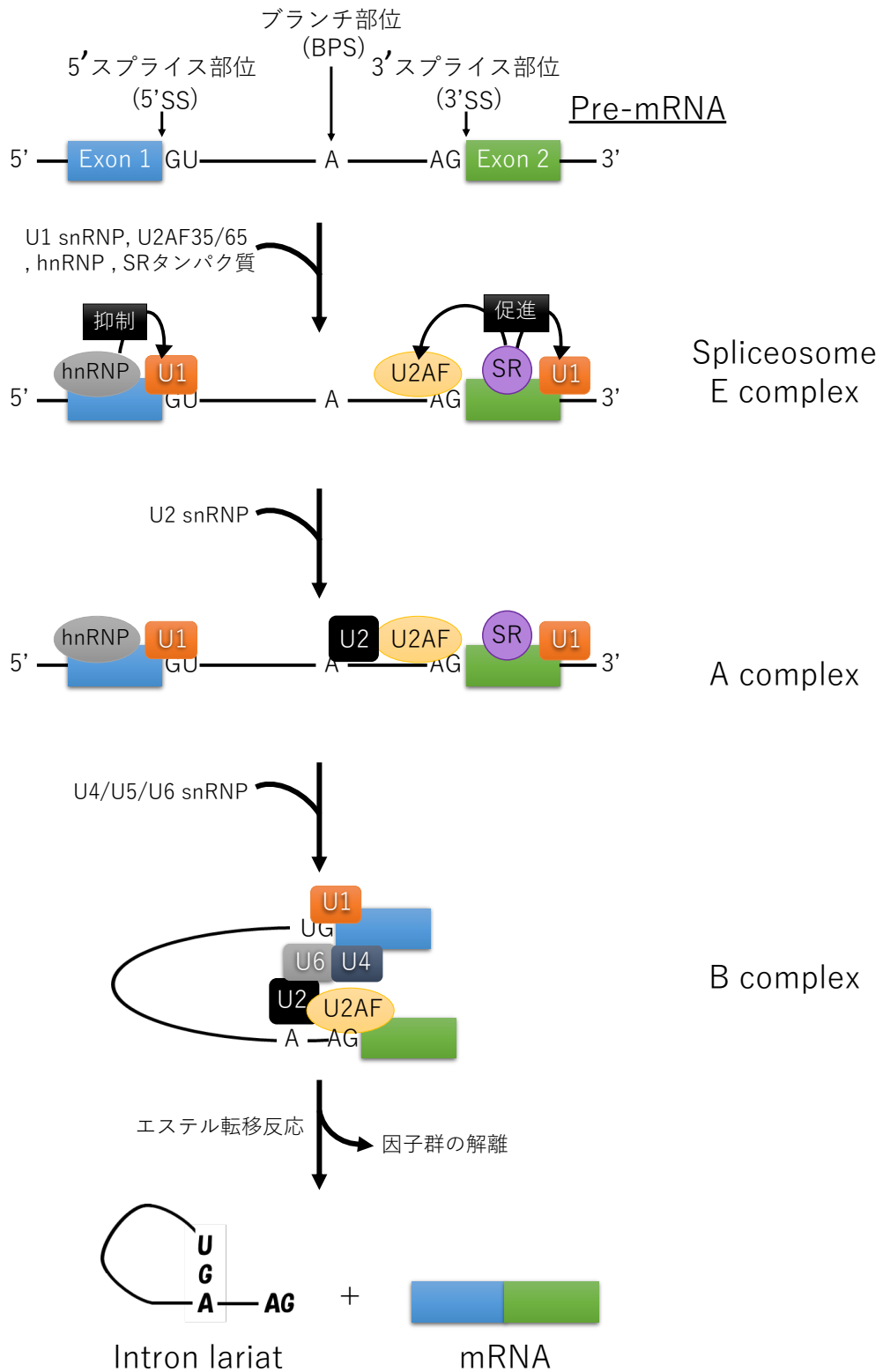
2-1 Pre-mRNA スプライシング反応

Pre-mRNA スプライシング反応には SR タンパク質や hnRNP など、さまざまな因子が関与するが (reviewed in Li et al. 2007), 実質的に反応を触媒するのはスプライソソームと呼ばれる複数のタンパク質と RNA から成る巨大複合体である (Brody & Abelson 1985; Grabowski et al. 1985). その主要構成因子である U snRNP は, 特定のタンパク質と RNA [Uridine-rich small nuclear RNA (U snRNA)] の複合体であり, 主に 5 種類存在する (U1, U2, U4, U5, U6 snRNP). Pre-mRNA スプライシング反応とは, 各 U snRNP の逐次的な集積と解離により, pre-mRNA 上のスプライソソームの形態を継時的に変化させることで進行する反応である (図 1.4A; reviewed in Li et al. 2007).

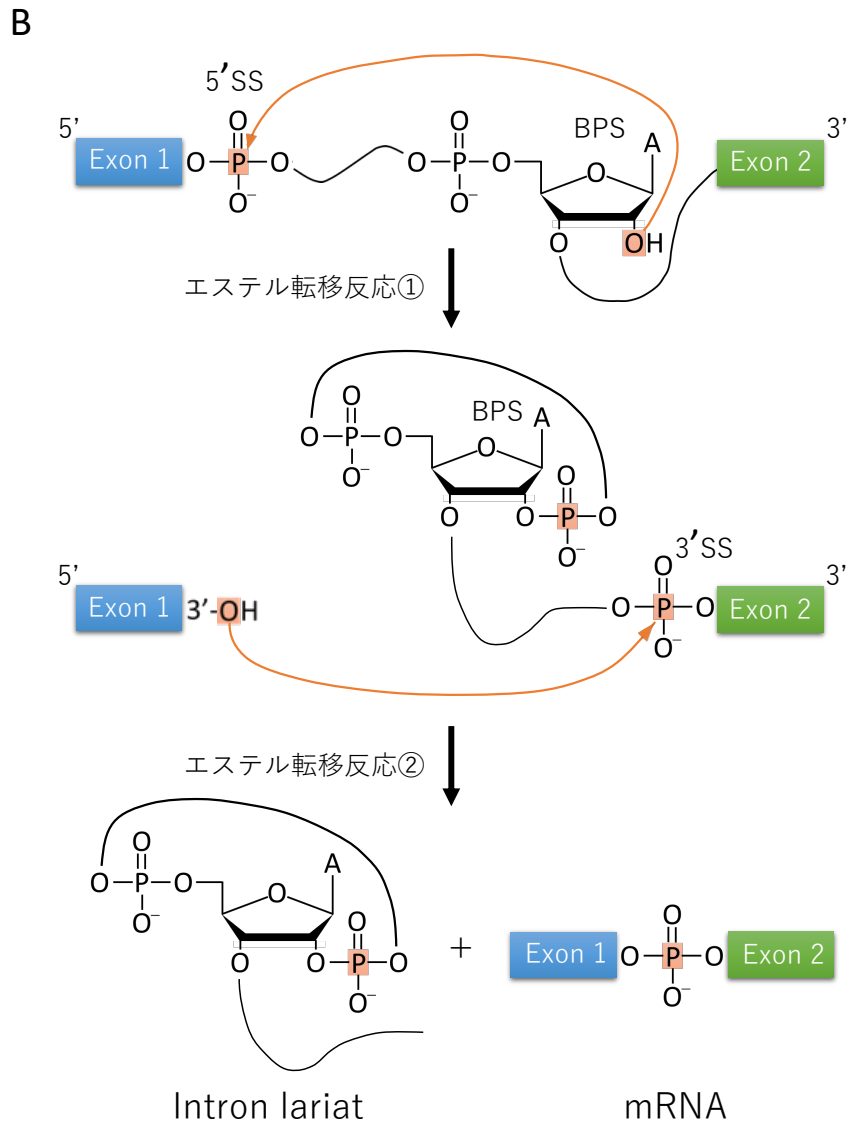
Pre-mRNA スプライシング反応はまず, U1 snRNP と U2AF35/65 が pre-mRNA 上のエクソン-イントロン間に存在する 5'スプライス部位 (5'SS: GU nucleotides) と (Du & Rosbash 2002), 3'スプライス部位 (3'SS: AG nucleotides) に結合し (Zuo & Maniatis 1996; Berglund et al. 1998; Voith von Voithenberg et al. 2016), スプライソソーム E complex を形成することから始まる. その際 U2AF65 との相互作用を介し, U2 snRNP も同時にリクルートされるとも考えられている (Berglund et al. 1998). 次に pre-mRNA 上の U2 snRNP がイントロン内のブランチ部位 (BPS) に結合することでスプライソソーム A complex を形成し (MacMillan et al. 1994), 次いで U2 snRNP との相互作用を介して U5-U4/U6 tri-snRNP が呼び込まれることでスプライソソーム B complex が形成する (Sun & Manley 1995). その後 U1, U4 snRNP が解離することで触媒活性を発揮できる形態 (スプライソソーム B* complex) へと変化し (Raghunathan & Guthrie 1998), 二段階のエステル転移反応, すなわち BPS-5'SS 間の反応によるエクソン-イントロン間の切り離しと, 5'SS-3'SS 間の反応によるエクソン同士の連結が起こる (図 1.4B; Ruskin et al. 1984; Domdey et al. 1984). 以上の機構を介し, 最終的に pre-mRNA から mRNA と Intron lariat が生成する (図 1.4B).

真核生物において、これら一連の過程は pre-mRNA の大部分（約 99.5%）で起こる (reviewed in Turunen et al. 2013). また、極めて特殊な 5'SS, 3'SS, BPS 配列を有する残りの pre-mRNA（約 0.5%）も、ほぼ同一過程のスプライシングを受ける (Dietrich et al. 1997; Burge et al. 1998; reviewed in Turunen et al. 2013). しかしながら、マイナーなスプライシング反応を触媒するスプライソソームの構成因子はわずかに異なる (reviewed in Turunen et al. 2013). U1, U2, U4, U5, U6 snRNP から成るメジャースプライソソームに対し、マイナーなスプライソソームは U11, U12, U4atac, U5, U6atac snRNP で構成される (reviewed in Turunen et al. 2013). U11, U12, U4atac, U6atac snRNP は、それぞれ U1, U2, U4, U6 snRNP の機能的アナログであるが、含まれる U snRNA の配列は異なる (reviewed in Turunen et al. 2013). この U snRNA の配列の違いは、極めて特殊な 5'SS, 3'SS, BPS を持つ pre-mRNA の認識し、それらのスプライシングを可能にする (Kolossova & Padgett 1997; Frilander & Steitz 1999).

A



出典: Li et al. 2007, Box 1



出典: Shi 2017, Figure 1a

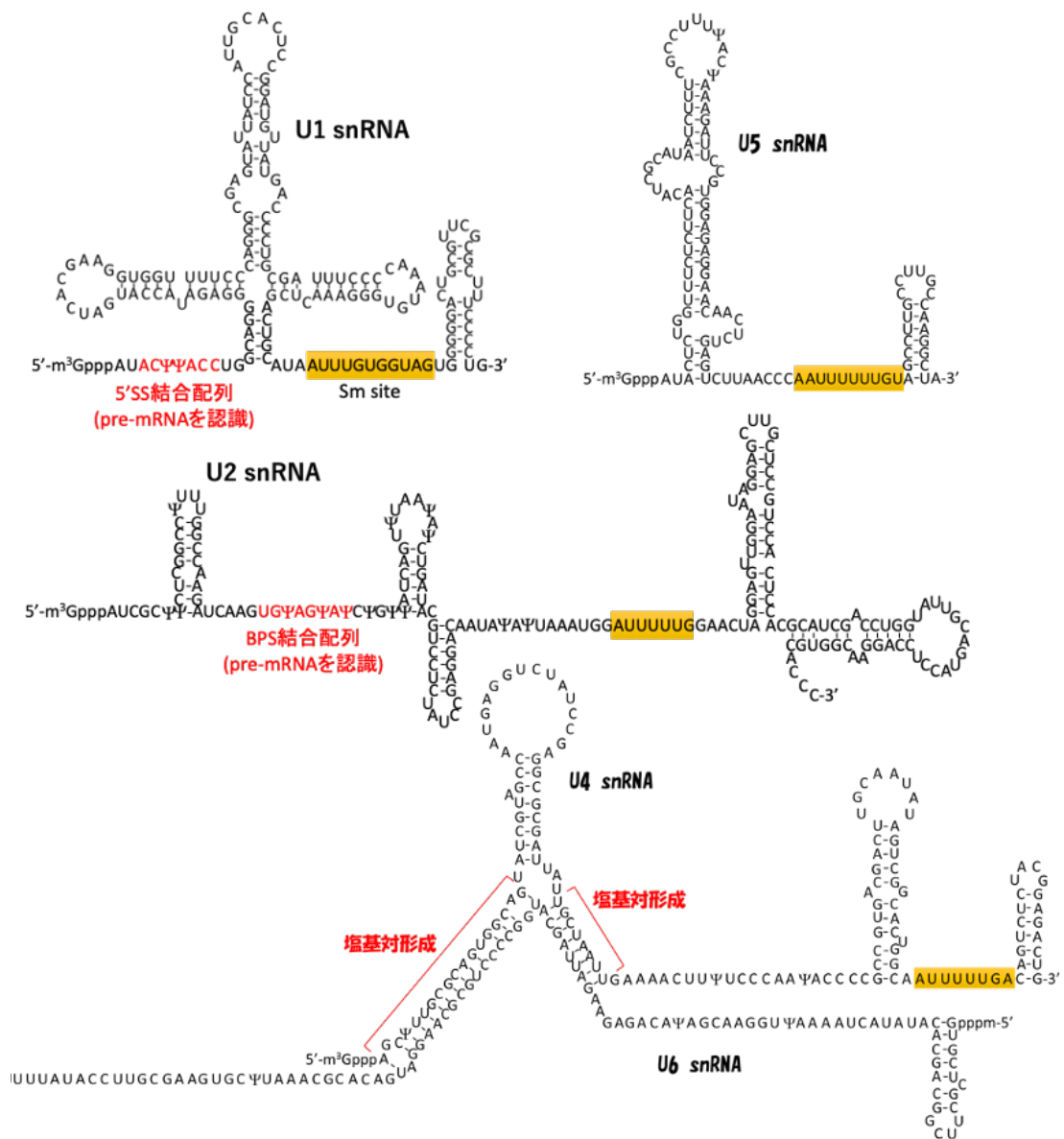
図 1.4 Pre-mRNA スプライシング反応

- (A) スプライソソームの形態変化に伴い進行する pre-mRNA スプライシング反応
- (B) 二段階のエステル転移反応により生成する mRNA と Intron lariat

2-2 Pre-mRNA スプライシング反応における U snRNA の重要性

スプライソソームの主要構成因子である U snRNP は、それぞれに特有なタンパク質と RNA (U snRNA) の複合体である (reviewed in Matera & Wang 2014). 主に 5 種存在する U snRNP (U1, U2, U4, U5, U6 snRNP) は、各 RNA 成分である U snRNA (U1, U2, U4, U5, U6 snRNA) の種類により分類される (reviewed in Matera & Wang 2014). これらの U snRNA はその共通配列から、Sm-class snRNA とも呼称される (reviewed in Matera & Wang 2014).

前述 2-1 の通り、pre-mRNA スプライシング反応は、各 U snRNP の pre-mRNA 上への逐次的な集積と解離によりスプライソソームの形態を徐々に変化させることで進行する (図 1.4A). この集積と解離は、U snRNP と pre-mRNA, また他の U snRNP との相互作用により実現するが、中でも U snRNA は重要な要素である. なぜなら U snRNP は、それぞれに特有な U snRNA の配列の一部を介した塩基対形成により、pre-mRNA や他の U snRNP と相互作用するからである (図 1.5; reviewed in Adachi & Yu 2014). 従って、U snRNA の異常は U snRNP 自体の機能不全、延いては遺伝性疾患の原因となり得る (reviewed in Matera & Wang 2014). 例えば、U4 snRNP の機能的アナログである U4atac snRNP の機能欠損、およびその RNA 成分である U4atac snRNA 内の変異は、出生前後において重度の発達遅滞、小頭症、骨格異常を示す疾患 (Taybi-Linder 症候群) を引き起こす (He et al. 2011). また、U snRNA の成熟過程の一つである 3'-end trimming を行うタンパク質 (TOE1) の機能不全が、特定の神経変性疾患 [pontocerebellar hypoplasia type 7 (PCH7)] の原因となると報告されている (Lardelli et al. 2017). 従って、スプライシング反応を円滑に進める上で、U snRNP とその RNA 成分である U snRNA の適切な機能は不可欠である.



- Ψ. シュードウリジン(ウリジンの異性体)
- m³Gppp.トリメチルグアノシンキャップ (U1, U2, U4, U5 snRNAに特有な5'末端構造)
- mppp.モノメチルキャップ (U6 snRNA特有な5'末端構造)

出典: Karijolich & Yu 2010, Figure 2

図 1.5 ヒト U snRNA の二次構造予測

3. U snRNP 成熟過程

3-1 U snRNA・U snRNP の発見

U snRNA は 1968 年、ヒト培養細胞（HeLa 細胞）の核において発見された (Weinberg & Penman 1968). Weinberg R. A. と Penman S. は、HeLa 細胞中の RNA を ^3H -uridine により放射標識後、細胞を核・核小体・細胞質に分画し、各組織由来の放射標識 RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分離し解析した (Weinberg & Penman 1968). その結果、核においてのみ豊富に、また安定に存在する、100-180 nt 程度の長さの RNA を 6 種見出した (Weinberg & Penman 1968). しかしながら、後に U snRNA と命名されるこれら RNA の機能は、発見から 10 年程は謎のままであった.

U snRNA の機能を明らかにする糸口となったのは、1974 年に成された U1 snRNA 配列の決定である (Reddy et al. 1974). この時決定された配列から、U1 snRNA が pre-mRNA 内のエクソンとイントロンの境界領域に対し相補的な配列を持つことが分かり、U1 snRNA の pre-mRNA スプライシング反応への関与が予想された (Reddy et al. 1974; reviewed in Lerner et al. 1980). その後 Pre-mRNA と U snRNA の相互作用は 1978 年、ラット肝臓核由来の hnRNP complex を精製実験により示された (Flytzanis et al. 1978). Flytzanis C. らは、pre-mRNA の別称である hnRNA とタンパク質の複合体 (hnRNP complex) 精製画分中に、U snRNA が豊富に含まれることを示した (Flytzanis et al. 1978).

その後 1979 年には、自己免疫性リウマチ性疾患の一種である lupus erythematosus (LE) 患者由来の自己抗体（抗 Sm 抗体）が、U snRNA を効率よく沈降させることが分かり、U snRNA は特定のタンパク質（Sm タンパク質）との複合体として機能することが予測された (Lerner & Steitz 1979). このことは、HeLa 細胞の全細胞抽出物中で起こる pre-mRNA スプライシング反応を、前述自己抗体が阻害するという実験結果により証明された (Padgett et al. 1983).

1980 年代に入ると pre-mRNA スプライシングは、複数の U snRNP から成るスプ

ライソソームの pre-mRNA 上での逐次的な形態変化に伴い、進行する反応（図 1.4A）であることを示す実験結果が立て続けに報告された。まず 1984 年、*S. cerevisiae* の pre-mRNA スプライシングは、二段階の反応（図 1.4B）を介して進行することが *in vitro* および *in vivo* の両方で示された（Ruskin et al. 1984; Domdey et al. 1984）。また、これらの反応はエステル転移反応であることが分かった（図 1.4B; Ruskin et al. 1984）。その翌年には、*in vitro* スプライシング反応の、pre-mRNA、および各エステル転移反応後の RNA（図 1.4B）を含むタンパク質複合体の大きさが異なることが、酵母とヒトのそれぞれで示された（Brody & Abelson 1985; Grabowski et al. 1985）。これらの実験結果は、pre-mRNA 上のスプライソームの形態が、pre-mRNA スプライシング反応に伴い変化することを示唆した（Brody & Abelson 1985; Grabowski et al. 1985）。加えて 1986 年には、U1 snRNA の 5'SS 結合配列内の変異が、pre-mRNA スプライシング反応を阻害することがヒト培養細胞においても示された（Zhuang & Weiner 1986）。

これらに代表される実験結果から、今日の「pre-mRNA スプライシング反応はスプライソームにより触媒される」という、生物学の極めて基礎的な発見に至った（図 1.4）。

3-2 U snRNP の成熟過程

U snRNP やその RNA 成分である U snRNA は、転移 RNA [transfer RNA (tRNA)] やリボソーム RNA [ribosomal RNA (rRNA)] などと同様、複数の成熟過程を経て機能を獲得する (reviewed in Hopper & Nostramo 2019). 真核生物における U snRNP 成熟過程はトリパノソーマや出芽酵母といった例外はあるものの、核-細胞質間輸送と協調して起こる (図 1.6; reviewed in Matera & Wang 2014).

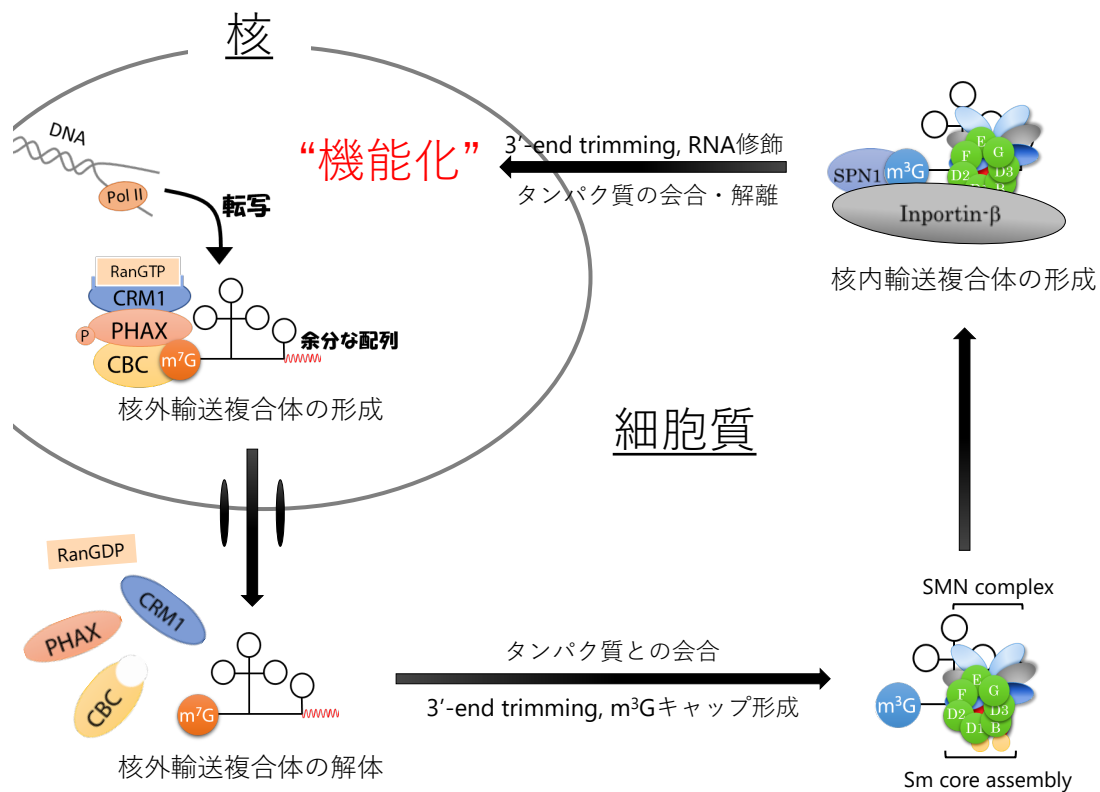
高等真核生物における U snRNP の成熟過程は U6 を除き、核内の RNA polymerase II (Pol II) による U snRNA の転写から始まる (Murphy et al 1982; Reddy 1988; Henry et al. 1998). 転写直後の U snRNA 前駆体 (pre-U1, -U2, -U4, -U5 snRNA) は 5'末端に 7-methylguanosine (m^7G) キャップ構造 (Hamm & Mattaj 1990), 3'末端に数塩基程度の余分な配列を持つ (Uguen & Murphy 2003; Baillat et al. 2005). 次に, m^7G キャップ構造に Cap Binding Complex (CBC) や Phosphorylated adaptor for RNA export (PHAX) などが会合することで核外輸送複合体を形成し, 細胞質へと輸送される (Ohno et al. 2000).

細胞質へと輸送された核外輸送複合体は、構成因子である PHAX の脱リン酸化などを引き金に解体される (Ohno et al. 2000). その後、恐らくフリーとなった各 pre-U snRNA の Sm 配列への Gemin 5 の会合を契機に SMN 複合体を形成 (Massenet et al. 2002; Yong et al. 2010), 7 つの Sm タンパク質から成るリング構造の形成 (Sm core assembly) (Kambach et al. 1999), TGS1 によるキャップ構造のトリメチル化 (m^3G キャップ構造の形成) (Mouaikel et al. 2003), pre-U snRNA 3'末端の余分な配列の大部分の除去 (細胞質内での 3'-end trimming) (Kleinschmidt & Pederson 1987), および m^3G キャップ構造を基盤とした核内輸送複合体の形成という一連の過程を経て, 核内に再輸送される (Mattaj 1986; Palacios et al. 1997; Huber et al. 1998).

核内に再輸送された後, SMN の解離 (Neubauer et al. 1998; reviewed in Matera & Wang 2014), pre-U snRNA 3'末端の余分な配列の除去 (核内での 3'-end trimming) (Madore

et al. 1984; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990), 各 U snRNA の種類に応じたタンパク質との会合 (Nesic et al. 2004; reviewed in Matera & Wang 2014), small Cajal body-specific RNA (scaRNA) などを経た U snRNA 特定配列の RNA 修飾 (図 1.5; Jády et al. 2003) を経て U snRNP が成熟化し、スプライソソームの構成因子として機能する。

以上のように U snRNP 成熟過程 (図 1.6) やその機能 (図 1.4) はおよそ明らかとなっている一方、近年になって主に核に局在する因子 (TOE1) が 3'-end trimming 反応の担い手であること (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018) や、U1 snRNP がスプライシング反応以外にも pre-mRNA を異常なポリ A 化から保護する役割を担うこと (Kaida et al. 2010) が明らかとなるなど、U snRNP 成熟過程やその機能についての理解は未だに広がり続けている。



出典: Matera & Wang 2014, Figure 2

図 1.6 高等真核生物における U6 以外の U snRNP 成熟過程

3-3 真核生物における U snRNA の 3'末端形成

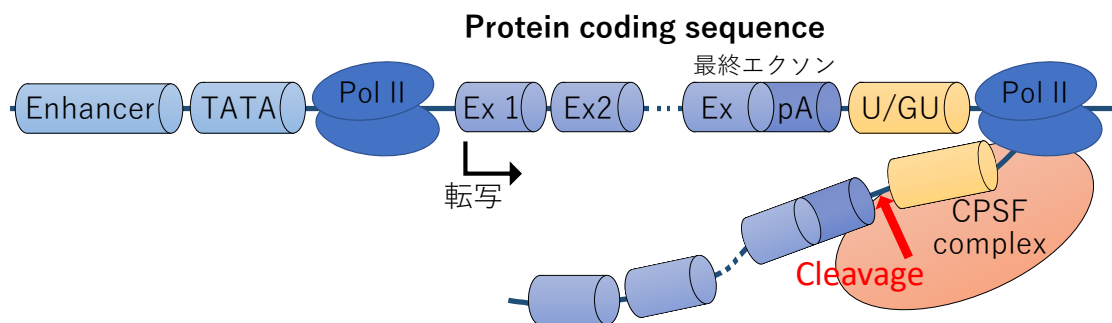
Pre-U snRNA は、U snRNA の発見 (Weinberg & Penman 1968) から 8 年後の 1976 年に初めて同定された (Eliceiri & Sayavedra 1976)。Eliceiri G. L. と Sayavedra M. S. は、U snRNA 発見時の手法 (Weinberg & Penman 1968) を RNA の放射標識時間を短くして行い、U snRNA と酷似した特徴を持つが、それらより数塩基長い RNA が HeLa 細胞の細胞質中に存在することを示した (Eliceiri & Sayavedra 1976)。また後の研究から、pre-U snRNA の生成は mRNA と類似するが、U snRNA に特有の転写終結機構に起因することが明らかとなった (図 1.7A, B; reviewed in Matera & Wang 2014)。同時に、pre-U snRNA の 3'末端に存在する余分な配列の除去機構、すなわち pre-U snRNA の 3'-end trimming についての研究も進められてきた。これら U snRNA の 3'末端形成についての研究は、ヒトから酵母に至るまで、さまざまな真核生物で行われてきた。その結果、哺乳類と酵母でそれら機構に若干の違いがあることが明らかとなった (reviewed in Matera & Wang 2014)。

S. cerevisiae において U snRNA の転写終結は、RNase III class に属する endonuclease Rnt1 と (Chanfreau et al. 1997; Seipelt et al. 1999)、RNA polymerase II transcription termination factor の一種である Nrd1 に依存すると考えられている (Steinmetz et al. 2001)。まず Nrd1 は RNA Pol II の最大サブユニットである Rpb1 との相互作用を介し、U snRNA 遺伝子下流の特定配列 (5'-CTTTGTAAAACGGT-3') に転写依存的に結合する (Steinmetz et al. 2001)。その後 Nrd1 との直接的相互作用により Rnt1 が呼び込まれ、endoribonucleolytic な切断が起こると考えられている (Chanfreau et al. 1997; Seipelt et al. 1999; Steinmetz et al. 2001)。この過程で生じた pre-U snRNA は 3'末端に数十～数百塩基の余分な配列を持つ (Chanfreau et al. 1997)。それら余分な配列は、恐らく Nrd1 との相互作用を介して呼び込まれる核 RNA exosome complex、またはその 3'-exonuclease 活性を担うタンパク質 [EXOSC10 (EXO10)] による 3'-end trimming 反応により除去され、成熟 U snRNA の長さとなる (Allmang et al. 1999; Van Hoof et al. 2000a; Steinmetz et al. 2001; Mitchell et al. 2003)。

また pre-U4 と pre-U5 snRNA の場合のみ、EXO10 だけではなく 3'-exonuclease Rex2p が 3'-end trimming 反応を触媒するという報告もある (Van Hoof et al. 2000b). なお、酵母の U snRNA は細胞質へ輸送されないため、3'-end trimming 反応はすべて核内で起こると考えられている (Murphy et al. 2004).

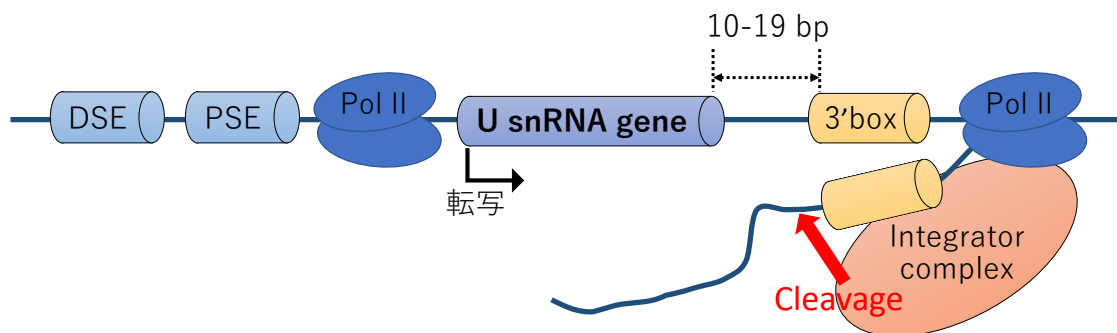
哺乳類においては、U snRNA 遺伝子領域の 9-19 nt 下流に存在する 3'box 配列 (5'-GTTTN₀₋₃AAAPuNNAGA-3', Pu: purine nucleotide) の認識、およびその上流での endoribonucleolytic な切断を、Integrator complex と呼ばれる巨大複合体が行うと考えられている (図 1.7B; Uguen & Murphy 2003; Baillat et al. 2005). この切断位置、すなわち U snRNA の転写終結位置は、これまで検出された pre-U snRNA の長さが成熟型と極めて近いこと (Eliceiri & Sayavedra 1976; Madore et al. 1984; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990) から、U snRNA 3'末端近傍で起こると考えられる。このことは、特定の遺伝子座 (図 1.7C; chr1:16895980-16896143 on GRCh38/hg38) に位置するヒト U1 snRNA プロモーター配列とターミネーター配列を用いた非 U snRNA 遺伝子の発現実験からも支持される (図 1.7D 左; Uguen & Murphy 2003). HeLa 細胞で発現した非 U snRNA の 3'末端位置を、RNase protection assay により検出したこの実験は、U1 snRNA ターミネーター内の 3'box 配列の 3-5 nt 上流で切断が起こることを明らかにした (図 1.7D 左; Uguen & Murphy 2003). すなわち、この条件で発現する U1 snRNA は、転写直後には 7-5 nt の余分な配列を 3'末端に持つと推察される (図 1.7D 右; Uguen & Murphy 2003). これら余分な配列は *S. cerevisiae* と同様、3'-exoribonucleolytic に分解されると考えられているが、反応の実行因子は長い間不明であった。

(A) ヒト mRNA の転写とその終結機構



出典: Matera & Wang 2014, Figure 1

(B) ヒト U snRNA の転写とその終結機構



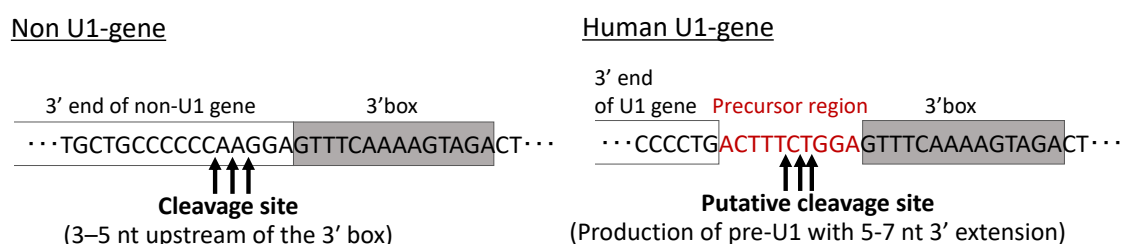
出典: Matera & Wang 2014, Figure 1

(C) 複数のヒト遺伝子座に存在する U1 snRNA 遺伝子とその 3'末端 (-30 nt) 配列

Locus	U1 3'-extra precursor sequences
chr1:16740516-16740679	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACCGTAC
chr1:16895980-16896143	ACTTTCTGGAGTTTCTAAAAGTAGACTGTA
chr1:146376807-146376970	ATTTTTGTAGTTTAAAGAACAGTCTGCACG
chr14:34546714-34546877	CCTTACTGGAAGTTGAAAGGTAGCTGTTAT
chr1:16514285-16514122	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTAC
chr1:16666948-16666785	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACCGTAC
chr1:143729570-143729407	ATTTTTGTAGTTTAAAGAATAGTCTACAC
chr1_KI270713v1_random:22024-21861	ACTTTCTGGAGTTTCAAAAACAGACTGTAC
chr14:34556389-34556226	CCTTACTGGAAGTTGAAAGGTAGCTGTTAT

Each chromosome and the loci number, and sequence information from UCSC genome database (Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly).

(D) 特定の遺伝子座のヒト U1 snRNA の予測転写終結位置



出典:Uguen & Murphy 2003, Figure 1C

図 1.7 ヒト U snRNA の転写終結に起因する pre-U snRNA の生成

- (A) mRNA コード領域上流には、転写促進のためのエンハンサー配列と TATA box 配列が、下流に転写終結のための GU-rich element (U/GU) が存在する。RNA polymerase II (Pol II) による mRNA の転写は、mRNA コード領域 3'末端の poly A signal (pA) と GU-rich 配列の間の、cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex による切断により終結する。なお Ex は pre-mRNA 内のエクソンを示す。
- (B) U snRNA と mRNA の転写とその終結機構は酷似する。両者は Pol II で転写されるだけでなく、U snRNA 遺伝子領域前後には、mRNA 転写時のエンハンサー、TATA box、U/GU に相当する、distal sequence element (DSE), proximal sequence element (PSE), 3'box が存在する。U snRNA の転写は、Integrator complex による 3'box 上流での切断により集結する。
- (C) ヒト U1 snRNA 遺伝子は複数の遺伝子座に存在するが、その 3'末端配列は、U1 snRNA 遺伝子領域の 9-19 nt 下流に存在する 3'box 配列も含め、異なっている。
- (D) 特定のヒト遺伝子座 (chr1:16895980-16896143) に位置するヒト U1 snRNA の、プロモーター配列 (DSE と PSE を含む遺伝子領域) とターミネーター配列 (3'box を含む遺伝子領域) により非 U snRNA 遺伝子 (152-bp) を HeLa 細胞で一過的に発現し、生成 RNA の 3'末端を RNase protection assay により検出した結果を元に、非 U snRNA の転写終結位置 (Cleavage site) を決定した (左図; Uguen & Murphy 2003)。また、左図より予想される U1 snRNA の転写終結位置を右図に示す。

3-4 Pre-U snRNA 3'-end trimming 反応の起こる場

ヒト U snRNP 成熟過程 (図 1.6) において, 「pre-U snRNA の 3'-end trimming 反応を行う因子 (Trimmer) は何か?」ということは, pre-U snRNA が発見されて以降, 長い間不明であった (Eliceiri & Sayavedra 1976). しかしながら複数の実験結果は, pre-U snRNA 内の前駆体配列の大部分が細胞質で除去され, 残りのわずかな配列は核内に再輸送された後除去されることを示唆した (図 1.8; Madore et al. 1984; Kleinschmidt & Pederson 1987; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990).

その根拠のひとつに, HeLa 細胞中の U1 snRNA についての pulse-chase 標識実験がある (Madore et al. 1984). この実験では, HeLa 細胞中の RNA を ³H-uridine により放射標識後, actinomycin 処理により ³H-uridine の転写時の取り込みを遮断した (Madore et al. 1984). その後 0, 25, 50 分間培養した細胞の核, または細胞質由来の放射標識 U1 snRNA を PAGE により分離し解析することで, 各組織における U1 snRNA の長さが転写後どう変化するかを評価した (Madore et al. 1984). その結果, 転写直後に成熟 U1 より長い RNA (pre-U1 snRNA) が両組織で検出されること, 両組織中の pre-U1 snRNA は転写後徐々に短くなり成熟型の長さに近づくこと, 核中の成熟 U1 近傍のバンド強度が転写後の時間経過に伴い増加する一方, 細胞質中のは減少することが明らかとなった (Madore et al. 1984). これらは, 核と細胞質の両方で 3'-end trimming が起こることだけでなく, 細胞質での反応を介して生成した成熟 U1, またはわずかな伸長配列を持つ pre-U1 snRNA が核内に再輸送された後, 必要に応じてさらなる 3'-end trimming を受けることを示唆した (Madore et al. 1984).

また, アフリカツメガエル卵母細胞を用いた pulse-chase 標識実験においても, 同様の結果が得られている. 卵母細胞の細胞質にさまざまな長さの 3'末端伸長配列を持つ放射標識ヒト pre-U1 snRNA を顕微注入し, 注入直後と一定時間経過後の核と細胞質に含まれる放射標識 RNA の長さを比較した (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). この

実験は、細胞質と核の両方で 3'-end trimming が起こることだけでなく、10-nt より長い伸長配列を持つ pre-U1 snRNA は細胞質での反応を受けにくいことを明らかにした (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). さらに成熟 U1 と 1-nt の伸長を持つ pre-U1 snRNA 以外、核内で検出されないことは、pre-U1 snRNA の 3'末端伸長配列の長さが 0-, または 1-nt 以外の場合、核内への再輸送が阻害されることを示唆した (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990).

加えて、上記の両 pulse-chase 標識実験において、核と細胞質に含まれる pre-U snRNA が 1 塩基ごとのラダーとして検出されたことは、*S. cerevisiae* と同様に、ヒトおよびアフリカツメガエルの Trimmer が 3'-exonuclease であることを示唆した (Madore et al. 1984; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). これら以外にも、ヒト pre-U snRNA 3'-end trimming についての知見は複数存在するものの、反応の実行因子が何かということは長い間不明であった。

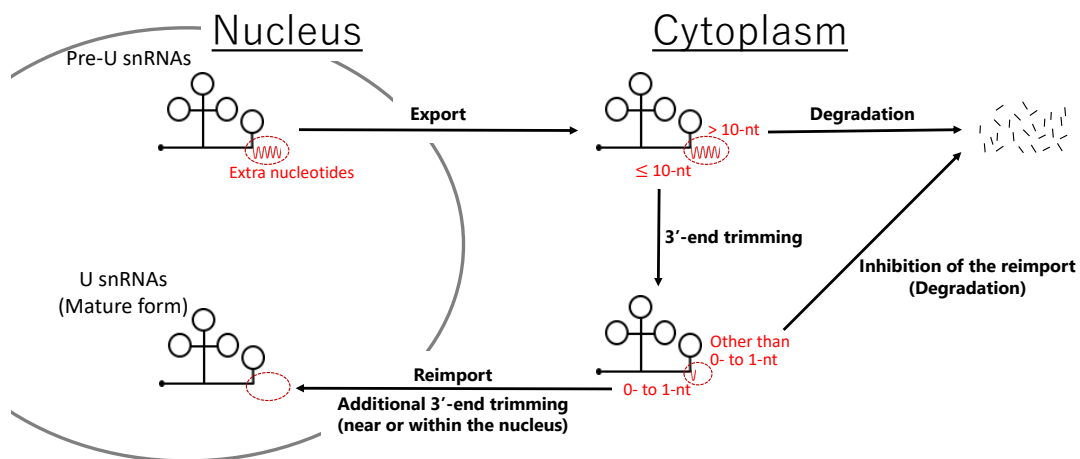


図 1.8 ヒト pre-U snRNA の 3'-end trimming 反応は核と細胞質の両方で起こる

ヒト pre-U snRNA 3'-end trimming 反応は二段階で起こると考えられる。第一段階の反応は、核から細胞質への輸送後に起こる。この反応により pre-U snRNA の 3'末端伸長配列の長さは、限りなく成熟型となる。その後第二段階目の反応が、再輸送された後の核、または核近傍で起こり、成熟 U snRNA が生成する。一方で、10-nt より長い伸長配列を

持つ pre-U snRNA は細胞質での 3'-end trimming 反応を受けにくい。また、成熟 U1 と 1-nt の伸長を持つ pre-U1 snRNA 以外、細胞質から核への効率的な再輸送が起こりにくい。これらは最終的に分解されると予想される。

3-5 ヒト Trimmer

ヒト Trimmer として初めて同定されたのは pre-U snRNA の発見 (Eliceiri & Sayavedra 1976) から実に 40 年後のことである (Lardelli et al. 2017). 2017 年 Lardelli R. M. らは, 特定の神経変性疾患 (PCH7) 患者の多くが deadenylase の一種である *TOE1* 遺伝子にさまざまな機能欠失変異を持つこと, さらに *TOE1* 発現量低下と U1, U2 snRNA の 3' 末端が伸長することに相関関係があることを見出した (Lardelli et al. 2017). 加えて *TOE1* 発現量が低下した PCH7 患者由来の線維芽細胞において, 成熟 U1, U2 snRNA に対する, 3' 末端が伸長した pre-U snRNA の割合が増加することを明らかにした (Lardelli et al. 2017). これらの結果は, *TOE1* が pre-U snRNA のヒト Trimmer として機能することを示唆した (Lardelli et al. 2017).

しかしながら「*TOE1* が唯一の Trimmer」とするのは早計であろう. その根拠のひとつに, *TOE1* が deadenylase であることが挙げられる (Wagner et al. 2007; Son et al. 2018). *TOE1* の主な標的は, 3' 末端にアデノシン (A-tail) を持つ pre-U snRNA と考えられるが (Wagner et al. 2007; Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018), PHAX と共沈する pre-U snRNA の多くは A-tail を持たない (Lardelli et al. 2020). よって, 3' 末端に A-tail を持たない pre-U snRNA は, *TOE1* 以外が, PHAX 会合前後の核近傍で 3'-end trimming を行うと推察される.

また *TOE1* の局在も, 唯一の Trimmer でないとする根拠になるだろう. 前述 3-4 の通り, 3'-end trimming 反応は核と細胞質のそれぞれで起こると考えられる (Madore et al. 1984; Kleinschmidt & Pederson 1987; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990) が, *TOE1* は主に核 (Cajal body) に局在する (Wagner et al. 2007; Son et al. 2018). 加えて, SMN と共沈した U1 snRNA の 3' 末端伸長配列の大部分が, SPN1 と共沈したものからは除去されているという実験結果 (Lardelli et al. 2020) は, SMN 会合後から SPN1 会合前までの細胞質で 3'-end trimming が起こることを示唆する.

3-6 ヒト U snRNA の品質管理

真核生物には、U snRNP 成熟過程の失敗などの結果生じた、異常 U snRNA を優先的に排除する機構が備わっている (reviewed in Doma & Parker 2007). この機構は最終的に、さまざまな nuclease による U snRNA の分解で達成される (reviewed in Doma & Parker 2007). 例えば、酵母およびヒト中の、Sm 配列などに変異を持つ異常 U snRNA は、10 前後のタンパク質で構成される RNA exosome complex が 3'-exoribonucleolytic に (Van Hoof et al. 2000a; Egecioglu et al. 2006; Lardelli et al. 2020), Xrn I が 5'-exoribonucleolytic に分解する (Shukla & Parker 2014).

一方で、酵母 RNA exosome complex は、pre-U snRNA に対する Trimmer であるとも報告されている (Van Hoof et al. 2000a; Steinmetz et al. 2001; Mitchell et al. 2003). それゆえ、酵母 RNA exosome complex は U snRNA に対し、「Trimmer」と「分解装置」の両方の側面を持つと考えられる (reviewed in Kilchert et al. 2016). このことから、ヒト U snRNA 分解を担う因子と考えられてきた RNA exosome complex (Shukla & Parker 2014; Lardelli et al. 2020) も、pre-U snRNA に対する Trimmer になり得ると考えられる. 勿論、未知の 3'-exonuclease がヒト Trimmer である可能性も捨てきれない. よって、TOE1 以外の新規ヒト Trimmer を同定するためには、これまでの先入観を極力排した上で臨む必要があるだろう.

4. 研究目的

U snRNP の適切な機能の獲得は, pre-mRNA スプライシング反応を円滑に進める上で必須である. したがって U snRNP 自体の機能についてだけでなく, その機能獲得までの道筋についての正しい知識は, pre-mRNA スプライシング反応のより深い理解に繋がるだろう.

本研究は, ヒト U snRNP 成熟過程の一つである「pre-U snRNA の 3'-end trimming 反応」を行う因子 (Trimmer) の同定を当初の目的としたが, その達成前に別グループより deadenylase TOE1 が Trimmer として機能すると報告され, 本研究の新規性は損なわれてしまった (Lardelli et al. 2017). しかしながら序論の通り, 「TOE1 が唯一の Trimmer である」とした場合, 過去の複数の報告と矛盾することに気付いた.

そこで本研究は一切の先入観を排した上で, ヒト Trimmer を同定することを目指した. その手始めとして 3'-end trimming の試験管内反応系 (*in vitro* 3'-end trimming アッセイ系とする) を構築し, その反応が TOE1 に依存したものを評価した.

研究結果

1. U1 snRNA 前駆体を基質 RNA とした *in vitro* 3'-end trimming アッセイ系の構築

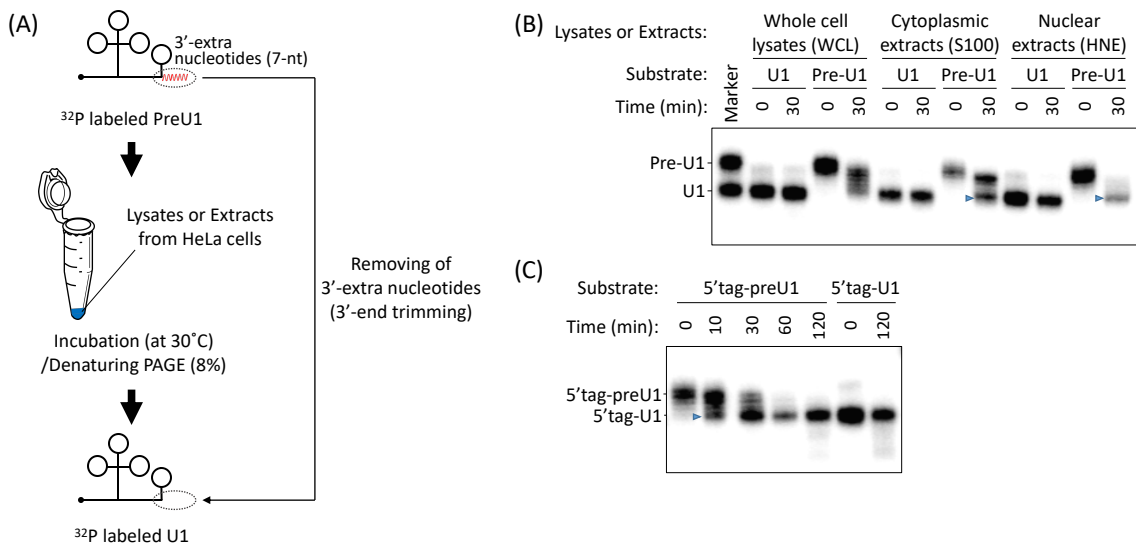
本研究では、U snRNA 前駆体 (pre-U snRNA) の 3'-end trimming を行う新規因子 (Trimmer) の同定を目的とし、最初に *in vitro* 3'-end trimming アッセイ系の構築を試みた(図 2.1A)。基質 RNA には、HeLa 細胞中に最も豊富に存在する U snRNA である U1 に着目し (Weinberg & Penman 1968; reviewed in Reddy & Busch 1988)、その前駆体である pre-U1 snRNA を用いた。なお U1 snRNA の配列として、複数存在する U1 遺伝子座の内、chr1:16895980-16896143 を採用した(図 1.7C)。この遺伝子座を用いたのは、U snRNA に特有な転写終結位置、すなわち 3'box 依存的な切断位置が明らかになっているからである(図 1.7D 左; Uguen & Murphy 2003)。この遺伝子座からは成熟 U1 の 3'末端に 7-nt (5'-ACUUUCU-3') の塩基を持つ前駆体が生成すると予想される(図 1.7D 右; Uguen & Murphy 2003)。

³²P 標識した pre-U1、もしくは U1 を HeLa 細胞由来の破碎液、または抽出液 [Whole Cell Lysate (WCL), Nuclear Extract (HNE), Cytoplasmic Extract (S100)] 中で 30°C で保温後、生成 RNA を 8%変性 PAGE により分離し解析した(図 2.1B)。その結果、全ての破碎液と抽出液中で、pre-U1 から成熟 U1 と長さの一致する RNA が生成した(図 2.1B)。一方 U1 を基質 RNA とした場合、反応前後での長さの変化はほとんど認められなかった(図 2.1B)。これは硫酸分画後の S100 中で、pre-U2 snRNA を基質 RNA とした 3'-end trimming 反応が起こるという過去の知見とも一致する (Kleinschmidt & Pederson 1987)。

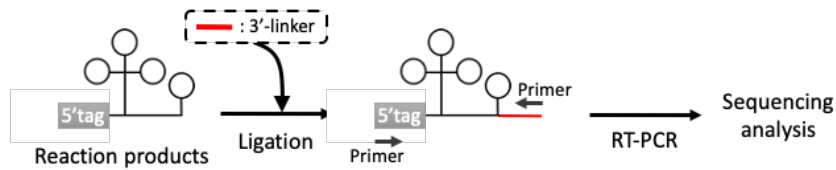
次に pre-U1 を基質 RNA とした反応が、pre-U1 3'末端の余分な配列の除去反応であることを確認するため、反応で生成したバンドの配列を解析した(図 2.1C-E)。反応後の生成 RNA と、HNE 中に多量に存在する U1 snRNA とを区別するために、5'末端に人工的なタグ配列を挿入した pre-U1 (5'tag-preU1) を基質 RNA として用いた (Katz et al. 2007)。その結果 pre-

U1 を基質 RNA としたときと同様(図 2.1B), 5'tag-preU1 の場合も成熟型と長さの一致する RNA が生成した(図 2.1C). 加えて, 反応時間依存的に 5'tag-preU1 の 3'末端側から徐々に短くなることが分かった(図 2.1C, E). さらに, 生成 RNA の配列を解析した結果, それらの多くは成熟 U1 の 3'末端と一致する配列を持つことが分かった(図 2.1D). これらの結果から, 本研究で構築した *in vitro* の反応は pre-U1 snRNA の 3'-end trimming を再現したものであるとこの時点では考えた.

興味深いことに, ヒト Trimmer としての唯一の報告例である TOE1 (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018) のノックダウン (KD) 効率が約 95%を示した WCL(図 2.1F 上)を用いた場合も, 若干減弱するものの, 活性は残存した(図 2.1F 下). このことは, 少なくとも *in vitro* で Trimmer として機能できる因子が TOE1 以外にも存在することを示唆した.



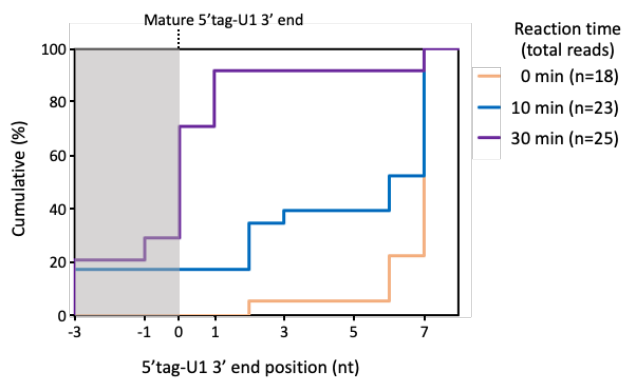
(D) Sequencing analysis of 5'tag-preU1 3'-end trimming reaction products *in vitro*



Sequencing results (5'tag-preU1 3'-end trimming reaction at 30 min, total reads = 25)

	3' end position	Sequences (5'-to-3')	Frequency (%)
Precursor	7	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUUCCCCUGACUUUCU	8.3
	1	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUUCCCCUGA	20.8
Mature	0	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUUCCCCUG	41.7
Degradation from 3' end	-1	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUUCCCCU	8.3
	-6	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUUU	4.2
	-7	••AGUGGGGGACUGCGUUCGCGCUU	4.2
	<-7		12.5

(E)



(F)

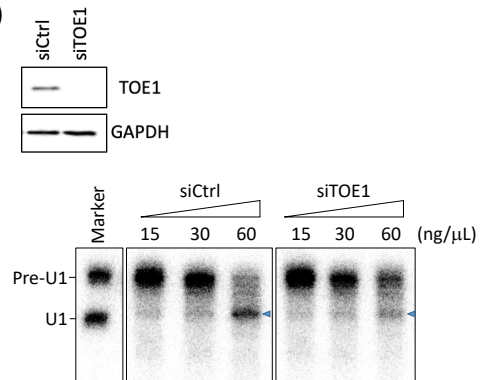


図 2.1 ヒト pre-U1 snRNA を基質 RNA とした *in vitro* 3'-end trimming アッセイ系の構築

- (A) ^{32}P 標識した pre-U1 snRNA を基質 RNA とした *in vitro* 3'-end trimming アッセイ系の模式図. Pre-U1 snRNA は成熟 U1 の 3'末端に余分な配列 (5'-ACUUUCU-3') を含む. ^{32}P 標識した pre-U1 を HeLa 細胞由来の破碎液, または抽出液 [Whole Cell Lysate (WCL), Nuclear Extract (HNE), Cytoplasmic Extract (S100)] 中で 30°C で一定時間保温後, 生成 RNA を 8%変性 PAGE により分離し, オートラジオグラフィーによって検出した.
- (B) ^{32}P 標識した pre-U1, または U1 を基質 RNA とした *in vitro* 3'-end trimming アッセイ. 保温時間は図中に記載した通りに行った.
- (C-E) 5'末端にタグ配列 (5'-UGAUCGCGCUUCUCGUGGG-3') を持つ ^{32}P 標識した pre-U1

(5'tag-preU1) を基質 RNA とした *in vitro* 3'-end trimming アッセイ. 各アッセイには HNE を用いた. 各図は, 反応時間依存的な切断 (C), 生成 RNA の 3'末端の配列 (D), および生成 RNA の 3'末端位置 (E) を示す. 各保温時間は (C, E) は図中の記載通り, (D) は 30 分間で行った. 反応には HNE を用いた.

(F) Luciferase (siCtrl), または TOE1 (siTOE1) KD 条件下の HeLa 細胞由来の WCL による *in vitro* 3'-end trimming アッセイ. 反応時間は 6 時間とした.

各アッセイに用いた WCL, HNE, S100 のタンパク質濃度は, (B-E) は 1 mg/mL, (F) は図中の記載通りとした.

2. HNE 中の Trimmer 精製手法の検討

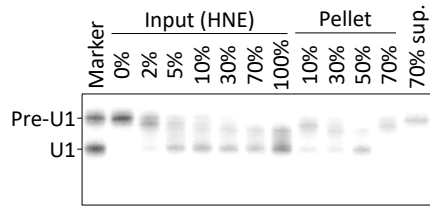
次に *in vitro* で Trimmer として機能できる因子の精製を目指した。そこで、単位タンパク質当たり最も強い活性を示した HNE を用いることにし(図 2.1B)、目的活性の精製手法を小容量の HNE を用いて検討した。

まず硫酸分画について検討した。その結果、30-50%硫酸沈殿が最も強い活性を示した(図 2.2A)。このことから硫酸分画を目的活性の精製に使用できると判断した。

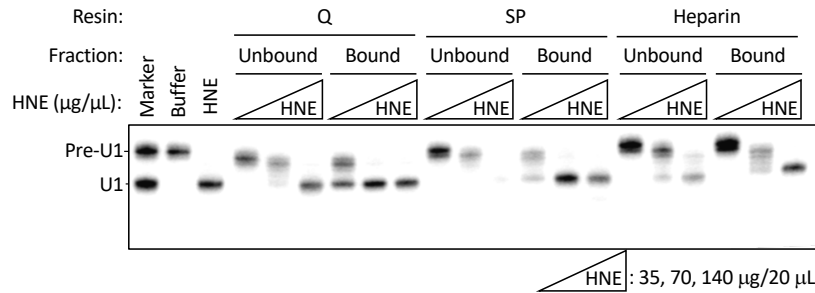
次に、種々のクロマトグラフィー[陰イオン交換 (Q), 陽イオン交換 (SP), アフィニティー (Heparin), 疎水 (Phenyl)]を検討した。その結果、いずれの特性を示す担体を用いた場合も、Bound 画分が活性を示した(図 2.2B)。また Heparin セファロース担体使用時にのみ、Bound 画分の活性が飽和しない量の HNE を結合させたにも関わらず、Unbound 画分も活性を示した(図 2.2B 中の 70 μ g/20 μ L HNE 結合条件)。これは、一部の活性が Heparin セファロースに結合しないこと、すなわち目的の活性因子が HNE 中に複数種存在することを示唆した。さらに Phenyl セファロースに HNE 中の活性因子の全てが結合するためには、30%硫酸上清の容量に対し、1.5 倍以上の容量の担体が必要であることが分かった(図 2.2C)。

以上の結果を踏まえ、検討した各精製手法[硫酸分画, および陰イオン交換 (Q), 陽イオン交換 (SP), アフィニティー (Heparin), 疎水 (Phenyl) クロマトグラフィー]を用いて HNE 中の Trimmer を精製することにした。

(A) 硫酸分画の検討



(B) Q, SP, Heparinセファロースの検討



(C) Phenylセファロースの検討

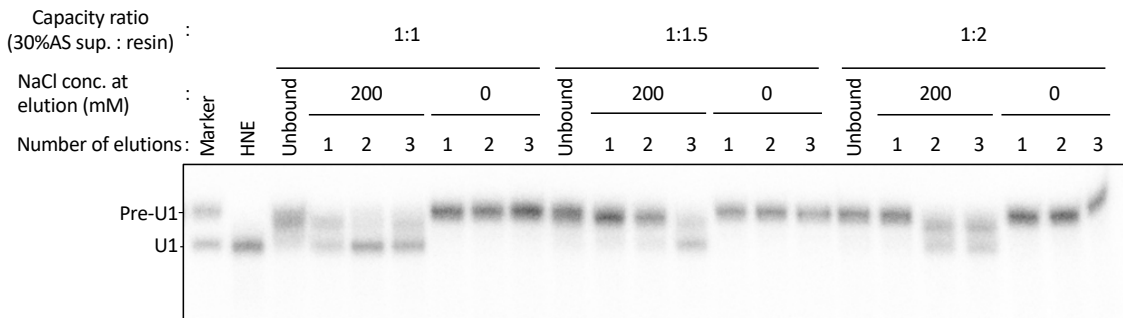


図 2.2 HNE 中の 3'-end trimming 活性精製手法の検討

- (A) 硫酸分画による各精製画分についての活性評価. Pellet は硫酸沈殿, 70% sup.は 70%硫酸上清を示す.
- (B) Q, SP, Heparin セファロース精製画分についての活性評価. 図中の各タンパク質濃度の HNE (20 μL) を, 各 20 μL のレジンを精製した.
- (C) Phenyl セファロース精製画分についての活性評価. 一定容量の 30%硫酸上清 (30%AS sup.) を, 1, 1.5, 2 倍容量のレジンを精製した. 結合タンパク質の溶出は, 200 mM, 0 mM NaCl を含むバッファーで逐次的に, かつ各 3 回ずつ行った.

活性は, Buffer N100, または N200 で透析した各精製画分を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイ(図 2.1A)により評価した.

3. HNE 中の Trimmer の精製

HNE 中の 3'-end trimming 活性の精製を、前述で検討した各精製手法を組み合わせ
て行った(図 2.3).

まず、市販の HNE を遠心し、その上清から 30%硫酸上清を調整した(図 2.3A).

次に、30%硫酸上清中の活性を、HiTrap Phenyl FF カラムを用いて精製した。この際、
活性が 2 つに分かれた(図 2.3B)。そこで、Phenyl Eluate_Fraction 37-39 と Fraction 41 中の活
性をそれぞれ Activity I, Activity II とし、個別に精製を進めた。

次に、各 Phenyl Eluate の Buffer N200 への置換、および活性の濃縮を Amicon Ultra
(3K) により行った(図 2.3C)。

次に、Activity I と II を HiTrap Heparin HP カラムにより精製した。その結果、Activity
I では Heparin Eluate_Fraction 32(図 2.3D)が、Activity II では_Fraction 34(図 2.3G)が最も強
い活性を示した。

次に、各活性を Mono Q カラムにより精製した。その結果、Activity I では Mono Q
FT_Fraction 2-5(図 2.3E)が、Activity II では Mono Q Eluate_Fraction 22(図 2.3H)が最も強い
活性を示した。Activity II についてはこの時点でのサンプルを最終精製産物とした。

最後に、Activity I を Mono S カラムで精製した。その結果、Mono S Eluate_Fraction
19 が最も強い活性を示した(図 2.3F)。

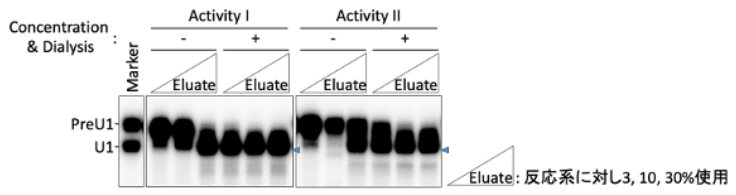
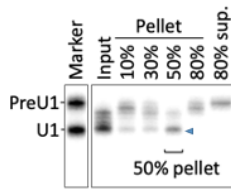
Activity I についてはこの時点でのサンプル
を最終精製産物とした。

なお、各精製画分のタンパク質濃
度は右の Table 1 にまとめた。

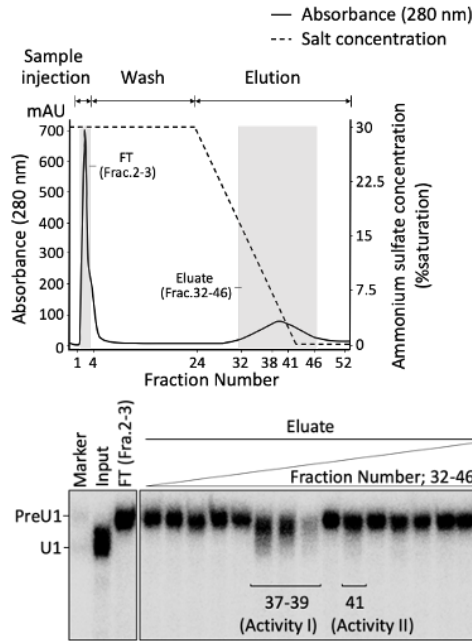
Table 1 | Purification Steps of activity I and II

Purification Step	Total Protein (mg)	
	Activity I	Activity II
HeLa Nuclear Extract	128	
Ammonium sulfate	88	
HiTrap Phenyl FF	10.1	5.22
Amicon Ultra (3K)	2.15	1.67
HiTrap Heparin HP	0.13	0.04
Mono Q	0.07	0.03
Mono S	< 0.01	-

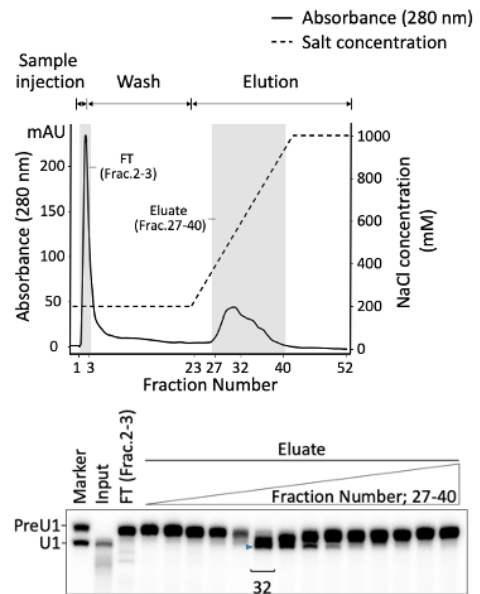
(A) Ammonium sulfate precipitation (C) Amicon 3K filtration



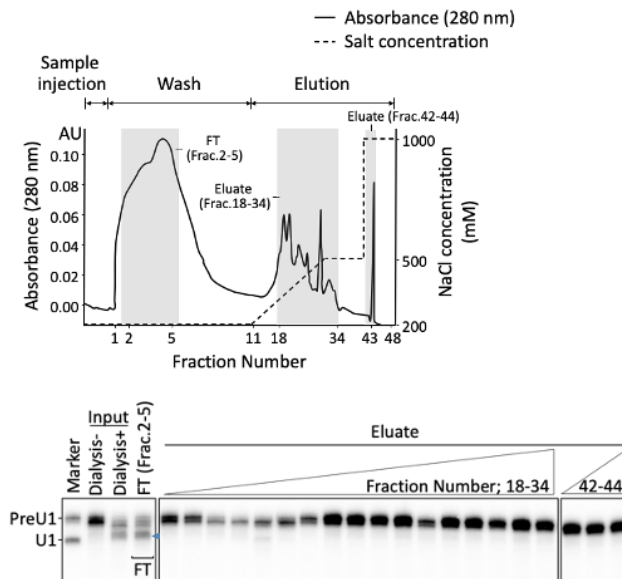
(B) HiTrap Phenyl FF



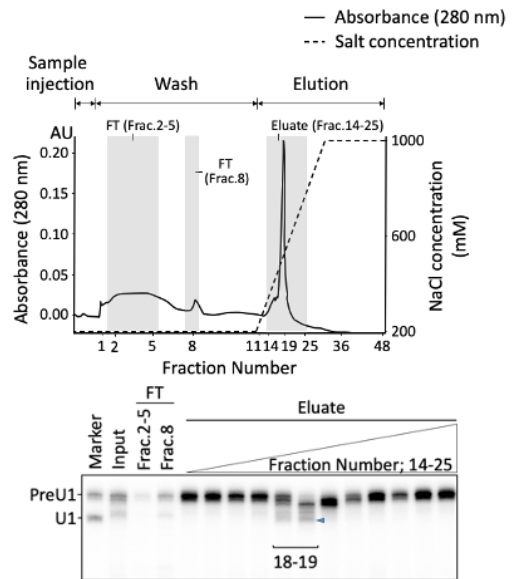
(D) HiTrap Heparin HP (Activity I)



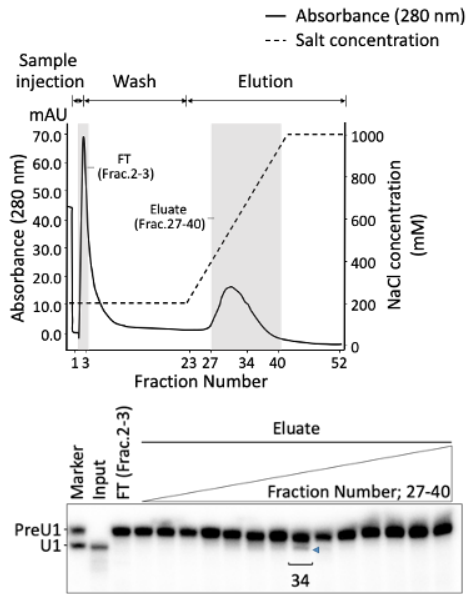
(E) MonoQ (Activity I)



(F) MonoS (Activity I)



(G) HiTrap Heparin HP (Activity II)



(H) MonoQ (Activity II)

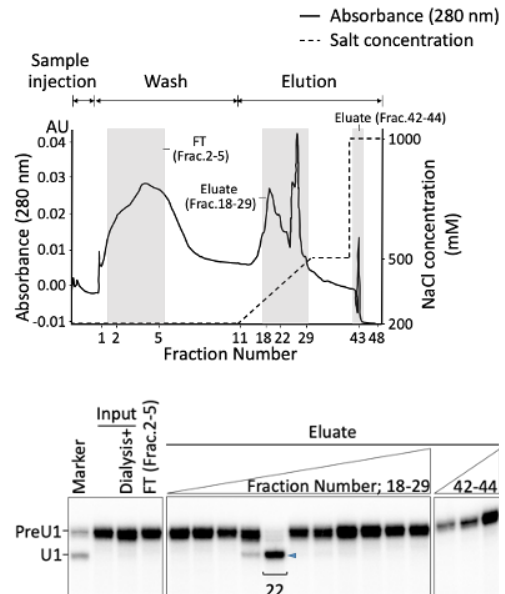


図 2.3 HNE 中の 3'-end trimming 活性の精製

(A-H) 硫酸分画 (A), HiTrap Phenyl FF カラム (B), Amicon Ultra-3K (C), HiTrap Heparin HP カラム (D, F), Mono Q カラム (E, H), Mono S カラム (G) による精製. (B) の精製で分かれた 2 つの活性 (Activity I, II) は、これ以降個別に精製した. (A-F) は Activity I の、(A-C, G, H) は Activity II の精製結果を示す. (A), (C), (B, D-H 下図) は活性評価結果を、(B, D-H 上図) はクロマトグラムを示す.

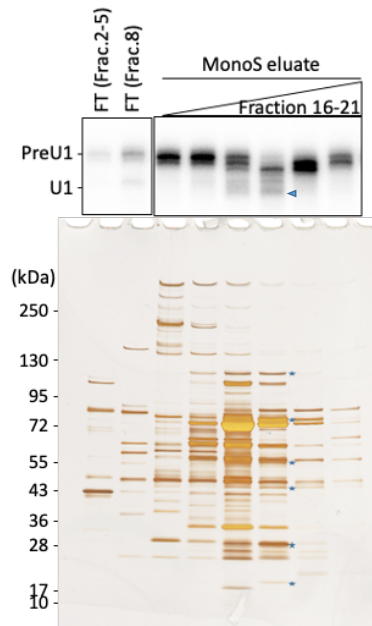
活性は、Buffer N200 で透析した各精製画分を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイ (図 2.1A) により評価した.

4. HNE 中の Trimmer の同定

図 2.3 で精製した, *in vitro* で Trimmer として機能する因子の同定を目的とし, まず Activity I と Activity II の最終精製産物中のタンパク質を SDS-PAGE により分離した後, 銀染色により検出した(図 2.4A, B 左). 次に, 銀染色で検出された各バンド強度(図 2.4A, B 左下)と, 活性の強さ(図 2.4A, B 左上)に相関関係のあるバンドを切り出し, 質量分析を行った(図 2.4A, B 右). その結果, 3'-exonuclease として, Activity I では ISG20 を (Nguyen et al. 2001), Activity II では EXOSC10 (EXO10) を (Allmang et al. 1999; reviewed in Kilchert et al. 2016), それぞれ獲得した(図 2.4A, B 右). 興味深いことに, Activity II では EXO10 の他, RNA exosome complex を構成するタンパク質の大部分を同時に獲得した(図 2.4B 右; Allmang et al. 1999; reviewed in Kilchert et al. 2016). このことは, Activity II では *in vitro* 3'-end trimming 反応を EXO10 を含む RNA exosome complex が行うことを示唆した (Allmang et al. 1999; reviewed in Kilchert et al. 2016).

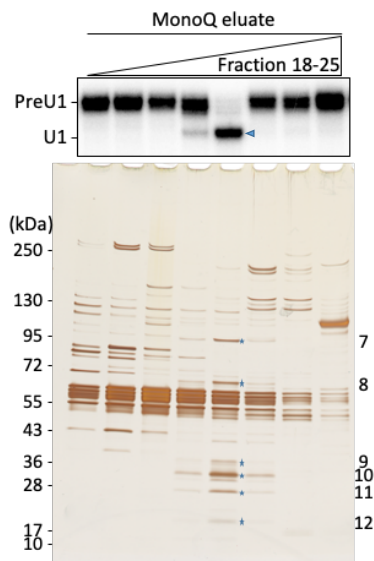
次に, これらの 3'-exonuclease が *in vitro* 3'-end trimming 反応の担い手であることを確認するため, ISG20-, または EXO10-KD 細胞から調製した WCL の希釈系列についての活性を評価した(図 2.4C, D). その結果, ISG20 の KD 効率が約 95%を示す ISG20-KD WCL ではほとんど減弱しなかったものの(図 2.4C), EXO10 の KD 効率が約 85%を示す EXO10-KD WCL では活性が著しく減弱した(図 2.4D). このことから, WCL 中での 3'-end trimming 反応の主な担い手は EXO10, または EXO10 を含む RNA exosome complex であることが示唆された.

(A) Activity I



No.	Protein
1	DNA damage-binding protein 1
2	Radixin
3	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
4 a	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2
4 b	Protein FAM98B
5	Copper homeostasis protein cutC homolog
6	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein (3'-exonuclease)

(B) Activity II



No.	Protein
7	Exosome component 10 (EXOSC10)
8	Exosome complex component RRP45
9	Exosome complex component RRP42
10 a	Exosome complex component RRP43
10 b	Exosome complex component RRP4
10 c	Exosome complex component MTR3
10 d	Exosome complex component RRP40
11 a	Exosome complex component RRP46
11 b	Exosome complex component RRP41
12	M-phase phosphoprotein 6

} **3'-exonuclease complex (RNA exosome)**

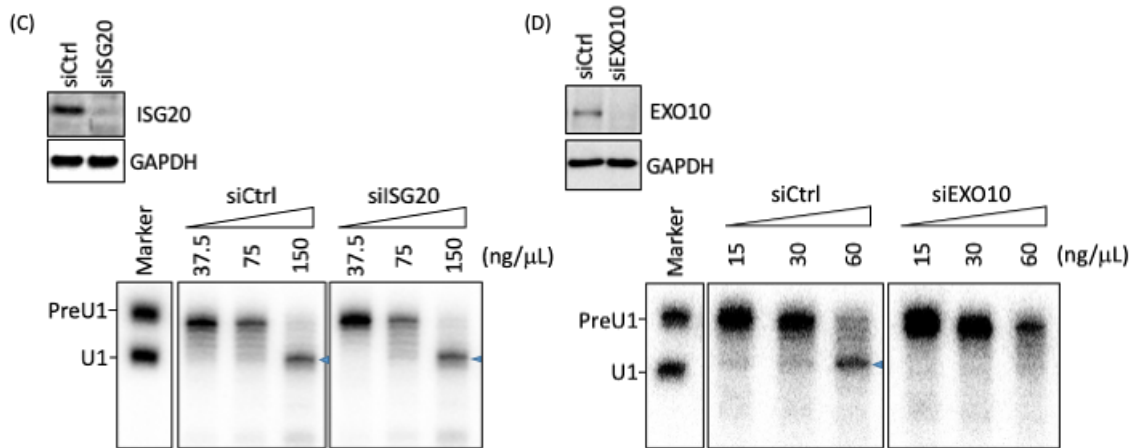


図 2.4 HNE 中の Trimmer の同定

(A, B) Activity I (A) と Activity II (B) を担うタンパク質の同定. 左上図と左下図は, 最終精製産物の活性評価(図 2.3F, H の一部抜粋)と 5-20% SDS PAGE による分離後の銀染色結果を示す. 右図は, 銀染色結果右の各数字(星印)のタンパク質についての質量分析結果を示す.

(C, D) ISG20- (C), EXO10-KD (D) 条件で調整した WCL 希釈系列の活性評価. 上図は WCL についての Western Blotting, 下図は活性評価結果を示す. 活性は, 図中の各タンパク質濃度を示す WCL を用いた, *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより評価した. その際反応は 6 時間で行った.

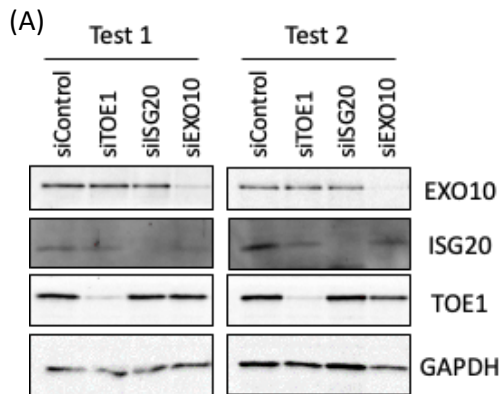
5. ヒト培養細胞において ISG20, EXO10 が Trimmer として機能するかの検証

Trimmer 候補因子として同定した ISG20 と EXO10 が(図 2.4), ヒト培養細胞において pre-U1 snRNA 3'-end trimming 反応の担い手かを評価することにした. 過去の知見から, ヒト培養細胞において, Trimmer としての唯一の報告例である TOE1 を枯渇化すると, U1 より長い配列 (U1 with 3'tail) の, 成熟 U1 に対する割合が優位に増加することが明らかになっている (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018). そこで, ISG20-, EXO10-KD 条件下で同様の実験を行い, 各因子がヒト培養細胞において Trimmer として機能するかを検証した (Lardelli et al. 2017).

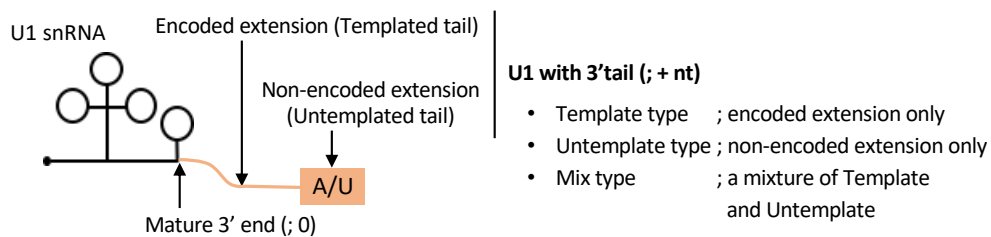
ISG20-, EXO10-KD 条件下(図 2.5A)の HeLa 細胞由来の U1 snRNA の 3'末端配列について次世代シーケンス解析を行った. その後解析結果を, 2 つの分類手法により評価した(図 2.5B). ひとつは U1 の 3'末端の位置について(図 2.5B, C)であり, もうひとつは U1 の 3'末端配列の種類について(図 2.5B, D)である. さらにふたつめの分類手法では, 成熟 U1 より長い配列を持つもの(U1 with 3'tailとする)について, その前駆体領域の配列を元に Template 型, Untemplate 型, Mix 型に分類した(図 2.5B, D). その結果, 独立した各試行において, ISG20-, EXO10-KD による U1 3'末端形成への影響は認められなかった(図 2.5C, D). 一方, コントロールとした TOE1-KD 条件下では U1 の 3'末端が伸長し(図 2.5C), かつ Template 型の U1 with 3'tail の割合が増加した(図 2.5D; Lardelli et al. 2017). また TOE1-KD 条件下で増加した U1 with 3'tail の多くが, その 3'末端にアデノシン (A-tail) を有することも同時に分かった(図 2.5E). これらの結果は, deadenylase TOE1 についての過去の知見とも一致する (Wagner et al. 2007; Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018). 加えて, EXO10 の標的である 5.8S rRNA 前駆体領域の配列 [Internal Transcribed Spacer (ITS)] が, EXO10-KD 条件下で蓄積した(図 2.5F; Tomecki et al., 2010). これは本実験で, EXO10 による ITS の除去反応, すなわち特定因子 (EXO10) の特定 RNA(5.8S rRNA 前駆体)の 3'-trimming 反応への影響を評価できたことを意味する. 以上の結果は, ヒト培養細胞中で ISG20, および EXO10 が pre-U1 に対する

Trimmer として機能しないことを示唆する。

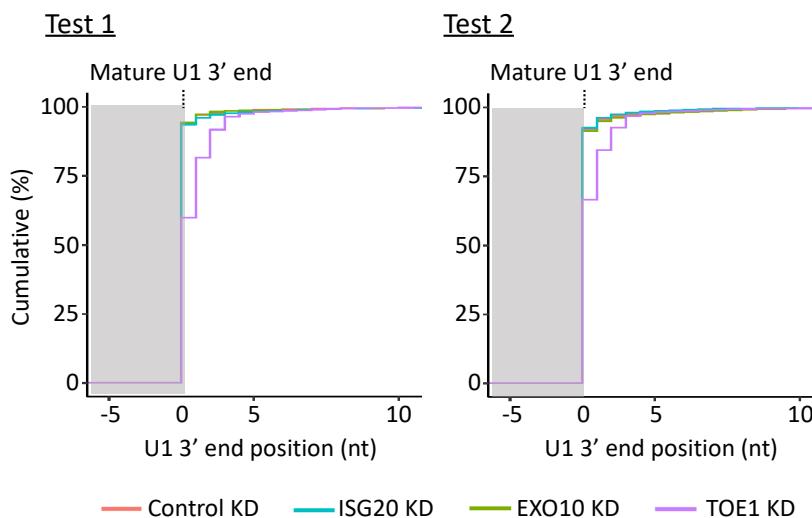
さらに TOE1 が, ISG20 や EXO10 の Trimmer としての機能を補完できる可能性を考え, ISG20/TOE1, EXO10/TOE1 の double KD 条件下でも同様の実験を行った(図 2.5G, H). しかしながら, TOE1 single KD との明確な違いは認められなかった.



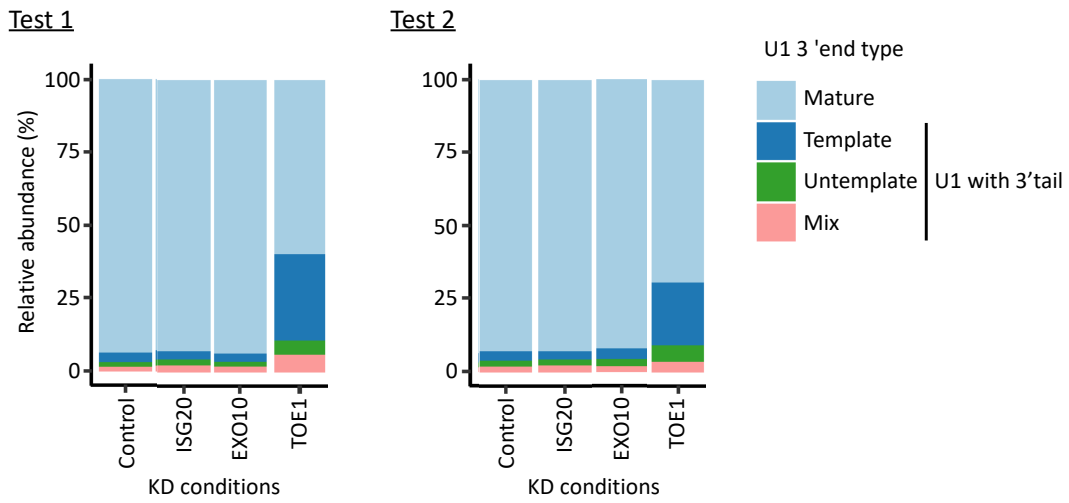
(B) Types of U1 3' end sequences



(C) U1 3' end position



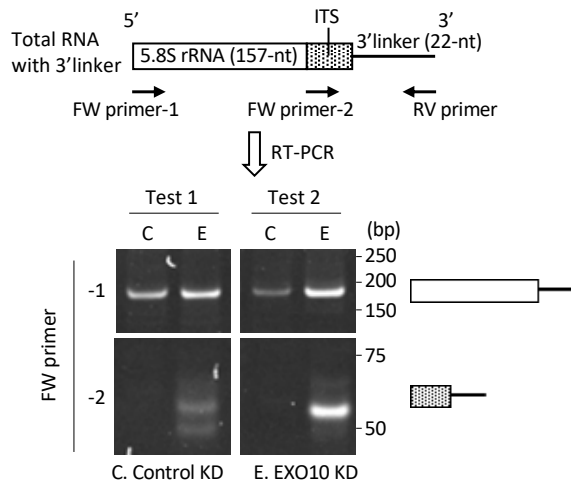
(D) U1 3' end type



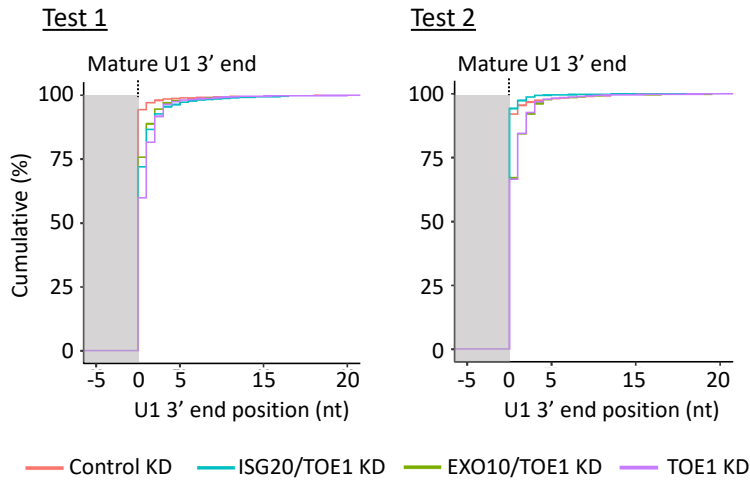
(E) 3'-end nucleotide of U1 with 3'tail (Control or TOE1 KD condition)

3'-end nucleotide of U1 with 3'tail	Test 1				Test 2			
	Control KD		TOE1 KD		Control KD		TOE1 KD	
	Total reads	Frequency (%)	Total reads	Frequency (%)	Total reads	Frequency (%)	Total reads	Frequency (%)
Adenine	63,786	33.8	550,048	51.5	51,807	34.3	217,138	45.3
Guanine	19,141	10.1	29,166	2.7	15,088	10.0	16,991	3.5
Cytosine	49,452	26.2	270,050	25.3	39,640	26.2	114,211	23.8
Uridine	56,432	29.9	217,993	20.4	44,504	29.5	130,706	27.3
	188,811	100.0	1,067,257	100.0	151,039	100.0	479,046	100.0

(F) Amplification of 5.8S rRNA and their 3'-extended precursor region in total RNA with 3'linker (RT-PCR)



(G) U1 3' end position



(H) U1 3' end type

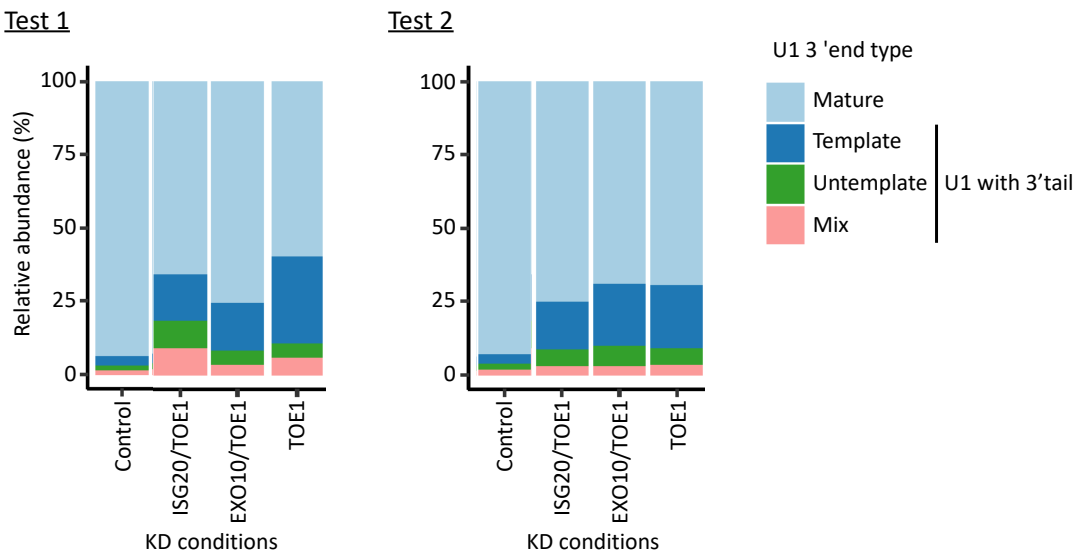


図 2.5 ISG20 と EXO10 は Trimmer として機能しない

- (A) 各因子 KD 条件下の HeLa 細胞についての Western Blotting.
- (B) U1 の 3'末端配列による分類様式. U1 の 3'末端配列から, 成熟型と成熟型より長いもの (U1 with 3'tail) に分類した. なお, 成熟型の U1 3' end position (nt) は 0 とする. また U1 with 3'tail は, その前駆体配列を元に Template 型, Untemplate 型, Mix 型に細分化した. Template 型はゲノム由来の配列のみ持つ, Untemplate 型はゲノム由来でない配列のみ持つ, Mix 型はいずれにも該当しないものを示す.

- (C-D) 各 single KD 条件下での U1 の 3'末端位置についての累積ヒストグラム (C) と 3'末端配列の種類についての積み上げプロット (D).
- (E) Control-, TOE1-KD 条件下の U1 with 3'tail の 3'末端ヌクレオチドによる分類. 表には各リード数と割合をまとめた.
- (F) Control-, EXO10-KD 条件下の 5.8S rRNA 前駆体配列 [Internal Transcribed Spacer (ITS)] の検出. 各 KD 条件下での NGS 解析途中の RNA (total RNA with 3'linker) についての RT-PCR 産物を, 20% native PAGE により分離し EtBr 染色により検出した(下図). 上図には RT-PCR 時のプライマーセットの標的位置を示す.
- (G-H) ISG20/TOE1-, EXO10/TOE1-KD 条件下での U1 の 3'末端位置についての累積ヒストグラム (G) と 3'末端配列の種類についての積み上げプロット (H).
- (C-H) は, 各 KD 条件下の HeLa 細胞由来の total RNA に 3' linker 配列をライゲーション後 (total RNA with 3' linker), U1 snRNA (C-E, G, H), または 5.8S rRNA (F) の 3'末端を増幅した. U1 の 3'末端増幅産物については次世代シーケンス解析を行い, その結果を (B) に従い分類し評価した (C-E, G, H).

6. ヒト培養細胞において RNA exosome complex が Trimmer として機能するかの検証

ヒト RNA exosome complex は複数の形態を取ると考えられているが、これは含まれる各 3'-exonuclease が異なる局在を示すためである (Tomecki et al. 2010). 3'-exonuclease としては前述 EXO10 の他、DIS3, DIS3L (DIS3-like exonuclease) の計 3 種が報告されており、それぞれ核と核小体、核と細胞質、細胞質に局在する (Tomecki et al. 2010).

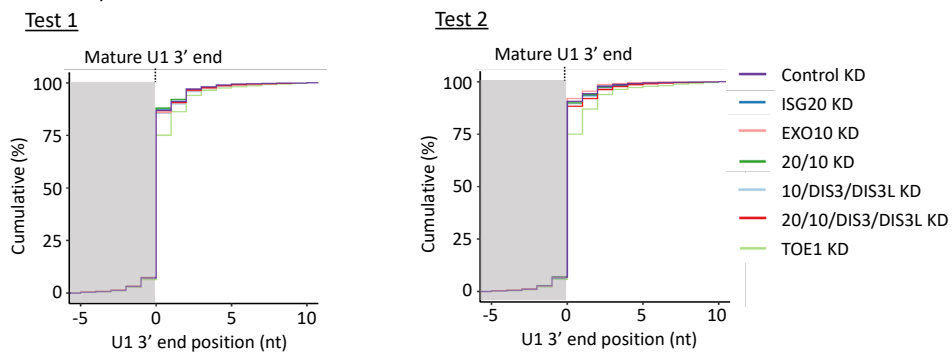
本研究において *in vitro* で Trimmer として機能する因子として獲得できたのが EXO10 を含む RNA exosome complex であったため(図 2.4B), ヒト培養細胞においても同様と仮定し、EXO10-KD 条件下で U1 snRNA の 3'末端の配列を解析したが、U1 の 3'末端形成に対する影響は認められなかった(図 2.5). これは DIS3 や DIS3L を含む RNA exosome complex が、EXO10 を含むものの機能を補完したことに起因する可能性が考えられた. そこで前述と同様の手法により、EXO10/DIS3/DIS3L-KD 条件下での U1 の 3'末端配列を解析し、ヒト培養細胞中で RNA exosome complex が Trimmer として機能するかを評価した(図 2.6). しかしながら Control-KD との明確な違いは認められず(図 2.6B, C), RNA exosome complex の U1 snRNA の 3'末端形成への影響は否定された.

これら結果を総括し、試験管内反応系により Trimmer の候補因子として同定した各 3'-exonuclease (ISG20, EXO10), および EXO10, DIS3, DIS3L を含む RNA exosome complex は、ヒト培養細胞においては Trimmer として機能しないと結論付けた.

(A)

KD conditions	Relative expression levels (normalized by GAPDH)			
	ISG20	EXO10	DIS3	DIS3L
siControl	1.00	1.00	1.00	1.00
siISG20	ND	1.42	2.84	2.46
siEXO10	0.92	0.15	2.36	1.75
Test 1 siISG20/EXO10	< 0.01	0.08	0.63	0.70
siEXO10/DIS3/3L	1.73	0.17	0.44	0.29
siISG20/EXO10/DIS3/3L	< 0.01	0.11	0.27	0.09
siTOE1	1.85	0.95	1.37	1.25
siControl	1.00	1.00	1.00	1.00
siISG20	0.02	1.04	1.32	1.01
siEXO10	1.27	0.24	1.87	2.00
Test 2 siISG20/EXO10	< 0.01	0.46	3.88	3.46
siEXO10/DIS3/3L	1.04	0.12	0.27	0.10
siISG20/EXO10/DIS3/3L	< 0.01	0.27	0.49	0.33
siTOE1	0.38	1.18	1.52	1.53

(B) U1 3' end position



(C) U1 3' end type

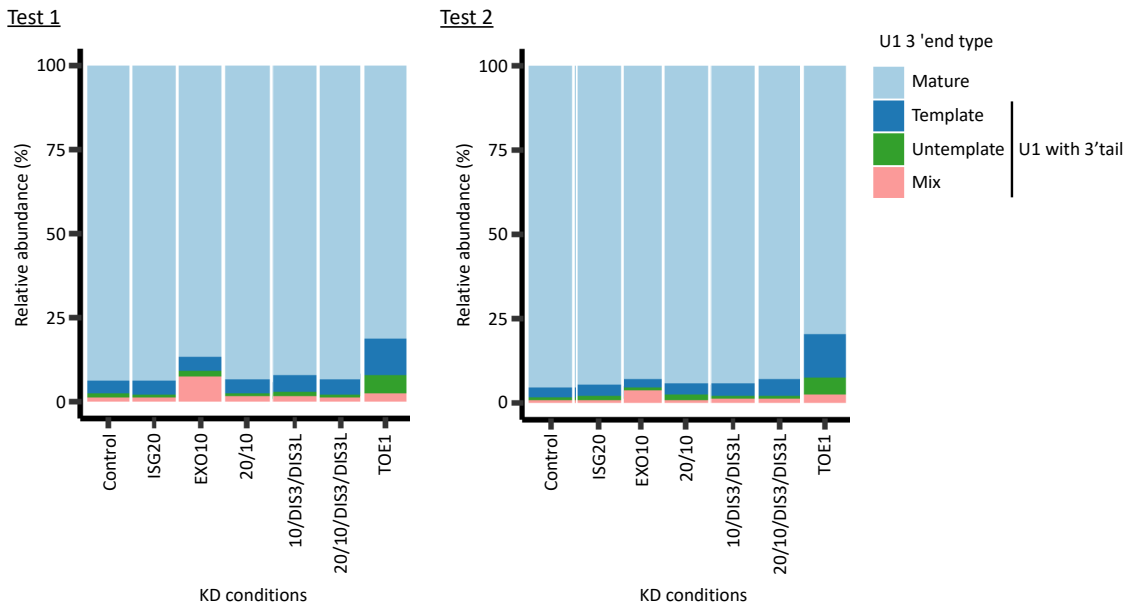


図 2.6 RNA exosome complex は Trimmer として機能しない

(A) 各因子 KD 効率の確認 (RT-PCR).

(B-C) RNA exosome complex に含まれる 3'-exonuclease (EXO10, DIS3, DIS3L) KD 条件下での

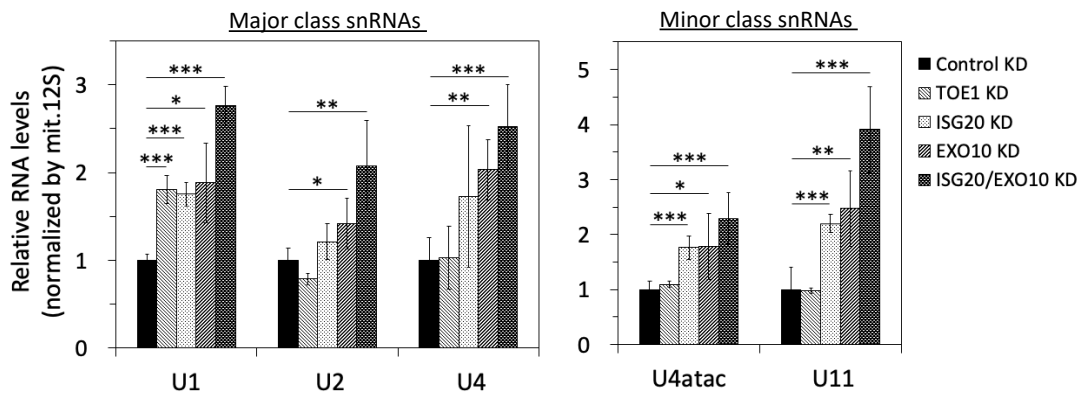
U1 の 3'末端位置についての累積ヒストグラム (B) と 3'末端配列の種類についての積み上げプロット (C). 各分類は図 2.5 と同様に行った.

7. ヒト培養細胞において ISG20 と EXO10 が U snRNA を分解するかの検証

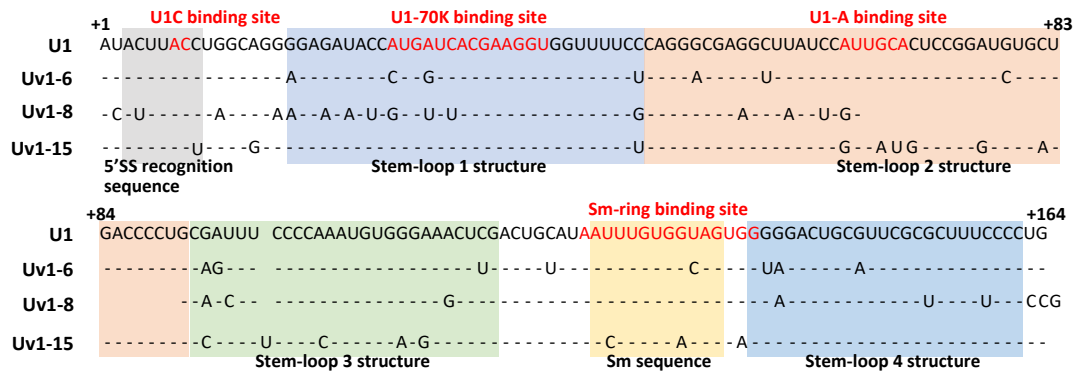
前述の通り, ISG20 と EXO10 は U1 with 3'tail に対する Trimmer ではなかった(図 2.5). しかしながら pre-U1 snRNA に対する Trimmer の候補因子として HNE から精製できた以上(図 2.4), 培養細胞においても各因子が U1 with 3'tail を始めとする U snRNA を無作為に標的とする可能性がある. さらに, ISG20 が U snRNA と相互作用すること (Espert et al. 2006), RNA exosome complex が U1 snRNA の偽遺伝子 [U1 variant (Uv1)] (O'Reilly et al. 2013) を標的とすることが過去報告されている (Lardelli et al. 2020). これらのことは, ISG20 と EXO10 が U1 snRNA および Uv1 の分解を行うことを想起させる. この仮説が正しいかを評価するため, 各因子 KD 条件下での U snRNA と Uv1 の蓄積量を評価した.

ISG20-, EXO10-KD 条件下での HeLa 細胞中の新生 RNA を 5-ethynyl uridine (5-EU) により 1.5 時間の条件で代謝標識し, 5-EU 標識した RNA を精製後 RT-qPCR を行うことで, 各 KD 条件下での新生 RNA の蓄積量を評価した. その結果, 評価した全ての新生 U snRNA (U1, U2, U4, U4atac, U11) が, ISG20-, EXO10-KD 条件下で増加傾向にあった(図 2.7A). また, Uv1 についても同様に評価したところ, EXO10-KD のみならず ISG20-KD 条件下でも新生 Uv1 は有意に増加した(図 2.7B, C; O'Reilly et al. 2013). 一方, TOE1-KD 条件下では U snRNA や Uv1 の蓄積は, U1 snRNA を除き認められなかった(図 2.7A, C). さらに, Sm-class snRNA 以外の新生 RNA (7SK RNA, GAPDH mRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA) の蓄積は, いずれの KD 条件下でも認められなかった(図 2.7D). 加えて, 常に RNA exosome complex により分解される PROMPT RNA は, EXO10-KD 条件下でのみ蓄積した(図 2.7D; Preker et al. 2008; Tomecki et al. 2010). これらは, ISG20 と EXO10 が U snRNA や Uv1 の発現制御を, おそらく RNA 分解を介して行うことを示唆した(図 2.8).

(A) Nascent U snRNA accumulation

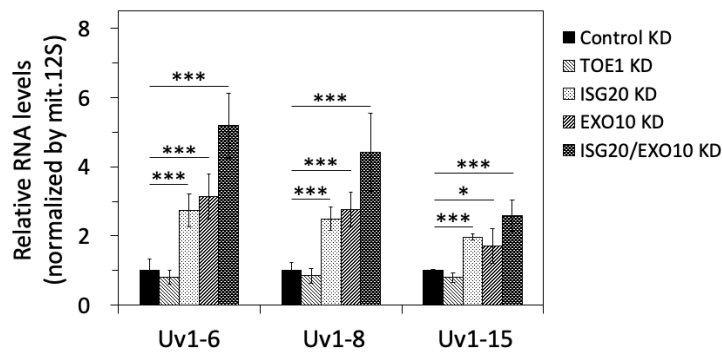


(B) U1 variant sequence alignment



出典: O'Reilly et al. 2013, Figure 1

(C) Nascent U1 variant accumulation



(D) Nascent various RNA accumulation

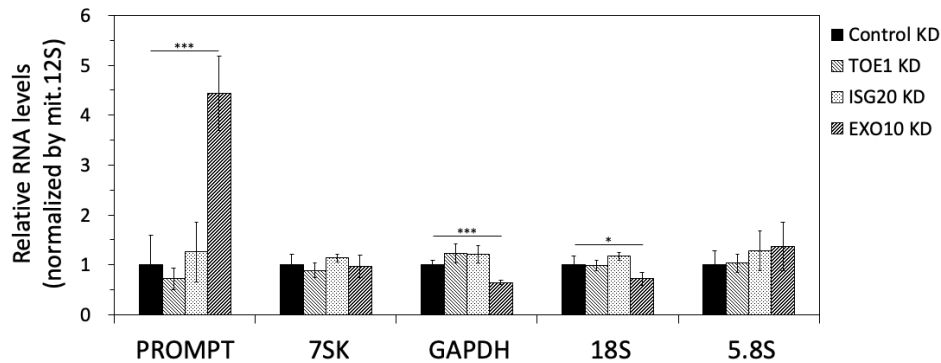


図 2.7 ISG20, EXO10 は新生 U snRNA, U1 variants (Uv1) を分解する

- (A) メジャー(左図), もしくはマイナー(右図)クラスに分類される新生 U snRNA の相対量.
- (B) U1 snRNA と U1 variants (Uv1) の配列アラインメント. U1 に特有な配列と構造をそれぞれ, 5'スプライスサイト (5'SS) 認識配列を灰色, Stem-loop 1 構造を青色, Stem-loop 2 構造を橙色, Stem-loop 3 構造を緑色, Stem-loop 4 構造を淡青色, Sm 配列を黄色で着色する. また U1 snRNP 特異的なタンパク質結合配列を赤字で示す.
- (C) 新生 Uv1 の相対量.
- (D) Sm-class snRNA 以外の新生 RNA (7SK RNA, GAPDH mRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA) の相対量.

新生 RNA は, HeLa 細胞に 5-ethynyl uridine (5-EU) を添加することで代謝標識した. 5-EU 標識した RNA は Click-it nascent RNA capture kit (Thermo Fisher Scientific) により精製した. 各新生 RNA 量は RT-qPCR で測定した. 各測定値は mitochondrial 12S control RNA で標準化した. 各相対値は対応する Control KD の値を 1 として算出した. エラーバーは独立した試行 (n=3) の平均値の標準誤差を示し, 各アスタリスクは (*) $p < 0.1$; (**) $p < 0.05$; (***) $p < 0.01$ とした.

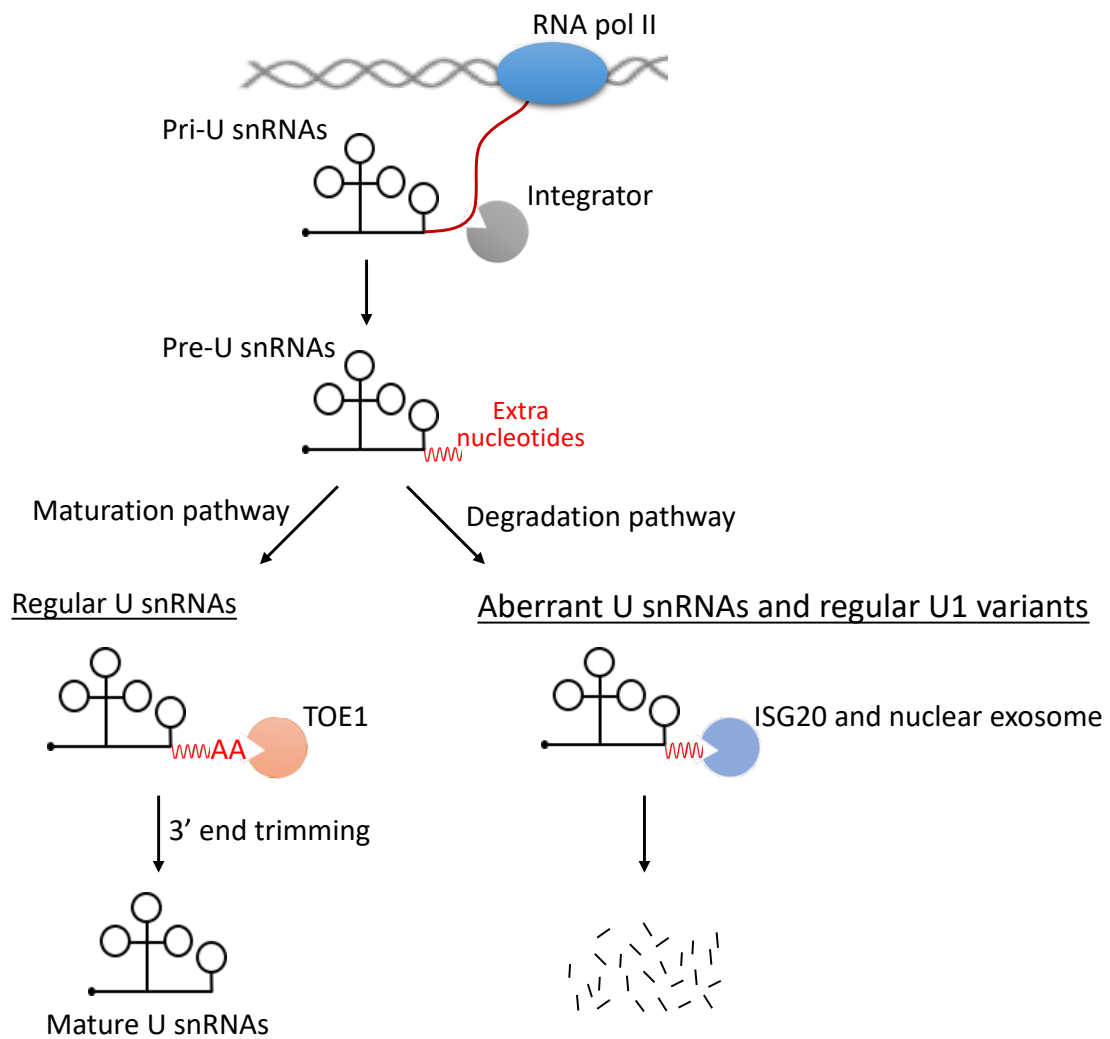


図 2.8 U snRNA と Uv1 の成熟および分解モデル

通常の場合、U snRNA 特有の転写終結機構により生じた pre-U snRNA 3'末端は、転写後に A-tail が付加することで deadenylase TOE1 の標的となり、3'-end trimming を受ける (Maturation pathway)。一方で、U snRNP 成熟過程の不具合で生じた異常 U snRNA、および U1 variant は、ISG20 と RNA exosome complex により分解される (Degradation pathway)。

考察

1. ヒト U snRNA の品質管理

真核生物には、U snRNA の機能過程、および生合成過程における、何らかのエラーの結果生じた異常 U snRNA を優先的に排除する機構が備わっている (reviewed in Doma & Parker 2007). 本論文で明らかにした ISG20, および EXO10 を含む RNA exosome complex は、異常 U snRNA の分解を介し、それらの発現を抑える役割を担う (図 2.7A, 2.8). このことは、常に分解されると考えられる U1 variant (Uv1) の新生鎖が、ISG20 や EXO10 枯渇条件下で蓄積するという実験結果からも支持される (図 2.7B, C; O'Reilly et al. 2013; Lardelli et al. 2020).

異常な U snRNA と見做される要因はさまざまである (reviewed in Doma & Parker 2007). 例えば、U snRNA 生合成過程においても、U snRNA 転写終結機構や 3'-end trimming など、U snRNA が正常かどうかを見極めるチェックポイントが複数存在すると考えられる (後述).

2. ヒト U snRNA の生合成過程と品質管理

ヒト U snRNA 生合成過程において、RNA polymerase II 転写により生じた新生 U snRNA の 3'末端には、成熟型にはない余分な配列が存在する。これは、U snRNA に特有な転写終結機構に起因する (図 1.7B; reviewed in Matera & Wang 2014). 哺乳類において U snRNA の転写は通常、それら遺伝子の 9-19 nt 下流に位置する 3'box 配列上流での切断により終結する (図 1.7B, D; Uguen & Murphy 2003). これまでに 3'box 配列に依存した転写終結位置は、厳密には決定されていない。これは、各 U snRNA が複数の遺伝子座に存在し、それら下流の

3'box 配列, および位置がわずかながら異なるためだと推察される(図 1.7C). しかしながら, ヒト培養細胞中の U snRNA 放射標識実験 (Eliceiri & Sayavedra 1976; Madore et al. 1984) や, 特定 U1 snRNA 遺伝子の発現条件を模倣した転写終結位置の決定実験(図 1.7D; Uguen & Murphy 2003)から, 転写直後の pre-U snRNA 内の余分な配列の長さは 10-nt 前後と予想される. また, U snRNA 転写終結機構の失敗により生じる, 数十塩基もの長さの 3'末端伸長配列を持つ pre-U snRNA などが細胞中にほとんど存在しないこと (Eliceiri & Sayavedra 1976; Madore et al. 1984; Uguen & Murphy 2003; Yong et al. 2010) は, この転写終結機構の正確性と, この段階で生じた異常 U snRNA を排除する機構の存在を示唆する.

U snRNA の転写終結機構により生じた, pre-U snRNA 3'末端の余分な配列は, その後の核-細胞質間輸送と協調した U snRNA 生合成過程において, 3'-exoribonucleolytic に分解される(図 1.6, 1.8; reviewed in Matera & Wang 2014). 3'-end trimming と呼ばれるこの除去反応は, 細胞質と核で段階的に起こる (Madore et al. 1984; Kleinschmidt & Pederson 1987; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). いくつかの知見は 3'-end trimming が, U snRNP が適切な機能を獲得するためのチェックポイントとなることを示唆する. 例えば, 0-, または 1-nt 以外の 3'末端伸長配列を持つ pre-U snRNA の細胞質から核への輸送は阻害される可能性がある (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). このことに加え, U snRNP 成熟過程(図 1.6)の比較的早い段階(PHAX: 転写直後に核で会合, SMN: 輸送後の細胞質で会合)と遅い段階(SPN1: 細胞質から核への再輸送直前に会合)に会合するタンパク質と共沈する U snRNA の 3'末端配列についての解析結果は, PHAX や SMN との会合時には存在する U snRNA 3'末端伸長配列が, SPN1 会合時にはほとんど除去されることを明らかにした (Lardelli et al. 2020). この実験結果は, SPN1 が会合するためには, pre-U snRNA の 3'末端伸長配列の除去が必要であることを示唆する. 3'-end trimming の実行因子 (Trimmer) として唯一報告されている TOE1 をノックダウンしたとき, U snRNA の局在が変化するかを評価することは興味深い.

以上のことから, U snRNA 生合成過程における U snRNA 転写終結機構や 3'-end

trimming は、U snRNA が正常かどうかを見極めるチェックポイントになると考えられる。おそらく ISG20 や RNA exosome complex は、これらのチェックポイントを突破できなかった U snRNA を異常と見做し、分解するのだろう。

3. ヒト U snRNA に対する TOE1 の役割

これまでにヒト pre-U snRNA に対する Trimmer としては、TOE1 のみが報告されている (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018)。TOE1 を枯渇したヒト培養細胞において、成熟 U snRNA の割合の減少に伴い、3'末端に伸長配列を持つ pre-U snRNA の割合が増加するという実験結果は、TOE1 がヒト Trimmer であるという確かな証拠である (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018)。加えて U snRNA の新生鎖の量が、RNA exosome complex 構成因子 (DIS3) の枯渇条件下では変化しない一方、DIS3 と TOE1 を併せて枯渇させると蓄積するという実験結果に由来する (Lardelli et al. 2020)、TOE1 が新生 U snRNA を RNA exosome complex による分解から保護するという知見は (Lardelli et al. 2020)、U snRNA に対し、TOE1 は Trimmer、RNA exosome complex は分解装置という、ある程度の使い分けが存在することを示唆する。

しかしながら、TOE1 と RNA exosome complex の使い分けは厳密ではないのかもしれない。本研究で示した、ISG20 および EXO10 を含む RNA exosome complex が U snRNA を分解するという知見は、前述 TOE1 についての知見と大まかには矛盾しない (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018)。一方で、自身の TOE1-KD 条件下で新生 U1 snRNA が蓄積するというデータ (図 2.7A) は、新生 U1 snRNA に限り TOE1 が「3'-end trimming」と「分解」の両方を行うことを示唆した。これは、TOE1 が新生 U snRNA を分解から保護する、という知見とは明らかに矛盾する (Lardelli et al. 2020)。この矛盾はおそらく、新

生 RNA の標識条件の違いによるものと推察する。本研究では、より転写直後の新生 RNA についての解析をすべく、それら RNA の標識を極力短い時間で行った (Lardelli et al. 2020)。この標識時間の違いが、U1 snRNA ターンオーバーについての異なる結果を与えたのかもしれない。また TOE1 枯渇条件下で、A-tail を持つ、成熟型より短い U1 snRNA が蓄積するという報告は (Lardelli et al. 2017)、TOE1 が一部の異常 U1 snRNA を標的とすることを示唆する。これらの異常 U snRNA は TOE1 が分解すると推察される。

4. ヒト U snRNA に対する RNA exosome complex の役割

今でこそ RNA exosome complex は、真核生物において最も汎用性の高い RNA 分解装置の一つとされるが (reviewed in Kilchert et al. 2016)、その発見は比較的最近のことである (Mitchell et al. 1997)。RNA exosome complex は、1997 年 *S. cerevisiae* において、「7S pre-rRNA から 5.8S rRNA への生成過程 (3'-end trimming)」を行う因子として初めて同定された (Mitchell et al. 1997)。その後、RNA exosome complex は酵母、ハエ、マウス、ヒト、植物まで幅広く存在し、その標的 RNA も mRNA から non-coding RNA までさまざまであることが明らかとなった (reviewed in Kilchert et al. 2016)。

しかしながら RNA exosome complex の基質 RNA の標的化には、いくつか共通の要素があるようだ (reviewed in Kilchert et al. 2016)。その一つが、「基質 RNA 3'末端の非構造配列」の存在である (reviewed in Kilchert et al. 2016)。例えば、Trf4/5-Air1/2-Mtr4 polyadenylation (TRAMP) complex は、基質 RNA 3'末端に poly (A) tail を付加することで、RNA exosome complex 結合の足場を提供し、RNA 分解を促進すると考えられている (LaCava et al. 2005; Wlotzka et al. 2011; Jia et al. 2011)。本論文の研究対象とした U snRNA の 3'末端にも、転写後に A tail が付加されると報告されており (Lardelli et al. 2020)、これらが RNA exosome

complex 結合の足場となることは容易に想像できる。

本論文では最終的に、U snRNA は RNA exosome complex による「3'-end trimming」を受けず、「分解」のみ受けることを示した(図 2.5, 2.6, 2.7)。これは、酵母 RNA exosome complex が両過程を行うことを考えると、少し意外な結果と言えよう (Van Hoof et al. 2000a; Steinmetz et al. 2001; Mitchell et al. 2003)。このヒトと酵母間の RNA exosome complex の機能の違いは、おそらく pre-U snRNA の 3'末端伸長配列の長さの違いに起因すると推察される。ヒトと酵母における U snRNA の転写は、特定配列上流での endoribonucleolytic な切断により終結するが、その切断位置は大きく異なる (Chanfreau et al. 1997; Seipelt et al. 1999; Steinmetz et al. 2001; Uguen & Murphy 2003; Baillat et al. 2005)。それゆえ、ヒト pre-U snRNA の持つ 3'末端伸長配列の長さが 10-nt 前後である一方 (Eliceiri & Sayavedra 1976; Madore et al. 1984; Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990; Uguen & Murphy 2003)、酵母のそれらの長さは数十～数百にもおよぶ (Chanfreau et al. 1997)。酵母においてはこの十分な長さの 3'末端伸長配列が、RNA exosome complex の U snRNA への標的化を補助すると推察される。

ただし、ヒトと酵母間の RNA exosome complex の U snRNA に対する機能差を決める要因は他にもあるのだろう。なぜなら *in vitro* において、ヒト RNA exosome complex は、わずか 7-nt の 3'末端伸長配列を持つ pre-U1 snRNA の標的化が可能だからである (図 2.4D)。このことは、例えば U snRNA 転写やその終結、また特定の RNA helicase との相互作用など、*in vitro* 系では再現できなかった、RNA exosome complex の U snRNA への標的化を制御する機構の存在を示唆する (後述)。

5. ヒト U snRNA に対する ISG20 の役割

Interferon-stimulated gene 20-kDa という名称の通り、ISG20 はインターフェロン

(IFN) による発現誘導を受ける因子として、1997年にヒトリンパ芽球様 Daudi 細胞で同定された (Gongora et al. 1997). これは IFN 誘導性の RNase としては、RNase L に次ぐ発見であった (reviewed in Zheng et al. 2017). それゆえ、ISG20 の生理学および病理学的役割の研究成果は数多く存在する. 一方、その多くは抗ウイルス特性についてのようであり、ISG20 と U snRNA の関係性についての報告はほとんど存在しない.

しかしながら、いくつかの知見は ISG20 の U snRNA への関与を示唆する. 例えば ISG20 は、酵母において U4, U5 snRNA など、さまざまな RNA のプロセッシングを行う RNase D family of exonucleases (Rex) タンパク質のひとつ (Rex4p) のホモログに相当する (Van Hoof et al. 2000b). 加えて、ISG20 は U1, U2 snRNA と相互作用するという報告もある (Espert et al. 2006). ただし、ISG20 がどのように U snRNA に関与するかという明確な知見は存在しなかった. 本論文は、ISG20 が U snRNA の分解を行うという、新たな知見を与える.

これまで ISG20 は、RNA ウイルスの侵入に伴い発現が誘導され、それらを分解することで抗ウイルス効果を発揮すると考えられてきた (reviewed in Zheng et al. 2017). 一方で興味深いことに、ISG20 が RNA 分解を介さずに、ウイルス増殖を抑制できるという報告も複数存在する (Zhou et al. 2011; Weiss et al. 2018; Wu et al. 2019). これは、前述とは異なる作用機序でも ISG20 が抗ウイルス効果を発揮できることを示唆する (Zhou et al. 2011; Weiss et al. 2018; Wu et al. 2019).

本論文の、ISG20 が U snRNA を分解するという知見は、pre-mRNA スプライシング機構の調節を介した、新規のウイルス増殖抑制機構を提供するかもしれない. 一本鎖 RNA ウイルスであるデングウイルスの感染は、宿主 pre-mRNA のスプライシングパターンの広範な変化をもたらすことが知られているが (Ku et al. 2011; De Maio et al. 2016), これはデングウイルス NS5 タンパク質が宿主 U snRNP と結合することで、宿主スプライシング機構を強奪するためと考えられている (De Maio et al. 2016; Pozzi et al. 2020). デングウイルス感染により

発現誘導される ISG20 は (Jiang et al. 2010), これら強奪された U snRNP の解体を U snRNA 分解を介して行い, ウイルス増殖を防ぐ役割を果たすのかもしれない. 本研究の ISG20 と U snRNA についての知見が, ISG20 を介した新規のウイルス増殖抑制機構を紐解くきっかけになることを期待したい.

6. ISG20 と RNA exosome complex によるヒト U snRNA の分解

二次構造予測上, Sm-class snRNA の 3'末端にはステム・ループ構造が存在する (図 1.5; reviewed in Adachi & Yu 2014). それゆえ U snRNA を 3'-exoribonucleolytic に分解するためには, この強固な構造を解く必要があると推察される.

ヒト RNA exosome complex は, 含まれる 3'-exonuclease (EXO10, DIS3, DIS3L) に違いはあるものの, 核小体・核・細胞質まで, 細胞内に幅広く存在する (Tomecki et al. 2010). また, それら全ての活性は RNA helicase により補助される. 核小体・核では RNA helicase Mtr4 を持つ TRAMP complex および nuclear exosome targeting (NEXT) complex のそれぞれが (Lubas et al. 2011; Aly et al. 2016), 細胞質では RNA helicase Ski2 を持つ Ski complex が (Kalisiak et al. 2016), RNA exosome complex の補助因子として機能する. 各 RNA helicase と相互作用可能な RNA exosome complex が, 3'末端にステム・ループ構造を持つ U snRNA を分解するという本論文での主張は合理的だと考える.

一方, ISG20 が特定の RNA helicase と相互作用するという報告は, 2つのタンパク質間相互作用についてのデータベース (BioGRID, IntAct) を見る限り存在しない. よって ISG20 は, U snRNA 3'末端のステム・ループ構造の形成前, もしくは形成が失敗したものを標的とすると考えられる. ISG20 はその局在ゆえに (Espert et al. 2006; Son et al. 2018), U snRNP 成熟過程の序盤と終盤, すなわち PHAX が結合する前 (Suzuki et al. 2010),

および細胞質から核への再輸送後の (Jády et al. 2003; Nesic et al. 2004), Cajal body 内に存在する U snRNA (Smith & Lawrence 2000) の品質管理を行う可能性が高い (図 3.1).

異常 U snRNA は, 生成後速やかに分解されると推察する. なぜなら, U1 snRNA 遺伝子と Uv1 遺伝子の上流と下流の配列は, プロモーターや 3'box を含め, 高い相同性を示すが (Denison & Weiner 1982; O'Reilly et al. 2013), U1 snRNA 遺伝子内にさまざまな変異を持つ Uv1 の細胞内存在量は, U1 snRNA と比較し著しく少ないからである (図 2.7B O'Reilly et al. 2013). 加えて, 特定の Uv1 (Uv1-8, -15) が Sm タンパク質と共沈するという実験結果は (図 2.7B; O'Reilly et al. 2013), 何らかの変異を持つ U1 snRNA でさえ, U1 snRNP に取り込まれてしまう可能性を示唆する. おそらく ISG20 と RNA exosome complex の異所性は (Espert et al. 2006; Tomecki et al. 2010; Son et al. 2018), さまざまな場所で生じる異常 U snRNA の素早い除去を可能し, 非機能性 U snRNP の生成を未然に防ぐのだろう.

7. *In vitro* 反応系を基盤とした新規因子の同定, およびその限界

「特定の反応を再現した系の構築 (*in vitro*)」→「活性因子を生化学的に精製 (*in vitro*)」→「活性評価 (*in vivo*)」という一連の流れは, 未知の因子を同定する上で極めて有用な手法である. 一方で, *in vitro* 系に根ざした研究手法である以上, 特定反応以外を軽視せざるを得ないこともまた事実であり, このことが目的因子の誤同定の要因となり得る. 実際, 本研究においても, *in vitro* 3'-end trimming 反応 (図 2.1) を基盤とした新規 Trimmer の同定は (図 2.4), 結果的には目的因子の誤同定に繋がった (図 2.5, 2.6, 2.7).

本研究での誤同定の要因のひとつに, 転写と協調しない, すなわち転写直後の U snRNA の構造が不安定になり得ることなどを無視した, *in vitro* 3'-end trimming 反応系

を用いたことが考えられる。 *In vitro* 反応系の基質 pre-U1 snRNA は二次構造予測上、U1 snRNA 3'末端のステム・ループ構造に 5'-ACUUUCU-3' という非構造配列が付加された形となる (図 1.5)。この 3'末端の強固な構造の存在は、単なる基質 pre-U1 の「3'-exoribonucleolytic な分解反応」を、「ステム・ループ構造根元までの分解反応 (3'-end trimming)」とする可能性を内包する。事実、ISG20 (Nguyen et al. 2001) や EXO10 (Januszkyk et al. 2011) の *in vitro* での活性は、RNA 中のステム・ループ構造の存在により著しく減弱すると報告されている。同時に、*in vitro* 反応系に「RNA helicase の関与が不確定」であることも、Trimmer 誤同定の要因のひとつになり得るだろう。加えて今回は、「活性因子を生化学的に精製 (*in vitro*)」した際にも、誤同定を誘引する要素が存在した。本研究では最終的に、HeLa 細胞核抽出液 (HNE) 中の、特に強い活性を示すタンパク質 (ISG20, RNA exosome complex) のみ精製した。言い換えれば、活性が弱いものは軒並み棄却している (図 2.3B 中 Phenyl Eluate_Fraction 34 など)。これら精製途中で棄却した因子の中に、目的の Trimmer が含まれていた可能性は十分にある。

8. 総合的考察

本研究の総合的見解として、ヒト U snRNA の細胞内の挙動を、U snRNP 成熟過程を中心に言及する (図 3.1)。

ヒト U snRNP 成熟過程は、U snRNA の RNA polymerase II 転写により始まる (Murphy et al 1982; Reddy 1988; Henry et al. 1998)。この転写は、一次転写産物 (pri-U snRNA) の 3'末端を Integrator complex が切断することで終結する (Baillat et al. 2005)。ここで生じた U snRNA 前駆体 (pre-U snRNA) の 3'末端は、成熟型にはない 10-nt 前後の余分な配列を持つ (Weinberg & Penman 1968; Eliceiri & Sayavedra 1976; Uguen & Murphy 2003)。次に、

おそらく pre-U snRNA 3'末端にアデノシンが付加 (A-tailing) される (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018). その後 Cajal body に輸送され (Smith & Lawrence 2000; Suzuki et al. 2010), TOE1 が会合する (Wagner et al. 2007; Son et al. 2018). TOE1 による 3'末端伸長配列の除去 (3'-end trimming) はこの段階で行われるのかもしれない (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018). また会合した TOE1 は, この後の pre-U snRNA の 3'-exoribonucleolytic な分解を阻害する (Lardelli et al. 2020). 次に, pre-U snRNA は細胞質へと輸送される (Ohno et al. 2000). この段階で pre-U snRNA は, それら 3'末端伸長配列の長さにより規定された 2 つの方法で品質を評価される (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). ひとつめの評価は, 輸送直後の pre-U snRNA について起こる (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). この評価において, 10-nt 以下の伸長配列を持つ pre-U snRNA は 3'-end trimming を受け, その前駆体領域の大部分が除去される (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990; Lardelli et al. 2020). なお, この除去反応には未知の 3'-exonuclease が関与するかもしれない. 一方, 10-nt よりも長い伸長配列を持つ pre-U snRNA は 3'-end trimming を受けず, 分解される (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). これは, 3'末端伸長配列の高い自由度のため, Trimmer との接触効率が低下することに起因するかもしれない (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). このひとつめの評価を突破した pre-U snRNA は, ふたつめの評価に回される. ここで評価される U snRNA のうち, 3'末端が成熟型, または 1-nt の伸長配列を持つものは核に再輸送されるが, それ以外は細胞質に留まり続け, 最終的には分解される (Neuman de Vegvar & Dahlberg 1990). これら 2 つの評価を突破し, 核に再輸送された pre-U snRNA は, TOE1 による 3'-end trimming (Lardelli et al. 2017, 2020; Son et al. 2018), 特定塩基の RNA 修飾 (Jády et al. 2003), および特定タンパク質との会合 (Nesic et al. 2004) を経て成熟化し, スプライシング因子として機能する (reviewed in Matera & Wang 2014).

U snRNA 生合成経路のいずれかの失敗, もしくは U snRNP の機能不全の結果生じる異常 U snRNA は, 即座に分解されると予想される (Denison & Weiner 1982; O'Reilly et

al. 2013). 本論文で U snRNA を分解する因子とした, ISG20 および RNA exosome complex の異なる細胞内局在は, さまざまな場で生じる異常 U snRNA の速やかな分解を可能にすると推察される (Espert et al. 2006; Tomecki et al. 2010; Son et al. 2018). U snRNP 成熟過程において, Cajal body に局在する ISG20 は序盤と終盤の (Espert et al. 2006), RNA exosome complex はそれ以外の場の U snRNA 品質管理を担うのだろう (Tomecki et al., 2010). また, U snRNP 機能不全の結果生じた異常 U snRNA も, 各因子により 3'-exoribonucleolytic に分解されるだろう. もしかしたら, その分解は Cajal body 近傍, または内部で起こり, 異常のないタンパク質は Cajal body 中で再利用されるのかもしれない. 本論文の, ISG20 および RNA exosome complex が U snRNA の品質管理を行うという知見が, これまでほとんど報告のない, U snRNP ターンオーバー機構を解き明かすきっかけになることを期待したい.

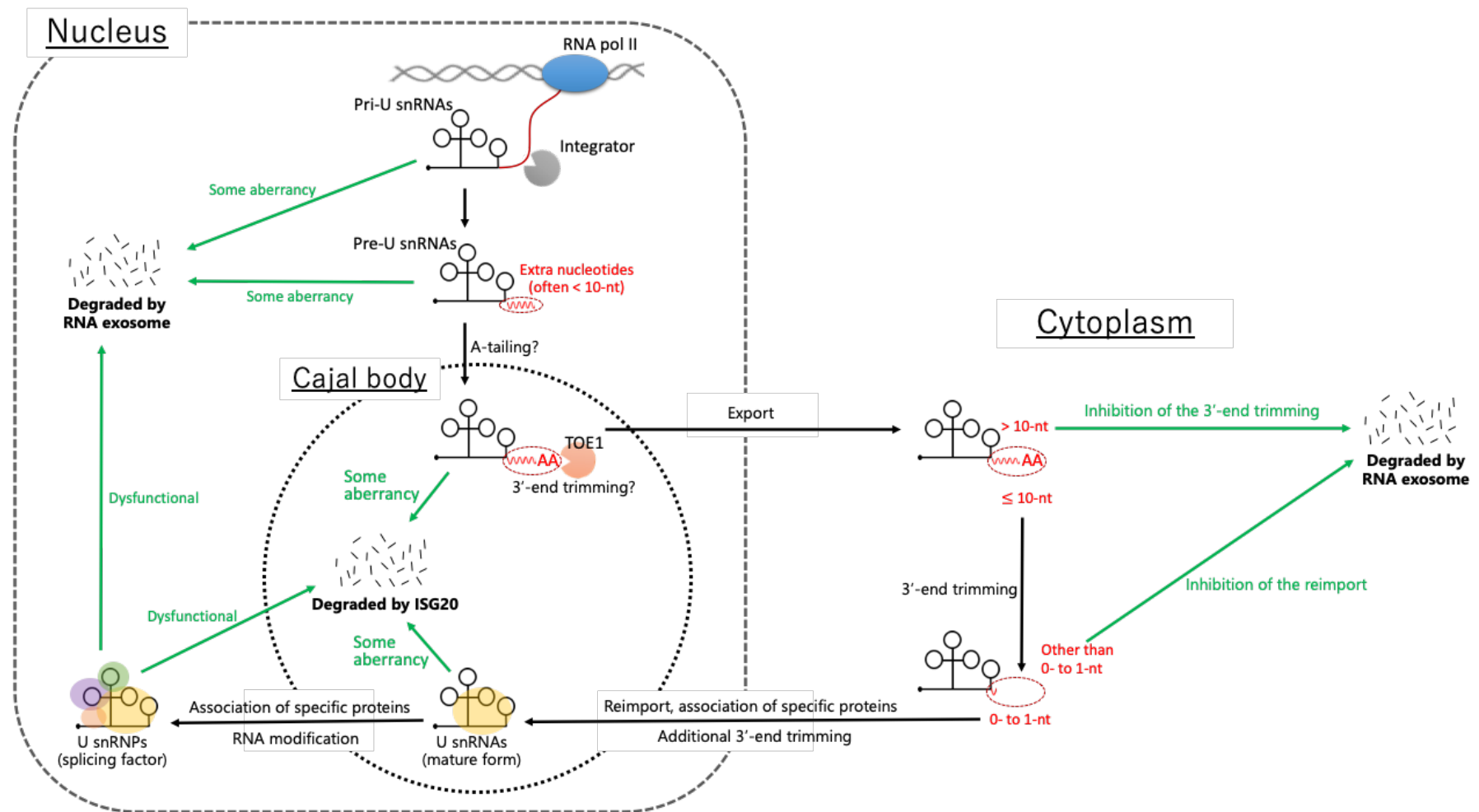


図 3.1 ヒト U snRNA の挙動についての総合的見解

材料と手法

プラスミドの構築

HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリを鋳型とした PCR により, ヒト U1 snRNA 遺伝子座を増幅した. その後 PCR 断片を, Eco RI と Hind III を用いて pUC118 ベクターに挿入し, hU1_pUC118 を構築した.

hU1_pUC118 を鋳型とした PCR により, プラスミドの全長を増幅した. なお PCR には, リン酸化処理後のプライマーを使用した. また, PCR 断片内の U1 snRNA 遺伝子領域上流に 5' tag 配列 (5' -TGATCGCGCTTCTCGTGGG-3') が挿入されるプライマーを用いた (Katz et al. 2007). その後 PCR 断片をセルフライゲーションさせ, 5' tag-hU1_pUC118 を構築した.

全ての PCR は Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) で行った. 使用したプライマーは Table 2 にまとめる.

In vitro 3'-end trimming 反応の基質 RNA の構築

T7 プロモーター配列を挿入した U1, preU1, 5'tag-U1 and 5'tag-preU1 DNA 断片を PCR により増幅した. その際, 各 DNA 配列を含むプラスミドを鋳型とした. なお PCR には, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) を用いた. これら PCR 産物を *in vitro* 転写反応時の鋳型 DNA とした.

³²P 標識した基質 RNA は, 上記 PCR 断片を鋳型 DNA とした *in vitro* 転写反応により合成した. 反応は, 10 μ L 反応容量, 37°C, 1 時間の条件で行った. また組成は, 20 U T7 RNA Polymerase (Promega), 1 \times Transcription Optimized Buffer (Promega), 1 mM DTT (Promega), 12 U RNasin Plus (Promega), NTP 混合溶液 (0.5 mM ATP, CTP, 0.1 mM UTP, GTP), 1 μ g 鋳型 DNA,

1 mM m⁷G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog (New England Biolabs), 2.96 TBq/mmol [α -³²P] UTP とした。

各転写産物についてのゲル精製を、8%変性 PAGE により行った後、精製 RNA を Milli-Q 水で溶解した。なお各 RNA 濃度は 100,000 cpm/ μ L に統一した。これらの ³²P 標識 RNA を、*in vitro* 3'-end trimming 反応の基質 RNA とした。

使用したプライマーは Table 2 にまとめる。

***In vitro* 3'-end trimming アッセイ**

In vitro 3'-end trimming 反応は、10 μ L 反応容量、30°C の条件で行った。また組成は、100,000 cpm ³²P 標識基質 RNA、10 ng 非標識基質 RNA、2.5 mM MgCl₂、8 U RNasin Plus (Promega)、8 μ L 細胞破砕液 (WCL) または抽出液 (HNE, S100) とした。なお破砕液と抽出液は、Buffer N100 [20 mM Tris (7.4), 0.1 mM EDTA (8.0), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF] で透析した後のものを使用した。透析には Mini Dialysis Kit (8kDa cut-off; GE Healthcare) を用いた。一定時間経過後、溶液に 50 mL Homomix [50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 1.5% SDS, 300 mM NaCl, 1.5 mg/ml proteinase K (Nacalai Tesque)] を添加し、反応を停止した (Taniguchi et al. 2014)。

反応による生成 RNA は、フェーノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿の操作により回収した後、8%変性 PAGE により分離し、オートラジオグラフィーにより検出した。

HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞は 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。また培養には、10%ウシ胎児血清 (Equitech-Bio, Inc.), 100 mg/mL ペニシリンと 100 U/mL ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Inc.)

のペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を使用した)を含む DMEM (Nacalai Tesque, Inc.) を用いた。

HeLa 細胞破碎液と抽出液の準備

HeLa 細胞の細胞質抽出液 (S100) と核抽出液 (HNE) は Cil Biotech より購入した。

HeLa 細胞の全溶解液 (WCL) の調整は次の手順で行った。まず 10-cm ディッシュで培養した HeLa 細胞を、PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.09 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で洗浄した後、トリプシン消化によりマイクロチューブに回収した。そのチューブを 400×g, 4°C, 10 分間遠心した後、細胞ペレットを ice-cold PBS で 2 回洗浄した。次に、ペレットと等容量の ice-cold D'K100 buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol) で懸濁した後、ソニケーションを行い、細胞を完全に破碎した。最後に、チューブを 20,400×g, 4°C, 10 分間遠心し、上清を WCL として回収した。

HNE 中の Trimmer 精製手法の検討

精製手法の検討には、15,300×g, 4°C, 10 分間遠心した後の HNE 上清を用いた。なお、HNE 上清のタンパク質濃度は 12.8 mg/mL を示した。また、操作は極力氷上で行った。

硫酸分画についての検討は、HNE 上清 (70 μL) を用いて行った。HNE 上清に飽和 (100%) 硫酸溶液を終濃度 10%になるように添加し、氷上で 30 分間保温した。その際 10 分毎にタッピングを行い、溶液を混合した。その後 20,400×g, 4°C, 10 分間遠心し、10%硫酸沈殿を調製した。次に、別のマイクロチューブに移した 10%硫酸上清に終濃度 30%となるように飽和硫酸溶液を添加し、前述と同様の操作により 30%硫酸沈殿を調製した。その後、50%, 70% の各硫酸沈殿、および 70%硫酸上清も同様に調製した。最後に、硫酸沈殿を精製開始時の

HNE 上清と等容量 (70 μ L) の Buffer N100 に溶解後, Buffer N100 で透析することで各精製画分を調整した. 透析には Mini Dialysis Kit (8kDa cut-off; GE Healthcare) を用いた. 活性評価は, 透析後の各精製画分を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.2A). 反応は 30°C, 30 分間の条件で行い, 各精製画分は反応系に対して 30%の割合で使用した.

Q, SP, Heparin の各セファロース担体についての検討には, 一定容量 (20 μ L) の担体に対し, 35, 70, 140 μ g/20 μ L のいずれかのタンパク質濃度を示す HNE 上清を使用した. まず HNE 上清を, いずれかの特性を持つ担体に加え, 4°C, 1 時間の条件でローテートした. 次に, 卓上遠心機による数秒間の遠心により生じた上清を Unbound 画分として回収した. 担体は 1 mL の Buffer N100 で 3 回洗浄した後, 20 μ L の Buffer N1000 [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1000 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF] で結合タンパク質を溶出し, Bound 画分として回収した. 活性評価は, 各精製画分を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.2B). 反応は 30°C, 2 時間の条件で行い, 各精製画分は反応系に対して 16%の割合で使用した.

疎水 (Phenyl) セファロース担体についての検討には, 30%硫酸上清を用いた. なお 30%硫酸上清は, HNE 上清について前述と同様の操作を行い調整した. まず, いずれかの量 (50, 75, 100 μ L) の Phenyl セファロースビーズに, 一定容量の 30%硫酸上清 (50 μ L) を加え, 4°C, 1 時間の条件でローテートした. 次に, 卓上遠心機による数秒間の遠心により生じた上清を Unbound 画分として回収した. 担体は 30%硫酸を含む Buffer N200 [20 mM Tris-HCl (7.4), 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF] 1 mL で 4 回洗浄した後, Buffer N200 と Buffer N0 [20 mM Tris-HCl (7.4), 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF] で結合タンパク質を逐次的に溶出した. 溶出は 50 μ L の各 Buffer を用いて 3 回ずつ行い, それぞれを Bound 画分として回収した. 各精製画分は, Mini Dialysis Kit (8kDa cut-off; GE Healthcare) を用いて Buffer N100 で透析した. 活性評価は, 透析後の各精製画分を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.2C). 反応は 30°C, 2 時間の条件

で行い、各精製画分は反応系に対して 16%の割合で使用した。

HNE 中の Trimmer の精製

Cil Biotech より購入した HNE (10 mL) を 15,300×g, 4°C, 30 分間の条件で遠心した後、その上清を HNE 上清として回収し、次精製ステップに用いた。

HNE 上清 (9.45 mL) から 30%硫酸上清を前述と同様の手法により調製し、次精製ステップに用いた。なお、30%硫酸上清の一部 (50 µL) については Buffer N200 で透析した後、活性評価とタンパク質濃度測定を行った。活性評価は、*in vitro* 3'-end trimming アッセイで行った(図 2.3A)。反応は 30°C, 30 分間の条件で行い、各精製画分は反応系に対して 30%の割合で使用した。また、タンパク質濃度測定結果から、30%硫酸上清全量 (13.5 mL) 中に含まれるタンパク質量を推定した。

30%硫酸上清中の活性の精製は、HiTrap Phenyl FF カラム (1 mL-column, low sub; GE Healthcare) により行った。精製は、30%硫酸上清の一部 (0.5 mL) をサンプルとし、流速を 1 mL/min, 30%から 0%硫酸のリニアグラジエント溶出、各溶出画分を 0.5 mL ずつ回収する条件で行った。なお Buffer は、各濃度の硫酸を含む Buffer N200 を使用した。また、同一条件での精製を計 27 回行い、前述で調整した 30%硫酸上清を全量 (13.5 mL) 精製した。活性評価は、1 試行回数分の精製画分を Buffer N200 で透析し、その一部を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った。反応は、各精製画分を反応系に対して 30%使用し、30°C, 3 時間の条件で行った。この際、活性が 2 つに分かれたため(図 2.3B)、以下の精製ステップは、Phenyl Eluate_Fraction 37-39 を Activity I, _Fraction 41 を Activity II とし、それぞれ個別に行った。また透析後の各 Phenyl Eluate のタンパク質濃度測定結果から、Activity I (40.5 mL) と Activity II (10.5 mL) 中に含まれるタンパク質量を推定した。

各 27 施行回数分の Phenyl Eluate を 1 本にまとめた後、各 Phenyl Eluate の Buffer

200N への置換, および濃縮を Amicon Ultra 3K filter (Merk-millipore) により行った. また, この操作前後の各 Phenyl Eluate の一部について希釈系列を作製し, *in vitro* 3'-end trimming アッセイを行うことで, この操作前後の活性の強さを比較した(図 2.3C). 反応は, 各希釈系列溶液を反応系に対して 30%使用し, 30°C, 1 時間の条件で行った. また次精製ステップのために, バッファ置換, および濃縮後の各 Phenyl Eluate を 15,300×g, 4°C, 10 分間遠心し, その上清を回収した. その後, 各遠心上清のタンパク質濃度を測定した.

各 Phenyl Eluate 遠心上清中の活性の精製を, HiTrap Heparin HP カラム (1 mL-column, GE Healthcare) により行った. 精製は, Activity I (0.33 mL) と Activity II (0.175 mL) をサンプルとし, 流速を 1 mL/min, 0.2-1 M NaCl のリニアグラジエント溶出, 各溶出画分を 0.5 mL ずつ回収する条件で行った. なお Buffer は, Buffer N200 と Buffer N1000 を使用した. また, 同一条件での精製を各 2 回ずつ行うことで, 前述で調整した Activity I (0.66 mL) と Activity II (0.35 mL) の各全量を精製した. 活性評価は, Buffer N200 で透析した後の各精製画分の一部を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.3D, G). 反応は, 各精製画分を反応系に対して 30%使用し, 30°C, 6 時間の条件で行った. また次精製ステップのために, 透析後の各 Heparin Eluate を 15,300×g, 4°C, 10 分間遠心し, その上清を回収した. その後, 各遠心上清のタンパク質濃度を測定した.

各 Heparin Eluate 遠心上清中の活性の精製を, Mono Q カラム (0.1 mL-column, GE Healthcare) により行った. 精製は, Activity I (1 mL) と Activity II (1 mL) をサンプルとし, 流速を 80 μ L/min, 各溶出画分を 50 μ L ずつ回収する条件で行った. また各結合画分の溶出は, Activity I は 0.2-1 M NaCl のリニアグラジエント, Activity II は 0.2-0.5 M NaCl のリニアグラジエントでそれぞれ行った. なお Buffer は, Buffer N200 と Buffer N1000 をそれぞれ使用した. 活性評価は, Buffer N200 で透析した後の各精製画分の一部を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.3E, H). 反応は, 各精製画分を反応系に対して 30%使用し, 30°C, 6 時間の条件で行った. また次精製ステップのために, Activity I 精製画分についてのみ Mono

Q FT_Fraction 2-5(図 2.3E)を混合した後, 15,300×g, 4°C, 10 分間遠心し, その上清を回収した. Activity II については Mono Q Eluate_Fraction 22(図 2.3H)を最終精製産物とした. 各操作を終えた後, それぞれのタンパク質濃度を測定した.

Activity I の精製を, Mono S カラム (0.1 mL-column, GE Healthcare) により行った. 精製は, Mono Q FT_Fraction 2-5 (1 mL) をサンプルとし, 流速を 80 μ L/min, 0.2-1 M NaCl のリニアグラジエント溶出, 各溶出画分を 50 μ L ずつ回収する条件で行った. なお Buffer は, Buffer N200 と Buffer N1000 を使用した. 活性評価は, 各精製画分の一部を用いた *in vitro* 3'-end trimming アッセイにより行った(図 2.3F). 反応は, 各精製画分を反応系に対して 30%使用し, 30°C, 6 時間の条件で行った. Activity I については Mono S Eluate_Fraction 19(図 2.3F)を最終精製産物とし, タンパク質濃度を測定した.

各精製ステップ後に測定したタンパク質濃度結果は Table 1 にまとめる.

HNE 中の Trimmer の同定

Activity I と Activity II の最終精製画分, およびそれらと隣接する各精製画分をサンプルとし, 5-20%グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE を行った. また, タンパク質の検出は銀染色により行った(図 2.3A, B 左下). 次に活性の強さ(図 2.3A, B 左上)と, 銀染色で検出された各バンド強度との間に相関関係のあるバンド(図 2.3A, B 左下内の星印)を切り出し, 各ゲル切片をマイクロチューブに入れた. その後, 各ゲル切片中に含まれるタンパク質の質量分析を JPROteomics に依頼し, 各タンパク質を同定した.

HeLa 細胞中の特定因子のノックダウン (KD)

24 ウェルプレートに培養した HeLa 細胞に, 5 nM Silencer Select siRNA (Thermo Fisher

Scientific) を Lipofectamine 3000 試薬 (Thermo Fisher Scientific) により導入した後, 72 時間インキュベーションした. その後, 同条件で siRNA を再導入し, さらに 72 時間インキュベーションし, 特定の因子を KD した. 使用した siRNA の配列は Table 3 にまとめる.

Western blotting

ディッシュ上の HeLa 細胞を PBS で洗浄した後, SDS-PAGE サンプルバッファー [62.5 mM Tris (6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.02% Bromophenol blue, 10% glycerol] でエッペンチューブに回収した. そのチューブを 100°C で 5 分間保温した後, 氷上で急冷し, サンプルを調整した.

サンプル中のタンパク質は 12.5% SDS-PAGE により分離した後, ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) に転写した. 次にメンブレンを, 5% スキムミルクを含む TBS-T buffer [20 mM Tris-HCl (7.5), 30 mM NaCl, 0.1% Tween 20] に浸し, 室温で 1 時間振盪することでブロッキングした. その後一次抗体反応は 4°C, オーバーナイトの条件で行った. 二次抗体反応には, HRP 標識の抗マウス, または抗ラビット IgG 抗体を 3,000 倍希釈で使用し (Jackson ImmunoResearch), 反応は室温, 1 時間の条件でそれぞれ行った. 一次抗体, 二次抗体は 5% スキムミルクを含む TBS-T buffer で希釈し使用した. なお, 各抗体反応後のメンブレンは TBS-T buffer 中での, 室温, 10 分間の振盪を各 3 回行うことで洗浄した. バンドの検出には, Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare) のいずれかを用いた.

使用した一次抗体の情報は Table 4 にまとめる.

内在性 U1 snRNA の 3'末端配列解析

特定因子 KD 後の HeLa 細胞中の total RNA を Sepasol RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.) により抽出した。次に, total RNA の 3'末端に 3'linker をライゲーションした。なお反応には T4 RNA ligase (Thermo Fisher Scientific) を用い, 16°C, 18 時間の条件で行った。ライゲーション産物 (RNA with 3'linker) は, フェーノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿の操作により回収した。次に, RNA with 3'linker を鋳型とした逆転写反応を, SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。次に, cDNA を鋳型とした PCR により U1 遺伝子の 3'末端配列を増幅した(一次 PCR)。なお増幅には, U1 内部と 3'linker を標的とするプライマーセットを用いた。その後, 目的断片のゲル精製を 8% PAGE により行った。ゲル精製は, メインバンドの-30 から+200 bp までの領域について行った。次に, 一次 PCR 産物を鋳型とした二次 PCR, ついで三次 PCR を行った。これら PCR により, 増幅断片の両末端に NGS 解析のための配列を付加した。また, 他の配列の混入を避けるため, 一次 PCR とは異なる U1 遺伝子内の配列を標的とするプライマーを用いた。また, 一次, 二次, 三次 PCR は全て EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio) で行った。次に, 三次 PCR 溶液を SPRIselect (Beckman Coulter Inc.) により精製した。精製は, 製品マニュアルの"1.2×Left Side Size Selection Procedure"を参照した。SPRIselect ビーズからの目的断片の溶出には Milli-Q 水を用いた。以上の操作で調整したサンプルを, U1 3'末端ライブラリとし, その NGS 解析は Novogene Inc.に委託した。

使用したプライマーは Table 2 に, 3'linker は Table 5 にそれぞれまとめる。

得られた配列データ (paired-end reads) の解析は次の手順で行った。まず paired-end reads 中の目的配列の抽出を Trimmomatic により行った (Bolger et al. 2014)。なお配列は, (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-3' と 5'-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGCTGATCATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3') を持つものを抽出した。また, 抽出に使用したこれらの配列は後の解析には不必要なため, この時点で除去した。その後抽出データを, 各 KD 条件を識別するために任意に挿入したバー

コード配列に従い分類した。分類には `sabre` (<https://github.com/najoshi/sabre>) を使用した。次に各データを、U1 遺伝子座 (chr1:16514122-16514285, chr1:16895980-16896143, chr1:143729407-143729570, chr1:146376807-146376970, chr14:34546714-34546877 on hg19) 上にマッピングし、3'末端の配列から、“成熟型”と、それらより長いものとして分類した。長いものについてはさらに、“Template 型”、“Untemplate 型”、“Mix 型”に分類した。まず、U1 遺伝子座の配列と完全一致したリードのみを“Template 型”として抽出した。この抽出からもれたリードは回収し、“Untemplate 型”と“Mix 型”に分類した。配列として、
CCAAATGTGGGAACTCGACTGCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTCCCTG(T/G)N
... を “Untemplate 型” ,
CCAAATGTGGGAACTCGACTGCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTCCCTG(A/C)N
...を“Mix 型”と分類した。これらのマッピングと分類には、`prinseq` と `Bowtie` (Langmead et al. 2009) を用いた。

新生 RNA の精製と定量的逆転写 PCR

24 ウェルプレートで培養した HeLa 細胞に、0.1 mM の 5-ethynyl uridine (5-EU) を添加し、1.5 時間インキュベーションすることで新生 RNA を 5-EU 標識した。次に total RNA を Sepasol RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.) により抽出した。その後 total RNA 中の 5-EU 標識 RNA を、Click-it nascent RNA capture kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。

5-EU 標識 RNA を基質とした逆転写反応と定量的 PCR は、それぞれ SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) と Fast SYBR green master mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

定量的 PCR に使用したプライマーは Table 2 にまとめる。

Table 2. Primers used in this study

Purpose and primer	Sequence (5'-to-3')
<u>Plasmids</u>	
• hU1_pUC118	
hU1 FW	aagaattcGTTTCTTCTGTAATCCGAAACATTCTAGTC
hU1 RV	aaaagcttACTGTAGGATTAACATTTAAGACGCCA
• 5'tagU1_pUC118	
5'tag-hU1 FW	tgatcgcgcttctcgttgggATACTTACCTGGCAGGGGAGA
5'tag-hU1 RV	GAGATCTTCGGGCTCTGCC
<u>DNA templates for transcription</u>	
• U1, preU1, 5'tag-U1, 5'tag-preU1 transcription template	
T7-U1, -PreU1 FW	taatacgaactcactataggATACTTACCTGGCAGGGGAG
T7-5'tagU1, 5'tagPreU1 FW	taatacgaactcactataggTGATCGCGCTTCTCGTTGGG
U1, 5'tagU1 RV	CAGGGGAAAGCGCGAACGCGAG
PreU1, 5'tagPreU1 RV	agaaagtCAGGGGAAAGCGCGAAC
<u>RNA-seq for U1 3'end</u>	
• 1st PCR	
U1 3'end_NGS (1st) -FW	ATGATCACGAAGGTGGTTTT
U1 3'end_NGS (1st) -RV	CAGACGTGTGCTCTCCGAT
• 2nd PCR	
U1 3'end_NGS (2nd) -FW1	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNTAAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW2	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNATTAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW3	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNGCGCAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW4	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNCGCTTAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW5	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNAGAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW6	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNGTGAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW7	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNACTAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -FW8	ACACGACGCTCTCCGATCTNNNTCTTAGCccaaatgtgggaaactcgac
U1 3'end_NGS (2nd) -RV	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATgatcagcgGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
• 3rd PCR	
U1 3'end_NGS (3rd) -FW	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
U1 3'end_NGS (3rd) -RV	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAG

Table 2. Primers used in this study

Purpose and primer	Sequence (5'-to-3')
qPCR	
U1_qPCR FW	GCACTCCGGATGTGCTGACCC ^[ref.1]
U1_qPCR RV	CAGGGGAAAGCGCAACGCAG ^[ref.1]
U2_qPCR FW	ATCGCTTCTCGCCTTTTGG ^[ref.2]
U2_qPCR RV	GGGTGCACCGTTCCTGGAGG ^[ref.2]
U4_qPCR FW	GCGCGATTATTGCTAATTGAAA ^[ref.1]
U4_qPCR RV	AAAAATTGCCAATGCCGACTA ^[ref.1]
U4atac_qPCR FW	GCGCATAGTGAGGGCAGTACT ^[ref.1]
U4atac_qPCR RV	GCACCAAATAAAGCAAAGCTCTA ^[ref.1]
U11_qPCR FW	AGGGCTTCTGTCGTGAGTGG ^[ref.2]
U11_qPCR RV	AAAGGGCGCCGGGACCAACG ^[ref.2]
U12_qPCR FW	TGCCTTAAACTTATGAGTAA ^[ref.2]
U12_qPCR RV	CGGGCAGATCGCAACTCCA ^[ref.2]
Uv1-6_qPCR FW	TGGCAGGAGAGATACCTGG ^[ref.1]
Uv1-6_qPCR RV	CGCGAATGCAGTCTACCACTG ^[ref.1]
Uv1-8_qPCR FW	GAAGCTAATTCGTGCAACTCCC ^[ref.1]
Uv1-8_qPCR RV	CGGGGGAAAAGAGCGAACGCAG ^[ref.1]
Uv1-15_qPCR FW	GTTATGTTCCGGGTGTACTGACCCTGCC ^[ref.1]
Uv1-15_qPCR RV	CAGTCGAGTTCCTCACATTG ^[ref.1]
mit12S_qPCR FW	ATGCAGCTCAAACGCTTAGC ^[ref.1]
mit12S_qPCR RV	GCTGGCACGAAATTGACCAA ^[ref.1]
7SK_qPCR FW	GAGGGCGATCTGGCTGCGACAT ^[ref.1]
7SK_qPCR RV	ACATGGAGCGGTGAGGGAGGAA ^[ref.1]
PROMPT_qPCR FW	CTTCTGAAGGGTTTTGTGTC ^[ref.3]
PROMPT_qPCR RV	CGTGGCTTCATAGTCCTTAT ^[ref.3]
5.8S_qPCR FW	GTCGATGAAGAACGCAGCTA
5.8S_qPCR RV	GACGCTCAGACAGGCGTAG
18S_qPCR FW	TTGTTGGTTTTCGAACTGAG ^[ref.2]
18S_qPCR RV	GCAAATGCTTTCGCTCTGGTC ^[ref.2]
GAPDH_qPCR RV	ATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAA ^[ref.4]
GAPDH_qPCR RV	AGTCCTCCACGATACCAAAGTT ^[ref.4]
EXOSC10_qPCR FW	CAGTGCTTCAAAGCCACAA
EXOSC10_qPCR RV	GTGCTCAAGTCAACTGCAA
DIS3_qPCR FW	GCTCTGCTTCGAAAACATCC
DIS3_qPCR RV	GCCTGATCCAAAGACTCAGC
DIS3L_qPCR FW	GGAAAGGAAGAACCCTAGCC
DIS3L_qPCR RV	AAGTATGCCCACTACTCGAC
ISG20_qPCR FW	ACAAGTTCATCCGGCCTGAG
ISG20_qPCR RV	TCAGGAGCTGCAGGATCTCT
PCR amplification of pre-5.8S rRNA containing ITS	
5.8S FW (FW-1)	CGACTCTTAGCGGTGGATCACTC
5.8S-ITS FW (FW-2)	GCCGATCAATCGCCCC
U1 3'end_NGS (1st) -RV	CAGACGTGTGCTCTCCGAT

References (table 2)

- 1 Lardelli R.M. & Andersen J.L. (2020). Competition between maturation and degradation drives human snRNA 3' end quality control. *Genes Dev.* **34**, 989-1001. <https://doi.org/10.1101/gad.336891.120>
- 2 Hrossova D., Sikorsky T., Potesil D., Bartosovic M., Pasulka J., Zdrahal Z., ... Vanacova S. (2015). RBM7 subunit of the NEXT complex binds U-rich sequences and targets 3'-end extended forms of snRNAs. *NAR.* **43**, 4236-4248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv240>
- 3 Tomecki R., Kristiansen M.S., Lykke-Andersen S., Chlebowski A, Larsen K.M., Szczesny R.J., ... Jensen T.H. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* **29**, 2342–2357. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.121>
- 4 Izumi H., McCloskey A., Shinmyozu K. & Ohno M. (2014). p54nrb/NonO and PSF promote U snRNA nuclear export by accelerating its export complex assembly. *NAR.* **42**, 3998–4007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1365>

Table 3. siRNAs used in this study

Target for siRNAs		Sequence (5'-to-3')
siControl (Luciferase)	Sense strand	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
	Antisense strand	UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT
siEXOSC10	Test 1	Sense strand CCAGUUUACAGACCUAUAdTdT Antisense strand UAUAGGUCUGUAUAACUGGdTdT
	Test 2	Pre-designed (Thermo, s10738)
siSG20	Test 1	Pre-designed (Thermo, s7523)
	Test 2	Pre-designed (Thermo, s7524)
siTOE1	Test 1	Pre-designed (Thermo, s41523)
	Test 2	Pre-designed (Thermo, s41524)
siDIS3	Test 1	Sense strand AGGUAGAGUUGUAGGAAUAdTdT Antisense strand UAUUCCUACAACUCUACCUdTdT
	Test 2	Pre-designed (Thermo, s229660)
siDIS3L	Test 1	Sense strand CGUAAAGACUUGAGGAAAAdTdT Antisense strand UUUUCCUCAAGUCUUACGdTdT
	Test 2	Pre-designed (Thermo, s41867)

Table 4. Antibodies used in this study

Target proteins	Type	Source	Working dilution
ISG20	Rabbit	abcam; ab154393	1:500
EXO10	Rabbit	abcam; ab50558	1:500
TOE1	Mouse	Merck: SAB1405335	1:500
GAPDH	Rabbit	SIGMA; G9545	1:300,000

Table 5. 3' linkers used in this study

3' linker	Sequence (5'-to-3')
-1	/P/NNNNNATCGTAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAA/ddC/
-2	/P/NNNNNAGCTAAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAA/ddC/

引用文献

- Adachi H. & Yu Y. T. (2014). Insight into the mechanisms and functions of spliceosomal snRNA pseudouridylation. *World J Biol Chem.* **5**, 398-408.
<https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i4.398>
- Allmang C., Kufel J., Chanfreau G., Mitchell P., Petfalski E. & Tollervey D. (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* **18**, 5399-5410.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5399>
- Allmang C., Petfalski E., Podtelejnikov, A., Mann M., Tollervey D. & Mitchell P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**, 2148–2158. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2148>
- Aly H. H., Suzuki J., Watashi K., Chayama K., Hoshino S., Hijikata M., ..., Wakita T. (2016). RNA Exosome Complex Regulates Stability of the Hepatitis B Virus X-mRNA Transcript in a Non-stop-mediated (NSD) RNA Quality Control Mechanism. *J Biol Chem.* **291**, 15958-15974. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.724641>
- Baillat D., Hakimi M. A., Näär A. M., Shilatifard A., Cooch N. & Shiekhattar R. (2005). Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell* **123**, 265-76.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.019>
- Berget S. M., Moore C. & Sharp P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *PNAS.* **74**, 3171-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3171>
- Berglund J. A., Abovich N. & Rosbash M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev.* **12**, 858–867.
<https://doi.org/10.1101/gad.12.6.858>

- Berk A. J. (2016). Discovery of RNA splicing and genes in pieces. *PNAS*. **113**, 801-805.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1525084113>
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**, 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Brody E. & Abelson J. (1985). The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**, 963-967.
<https://doi.org/10.1126/science.3890181>
- Burge C. B., Padgett R. A. & Sharp P. A. (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell*. **2**, 773-785. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80292-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80292-0)
- Chanfreau G., Elela S. A., Ares M. Jr. & Guthrie C. (1997). Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev.* **11**, 2741-2751.
<https://doi.org/10.1101/gad.11.20.2741>
- Chow L. T., Gelinas R. E., Broker T. R. & Roberts R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**, 1-8.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90180-5)
- Crick F. H. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*. **12**, 138-63.
- Davis C. A. & Ares M. Jr. (2006). Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in *Saccharomyces cerevisiae*.
- De Maio F. A., Risso G., Iglesias N. G., Shah P., Pozzi B., Gebhard L. G., ..., Gamarnik A. V. (2016). The dengue virus NS5 protein intrudes in the cellular spliceosome and modulates splicing. *PLoS Pathog*. **12**, e1005841. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005841>
- Denison R. A. & Weiner A. M. (1982). Human U1 RNA pseudogenes may be generated by both DNA- and RNA-mediated mechanisms. *Mol Cell Biol*. **2**, 815-828.
<https://dx.doi.org/10.1128%2Fmcb.2.7.815>

- Dietrich R. C., Inorvaia R. & Padgett R. A. (1997). Terminal intron dinucleotide sequences do not distinguish between U2- and U12-dependent introns. *Mol Cell*. **1**, 151-160. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80016-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80016-7)
- Doma M. K. & Parker R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell* **131**, 660-668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.041>
- Domdey H., Apostol B., Lin R. J., Newman A., Brody E. & Abelson J. (1984). Lariat structures are in vivo intermediates in yeast pre-mRNA splicing. *Cell* **39**, 611-621. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90468-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90468-9)
- Du H. & Rosbash M. (2002). The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. *Nature* **419**, 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature00947>
- Egecioglu D. E., Henras A. K. & Chanfreau G. F. (2006). Contributions of Trf4p- and Trf5p-dependent polyadenylation to the processing and degradative functions of the yeast nuclear exosome. *RNA* **12**, 26-32. <https://doi.org/10.1261/rna.2207206>
- Eliceiri G. L. & Sayavedra M. S. (1976). Small RNAs in the nucleus and cytoplasm of HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **72**, 507-512. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(76\)80070-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(76)80070-8)
- Espert L., Eldin P., Gongora C., Bayard B., Harper F., Chelbi-Alix M. K., ... Mechti N. (2006). The exonuclease ISG20 mainly localizes in the nucleolus and the Cajal (Coiled) bodies and is associated with nuclear SMN protein-containing complexes. *J Cell Biochem*. **98**, 1320-1333. <https://doi.org/10.1002/jcb.20869>
- Flytzanis C., Alonso A., Louis C., Krieg L. & Sekeris C. E. (1978). Association of small nuclear RNA with HnRNA isolated from nuclear RNP complexes carrying HnRNA. *FEBS Lett*. **96**, 201-206. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)81094-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)81094-1)
- Frilander M. J. & Steitz J. A. (1999). Initial recognition of U12-dependent introns requires both

- U11/5' splice-site and U12/branchpoint interactions. *Genes Dev.* **13**, 851-863.
<https://doi.org/10.1101/gad.13.7.851>
- Gongora C., David G., Pintard L., Tissot C., Hua T. D., Dejean A. & Mechti N. (1997). Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J Biol Chem.* **272**, 19457–19463. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19457>
- Grabowski P. J., Seiler S. R. & Sharp P. A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**, 345-353.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80130-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80130-6)
- Hamm J. & Mattaj I. W. (1990). Monomethylated Cap Structures Facilitate RNA Export from the Nucleus. *Cell* **63**, 109-118. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90292-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90292-M)
- He H., Liyanarachchi S., Akagi K., Nagy R., Li J., Dietrich R. C., P., ..., de la Chapelle A. (2011). Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* **332**, 238-240.
<https://doi.org/10.1126/science.1200587>
- Henry R. W., Mittal V., Ma B., Kobayashi R. & Hernandez N. (1998). SNAP19 mediates the assembly of a functional core promoter complex (SNAPc) shared by RNA polymerases II and III. *Genes Dev.* **12**, 2664–2672. <https://dx.doi.org/10.1101%2Fgad.12.17.2664>
- Hopper A. K. & Nostramo R. T. (2019). tRNA Processing and Subcellular Trafficking Proteins Multitask in Pathways for Other RNAs. *Front Genet.* **10**, 1-14.
[10.3389/fgene.2019.00096](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00096) 2019 Feb 20;10:96.
- Huber J., Cronshagen U., Kadokura M., Marshallsay C., Wada T., Sekine M., Lührmann R. (1998). Snurportin1, an m₃G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* **17**, 4114-26. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.4114>
- Jády B. E., Darzacq X., Tucker K. E., Matera A. G., Bertrand E. & Kiss T. (2003). Modification of Sm

- small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J.* **22**, 1878-1888. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg187>
- Januszyk K., Liu Q. & Lima C. D. (2011). Activities of human RRP6 and structure of the human RRP6 catalytic domain. *RNA* **17**, 1566-1577. <https://doi.org/10.1261/rna.2763111>
- Jia H., Wang X., Liu F., Guenther U. P., Srinivasan S., Anderson J. T., & Jankowsky E. (2011). The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell* **145**, 890–901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.010>
- Jiang D., Weidner J. M., Qing M., Pan X. B., Guo H., Xu C., ..., Guo J. T. (2010). Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west Nile virus and dengue virus infection. *J Virol.* **84**, 8332-8341. <https://doi.org/10.1128/jvi.02199-09>
- Kaida D., Berg M. G., Younis I., Kasim M., Singh L. N., Wan L. & Dreyfuss G. (2010). U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* **468**, 664-668. <https://doi.org/10.1038/nature09479>
- Kalisiak K., Kuliński T. M., Tomecki R., Cysewski D., Pietras Z., Chlebowski A., ..., Dziembowski A. (2016). A short splicing isoform of HBS1L links the cytoplasmic exosome and SKI complexes in humans. *NAR.* **45**, 2068-2080. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw862>
- Kambach C., Walke S., Young R., Avis J. M., de la Fortelle E., Raker V. A., ... Nagai K. (1999). Crystal Structures of Two Sm Protein Complexes and Their Implications for the Assembly of the Spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**, 375-87. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80550-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80550-4)
- Karijolich J. & Yu Y. T. (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol.* **7**, 192-204. <https://doi.org/10.4161/rna.7.2.11207>
- Katz R. A., Jack-Scott E., Narezkina A., Palagin I., Boimel P., Kulkosky J. ..., Skalka A. M. (2007). High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized

- by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms. *J Virol.* **81**, 2592-2604.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01643-06>
- Kilchert C., Wittmann S. & Vasiljeva L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **17**, 227-239.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2015.15>
- Kleinschmidt A. M. & Pederson T. (1987). Accurate and Efficient 3' Processing of U2 Small Nuclear RNA Precursor in a Fractionated Cytoplasmic Extract. *Mol Cell Biol.* **7**, 3131-3137.
<https://doi.org/10.1128/mcb.7.9.3131>
- Kolossova I. & Padgett R. A. (1997). U11 snRNA interacts in vivo with the 5' splice site of U12-dependent (AU-AC) pre-mRNA introns. *RNA* **3**, 227-233.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1369475/>
- Ku C. C., Che X. B., Reichelt M., Rajamani J., Schaap-Nutt A., Huang K. J., ..., Arvin A.M. (2011). Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 173-82. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.83>
- Lacava J., Houseley J., Saveanu C., Petfalski E., Thompson E., Jacquier A. & Tollervey D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**, 713–724 (2005).
- Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25.
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Lardelli R. M. & Andersen J. L. (2020). Competition between maturation and degradation drives human snRNA 3' end quality control. *Genes Dev.* **34**, 989-1001.
<https://doi.org/10.1101/gad.336891.120>

- Lardelli R. M., Schaffer A. E., Eggens V. R., Zaki M. S., Grainger S., Sathe S. ... Gleeson J. G. (2017). Biallelic mutations in the 3' exonuclease TOE1 cause pontocerebellar hypoplasia and uncover a role in snRNA processing. *Nat Genet.* **49**, 457-464. <https://doi.org/10.1038/ng.3762>
- Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L. & Steitz J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220-224. <https://doi.org/10.1038/283220a0>
- Lerner M. R. & Steitz J. A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**, 5495-5499. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5495>
- Li Q., Lee J. A. & Black D. L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci.* **8**, 819-31. <https://doi.org/10.1038/nrn2237>
- Lubas M., Christensen M. S., Kristiansen M. S., Domanski M., Falkenby L. G., Lykke-Andersen S., ..., Jensen T. H. (2011). Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Mol Cell.* **43**, 624-37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.028>
- MacMillan A. M., Query C. C., Allerson C. R., Chen S., Verdine G. L. & Sharp P. A. (1994). Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region. *Genes Dev.* **8**, 3008–3020. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.3008>
- Madore S. J., Wieben E. D. & Pederson T. (1984). Intracellular site of U1 small nuclear RNA processing and ribonucleoprotein assembly. *J Cell Biol.* **98**, 188-192. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.188>
- Massenet S., Pellizzoni L., Paushkin S., Mattaj I. W. & Dreyfuss G. (2002). The SMN Complex Is Associated with snRNPs throughout Their Cytoplasmic Assembly Pathway. *Mol Cell Biol.* **27**, 1686-1695. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.18.6533-6541.2002>
- Matera A. G. & Wang Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**,

108-121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>

Mattaj I. W. (1986). Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**, 905-911. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90072-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90072-3)

Mitchell P., Petfalski E., Houalla R., Podtelejnikov A., Mann M. & Tollervey D. (2003). Rrp47p Is an Exosome-Associated Protein Required for the 3' Processing of Stable RNAs. *Mol Cell Biol.* **23**, 6982–6992. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.19.6982-6992.2003>

Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M., Tollervey D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457–466. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80432-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80432-8)

Mouaikel J., Narayanan U., Verheggen C., Matera A.G., Bertrand E., Tazi J. & Bordonné 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. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor863>

Murphy J. T., Burgess R. R., Dahlberg J. E. & Lund E. (1982). Transcription of a gene for human U1 small nuclear RNA. *Cell* **29**, 265-274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90111-8)

Murphy M. W., Olson B. L. & Siliciano P. G. (2004). The yeast splicing factor Prp40p contains functional leucine-rich nuclear export signals that are essential for splicing. *Genetics* **166**, 53-65. doi: 10.1534/genetics.166.1.53. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.1.53>

Nesic D., Tanackovic G. & Krämer A. (2004). A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. *J Cell Sci.* **117**, 4423-4433. <https://doi.org/10.1242/jcs.01308>

Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., ..., Mann M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet.* **20**, 46-50. <https://doi.org/10.1038/1700>

- Neuman de Vegvar H. E. & Dahlberg J. E. (1990). Nucleocytoplasmic Transport and Processing of Small Nuclear RNA Precursors. *Mol Cell Biol.* **10**, 3365-3375. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.7.3365>
- Nguyen L. H., Espert L., Mechti N. & Wilson D. M. (2001). The Human Interferon- and Estrogen-Regulated ISG20/HEM45 Gene Product Degrades Single-Stranded RNA and DNA in Vitro. *Biochemistry* **40**, 7174-7179. <https://doi.org/10.1021/bi010141t>
- Ohno M., Segref A., Bachi A., Wilm M. & Mattaj J. W. (2000). PHAX, a Mediator of U snRNA Nuclear Export Whose Activity Is Regulated by Phosphorylation. *Cell* **101**, 187-198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80829-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80829-6)
- O'Reilly D., Dienstbier M., Cowley S. A., Vazquez P., Drozd M., Taylor S., ... Murphy S. (2013). Differentially expressed, variant U1 snRNAs regulate gene expression in human cells. *Genome Res.* **23**, 281-291. <https://doi.org/10.1101/gr.142968.112>
- Padgett R. A., Mount S. M., Steitz J. A. & Sharp P. A. (1983). Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **35**, 101-107. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90212-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90212-x)
- Palacios I., Hetzer M., Adam S. A. & Mattaj J. W. (1997). Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J.* **16**, 6783-6792. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6783>
- Pozzi B., Bragado L., Mammi P., Torti M. F., Gaioli N., Gebhard L. G., ..., Srebrow A. (2020). Dengue virus targets RBM10 deregulating host cell splicing and innate immune response. *NAR.* **48**, 6824-6838. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa340>
- Preker P., Nielsen J., Kammler S., Lykke-Andersen S., Christensen M. S., Mapendano C. K., ... Jensen T. H. (2008). RNA Exosome Depletion Reveals Transcription Upstream of Active Human Promoters. *Science* **322**, 1851-1854. <https://doi.org/10.1126/science.1164096>
- Raghuathan P. L. & Guthrie C. (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis

and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol.* **8**, 847–855.

[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00345-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00345-4)

Reddy R. (1988). Transcription of a U6 small nuclear RNA gene in vitro. Transcription of a mouse U6 small nuclear RNA gene in vitro by RNA polymerase III is dependent on transcription factor(s) different from transcription factors IIIA, IIIB, and IIIC. *J Biol Chem.* **263**, 15980-15984.

Reddy R. & Busch H. (1988). Small nuclear RNAs: RNA sequences, structure, and modifications. In *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles* (ed. Birnstiel ML), pp. 1–37. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Reddy R., Ro-Choi T. S., Henning D. & Busch H. (1974). Primary sequence of U-1 nuclear ribonucleic acid of Novikoff hepatoma ascites cells. *J Biol Chem.* **25**, 6486-6494.

Ruskin B., Krainer A. R., Maniatis T. & Green M. R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**, 317-331.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90553-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90553-1)

Sakharkar M. K., Chow V. T. K. & Kanguene P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol.* **4**, 387-93.

Seipelt R. L., Zheng B., Asuru A. & Rymond B. C. (1999). U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *NAR.* **27**, 587-595.
<https://doi.org/10.1093/nar/27.2.587>

Shi Y. (2017). Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **18**, 655-670. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.86>

Shukla S. & Parker R. (2014). Quality control of assembly-defective U1 snRNAs by decapping and 5'-to-3' exonucleolytic digestion. *PNAS.* **111**, E3277-3286.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412614111>

- Smith K. P. & Lawrence J. B. (2000). Interactions of U2 gene loci and their nuclear transcripts with Cajal (coiled) bodies: evidence for PreU2 within Cajal bodies. *Mol Biol Cell*. **11**, 2987-2998. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.2987>
- Son A., Park J. E. & Kim V. N. (2018). PARN and TOE1 Constitute a 3' End Maturation Module for Nuclear Non-coding RNAs. *Cell Rep*. **23**, 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.089>
- Steinmetz E. J., Conrad N. K., Brow D. A. & Corden J. L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* **413**, 327-331. <https://doi.org/10.1038/35095090>
- Sun J. S. & Manley J. L. (1995). A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes Dev*. **9**, 843–854. <https://doi.org/10.1101/gad.9.7.843>
- Suzuki T., Izumi H. & Ohno M. (2010). Cajal body surveillance of U snRNA export complex assembly. *J Cell Biol*. **190**, 603-612. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004109>
- Taniguchi I., Mabuchi N. & Ohno M. (2014). HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *NAR*. **42** 6645-6658. <https://doi.org/10.1093/nar/gku304>
- Tomecki R., Kristiansen M. S., Lykke-Andersen S., Chlebowski A., Larsen K. M., Szczesny R. J., ... Jensen T. H. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J*. **29**, 2342–2357. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.121>
- Turunen J. J., Niemelä E. H., Verma B. & Frilander M. J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **4**, 61-76. <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>
- Uguen P. & Murphy S. (2003). The 3' ends of human pre-snRNAs are produced by RNA

- polymerase II CTD-dependent RNA processing. *EMBO J.* **22**, 4544-4554.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg430>
- Van Hoof A., Lennertz P. & Parker R. (2000a). Yeast Exosome Mutants Accumulate 3'-Extended Polyadenylated Forms of U4 Small Nuclear RNA and Small Nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol.* **20**, 441-452. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.441-452.2000>
- Van Hoof A., Lennertz P. & Parker R. (2000b). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* **19**, 1357-1365.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1357>
- Voith von Voithenberg L., Sánchez-Rico C., Kang H. S., Madl T., Zanier K., Barth A., ..., Lamb D. C. (2016). Recognition of the 3' splice site RNA by the U2AF heterodimer involves a dynamic population shift. *PNAS* **113**, E7169-E7175.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1605873113>
- Wagner E., Clement S.L. & Andersen J.L. (2007). An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies. *Mol Cell Biol.* **27**, 1686-1695.
<https://doi.org/10.1128/mcb.01483-06>
- Weinberg R. A. & Penman S. (1968). Small molecular weight monodisperse nuclear RNA. *J Mol Biol.* **38**, 289-304. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90387-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90387-2)
- Weiss C. M., Trobaugh D. W., Sun C., Lucas T. M., Diamond M. S., Ryman K. D. & Klimstra W. B. (2018). The Interferon-Induced Exonuclease ISG20 Exerts Antiviral Activity through Upregulation of Type I Interferon Response Proteins. *mSphere.* **3**, e00209-18.
<https://doi.org/10.1128/msphere.00209-18>
- Wlotzka W., Kudla G., Granneman S. & Tollervy D. (2011). The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *EMBO J.* **30**, 1790-1803.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.97>

Wu N., Nguyen X. N., Wang L., Appourchaux R., Zhang C., Panthu B., ..., Cimorelli A. (2019). The interferon stimulated gene 20 protein (ISG20) is an innate defense antiviral factor that discriminates self versus non-self translation. *PLoS Pathog.* **15**, e1008093.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008093>

Yong J., Kasim M., Bachorik J. L., Wan L. & Dreyfuss G. (2010). Gemin5 delivers snRNA precursors to the SMN complex for snRNP biogenesis. *Mol Cell.* **38**, 551-562.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.014>

Zheng Z., Wang L. & Pan J. (2017). Interferon-stimulated gene 20-kDa protein (ISG20) in infection and disease: Review and outlook. *Intractable Rare Dis Res.* **6**, 35-40.

<https://doi.org/10.5582/irdr.2017.01004>

Zhou Z., Wang N., Woodson S. E., Dong Q., Wang J., Liang Y., ..., Li K. (2011). Antiviral activities of ISG20 in positive-strand RNA virus infections. *Virology* **409**, 175–188.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.008>

Zhuang Y. & Weiner A. M. (1986). A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46**, 827-35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90064-4)

Zuo P. & Maniatis T. (1996). The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev.* **10**, 1356-

1368. <https://doi.org/10.1101/gad.10.11.1356>

謝辞

本研究を遂行するに当たり、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 生命システム研究部門 RNA システム分野 大野 睦人 教授には、常に厳しくも暖かいご指導を頂きました。深く御礼申し上げます。

同上研究室 谷口 一郎 博士、並びに北畠 真 博士には、終始適切な御助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

一部実験データの解析にあたり、摂南大学 農学部 応用生物科学科 動物機能科学研究室 芳本 玲 博士には大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

本研究を開始するきっかけを与えて下さった、和泉 光人 博士に心より感謝申し上げます。

最後に、さまざまな局面で御支援頂いた、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 生命システム研究部門 RNA システム分野の皆様、並びに友人・家族に、心より御礼申し上げます。