



# 熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析

山本, 耕一

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2016-09-09

(Date of Publication)

2018-09-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3316号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003316>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析

平成 28 年 7 月

神戸大学大学院理学研究科

山本 耕一

# 目次

## 第1章 序論

1.1 はじめに	1
1.2 スプライシング反応とエキソン認識	1
1.3 選択的スプライシング	2
1.4 選択的スプライシングとスプライシング因子	4
1.5 選択的スプライシングの制御	5
1.6 熱ストレスと選択的スプライシング	5
1.7 hsp105 遺伝子の熱ストレス下における選択的スプライシング	7
1.8 本研究の目的及び概要	8

## 第2章 材料と方法

## 第3章 結果

3.1 HEK293 細胞を用いた試験系の構築	13
3.1.1 HEK293 細胞を用いた熱ストレス応答再現性の確認	13
3.1.2 RNAi による hnRNPK 遺伝子のノックダウン	13
3.2 Human Transcriptome Array 2.0 (HTA2.0) を用いた解析	14
3.2.1 アレイ解析の流れ	14
3.2.2 熱ストレスによる選択的スプライシングの変化	15
3.2.2.1 イントロンリテンションの変化が認められる遺伝子	16
3.2.2.2 その他様式の選択的スプライシングの変化が認められる遺伝子	18
3.2.2.3 遺伝子群の GO 解析	19
3.2.2.4 HTA2.0 結果の確認	24
3.2.3 hnRNPK が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析	25
3.2.3.1 遺伝子群の GO 解析 (hnRNPK)	27
3.2.3.2 RT-PCR によるマイクロアレイ解析結果の再現性確認	32
3.2.4 PSF が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析	34
3.2.4.1 遺伝子群の GO 解析 (PSF)	36
3.3 熱ストレス依存的な選択的スプライシングに関与するその他の因子	38
3.3.1 SRp38 RNAi を用いた熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析	38
3.3.2 遺伝子群の GO 解析 (SRp38)	41

## 第4章 纏め及び考察

4.1 熱ストレス応答性の選択的スプライシング	45
4.2 hnRNPK 及び PSF の関与	47
4.3 SRp38 の関与	49
4.4 hnRNPK 及び SRp38 による選択的スプライシング制御	50
4.5 熱ストレス応答性の選択的スプライシングによる遺伝子発現制御	52

## 謝辞

## 参考文献

## 第1章 序論

### 1.1 はじめに

真核生物の遺伝子の多くは、イントロンと呼ばれる介在配列により分断された状態で存在している。その為、これらの遺伝子の発現過程では RNA ポリメラーゼ II により pre-mRNA が転写された後、不要なイントロンを適切に取り除き遺伝情報をコードするエキソンのみを繋ぎ合わせる必要がある。この過程はスプライシングと呼ばれ、正常な遺伝子発現において重要な役割を担う。さらに、スプライシングの際にスプライシングのパターンを変化させ、単一の遺伝子から複数種の mRNA が生成される選択的スプライシングと呼ばれる機構が知られている。この機構により、ヒトではおよそ 2 万 2 千という限られた数の遺伝子から、10 万種類以上のタンパク質を生み出す事が可能となっている。実際、近年のトランスクリプトーム解析から、ヒトでは約 90% の遺伝子が何らかの選択的スプライシングを受ける可能性が示唆されている[1, 2]。

このような選択的スプライシングは、無秩序に行われているのではなく、発生段階、組織及び細胞を取り巻く外部環境等に応じて高度に制御されている。多くの研究者がこれら選択的スプライシング制御機構及びそれにより決定される遺伝子発現制御の解明に取り組んでいるが、その全体像の解明には至っておらず未知な点が多く残されている。

### 1.2 スプライシング反応とエキソン認識

スプライシングは pre-mRNA 上に散在するエキソンを結合させる必要があるが、例えばヒト遺伝子のイントロン平均長およそ 3365 塩基に対してエキソン平均長はおよそ 145 塩基であり[3]、その反応においてはイントロンによって分断されたエキソンを正しく認識することが重要となる。このエキソン認識は pre-mRNA 上の配列とそれらを認識する因子により行われていることが知られている。

エキソンとイントロンの境界部位は、スプライスサイトと呼ばれる。多くのイントロンの 5' 側は GT で始まり 3' 側は AG で終わっており、これは生物種を超えて高度に保存されている。また 3' スプライスサイト上流には、ポリピリミジントラクト及びブランチサイトと呼ばれる配列が存在する。スプライシング反応は 2 回のエステル転移反応からなり、第一段階として 5' スプライスサイトでの切断されたイントロンの 5' 末端のグアノシン残基がブランチサイトのアデ

ノシン残基と結合し、第二段階としてイントロンが切り出されるとともに前後のエキシンの再結合が行われ反応が完結する。

このスプライシング反応は、スプライソソームと呼ばれるタンパク質-RNA複合体により触媒される。スプライソソームは、U1、U2、U4、U5及びU6と呼ばれる5つの核内低分子リボ核タンパク質 (snRNP : small nuclear ribonucleoprotein particle) とおよそ200のタンパク質で構成されていると考えられている[4, 5]。スプライシング反応の過程では、まずU1snRNPにより5'スプライスサイトが認識され、ブランチサイトにSF1 (splicing factor1)、ポリピリミジントラクトと3'スプライスサイトにU2AF (U2 auxiliary factor) が結合する (E複合体)。次いでU2snRNPがATP依存的にリクルートされ、SF1と入れ替わってブランチサイトに結合する (A複合体)。これら一連の過程でU1及びU2snRNPによりエキソン認識が行われた後、U5、U4/U6がリクルートされる (B複合体)。続いてU1及びU4snRNPが解離し (複合体C)、イントロンの除去と前後のエキシンの再結合が行われる (図1) [6]。

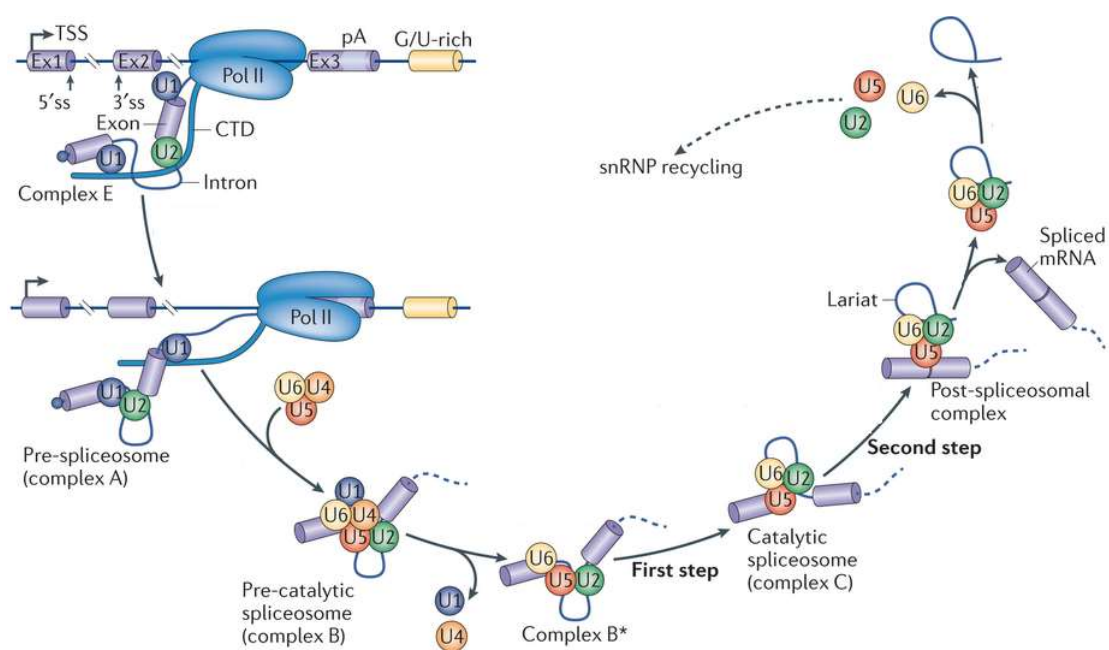


図1 RNA スプライシング反応の流れ (文献[6]より一部改変し引用)

### 1.3 選択的スプライシング

1種類の遺伝子から一定のスプライシング様式により1種類のmRNAが生成されるスプライシング (恒常的スプライシング) に対して、1種類の遺伝子が

ら異なるスプライシング様式により複数種類の mRNA アイソフォームを生成するスプライシングは選択的スプライシングと呼ばれる。冒頭で述べたとおり、ヒトでは全遺伝子のおよそ 90%が何らかの選択的スプライシングを受けることが知られており、およそ 2 万 2 千の遺伝子から 10 万種類以上ものタンパク質を生み出している。これら選択的スプライシングから生じた遺伝的な多様性は、進化の過程におけるより高次の生命機能の獲得や環境への適応の大きな原動力になったと考えられる。

これら選択的スプライシングには図 2 に示すような 7 つのパターンが想定される。これら選択的スプライシングによって生じる mRNA のアイソフォームの大部分は、複数あるエクソンのどの 5'及び 3'スプライスサイトが U1 及び U2snRNP それぞれによって選択されるかによって決定されている。

このスプライスサイトの認識は、U1 及び U2snRNP のスプライスサイトへの結合の強弱に加え、エクソン及びイントロン内に存在するスプライシングを促進または抑制する塩基配列によって影響をうけることが知られている。エクソン内に存在しスプライシングを促進する塩基配列は ESE (Exonic Splicing Enhancer)、抑制する塩基配列は ESS (Exonic Splicing Silencer)、またイントロンに存在してスプライシングを促進する塩基配列は ISE (Intronic Splicing Enhancer)、抑制する塩基配列は ISS (Intronic Splicing Silencer) とそれぞれ呼ばれる。これらの塩基配列を特異的に認識し結合するスプライシング因子が U1 及び U2snRNP の各スプライスサイトへの結合を促進または阻害することにより、エクソンの選択を制御している [7]。

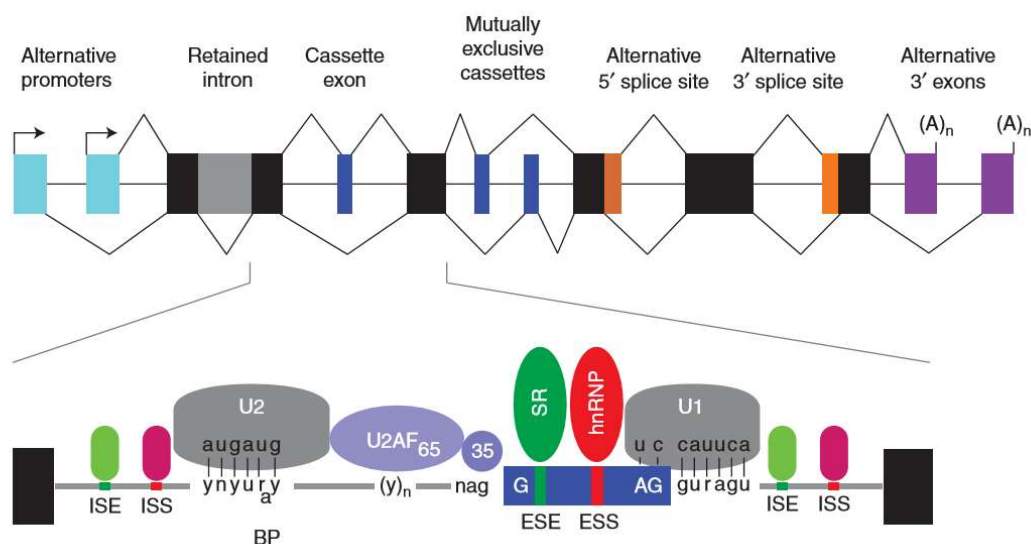


図 2 選択的スプライシングの種類 (文献[7]より引用)

また、近年の研究により、上記のような要因の他にも、例えば RNA の二次構造[8, 9, 10]や転写との共役[11, 12]、クロマチン構造[13, 14]など、多くの要因が選択的スプライシングに影響を与えることが確認されている。

#### 1.4 選択的スプライシングとスプライシング因子

このように、選択的スプライシングに関与するスプライシング因子については多くの研究がなされており、その中でも代表的な因子として SR タンパク質及び hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) タンパク質がよく知られている。

SR タンパク質は N 末端側に RNA 認識モチーフ (RRM : RNA recognition motif) を持ち、RS ドメインと呼ばれる C 末端側にアルギニン残基とセリン残基を豊富に含む部位を持つ特徴的な構造をしており、一部の SR タンパク質は元来恒常的スプライシングにも必須の因子である[15, 16]。ESE の多くはプリン残基に富んだ特徴的な配列を持っており、SR タンパク質は RRM を介して ESE に結合、同時に RS ドメインを介して U2AF または U1snRNP、さらに他のスプライシング因子とスプライスサイト近傍で相互作用することで、選択的スプライシングにおいて当該エキソンの取り込みを促進、スプライスサイトの選択を調整することが知られている (図 3) [17]。

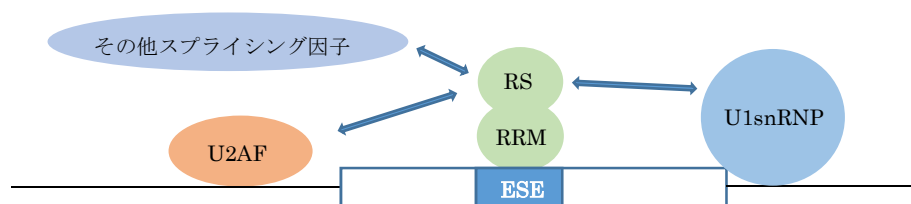


図 3 SR タンパク質と ESE 及び他のスプライシング因子との相互作用モデル

hnRNP タンパク質は、RRM、KH ドメイン(hnRNPK homology domain)、RGG box (arginine/glycine rich box) を 1 つないし複数持つタンパク質であり、hnRNPA1 から hnRNPU までの存在が知られている[18]。これらのタンパク質は翻訳及び mRNA 安定性等多様な機能を持つことが確認されているが、選択的スプライシングにおいてはサイレンサー配列に結合することでスプライシングを負に制御することが知られており、抑制性のスプライシング因子として考え



られている。その代表的な例として hnRNPI (別称 PTB: poly pyrimidine binding protein) が挙げられる。本タンパク質は 4 つの RRM を持つ RNA 結合タンパク質であり、RRM2 が PTB 同士の相互作用に、RRM3 が RNA 結合に、そして RRM4 がスプライシング制御に必要な領域であることが報告されている。CU に富んだ配列に特異的に結合し、PTB 間の結合や多量化などを通して多くの遺伝子において選択的スプライシングの抑制に働いていると考えられている [19, 20, 21]。

### 1.5 選択的スプライシングの制御

上記のように選択的スプライシングにはさまざまな因子が関与しているが、これらは特定の因子の存在や細胞がおかれた状況に応じて高度に制御されていることが明らかとなってきた。

発現する組織、細胞において特異的な選択的スプライシング制御に重要な役割を持つスプライシング因子の例として、神経系に発現する Nova タンパク質が良く知られている。このタンパク質は多くの神経関連遺伝子の選択的スプライシングを制御していることが分かっており、その制御においてサイレンサーとしてもエンハンサーとしても働いている。選択的エキソンの上流イントロンに結合した場合、U1snRNP のスプライスサイトへの結合を阻害し、エキソンインクルージョンを抑制する。一方、選択的エキソンもしくはエキソンの下流イントロンの結合した場合は、エキソンインクルージョンを促進する [22]。

また、状況に応じた選択的スプライシング制御としては、細胞を取り巻く外部環境 (温度、pH、栄養状態、紫外線や薬剤への暴露等) 変化に応じて、選択的スプライシングの様子が制御されることによって遺伝子発現の調整が行われることが知られている [23]。例えば、飢餓状態にある細胞では、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) のエキソン 12 に存在する ESS への hnRNPK の結合が増加することにより、スプライシングが抑制され、結果として G6PD の発現量が調整されることが報告されている [24]。

### 1.6 熱ストレスと選択的スプライシング

前述のとおり、近年の研究から選択的スプライシングの制御について関与するスプライシング因子とともに理解が進んできているが、スプライシング制御機構及びそれにより決定される遺伝子発現制御については依然として未解明なことが数多く残されている。

熱ストレス下では細胞は異常なタンパク質の生成を防ぐため、転写やスプラ

イシング、翻訳などの反応を抑制することが知られている[25]。熱ストレス下で起こるスプライシングの抑制機構の一つとして、SRタンパク質の一つであるSRp38 (SRSF10) が関与する機構が知られている[26]。SRp38 は通常の温度条件ではリン酸化による修飾を受けた状態で存在しているが、熱ストレスを受けると、脱リン酸化酵素 PP1 (Protein phosphatase 1) の働きにより SRp38 は脱リン酸化され、U1snRNP と結合する。SRp38 と結合した U1snRNP は 5' スプライスサイトの認識が阻害され、その結果スプライシングが抑制される(図4)[27]。一方で通常の温度条件では PP1 は PP1 抑制因子である NIPP (Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1) と結合しており働きが抑えられているため、SRp38 の脱リン酸化は起こらず、スプライシングは抑制されない。このような機構でスプライシング反応を全体的に抑制することで、その他の制御機構と協働して熱ストレス下における不要なタンパク質生産を抑制する仕組みが提唱されている。

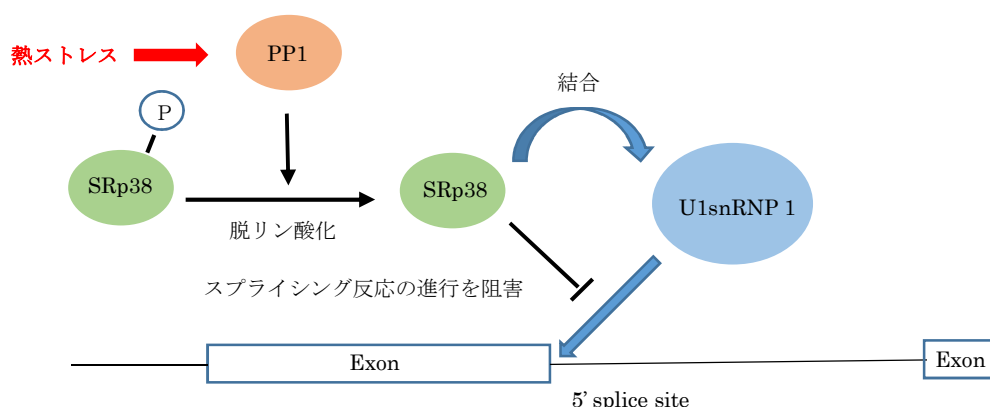


図4 SRp38 による熱ストレス下におけるスプライシング抑制モデル

一方で熱ストレス下においても遺伝子発現の抑制を受けず、正常に発現する遺伝子が存在する。代表的な例として、Heat Shock Protein (hsp) 遺伝子は熱ストレス下でも正常に発現し、さらに発現が上昇することが知られている[28]。hsp 遺伝子の転写因子の一つである heat-shock factor 1(HSF1)は通常は細胞質で不活性な状態で存在しているが、熱ストレス下では活性化し核内へ移行する。核内へ移行した HSF1 は hsp 遺伝子のプロモーター領域に存在する heat-shock element(HSE)に結合し hsp 遺伝子の転写を活性化する。HSP タンパク質はストレス条件下で変性したタンパク質の凝集抑制やリフォールディングを促進する機能が知られており、タンパク質の生産が停止している間に熱ストレスにより凝集や変性したタンパク質に作用することで、細胞を守る働きをしていると考えられている[28]。

これら HSP タンパク質は、SRp38 によるスプライシング抑制下においても発現量を増加することが出来るが、多くの hsp 遺伝子がイントロンを持たないことが理由の一つとして考えられてきた。

しかし、近年の研究によりマウスやヒトにおいて hsp47 遺伝子や hsp105 遺伝子のように熱ストレス下において特異的な選択的スプライシングが誘導される遺伝子の存在が報告されている[29, 30]。このような知見は、SRp38 によるスプライシング抑制とは別の熱ストレス下におけるスプライシング制御機構及び遺伝子発現制御ネットワークの存在を示唆していると考えられるが、これらに対する研究は未だ進んでいない。

### 1.7 hsp105 遺伝子の熱ストレス下における選択的スプライシング

HSP105 とは、熱ショックタンパク質の一種であり、多くの臓器において発現が確認されている[30,31]。hsp105 遺伝子は 18 のエキソンと 17 のイントロンから構成される遺伝子であり、熱ストレス下ではエキソン 12 のスキップが起こることが知られている[32, 33]。恒常的に発現しているエキソン 12 を含むアイソフォーム (HSP105 $\alpha$ ) は細胞質に局在し、熱ストレス下で特異的に発現するエキソン 12 をスキップしたアイソフォーム (HSP105 $\beta$ ) は核に局在する。これは、hsp105 遺伝子には nuclear localization signal (NLS) と nuclear export signal (NES) が存在し、それら活性の優劣で局在が決定されることによる。HSP105 $\alpha$  は NLS 抑制配列 (エキソン 12 にコードされる配列) の影響で NLS の活性が低下し、結果として NES の活性が強くなり細胞質に局在する。一方で HSP105 $\beta$  は NLS 抑制配列を持たないため、NLS の活性は抑制されず、さらに HSP105 タンパク質の N 末端領域と C 末端領域に存在する NES 抑制配列の影響を受けることで、NLS の活性の方が NES の活性よりも強くなり核に局在する[34, 35]。HSP105 $\beta$  は核内で hsp70 遺伝子の発現促進に働くことが知られている。HSP70 はタンパク質の凝集阻止や変性の抑制などに関与する分子シャペロンの一つであり、ストレス下において細胞を守る重要な働きをしている。HSP105 は HSP70 と複合体を形成し互いの機能を制御することも示唆されており、HSP105 は HSP70 とともに熱ストレスから細胞を守る重要な機能を持つと考えられる[36]。

hsp105 遺伝子の熱ストレス特異的なスプライシングの制御機構は長らく不明なままであったが、井上研究室における最近の研究から、本熱特異的なスプライシングは hnRNPK 依存的にエキソン 12 中に存在するシスエレメントとの相互作用により制御されていること、またこの制御には PFS (PTB-associated splicing factor / SFPQ) が補佐的に関与していることが明らかとなっている[37]。

## 1.8 本研究の目的及び概要

これまでに述べたとおり、選択的スプライシングの制御は細胞の熱ストレス応答において重要な働きを担っており、これらの制御について SRp38 を介した全体的なスプライシング抑制のモデルが広く知られている。しかし、一部の遺伝子における知見から本制御機構以外に熱ストレス応答において多様な選択的スプライシング制御が行われている可能性が示唆されているが、これら制御の全体像は依然不明である。そこで本研究では、hsp105 遺伝子の制御で中心的な役割を果たしていると考えられる hnRNPK 及び PSF (SFPQ) に着目し、これらスプライシング因子により熱ストレス下で選択的スプライシングが制御される遺伝子群を明らかにすることにより、熱ストレス応答における選択的スプライシング制御の全体像について理解を深めることを目的とした。

本目的のため、ヒト胎児腎由来細胞 (HEK293 細胞) と siRNA を用いた実験系を構築し、hnRNPK 及び PSF (SFPQ) をノックダウンした時の熱ストレス応答性の選択的スプライシングに与える影響について、マイクロアレイを用いた網羅的な解析を試みた。マイクロアレイには、従来のエクソンアレイと異なり、コード転写産物のエクソンに加え、エクソン間のスプライス接合部、非コード転写産物までの広範囲な領域をカバーし、今回のような網羅的な解析に適したマイクロアレイと考えられる Human Transcriptome Array 2.0 (HTA2.0) (Affymetrix 社) を使用した。また、今回の検討では hnRNPK 及び PSF (SFPQ) に加え、SRp38 (SRSF10) についても同様の検討を行った。さらに、本解析結果から、これらスプライシング因子によって熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されることが示唆された遺伝子群について、遺伝子オントロジー (GO: Gene Ontology) 解析を行い、それぞれ抽出された遺伝子群について生物学的な機能に特徴が認められるかについても検討を行った。

## 第2章 材料と方法

<siRNA を用いた遺伝子ノックダウン>

### 培養細胞の取り扱い

HEK293 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地を用い 37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養を行い、80~100% コンフルエントで継代を繰り返し試験に使用した。

### siRNA

本試験で使用した siRNA のうち、hnRNPK 及び PSF を標的遺伝子とする siRNA はタカラバイオ株式会社で合成を実施したものを使用し、SRp38 を標的遺伝子とする siRNA、並びに陰性対象は Dharmacon 社 (GE healthcare 社) 製のデザイン済み siRNA を使用した。各 siRNA の情報を以下に示す。

- ・ 標的遺伝子 : hnRNPK

sense: GGAAGUGACUUUGACUGCGAGUUGA

antisense: UCAACUCGCAGUCAAGUCACUUC

- ・ 標的遺伝子 : PSF

sense: CAGUCAUUGUGGAACCACUUGAACA,

antisense: UGUUCAAGUGGUUCCACAAUGACUG

- ・ 標的遺伝子 : SRp38

Dharmacon 社製 siRNA 型番 : MQ-190401-00-0002

- ・ 陰性対象

Dharmacon 社製 Non-Targeting siRNA 型番 : #D-001210-02-05

### siRNA トランスフェクション

培養細胞への siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific 社) を用いたリポフェクション法により、製造元推奨のプロトコルに準じて実施した。80~100%コンフルエントの細胞を培養容器から剥離し、新鮮な培地を用いて  $1 \times 10^5$  cells/mL の濃度となるよう細胞懸濁液を調製した。別途、siRNA (40 pmol 相当)、OPTI-MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) 250  $\mu$ l、Lipofectamine RNAiMAX 1.25  $\mu$ l を混ぜ室温にて 20 分間放置した後、上記細胞懸濁液と混合し、6 穴プレートにそれぞれ播種した。播

種後 37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気下で、およそ 72 時間培養を行い、標的遺伝子のノックダウンを行った。

熱ストレスの解析に使用する場合は、72 時間の培養後、6 穴プレート を 42°C、5%CO<sub>2</sub> 条件に設定した炭酸ガスインキュベータに移し、さらに 1 時間もしくは 3 時間培養を継続した。

### Total RNA の抽出

培養細胞からの total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン社) を使用し、製造元推奨のプロトコルに準じて実施した。得られた total RNA は RNase Free Water (Thermo Fisher Scientific 社) に溶解し、NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて吸光度の測定を行った。

マイクロアレイ解析に使用する RNA は、ゲノム DNA の混入を避けるため、RNase free DNaseI (タカラバイオ社) を添加し、37°C、15 分間の処理を行った後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール及びクロロホルムを用いて除タンパク処理を実施、エタノール沈殿及び 70%エタノール洗浄を行った後、再度 RNase Free Water に溶解し検体とした。

### siRNA による標的遺伝子のノックダウン効率の確認

siRNA による標的遺伝子のノックダウン効率を、定量 PCR を用いて確認した。Total RNA 0.15 µg に対して、各標的遺伝子に対応するプライマー及びプローブ及び TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) を使用して RT-PCR 反応を行った。本定量 PCR には、Applied Biosystems QuantStudio™ 12K (Applied Biosystems 社) を使用した。各標的遺伝子に対応するプライマー及びプローブを以下に示す。また、補正のためのコントロールとして GAPDH に対するプライマー及びプローブキット (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した。

#### ・ 標的遺伝子 : hnRNPK

Forward primer: GCCCCGAGCGCATATTG

Reverse primer: TTCCAAGGTAGGGATGATTTTCTT

Probe: FAM-CTGATATTGAAACAATTGGAGAA-MGB

#### ・ 標的遺伝子 : PSF

Forward primer: TGCCATTCATGCTTCTATGCA

Reverse primer: GCCTAGACACTCTCATGCTTTCAA

Probe: FAM-ATTAGGCTACGTATTCCAC-MGB

・ 標的遺伝子 : SRp38

Forward primer: GGATGAGAGATTAAACGTACTCGAAGAT

Reverse primer: GATTTGGAAAGCCATGCTTAGAG

Probe: FAM-TATGGTTGTGTGGCTCAGA-MGB

### マイクロアレイ解析

Affymetrix 社 (Thermo Fisher Scientific 社) 製の Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) を使用して解析を行った。Total RNA を調製後、タカラバイオ株式会社に検体を送付、解析を委託した。タカラバイオ社での解析は、Affymetrix 社の標準的なプロトコルに従い実施した。以下、解析の概略を記載する。検体の RNA は解析可能か否かについて、吸光度測定及びマイクロチップ電気泳動法により検定を行った後、100 ng の検体を使用し GeneChip WT PLUS Reagent kit (Affymetrix 社) を用いて cDNA 合成が実施された。次に GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix 社) を使用しフラグメンテーション及びアレイへのハイブリダイゼーションが実施され、染色及び脱染を行った後、GeneChip 専用スキャナーを用いてアレイ画像が取得された。次に、Affymetrix GeneChip Command Console Software を使用し、ARR ファイル及びアレイ画像データを数値化した Raw データ (CEL ファイル) が取得された。

得られた Raw データについて、Affymetrix Expression Console Software ver.1.4 を用いて正規化処理によるノーマライズを行い CHP ファイルとして出力した。なお、解析パラメータはデフォルト値 (STT-Alt Splice Analysis) を使用した。CHP ファイルについて、Affymetrix Transcriptome Analysis Console Software ver.3.0 を用いて解析を実施した。解析は Alternative Splicing Analysis (解析パラメータはデフォルト値) を使用し、スプライシング状態の比較は Splicing Index を用いて実施した。

なお、シグナル値の違いについて統計的な優位差を判断するため、同 Software により同時に一元配置分散分析 (unpaired ANOVA) による解析を実施、 $p$  値が 0.05 未満のデータを採用した。

### 遺伝子オントロジー (GO: Gene Ontology) 解析

遺伝子オントロジー解析 (GO 解析) は、Gene Ontology Consortium により提供されている解析ツール (<http://geneontology.org/>) を使用し、遺伝子群の生物学的過程 (Biological process) について解析を実施した ( $p$  値 $<0.05$ )。

## RT-PCRによるスプライシングの確認

培養細胞から ISOGEN を用いて回収した total RNA 0.4 µg を使用し、Takara AMV RT-PCR kit (タカラバイオ社) を用い、製造元推奨のプロトコルに準じて RT-PCR を行った。RT 反応はプライマーとして oligo dT を用いて 42°C で 30 分間、PCR 反応は以下に示すプライマーを使用し、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分間の反応を 35 サイクル行った。PCR 産物は、2%アガロースゲルもしくは 6%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動と EtBr 染色、または Agilent 2100 バイオアナライザ (アジレントテクノロジー社) を用いて確認を行った。

hsp105 遺伝子

Fw: CGGAATTCATGTTTCTGCACAGAAAGATGG

Rev: CGGGATCCTTTTGGGCTTTTTAGCTTCTGG

PPP1CB 遺伝子

Fw: CAGAAGTTCGAGGCTTATGTATCAA

Rev: TCCTCTGTCCACATAATCTCCTAAG

SRSF11 遺伝子

Fw: AGGTAATCCAGGTGACTAATGTCTC

Rev: AGACAAAGCTTTAGCTTCATCAGG

ZDHHC20 遺伝子

Fw: AACTGACAGATACACGTGCAAAATTC,

Rev: ATTTCTTTTCATCACCAAAGACTTG

TRNC6A 遺伝子

Fw: CGGGATCCGAATGTTACAAGACAAACGAAT

Rev: CCCTCGAGTTGTGCTGCTGTGTTTCCA



## 第3章 結果

### 3.1 HEK293 細胞を用いた試験系の構築

#### 3.1.1 HEK293 細胞を用いた熱ストレス応答再現性の確認

hsp105 遺伝子は、熱ストレスに応答しエクソン 12 の選択的スプライシングが誘導され、エクソン 12 を持たないアイソフォームが産生されることが知られている。また、HeLa 細胞に 42°C で熱ストレスを与えると、30 分でエクソン 12 をスキップしたスプライシング産物が確認され、2 時間で同アイソフォームの増加が止まり飽和となることが確認されている [38]。本研究では、実験施設における利便性を考慮し HEK293 細胞の使用を計画したことから、まず本細胞株においても同様に選択的スプライシングが熱ストレスにより誘導されるかを検証した。42°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 0、1 及び 3 時間の熱ストレスを与えた HEK293 細胞から RNA 抽出し、hsp105 遺伝子特異的なプライマーで RNA 産物を検出した。その結果、熱ストレスを与えていない状態ではエクソン 11、12、13 を連結するスプライシング産物が得られ、熱ストレスを与えて 1 時間及び 3 時間経過した細胞ではエクソン 12 をスキップしたスプライシング産物を認め、その量は同程度であった (図 5)。本結果から、以降の試験における熱ストレス処理時間を 1~3 時間の間で制御することとした。

#### 3.1.2 RNAi による hnRNPK 遺伝子のノックダウン

RNAi (RNA interference) は、siRNA (short interfering RNA) と呼ばれる 21~23 塩基長の二本鎖 RNA によって、配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象であり、同現象が線虫にて発見されて以降、哺乳類細胞でも同様の現象が起こることが確認され、現在幅広く遺伝子機能の解析に幅広く使用されている [39,40]。今回、hnRNPK が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析を行うため、これまでの検討と同様に siRNA を用いた hnRNPK ノックダウンの手法が HEK293 細胞でも同様に適用可能かを検証した。siRNA をトランスフェクション後、3 日間培養を行った細胞から RNA を回収し、Oligo dT 及び hnRNPK 遺伝子特異的なプローブ、プライマーを用いて RT-qPCR 法により hnRNPK 遺伝子の mRNA の定量を行った。結果、siRNA をトランスフェクションした細胞では、hnRNPK の発現量は通常に比べ 5%以下のレベルまで低下していることを確認した。

次に、siRNA をトランスフェクションした細胞に 42°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 3 時間の熱ストレスを与えた後全 RNA 抽出し、Oligo dT を用いて逆転写を行った後、hsp105 遺伝子特異的なプライマーで RNA 産物を検出した。その結果、

これまでの研究結果と同様、hnRNPK をノックダウンした細胞ではエクソン 12 をスキップしたスプライシング産物の量が著しく減少していることを確認した (図 5)。

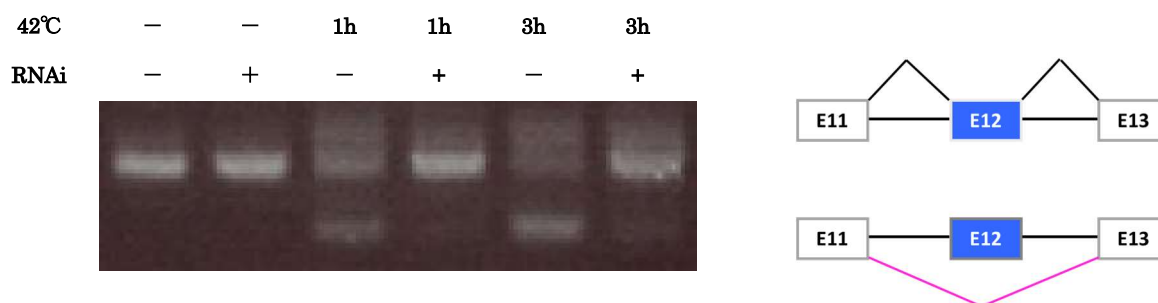


図 5 HEK293 細胞における hsp105 遺伝子の選択的スプライシングの様子

熱ストレス条件の違い (0 時間、1 時間、3 時間) 及び hnRNPK に対する RNAi の有無の各条件における HEK293 細胞から抽出した全 RNA について RT-PCR により hsp105 遺伝子の選択的スプライシングを確認した結果。塩基長が長い泳動帯はエクソン 12 を含む遺伝子を短い泳動帯はエクソン 12 を含まない遺伝子が検出されていること示す。

## 3.2 Human Transcriptome Array 2.0 (HTA2.0) を用いた解析

### 3.2.1 アレイ解析の流れ

熱ストレス下における選択的スプライシング制御の様子を網羅的に解析するため、Affymetrix 社の HTA2.0 を使用した。本アレイの基本的な解析フローを図 6 に示す。

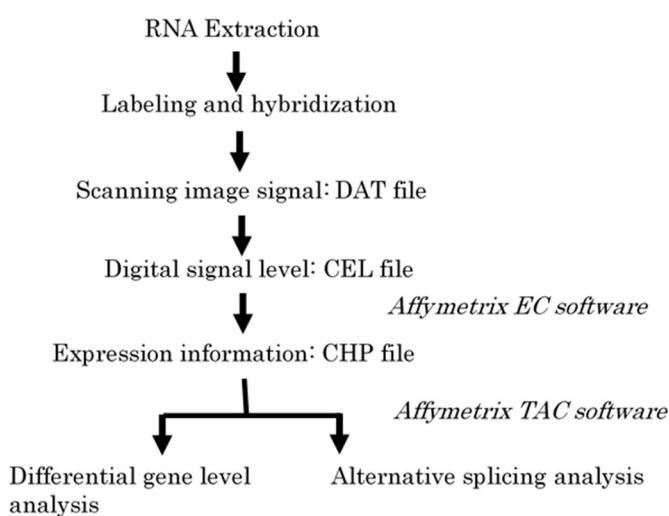


図 6 HTA2.0 を使用したアレイ解析の流れ

### 3.2.2 熱ストレスによる選択的スプライシングの変化

HEK293 細胞において、42°C 3 時間の熱ストレス条件下で hsp105 遺伝子に HeLa 細胞と同様エクソン 12 をスキップする選択的スプライシングが生じることが確認できたことから、次に同条件における細胞内の選択的スプライシングの状態変化について HTA2.0 を用いた網羅的な解析を実施した。

通常の培養温度である 37°C で培養した非ストレス条件における細胞と熱ストレス条件として 42°C で 3 時間培養した細胞から、それぞれ全 RNA を抽出し、それらを検体として HTA2.0 を用いた解析に供した。なお、本試験は続く siRNA を用いた実験の陰性対象とすることを想定し、ターゲットを持たない siRNA をトランスフェクションした細胞を使用し、それぞれの条件について 3 回独立して調製した検体を使用した。HTA2.0 を用いた解析は図 6 (3.2.1 項) に示す流れで行い、それぞれの検体から取得されたアレイの生データ (CEL ファイル) に対して正規化処理を行いデータ間のバイアスを補正し CHP ファイルを作成した。CHP ファイルは Affymetrix Transcriptome Analysis Console Software (TAC) を用いて解析を行い、遺伝子発現とそれぞれの遺伝子における選択的スプライシングの状態の違いを調査した。

選択的スプライシングの状態変化の把握には、Splicing Index (SI) を用いた。SI は、以下の計算式に示すとおり、各エクソンもしくはエクソン接合部について得られたシグナル値を各遺伝子の発現量でノーマライズ後、各条件間において比較した値である。なお、本値の TAC による出力は、1 以上の場合には正の数で、1 未満の場合はその逆数が負の数となる。

$$\text{Splicing Index} = \frac{\left[ \frac{\text{条件 1 における Exon1 signal intensity}}{\text{条件 1 における遺伝子 A の発現量}} \right]}{\left[ \frac{\text{条件 2 における Exon1 signal intensity}}{\text{条件 2 における遺伝子 A の発現量}} \right]}$$

また、各エクソンまたはエクソン接合部におけるシグナル値の差異について統計的な優位差を判断するため、一元配置分散分析 (unpaired ANOVA) により  $p$  値を算出した。今回の試験では、SI が 2 より大きいまたは -2 未満であり、且つそれらの  $p$  値が 0.05 未満の場合においてスプライシング状態が変化していると判断した。さらに、選択的スプライシング状態の変化の分類には、TAC に備わっている選択的スプライシング様式の推定ツール (Splicing Event Estimate) を使用した。

結果、HEK293 細胞に 42°C 3 時間の熱ストレスを与えることにより、検出

された遺伝子のうち判断条件を満たすエクソンもしくはエクソン接合部位 (PSR/Junction ID) が 4630 遺伝子に存在し、これら遺伝子において選択的スプライシングの状態が変化していると推定された。なお、今回のデータ解析においては、データのばらつきによる誤差を最小化することを目的として、シグナル強度 5 未満または 3 検体のシグナル強度の変動係数が 25%を超えるものは削除して解析を実施した。

熱ストレス下では一般的な遺伝子ではスプライシングの抑制が起こり、遺伝子発現が抑制されると考えられている[27]。そこで、今回の熱ストレス条件においても同様の変化が起こっているかどうかを確認するため、抽出された 4630 遺伝子の選択的スプライシング様式について TAC により推定された Splicing Event Estimate を元に分類を行った (表 1)。結果、スプライシングの抑制において生じると考えられるイントロンリテンション (Intron Retention) が生じていると推定された遺伝子は 4630 遺伝子中 434 遺伝子であった。一方、エクソンインクルージョン及びエクソンスキップ (Cassette Exon)、5'及び 3'スプライシング部位の変化 (Alternative 5' Acceptor Site、Alternative 3' Acceptor Site) が生じていると区分された遺伝子は 2878 遺伝子存在すると推定された。これらの結果は、熱ストレスによってスプライシングの抑制が生じるだけではなく、多様な熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御が起こっていることを示唆するものと考えられた。

表 1 熱ストレス応答に伴う選択的スプライシング様式の分類

選択的スプライシング様式	遺伝子数*
Intron Retention	434
Cassette Exon	1142
Alternative 5' Acceptor Site	853
Alternative 3' Acceptor Site	883

\*: TAC において選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数

### 3.2.2.1 イントロンリテンションの様子に変化が認められる遺伝子

イントロンリテンションが生じている転写産物は、核外輸送の阻止や、NMD と呼ばれる機構による分解、除去を受けることが知られており、遺伝子の発現と直接的に結びついていると考えられる[41]。そこで、まずイントロンリテンションが生じていると推定された遺伝子群について SI と遺伝子の発現量の変化との関連を調査した。SI が正のものはイントロンリテンションが増加、SI が負のものは逆にイントロンリテンションが減少している様子を示すと考えられる。結果、SI が正の値を示すもの 384 遺伝子に対して負の値を示すものは 54 遺伝子

であり、熱ストレス応答に伴いイントロンリテンションの状態が変化する遺伝子群のうちおよそ 9 割の遺伝子ではイントロンリテンションが増加するように制御されていることが示唆された (表 2)。

表 2 イントロンリテンションの変化と発現量の関連

Splicing Index (SI)	発現量の変化 (対 37°C 比)	遺伝子数*
-	2 倍より大きい	11
	1~2 倍	30
	-1~-2 倍	13
	-2 倍より小さい	0
	合計	54
+	2 倍より大きい	14
	1~2 倍	189
	-1~-2 倍	179
	-2 倍より小さい	2
	合計	384

\* : TAC において選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数

一般的にイントロンリテンションの増加は発現を抑制すると考えられており、逆にその減少は発現を促進すると考えられる[41]。表 2 において、発現量の増加と SI の符号の関連に着目すると、発現量が 2 倍以上増加するに伴いイントロンリテンションの減少が同時に起こっていると推定される遺伝子が 11 遺伝子あり、これらは熱ストレスに対応し積極的に発現を促進するように選択的スプライシングにより制御されている可能性が示唆された。これらの遺伝子を表 3 に示す。

表 3 発現量の増加とイントロンリテンションの減少が起こる遺伝子

Gene Symbol	Transcript Cluster ID	Gene Fold Change (linear) (42 vs. 37)	PSR/Junction ID	Splicing Index (linear) (42 vs. 37)	ANOVA p-value (42 vs. 37)
SERPINH1	TC11000809.hg.1	57.73	PSR11010339.hg.1	-5.43	0.012231
HSPA1B; HSPA1A	TC06000385.hg.1	16.4	PSR06003972.hg.1	-3.5	0.001803
DDIT4	TC10000449.hg.1	14.73	PSR10005311.hg.1	-2.81	0.009992

表 3 発現量の増加とイントロンリテンションの減少が起こる遺伝子 (続き)

Gene Symbol	Transcript Cluster ID	Gene Fold Change (linear) (42 vs. 37)	PSR/Junction ID	Splicing Index (linear) (42 vs. 37)	ANOVA p-value (42 vs. 37)
HSPA1A; HSPA1B	TC06000384.hg.1	10.36	PSR06003945.hg.1	-2.79	0.001307
			PSR06003947.hg.1	-2.49	0.001264
HSPB1	TC07000485.hg.1	10.03	PSR07006769.hg.1	-4.88	0.008086
DUSP1	TC05002066.hg.1	7.66	PSR05028444.hg.1	-4.35	0.000174
IER5	TC01001569.hg.1	5.96	PSR01024238.hg.1	-2.95	0.000699
ATF3	TC01001777.hg.1	3.67	PSR01027792.hg.1	-2.73	0.005542
CLK4; RN7SKP70	TC05002125.hg.1	2.56	PSR05029564.hg.1	-3.89	0.000758
			PSR05029565.hg.1	-5.5	0.001159
			PSR05029568.hg.1	-3.64	0.002113
			PSR05029570.hg.1	-6.2	0.003268
			PSR05029583.hg.1	-3.53	0.000039
CLK1	TC02002666.hg.1	2.53	PSR02042807.hg.1	-3.17	0.003081
			PSR02042808.hg.1	-2.28	0.011815
			PSR02042810.hg.1	-6.49	0.002646
			PSR02042811.hg.1	-3.74	0.006871
			PSR02042813.hg.1	-3.78	0.004139
			PSR02042814.hg.1	-3.69	0.000352
POU3F2	TC06000828.hg.1	2.4	PSR06009833.hg.1	-2.22	0.033645
CLK1	TC02004777.hg.1	2.05	PSR02056144.hg.1	-2.82	0.008385

一方で、発現量が2倍以上増加しているにも関わらず、SIが正の値をとりイントロンリテンションが増加しているように見えるものが14遺伝子区分されている(表2)。この区分の遺伝子にはHSPA1L、HSPA1B、CHORDC1、HSPE1等のヒートショックタンパク質やそれらとの相互作用が報告されている遺伝子が含まれていることを確認した。

### 3.2.2.2 その他様式の選択的スプライシングの変化が認められる遺伝子

イントロンリテンション以外の選択的スプライシングが生じていると分類された遺伝子群では、スプライス部位の選択による制御が行われていると推定される。これら遺伝子群についても3.2.2.1項と同様に分類を行った(表4)。しか

し、分類の結果からは SI と発現量との関連は特に見出すことが出来なかった。このことは、スプライス部位選択の変化は、発現量以外に局在やその他機能面での差異に反映される可能性があり発現量単独の指標とは特に関連が認められないためであると考えられた。一方で、これら選択的スプライシングの制御を受けると推定された遺伝子群のうち、発現量が 2 倍以上変動しているものが 10%程度含まれており、これら遺伝子の中には、ヒートショックタンパク質の他にも多く機能遺伝子、さらに NEAT1 といった non-coding RNA 遺伝子が含まれていることを確認した。

表 4 選択的スプライシングの変化と発現量の関連

Splicing Index (SI)	発現量の変化 (対 37°C比)	遺伝子数*
-	2 倍より大きい	87
	1~2 倍	368
	-1~-2 倍	112
	-2 倍より小さい	3
	合計	570
+	2 倍より大きい	54
	1~2 倍	899
	-1~-2 倍	853
	-2 倍より小さい	27
	合計	1833

\* : TAC において選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数

### 3.2.2.3 遺伝子群の GO 解析

42°C 3 時間の熱ストレスにより選択的スプライシングが変化していると推定される遺伝子群 (4360 遺伝子) について生物学的な機能に特徴が認められるかを調査するため、遺伝子オントロジー解析 (GO 解析) を実施した。解析は Gene Ontology Consortium が提供する解析ツール (<http://geneontology.org/>) を使用し、遺伝子群の生物学的過程 (Biological process) に関して実施した。fold enrichment 値が 2 以上 ( $p$  値<0.05) の結果を表 5 に示す。結果、熱ストレス応答の制御に関連する機能 (regulation of cellular response to heat (GO:900034)、cellular response to heat (GO:0034605)) といった熱ストレス応答に直接関連する過程に加え、ユビキチンや小胞体ストレス関連、細胞分裂及び細胞周期関連遺伝子や RNA の制御関連の機能など、幅広い機能が抽出された。

表 5 熱ストレスにより選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
regulation of cellular response to heat (GO:1900034)	74	42	12.36	3.4	2.30E-07
regulation of chromosome segregation (GO:0051983)	93	46	15.54	2.96	2.23E-06
cellular response to heat (GO:0034605)	108	50	18.04	2.77	3.45E-06
positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in regulation of mitotic cell cycle transition (GO:0051437)	74	34	12.36	2.75	2.33E-03
circadian regulation of gene expression (GO:0032922)	61	28	10.19	2.75	2.53E-02
regulation of sister chromatid segregation (GO:0033045)	75	34	12.53	2.71	3.14E-03
regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle (GO:0051439)	81	36	13.53	2.66	2.31E-03
anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0031145)	83	36	13.87	2.6	4.04E-03
positive regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:2000060)	88	38	14.7	2.58	2.20E-03
anaphase (GO:0051322)	162	67	27.06	2.48	4.90E-07
mitotic anaphase (GO:0000090)	162	67	27.06	2.48	4.90E-07
negative regulation of translation (GO:0017148)	138	57	23.05	2.47	1.32E-05
response to unfolded protein (GO:0006986)	155	64	25.89	2.47	1.38E-06
regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:2000058)	97	40	16.2	2.47	3.42E-03
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator (GO:0030330)	90	37	15.03	2.46	9.72E-03



表 5 熱ストレスにより選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能 (続き)

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
negative regulation of cellular amide metabolic process (GO:0034249)	144	59	24.06	2.45	9.22E-06
mRNA transport (GO:0051028)	132	54	22.05	2.45	4.78E-05
response to topologically incorrect protein (GO:0035966)	167	68	27.9	2.44	6.74E-07
S phase (GO:0051320)	118	48	19.71	2.44	3.82E-04
mitotic S phase (GO:0000084)	118	48	19.71	2.44	3.82E-04
mitotic interphase (GO:0051329)	133	54	22.22	2.43	6.12E-05
interphase (GO:0051325)	133	54	22.22	2.43	6.12E-05
cell cycle G1/S phase transition (GO:0044843)	163	66	27.23	2.42	1.58E-06
G1/S transition of mitotic cell cycle (GO:0000082)	163	66	27.23	2.42	1.58E-06
response to heat (GO:0009408)	169	68	28.23	2.41	1.10E-06
NIK/NF-kappaB signaling (GO:0038061)	87	35	14.53	2.41	2.95E-02
stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway (GO:0002223)	122	49	20.38	2.4	4.05E-04
establishment of RNA localization (GO:0051236)	158	63	26.39	2.39	7.21E-06
positive regulation of ubiquitin-protein transferase activity (GO:0051443)	98	39	16.37	2.38	1.10E-02
regulation of mRNA stability (GO:0043488)	136	54	22.72	2.38	1.26E-04
DNA-templated transcription, termination (GO:0006353)	99	39	16.54	2.36	1.39E-02
innate immune response activating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002220)	125	49	20.88	2.35	8.24E-04
modification by symbiont of host morphology or physiology (GO:0044003)	97	38	16.2	2.35	2.13E-02
RNA transport (GO:0050658)	156	61	26.06	2.34	2.67E-05
nucleic acid transport (GO:0050657)	156	61	26.06	2.34	2.67E-05
mitotic DNA integrity checkpoint (GO:0044774)	110	43	18.38	2.34	5.16E-03

表 5 熱ストレスにより選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能 (続き)

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
signal transduction in response to DNA damage (GO:0042770)	105	41	17.54	2.34	9.52E-03
positive regulation of ligase activity (GO:0051351)	103	40	17.21	2.32	1.45E-02
regulation of RNA stability (GO:0043487)	140	54	23.39	2.31	3.17E-04
negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle (GO:2000134)	104	40	17.37	2.3	1.82E-02
mitotic DNA damage checkpoint (GO:0044773)	102	39	17.04	2.29	2.77E-02
tRNA processing (GO:0008033)	165	63	27.56	2.29	3.59E-05
mitotic cell cycle phase transition (GO:0044772)	297	113	49.61	2.28	4.15E-11
RNA localization (GO:0006403)	179	68	29.9	2.27	1.09E-05
cell cycle phase transition (GO:0044770)	301	114	50.28	2.27	4.24E-11
mitotic cell cycle checkpoint (GO:0007093)	169	64	28.23	2.27	3.68E-05
nucleobase-containing compound transport (GO:0015931)	191	72	31.91	2.26	5.01E-06
M phase (GO:0000279)	238	89	39.76	2.24	7.60E-08
mitotic M phase (GO:0000087)	238	89	39.76	2.24	7.60E-08
negative regulation of cell cycle G1/S phase transition (GO:1902807)	107	40	17.87	2.24	3.52E-02
mitotic cell cycle phase (GO:0098763)	313	116	52.29	2.22	1.03E-10
cell cycle phase (GO:0022403)	313	116	52.29	2.22	1.03E-10
nuclear export (GO:0051168)	125	46	20.88	2.2	1.07E-02
biological phase (GO:0044848)	317	116	52.96	2.19	2.35E-10
negative regulation of mitotic cell cycle phase transition (GO:1901991)	167	61	27.9	2.19	2.91E-04
DNA integrity checkpoint (GO:0031570)	157	57	26.23	2.17	9.71E-04
DNA damage checkpoint (GO:0000077)	146	53	24.39	2.17	2.65E-03
tRNA metabolic process (GO:0006399)	238	86	39.76	2.16	8.82E-07
response to UV (GO:0009411)	133	48	22.22	2.16	1.08E-02

表 5 熱ストレスにより選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能 (続き)

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
ncRNA processing (GO:0034470)	355	128	59.3	2.16	3.13E-11
regulation of ubiquitin-protein transferase activity (GO:0051438)	125	45	20.88	2.16	2.41E-02
negative regulation of cell cycle phase transition (GO:1901988)	179	64	29.9	2.14	2.91E-04
rRNA metabolic process (GO:0016072)	169	60	28.23	2.13	9.64E-04
rRNA processing (GO:0006364)	162	57	27.06	2.11	2.60E-03
phosphatidylinositol metabolic process (GO:0046488)	148	52	24.72	2.1	8.66E-03
cell cycle G2/M phase transition (GO:0044839)	140	49	23.39	2.1	1.93E-02
G2/M transition of mitotic cell cycle (GO:0000086)	140	49	23.39	2.1	1.93E-02
posttranscriptional regulation of gene expression (GO:0010608)	460	160	76.84	2.08	2.54E-13
protein polyubiquitination (GO:0000209)	216	75	36.08	2.08	6.78E-05
response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976)	234	81	39.09	2.07	2.01E-05
regulation of mitotic cell cycle phase transition (GO:1901990)	272	94	45.44	2.07	1.19E-06
regulation of cellular amide metabolic process (GO:0034248)	368	127	61.47	2.07	8.20E-10
positive regulation of proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:1903052)	171	59	28.57	2.07	3.04E-03
regulation of cell cycle phase transition (GO:1901987)	293	101	48.95	2.06	2.87E-07
RNA modification (GO:0009451)	151	52	25.22	2.06	1.52E-02
regulation of translation (GO:0006417)	340	117	56.8	2.06	9.14E-09
regulation of DNA replication (GO:0006275)	160	55	26.73	2.06	8.25E-03
regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle (GO:2000045)	147	50	24.56	2.04	3.29E-02

表 5 熱ストレスにより選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能 (続き)

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
RNA splicing, via transesterification reactions (GO:0000375)	259	88	43.27	2.03	1.00E-05
regulation of cell cycle G1/S phase transition (GO:1902806)	156	53	26.06	2.03	1.78E-02
negative regulation of mitotic cell cycle (GO:0045930)	236	80	39.42	2.03	6.09E-05
ribosome biogenesis (GO:0042254)	242	82	40.43	2.03	4.05E-05
positive regulation of chromosome organization (GO:2001252)	145	49	24.22	2.02	4.83E-02
mitotic cell cycle process (GO:1903047)	738	249	123.28	2.02	1.44E-20
mRNA splicing, via spliceosome (GO:0000398)	255	86	42.6	2.02	2.14E-05
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile (GO:0000377)	255	86	42.6	2.02	2.14E-05
mitotic cell cycle (GO:0000278)	823	276	137.48	2.01	9.00E-23
ncRNA metabolic process (GO:0034660)	505	169	84.36	2	1.01E-12
cell cycle checkpoint (GO:0000075)	287	96	47.94	2	3.95E-06
antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen (GO:0002478)	174	58	29.07	2	1.09E-02

\* : 解析した遺伝子のうちデータベースにマッピングされた遺伝子 (3477 遺伝子)

### 3.2.2.4 HTA2.0 結果の確認

今回得られたアレイの結果について、hsp105 遺伝子の選択的スプライシングの RT-PCR による解析結果と一致するかを確認した。結果 (表 6、図 7) は、RT-PCR の結果 (図 5 : 3.1.2 項) と矛盾なく一致しており、アレイ解析の結果の確からしさを支持するものであると考えられた。

表 6 hsp105 遺伝子エクソン 12 に関するアレイ解析の結果

Transcript Cluster ID	Gene Symbol	Gene Fold Change (linear) (42 vs. 37)	PSR/Junction ID	Splicing Index (linear) (42 vs. 37)	ANOVA p-value (42 vs. 37)
TC13000539.hg.1	HSPH1	15.21	JUC13003634.hg.1	8.88	0.006771
			JUC13003648.hg.1	-5.03	0.000617
			JUC13003637.hg.1	-6.23	0.005218

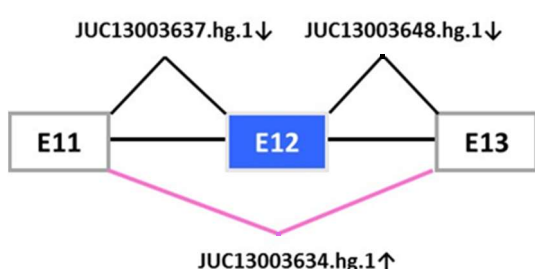


図 7 hsp105 遺伝子エクソン 12 に関するアレイ解析の結果 (模式図)

アレイの PSR/Junction ID と hsp105 遺伝子の各エクソンの関連を示す。JUC13003634.hg.1 はエクソン 11 と 12 の結合部に相当し、JUC13003634.hg.1 及び JUC13003648.hg.1 はそれぞれエクソン 11 と 12 及びエクソン 12 と 13 の結合部に相当する。

### 3.2.3 hnRNPK が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析

前述のとおり、hnRNPK は hsp105 遺伝子のエクソン 12 における熱ストレス応答性の選択的スプライシングを制御する因子であることが確認されているが、熱ストレス応答性の選択的スプライシング全体に対して hnRNPK がどのような関与をしているかについては依然不明である。そこで、次に RNAi により hnRNPK をノックダウンした時に熱応答性の選択的スプライシングがどのような影響をうけるかについて HTA2.0 を用いた解析を試みた。HEK293 細胞に hnRNPK に対する siRNA をトランスフェクション後 3 日間培養し、熱ストレスを 42°C 3 時間与えた細胞から抽出した全 RNA を検体とし 3.1.2 項と同様の方法で解析を行った。同様に hnRNPK に対する siRNA をトランスフェクションした細胞を通常の 37°C で培養したもの、並びにターゲットを持たない siRNA をトランスフェクションした細胞を熱ストレス条件及び通常条件下で培養したものから、それぞれ抽出した全 RNA を比較対象の検体とした。本解析においても、それぞれの条件について独立して調製した検体を 3 検体ずつ使用した。また、今回のデータ解析においても、データのばらつきによる誤差を最小化することを目的として、シグナル強度 5 未満または 3 検体のシグナル強度の変動係数

が 25%を超えるものは削除して解析を実施した。

まず、42℃ 3 時間の熱ストレスを与えた条件において、RNAi により hnRNPK をノックダウンした細胞と通常の細胞における選択的スプライシングの様子を比較した結果、SI が 2 より大きいまたは -2 未満であり、且つそれらの  $p$  値が 0.05 未満を満たすエクソンもしくはエクソン接合部位が 7639 遺伝子に存在することを確認した。次に選択的スプライシングの状態が変化していると推定されるこれら 7639 遺伝子において変化が認められている各エクソン及びエクソン接合部位と、3.2.2 項で確認した 4630 遺伝子で変化が認められた各エクソン及びエクソン接合部位が一致する遺伝子群の抽出を行った。本解析にあたっては、①hnRNPK のノックダウンによってスプライシングの変化が消失しないもの (SI の正負が逆転するもの) 及び②37℃における通常培養条件下でも hnRNPK のノックダウンによって変化するもの、の 2 条件に該当するものは除外した。結果、678 遺伝子において本条件に適合するエクソンまたはエクソン接合部位が認められ、これら遺伝子は hnRNPK により熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受けている可能性が示唆された (図 8)。

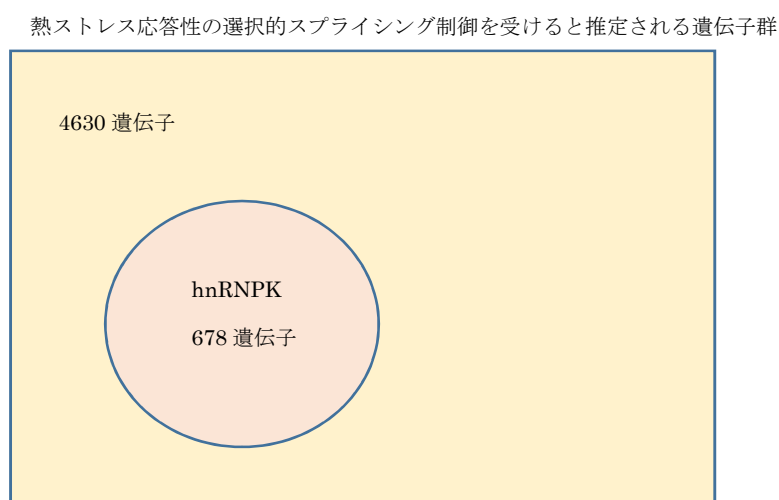


図 8 熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御における hnRNPK の関与。熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受けると推定される遺伝子群(4260 遺伝子)とその中で hnRNPK が関与すると推定される遺伝子群 (678 遺伝子) の関係をベン図にて示す。

これら 678 遺伝子について、4630 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシングの様式と違いが認められるか否について、3.2.2 項同様 TAC により選択的スプライシングの様式を推定し比較を行った。結果、今回抽出された 678 遺伝子において生じていると推定される選択的スプライシングの様式には、全体の 4630 遺伝子と比較して顕著な違いを認めなかった (表 7)。

表 7 選択的スプライシング様式の比較

選択的スプライシング様式	4630 遺伝子における分布 (%)	678 遺伝子における分布 (%)
Intron Retention	13	15
Cassette Exon	34	35
Alternative 5' Acceptor Site	27	26
Alternative 3' Acceptor Site	26	24

\* : 選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数の割合 (小数第一位を四捨五入)

### 3.2.3.1 遺伝子群の GO 解析 (hnRNPK)

次に、抽出された 678 遺伝子について生物学的な機能に特徴が認められるかを調査するため、3.2.2.3 項の記載と同様に GO 解析を行った。fold Enrichment が 2 以上の機能について抽出した結果を表 8 に示す。熱ストレス応答の制御に関連する機能が上位に抽出され、その他 RNA の輸送及び局在等の転写後制御などの機能が抽出されることを確認した。

表 8 hnRNPK により熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
regulation of cellular response to heat (GO:1900034)	74	12	1.98	6.06	0.00937
cellular response to heat (GO:0034605)	106	14	2.84	4.94	0.0134
gene silencing by RNA (GO:0031047)	131	17	3.51	4.85	0.00135
mRNA export from nucleus (GO:0006406)	102	13	2.73	4.76	0.0457
mRNA-containing ribonucleoprotein complex export from nucleus (GO:0071427)	102	13	2.73	4.76	0.0457
ribonucleoprotein complex localization (GO:0071166)	118	15	3.16	4.75	0.00915
ribonucleoprotein complex export from nucleus (GO:0071426)	115	14	3.08	4.55	0.0338
mRNA transport (GO:0051028)	136	16	3.64	4.4	0.0109
gene silencing (GO:0016458)	207	23	5.54	4.15	0.000156
nuclear transport (GO:0051169)	290	23	7.76	2.96	0.0477

表 8 hnRNPK により熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能 (続き)

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
peptidyl-lysine modification (GO:0018205)	322	25	8.62	2.9	0.0272
regulation of cellular amide metabolic process (GO:0034248)	367	27	9.82	2.75	0.0296
posttranscriptional regulation of gene expression (GO:0010608)	462	33	12.36	2.67	0.00472
mitotic cell cycle (GO:0000278)	824	55	22.05	2.49	7.85E-06
RNA processing (GO:0006396)	930	62	24.89	2.49	6.42E-07
mitotic cell cycle process (GO:1903047)	756	50	20.23	2.47	6.37E-05
regulation of cellular response to stress (GO:0080135)	687	44	18.38	2.39	0.00127
regulation of catabolic process (GO:0009894)	740	47	19.8	2.37	0.000598
cell cycle process (GO:0022402)	1109	68	29.68	2.29	2.43E-06
interspecies interaction between organisms (GO:0044419)	805	49	21.54	2.27	0.0011
symbiosis, encompassing mutualism through parasitism (GO:0044403)	805	49	21.54	2.27	0.0011
mRNA metabolic process (GO:0016071)	625	38	16.73	2.27	0.0301
viral process (GO:0016032)	757	46	20.26	2.27	0.00284
regulation of cellular catabolic process (GO:0031329)	631	38	16.89	2.25	0.0374
multi-organism cellular process (GO:0044764)	771	46	20.63	2.23	0.00467
small GTPase mediated signal transduction (GO:0007264)	791	45	21.17	2.13	0.0215
cell cycle (GO:0007049)	1364	75	36.5	2.05	0.000031
single-organism organelle organization (GO:1902589)	2269	122	60.72	2.01	5.02E-10
cellular protein localization (GO:0034613)	1176	63	31.47	2	0.00155

\* : 解析した遺伝子のうちデータベースにマッピングされた遺伝子 (557 遺伝子)

次に、熱ストレス条件下において RNAi による hnRNPK ノックダウンの有無により選択的スプライシングに違いを生じていると推定された 7639 遺伝子に



ついて同様に GO 解析を行った結果（データ示さず）及び 3.2.2.4 に記載した 4260 遺伝子に関する解析結果から抽出された各機能と fold enrichment 値の比較を行った（図 9）。結果、hnRNPK 依存的に熱ストレスに応答して選択的スプライシングを受けると推定される遺伝子群では、熱ストレス応答に関連する機能（regulation of cellular response to heat (GO:1900034)、cellular response to heat (GO:0034605)) に属する遺伝子に加え、mRNA や Ribonucleoprotein の局在に関連する機能（RNA export from nucleus (GO:0006406)、mRNA-containing ribonucleoprotein complex export from nucleus (GO:0071427, GO:0071426)、ribonucleoprotein complex localization (GO:0071166)) 及び Gene silencing に関連する機能（gene silencing by RNA (GO:0031047)、gene silencing (GO:0016458)) に属する遺伝子の占める割合が相対的に増加していることを認めた。これら各機能に分類された遺伝子の代表例を表 9 に示す。

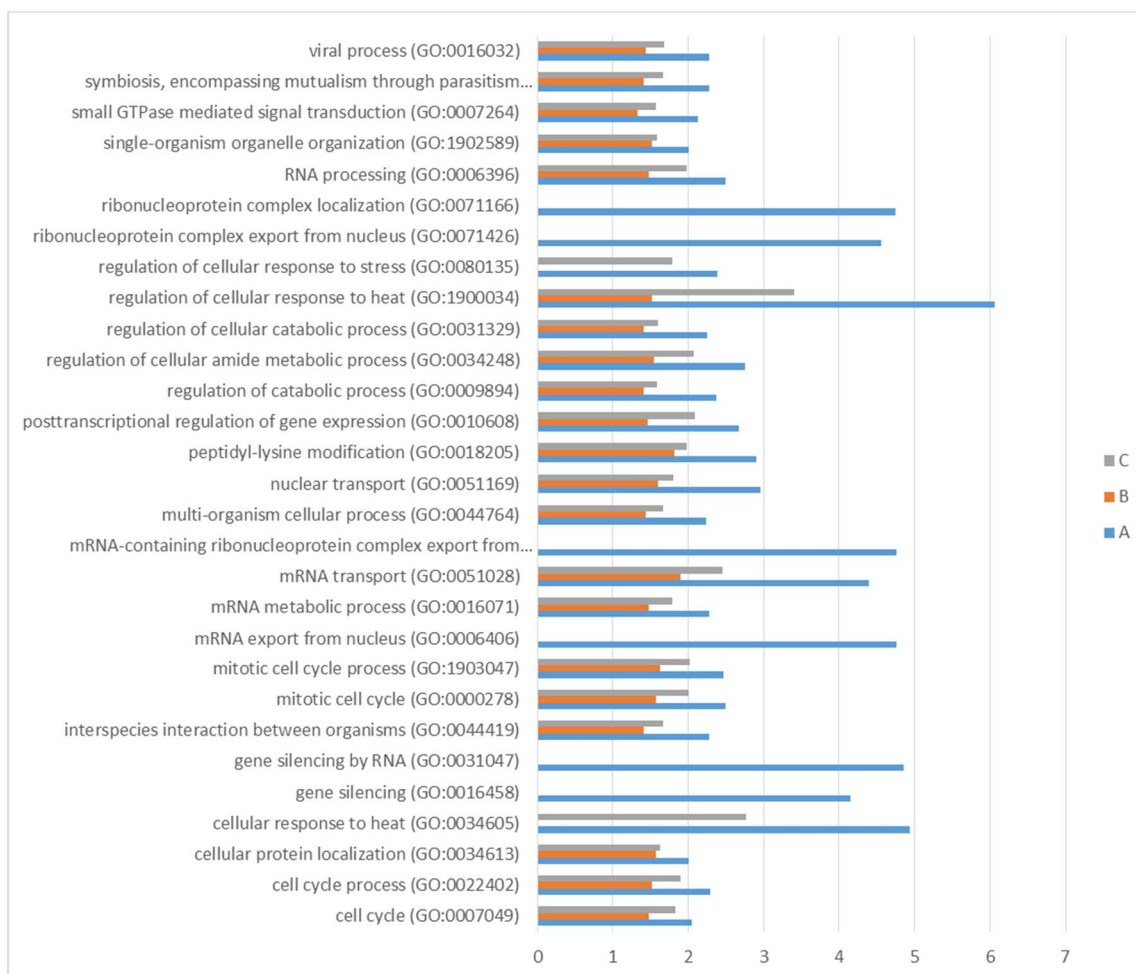


図9 抽出された各機能の fold enrichment 値の比較

GO 解析の結果共通して抽出された機能に関する fold enrichment 値の比較を示す。

A : 共通して抽出された 678 遺伝子に対応する各機能の fold enrichment 値

B : hnRNP のノックダウンにより選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子 (at 42°C) に対応する各機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

C : 熱ストレス条件の有無により選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子の機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

表9 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子

Gene ID	Gene name	Protein class*
regulation of cellular response to heat		
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	Hsp70 family chaperone
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90 family chaperone
MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2	non-receptor serine/threonine protein kinase
HSPA1L	Heat shock 70 kDa protein 1-like	Hsp70 family chaperone

表 9 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子 (続き)

Gene ID	Gene name	Protein class*
POM121C	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C	structural protein/RNA binding protein
NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	transporter
SEH1L	Nucleoporin SEH1	membrane trafficking regulatory protein
NUP188	Nucleoporin NUP188 homolog	-
NUP160	Nuclear pore complex protein Nup160	transporter
CREBBP	CREB-binding protein	acetyltransferase
C11orf73	Protein Hikeshi	-
NUPL2	Nucleoporin-like protein 2	-
gene silencing by RNA		
CNOT2	CCR4-NOT transcription complex subunit 2	transcription factor
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	transcription factor
TNRC6C	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein	-
POM121C	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C	structural protein
NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	transporter
SEH1L	Nucleoporin SEH1	membrane trafficking regulatory protein
SMAD1	Mothers against decapentaplegic homolog 1	transcription factor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	transcription factor
NUP188	Nucleoporin NUP188 homolog	-
POLR2B	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	nucleotidyltransferase
NUP160	Nuclear pore complex protein Nup160	transporter
TARBP2	RISC-loading complex subunit TARBP2	-
NCBP2	Nuclear cap-binding protein subunit 2	RNA binding protein
TNRC6A	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	-

表 9 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子 (続き)

Gene ID	Gene name	Protein class*
NUPL2	Nucleoporin-like protein 2	-
mRNA export from nucleus		
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1	RNA/DNA helicase
SRSF4	Serine/arginine-rich splicing factor 4	-
ALYREF	THO complex subunit 4	RNA binding protein
POM121C	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C	structural protein
NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	transporter
SEH1L	Nucleoporin SEH1	membrane trafficking regulatory protein
SRSF11	Serine/arginine-rich splicing factor 11	RNA binding protein
SRSF5	Serine/arginine-rich splicing factor 5	-
SMG7	Protein SMG7	-
NUP188	Nucleoporin NUP188 homolog	-
NUP160	Nuclear pore complex protein Nup160	transporter
NCBP2	Nuclear cap-binding protein subunit 2	RNA binding protein
NUPL2	Nucleoporin-like protein 2	-

\* : PANTHER Protein Class : PANTHER classification system[42]による分類

### 3.2.3.2 RT-PCR によるマイクロアレイ解析結果の再現性確認

マイクロアレイの試験結果から熱ストレス応答性の選択的スプライシングが hnRNPK 依存的に変化している遺伝子として抽出されたものの中から任意の 3 遺伝子 (SRSF11、PPP1CB、ZDDHC20) を選択し、各試験条件において抽出した全 RNA を用い RT-PCR 及びポリアクリルアミド電気泳動による追試を行った (図 10)。結果、RT-PCR の結果は HTA2.0 の解析結果と一致することを確認した。複数の遺伝子において HTA2.0 及び RT-PCR の結果が一致したことから、これら結果は HTA2.0 の解析結果の妥当性を裏付けるものであると考えられた。

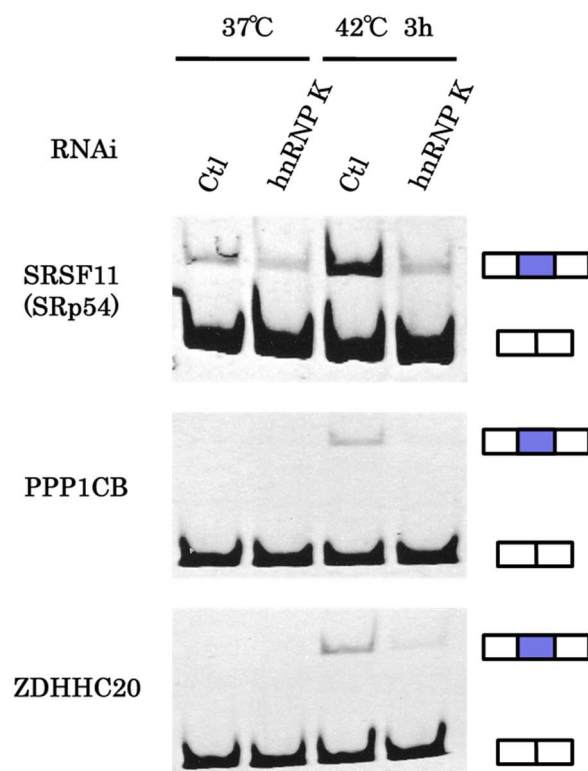


図 10 RT-PCR による選択的スプライシングの確認

熱ストレス (42°C 3 時間) の有無及び hnRNP K に対する RNAi の有無の各条件における HEK293 細胞から抽出した全 RNA について RT-PCR により各遺伝子の選択的スプライシングを確認した結果。模式図は各泳動帯に関する選択的スプライシングのイメージを示す。SRSF11 では Exon6j、PPP1CB では Exon3 及び ZDHHC20 では Exon10a についてそれぞれ熱ストレス応答性のエキソンインクルージョンが起こっていることを示す (各 Exon の定義及び名称は TAC の表示に従った)。

### 3.2.4 PSF が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析

これまでの検討において、HEK293 細胞に対して熱ストレス 42°C 3 時間を与えた際に影響を受けることが示唆された 4260 遺伝子のうち、約 1/6 に相当する 678 遺伝子が hnRNPK による制御を受ける可能性のあることが明らかとなった。しかし、残りの遺伝子の制御に関与する因子については不明な点が残ることから、次に hsp105 遺伝子のエキソン 12 の熱ストレス応答性の選択的スプライシングにおいて hnRNPK と共に関与することが確認されているスプライシング因子である PSF に着目し、hnRNPK と同様の解析を実施した。

HEK293 細胞に PSF に対する siRNA をトランスフェクション後 3 日間培養し、熱ストレスを 42°C 3 時間与えた細胞から抽出した全 RNA を検体とし 3.1.2 項と同様の方法で解析を行った。同様に PSF に対する siRNA をトランスフェクションした細胞を通常の 37°C で培養したもの、並びにターゲットを持たない siRNA をトランスフェクションした細胞を熱ストレス条件及び通常条件下で培養したものから、それぞれ抽出した全 RNA を比較対象の検体とした。本解析においても、それぞれの条件について独立して調製した検体を 3 検体ずつ使用した。また、siRNA をトランスフェクション後、3 日間培養を行った細胞から RNA を回収し、Oligo dT 及び psf 遺伝子特異的なプローブ、プライマーを用いて RT-qPCR 法により psf 遺伝子の mRNA の定量を行い、結果 siRNA をトランスフェクションした細胞では PSF の発現量が通常の 50~60% に低下していることを確認した。

hnRNPK 同様、42°C 3 時間の熱ストレスを与えた条件において、RNAi により PSF をノックダウンした細胞と通常の細胞における選択的スプライシングの様子を比較した結果、SI が 2 より大きいまたは -2 未満であり、且つそれらの *p* 値が 0.05 未満を満たすエキソンもしくはエキソン接合部位が 7013 遺伝子に存在することを確認した。次に選択的スプライシングの状態が変化していると推定されるこれら 7013 遺伝子において変化が認められている各エキソン及びエキソン接合部位と、3.2.2 項で確認した 4630 遺伝子で変化が認められた各エキソン及びエキソン接合部位が一致する遺伝子群の抽出を行った。本解析にあたっては、①PSF のノックダウンによってスプライシングの変化が消失しないもの (SI の正負が逆転するもの) 及び②37°C における通常培養条件下でも PSF のノックダウンによって変化するもの、の 2 条件に該当するものは除外した。結果、477 遺伝子において本条件に適合するエキソンまたはエキソン接合部位が認められ、これら遺伝子は PSF により熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受けている可能性が示唆された (図 11)。

次に、これら 477 遺伝子が 3.2.3 項で抽出された hnRNPK による熱ストレス応答性のスプライシング制御を受けると推定される 678 遺伝子と一致するかを

解析した。結果、149 遺伝子が共通する遺伝子として抽出され、これら遺伝子は hnRNPK と PSF 両方により熱ストレス特異的に選択的スプライシングの制御を受けることが示唆された (図 11)。

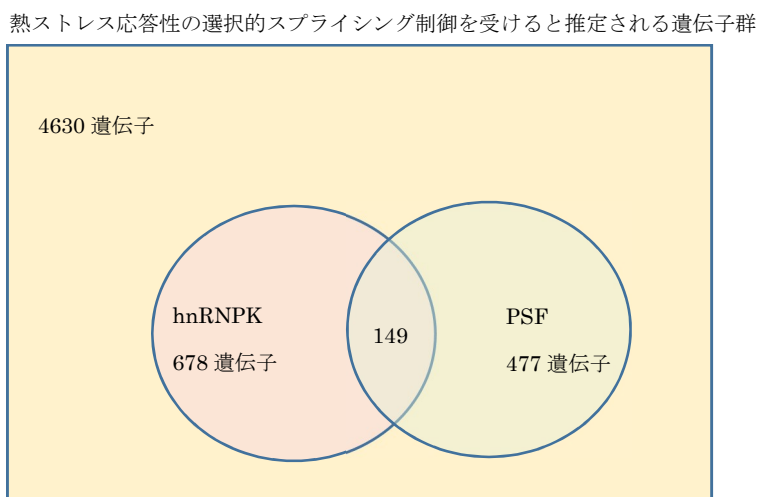


図 11 熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御における PSF の関与

熱応答性選択的スプライシング制御を受けると推定される遺伝子群(4260 遺伝子)とその中で PSF が関与すると推定される遺伝子群 (477 遺伝子)、さらに hnRNPK が関与すると推定される遺伝子群との関係をベン図にて示す。hnRNPK と PSF に共通する遺伝子はエクソンもしくはエクソン接合部位単位での一致ではなく遺伝子単位で抽出した。

また、これら 477 遺伝子について、4630 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシングの様式と違いが認められるか否について、3.2.2 項同様 TAC により選択的スプライシングの様式を推定し比較を行った。結果、今回抽出された 477 遺伝子において生じていると推定される選択的スプライシングの様式には、全体の 4630 遺伝子と比較して顕著な違いを認めなかった (表 10)。

表 10 選択的スプライシング様式の比較

選択的スプライシング様式	4630 遺伝子における分布 (%) *	477 遺伝子における分布 (%) *
Intron Retention	13	9
Cassette Exon**	34	43
Alternative 5' Acceptor Site	27	24
Alternative 3' Acceptor Site	26	22

\* : 選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数の割合 (小数第一位を四捨五入)

\*\* : Mutually Exclusive Exons に分類されたもの (0.4%) を含む

### 3.2.4.1 遺伝子群の GO 解析 (PSF)

次に、これら抽出された 477 遺伝子について生物学的な機能に特徴が認められるかを調査するため、3.2.2.3 項の記載と同様に GO 解析を行った。hnRNPK と異なり fold enrichment 値が 2 を超えるものが少数であったため 1.5 以上の機能について抽出した結果を表 11 に示す。結果、タンパク質の代謝促進に関連する機能及び細胞内小器官に関連する機能が抽出された。

表 11 PSF により熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
positive regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032270)	1397	50	25.57	1.96	4.25E-02
organelle organization (GO:0006996)	3126	95	57.22	1.66	2.46E-03
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	5266	148	96.39	1.54	3.43E-05
cellular component organization (GO:0016043)	5113	142	93.59	1.52	2.00E-04

\* : 解析した遺伝子のうちデータベースにマッピングされた遺伝子 (381 遺伝子)

次に、熱ストレス条件下において RNAi による PSF ノックダウンの有無により選択的スプライシングに違いを生じていると推定された 7013 遺伝子について同様に GO 解析を行った結果 (データ示さず) 及び 3.2.2.4 に記載した 4260 遺伝子に関する解析結果から抽出された各機能と fold enrichment 値の比較を行った (図 12)。結果、PSF 依存的に熱ストレスに応答して選択的スプライシングを受けると推定される遺伝子群では、タンパク質の代謝促進に関連する機能 (positive regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032270)) に属する遺伝子の占める割合が相対的に僅かに増加している様子を認めたが、全体的に特徴的な傾向は認められなかった。なお、hnRNPK と異なり特徴的な傾向を認めなかったことから遺伝子例の抽出は行わなかった。



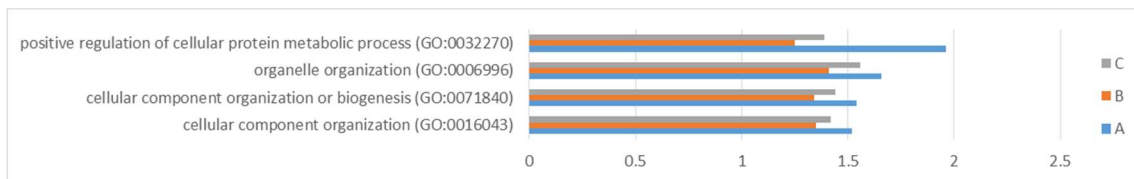


図 12 抽出された各機能の fold enrichment 値の比較

GO 解析の結果共通して抽出された機能に関する fold enrichment 値の比較を示す。

A : 共通して抽出された 477 遺伝子に対応する各機能の fold enrichment 値

B : PSF のノックダウンにより選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子 (at 42°C) に対応する各機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

C : 熱ストレス条件の有無により選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子の機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

### 3.3 熱ストレス応答性の選択的スプライシングに関与するその他の因子

ここまでの検討結果から、hnRNPK 及び PSF は熱ストレス応答性の選択的スプライシングに関与する因子として、それぞれおよそ 500~700 遺伝子の制御に関わることが示唆された。しかし、今回の検討では 42°C 3 時間の熱ストレスにより 4260 遺伝子が熱ストレスに伴い選択的スプライシングの制御を受ける可能性が示唆されており、残りおよそ 70%の遺伝子は別の因子により制御されていると考えられた。そこで、次にこれら他の因子について検討を行った。

3.2.2 項の調査により熱ストレス応答性の選択的スプライシングが生じていることが示唆された遺伝子のうち、hnRNPK 及び PSF の制御を受けるエクソンとして抽出されなかったものの中から、これまでに実施された他の検討結果も併せて考慮し、調査対象として TNRC6A (Trinucleotide Repeat Containing 6A) のエクソン 13 を、スプライシング因子として SRp38 (SRSF10) 及び SC35 (SRSF2) を選択し、これら因子の影響を確認することとした。HEK293 細胞に hnRNPK、PSF、SRp38 及び SC35 に対する siRNA を 3.1.2 項と同様の方法でそれぞれトランスフェクション後 3 日間培養し、熱ストレスを 42°C 3 時間与えた細胞から全 RNA を抽出した。Oligo dT を用いて逆転写を行った後、TNRC6A 特異的なプライマーにてエクソン 13 のスプライシングの様子を解析した (図 13)。

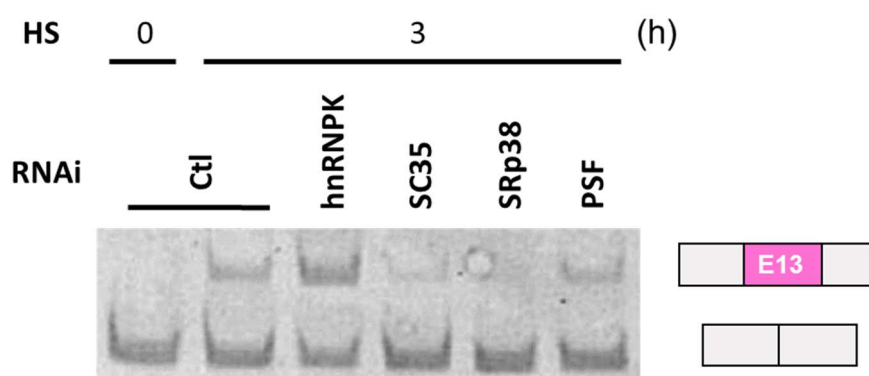


図 13 TNRC6A の熱ストレスに伴う選択的スプライシングの様子

熱ストレス条件の違い (0 時間、3 時間) 及び hnRNPK、SC35、SRp38 及び PSF に対する RNAi の有無の各条件における HEK293 細胞から抽出した全 RNA について RT-PCR により TNRC6A の選択的スプライシングを確認した結果。塩基長が長い泳動帯はエクソン 13 を含む遺伝子を短い泳動帯はエクソン 13 を含まない遺伝子が検出されていること示す。

結果、TRNC6A のエキソン 13 は熱ストレスに応答しエキソンインクルージョンが生じること、それらは hnRNPK を RNAi でノックダウンすることにより促進されるが SRp38 及び SC35 をノックダウンで阻害されることを確認した。一方、PSF のノックダウンでは変化が見られなかった。

なお、RNAi により SRp38 及び SC35 の発現量は、通常に比べておよそ 30～50%に低下していることを RT-qPCR 法により確認した。

### 3.3.1 SRp38 RNAi を用いた熱ストレス応答性の選択的スプライシングの解析

TRNC6A のエキソン 13 の熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御に関与していることが確認された SRp38 は、熱ストレス下において広範囲なスプライシング抑制に働くと考えられている[27]。そこで、HEK293 細胞に対して熱ストレス 42°C 3 時間を与えた際に選択的スプライシングが制御されることが示唆された 4260 遺伝子のうち、hnRNPK 及び PSF の制御を受けると考えられる遺伝子以外の遺伝子が SRp38 により制御されているかどうかを確認するために同様の解析を行った。

HEK293 細胞に SRp38 に対する siRNA をトランスフェクション後 3 日間培養し、熱ストレスを 42°C 3 時間与えた細胞から抽出した全 RNA を検体とし 3.1.2 項と同様の方法で解析を行った。同様に PSF に対する siRNA をトランスフェクションした細胞を通常の 37°C で培養したもの、並びにターゲットを持たない siRNA をトランスフェクションした細胞を熱ストレス条件及び通常条件下で培養したものから、それぞれ抽出した全 RNA を比較対象の検体とした。本解析においても、それぞれの条件について独立して調製した検体を 3 検体ずつ使用した。

hnRNPK 及び PSF と同様、42°C 3 時間の熱ストレスを与えた条件において、RNAi により SRp38 をノックダウンした細胞と通常の細胞における選択的スプライシングの様子を比較した結果、SI が 2 より大きいまたは -2 未満であり、且つそれらの  $p$  値が 0.05 未満を満たすエキソンもしくはエキソン接合部位が 6874 遺伝子に存在することを確認した。次に選択的スプライシングの状態が変化していると推定されるこれら 6874 遺伝子において変化が認められている各エキソン及びエキソン接合部位と、3.2.2 項で確認した 4630 遺伝子で変化が認められた各エキソン及びエキソン接合部位が一致する遺伝子群の抽出を行った。本解析にあたっては、①SRp38 のノックダウンによってスプライシングの変化が消失しないもの (SI の正負が逆転するもの) 及び②37°C における通常培養条件下でも SRp38 のノックダウンによって変化するもの、の 2 条件に該当するものは除外した。結果、584 遺伝子において本条件に適合するエキソンまたはエキソン接合部位が認められ、これら遺伝子は SRp38 により熱ストレス応答性

の選択的スプライシング制御を受けている可能性が示唆された (図 14)。

次に、これら 584 遺伝子について hnRNPK 及び PSF による熱ストレス応答性のスプライシング制御を受けると推定される遺伝子と一致するかを解析した。結果、hnRNPK とは 188 遺伝子が、PSF とは 218 遺伝子が共通する遺伝子として抽出され、さらにいずれにも共通する遺伝子が 92 遺伝子抽出された (図 14)。なお、これら共通因子の制御を受ける遺伝子の抽出は遺伝子単位で行った。

熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受けると推定される遺伝子群

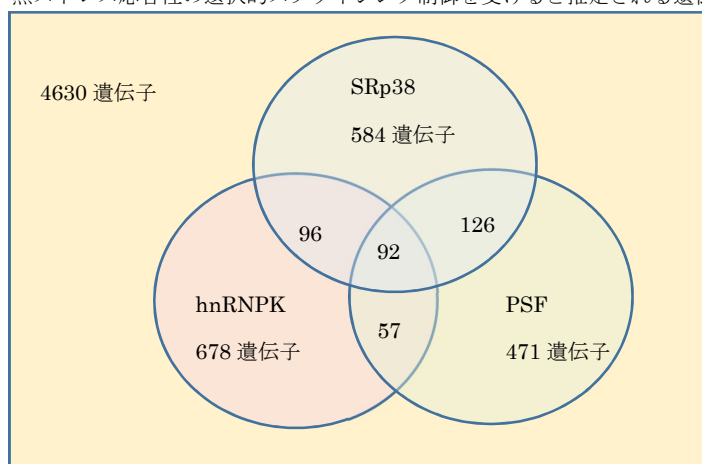


図 14 熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御における SRp38 の関与  
熱応答性の選択的スプライシング制御を受けると推定される遺伝子群(4260 遺伝子)とその中で SRp38 が関与すると推定される遺伝子群 (584 遺伝子)、さらに hnRNPK 及び PSF が関与すると推定される遺伝子群との関係をベン図にて示す。SRp38、hnRNPK 及び PSF に共通する遺伝子はエキソンもしくはエキソン接合部位単位での一致ではなく遺伝子単位で抽出した。

また、これら 584 遺伝子について、4630 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシングの様式と違いが認められるか否について、3.2.2 項同様 TAC により選択的スプライシングの様式を推定し比較を行った。結果、今回抽出された 584 遺伝子において生じていると推定される選択的スプライシングの様式には、全体の 4630 遺伝子と比較して顕著な違いを認めなかった (表 12)

表 12 選択的スプライシング様式の比較

選択的スプライシング様式	4630 遺伝子における分布 (%) *	584 遺伝子における分布 (%) *
Intron Retention	13	17
Cassette Exon	34	35
Alternative 5' Acceptor Site	27	24
Alternative 3' Acceptor Site	26	25

\* : 選択的スプライシングの様式が分類された PSR/Junction が存在する遺伝子数の割合 (小数第一位を四捨五入)

### 3.3.2 遺伝子群の GO 解析 (SRp38)

次に、これら抽出された 584 遺伝子について生物学的な機能に特徴が認められるかを調査するため、3.2.2.3 項の記載と同様に GO 解析を行った。hnRNPK と同様 fold enrichment 値が 2 を超えるものについて抽出した結果を表 13 に示す。結果、タンパク質の細胞内での移送に関連する機能及び細胞周期に関連する機能が抽出された。

表 13 SRp38 により熱ストレス応答性のスプライシングが制御されると推定される遺伝子群の機能

GO biological process complete	Homo sapiens (20814)	upload_1 *	upload_1 (expected)	fold Enrichment	P-value
protein import (GO:0017038)	158	15	3.51	4.27	3.14E-02
nucleocytoplasmic transport (GO:0006913)	348	24	7.74	3.1	1.31E-02
nuclear transport (GO:0051169)	356	24	7.92	3.03	1.92E-02
mitotic cell cycle process (GO:1903047)	735	39	16.35	2.39	6.25E-03
mitotic cell cycle (GO:0000278)	754	40	16.77	2.38	4.51E-03
cell cycle process (GO:0022402)	1072	52	23.85	2.18	1.34E-03
protein transport (GO:0015031)	1324	63	29.45	2.14	1.15E-04
cell cycle (GO:0007049)	1304	61	29.01	2.1	3.65E-04
establishment of protein localization (GO:0045184)	1432	65	31.85	2.04	3.77E-04

\* : 解析した遺伝子のうちデータベースにマッピングされた遺伝子(463 遺伝子)

次に、熱ストレス条件下において RNAi による SRp38 ノックダウンの有無により選択的スプライシングに違いを生じていると推定された 6874 遺伝子について同様に GO 解析を行った結果 (データ示さず) 及び 3.2.2.4 に記載した 4260 遺伝子に関する解析結果から抽出された各機能と fold enrichment 値の比較を

行った (図 15)。結果、タンパク質の細胞内での移送に関連する機能 (protein import (GO:0017038)、nucleocytoplasmic transport (GO:0006913)、nuclear transport (GO:0051169)、protein transport (GO:0015031)、establishment of protein localization (GO:0045184)) に属する遺伝子の占める割合が相対的に増加している様子が認められ、細胞周期に関連する機能 (mitotic cell cycle process (GO:1903047)、mitotic cell cycle (GO:0000278)、cell cycle process (GO:0022402)、cell cycle (GO:0007049)) に属する遺伝子の占める割合にも若干であるが相対的に増加している様子が確認された。これら各機能に分類された遺伝子の代表例を表 14 に示す。

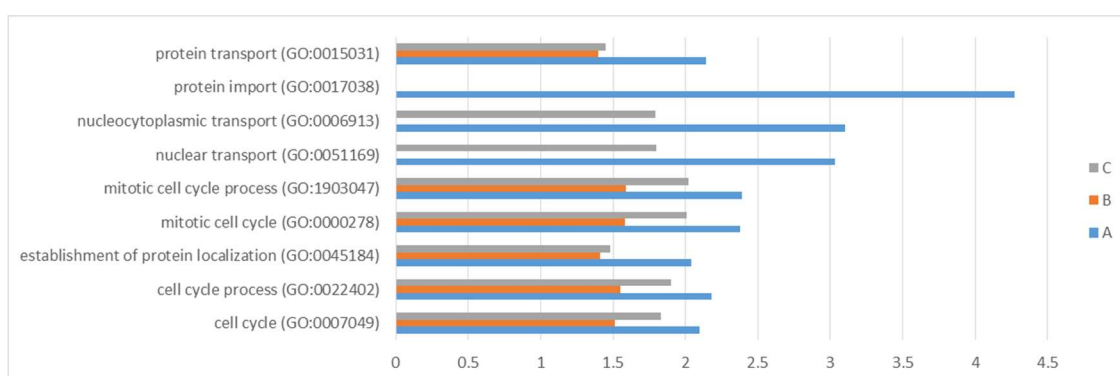


図 15 抽出された各機能の fold enrichment 値の比較

GO 解析の結果共通して抽出された機能に関する fold enrichment 値の比較を示す。

A: 共通して抽出された 584 遺伝子に対応する各機能の fold enrichment 値

B: SRp38 のノックダウンにより選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子 (at 42°C) に対応する各機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

C: 熱ストレス条件の有無により選択的スプライシングの変化が認められた遺伝子の機能のうち、条件 A で抽出された機能と共通する各機能の fold enrichment 値

表 14 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子

Gene ID	Gene name	Protein class*
protein import		
Pro-epidermal growth factor	Pro-epidermal growth factor	Pro-epidermal growth factor
PEX19	Peroxisomal biogenesis factor 19	storage protein
CLU	Clustered mitochondria protein homolog	translation initiation factor
CBLB	E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	ligase
NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	-
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90 family chaperone

表 14 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子 (続き)

Gene ID	Gene name	Protein class*
protein import		
RAB8B	Ras-related protein Rab-8B	-
NOP58	Nucleolar protein 58	ribonucleoprotein
NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	transporter
HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	Hsp70 family chaperone
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	transcription factor
PEX5L	PEX5-related protein	receptor
KPNA3	Importin subunit alpha-4	transfer/carrier protein
CLU	Clusterin	-
FGF9	Fibroblast growth factor 9	growth factor
C11orf73	Protein Hikeshi	-
mitotic cell cycle process		
CNTRL	Centriolin	receptor extracellular matrix protein
TTN	Titin	extracellular matrix protein
NPAT	Protein NPAT	-
CEP57L1	Centrosomal protein CEP57L1	-
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	transcription factor
CCNK	Cyclin-K	transcription cofactor
NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	-
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90 family chaperone
REEP4	Receptor expression-enhancing protein 4	transporter
HAUS6	HAUS augmin-like complex subunit 6	-
SPRY2	Protein sprouty homolog 2	transcription factor
PPP1R12A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	phosphatase modulator
NCAPD2	Condensin complex subunit 1	nucleic acid binding
ORC6	Origin recognition complex subunit 6	replication origin binding protein
ATM	Serine-protein kinase ATM	nucleotide kinase
PBRM1	Protein polybromo-1	-

表 14 fold enrichment 値に変化が認められた機能に分類された遺伝子 (続き)

Gene ID	Gene name	Protein class*
NEDD9	Enhancer of filamentation 1	-
INTS3	Integrator complex subunit 3	-
NUP88	Nuclear pore complex protein Nup88	transporter
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	-
RBL2	Retinoblastoma-like protein 2	transcription factor
NEK1	Serine/threonine-protein kinase Nek1	-
DYNLL1	Dynein light chain 1, cytoplasmic	enzyme modulator
SPRY1	Protein sprouty homolog 1	transcription factor
CDC23	Cell division cycle protein 23 homolog	-
PSMC1	26S protease regulatory subunit 4	hydrolase
NEK4	Serine/threonine-protein kinase Nek4	-
DIS3L2	DIS3-like exonuclease 2	endoribonuclease
POM121	Nuclear envelope pore membrane protein POM 121	structural protein
SMC5	Structural maintenance of chromosomes protein 5	nucleic acid binding
PPP1R12B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B	phosphatase modulator
POGZ	Pogo transposable element with ZNF domain	zinc finger transcription factor
GIGYF2	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	-
PLK4	Serine/threonine-protein kinase PLK4	-
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E	translation initiation factor
CCNG1	Cyclin-G1	kinase activator
RACGAP1	Rac GTPase-activating protein 1	transfer/carrier protein
TP53	Cellular tumor antigen p53	transcription factor
SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein 4	chromatin/chromatin-binding protein

\* : PANTHER Protein Class : PANTHER classification system[42]による分類



## 第4章 纏め及び考察

### 4.1 熱ストレス応答性の選択的スプライシング

今回 HTA2.0 を用いた解析により、HEK293 細胞では 42°C 3 時間の熱ストレスにより 4260 の遺伝子が選択的スプライシングの制御を受けることが示唆された。熱ストレス応答性のスプライシング制御については、熱ストレスによりスプライシング反応が抑制されることが知られており [26, 27]、その結果イントロンリテンションが生じると考えられているが、本研究においても熱ストレスに応答し 370 の遺伝子にイントロンリテンションによる制御が行われていると推定され、これら遺伝子の大部分では熱ストレス条件下でスプライシング抑制による遺伝子発現制御が行われていると考えられた。近年マウス繊維芽細胞 (3T3 細胞) を用いて実施された試験にて約 1700 遺伝子が熱ストレス応答によるイントロンリテンションにより発現が抑制されることが報告されている[43]。試験条件及び解析に用いたソフトウェアのアルゴリズムや判定基準の違い等により直接的な比較は出来ないが、今回の結果においても熱ストレスに応答して多くの遺伝子でスプライシング抑制が認められたことから、これらの制御が熱ストレス応答において細胞や子細な条件の違いによらず一般的なものであることが確認できたと考えられる。

一方、今回の研究では熱ストレスに伴い発現量が上昇 (2 倍以上) するとともに、イントロンリテンションの消失が起こると推定される遺伝子を若干数 (11 遺伝子) 検出している。これら遺伝子群の中には、熱ストレスによりイントロンリテンションが減少することにより発現が増加するように制御されることが報告されている CLK1/4 遺伝子[44]が含まれており、今回確認された他の遺伝子においても同様の制御が行われている可能性が考えられた。また、対照的に発現量が上昇 (2 倍以上) しているにも関わらず、イントロンリテンションが増加していることが示唆された遺伝子も同様に若干数 (12 遺伝子) 確認された。ここには HSPA1L[45]、HSPA1B[46]、CHORDC1[47]、HSPE1[48]といった熱ストレス下で誘導されると考えられるヒートショックタンパク質やそれらとの相互作用する可能性のある遺伝子が含まれており、イントロンリテンションが発現抑制に働くことと矛盾するように見える。このような矛盾が生じた理由としては、転写レベルの急激な増加にスプライシングが追い付かずイントロンリテンションが生じている可能性が考えられた。今回の検討は熱ストレスをかけて 3 時間後定点での試験であること、また熱ストレス下における選択的スプライシングの状態は時間経過と共に変化していると考えられること[25]を考慮すると、これら遺伝子に対するスプライシング制御の詳細を確認するには時間経過を追った

検討が必要になると考えられる。

一方、イントロンリテンション以外に区分された遺伝子群では、スプライス部位の選択による制御が行われていると推定されるが、これら遺伝子群については特に **Splicing Index (SI)** に基づく分類と発現量との間に明確な関連は見いだせなかった。これは、スプライス部位の選択の変化は発現量以外に局在など機能面の多様な変化に反映される可能性があり、発現量単独の指標では特徴づけることが出来ないためと考えられた。しかし、今回 TAC を用いたスプライシング様式の推定では、イントロンリテンションの制御が行われていると分類された遺伝子はおおよそ 10%程度のみであり、残り大半の遺伝子群では HSP105 のような他の様式の選択的スプライシングが生じていると推定されている。このことは、熱ストレスに応答してスプライシングの抑制だけではなく、多くの遺伝子が 5'及び 3'スプライシング部位の選択の違いによる様々なスプライシング制御を受けることを示唆するものであると考えられた。

また、今回の調査において、熱ストレスにより発現量が増加し、且つ SI の値が大きい区分の遺伝子を精査したところ、NEAT1 のような **non-coding RNA** 遺伝子が含まれていることが確認された。NEAT1 はパラスペックルと呼ばれる核内構造体の形成に関与する **non-coding RNA** である。パラスペックル自体はある種のストレス下で形成が促進されること以外に生物学的な機能は依然明らかとなっていないが、その核となる NEAT1 については研究が進んでおり、3'末端の切断部位の違いにより長さの違う NEAT1\_1 と NEAT1\_2 が存在すること、パラスペックルの形成には NEAT1\_2 が必要なこと等が報告されている[49]。NEAT1\_1 の形成は 3'末端の polyA 付加部位の選択の違いにより制御されていることから本研究の対象とした選択的スプライシング制御とは異なるが、熱ストレス応答において RNA レベルの多様な制御が **coding** 及び **non-coding** を問わず広範囲に及んでいることを示唆するものとして興味深いと思われた。

さらに今回、どのような生物学的な機能に関係する遺伝子発現の制御にこれら選択的スプライシングの制御が関与しているかについて、遺伝子オントロジー解析を行い調査した。その結果、熱ストレス応答の制御に関連する機能 (**regulation of cellular response to heat (GO:1900034)**、**cellular response to heat (GO:0034605)**) を始め、ユビキチンや小胞体ストレス関連、細胞分裂及び細胞周期関連遺伝子や RNA の制御関連の機能など、細胞の熱ストレス応答に関係が深いと思われる機能が多数抽出された。これらの結果は、選択的スプライシング制御が細胞の熱ストレス応答の遺伝子発現を調整する上で幅広く重要な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えられる。

## 4.2 hnRNPK 及び PSF の関与

hnRNPK 及び PSF が熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御の全体にどのように関与しているかを明らかにするため、RNAi 及び HTA2.0 を用いた解析を行った結果、42°C 3 時間の熱ストレスに応答して選択的スプライシングの制御を受ける可能性がある 4260 遺伝子のうち、678 遺伝子が hnRNPK により制御を受け、また 477 遺伝子が PSF により制御を受ける遺伝子群として抽出された。また、149 遺伝子が両方により制御を受ける遺伝子として抽出された。本結果から、hsp105 遺伝子のエキソン 12 の熱ストレス応答性の選択的スプライシングに関与する因子として同定された hnRNPK 及び PSF は、今回の試験における熱ストレス条件下で全体のおよそ 10~15% の遺伝子の選択的スプライシング制御にそれぞれ関わると推定された。また、TAC を用いたスプライシング様式の推定では、それぞれ因子が制御に関わると推定される選択的スプライシング様式には特に顕著な違いは認められなかったことから、これら因子は特定の選択的スプライシング様式の制御だけに関与しているものではないと考えられた。

### ・ hnRNPK が選択的スプライシング制御に関与する遺伝子群の特徴

GO 解析の結果、hnRNPK 特異的に熱ストレスに応答して選択的スプライシングを受けると推定される遺伝子群は、熱ストレス応答の制御に関連する機能から RNA の輸送及び局在等の転写後制御など広範囲な機能に分類されることを確認した。またその中でも①細胞の熱ストレス応答に関連する機能、②mRNA 及びリボ核タンパク質の局在に関連する機能及び③Gene silencing に関与する機能に属する遺伝子の占める割合が相対的に増加している様子が認められた。これらは、hnRNPK が熱ストレス応答とは無関係に関わると推定される選択的スプライシングを受ける遺伝子群及び熱ストレス応答性の選択的スプライシングを受ける遺伝子群が属する機能の分布とは明らかに異なっていることから、hnRNPK はそれら機能に属する遺伝子群に対し、細胞が熱ストレスを受けた際に作用することによって細胞の熱ストレス応答に関わっていることが示唆される結果であると考えられた。

### ・ PSF

PSF 特異的に熱ストレスに応答して選択的スプライシングを受けると推定される遺伝子群では、タンパク質の代謝促進に関連する機能に属する遺伝子の占める割合が相対的に若干増加している様子が認められた。しかし、GO 解析において抽出された機能が少なく、hnRNPK の場合と異なり全体として特徴的な機

能の偏りは認められなかった。そのため、熱ストレス応答において PSF が特徴的に関与する機能は少ないと推定された。

これらの結果は、hnRNPK と PSF が熱ストレス応答において制御する対象の遺伝子群に機能的な差異があることを示唆しており、特に hnRNPK については、熱ストレス応答に関わる機能を始め特徴的な機能に属する遺伝子群に偏りが認められたことから、熱ストレス応答の中でそれらの生物学的な過程に大きく関与することが示唆された。hnRNPK に関して今回抽出された機能のうち、熱ストレス応答に関連する機能には、HSPH1 (HSP105)、HSPA1L (HSP70)、HSP90AA1 (HSP90) [49]及び C11orf73 (Hikeshi) [50]といった熱タンパク質によって変性したタンパク質の処理に関わるシャペロン及びそれらに関連する遺伝子が含まれている。HSP105 は核内で hsp70 遺伝子の発現促進に働くとともに HSP105 は HSP70 が変性タンパク質と相互作用する際に生じる ADP から ATP へのヌクレオチド交換反応を促進することで HSP70 の働きを促進することが報告されており [51,52]、また Hikeshi は熱ストレス応答の際に ATP が結合した HSP70 が核に移行する際に関与するタンパク質として同定されたものである [50]。選択的スプライシングが局在を調整していることが明らかとなっている HSP105 以外の遺伝子について現時点では機能に関連した熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御の報告はなされていないが、今回これら互いに協働して働く想定される遺伝子群が hnRNPK により熱ストレス応答性の選択的スプライシングを受ける可能性が示唆されたことは興味深い。同様に変化が認められた mRNA や Ribonucleoprotein の局在に関連する機能及び Gene silencing に関連する機能に属する遺伝子を併せ、今回 RT-PCR で確認された HSP105 及び SRSF11 以外の遺伝子についても同様な確認を行うこと、さらに確認されたスプライシングアイソフォームについて機能面から詳細な解析を行うことで、今後より詳細な制御ネットワークの全体像が明らかになると期待された。

hnRNPK は分子内に様々なタンパク質との結合部位やリン酸化部位を多数有しており、さまざまなシグナルを統合するタンパク質の一つであると考えられている [53]。細胞に熱ストレス応答を引き起こすシグナル伝達の経路は依然未知な部分が多く残されているが、今回の解析結果は hnRNPK がその中で選択的スプライシングの制御を通して重要な役割を担うタンパク質の一つである可能性を示唆していると考えられた。一方、PSF は今回の試験では対象と考えられる遺伝子群の機能については、一部を除き特徴的な傾向は認められず、熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御の中では特に特徴的な機能の遺伝子群に関与するものではないことが示唆された。ただし、今回の試験において hnRNPK の RNAi によるノックダウンの効率が 90%を超えるのに対し、PSF のノックダ

ウン効率は 50%~60%程度に止まっていることから、RNAi の条件を検討しノックダウン効率の違いで明瞭な差異が確認できていない可能性について留意する必要があると考えられた。

### 4.3 SRp38 の関与

本研究では、hnRNPK 及び PSF に加え、SRp38 の熱ストレス依存性の選択的スプライシングへの関与についても、マイクロアレイを用いた評価を行い、その関与の範囲を明らかにすることを試みた。hnRNPK 及び PSF と同様、RNAi 及び HTA2.0 を用いた解析を行った結果、42°C 3 時間の熱ストレスに応答して選択的スプライシングの制御を受ける可能性がある 4260 遺伝子のうち、584 遺伝子が SRp38 により制御を受ける遺伝子群として抽出された。また、抽出された遺伝子について hnRNPK 及び PSF で抽出されたものと共通な遺伝子を調査したところ、それぞれおよそ 200 近い遺伝子が共通し、約 100 遺伝子が 3 つに共通であった。本結果を併せ、hnRNPK、PSF 及び SRp38 で熱ストレス応答性の選択的スプライシングの約 30%が制御されていると考えられた。しかし、本結果は、SRp38 が熱ストレス応答時に広範囲なスプライシングを阻害するというモデルからは解離があるように思われた。また、TAC を用いたスプライシング様式の推定では、SRp38 が制御に関わると推定される選択的スプライシング様式においてスプライシングが阻害されることにより生じると推定されるイントロンリテンションの割合について顕著な増加は認められていない。

今回、SRp38 が制御に関与する遺伝子群の GO 解析を行った結果から、それらの遺伝子群では、タンパク質の細胞内での移送に関連する機能と M 期を含む細胞周期に関する機能に分類される遺伝子の割合が相対的に増加していることを確認している。また、通常条件下において、SRp38 は細胞周期の M 期に脱リン酸化されることにより活性化されスプライシングを抑制することが知られている[54]。上記遺伝子群に細胞周期に関連する機能に含まれる遺伝子の割合が相対的に増加している様子が認められたことは、それらの遺伝子が熱ストレス応答に伴う SRp38 の脱リン酸化の結果、選択的スプライシングの制御を受けたためと推定される。そのため、今回確認された遺伝子群についてもこれまでの報告と同じの機構の制御が働いていると推定された。ただし、対象となる遺伝子数が広範囲に及んでいないのは、SRp38 を介したスプライシングの抑制の対象となる遺伝子が限られているもしくは今回熱ストレス条件が 42°C 3 時間の単一条件だったことから温度条件または時間経過に伴い検出できる遺伝子が異なるため相違が生じた可能性等が考えられた。実際、SRp38 のリン酸化状態は熱ストレス応答後の時間経過とともに変化することが知られている[55]。また、後者に

については、スプライシング様式の解析アルゴリズムや判定基準に依存する側面も多いと考えられる。今回解析に使用した TAC に加えて、HTA2.0 のデータが解析可能な別のアルゴリズムで動作するソフトウェアが開発されたことが報告されており[56]、これら異なるソフトウェアを用いた解析も興味深いと思われる。これらについては試験条件と併せて今後検討が必要な課題と考えられた。

また、GO 解析で抽出されたタンパク質の細胞内での移送に関連する機能には、HSP90 や Hikeshi などの hnRNPK で熱ストレス応答に関連する機能として抽出された遺伝子が含まれていることを確認している。これら遺伝子は TNRC6A のように複数の制御因子により熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されていると考えられ、熱ストレス応答における選択的スプライシングでは多数のスプライシング因子が相互作用する複雑な制御が行われていると考えられた。

#### 4.4 hnRNPK 及び SRp38 による選択的スプライシング制御

今回実施した HSP105 のエクソン 12 と TNRC6A のエクソン 13 を指標とした確認試験及びこれまでに得られていた知見を併せ、hnRNPK 及び SRp38 を介した熱ストレス応答性のスプライシング制御について以下のようなモデルが考えられた (図 16)。

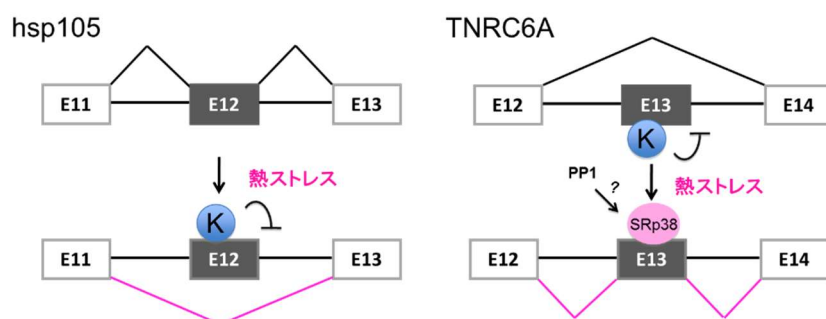


図 16 hnRNPK 及び SRp38 を介した選択的スプライシングのモデル

hnRNPK 及び SRp38 を介した熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御モデルを示す。熱ストレスによって hsp105 のエクソン 12 では hnRNPK の働きによりエクソンスキップが生じ、TNRC6A では hnRNPK の抑制が解除されるとともに SRp38 の関与によりエクソン 13 のエクソンインクルージョンが生じると推定される。図中 K は hnRNPK を示す。

SRp38 は熱ストレスに応答して脱リン酸化されることで広範囲なスプライシング抑制因子として働くと考えられており、またリン酸化されることによってスプライシングの促進因子として働くことが報告されている[57, 58]。今回の検

討から想定された TNRC6A の制御モデル (図 16) と、これら SRp38 が熱ストレスにより脱リン酸化され促進因子としての機能を消失するというこれまでの報告とは一致しないように思われる。現時点では本相違の理由は明らかではなく、今後 SRp38 のリン酸化状態や hnRNPK 及び SC35 といった他の因子の関わりを含め詳細に解析することが必要と考えられた。

また、hnRNPK の関与が示唆された遺伝子の中から SRSF11、PPP1CB 及び ZDHHC20 を選択し RT-PCR にて評価したところ、いずれも hnRNPK に依存的に熱ストレス応答性のエキソンインクルージョンが生じることを確認した。これら遺伝子の挙動は TNRC6A と同様であるが、SRp38 等の他のスプライシング因子の関与は明らかになっておらず、これらの制御に関与する他のスプライシング因子を調査することは熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御の全体像を理解する上で今後の課題と考えられた。一方、今回の検討において RT-PCR による評価では、hsp105 と同様の様子を示す遺伝子は HSP90AA のみであった (データ示さず)。ただし、これについては選択的スプライシングが確認されているエキソンとしてデータベースに登録されている領域ではない箇所であったことから、アーティファクトの可能性も考えられたため本報告には含めなかった。上記 RT-PCR を用いた評価では事例に偏りが見られたが、hnRNPK は通常条件下でのノックダウンの検討において、エキソンスキップ及びエキソンインクルージョンの両方の制御に関わる因子であることが報告されており [56]、熱ストレス応答性の選択的スプライシングにおいても対象となる遺伝子群に対し同様に働くと推定される。

今回の検討における各因子について実施した GO 解析の結果から、hnRNPK と SRp38 については熱ストレス応答時に制御対象となる遺伝子群の機能にそれぞれ特徴があることが示唆されている。リン酸化された SRp38 は配列依存的にスプライシングの促進因子として働くことが報告されており [58]、また hnRNPK については好ましい結合配列として AUC<sub>3/4</sub>(A/U)<sub>2</sub> が報告されている [59,60]。実際、hsp105 遺伝子においてもエキソン 12 中の配列 (CCCCUU) が熱ストレス応答性の選択的スプライシングに必要なことが確認されている [37]。そのため、これら対象となる遺伝子群のエキソンもしくはイントロンにはこれら因子が好んで結合する配列があり、それらに選択的に結合することで制御が行われていることが推定される。現時点では、制御対象の遺伝子群が属する機能にそれぞれ特徴がある理由は不明であることから、各遺伝子の配列に加え、遺伝子機能のネットワークについてより詳細に解析を進める必要があると考えられた。

#### 4.5 熱ストレス応答性の選択的スプライシングによる遺伝子発現制御

本研究では HEK293 細胞を使用し 42°C 3 時間の熱ストレス条件をモデルとして熱ストレス応答性の選択的スプライシングについてマイクロアレイを用いた網羅的な解析を行い、hnRNPK、PSF 及び SRp38 とそれらスプライシング制御との関係を調査した。一連の検討で得られた知見をもとに推定される熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を介した遺伝子発現制御について図 17 に示す。

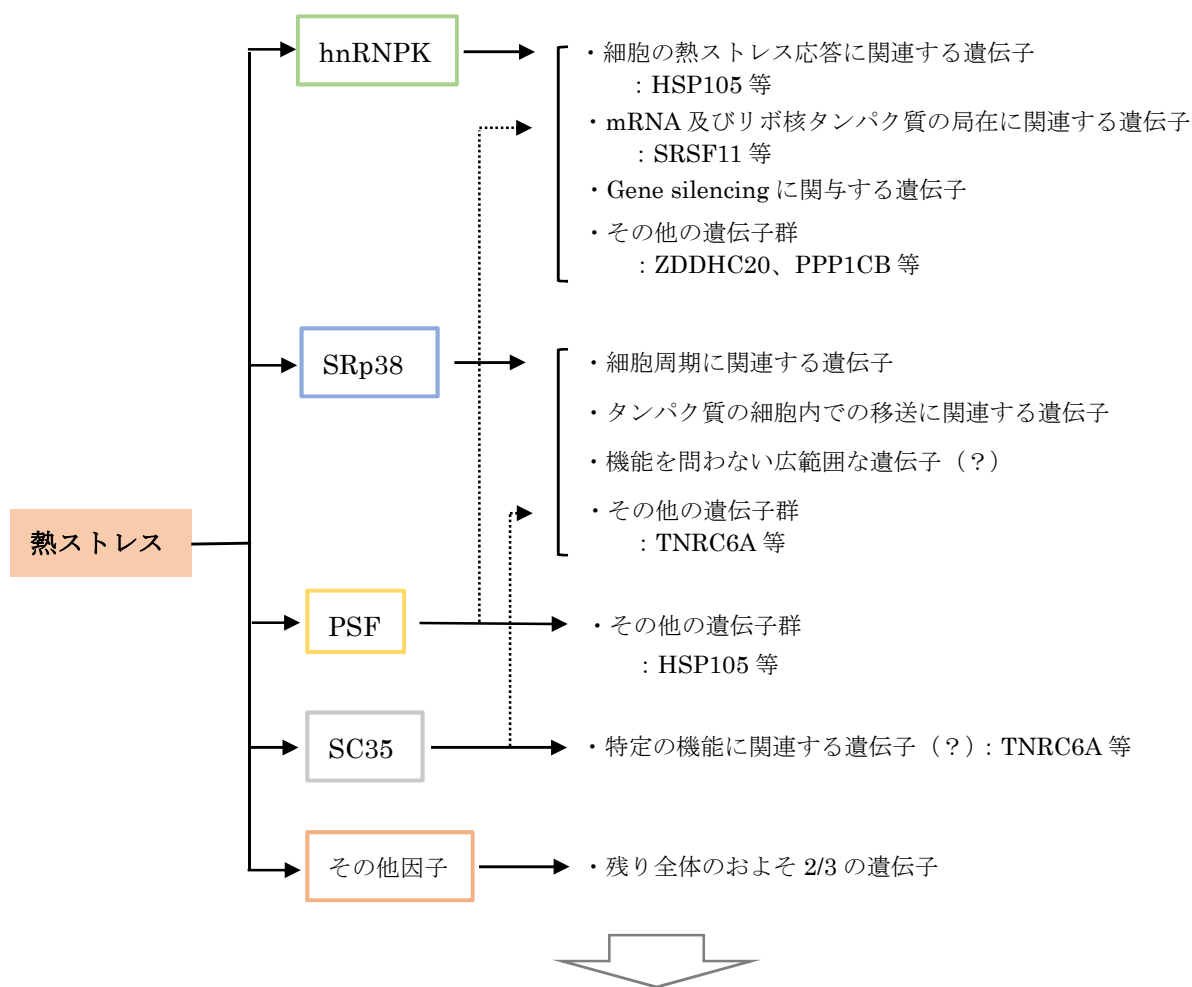


図 17 熱ストレス応答性のスプライシング制御を介した遺伝子発現制御

今回の検討から得られた知見をもとに推定される熱ストレス応答性のスプライシング制御を介した遺伝子発現制御を示す。相互作用のある因子の関連については、図が複雑になるため最小限の記載とした。



図 21 が示すとおり、今回の研究により、hnRNPK、PSF 及び SRp38 が多様な遺伝子において熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御に関与している様子が明らかとなった。しかし、今回特定された熱ストレス応答性の選択的スプライシングの中でこれら 3 因子が関与する制御は全体のおよそ 30%であり、残り 70%は依然不明である。今回得られた知見に加え、詳細な調査に着手できなかった SC35 などの他のスプライシング因子について今後検討を進めることにより、熱ストレス応答性の選択的スプライシングの全体像が明らかになるとともに、これらの選択的スプライシング制御が持つ生物学的な意義についても解明が期待されると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々に大変お世話になりました。心より感謝致します。8年前に博士課程に入学させて頂いたにも関わらず、会社の方針に変更があり単位修得退学となりそのままとなっていたところ、今回研究を再開することができたのは、ひとえに温かく応援して頂いた皆様のおかげと存じます。

井上邦夫先生には、素人同然の私に大変興味深い研究テーマを与えて頂いたとともに、最後まで導いていただき深く感謝致します。また、会社の仕事を言い訳に大変ご迷惑をおかけしてしまったこと深く反省いたします。ご指導いただいた今回の研究で得た経験を活かし、今後会社の仕事を通して社会に役立てるよう精進したいと思います。古川真理博士には、実際の試験の進め方、データ解析の方法のレクチャーやアドバイス、さらに解析の追試験まで実施頂き大変お世話になりました。古川博士の存在抜きで本研究活動を実施することは不可能だったと思います。改めて御礼申し上げます。坂本博先生には、今回の研究の再開のきっかけを頂き大変有難うございました。先生にお気遣い頂き、声掛け頂かなければ今回の私の研究はあり得ませんでした。坂本先生の研究室を卒業して以降も温かく見守って頂き大変感謝いたします。

協和発酵キリン株式会社の新井仁前所長並びに加納健二郎前原薬 1 グループ長には研究再開をご支援頂き、また蔵彦敏之所長並びに須澤敏行原薬 1 グループ長には研究継続についてご支援を頂き大変有難うございました。また、研究再開時に社内の調整及び手続きにご尽力いただきました研究推進グループの武内雅春さん、知財部の工藤幸一マネージャー、並びに生産企画部の進藤大紀マネージャーには大変お世話になりました。また、原薬 1 グループの長坂朋子さんには、社内での実験に当たり装置使用方法を教えていただく等実験継続に多大なご援助を頂き大変有難うございました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

最後に、今回の研究活動についていつも気にかけて支援してくれた母に感謝します。

## 参考文献

- [1] Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40 (12), 1413–5.
- [2] Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Yaspo, M.-L. (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, 321 (5891), 956–60.
- [3] Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822), 860–921.
- [4] Krämer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 367–409.
- [5] Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, 136 (4), 701–718.
- [6] Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 108–21.
- [7] Poulos, M. G., Batra, R., Charizanis, K., & Swanson, M. S. (2011). Developments in RNA splicing and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (1), a000778.
- [8] Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., Misteli, T., Aebi, M., Grewal, S. I. S. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144 (1), 16–26.
- [9] Buratti, E., & Baralle, F. E. (2004). Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (24), 10505–14.
- [10] Jin, Y., Yang, Y., & Zhang, P. New insights into RNA secondary structure in the alternative splicing of pre-mRNAs. *RNA Biology*, 8 (3), 450–7.

- [11] de la Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Chabot, B. (2003). A Slow RNA polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Molecular Cell*, 12(2), 525–532.
- [12] de la Mata, M., Lafaille, C., & Kornblihtt, A. R. (2010). First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(5), 904–12.
- [13] Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., & Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 996–1000.
- [14] Zhou, H.-L., Luo, G., Wise, J. A., & Lou, H. (2014). Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 701–13.
- [15] Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(9), 1197–211.
- [16] Long, J. C., & Cáceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical Journal*, 417(1), 15–27.
- [17] Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews. Genetics*, 3(4), 285–98.
- [18] Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical Journal*, 430(3), 379–92.
- [19] Chou, M.-Y., Underwood, J. G., Nikolic, J., Luu, M. H. ., & Black, D. L. (2000). Multisite RNA Binding and Release of Polypyrimidine Tract Binding Protein during the Regulation of c-src Neural-Specific Splicing. *Molecular Cell*, 5(6), 949–957.
- [20] Southby, J., Gooding, C., & Smith, C. W. (1999). Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2699–711.

- [21] Wagner, E. J., & Garcia-Blanco, M. A. (2001). Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), 3281–8.
- [22] Allen, S. E., Darnell, R. B., & Lipscombe, D. (n.d.). The neuronal splicing factor Nova controls alternative splicing in N-type and P-type CaV2 calcium channels. *Channels*, 4(6), 483–9.
- [23] Stamm, S. (2002). Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2409–16.
- [24] Cyphert, T. J., Suchanek, A. L., Griffith, B. N., & Salati, L. M. (2013). Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829(9), 905–15.
- [25] Biamonti, G., Caceres, J. F., Kramer, A., Matlin, A. J., Moore, M. J., Matlin, A. J., (2009). Cellular stress and RNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(3), 146–53.
- [26] Shin, C., Feng, Y., & Manley, J. L. (2004). Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*, 427(6974), 553–8.
- [27] Shi, Y., Manley, J. L., Benzinger, A., Muster, N., Koch, H. B., Yates, J. R., Wu, C. (2007). A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Molecular Cell*, 28(1), 79–90.
- [28] Stetler, R. A., Gan, Y., Zhang, W., Liou, A. K., Gao, Y., Cao, G., & Chen, J. (2010). Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 92(2), 184–211.
- [29] Takechi, H., Hosokawa, N., Hirayoshi, K., & Nagata, K. (1994). Alternative 5' splice site selection induced by heat shock. *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), 567–75.
- [30] Yasuda, K., Nakai, A., Hatayama, T., & Nagata, K. (1995). Cloning and

expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29718–23.

[31] Wakatsuki, T., & Hatayama, T. (1998). Characteristic expression of 105-kDa heat shock protein (HSP105) in various tissues of nonstressed and heat-stressed rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21(9), 905–10.

[32] Ishihara, K., Yasuda, K., & Hatayama, T. (1999). Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1444(1), 138–142.

[33] Yasuda, K., Ishihara, K., Nakashima, K., & Hatayama, T. (1999). Genomic Cloning and Promoter Analysis of the Mouse 105-kDa Heat Shock Protein (HSP105) Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(1), 75–80.

[34] Saito, Y., Yamagishi, N., & Hatayama, T. (2007). Different localization of Hsp105 family proteins in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, 313(17), 3707–3717.

[35] Saito, Y., Yamagishi, N., & Hatayama, T. (2008). Nuclear Localization Mechanism of Hsp105 beta and its Possible Function in Mammalian Cells. *Journal of Biochemistry*, 145(2), 185–191.

[36] Yamagishi, N., Fujii, H., Saito, Y., & Hatayama, T. (2009). Hsp105 $\beta$  upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS Journal*, 276(20), 5870–5880.

[37] 熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御機構の解析 井上研究室 河村有砂氏 修士論文 2013

[38] 熱ストレス応答によるスプライシング制御機構の解析 井上研究室 山田智子氏 修士論文 2010

[39] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.

- [40] Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494–498.
- [41] Wong, J. J.-L., Au, A. Y. M., Ritchie, W., & Rasko, J. E. J. (2016). Intron retention in mRNA: No longer nonsense: Known and putative roles of intron retention in normal and disease biology. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 38(1), 41–9.
- [42] Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols*, 8(8), 1551–1566.
- [43] Shalgi, R., Hurt, J. A., Lindquist, S., Burge, C. B., Biamonti, G., Caceres, J. F., Lindquist, S. (2014). Widespread inhibition of posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock. *Cell Reports*, 7(5), 1362–70.
- [44] Ninomiya, K., Kataoka, N., & Hagiwara, M. (2011). Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *The Journal of Cell Biology*, 195(1), 27–40.
- [45] Milner, C. M., & Campbell, R. D. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*, 32(4), 242–51.
- [46] Kim, Y.-K., Suarez, J., Hu, Y., McDonough, P. M., Boer, C., Dix, D. J., & Dillmann, W. H. (2006). Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy. *Circulation*, 113(22), 2589–97.
- [47] Gano, J. J., & Simon, J. A. (2010). A proteomic investigation of ligand-dependent HSP90 complexes reveals CHORDC1 as a novel ADP-dependent HSP90-interacting protein. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9(2), 255–70.
- [48] Parissi, V., Calmels, C., De Soultrait, V. R., Caumont, A., Fournier, M., Chaignepain, S., & Litvak, S. (2001). Functional Interactions of Human

Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase with Human and Yeast HSP60. *Journal of Virology*, 75(23), 11344–11353.

[49] Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y. F., Goshima, N., & Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *The EMBO Journal*, 31(20), 4020–34.

[49] Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E., & Monteiro, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics*, 86(6), 627–637.

[50] Kose, S., Furuta, M., Imamoto, N., Cotto, J., Fox, S., Morimoto, R. McKay, D. B. (2012). Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell*, 149(3), 578–89.

[51] Cyr, D. M. (2008). Swapping nucleotides, tuning Hsp70. *Cell*, 133(6), 945–7.

[52] Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F. U., Bracher, A., Andreasson, C., Fiaux, J. Hendrickson, W. A. (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 133(6), 1068–79.

[53] Bomsztyk, K., Denisenko, O., & Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays*, 26(6), 629–638.

[54] Shin, C., Manley, J. L., Akoulitchev, S., Reinberg, D., Barnard, D. C., Patton, J. G., Manley, J. L. (2002). The SR Protein SRp38 Represses Splicing in M Phase Cells. *Cell*, 111(3), 407–417. [55] *Mol Biol Cell*. 2006 Feb; 17(2): 886–894.

[55] Marin-Vinader, L., Shin, C., Onnekink, C., Manley, J. L., & Lubsen, N. H. (2005). Hsp27 Enhances Recovery of Splicing as well as Rephosphorylation of SRp38 after Heat Shock. *Molecular Biology of the Cell*, 17(2), 886–894.

[56] Romero, J. P., Muniategui, A., De Miguel, F. J., Aramburu, A., Montuenga, L., Pio, R., & Rubio, A. (2016). EventPointer: an effective identification of alternative splicing events using junction arrays. *BMC Genomics*, 17(1), 467.



[57] Chen, M., & Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(11), 741–54.

[58] Feng, Y., Chen, M., & Manley, J. L. (2008). Phosphorylation switches the general splicing repressor SRp38 to a sequence-specific activator. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(10), 1040–1048.

[59] Thisted, T., Lyakhov, D. L., & Liebhaber, S. A. (2001). Optimized RNA Targets of Two Closely Related Triple KH Domain Proteins, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and CP-2KL, Suggest Distinct Modes of RNA Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17484–17496.

[60] Venables, J. P., Koh, C.-S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L. Chabot, B. (2008a). Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 28(19), 6033–43.