

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 60197

氏名 今村 亮俊

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。  
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: オーフス大学 (国名: デンマーク)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
マウス発生段階における核内RNA分解の重要性の解明
3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名  
オーフス大学 Department of Molecular Biology and Genetics
5. 所期の目的の遂行状況及び成果... 書式任意 **書式任意 (A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注) 「6.研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

## 【研究目的】

本研究の目的は、哺乳動物細胞における核内long non-coding RNA(lncRNA)の分解経路の全体像を明らかにすると共に、核内lncRNA分解の生理的意義を発生・分化の観点から明らかにすることである。

本研究の背景として、この10年で、タンパク質をコードしないnon-coding RNA(ncRNA、非コードRNA)の存在が明らかとなった。この中でも200塩基以上の長さをもつlncRNAは核内に留まり、タンパク質・クロマチンと相互作用することで、生理機能を発揮していることが明らかとなってきた。このような真核生物でみられるlncRNAによる高精度な遺伝子発現制御には、プロセッシングや分解といった転写後のRNAの代謝が不可欠である。しかしながら、核内lncRNAの分解機構は、十分理解されていない。

核内lncRNA分解に関与する因子として、核内エキソソームが知られている。核内エキソソームは真核生物において主要な3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を担い、RNA代謝の様々な局面において中心的な役割を担っている。ターゲットRNAの認識には、核内エキソソームと結合するアクセサリ複合体が必要である。これまでに、核内エキソソームのターゲットRNAの認識に関与するアクセサリ複合体は、申請者の派遣先の研究室から報告されたNEXT及びPAXT複合体が知られているだけである(Lubas M, et al., Mol Cell.

2011、Meola M, et al., Mol Cell 2016)。NEXT複合体(MTR4-ZCCHC8-RBM7)は、mRNAの上流域を逆方向に転写されるPROMPTs (promoter upstream transcripts) の認識に、PAXT

複合体(MTR4-ZFC3H1-PABPN1)はpolyA tailを持つlncRNA(SNHGsなど)の認識に参与している。これまでに知られているエキソソームのアクセサリ複合体であるNEXT及びPAXT複合体のターゲットlncRNAはlncRNA全体の40%程であり、残りの60%の核内lncRNAの認識に参与するアクセサリ複合体の全貌は明らかにされていない。さらに、核内lncRNA分解の生理的意義については未だ不明である。申請者は、発生・分化の過程で核内lncRNAの発現がダイナミックに変動することに着目し、発生・分化の過程において核内lncRNA分解が重要な役割を担っていると仮説を立てた。そこで申請者は、(実験プラン1)エキソソームのアクセサリ複合体の新規発見と核内RNA分解因子の全体像の解明  
(実験プラン2)マウスの発生・分化過程における核内RNA分解の関与とその重要性の解明について、共免疫沈降法・質量分析・次世代シーケンスを駆使し、解明したいと考えている。

派遣先の研究室で既に発見されたアクセサリ複合体  
ターゲットlncRNAは全体の約40%

**【目的】残り60%のターゲットlncRNAを  
分解する新規アクセサリ複合体の発見**

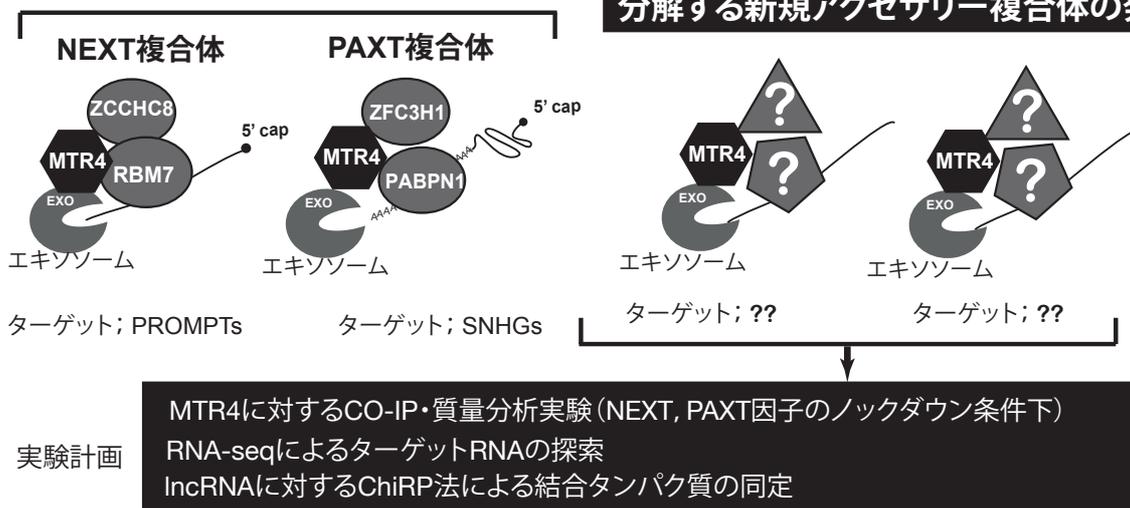


図1 実験プラン① エキソソームの新規アクセサリ複合体の網羅的発見

### 【研究遂行状況 - 新規アクセサリ複合体の発見】

1年目において、核内エキソソームとの結合に重要なMTR4に注目し、MTR4の発現パターンを解析するとmESCにおいて、Mtr4の発現が高いこと、一方でNEXT/PAXTタンパク質の発現は相関していなかったことが分かったため、これまでに見つかっていない相互作用因子が見つかるのではないかと考えた。

まず、Mtr4に対する抗体を用いてIPを行ってみたが、既に結合が分かっているタンパク質の相互作用が見られなかったことから、内在性Mtr4に対する抗体ではIPできないと考えた。そこで、FlagタグをN末もしくはC末に付加したMtr4の発現mES細胞をPiggyBacを用いて樹立した。それを用いて、IPを行ったところ、C末Fla-Mtr4ではIPが出来なかった。そこでN末Flag-Mtr4を用いてIPMSを行ったところ、200以上の相互作用因子タンパク質を見出すことが出来た。2年目においては、IPMSで見つかったタンパク質の中で、Zinc Fingerドメインを有するタンパク質とRNA結合ドメインを有するタンパク質にまず着目し、それぞれFlagタグを付加した細胞を作出した。作出出来た細胞において、IPを行った結果、全てのタンパク質において、Mtr4と結合することが確認できた。現在リバー

IPMSを行い、相互作用様式を網羅的に解析しようと試みている。また、発現しなかったタンパク質もあったため、それについてはPiggyBacの問題と考え、episomalベクターを購入した。現在episomalベクターをセレクションできるように改変している。さらに、CRISPRによるタグ挿入も試みている。

また、それぞれのターゲットRNAを見つけることも大切な課題である。新規相互作用タンパク質について、既にmESCにおいてKO細胞もしくはKDしたデータがあるものについては、再度集計し、新たなターゲットを見出している。それらのデータがないタンパク質については、KO細胞もしくはDegron細胞の作出も現在進めている。KO細胞もしくはDegron細胞は、それぞれRNA-seqに供し、ターゲットRNAを見出そうとしている。さらに、Mtr4と既に相互作用することが分かっているNEXT/PAXTのKO細胞も作出し、これらの細胞を用いてIPMSを行うことでさらなるMtr4相互作用タンパク質の同定を現在試みている。

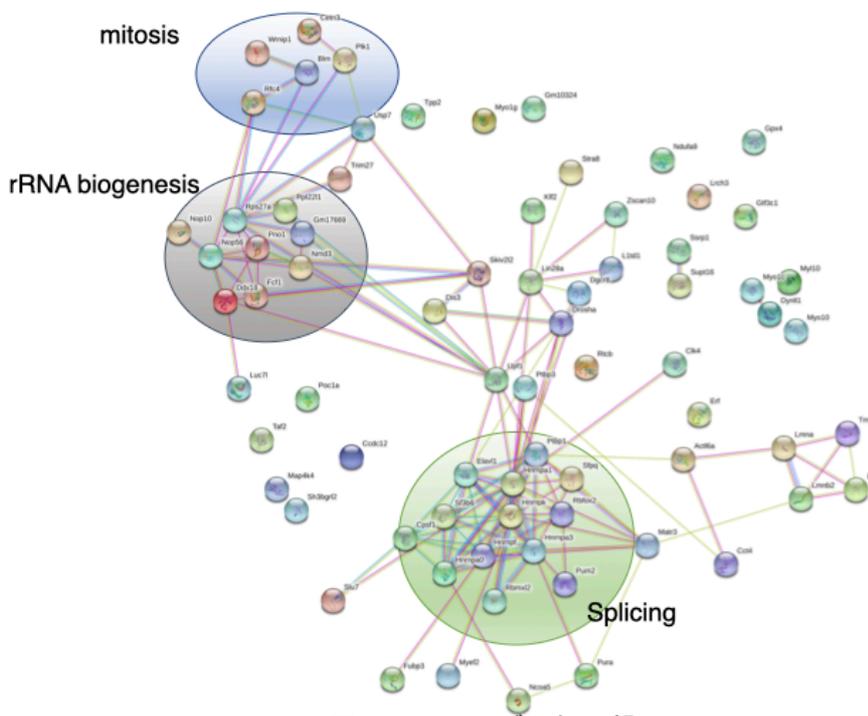


図2 Mtr4 IPMSデータ(一部)

【研究遂行状況 - 分化過程における核内RNA分解の重要性について】

まず、様々な分化について検討し、プロトコルの確立を行った。その結果、神経細胞へ分化させるプロトコルが一番再現よく分化出来たので、それを用いて実験を行っていくことにした。神経分化をする際に、PROMPTやSNHGの発現が高くなっていたことから、核内RNA分解が発現制御に関与しているのではないかと考え、エキソソームやアクセサリ複合体の発現量をウエスタンブロット法によって確認した。その結果、ある特定のタンパク質の発現が低下していることが分かった。また、mRNAレベル、pre-mRNAレベルでの低下はそれほど見られないことから、タンパク質レベルでの発現低下を考えて、分化における相互作用タンパク質の同定を行っている。また、分化に与える影響をみようとして、発現低下したタンパク質を発現誘導できる細胞を作出した。これらの細胞では神経細胞への分化に影響があるように見られた。さらに、NEXT/PAXTのKO細胞において

は、分化の過程で神経細胞様にならず、増殖スピードが早く、あたかもがん細胞のような細胞になった。これらの細胞を解析していくことで、神経細胞分化における核内RNA分解の重要性について解明できると考える。

【本研究の発表・学会への参加】

本研究は未だ学会への発表は行っていない。ただし、所属研究室が採択されたExo-Adaptというプロジェクトのメインのテーマとなったことで、オープニングミーティングでの発表を行った。