

mRNA 核外輸送因子 DBP5/DDX19、GLE1、
IPPK の細胞質 mRNA 発現ならびに
細胞表現型に対する特異的な機能と影響

岡村 真純

目次

要旨	2
略語一覧	3
序論	5
第一節 <i>DBP5</i> 、 <i>GLE1</i> 、 <i>IPPK</i> のノックダウンはそれぞれ特異的な RNA サブセットの発現低下をもたらす	8
第二節 <i>GLE1</i> のノックダウンはM期進行異常をもたらす	23
第三節 <i>GLE1</i> の欠失はDNA 損傷修復機能を大きく減弱させる	30
第四節 <i>DBP5</i> ならびに <i>IPPK</i> のノックダウンは免疫応答としての IFNB1 の発現に影響する	32
考察	34
材料ならびに手法	38
文献	45
謝辞	51

要旨

真核生物に於いて、遺伝情報は細胞核内にゲノム DNA として存在する。遺伝情報が発現するためには、ゲノム DNA が転写されメッセンジャーRNA (mRNA) となり、様々なプロセッシングを経た後、核膜孔複合体を通じて細胞質に輸送される必要がある。DBP5 (DDX19 とも記載される)・GLE1・イノシトール六リン酸 (IP₆) は mRNA の核外輸送に対して一体となって機能する。DBP5 は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼの一種で、mRNA の核外輸送にそのヘリカーゼ活性が必須である。DBP5 の活性は GLE1 と IP₆ の相互作用により上昇する。これら三因子は mRNA 核外輸送では協働するが、それぞれ固有の機能も知られている。特に GLE1 については、神経変性疾患や神経細胞毒性との関連が複数報告されている。本研究は、細胞質 mRNA の発現や細胞形質に対するこの三因子の精密な影響を明らかにするために、マイクロアレイ解析と表現型の詳細な解析を行った。まず、DBP5・GLE1・IPPK (IP₆ 合成酵素) それぞれを siRNA によってノックダウンした結果、mRNA の核内蓄積が確認され、mRNA の核外輸送が抑制されている事が示唆された。次に、三因子のいずれかをノックダウンした細胞から細胞質 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、GLE1 のノックダウンが最も多くの遺伝子の発現量に影響を与えた。発現量が低下した因子を機能別に解析したところ、一部の細胞質 mRNA サブセット (例: 細胞周期、DNA 修復) の細胞質発現は、DBP5・GLE1・IPPK のノックダウンで共通して抑制されていた。また、表現型として G1/S 期アレストが確認された。一方で、細胞分裂進行に必要な因子の細胞質 mRNA の発現は GLE1 ノックダウンで特異的に抑制され、結果として紡錘糸の形態異常や細胞分裂の遅延が見られた。DBP5・IPPK のノックダウンでは免疫応答に関する因子の発現低下が見られ、そのため poly(I)-poly(C)二重鎖処理が惹起する IFNβ-1 mRNA の転写も抑制された。これらの結果は、DBP5・GLE1・IP₆ が細胞質 mRNA の発現に対して共通の機能と固有の機能の両方を持っている事を示唆する。各因子のノックダウンで見られる表現型の差は、各因子の細胞内 mRNA 代謝の違いに対して、総合的に異なる機能を発揮した結果を反映しているものだと結論づけられる。

略語一覽

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis
ATP: Adenosine triphosphate
BSA: Bovine serum albumin
CBC: Cap binding complex
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DNA: Deoxyribonucleic acid
dsRNA: double-strand RNA
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS: Fetal bovine serum
FISH: Fluorescence in situ hybridization
GFP: Green fluorescent protein
GST: Glutathione S-transferase
HRP: Horse Radish Peroxidase
IPA: Ingenuity pathway analysis
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LCCS: Lethal congenital contracture syndrome
MBP: Maltose binding protein
miRNA: micro RNA
mRNA: messenger RNA
NPC: Nuclear pore complex
PAGE: Poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS: Phosphate buffered saline
PCR: Polymerase chain reaction
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride
RNA: Ribonucleic acid
RNAP II: RNA polymerase II
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SHH: Sonic hedgehog
siRNA: small interfering RNA

snRNA: small nuclear ribonucleoprotein

SSC: Saline sodium citrate

TLR: Toll-like receptor

tRNA: transfer RNA

序論

真核生物では、遺伝情報は細胞核内にゲノム DNA として存在する。遺伝情報が発現するためには、先ずゲノム DNA が細胞核内の RNAP II によって転写され、メッセンジャーRNA 前駆体 (pre-mRNA) となる必要がある。pre-mRNA は 5' キャッピング、スプライシング、ポリアデニル化といった様々な修飾を受け (この過程をプロセッシングと呼ぶ) 成熟したメッセンジャーRNA (mRNA) となる。その後、輸送因子 (export factor) と呼ばれるいくつかのタンパク質と結合し、メッセンジャーリボ核タンパク質 (mRNP) の形態を取る [1-4]。mRNA はこの mRNP の形態となって初めて核膜孔複合体 (NPC) を通過することができ、細胞質でタンパク質へと翻訳される。

ヒトを含む哺乳類において、主要な mRNA 核外輸送因子の一つが NXF1 である [1]。NXF1 は NXT1 とヘテロダイマーを形成し、TREX-1 という複合体を介して mRNA と結合する。TREX-1 の構成物には ALYREF、THO といった因子が含まれ、ALYREF と THO は mRNA 前駆体 5' 末端の CBC と相互作用する [5,6]。NXF1 はクローズドフォーム (closed form) では RNA との親和性が低いため、mRNA 核外輸送の際に ALYREF などの因子によってオープンドフォーム (opened form) となる [7]。mRNP は NPC を通じて細胞質側へ移動するが、その際 NPC の細胞質側で『リモデリング』と呼ばれるコンホメーション変化を起こす。このリモデリングは mRNA の細胞質への移動に必須である。

リモデリングに関与する主な因子として、DBP5/DDX19 という DEAD-box 型 ATP 依存 RNA ヘリカーゼが挙げられる [3]。DBP5 は NPC 構成タンパク質のひとつ (出芽酵母では Nup159、ヒトでは NUP214) と相互作用することにより、NPC の細胞質フィラメントに局在している [4,8]。出芽酵母において、Dbp5 は核外輸送受容体 Crm1 依存的に核・細胞質間をシャトリングしている事が知られている [9]。Dbp5 のヘリカーゼ活性は、Gle1 とイノシトール六リン酸 (IP₆) との相互作用により活性化され [10-12]、Dbp5 が欠失するとポリアデニル化 RNA (poly(A)⁺ RNA) が核内に蓄積する [13]。また、ヒト DBP5 が mRNA の核外輸送に機能していることが、アフリカツメガエル卵細胞を用いた実験で確認されている [13]。これらの知見から、ヒトにおいても DBP5 は GLE1、IP₆ と相互作用し、RNA ヘリカーゼ活性によって mRNA の核外輸送に関与している事が示唆される。近年、ヒトの GLE1 は酵母とは異なり IP₆ との相互作用が弱く、そのため DDX19 の ATPase 活性上昇に IP₆ が寄与していないとする研究が報告された [14]。一方で、IP₆ はやはりヒト DBP5 の ATPase 活性を上昇させるとする報告もあり [15]、IP₆ の mRNA 核外輸送に対する具体的な影響は明確になっていない。

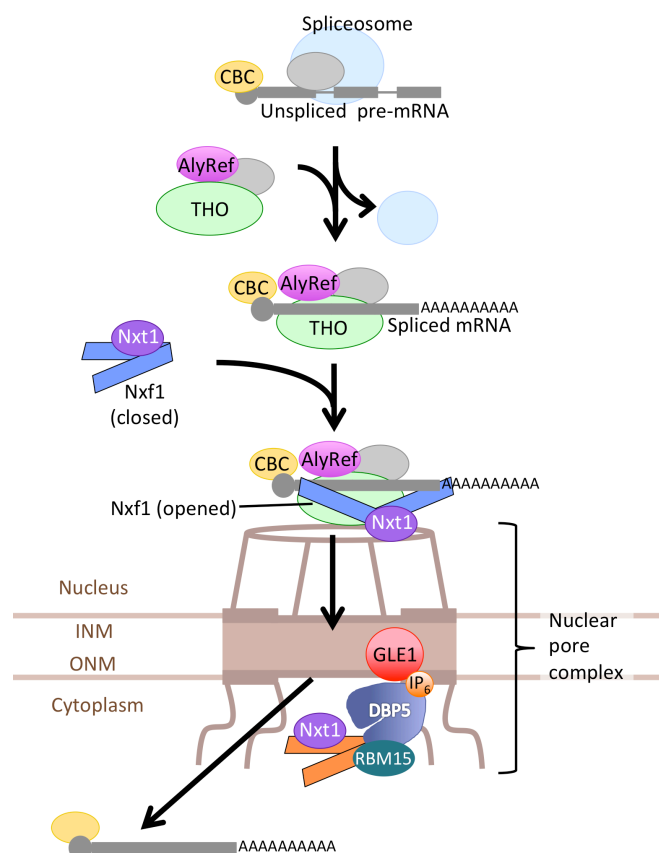


Fig.0 mRNA 核外輸送の概略図

核内で転写された pre-mRNA は、スプライソソーム (Spliceosome) によるスプライシング、5' 末端の CBC 結合、ポリアダニルの付与といった修飾を受けた後、様々な因子と結合して mRNP となる。INM: inner nuclear membrane, ONM: outer nuclear membrane. 文献[1]より改変して使用。

DBP5 の機能は mRNA 核外輸送の他にも、翻訳伸長・翻訳終結の安定化、DNA ダメージ修復、転写因子 SRF のコアクティベーター MKL1 の核内輸送などが知られている [16-19]。またヒトにおいては、NXF1 と DBP5 と相互作用をし、mRNP リモデリングを助けているとされる因子として RBM15 が同定されている [20,21]。RBM15 のノックダウンによっても、ポリアダニル化 RNA の核内蓄積は引き起こされる。

DBP5 の制御因子である補酵素 GLE1 もまた、真核生物において複数の機能が知られている。出芽酵母では、翻訳開始において、Gle1 は DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼ Ded1 の RNA 結合を制御する [22,23]。また、Gle1 と IP₆ の相互作用を阻害すると、正常な翻訳終結が阻害される [24,25]。ヒトの GLE1 には GLE1A・GLE1B の 2 種類のアイソフォームが存在し、GLE1B の N 末端側は GLE1A より 43 アミノ酸長い [26]。このうち、DBP5、IP₆ と相互作用することで mRNA 核外輸送に機能するのは GLE1B で

ある[26]。GLE1B が NPC の細胞質側に局在するのに対し、GLE1A は細胞質に拡散して存在し、ストレスグラニュールの形成に必要である[27]。GLE1B は核-細胞質間をシャトリングしており、GLE1B の NPC 局在のためにはこのシャトリングが必要である事が知られている[26]。発現量については、GLE1B が GLE1A より圧倒的に多いとされており、最大で 1000 倍の差があると報告されている[26]。他の知見としては、GLE1 が中心体と基底小体に局在し、染色体安定性に寄与していることが知られている[28]。また、生細胞中において GLE1 がダイマー化していることが確認されているが、このダイマー化による機能は明らかになっていない[29]。

IP₆は高度に保存されたシグナル分子で、IPPK (Inositol-pentakisphosphate 2-kinase、別称 IPK1/IP5-2K) によってイノシトール五リン酸 (IP₅) から産生される[30]。前述の通り、mRNA の核外輸送に機能し、出芽酵母では翻訳終結への関与も確認されている。IP₆は、DNA 二重鎖切断によって生じた DNA 末端に結合する Ku 二量体に結合し、非相同末端結合を促進する[31–33]。また、IP₆は RNA 編集酵素 ADAR2 と結合し、この結合は ADAR2 による RNA 編集に必要である[34]。IPPK をノックダウンしたゼブラフィッシュは、Ca²⁺シグナリングパターンの崩壊により発生時の左右非対称性に異常が生じる[35]。

GLE1 については、その変異と神経変性疾患との関連が報告されている。家族性遺伝病 LCCS1 は、*GLE1* のイントロン 3 に生じた一塩基変異によって発生するミスプライシングが原因である[36,37]。この変異 GLE1 は GLE1 FinMajor と名付けられており、mRNA 核外輸送の効率低下、シュワン細胞・神経細胞の生存・伸長阻害をもたらす[38,39]。また、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者においても複数種の GLE1 変異体が発見されている[40,41]。細胞内でのタンパク質凝集、RNA 代謝や核-細胞質間輸送の異常は、神経細胞に対し毒性を持つ事が示唆されており[42–45]、GLE1 の変異に対しても同様であると考えられる。

このように、DBP5、GLE1、IP₆はそれぞれが多様な機能を持ちながら、mRNA の核外輸送において協働している。しかし、この中で神経変性疾患との関連が報告されているのは GLE1 のみである。そこで本研究は、DBP5、GLE1、IP₆それぞれの、細胞質 mRNA 発現に対する精密な影響を調べる事を目的とした。各因子を siRNA によりノックダウンし、細胞質 mRNA 発現のアレイ解析と表現型の精査を行った。その結果、各因子固有の mRNA ターゲットや表現型が発見され、とりわけ GLE1 をノックダウンした細胞では細胞分裂進行の異常など、特異的な表現型が見られた。これらの知見は mRNA 発現機構の理解の一助となり、かつ GLE1 が関わる神経変性疾患の発症メカニズム解明の一助となる。

結果

第一節 DBP5、GLE1、IPPK のノックダウンはそれぞれ特異的な RNA サブセットの発現低下をもたらす

DBP5、GLE1、IPPK それぞれの mRNA 発現における機能を、ヒト培養細胞を用いて解析するため、先ず各因子を特異的にノックダウンする siRNA を設計した。設計した siRNA を U2OS 細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロッティングとリアルタイム PCR によって高効率かつ特異的に各因子がノックダウンされていることを確認した (Fig.1A-B)。

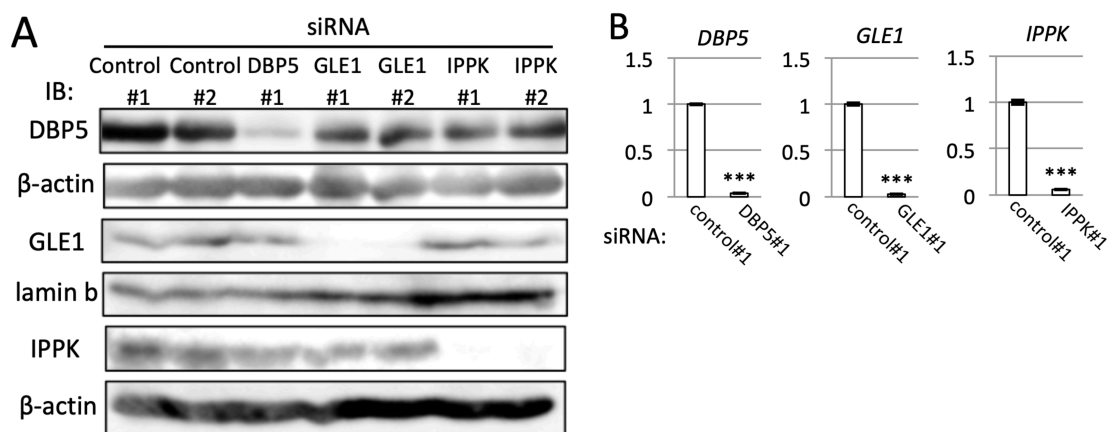


Fig.1 DBP5, GLE1, IPPK をノックダウンする siRNA の設計

U2OS 細胞を、各因子に特異的な siRNA をトランスフェクションした後 48 時間培養し固定した。

(A) DBP5, GLE1, IPPK それぞれの特異的ノックダウンを、ウエスタンブロッティングで確認した。DBP5 の検出には細胞質画分、GLE1 の検出には不溶性画分、IPPK の検出には核内抽出物画分を用いた。なお、ローディングコントロールとして β -アクチンとラミン b を用いた。IB: イムノブロッティング (Immunoblotting)。(B) 各因子ノックダウンによる細胞質 RNA の減少を、リアルタイム PCR によって検出した。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値はスチューデントの t 検定により control と比較して算出した (***) = $p < 0.001$ 。

これら三因子はいずれも mRNA 核外輸送に機能する因子であるため、ノックダウンした際には mRNA の細胞質への輸送が阻害され、mRNA は細胞核内に蓄積されていると予想される。そこで、RNA-FISH 法により細胞内の mRNA をポリアデニル化 RNA として検出した。その結果、いずれの因子のノックダウンでもポリアデニル化 RNA の核内蓄積が見られた (Fig.2A)。このポリアデニル化 RNA の核内蓄積レベルを比較するため、ImageJ を用い蛍光強度を定量化した (Fig.2B)。いずれのサンプルにおいてもポリアデニル化 RNA の核内蓄積が見られたが、蓄積レベルには差があり、RNA へ

リカーゼである *DBP5* をノックダウンした際に最も強く蓄積が見られた。次点が *GLE1* ノックダウンサンプルであり、*IPPK* ノックダウンサンプルはもっとも蓄積レベルが低かった。*GLE1* ならびに *IPPK* の siRNA については、それぞれの 2 種の siRNA で効果の差異が無い事を確認した (Fig.2A-B)。一方、*DBP5* は siRNA の効果を一種類しか確認していなかったため、上記の表現型が *DBP5* のノックダウンによるものである事を確認するためにレスキュー実験を行った (Fig.2C)。FLAG タグを付加した siRNA 抵抗性 *DBP5* 発現プラスミドを導入した U2OS 細胞は、ポリアデニル化 RNA の核内蓄積が解消された。このことから、ポリアデニル化 RNA の核内蓄積は、*DBP5* の mRNA を特異的にノックダウンした結果である事を確認した。

DBP5、*GLE1*、*IPPK* のノックダウンによってポリアデニル化 RNA の核内蓄積が発生する事から、細胞の増殖が妨げられている可能性がある。これを検証するため、siRNA を細胞にトランスフェクションし、その後 24 時間ごとに細胞数を計測した。control siRNA 導入群は、トランスフェクション 72 時間後までは穏やかに増殖を続け、72 時間後から 96 時間後には細胞数が倍増した (Fig.3)。72 時間後まで増殖が穏やかだったのは、siRNA トランスフェクション自体による細胞への負荷が原因と推測される。一方、*DBP5*、*GLE1* をノックダウンした群は 48 時間後から細胞数が減少し始めた。*IPPK* をノックダウンした群は 48 時間後に細胞数が減少したが、その後若干細胞増殖が見られた。上記の細胞増殖曲線の違いは、ポリアデニル化 RNA 核内蓄積の強度と関連していた。

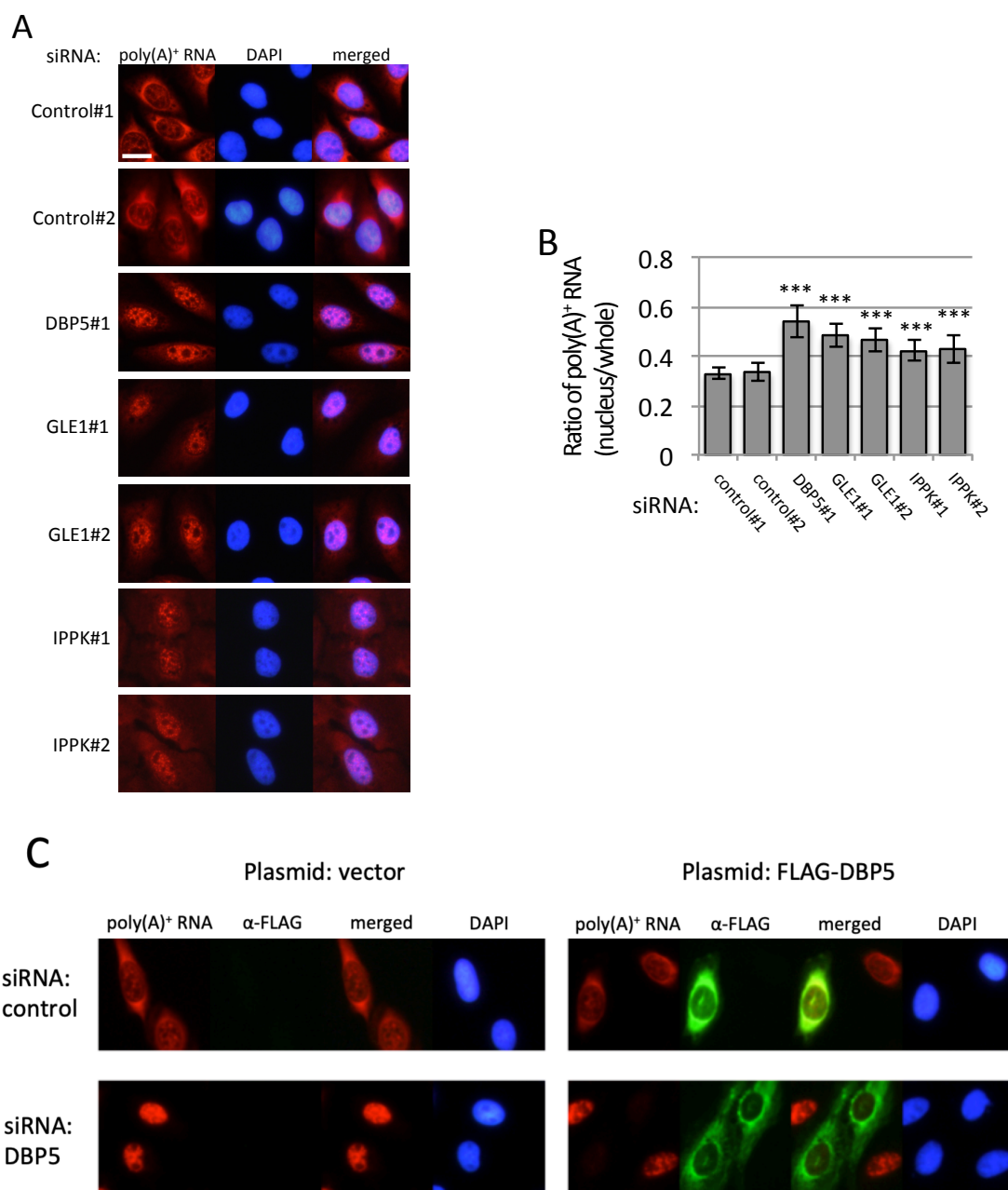


Fig.2 DBP5, GLE1, IPPK ノックダウンによるポリアデニル化 RNA の核内蓄積

(A,B) U2OS 細胞を、各因子に特異的な siRNA をトランスフェクションした後 48 時間培養し固定した。(A) DBP5, GLE1, IPPK ノックダウンによるポリアデニル化 RNA の核内蓄積を、RNA-FISH 法により検出した。染色体は DAPI により共染色した。スケールバーは 20μm を示す。

(B) ポリアデニル化 RNA のシグナル強度を ImageJ で定量化し、その比 (核/細胞全体) を表した。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (n=20, *** = p<0.001)。(C) U2OS 細胞に、ベクタープラスミド (pcDNA5)、若しくは siRNA 抵抗性 FLAG タグ付加 DBP5 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養した。その後コントロール siRNA 若しくは DBP5 siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養し固定した。免疫染色は抗 FLAG-M2 抗体を用いて行った。スケールバーは 20μm を示す。

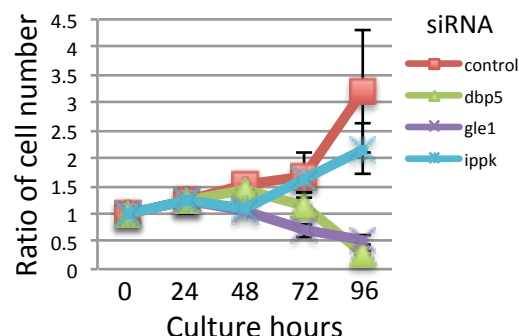


Fig.3 *DBP5*, *GLE1*, *IPPK* ノックダウンの細胞増殖への影響

図に示す siRNA をトランスフェクションした U2OS 細胞の増殖曲線。『0 時間』は播種した時点を示す。細胞数は 24 時間ごとに計測した。siRNA は播種 24 時間後にトランスフェクションした。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。

ここまでの解析で、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*はいずれをノックダウンしても mRNA の核内蓄積が発生するが、その強度は異なり、強度と細胞生育への影響は相関している事が分かった。このことから、これら三因子は細胞質 RNA の発現に対してそれぞれ異なる機能を有している可能性が考えられた。その検証のため、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*のいずれか一因子をノックダウンした細胞から細胞質画分の RNA を分離し、細胞質 RNA が全細胞 RNA から適切に分離できている事を確認した (Fig.4)。これらの細胞質 RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析にはアジレントテクノロジー社の Whole human genome DNA microarray 4x44K v2 を使用した。このアレイチップには、30412 種のプローブが搭載されている。私は取得された解析データを先ず正規化し、クラスター解析によってアレイ解析に値するデータである事を確認した (Fig.5)。また、各サンプルのアレイデータから、ノックダウンした標的遺伝子の細胞質 RNA 量が効率的に発現低下していることも確認した。

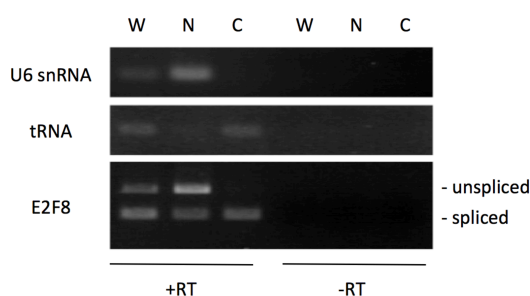


Fig.4 マイクロアレイ解析のための細胞質 RNA 分離

U2OS 細胞より細胞質 RNA と核内 RNA が分離できているかを、PCR 法と PAGE によって確認した。U6 snRNA は核画分に特異的、tRNA は細胞質画分に特異的な RNA である。*E2F8* はハウスキーピング遺伝子であり、mRNA スプライシングの有無により核・細胞質画分の分離を確認する事ができる。

W: Whole cell RNA, N: Nuclear total RNA, C: Cytoplasmic total RNA, RT: Reverse Transcriptase.

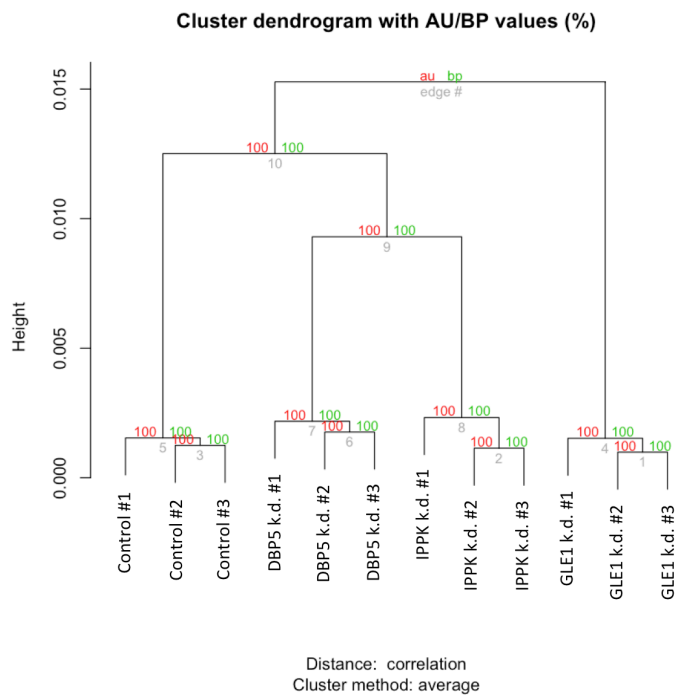


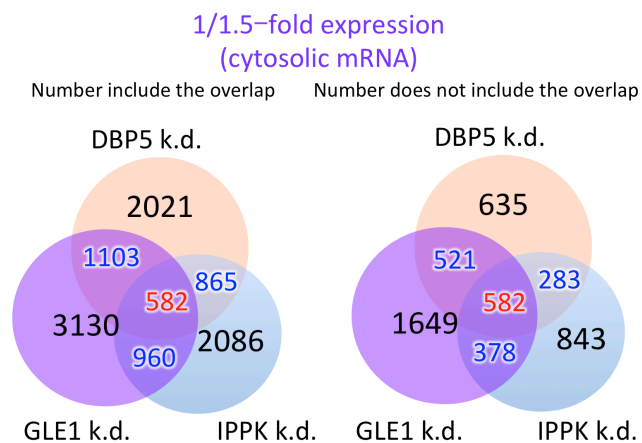
Fig.5 マイクロアレイ解析データのクラスター解析

統計ソフト R を用い、正規化されたマイクロアレイ解析データから樹形図を描いた。同じ遺伝子をノックダウンしたサンプルは全て同じグループに属している。

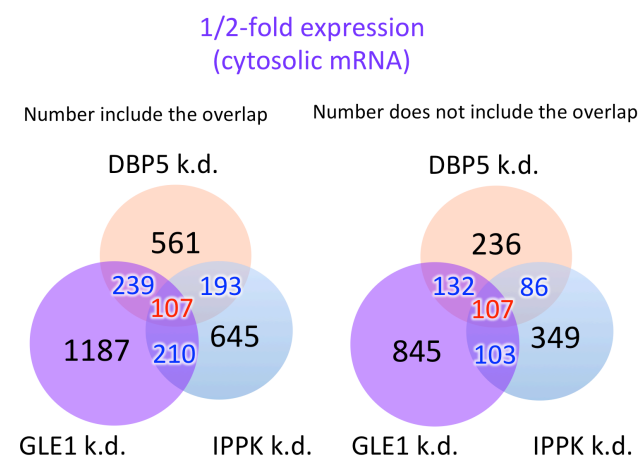
赤い数字：近似的に不偏な p 値
(Approximately unbiased p -value)、
緑の数字：ブートストラップ確率値
(Bootstrap probability value)。
k.d.: knockdown.

細胞質 RNA の発現低下について、先ず閾値を発現量 1/1.5 倍としてデータを検証した。その結果、*DBP5* ノックダウンでは 2021 種、*GLE1* ノックダウンでは 3130 種、*IPPK* ノックダウンでは 2086 種の遺伝子について、細胞質 mRNA が発現低下していた (Fig.6A)。また、全てのノックダウンサンプルで共通して減少していた遺伝子は 582 種であった。これらのアレイ解析結果を検証するため、いくつかの遺伝子を対象にリアルタイム PCR 法を行い、アレイデータと比較した (Fig.7A-D)。先ず、いずれのノックダウンサンプルでも共通して細胞質 RNA が減少している遺伝子として、細胞周期に関する遺伝子を 3 種解析した (Fig.7A)。次に、*GLE1* (Fig.7B)、*DBP5* (Fig.7C)、*IPPK* (Fig.7D) それぞれのノックダウン特異的に発現低下している遺伝子に対し、同様の解析を行った。その結果、いずれの遺伝子もアレイデータとリアルタイム PCR 法で同様の結果が得られた。以上の事から、このアレイデータはリアルタイム PCR 法の結果と十分に相関していると結論づけた。

A



B



C

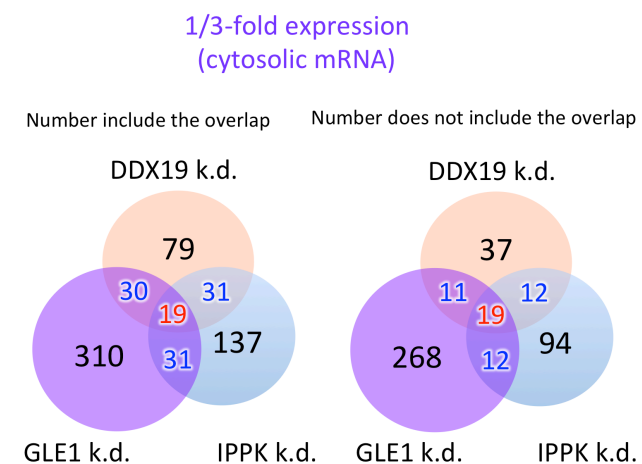


Fig.6 細胞質 mRNA が、一定割合以上減少した遺伝子数を示すベン図

(A-C) 図中の数字は、*DBP5*、*GLE1*、*IPPK* それぞれをノックダウンした際に、細胞質 RNA の発現量がそれぞれ (A) 1/1.5 倍、(B) 1/2 倍、(C) 1/3 倍になった遺伝子数を示す。左図はベン図の重複部分を含んだ遺伝子数、右図はベン図の重複部分を含まない遺伝子数を示す。使用したアレイチップには 30412 種のプローブが搭載されている。
k.d.: knockdown.

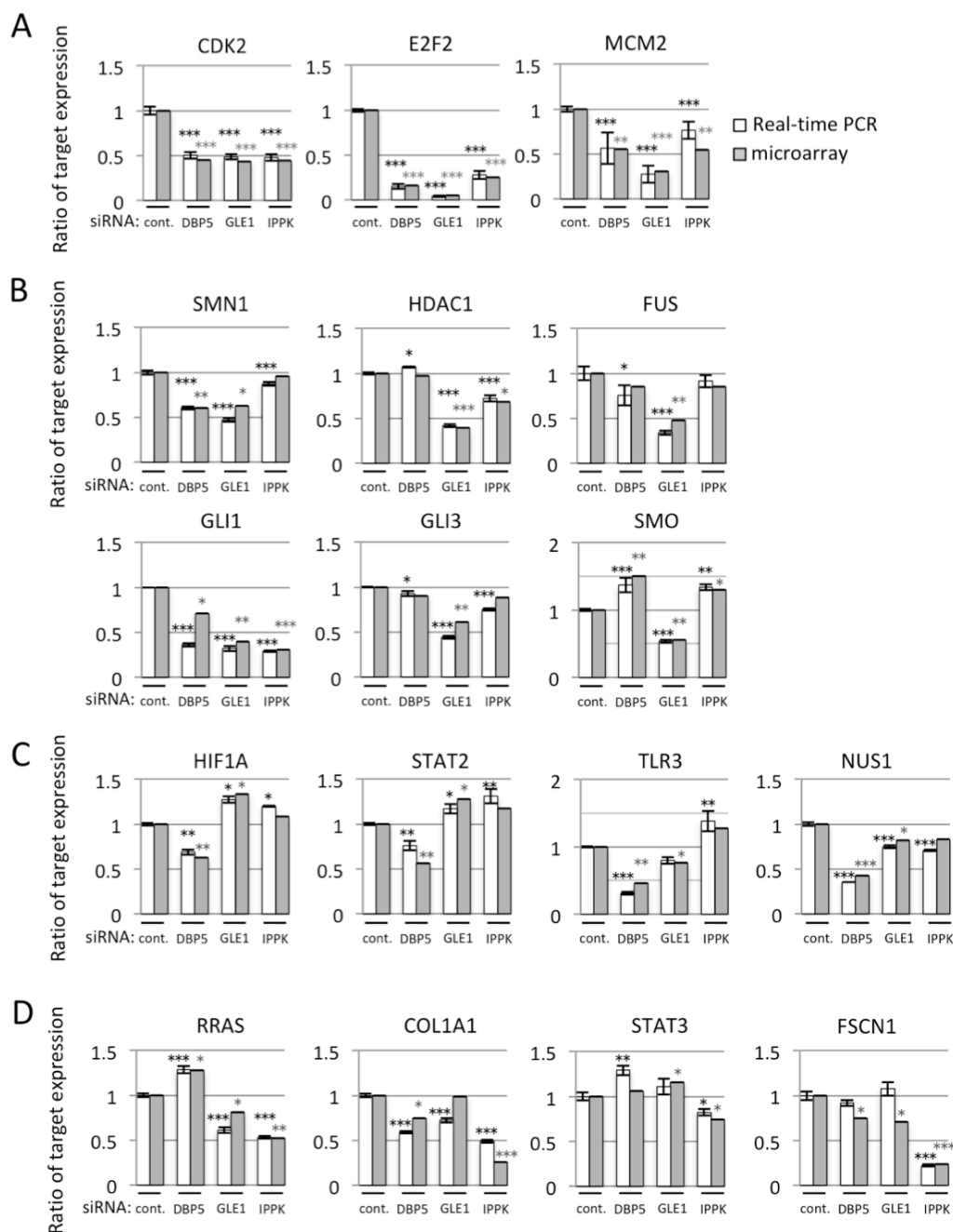


Fig.7 DBP5, GLE1, IPPK ノックダウンは、それぞれ異なる遺伝子サブセットの細胞質 RNA 発現量低下をもたらす

(A-D) リアルタイム PCR 法による、マイクロアレイデータの検証。細胞質 RNA は、図に示す siRNA をトランスフェクションした U2OS 細胞から抽出した。白い棒グラフ：リアルタイム PCR 法にて検出された値。灰色の棒グラフ：マイクロアレイ解析による値。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$)。(A) *CDK2*, *E2F2*, *MCM2* の細胞質 RNA は、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* いずれのノックダウンサンプルでも共通して減少した。

(B-D) これらの因子は、*DBP5*, *GLE1*, *IPPK* いずれかのノックダウン特異的に細胞質 RNA の発現量が減少する。(B) は *GLE1*, (C) は *DBP5*, (D) は *IPPK* のノックダウン特異的なものを示す。

*DBP5・GLE1・IPPK*それぞれのノックダウンによる細胞質 mRNA の発現変化について、影響を受ける遺伝子の種類・数を更に精査するため、Fig.6A 同様のベン図を異なる閾値で作成した (Fig.6 B-C)。その結果、いずれの場合においても *GLE1* ノックダウンが最も数多くの遺伝子発現に影響する事が解った。また、Table.1A にて、当該因子のノックダウンによって発現低下が起きた遺伝子の総数 (『総数』の列)、三因子いずれのノックダウンでも発現低下が起きた遺伝子の数 (『共通部分』の列)、当該因子のノックダウンによってのみ発現低下が起きた遺伝子の数 (『ユニークな部分』の列) を示している。*DBP5・GLE1・IPPK*いずれにおいても、発現低下遺伝子の総数に対する共通発現低下遺伝子数の割合 (Table.1A [共通/総数]の割合) は、閾値を厳しくするにつれて減少する傾向にあった。一方、発現低下遺伝子の総数に対するユニークな発現低下遺伝子数の割合 (Table.1A [ユニーク/総数]の割合) は、閾値を厳しくするにつれて増加する傾向にあった。三因子のノックダウンにより発現上昇が見られた遺伝子についても、類似の傾向が見られた (Fig.8, Table.1B)。すなわち、*GLE1* ノックダウンが最も数多くの遺伝子発現に影響し、*GLE1・IPPK* ノックダウンにおいて、発現低下遺伝子の総数に対するユニークな発現低下遺伝子数の割合は、閾値を厳しくするにつれて増加する傾向にあった。*DBP5・GLE1・IPPK*は mRNA の核外輸送に機能しているが、ノックダウンにより細胞質 RNA 量が上昇した因子も一定数見られた。*SMO*の細胞質 RNA は *DBP5・IPPK* ノックダウンにより増加している事をリアルタイム PCR により確認している (Fig.7B)。これらの結果より、*DBP5・GLE1・IPPK*による細胞質 RNA の発現制御は、三因子の中で重複している部分もあるが、それぞれ固有の機能による部分が大きい事が示唆される。

以上のように、アレイ解析とリアルタイム PCR では、*DBP5・GLE1・IPPK* ノックダウンによる細胞質 RNA の発現低下・上昇の両方が見られた。一方、細胞レベルの観察では、ポリアデニル化 RNA の核内蓄積や細胞増殖の抑制が観察された (Fig.2A, Fig.3)。これらについて精査するため、細胞質 RNA 量が低下している遺伝子は、核内に RNA が蓄積しているかを検証した。*DBP5・GLE1・IPPK*それぞれをノックダウンした細胞とコントロール細胞から細胞質 RNA と核内 RNA を抽出し、いくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR 法により細胞質 RNA と核内 RNA の存在量を比較した (Fig.9A-D)。一部の遺伝子では、三因子のいずれかのノックダウンにより核内 RNA 量が増えていたが、そうでないものも多かった。この結果は、核内に蓄積した RNA が分解されている事によると推測された。そのため、*DBP5・GLE1・IPPK*と同時にエキソソームの構成因子である *RRP45*をノックダウンした群を作製し、核内 RNA の存在量を比較した (Fig.9E-H)。*RRP45*のノックダウンによって核内 RNA の増加が見ら

れる群が複数あった。このことから、*DBP5・GLE1・IPPK* ノックダウンによる mRNA の核内蓄積は、核内エキソソームによる一部の蓄積 mRNA の分解も促進していると考えられる。

ここまでの結果より、核外輸送や翻訳後分解を含む細胞質 mRNA の発現制御メカニズムは、各々の遺伝子によって多様に異なっている可能性が高い事が示される。よって、以降は細胞質と核の mRNA 発現についてその機序を掘り下げるのではなく、表現型に焦点を当てて解析を行った。*DBP5・GLE1・IPPK* ノックダウンにより発現低下している遺伝子と細胞内プロセスとの関連を調べるため、発現量変化している遺伝子を IPA の Canonical Pathway analysis を使用して分類した (Table.2-4)。いずれの因子のノックダウンでも、細胞周期に関する遺伝子の発現低下が目立った。ノックダウンした因子それぞれの傾向としては、*GLE1* ノックダウンでは染色体損傷応答に関する遺伝子が多く含まれ、*DBP5・IPPK* ノックダウンでは炎症反応に関する遺伝子が多く含まれた。

Table.1 DBP5・GLE1・IPPK ノックダウンによって影響を受けた遺伝子の数と割合

(A-B) 各因子ノックダウンによって記載の閾値以上に細胞質 RNA の発現量に変化した遺伝子の数を記載。『共通部分』は、DBP5・GLE1・IPPKいずれのノックダウンでも同様に発現変化した遺伝子の数、『ユニークな部分』は、当該因子のノックダウンによってのみ発現変化した遺伝子の数を示す。

A. 発現低下遺伝子数

DBP5ノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1/1.5倍	2021	582	635	28.79762494	31.42008906
1/2倍	561	107	236	19.07308378	42.06773619
1/3倍	79	19	37	24.05063291	46.83544304

GLE1ノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1/1.5倍	3130	582	1649	18.5942492	52.68370607
1/2倍	1187	107	845	9.01432182	71.18786858
1/3倍	310	19	268	6.129032258	86.4516129

IPPKノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1/1.5倍	2086	582	843	27.90028763	40.41227229
1/2倍	645	107	349	16.58914729	54.10852713
1/3倍	137	19	94	13.86861314	68.61313869

B. 発現上昇遺伝子数

DBP5ノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1.5倍	2154	824	500	38.2544104	23.21262767
2倍	660	255	153	38.63636364	23.18181818
3倍	128	53	29	41.40625	22.65625

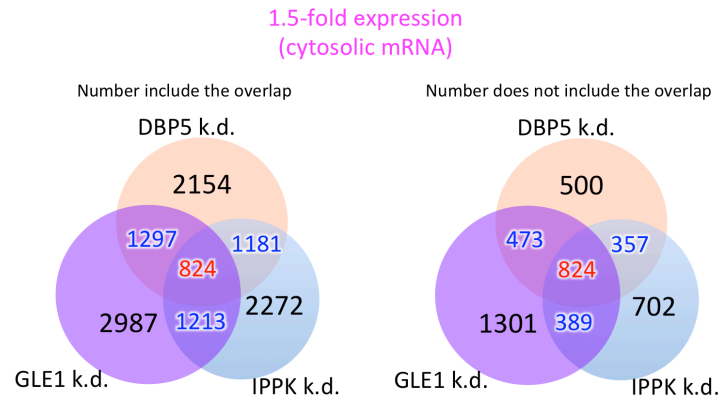
GLE1ノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1.5倍	2987	824	1301	27.5862069	43.55540676
2倍	1177	255	610	21.66525064	51.82667799
3倍	321	53	202	16.51090343	62.92834891

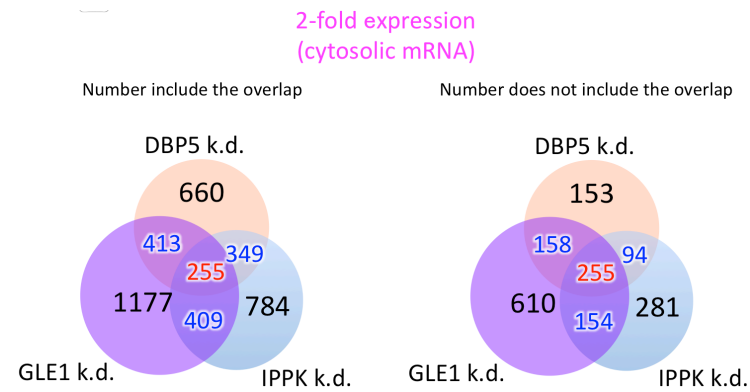
IPPKノックダウン

閾値	総数	共通部分	ユニークな部分	[共通/総数]の割合 (%)	[ユニーク/総数]の割合 (%)
1.5倍	2272	824	702	36.26760563	30.89788732
2倍	784	255	281	32.5255102	35.84183673
3倍	174	53	73	30.45977011	41.95402299

A



B



C

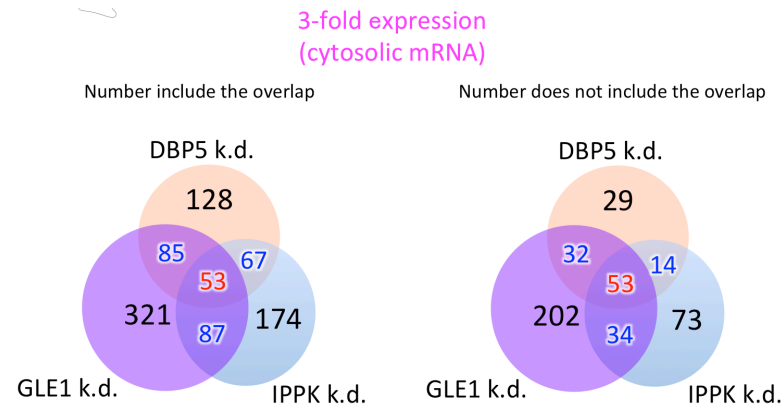


Fig.8 細胞質 mRNA が、一定割合以上増加した遺伝子数を示すベン図

(A-C) 図中の数字は、*DBP5*、*GLE1*、*IPPK* それぞれをノックダウンした際に、細胞質 RNA の発現量がそれぞれ (A) 1.5 倍、(B) 2 倍、(C) 3 倍になった遺伝子数を示す。左図はベン図の重複部分を含んだ遺伝子数、右図はベン図の重複部分を含まない遺伝子数を示す。
k.d.: knockdown.

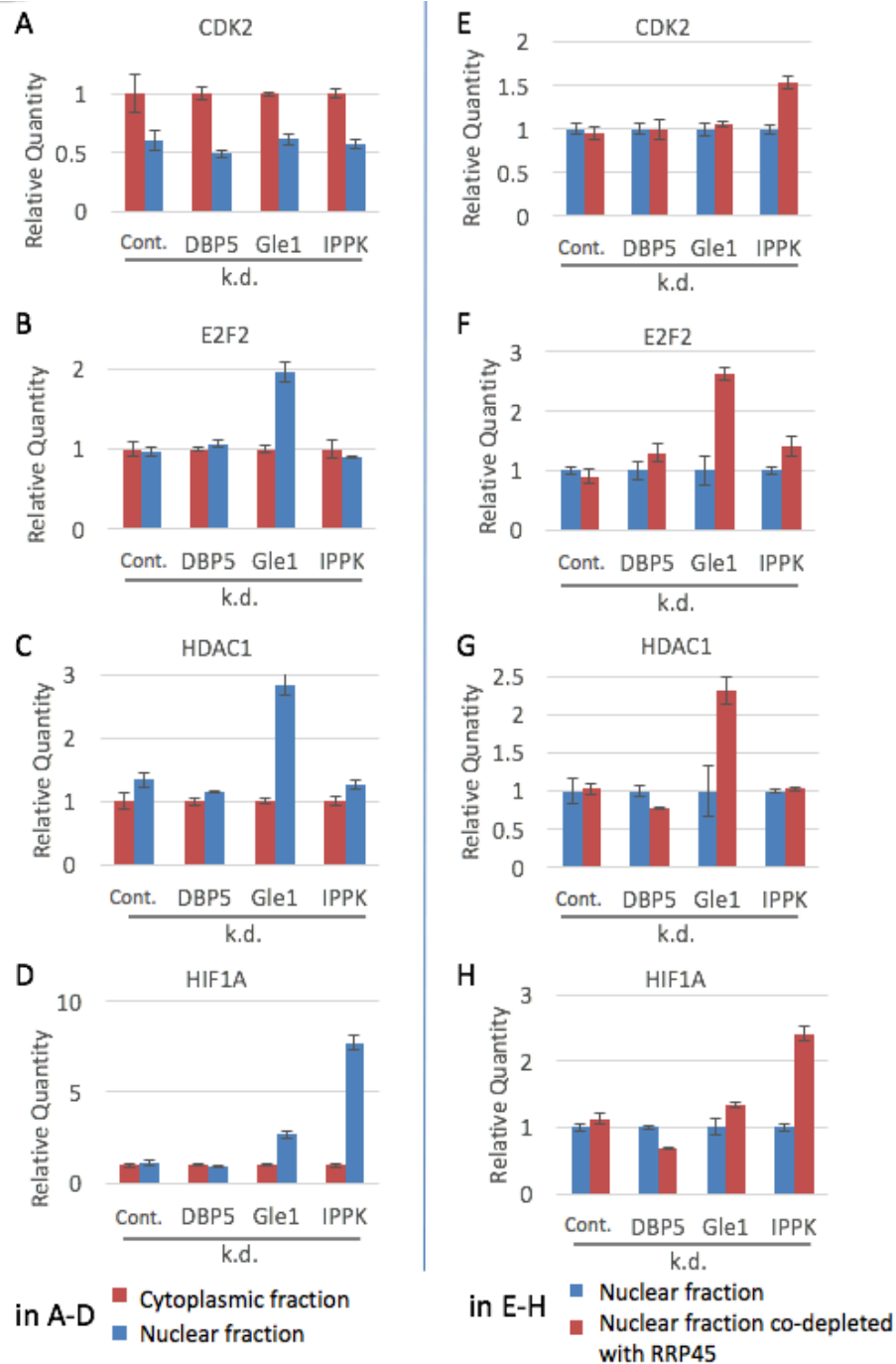


Fig.9 細胞質と核内の RNA 発現量比較

siRNA 導入により *DBP5*・*GLE1*・*IPPK* をノックダウンした細胞と、コントロール siRNA を導入した細胞の mRNA 量を、リアルタイム PCR 法によって比較した。リアルタイム PCR 法の測定データは *PGK1* によって標準化した。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。(A-D) 細胞質画分 (赤いバー) と核内画分 (青いバー) の mRNA 量を比較した。いずれのグラフも、細胞質 mRNA の発現量を 1 としている。mRNA 量比較対象は (A) *CDK2*、(B) *E2F2*、(C) *HDAC1*、(D) *HIF1A*。(E-H) 前述の因子のみをノックダウンした細胞の核内画分 (青いバー) と、前述の因子に加え RRP45 を同時にノックダウンした細胞の核内画分 (赤いバー) の mRNA 量を比較した。いずれのグラフも、前述の因子のみをノックダウンした核内画分 (青いバー) の mRNA 発現量を 1 としている。

cont.: control, k.d.: knockdown.

Table.2 *DBP5*・*GLE1*・*IPPK*をノックダウンした細胞において、細胞質 RNA の発現量が 1/1.5 倍以下に減少した遺伝子の分類

p 値は Ingenuity Pathway Analysis の Canonical Pathway Analysis によって求めた。p 値が大きい分類から順に、10 のカテゴリを示している。『三重重複部分』は、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*いずれのノックダウンでも発現量が閾値以上減少した遺伝子を示す。『ユニーク』は、当該因子のノックダウンによってのみ発現変化した遺伝子の数を示す。

発現量1/1.5倍

三重重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	8.18
Estrogen-mediated S-phase Entry	4.81
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	3.82
Cyclins and Cell Cycle Regulation	3.34
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	3.17
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	2.74
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	2.74
cAMP-mediated signaling	2.27
RhoGDI Signaling	2.11
GADD45 Signaling	2.02

DBP5ノックダウン&GLE1ノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	7.62
Hereditary Breast Cancer Signaling	5.17
Mismatch Repair in Eukaryotes	4.65
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	4.55
Granzyme B Signaling	3.39
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	2.8
Superpathway of Citrulline Metabolism	2.44
dTMP De Novo Biosynthesis	2.3
GADD45 Signaling	2.05
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	1.92

DBP5ノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	4.21
Interferon Signaling	2.72
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	2.7
Unfolded protein response	2.43
Synaptic Long Term Potentiation	2.24
p53 Signaling	2.17
Tetrahydrofolate Salvage from 5,10-methenyltetrahydrofolate	2.12
Neuregulin Signaling	1.98
Melatonin Signaling	1.9
TREM1 Signaling	1.87

GLE1ノックダウン&IPPKノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	4
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	2.56
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	2.55
ATM Signaling	1.89
Ephrin Receptor Signaling	1.77
Molecular Mechanisms of Cancer	1.63
Granzyme B Signaling	1.61
Methionine Degradation I (to Homocysteine)	1.61
Cysteine Biosynthesis III (mammalia)	1.52
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	1.5

GLE1ノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	5.91
Mismatch Repair in Eukaryotes	5.36
Hereditary Breast Cancer Signaling	3.77
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	3.47
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2.91
Adipogenesis pathway	2.73
ATM Signaling	2.63
Sonic Hedgehog Signaling	2.49
Choline Degradation I	2.31
DNA damage-induced 14-3-3σ Signaling	2.07

DBP5ノックダウン&IPPKノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	4.44
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	4.43
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	4.24
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	4
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza	3.93
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	3.89
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	3.77
IL-15 Signaling	3.71
TREM1 Signaling	3.6
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3.53

IPPKノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
IL-6 Signaling	3.48
PTEN Signaling	3.44
IL-8 Signaling	2.92
OX40 Signaling Pathway	2.76
Thiosulfate Disproportionation III (Rhodanese)	2.4
Bladder Cancer Signaling	2.37
iNOS Signaling	2.34
RhoA Signaling	2.33
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.24
NF-κB Signaling	2.12

Table.3 *DBP5*・*GLE1*・*IPPK*をノックダウンした細胞において、細胞質 RNA の発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子の分類

p 値は Ingenuity Pathway Analysis の Canonical Pathway Analysis によって求めた。p 値が大きい分類から順に、10 のカテゴリを示している。『三重重複部分』は、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* いずれのノックダウンでも発現量が閾値以上増加した遺伝子を示す。『ユニーク』は、当該因子のノックダウンによってのみ発現変化した遺伝子の数を示す。

発現量1.5倍

三重重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Integrin Signaling	4.75
Rac Signaling	3.25
Actin Cytoskeleton Signaling	2.92
Glioma Invasiveness Signaling	2.86
Epithelial Adherens Junction Signaling	2.50
Signaling by Rho Family GTPases	2.42
Paxillin Signaling	2.37
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	2.32
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	2.18
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	2.13

DBP5ノックダウン&GLE1ノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Molecular Mechanisms of Cancer	4.53
Gap Junction Signaling	4.38
Glioblastoma Multiforme Signaling	3.89
Axonal Guidance Signaling	3.87
TR/RXR Activation	3.85
α-Adrenergic Signaling	3.85
Cardiac Hypertrophy Signaling	3.78
CXCR4 Signaling	3.73
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	3.70
Leptin Signaling in Obesity	3.59

DBP5ノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	7.20
Gap Junction Signaling	7.17
Integrin Signaling	6.39
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	6.30
Cardiac Hypertrophy Signaling	6.07
Insulin Receptor Signaling	5.05
Epithelial Adherens Junction Signaling	4.93
ILK Signaling	4.67
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	4.39
Thrombin Signaling	3.99

GLE1ノックダウン&IPPKノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
TNFR2 Signaling	3.71
Glucocorticoid Receptor Signaling	2.58
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	2.52
Triacylglycerol Biosynthesis	2.41
Protein Ubiquitination Pathway	2.33
Induction of Apoptosis by HIV1	2.22
April Mediated Signaling	2.19
CCR5 Signaling in Macrophages	2.16
B Cell Activating Factor Signaling	2.11
IL-1 Signaling	2.04

GLE1ノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
TNFR2 Signaling	3.71
Glucocorticoid Receptor Signaling	2.58
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	2.52
Triacylglycerol Biosynthesis	2.41
Protein Ubiquitination Pathway	2.33
Induction of Apoptosis by HIV1	2.22
April Mediated Signaling	2.19
CCR5 Signaling in Macrophages	2.16
B Cell Activating Factor Signaling	2.11
IL-1 Signaling	2.04

DBP5ノックダウン&IPPKノックダウン重複部分

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
UVA-Induced MAPK Signaling	2.38
14-3-3-mediated Signaling	1.81
Alanine Biosynthesis III	1.76
Virus Entry via Endocytic Pathways	1.71
Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)	1.62
CD40 Signaling	1.59
FcγRIIB Signaling in B Lymphocytes	1.46
Sulfate Activation for Sulfonation	1.46
HGF Signaling	1.45
UVC-Induced MAPK Signaling	1.44

IPPKノックダウンユニーク

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
p53 Signaling	3.49
Oncostatin M Signaling	2.78
UVA-Induced MAPK Signaling	2.54
Gα12/13 Signaling	2.48
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.31
Cardiac Hypertrophy Signaling	2.26
TNFR2 Signaling	2.24
RANK Signaling in Osteoclasts	2.22
Induction of Apoptosis by HIV1	2.22
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	2.18

Table.4 *DBP5・GLE1・IPPK* をノックダウンした細胞において、細胞質 RNA の発現量が 1/1.5 倍以下もしくは 1/2 倍以下に減少した遺伝子の分類

左列は閾値 1/1.5 倍以下、右列は閾値 1/2 倍以下である。p 値は Ingenuity Pathway Analysis の Canonical Pathway Analysis によって求めた。p 値が大きい分類から順に、10 のカテゴリを示している。灰色のセルは、閾値 1/1.5 倍以下と 1/2 倍以下の両方でリストアップされたカテゴリである。

発現量1/1.5倍

DBP5ノックダウン(重複部分含む)

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	8.17
TREM1 Signaling	4.9
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	4.67
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3.56
Estrogen-mediated S-phase Entry	3.24
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	3.16
Mismatch Repair in Eukaryotes	2.85
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	2.85
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	2.56
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	2.55

GLE1ノックダウン(重複部分含む)

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	13.3
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	11.2
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	7.95
Mismatch Repair in Eukaryotes	7.75
Hereditary Breast Cancer Signaling	6.82
Estrogen-mediated S-phase Entry	5.89
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	5.35
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	4.84
Cyclins and Cell Cycle Regulation	4.81
ATM Signaling	4.7

IPPKノックダウン(重複部分含む)

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4.92
Estrogen-mediated S-phase Entry	4.07
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	4.01
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	3.61
IL-6 Signaling	3.61
Phosphatidylglycerol Biosynthesis II (Non-plastidic)	3.38
TREM1 Signaling	3.28
RhoA Signaling	2.99
CDP-diacylglycerol Biosynthesis I	2.87
IL-8 Signaling	2.83

発現量1/2倍

DBP5ノックダウン(重複部分含む)

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
TREM1 Signaling	5.03
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	4.79
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	4.57
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	4.52
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	4.22
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	4.15
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	4.06
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	3.88
Dendritic Cell Maturation	3.68
IL-15 Signaling	3.58

GLE1ノックダウン(重複部分含む)

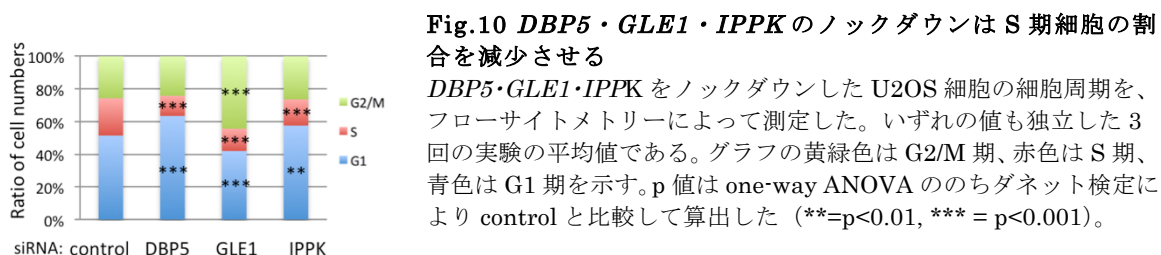
Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	13.20
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	9.75
Hereditary Breast Cancer Signaling	8.26
Cyclins and Cell Cycle Regulation	8.05
Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	7.99
ATM Signaling	7.51
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	6.96
Estrogen-mediated S-phase Entry	6.88
DNA damage-induced 14-3-3σ Signaling	6.83
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	6.27

IPPKノックダウン(重複部分含む)

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	5.80
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	4.40
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	3.97
Dendritic Cell Maturation	3.95
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	3.84
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	3.63
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	3.52
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	3.47
Hepatic Cholestasis	3.40
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	3.29

第二節 *GLE1* のノックダウンは M 期進行異常をもたらす

IPA を用いた解析によって、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* のノックダウンは細胞周期に影響する可能性が強く示唆された。そのため、三因子の siRNA を導入した細胞の細胞周期進行を解析した。まず、各 siRNA 導入 48 時間後の細胞群の細胞周期を測定した (Fig.10)。*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* いずれのノックダウンによっても、S 期の細胞割合の減少がはっきりと見られた。一方、*DBP5*・*IPPK* ノックダウン細胞群では G1 期の細胞割合が増加し、*GLE1* ノックダウンでは G2/M 期の細胞割合が増加した。



三因子のノックダウンで共通して見られた S 期細胞の減少は、G1/S チェックポイントの障害によるものと推測された。この障害を検出するため、ダブルチミジンブロックによる細胞周期同調処理を行った細胞を用いた。過剰量のチミジンを投与された細胞の細胞周期は、G1 期の最終期で止まる。チミジンを培地から除去する（この操作をチミジンリリースと呼ぶ）と細胞周期は再び進行するが、同時にノコダゾールを加えると M 期で停止するため、細胞が分裂し再び G1 期となる事を防げる。Fig.11A-B は、チミジンリリース・ノコダゾール添加 0・4・8・12 時間後の細胞を 75%エタノールで固定し、細胞群の細胞周期を測定した結果である。いずれの処理群も、ダブルチミジンブロックにより大半の細胞が G1 期停止の状態になっている (Fig.11A ヒストグラム黒線、Fig.11B 一番上)。チミジン除去後 8 時間のコントロール siRNA 導入群では、顕著な M 期細胞数の増加が見られた (Fig.11A ヒストグラム赤線、Fig.11B 上から三番目)。*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* ノックダウン細胞群でも同様にチミジン除去後 8 時間で M 期の細胞数が増加していたが、増加量はコントロール群より小さく、*GLE1* ノックダウン群で最も増加量が小さかった。この結果は、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* ノックダウンが G1/S チェックポイントの通過を障害している事を示唆する。

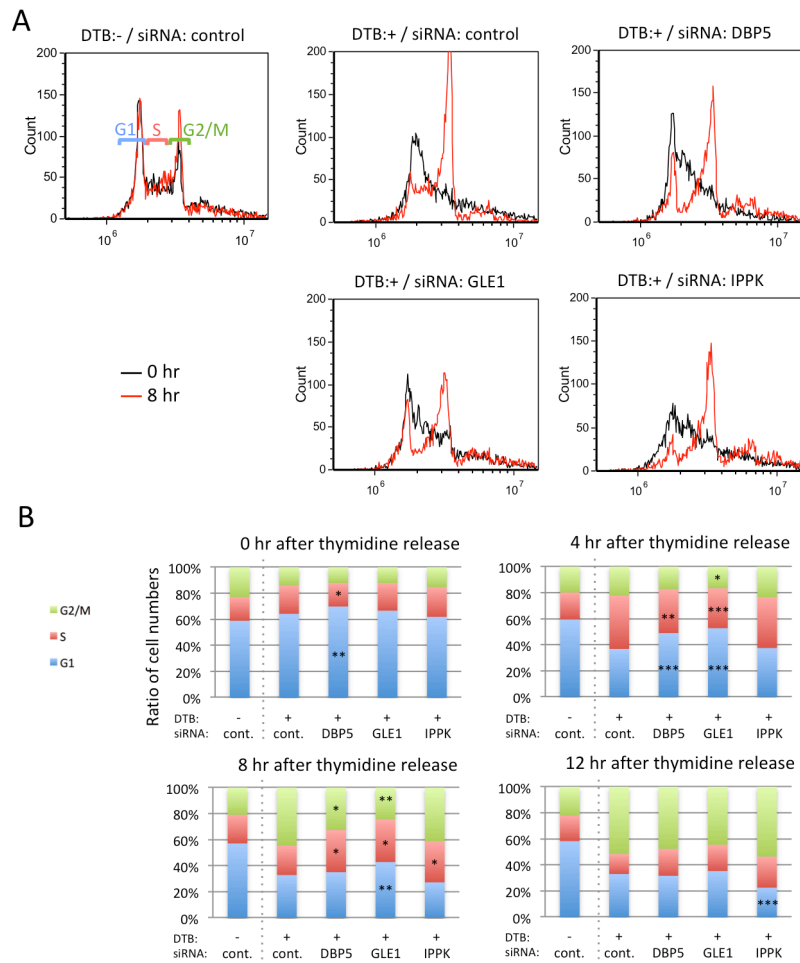


Fig.11 *DBP5*・*IPPK*のノックダウンはG1期/S期停止を、*GLE1*のノックダウンはG2期/M期停止を引き起こす

(A-B) コントロール siRNA を導入した細胞周期同調処理をしていない細胞と、コントロール・*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*いずれかの siRNA を導入した細胞周期同調処理をした細胞の比較。細胞周期同調はダブルチミジンブロックによって行った。DTB: double thymidine block. (A) 各細胞周期における細胞数の時間的変化を示すヒストグラム。黒線：チミジンリリース 0 時間後。赤線：チミジンリリース 8 時間後。(B) 棒グラフは独立した 3 回の実験の平均値を示す。グラフの黄緑色は G2/M 期、赤色は S 期、青色は G1 期を示す。p 値はスチューデントの t 検定により control と比較して算出した (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, *** = $p<0.001$)。

Fig.10 で、*GLE1* ノックダウン細胞群における G2/M 期細胞の比率増加が確認された。そのため、私は H2B-GFP 安定発現 HeLa 細胞株を作製し、*GLE1* ノックダウンが細胞の M 期進行に与える影響をタイムラプス顕微鏡で観察した。先ず、ここまでに使用した siRNA が作製した細胞株においても *DBP5*・*GLE1*・*IPPK* を効率よくノックダウン出来る事を確認した (Fig.12)。これら三因子がノックダウンされた細胞はいずれも、M 期に入る細胞の割合がコントロール群よりも減少していた (Fig.13A)。M 期に入った細胞が細胞分裂を完了させるまでの時間を比較した所、コントロール群と *DBP5*・*IPPK* ノックダウン群は殆どの細胞が 80 分以内であった (Fig.13B)。しかし、*GLE1* ノックダウン群は大半の細胞が 80 分以上の時間を要した。ここから、三因子の中でも特に *GLE1* のノックダウンが、M 期進行に必要な遺伝子の発現を低下させている事が推測される。この M 期進行遅延を精査するため、生細胞イメージング画像を解析した。その結果、*GLE1* siRNA 導入細胞では M 期の染色体整列が正常に行われず、中には染色体が完全に散在している細胞も観察された (Fig.13C)。これらの結果から、*GLE1* の欠乏は紡錘体形成や染色体整列に影響すると考えられる。また、*GLE1* ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延は、H2B-GFP 安定発現 U2OS 細胞株でも同様に見られた (Fig.14) ことから、この現象は幅広い細胞種で見られる可能性が高いと考えられる。

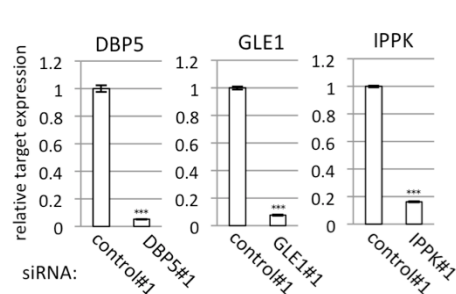


Fig.12 H2B-GFP 安定発現 HeLa 細胞株における *DBP5*・*GLE1*・*IPPK* ノックダウン効率の確認
H2B-GFP 安定発現 HeLa 細胞株を用いたリアルタイム PCR。
DBP5・*GLE1*・*IPPK* の siRNA はそれぞれ対応する遺伝子の細胞質 RNA 量を減少させている。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。
p 値はスチューデントの t 検定により control と比較して算出した (***) = $p < 0.001$ 。

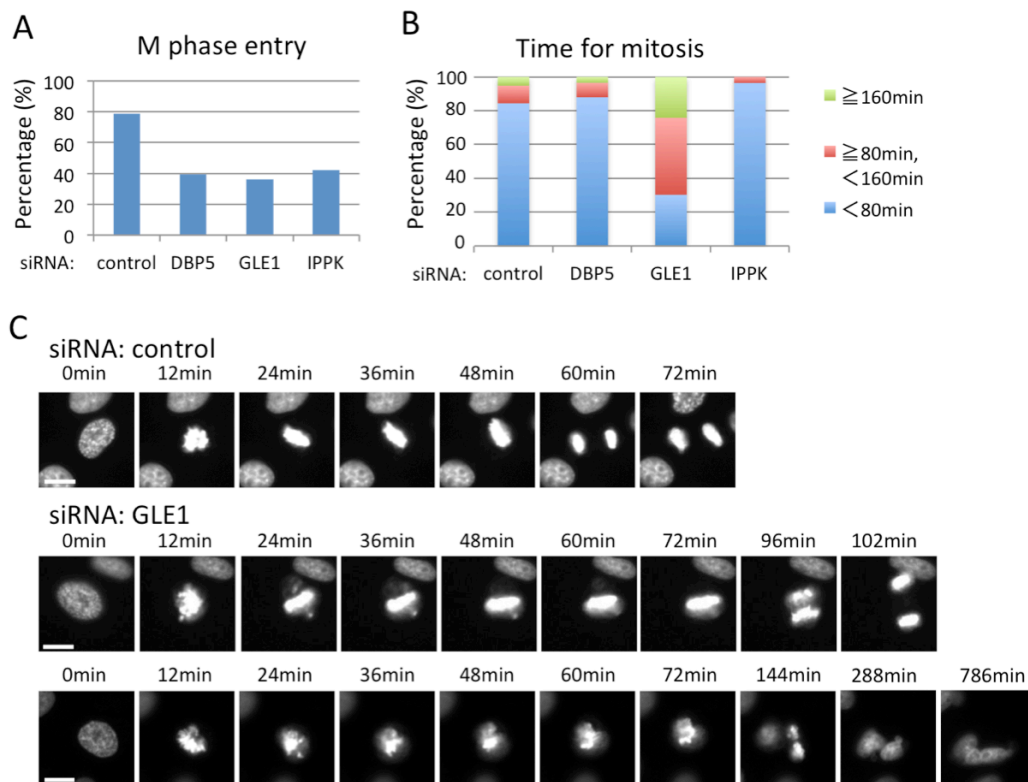


Fig.13 HeLa 細胞において、*GLE1* ノックダウンは細胞分裂進行に異常をもたらす
H2B-GFP 安定発現 HeLa 細胞株を用いた。(A) タイムラプス観察中に、M 期に入る事の出来た細胞の割合。カウントした細胞の総数は、コントロール siRNA 群が 111、*DBP5* siRNA 群が 66、*GLE1* siRNA 群が 75、*IPPK* siRNA 群が 71。(B) M 期細胞が細胞分裂にかかった時間が、80 分もしくは 160 分より長いのか短いのかを示す。カウントした細胞の総数は、コントロール siRNA 群が 96、*DBP5* siRNA 群が 33、*GLE1* siRNA 群が 58、*IPPK* siRNA 群が 28。(C) siRNA 導入細胞の代表的な生細胞イメージング。細胞観察は siRNA 導入後 40~57 時間で行われた。スケールバーは 20 μ m を示す。

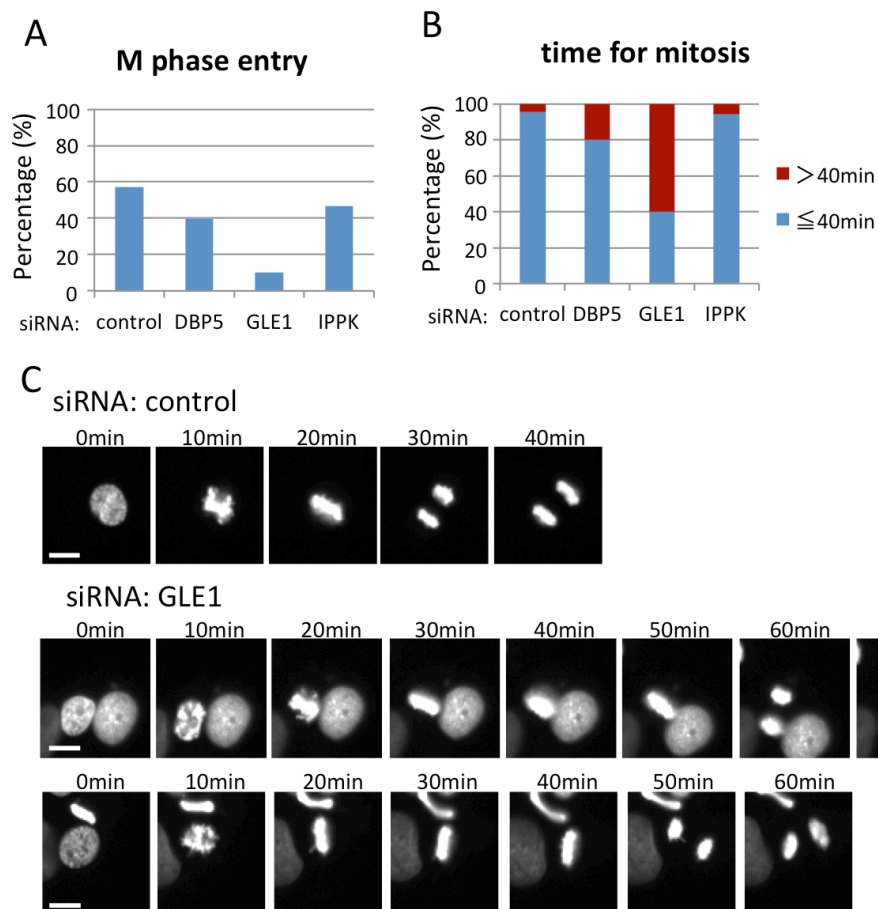


Fig.14 *GLE1* ノックダウンは U2OS 細胞においても細胞分裂進行に異常をもたらす
H2B-GFP 安定発現 U2OS 細胞株を用いた。(A) タイムラプス観察中に、M 期に入る事の出来た細胞の割合。(B) M 期細胞が細胞分裂にかかった時間が、40 分より長いかわるかを示す。カウントした細胞の総数は、コントロール siRNA 群が 126、*DBP5* siRNA 群が 20、*GLE1* siRNA 群が 10、*IPPK* siRNA 群が 33。(D) siRNA 導入細胞の代表的な生細胞イメージング。細胞観察は siRNA 導入後 40~57 時間で行われた。スケールバーは 20μm を示す。

ここまでの生細胞のタイムラプス観察によって、*GLE1* のノックダウンが M 期進行の遅延と染色体整列の異常をもたらす事が解った。IPA によるアレイデータ解析結果では、*GLE1* ノックダウンは細胞分裂におけるポロ様キナーゼ (Polo-like kinase) の機能に影響するが、*DBP5*・*IPPK* ノックダウンでは影響しないことが示されている (Table.2, 4)。この経路に生じる影響を更に解析するため、経路を代表する遺伝子として *PLK1* と *Kizuna* (*KIZ*) を選択した。この 2 つの遺伝子は紡錘体の極性の制御に不可欠とされ、どちらも発現低下によって細胞分裂の異常が発生する[46,47]。*DBP5*・*GLE1*・*IPPK* ノックダウン細胞における *PLK1* と *KIZ* の細胞質 RNA の発現量をリアルタイム PCR 法で確認したところ、*PLK1* は三因子いずれのノックダウンでも発現低下が見られたが、*GLE1* ノックダウンによる発現低下が最も顕著であった。また、*KIZ*

は *GLE1* ノックダウンでのみ発現低下が見られた (Fig.15A)。この事は、*PLK1* と *KIZ* の発現低下が *GLE1* ノックダウンによる M 期進行異常の一因であることを示唆する。この仮説を検証するため、*GLE1* ノックダウン細胞と同様の細胞分裂異常が、*PLK1*・*KIZ* をノックダウンした細胞で見られるか観察した。先ず、HeLa 細胞において、作製した siRNA で *PLK1*・*KIZ* が効率的にノックダウン出来ることを確認した (Fig.15B)。次に、*PLK1*・*KIZ*・*GLE1* をノックダウンした細胞に対し、紡錘糸の主成分である α -チューブリンの免疫染色を行った (Fig.16)。その結果、*GLE1*・*PLK1*・*KIZ* いずれのノックダウンでも α -チューブリンの動態異常が見られ、更に *PLK1* 阻害剤である BI2536 で処理した細胞でも同様の異常が見られた (Fig.16B)。*GLE1* ノックダウンは他にも、*CDK1*、*CCNB1*、*KIF11* といった M 期進行に関与する遺伝子の発現を低下させる事が、アレイデータによって示されている。以上の結果から、*GLE1* の発現低下は細胞分裂時の染色体配列に異常をもたらし、M 期進行を阻害することが解った。

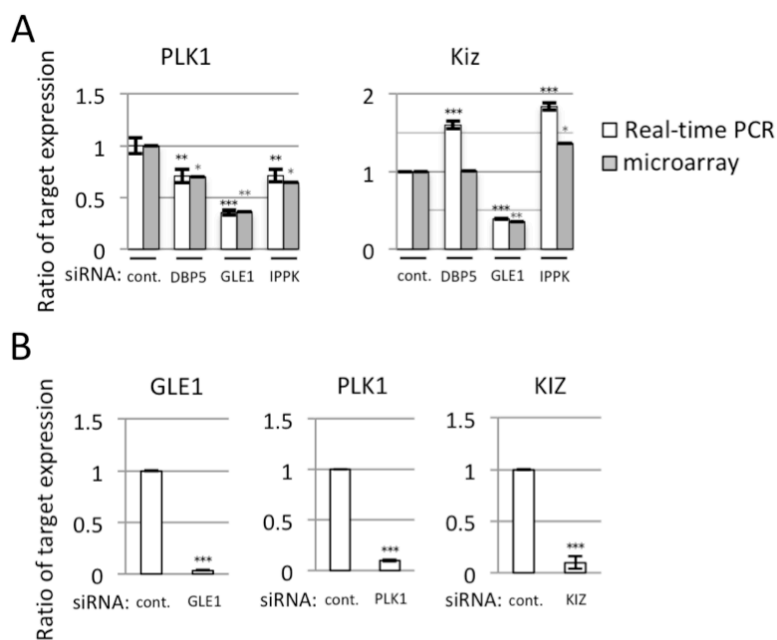


Fig.15 *PLK1*・*KIZ* の発現量変化と、siRNA によるノックダウン効率

いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)。 (A) 図に示された siRNA を導入した U2OS 細胞から細胞質 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を行った。DBP5・GLE1・IPPK をノックダウンした細胞における *PLK1*・*KIZ* の発現変化を確認した。白い棒グラフ：リアルタイム PCR 法にて検出された値。灰色の棒グラフ：マイクロアレイ解析による値。(B) 図に示された siRNA を導入した HeLa 細胞から細胞質 RNA を抽出し、*GLE1*、*PLK1*、*KIZ* に対するノックダウン効率をリアルタイム PCR 法により確認した。*PLK1* siRNA 導入細胞は導入後 24 時間で、*GLE1*・*KIZ* siRNA 導入細胞は導入後 48 時間で固定した。

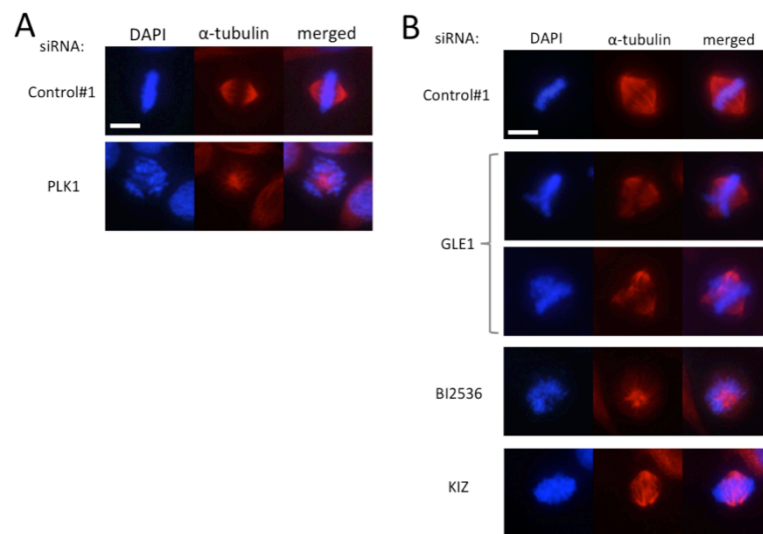


Fig.16 *GLE1*・*PLK1*・*KIZ*に対する siRNA を導入した細胞における紡錘体の異常
図に示された siRNA を導入した細胞の α-チューブリンを染色した。細胞は、siRNA 導入後 24 時間 (A)
もしくは 48 時間 (B) 後に固定した。染色体は DAPI にて染色した。スケールバーは 20μm を示す。

第三節 GLE1 の欠失は DNA 損傷修復機能を大きく減弱させる

マイクロアレイデータによると、*DBP5・GLE1・IPPK*いずれのノックダウンでも DNA 損傷応答 (DNA damage response) に影響が生じると推測出来る (Table3,4)。従って、三因子をノックダウンした細胞は、DNA の損傷が正常な細胞よりも蓄積すると考えられた。そこで、DNA 損傷の中でも DNA 二重鎖切断に着目し、DNA 二重鎖切断マーカーであるリン酸化ヒストン H2A.X (以降、 γ H2A.X) の免疫染色を行った。

DBP5・GLE1・IPPK のいずれかをノックダウンした細胞では、 γ H2A.X を示す核内の明るいシグナルが明確に増えており (Fig.17A, B)、DNA 二重鎖切断が生じている事が示された。中でも、*GLE1* ノックダウン群で最も顕著にシグナルが見られ、その蛍光強度はコントロール群の 19 倍になった (Fig.17B)。一方、ヒストン H2A.X のタンパク発現量は、ノックダウン群とコントロール群で変化していなかった (Fig.17C)。

そこで、ノックダウン群における γ H2A.X シグナル増加の原因を追究するため、DNA 損傷センサータンパクや DNA 修復タンパクの細胞質 RNA 量をリアルタイム PCR 法で検出した (Fig.18)。検出する因子は、IPA によるアレイデータの解析結果を参考にし、DNA 二重鎖切断に関与する因子として *BRCA1*、*BRCA2*、*FANCD2*、*ATM* を、DNA 一本鎖損傷に関与する因子として *XPC*、*XPA*、*ATR* を選んだ。*BRCA1* と *FANCD2* は明らかな RNA 発現量低下が見られた。また、*GLE1* ノックダウン細胞では *BRCA2* の発現量も大きく低下していた。*XPC*、*XPA* の RNA 発現量に大きな減少は見られず、*ATR* は発現量が上昇していた。以上の結果より、*DBP5・GLE1・IPPK* のノックダウンは DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の修復に関する因子の発現量低下を引き起こし、DNA 損傷応答を減弱させると解った。

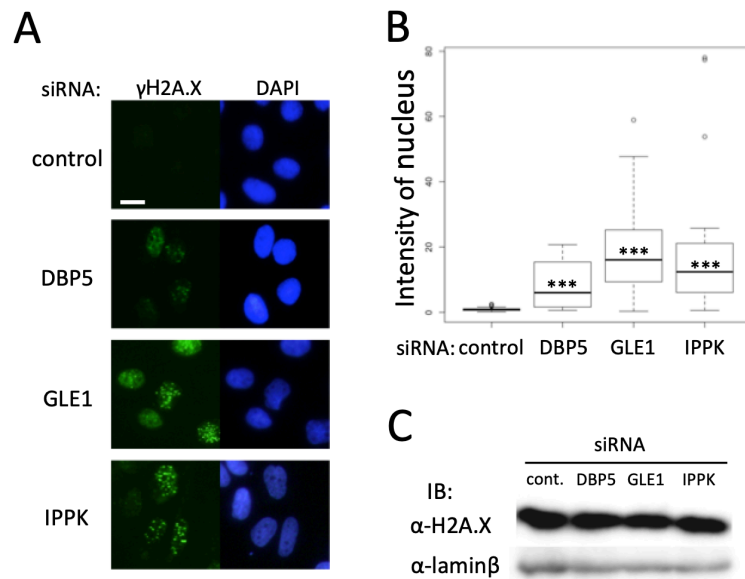


Fig.17 DBP5・GLE1・IPPK ノックダウンは γ H2A.X シグナルを増加させる

(A) U2OS 細胞を、図に示された siRNA 導入後 48 時間後に固定した。免疫染色には抗 γ H2A.X 抗体を用いた。染色体は DAPI にて染色した。スケールバーは 20 μ m を示す。(B) 抗 γ H2A.X 抗体の核内シグナル強度を ImageJ で定量化した。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (n=30, *** = p<0.001)。(C) 図に示された siRNA を導入した U2OS 細胞の核内抽出物を用いて、抗 H2A.X 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。ローディングコントロールとしてラミン b を用いた。

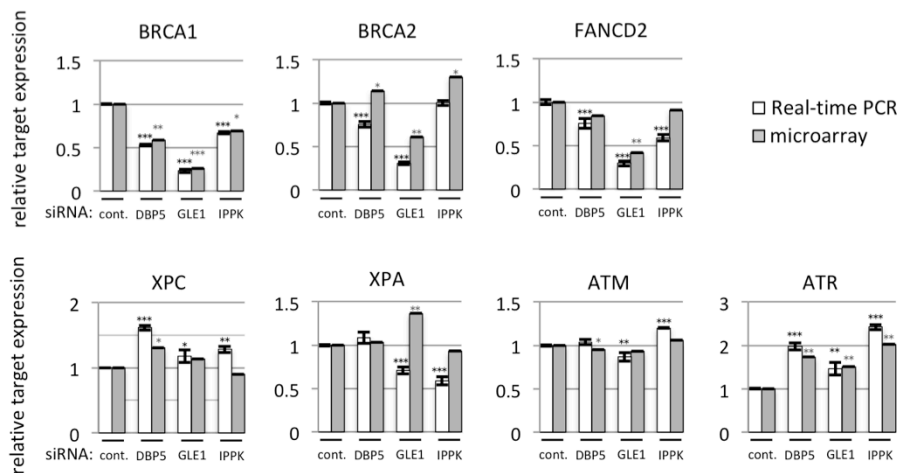


Fig.18 DBP5・GLE1・IPPK ノックダウンが DNA 損傷応答関連因子の発現に与える影響

IPA の DNA 損傷応答 (DNA damage response) カテゴリに分類される因子の細胞質 RNA 量を、リアルタイム PCR 法で検出した。細胞質 RNA は、図に示す siRNA をトランスフェクションされた U2OS 細胞から抽出した。白い棒グラフ：リアルタイム PCR 法にて検出された値。灰色の棒グラフ：マイクロアレイ解析による値。いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (* = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001)。

第四節 *DBP5*ならびに *IPPK*のノックダウンは免疫応答としての *IFNB1* の発現に影響する

マイクロアレイデータの解析によって、*DBP5*・*IPPK*のノックダウンが炎症反応や免疫応答に関する遺伝子の発現に影響している事が示されている (Table2, 4)。実際に、*DBP5*のノックダウンが Toll 様受容体 (TLR) の一種である *TLR3*の細胞質 RNA 発現量を低下させ、*IPPK*のノックダウンが炎症反応活性化に機能する *TRAF3*の細胞質 RNA 発現量を低下させる事が、リアルタイム PCR 法で確認できた (Fig.19A)。dsRNA に対する免疫応答経路の中で、TLR3・TRAF3の下流には *IFNB1*の転写があるため、前述のノックダウンは *IFNB1*の転写量低下も引き起こす事が推測された。しかし、マイクロアレイデータによるとノックダウン群においても *IFNB1*の細胞質 RNA 量は低下していなかった (Fig.19B)。

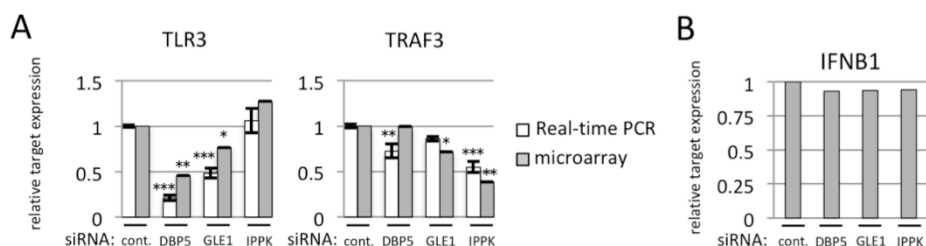


Fig.19 *DBP5*・*GLE1*・*IPPK*のノックダウンが免疫応答関連因子の発現に与える影響

いずれの値も独立した3回の実験の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。p値は one-way ANOVA ののちダネット検定により control と比較して算出した (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$)。 (A) マイクロアレイデータの示す *TLR3*と *TRAF3*の細胞質 RNA 発現量を、リアルタイム PCR 法で検証した。細胞質 RNA は、図に示す siRNA をトランスフェクションされた HeLa 細胞から抽出した。白い棒グラフ：リアルタイム PCR 法にて検出された値。灰色の棒グラフ：マイクロアレイ解析による値。 (B) *IFNB1*の細胞質 RNA 発現量が、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*ノックダウンによって変化しない事を示すマイクロアレイデータ。

これは、*IFNB1*の基礎発現量が免疫応答時に比べると極めて低いために、*DBP5*などのノックダウンの影響が顕在化していない可能性が考えられた。そこで私は、poly(I)・poly(C)二重鎖（以降、ポリ IC）処理によって *IFNB1*の転写が誘導される事を利用し、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*をノックダウンした細胞にポリ IC 処理を行うことによって、*IFNB1*の転写に対する影響を顕在化することを試みた。ポリ IC による *IFNB1*の転写誘導プロトコルは、先行研究[48]を参照した。HeLa 細胞は *DBP5*・*GLE1*・*IPPK*・コントロールいずれかの siRNA を導入し、45 時間後にポリ IC を導入した。更に 3 時間後に、全細胞抽出物から全 RNA を精製した。まず、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*それぞれが対応する siRNA によって効率よくノックダウンされているかを検出した (Fig.20A)。

これによってポリ IC 処理が *DBP5*・*GLE1*・*IPPK* のノックダウンに影響しない事が確認できた。次に、*IFNB1* の mRNA 転写量をリアルタイム PCR 法で検出した (Fig.20B)。予想された通り、*IFNB1* の mRNA 量は *DBP5*・*IPPK* ノックダウン群で大きく減少していた。*GLE1* ノックダウンでも *IFNB1* の mRNA 量減少は引き起こされたが、その影響は *DBP5*・*IPPK* ノックダウンより小さいものだった。

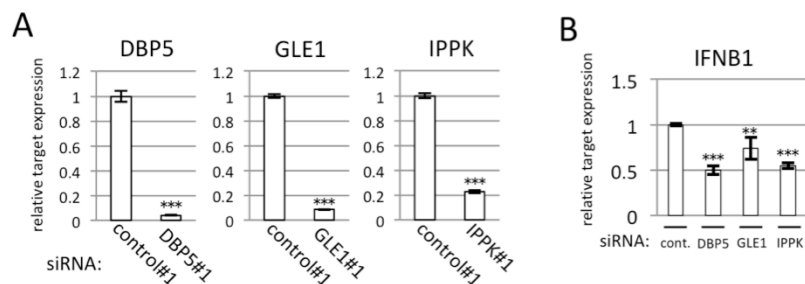


Fig.20 *DBP5* もしくは *IPPK* のノックダウンはポリ IC による *IFNB1* 誘導作用を減弱させる

いずれの値も独立した 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。p 値は one-way ANOVA のちダネット検定により control と比較して算出した (*=p<0.05, **=p<0.01, *** = p<0.001)。(A) 細胞質 RNA は、ポリ IC 処理を行い、かつ図に示す siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞から抽出した。(B) *IFNB1* の発現レベルを、HeLa 細胞の全細胞抽出物を用いたリアルタイム PCR 法で検出した。HeLa 細胞は、図に示した siRNA 導入後 45 時間後にポリ IC 処理を行い、更に 3 時間後全細胞 RNA を抽出した。

考察

DBP5・GLE1・IPPK は mRNA 核外輸送に機能し、その役割は出芽酵母からヒトまで進化的に保存されている。また、これら三因子は核内で転写された mRNA の細胞質での発現に関して、他の様々な機能も有しているとされる。しかし、細胞質 mRNA の発現に対する、個々の因子の機能の具体的な全体像は明らかになっていない。本研究では、*DBP5・GLE1・IPPK* を個別にノックダウンし、細胞質 mRNA の発現に対する影響を解析した。いずれの因子のノックダウンでも、ポリアデニル化 RNA の核内蓄積が見られた。近年、ヒトにおいて、DBP5 の ATPase 活性上昇に IP₆ が機能しているとする Adams らの報告[15]と、それに反する Lin らの報告[14]が相次いで発表された。これらの研究は合成タンパク質を用いた *in vitro* 解析であり、生細胞中における mRNA 核外輸送に対する IP₆ の影響を確認していない。本研究では *IPPK* ノックダウンによりポリアデニル化 RNA の核内蓄積が見られ、Adams らの報告を支持する結果が得られた。そのため、ヒトにおいても IP₆ は mRNA の細胞質発現に何らかの機能を持っていると考える。

DBP5・GLE1・IPPK のノックダウンによって mRNA の輸送阻害が確認できたため、次にどのような mRNA の核外輸送が阻害されているのかについて、細胞質 RNA を用いたマイクロアレイ解析により調べた。三因子それぞれのノックダウン効率は、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロッティングにより確認した。マイクロアレイデータによると、ノックダウンによって発現に影響を受ける遺伝子の数について、*DBP5・IPPK* と比較すると *GLE1* が若干多い傾向にあったが、大きな差ではなかった (Table.1)。しかし影響を受けた因子の内訳は、三因子の全てで共通している物もあれば各因子に固有の部分も多くあった。

影響を受けた因子の機能を探るため、マイクロアレイ解析のデータを IPA によるパスウェイ解析にかけた。その結果、三因子のノックダウンが影響を与えるパスウェイはそれぞれ大きく異なる事が示された (Table.2, 4)。発現低下が見られた遺伝子について、『三重重複部分』には細胞周期に関するパスウェイが複数リストアップされた。細胞周期に関する遺伝子の半減期は概して短い[49]ため、この結果は寿命の短い mRNA が三因子のノックダウンの影響を強く受けたという事を示すと言え、実際に三因子いずれのノックダウンでも細胞周期の進行に異常が見られた (Fig.11)。*GLE1* ノックダウンのリストには、細胞分裂と DNA 損傷応答に関するパスウェイが複数含まれた。実際、*GLE1* をノックダウンした細胞では M 期進行異常 (Fig.13-14) や DNA 損傷応答の顕著な減弱 (Fig.17-18) が見られた。一方、発現上昇が見られた遺伝子の解析結果は

*DBP5・GLE1・IPPK*それぞれについて大きく異なっていた (Fig.8)。発現上昇のパスウェイリストは、*DBP5* ユニークの項を除き、全体的に発現低下のリストほど *p* 値の大きいパスウェイが存在しなかった。これは同一パスウェイ内での発現上昇因子の数がそれほど多くない・発現上昇量が大きくなく、分散した結果であることを示す。発現上昇因子について本研究ではさらなる解析を行わなかったが、*DBP5・GLE1・IP₆*は主に mRNA の核外輸送に機能しているとされてきたため、ノックダウンにより細胞質 mRNA 量の増える因子があるという結果は意外なものであった。細胞質 mRNA の存在量は、そのライフサイクルの性質上、細胞質へ輸送された量と分解量との差し引きで決まる [50]。*DBP5* はヒトにおいて翻訳に機能している事が示されており [18]、*GLE1* と *IP₆* については出芽酵母における翻訳への関与が示されている [22–25]。ここから、*DBP5・GLE1・IPPK* ノックダウンにより、mRNA 核外輸送だけでなく翻訳の抑制も発生し、細胞質に滞留した mRNA の中で安定性の高い物が『細胞質発現量増加』として検出されたと仮説を立てる事ができる (Fig.21)。この仮説の検証には、発現量増加として検出された mRNA の半減期の測定や、*DBP5・GLE1・IPPK* ノックダウン時のプロテオーム解析等が必要になるだろう。また更なる要素として、*DBP5・GLE1・IP₆*は全ての mRNA 核外輸送に機能しているわけではなく、他の因子によって輸送される mRNA も存在する [1]。そのため、そういった mRNA は上記三因子のノックダウンによる核外輸送効率減少の影響を受けず、細胞質での安定性が細胞質発現量を決定すると推測出来る。ここまでの解析結果によって、*DBP5・GLE1・IP₆*が細胞質 mRNA の発現に対して共通の機能と各々固有の機能との両方を持っていることが確かに示された。ここで注意する必要があるのは、*IP₆*は *IPPK* によって *IP₅*から産生される中間代謝産物であり、*IP₆*はさらに高分子のイノシトールリン酸である *IP₇*や *IP₈*の基質であるという点である。本研究では、*IPPK* ノックダウンによる mRNA 発現への影響を、*IP₆*の欠乏によるものと *IP₇*や *IP₈*の欠乏によるものとに区別出来ていない事を付記しておく。

GLE1 は胎性致死の神経変性疾患 *LCCS1* の責任遺伝子である [37]。*LCCS1* 患者の持つ変異 *GLE1* は、mRNA 核外輸送効率が低下している事が報告されている [29]。ここから、*LCCS1* の病因は、*GLE1* の変異によって運動神経の発生に必要な mRNA の細胞質発現が阻害されている事であると考えられる。本研究で *GLE1* ノックダウンによる細胞質 mRNA 発現低下が確認された遺伝子に、*FUS* と *HDAC1* がある (Fig.7B)。この 2 つの遺伝子は神経変性疾患との関連が報告されている [51,52]。更に、*GLE1* ノックダウン細胞は、DNA 損傷を示す γ H2A.X のシグナル強度が細胞核内で強くなっており、DNA 損傷因子の mRNA 発現量が低下していた。*GLE1* ノックダウンは G2/M 期細胞の割合が増え (Fig.10)、一方で S 期細胞の割合は減少していた。細胞周期にお

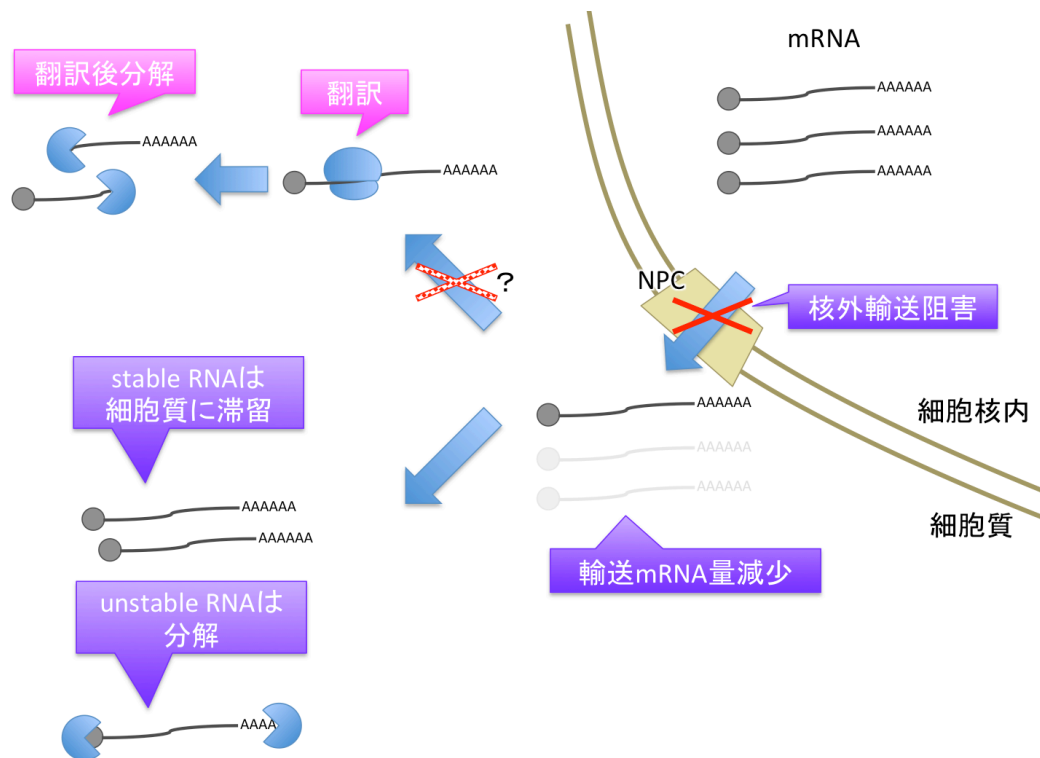


Fig.21 DBP5・GLE1・IPPK ノックダウンにより発生した、mRNA 細胞質発現量の増加・減少についてその機構の考察

いて、染色体量は S 期で増加し、G2 期では G1 期の 2 倍になる。 γ H2A.X シグナルの定量において、M 期の細胞は除外しているが、その他の細胞は細胞周期を区別せずシグナル強度を測定した。そのため、*GLE1* ノックダウン群は他の群より細胞の持つ染色体の総量が増えていると考えられる。さらに、その染色体量増加に伴い DNA 損傷の量も増えた可能性がある。しかし、*GLE1* ノックダウン細胞の γ H2A.X シグナル強度はコントロール群の 19 倍である。この変化は、細胞周期の割合変化による染色体量の増加だけでは説明できず、*GLE1* ノックダウンによって DNA 損傷応答の阻害が発生していると結論づける。発生ステージ初期での DNA 損傷応答の阻害は、神経変性疾患をもたらす[53]。こういった DNA 損傷応答に関する異常や M 期細胞分裂の異常に加え、*GLE1* ノックダウン細胞では *GLI3* と *SMO* の発現低下が生じる (Fig.7B)。GLI3 と SMO はソニックヘッジホッグ (SHH) シグナリングで極めて重要な機能を持っており、GLI3/SMO のダブルミュータントは腹側脊髄の階層的神経発生に異常が発生する[54]。また、SHH シグナリングの機能不全は神経細胞死をもたらす[55]。更に、GLE1 は miR-376a-3p との直接相互作用が近年報告されており[56]、miRNA の異常もまた運動神経の疾患に関与することが報告されている[57]。一方、DBP5 や IPPK・IP₆ に関して

はこういった miRNA 代謝と関連する報告はない。以上のように、先行研究と本研究の結果を合わせる事で、DBP5・GLE1・IP₆三因子の中で GLE1 だけが神経変性疾患と関連している理由の手掛かりが得られた。

ゼブラフィッシュを用いた近年の研究で、GLE1 は中心体に局在しており、微小管の安定性に不可欠である事が解った[28]。本研究でも、細胞分裂の異常は GLE1 ノックダウン細胞特異的に見られた。加えて、GLE1 ノックダウンは細胞分裂に関連する PLK1、KIZ、CDK1、KIF11 といった遺伝子の発現を低下させる。更に、RAE1 (GLE2) という GLE1 関連因子は細胞分裂時の微小管重合に対し構造的に機能していると報告されており[58]、GLE1 の細胞分裂における特異的な影響も、このような RNA 核外輸送とは異なる機能によるものと考ええる事が出来る。

DBP5・IPPK のノックダウンは TLR シグナル伝達経路に影響する。DBP5 ノックダウン細胞では、Toll 様受容体 (TLR) のヒトにおける一種である TLR3[59]の mRNA 発現低下が、IPPK ノックダウン細胞では、IFNB を含む I 型インターフェロンの発現に不可欠な TRAF3 の発現低下が見られた。また、ポリ IC 処理による IFNB1 転写誘導の減弱は DBP5・IPPK ノックダウンに共通して見られた。細胞の dsRNA 取り込み経路は複数存在する[60]ため、DBP5・IPPK ノックダウンによって影響を受けた経路はそれぞれ異なっていると考察される。また、DBP5 を含むいくつかの DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼについては、ウイルス核酸の認識に関与している事が知られている[61,62]。このため、本研究で行ったポリ IC の細胞内導入によって観察された DBP5 ノックダウンによる IFNB1 転写抑制は、DBP5 タンパク質が直接 dsRNA に対する免疫応答に影響した可能性もあると考えられる。

要約すると、本研究は DBP5・GLE1・IPPK 三因子の細胞質 mRNA 発現に関する機能と、細胞の生存・増殖に及ぼす影響について解析したものである。結果として、これら三因子の間には共通点と相違点の両方が見られた。ノックダウンによって細胞質 mRNA の発現に影響を受けた遺伝子の数としては、GLE1 が最も多かった。また、発現に影響を受けた遺伝子の種類は、三因子の間で共通しているものもあれば、各因子に固有のものもあった。以上の事から、DBP5・GLE1・IPPK は細胞質 mRNA に対しそれぞれ特異的な機能を持ち、三因子それぞれがどういった細胞質 mRNA の発現に関与するのかはその機能の特異性に由来する、と結論づける。

材料ならびに手法

抗体と試薬

PLK1 阻害剤 BI2536 は Selleckchem から、TLR3 アゴニスト poly(I)-poly(C)二重鎖 (ポリ IC) は GE healthcare から購入した。マウス抗 FLAG M2 抗体、マウス抗 IPPK 抗体は Sigma-Aldrich から購入した。マウス抗リン酸化ヒストン H2A.X (γ H2A.X) は Merck Millipore から、マウス抗 β アクチン-HRP 結合抗体は和光純薬から、ヤギ抗 ラミン b 抗体は Santa Cruz から購入した。DBP5 抗血清は Robin Reed 博士から供与いただいた。GST 結合 GLE1N (GLE1 の N 末端側 1-362 アミノ酸) タンパク産生には大腸菌 (*E.coli*) BL21 株を用いた。GST-GLE1N 産生は 0.5mM の IPTG を投与後 28℃で 4 時間培養することによって誘導した。大腸菌は 10 分間の 6000g 遠心により回収され、0.2mM の PMSF・1mM の DTT を添加した pH7.2 の PBS で再懸濁した後、氷上で 30 秒×4 回ソニケーションした。破碎物は 15 分間の 8000g 遠心により上清と沈殿に分けた。上清は新しいチューブに回収し、グルタチオンビーズ (GE Healthcare) 添加後に終夜静置した。ビーズに結合した GST-GLE1N タンパクは、0.2mM の PMSF・1mM の DTT・30mM のグルタチオンを添加した PBS を用いて溶出し、0.2mM の PMSF・1mM の DTT を含む PBS で透析した。GST-GLE1N タンパクの精製度と濃度は、SDS-ポリアクリルアミドゲル泳動 (PAGE) で確認した。SDS-PAGE でのタンパク濃度指標には、ウシ血清アルブミンを用いた。GLE1 抗血清は、先行研究[63]に沿ってウィスターラットから取得した。抗血清の抗体価は、HeLa 細胞抽出物と MBP 結合 GLE1 (MBP-GLE1) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。なお、この抗血清精製は、京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。

プラスミドコンストラクション

3xFLAG タグ融合 human DBP5 (3xFLAG-DBP5) 発現プラスミドは、human DBP5 全長 cDNA を pcDNA5 ベクターの AspI-XhoI サイトに挿入して作製した。GST タグ融合の GLE1N 末端領域 (1-362 アミノ酸) (GST-GLE1N) を発現するプラスミドは、pGex6p ベクターの BamHI-XhoI サイトに挿入して作製した。H2B-GFP 発現プラスミドは松本 智裕教授 (京都大学生命科学研究科) から供与していただいたものを用いた。

細胞培養と安定発現株の作製

U2OS 細胞、HeLa 細胞、H2B-GFP 安定発現 HeLa 細胞は、DMEM (Wako) に非働化処理をした 10% FBS を加えて培養した。これらの細胞は 5% CO₂、37℃で培養・継代維持した。

H2B-GFP 安定発現 U2OS 細胞は、H2B-GFP 発現プラスミドを U2OS 細胞にトランスフェクションし作製した。具体的な導入操作は、ディッシュに上記の方法で培養した U2OS 細胞の細胞密度が 60-70%に到達した翌日に行った。リニアライズした H2B-GFP プラスミド 5μg、Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific) 10μl を、それぞれ 250ml の Opti-MEM (Thermo Fischer Scientific) に溶かし、3 分間室温静置した。その後、プラスミド溶液と Lipofectamine 溶液を混合し、20 分間室温静置した後、混合溶液を U2OS 細胞培養ディッシュに添加した。24 時間後、細胞を希釈し、培地を選択培地 (DMEM、10% FBS、100μg/ml G418) に交換した。コロニー形成後、核に GFP の発現が見られるコロニーを蛍光顕微鏡観察で選択した。

siRNA とプライマー

本研究に使用した siRNA の配列を Table.5 に示す。Control #1、Control #2、GLE1 #1、RRP45 は Thermo Fisher Scientific より購入した。DBP5 #1、GLE1 #2、IPPK#1・#2、PLK1#1・#2、Kizuna (KIZ) #1・#2 は IDT Japan より購入した。PLK1 と KIZ の siRNA は IDT のプレデザイン品であり、カタログ番号は以下の通り。PLK1 #1: hs. Ri. PLK1. 13. 1, PLK1 #2: hs. Ri. PLK1. 13. 2, KIZ #1: hs. Ri. KIZ. 13. 1, KIZ #2: hs. Ri. KIZ. 13. 2.

Table. 5 本研究に用いた siRNA の配列

Name		Nucleotide sequence
Control #1	sense	GGG CAC AAG CUG GAG UAC AAC UAC A
	antisense	UGU AGU UGU ACU CCA GCU UGU GCC C
Control #2	sense	CAA UGA AAG ACG GUG AGC UGG UGA U
	antisense	AUC ACC AGC UCA CCG UCU UUC AUU G
DBP5 #1	sense	rCrArA rGrGrU rGrUrU rUrGrU rUrCrU rGrGrA rUrGrA rGrGC T
	antisense	rArGrC rCrUrC rArUrC rCrArG rArArC rArArA rCrArC rCrUrU rGrArU
GLE1 #1	sense	GAG AAG CCU UGG GAC ACC AAG AGA A
	antisense	UUC UCU UGG UGU CCC AAG GCU UCU C
GLE1 #2	sense	rCrCrG rUrCrA rCrArG rArGrC rArArA rGrArU rUrCrU rCrAA C
	antisense	rGrUrU rGrArG rArArU rCrUrU rUrGrC rUrCrU rGrUrG rArCrG rGrUrG
IPPK #1	sense	rCrUrG rGrGrA rArGrU rGrGrA rArGrC rArGrA rUrCrA rGrCA A
	antisense	rUrUrG rCrUrG rArUrC rUrGrC rUrUrC rCrArC rUrUrC rCrCrA rGrUrU
IPPK #2	sense	rGrCrC rArArA rArUrG rUrGrG rGrUrU rUrArU rUrCrC
	antisense	rArArU rArArA rCrCrC rArCrA rUrUrU rUrGrG rCrUrU
RRP45	sense	GGC AAA UAC GUG UAG ACC UAC AUU U
	antisense	AAA UGU AGG UCU ACA CGU AUU UGC C

免疫染色

12 ウェルプレートに配置したカバーガラスの上に、U2OS 細胞を 5～10%コンフルエントになるよう播種し、24 時間培養した。その後、以下の手順で siRNA もしくはプラスミドを細胞にトランスフェクションした。プラスミド (0.4μg) もしくは siRNA (20μM、2.5μl) を 100μl の OPTI-MEM (Invitrogen) で希釈し、この希釈液を 2μl の Lipofectamine 2000 と丁寧に混合し、20 分間室温静置した。その後、この核酸-Lipofectamine 混合液を各ウェルに添加した。トランスフェクション後の細胞培養時間は、特記無き場合 48 時間である。培養後の細胞は、4%ホルムアルデヒド/PBS で 20 分間の固定処理した後、0.1%Triton X-100/PBS (PBS-T) で透過した。細胞は PBS で 10 分×3 回洗浄された後、6%BSA/PBS を用いて 1 時間室温でブロッキングした。細胞は先ず 2%BSA/PBS で希釈した一次抗体で処理し、次に Alexa-488 結合二次抗体 (Molecular Probes) で処理した。染色体 DNA は DAPI で対比染色した。

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

RNA-FISH は先行研究と同様の手法で行った[63]。HeLa 細胞もしくは U2OS 細胞を 5～10%コンフルエントになるよう播種し、24 時間培養した。siRNA もしくはプラスミドの導入は、免疫蛍光法の項の記載と同様の手法で行った。トランスフェクション後の細胞培養時間は、特記無き場合 48 時間である。培養後の細胞は、4%ホルムアル

デヒド/PBS で 20 分間の固定処理した後、0.1%Triton X-100/PBS (PBS-T) で透過した。細胞は PBS で 10 分×3 回洗浄した後、2x SSC で 5 分間処理し、ULTRAhyb-Oligo ハイブリダイゼーションバッファー (Ambion) を用いて 42℃の湿潤チャンバー内で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、20pmol の Cy3 ラベルオリゴ dT₄₅ プローブを用いて、湿潤チャンバー内で終夜ハイブリダイゼーション処理を行った。その後、細胞は 42℃下で 20 分間の 2x SSC 処理、10 分間の 0.5x SSC 処理、10 分間の 0.1x SSC 処理をした。核と細胞質のポリアデニル化 RNA シグナル定量化は、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

ウエスタンブロッティング

細胞は以下の方法で細胞質画分・核内抽出物・不溶性画分に分画した。細胞を遠心によってペレットにした後、ペレットの 3 倍量の A ソリューション (10mM Hepes-KOH (pH 7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT) を加え注意深く懸濁した。懸濁後の細胞は 10 分間氷上静置し、5 秒間ボルテックスした後 10000g で 10 秒間遠心した。遠心後の上清を細胞質画分として回収した。遠心後のペレットは同量の C ソリューション (20mM Hepes-KOH (pH 7.9), 25%グリセロール, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT) を加え注意深く懸濁した。懸濁後のペレットは 20 分間氷上静置し、数回のタッピング後 10000g で 10 分間遠心した。遠心後の上清を核内抽出物として回収し、ペレットを不溶性画分とした。細胞質画分と核内抽出物のタンパク濃度は、ブラッドフォードアッセイ (ナカライテスク) で測定した。

各画分は 4x SDS バッファー (190mM Tris-HCl (pH 6.8), 40%グリセロール, 0.8% SDS, 0.2%ブromoフェノールブルー, 40mM DTT) を混合後、2 分間煮沸した。その後 SDS-PAGE にかけてタンパクを分離し、そのタンパクを Trans-Blot cell (Bio-Rad) を用いて PVDF 膜へと転写した。転写後の PVDF 膜は、0.1%の Tween 20 を含む 5%スキムミルク/PBS で 1 時間・室温下にてブロッキングした。PVDF 膜には、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡) で希釈された一次抗体を加え、4℃下で終夜ローテーター攪拌した。その後、PVDF 膜は 0.1%の Tween 20 を含む PBS で 10 分×3 回洗浄した後、Can Get Signal Solution 2 (東洋紡) にて希釈した HRP 結合二次抗体と共に室温下で 2 時間ローテーター攪拌した。抗体処理後の PVDF 膜は 0.1%の Tween 20 を含む PBS で 10 分×3 回洗浄後、イモビロンウエスタン化学発光 HRP 基質 (Merck Millipore) に浸漬し、LAS4000 mini (GE Healthcare) で化学発光を検出した。

細胞増殖アッセイ

U2OS 細胞を 6 ウェルプレートに 2.5×10^4 個ずつ播種した。24 時間培養後、siRNA トランスフェクションを Lipofectamine 2000 を用いて行った。トランスフェクション直前に、5 μ l の 20 μ M siRNA と 5 μ l の Lipofectamine 2000 をそれぞれ個別に 250 μ l の OPTI-MEM で希釈し、3 分間室温静置した。希釈した siRNA と Lipofectamine を丁寧に混合した後、20 分間室温静置した。その後、siRNA-Lipofectamine 混合液を各ウェルに添加した。所定の時間培養後、細胞をトリプシン添加により回収し、細胞数を計測した。

RNA 単離、逆転写とリアルタイム PCR

5~10%コンフルエントの U2OS 細胞もしくは HeLa 細胞に、ここまでに記載された手法で *DBP5*・*GLE1*・*IPPK* の siRNA を導入し、48 時間培養した。細胞はトリプシン処理によって回収した。細胞質画分は、細胞に溶解バッファー (20mM Tris-HCl (pH8.0), 200mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1% NP40) を添加し 5 分間氷上静置した後、数秒の 10000g 遠心で得られた上清として回収した。全細胞もしくは細胞質画分中の RNA は、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク) をメーカーの示すプロトコル通りに使用して回収した。相補鎖 DNA (cDNA: complementary DNA) は、得られた RNA 4 μ g に対し 100U の ReverTraAce (東洋紡) とランダム 9 プライマーを用い、メーカーの示すプロトコルに準じて合成した。リアルタイム PCR は、Thunderbird SYBR qPCR mix (東洋紡) を用い、Thermal Cycler Dice real-time system II (タカラバイオ) にて解析した。本研究のリアルタイム PCR に用いたプライマーセットと温度条件は Table.6 に記載する。

マイクロアレイ

マイクロアレイ解析には Whole human genome DNA microarray 4x44K v2 (Agilent Technologies) を用いた。アレイ解析はメーカーの示すプロトコルに準じて行った。プローブセットのシグナルはマイクロアレイスキャナ G2505 (Agilent) を用いて計測した。遺伝子発現の生データは統計ソフト R (<https://cran.r-project.org/>) を用いて LOESS 平滑化処理を行った。その後 False Discovery Rate 50%以上の遺伝子を除外し、Rank Product 法で得られた遺伝子リストを、IPA (Agilent) のサーバーへインプットした。Canonical Pathway Analysis は、*DBP5*・*GLE1*・*IPPK*それぞれのノックダウン細胞によって所定の閾値以上の発現変化をした遺伝子の分布を、IPA がフィッシャーの正確確率検定を用いた処理をする事で行った。アレイ解析の結果は 3 回の

独立した試験結果の統合である。アレイデータは GEO (Gene Expression Omnibus) に投稿し、アクセッションナンバーは GSE100424 である。

Table.6 本研究のリアルタイム PCR に用いたプライマーセットとその温度条件

Name		Nucleotide sequence	Annealing temperature
<i>PGK1</i>	forward	GTTGCAGACAAGATCCAGCTC	57°C
	reverse	GAGTGCCCAATGTCATGTTG	
<i>DBP5</i>	forward	GAAAGAGGCCAGAAAGATCAG	57°C
	reverse	GCCTCATCCAGAACAAACAC	
<i>GLE1</i>	forward	AAATCTCTGACGCAAGCTC	57°C
	reverse	TGTGCTGGGACTCATCTTTG	
<i>IPPK</i>	forward	GGTCGTTCAAGTACCTTTAG	57°C
	reverse	TATCCAGGTCCTGTGCACAG	
<i>CDK2</i>	forward	ATCTTTGCTGAGATGGTGACT	57°C
	reverse	CACATCCTGGAAGAAAGGGT	
<i>E2F2</i>	forward	AGGGGAATGTTTGAAGACCC	57°C
	reverse	CATAGGCCAGCCTCTTGTG	
<i>MCM2</i>	forward	TTTGCCCGCTAGCTTTCATT	57°C
	reverse	GACGAGCCTTATCCACCAAG	
<i>SMN1</i>	forward	AACATCAAGCCCAATCTGC	57°C
	reverse	TTTAGACCTGGCTTTCCTGG	
<i>HDAC1</i>	forward	GATTCAACGTTGGTGAGGAC	58°C
	reverse	ACGTAACAGAAAGCCAGATG	
<i>FUS</i>	forward	AGCCAGAAAGAGCTATGGAAC	57.5°C
	reverse	TTTGCTGCTGTCCACCATAG	
<i>GLI1</i>	forward	CTCCAGCCCTGGACCG	58°C
	reverse	AGTTGAACATGGCGTCTCAG	
<i>GLI3</i>	forward	GTCTATGGGAAGTTGCGGGA	57°C
	reverse	CTTCAGCTCTCTCGACCAA	
<i>SMO</i>	forward	AGCCTCTGGTGGAGAAGAT	57°C
	reverse	TCTTGCTCTTCTGTATCCG	
<i>HIF1A</i>	forward	TTGCATCTCCATCTCCTACC	57.5°C
	reverse	GCTTCTCTGAGCATTCTGC	
<i>STA72</i>	forward	ACATTGAGCCCTTTTCCAG	58°C
	reverse	TCCCTTTGGCGTGGATCTTA	
<i>TLR3</i>	forward	GGAAAGGCTAGCAGTCATCC	58°C
	reverse	TCCGGTACCTGAGTCAACTT	
<i>NUS1</i>	forward	CAGTTAGTAGCCCGAGAAGCA	57°C
	reverse	AGGCAAGAGACAATCTCAGT	
<i>RRAS</i>	forward	GTCTGACTACGACCCACTA	57.5°C
	reverse	GTGACTCCAGATCTGCCTTG	

Name		Nucleotide sequence	Annealing temperature
<i>COL1A1</i>	forward	CTGGCAAAGATGGACTCAAC	57.5°C
	reverse	CAGGAAGCTGAAGTCGAAAC	
<i>STAT3</i>	forward	GAACGAAGGGTACATCATGG	58°C
	reverse	GCTGCTTTGTGTATGGTTCC	
<i>FSCN1</i>	forward	GTGACCTCCAAGAAGAATGG	57°C
	reverse	CTGTGGAGTCTTTGATGTTGTAG	
<i>PLK1</i>	forward	CAAGTGGGTGGACTATTCCG	58°C
	reverse	CATCAAGGAGTTGGGATGGG	
<i>KIZ</i>	forward	GGCTCATACTCGAAACCAAG	57.5°C
	reverse	GTGCACTGCAACCTTTTCTC	
<i>XPC</i>	forward	TGATGCCATTGGCTGTGTC	58°C
	reverse	CCTGATGAGCAGACCTTTGG	
<i>ATM</i>	forward	ATTTGCTTAGCAGGAGGTG	58°C
	reverse	TGGAAGACCTGTTGCATGAC	
<i>ATR</i>	forward	TATCCCATGCGTGTGAACAG	58°C
	reverse	TGGCTAGCATGGTTAGCATG	
<i>BRCA1</i>	forward	GTCCCATCTGTCTGGAGTTG	57°C
	reverse	GCCCTTTCTTCTGGTTGAGA	
<i>XPA</i>	forward	AAGCAAAGGAAGTCCGACAG	58°C
	reverse	ATGTCAGTTCATGGCCACAC	
<i>BRCA2</i>	forward	TCCACCCCAACTAAAGACTG	57°C
	reverse	TGAGACAGGTGTGGAACACAG	
<i>FANCD2</i>	forward	TTGCTCCACATTCCCTACAC	57°C
	reverse	CAAAGAGAGCGCCATACCTTC	
<i>IFNB1</i>	forward	CACTGGCTGGAATGAGACTATT	57.5°C
	reverse	TTCTTCCAGGACTGTCTCAGATG	
<i>TLR4</i>	forward	TAAAGTTGCCGCTTTCACTT	58°C
	reverse	TTAGGAACCACTCCACGC	
<i>TRAF3</i>	forward	GCTGTCCTGACAGAAGAGAAC	58°C
	reverse	CCTCCACGGTCTTCACAAAC	
U6 snRNA	forward	GTGCTCCCTTCGGCAAGCACTTACACTAAA	55°C
	reverse	CTCAAAAAGGAATGCTTCACAAATTTGCCT	
tRNA	forward	GATGTCGTGGCCGAGTGGTTAAG	66°C
	reverse	GATGTCGGCAGGATTGGAACC	
<i>E2F8</i>	forward	CGGGGAGGAGAATAAGTACG	61°C
	reverse	CTTGCTTTGCGGCTGTTTA	

細胞周期同調と細胞周期解析

細胞周期の停止を解析するため、ダブルチミジンブロックによる細胞周期同調を行った。細胞を 15~20%コンフルエントになるよう播種し、同時にチミジンを終濃度 2mM となるよう培地に添加した。24 時間培養後、チミジンを含む培地を除去し、細胞を PBS で洗浄したのち新しい DMEM (10%FBS を含む) を添加した。更に 24 時間培養後、再びチミジンを終濃度 2mM となるよう添加した。20 時間培養後、再びチミジンを含む培地を除去し、細胞を PBS で洗浄したのち新しい DMEM (10%FBS を含む) を添加したことで、細胞周期を進めた。所定の時間経過後、細胞は 75%エタノールを用い 4°C 下に終夜静置され固定した。固定後、細胞に染色液を添加し、暗所に 30 分静置し染色体を染めた。染色液は 1 液 (100µg/ml ヨウ化プロピジウム, 0.1% Triron X100, 0.1mM

EDTA/ PBS) と 2 液 (2mg/ml RNase A/ PBS) を使用直前に等量ずつ混合して作製した。コントロール群と三因子のノックダウン群の細胞周期は、各細胞の染色体 DNA の量を Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) を用いて測定することで導き出した。

細胞周期同調処理下での siRNA 導入操作は以下の通りである。10%FBS と 2mM チミジンを添加した DMEM を 6 ウェルプレートに加え、各ウェルに 5×10^4 個ずつの細胞を播種した。24 時間培養後にチミジンを除去、細胞を洗浄し、siRNA を免疫蛍光法の項と同様の手順で導入した。更に 24 時間後、培地をチミジンが含まれるものに交換した。20 時間培養後、チミジンを含む培地を除去・洗浄し、40ng/ml のノコダゾールを含む培地に交換した。その後、細胞はノコダゾール添加の 0 から 12 時間後の所定の時点でエタノール固定した。固定後の手順は前述と同様である。

生細胞イメージング

HeLa 細胞 H2B-GFP 安定発現株は、35mm のガラスボトムディッシュ (Greiner Japan) に 5~10%コンフルエントになるよう播種した。siRNA は免疫蛍光の項と同様の手順で導入した。siRNA 導入後、細胞を 40 時間培養し、BioStation IM-Q (ニコン) にセットした後 6 分ごとにイメージを取得した。BioStation 内では 37°C 5%CO₂ 下で 16 時間培養した。

統計

対応のある両側 t 検定、もしくは one-way ANOVA とダネット検定は、R (<https://cran.r-project.org/>) を用いて行った。p 値 < 0.05 の場合を統計学的に有意差ありと判定した。

poly(I)-poly(C)二重鎖処理

poly(I)-poly(C)二重鎖 (以降、ポリ IC) は PBS で 3mg/ml に希釈した。HeLa 細胞を 3×10^5 個ずつ 10cm ディッシュに播種し、24 時間培養後に siRNA を導入した。siRNA 導入手順は免疫蛍光法の項と同様である。45 時間培養後、Lipofectamine 2000 を用いて細胞にポリ IC 希釈液を導入した。その 3 時間後に細胞を回収し、全細胞から RNA を抽出した。RNA 抽出手順については RNA 単離の項と同様である。

文献

1. Okamura M, Inose H, Masuda S. RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes*. 2015 Mar 20;6(1):124–49.
2. Inose H, Mukai K, Ito M, Masuda S. Gene Regulation through mRNA Expression. *Adv Biol Chem*. 2015 Mar 2;05(02):45.
3. Tran EJ, Zhou Y, Corbett AH, Wentz SR. The DEAD-Box Protein Dbp5 Controls mRNA Export by Triggering Specific RNA:Protein Remodeling Events. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):850–9.
4. Folkmann AW, Noble KN, Cole CN, Wentz SR. Dbp5, Gle1-IP6 and Nup159. *Nucleus*. 2011 Nov 1;2(6):540–8.
5. Cheng H, Dufu K, Lee C-S, Hsu JL, Dias A, Reed R. Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. *Cell*. 2006 Dec 29;127(7):1389–400.
6. Chi B, Wang Q, Wu G, Tan M, Wang L, Shi M, et al. Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2012 Dec 7;gks1188.
7. Viphakone N, Hautbergue GM, Walsh M, Chang C-T, Holland A, Folco EG, et al. TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export. *Nat Commun*. 2012 Aug 14;3:1006.
8. von Moeller H, Basquin C, Conti E. The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Mar;16(3):247–54.
9. Hodge CA. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J*. 1999 Oct 15;18(20):5778–88.
10. Alcázar-Román AR, Tran EJ, Guo S, Wentz SR. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat Cell Biol*. 2006 Jul;8(7):711–6.
11. Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J, Weis K. Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat Cell Biol*. 2006 Jul;8(7):668–76.
12. Montpetit B, Thomsen ND, Helmke KJ, Seeliger MA, Berger JM, Weis K. A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP₆ in

mRNA export. *Nature*. 2011 Apr;472(7342):238–42.

13. Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Panté N, Rodrigues JP, Boscheron C, et al. Dbp5, a DEAD - box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J*. 1999 Aug 2;18(15):4332–47.
14. Lin DH, Correia AR, Cai SW, Huber FM, Jette CA, Hoelz A. Structural and functional analysis of mRNA export regulation by the nuclear pore complex. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Jun 13;9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5998080/>
15. Adams RL, Mason AC, Glass L, Aditi, Wente SR. Nup42 and IP6 coordinate Gle1 stimulation of Dbp5/DDX19B for mRNA export in yeast and human cells. *Traffic*. 18(12):776–90.
16. Gross T, Siepmann A, Sturm D, Windgassen M, Scarcelli JJ, Seedorf M, et al. The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 Functions in Translation Termination. *Science*. 2007 Feb 2;315(5812):646–9.
17. Hodroj D, Recolin B, Serhal K, Martinez S, Tsanov N, Merhi RA, et al. An ATR - dependent function for the Ddx19 RNA helicase in nuclear R - loop metabolism. *EMBO J*. 2017 Mar 17;e201695131.
18. Mikhailova T, Shuvalova E, Ivanov A, Susorov D, Shuvalov A, Kolosov PM, et al. RNA helicase DDX19 stabilizes ribosomal elongation and termination complexes. *Nucleic Acids Res*. 2016 Dec 9;gkw1239.
19. Rajakylä EK, Viita T, Kyheröinen S, Huet G, Treisman R, Vartiainen MK. RNA export factor Ddx19 is required for nuclear import of the SRF coactivator MKL1. *Nat Commun*. 2015 Jan 14;6:5978.
20. Lindtner S, Zolotukhin AS, Uranishi H, Bear J, Kulkarni V, Smulevitch S, et al. RNA-binding Motif Protein 15 Binds to the RNA Transport Element RTE and Provides a Direct Link to the NXF1 Export Pathway. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36915–28.
21. Zolotukhin AS, Uranishi H, Lindtner S, Bear J, Pavlakis GN, Felber BK. Nuclear export factor RBM15 facilitates the access of DBP5 to mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2009 Nov 1;37(21):7151–62.
22. Aryanpur PP, Regan CA, Collins JM, Mittelmeier TM, Renner DM, Vergara AM, et al. Gle1 Regulates RNA Binding of the DEAD-Box Helicase Ded1 in Its

- Complex Role in Translation Initiation. *Mol Cell Biol*. 2017 Nov 1;37(21):e00139-17.
23. Bolger TA, Wente SR. Gle1 Is a Multifunctional DEAD-box Protein Regulator That Modulates Ded1 in Translation Initiation. *J Biol Chem*. 2011 Nov 18;286(46):39750–9.
 24. Kutay U, Panse VG. Gle1 Does Double Duty. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):564–6.
 25. Alcázar-Román AR, Bolger TA, Wente SR. Control of mRNA Export and Translation Termination by Inositol Hexakisphosphate Requires Specific Interaction with Gle1. *J Biol Chem*. 2010 May 28;285(22):16683–92.
 26. Kendirgi F, Barry DM, Griffis ER, Powers MA, Wente SR. An essential role for hGle1 nucleocytoplasmic shuttling in mRNA export. *J Cell Biol*. 2003 Mar 31;160(7):1029–40.
 27. Aditi, Folkmann AW, Wente SR. Cytoplasmic hGle1A regulates stress granules by modulation of translation. *Mol Biol Cell*. 2015 Apr 15;26(8):1476–90.
 28. Jao L-E, Akef A, Wente SR, Weis K. A role for Gle1, a regulator of DEAD-box RNA helicases, at centrosomes and basal bodies. *Mol Biol Cell*. 2016 Nov 9;28(1):120–7.
 29. Folkmann AW, Collier SE, Zhan X, Aditi, Ohi MD, Wente SR. Gle1 Functions during mRNA Export in an Oligomeric Complex that Is Altered in Human Disease. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):582–93.
 30. Hatch AJ, York JD. SnapShot: Inositol Phosphates. *Cell*. 2010 Dec 10;143(6):1030-1030.e1.
 31. Hanakahi LA, Bartlet-Jones M, Chappell C, Pappin D, West SC. Binding of Inositol Phosphate to DNA-PK and Stimulation of Double-Strand Break Repair. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):721–9.
 32. Ma Y, Lieber MR. Binding of Inositol Hexakisphosphate (IP6) to Ku but Not to DNA-PKcs. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):10756–9.
 33. Hanakahi LA, West SC. Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *EMBO J*. 2002 Apr 15;21(8):2038–44.
 34. Macbeth MR, Schubert HL, VanDemark AP, Lingam AT, Hill CP, Bass BL. Inositol Hexakisphosphate Is Bound in the ADAR2 Core and Required for RNA Editing. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1534–9.
 35. Sarmah B, Latimer AJ, Appel B, Wente SR. Inositol Polyphosphates Regulate

Zebrafish Left-Right Asymmetry. *Dev Cell*. 2005 Jul;9(1):133–45.

36. Herva R, Conradi NG, Kalimo H, Leisti J, Sourander P, Optiz JM, et al. A syndrome of multiple congenital contractures: Neuropathological analysis on five fetal cases. *Am J Med Genet*. 1988 Jan 1;29(1):67–76.

37. Nousiainen HO, Kestilä M, Pakkasjärvi N, Honkala H, Kuure S, Tallila J, et al. Mutations in mRNA export mediator GLE1 result in a fetal motoneuron disease. *Nat Genet*. 2008 Feb;40(2):155–7.

38. Jao L-E, Appel B, Wente SR. A zebrafish model of lethal congenital contracture syndrome 1 reveals Gle1 function in spinal neural precursor survival and motor axon arborization. *Development*. 2012 Apr 1;139(7):1316–26.

39. Seytanoglu A, Alsomali NI, Valori CF, McGown A, Kim HR, Ning K, et al. Deficiency in the mRNA export mediator Gle1 impairs Schwann cell development in the zebrafish embryo. *Neuroscience*. 2016 May 13;322:287–97.

40. Kaneb HM, Folkmann AW, Belzil VV, Jao L-E, Leblond CS, Girard SL, et al. Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2015 Mar 1;24(5):1363–73.

41. Zhang K, Liu Q, Shen D, Tai H, Fu H, Liu S, et al. Screening of GLE1 mutations in Chinese amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*. 2018 Jun 1;66:178.e9-178.e11.

42. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013 Sep 5;501(7465):45–51.

43. Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered Ribostasis: RNA-Protein Granules in Degenerative Disorders. *Cell*. 2013 Aug 15;154(4):727–36.

44. Qiu H, Lee S, Shang Y, Wang W-Y, Au KF, Kamiya S, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *J Clin Invest*. 2014 Mar 3;124(3):981–99.

45. Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee K-H, et al. GGGGCC repeat expansion in *C9orf72* compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015 Sep;525(7567):129–33.

46. Gleixner KV, Ferenc V, Peter B, Gruze A, Meyer RA, Hadzijusufovic E, et al. Polo-like Kinase 1 (Plk1) as a Novel Drug Target in Chronic Myeloid Leukemia: Overriding Imatinib Resistance with the Plk1 Inhibitor BI 2536. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1513–23.

47. Oshimori N, Ohsugi M, Yamamoto T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat Cell Biol.* 2006 Oct;8(10):1095–101.
48. Kumar A, Zhang J, Yu F-SX. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology.* 2006 Jan;117(1):11–21.
49. Sharova LV, Sharov AA, Nedorezov T, Piao Y, Shaik N, Ko MSH. Database for mRNA Half-Life of 19 977 Genes Obtained by DNA Microarray Analysis of Pluripotent and Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes.* 2009 Feb;16(1):45–58.
50. Das S, Sarkar D, Das B. The interplay between transcription and mRNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell.* 4(7):212–28.
51. Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vandenburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1205–8.
52. Wang W-Y, Pan L, Su SC, Quinn EJ, Sasaki M, Jimenez JC, et al. Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat Neurosci.* 2013 Oct;16(10):1383–91.
53. Madabhushi R, Pan L, Tsai L-H. DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration. *Neuron.* 2014 Jul 16;83(2):266–82.
54. Wijgerde M, McMahon JA, Rule M, McMahon AP. A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev.* 2002 Nov 15;16(22):2849–64.
55. Thibert C, Teillet M-A, Lapointe F, Mazelin L, Douarin NML, Mehlen P. Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. *Science.* 2003 Aug 8;301(5634):843–6.
56. Fellenberg J, Sähr H, Kunz P, Zhao Z, Liu L, Tichy D, et al. Restoration of miR-127-3p and miR-376a-3p counteracts the neoplastic phenotype of giant cell tumor of bone derived stromal cells by targeting COA1, GLE1 and PDIA6. *Cancer Lett.* 2016 Feb 1;371(1):134–41.
57. Haramati S, Chapnik E, Sztainberg Y, Eilam R, Zwang R, Gershoni N, et al. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Jul 20;107(29):13111–6.

58. Blower MD, Nachury M, Heald R, Weis K. A Rae1-Containing Ribonucleoprotein Complex Is Required for Mitotic Spindle Assembly. *Cell*. 2005 Apr 22;121(2):223–34.
59. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621–5.
60. Gürtler C, Bowie AG. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends Microbiol*. 2013 Aug;21(8):413–20.
61. Li J, Hu L, Liu Y, Huang L, Mu Y, Cai X, et al. DDX19A Senses Viral RNA and Mediates NLRP3-Dependent Inflammasome Activation. *J Immunol*. 2015 Nov 4;1501606.
62. Lai M-C, Sun HS, Wang S-W, Tarn W-Y. DDX3 functions in antiviral innate immunity through translational control of PACT. *FEBS J*. 2016;283(1):88–101.
63. Yamazaki T, Fujiwara N, Yukinaga H, Ebisuya M, Shiki T, Kurihara T, et al. The Closely Related RNA helicases, UAP56 and URH49, Preferentially Form Distinct mRNA Export Machineries and Coordinately Regulate Mitotic Progression. *Mol Biol Cell*. 2010 Aug 15;21(16):2953–65.

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、ご指導していただいた京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻、分子応答機構学分野の増田誠司准教授に深く感謝いたします。また、研究について様々なサポートをいただきました京都大学大学院生命科学研究科、生体情報応答学分野の永尾雅哉教授、神戸大朋准教授に厚く御礼申し上げます。研究遂行にあたり副指導教員として様々な助言をいただきました加藤博己准教授、原田慶恵教授（現大阪大学）にも深く感謝いたします。

三重大学生命科学研究支援センターの小林裕子博士・小林一成博士には、マイクロアレイデータの取得・解析についてご協力とご助言をいただきました。京都大学大学院医学研究科の松本智裕教授には、細胞周期の解析に必須であったプラスミドをご供与いただきました。Robin Reed 博士には DBP5 抗血清をご供与いただきました。誠にありがとうございます。

本研究遂行のために、様々なご助言や有意義な議論をしていただきました京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学の皆様に深く感謝申し上げます。特に山中靖貴さん、重本真紀さん、北谷優弥さんは多くの実験にご協力いただきました。皆様のご協力なしにこの論文は完成しませんでした。本研究の先駆けとなる解析を一部実施してくださった志岐拓哉氏にも深く感謝いたします。また、事務面で大変御世話になりました嶋林かほる氏、清水久美子氏に厚く御礼申し上げます。最後に、これまで支援してくれた家族・友人の皆に心より感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Masumi Okamura, Yasutaka Yamanaka, Maki Shigemoto, Yuya Kitadani, Yuhko Kobayashi, Taiho Kambe, Masaya Nagao, Issei Kobayashi, Katsuzumi Okumura, Seiji Masuda

Depletion of mRNA export regulator DBP5/DDX19, GLE1 or IPPK that is a key enzyme for the production of IP6, resulting in differentially altered cytoplasmic mRNA expression and specific cell defect

PLoS ONE (2018) 13(5): e0197165.

2018 年 11 月 19 日

岡村真純