

医科学研究 I レポート

医学部医学科 1 年生

学籍番号：5401023B

氏名：岡田陽菜

所属講座：循環生理学

指導教員：青戸守准教授

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

謝辞

本実験遂行にあたりご指導いただきました、循環生理学講座の青戸守先生に感謝申し上げます。

タイトル

Pinin とスプライソソームタンパク質 SF3B3 との相互作用の解析

要約

Acin1 と Pinin は共にスプライソソーム複合体に含まれ、exon junction complex (EJC) と結合する ASAP 複合体や PSAP 複合体の構成因子として知られている。しかし、両タンパク質がスプライソソームのどの因子と結合するかは不明であった。我々は先行研究で、マウス胸腺 T 細胞や HEK293T 細胞において Acin1 がスプライソソーム構成タンパク質 SF3B3 と共沈することを見出した。本研究では、FLAG タグ付き Pinin 発現プラスミドを作製して HEK293T 細胞に過剰発現させ、Pinin も SF3B3 と共沈することを明らかにした。これらの結果から、Acin1 と Pinin は共に SF3B3 との結合を介してスプライソソームと相互作用している可能性が示唆された。

キーワード：Acin1、Pinin、SF3B3、スプライソソーム、ASAP 複合体、PSAP 複合体

緒言

Apoptotic chromatin condensation inducer 1 (Acin1) は、当初アポトーシス時のクロマチン凝縮に必要なタンパク質として同定された (Sahara ら 1999)。Acin1 はショウジョウバエの Sxl に存在する RNA 認識モチーフ (RRM) に類似した配列を持ち (Sahara ら 1999)、さらに多くのスプライシング因子に保存されたアルギニン/セリンリピート (RS) ドメインを有する (Boucher ら 2001)。これらの構造的特徴から、Acin1 はアポトーシスだけでなく mRNA プロセッシングにも関与することが示唆されてきた。実際、Acin1 は exon junction complex (EJC) に結合する因子として同定されている (Tange ら 2005)。EJC は 4 つのタンパク質 (eIF4A3、MAGOH、Y14、MLN51) からなる複合体であり、pre-mRNA スプライシング中に exon-exon junction の 20-24 ヌクレオチド上流に結合し、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD)、mRNA の核外輸送や局在制御に重要な役割を果たす (Le Hir ら 2016)、Acin1 は EJC と相互作用する apoptosis- and splicing-associated protein (ASAP) 複合体の構成因子でもある (Schwerk ら 2003)。ASAP 複合体は、ヒストン脱アセチル化酵素 Sin3A 複合体の構成要素である Sin3A-associated protein, 18 kDa (SAP18)、および pre-mRNA スプライシングのアクティベーターである RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (RNPS1) を含み、スプライシング制御に機能する (図 1)。これらの知見と一致して、Acin1 は機能的スプライソソームの構成因子としても同定されており (Rappsilber ら 2002、Zhou ら 2002)、増殖期 HeLa 細胞の mRNA-タンパク質複合体中にも検出されている (Castello ら 2012)。したがって、Acin1 は EJC 複合体の一部としてだけ

でなく、スプライシング制御全般において重要な役割を担っていると考えられる。しかしながら、Acin1 がスプライソソームのどの構成因子と直接結合しているかは未解明である。

一方、Pinin は当初、デスモソームと中間フィラメント複合体を強化するデスモソーム関連タンパク質として同定された (Ouyang ら 1992, 1996)。その後の免疫蛍光染色解析により、Pinin は培養細胞、血液細胞、両生類および哺乳類の全固形組織において核内に発現することが確認され、広範に発現する核タンパク質であることが示された (Brandner ら 1997)。さらに、Pinin は RNA スプライシング因子を含む核スペckルに局在することが明らかとなり (Brandner ら 1998)、スプライシングへの関与が示唆された。実際、Murachelli らは Pinin が Acin1 と同様に RNPS1 および SAP18 と結合し、PSAP 複合体を形成することを報告している (Murachelli ら 2012) (図 1)。Pinin は PSAP 複合体として EJC と結合するのみならず、スプライソソーム中にも検出されることから、Acin1 と同様にスプライシング制御全般において機能していると考えられる。しかし、Pinin についてもスプライソソームのどの構成因子と直接結合しているかは不明である。

私の所属する研究室では、マウス胸腺 T 細胞抽出液に対する Acin1 免疫沈降物中に含まれるスプライソソーム構成因子を解析した結果、調べた因子の中で SF3B3 タンパク質のみが Acin1 と共沈することを見出した (未発表データ)。この結果は、Acin1 が SF3B3 との結合を介してスプライソソームと相互作用している可能性を示唆する。そこで本研究では、Pinin も Acin1 と同様に SF3B3 と相互作用するか否かを検証するため、FLAG タグ付きヒト Pinin 発現プラスミドを作製し、培養細胞における過剰発現系と抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降-ウエスタンブロット解析を実施したので、その結果を報告する。

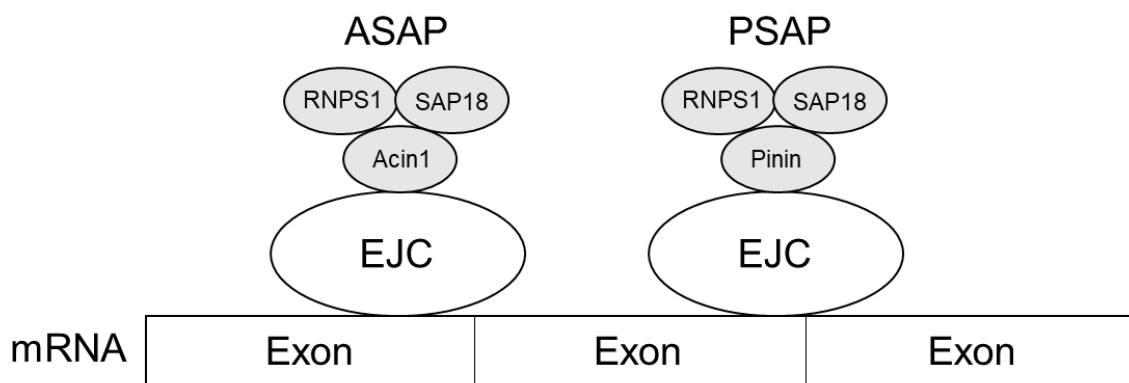


図 1 ASAP 複合体と PSAP 複合体の模式図

Acin1 は、RNPS1、SAP18 と結合し、ASAP 複合体を形成している。また、Pinin も RNPS1、SAP18 と結合し、PSAP 複合体を形成している。ASAP 複合体及び PSAP 複合体は EJC (exon junction complex) と結合し、mRNA の代謝に関与していると考えられている。

材料と方法

抗体

抗 DYKDDDDK (FLAG) タグマウスモノクローナル抗体 (018-22381) は FUJIFILM 社より、抗 FLAG ウサギポリクローナル抗体 (F7425) は Merck 社より購入した。抗 SF3B3 ウサギポリクローナル抗体 (14577-1-AP) は proteintech 社より購入した。Alpha Tubulin マウスモノクローナル抗体 (66031-1-Ig) は proteintech 社より購入した。抗 Lamin B1 マウスモノクローナル抗体 (33-2000) は ThermoFisher SCIENTIFIC 社より購入した。HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (SA00001-1) 及び HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (SA00001-2) は proteintech 社で購入した。

細胞培養

HeLa 細胞、HEK293T 細胞、HepG2 細胞、K562 細胞は、37°C、5% CO₂ の条件で、10% fetal calf serum (FCS)、100 units/mL penicilin、100 µg/mL streptomycin を含む培地中で培養した。HeLa 細胞、HEK293T 細胞、HepG2 細胞の培養には DMEM を、K562 細胞の培養には RPMI-1640 を基本培地として用いた。

培養細胞からの総 RNA の抽出と 1st strand 合成

Pinin 遺伝子のクローニングのため、Hela 細胞、HEK293T 細胞、HepG2 細胞、K562 細胞から総 RNA を抽出した。抽出には NucleoSpin RNA キット (U0955S、TaKaRa 社) を用いた。操作はマニュアルに従った。Oligo (dT)20 プライマーを用いた 1st strand 合成には、SuperScript III First-Strand Synthesis System (18080051、ThermoFisher SCIENTIFIC) を使用した。操作はマニュアルに従った。

PCR 法による各種培養細胞での Pinin 遺伝子の発現確認

4 つの培養細胞株由来の 1st strand cDNA それぞれに対して hPinin-fwd2 プライマー (GGAACCGGCGAATATTTGGC) と hPinin-rev2 プライマー (CCCTCTTCTTGTTCCGCCTT) 及び TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は 98°C で 10 秒、60°C で 15 秒、68°C で 1 分のサイクルを 25 回繰り返した。その結果 508 bp のバンドを得た。

PCR 法による FLAG タグ付きヒト Pinin 遺伝子の増幅

HEK293T 細胞由来の 1st strand cDNA に対して FLAG-hPinin-fwd1 プライマー (CGGCTCGAGACCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGGGAGCGGTGCGCCG TGAGAACTTTG) と hPinin-rev1 プライマー (GCCCTCGAGCCTGGCTTCTTCCATTAACGCC) 及び KAPA HiFi HotStart

ReadyMix (日本ジェネティクス) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は 98°C で 20 秒、65°C で 15 秒、72°C で 2 分 20 秒のサイクルを 30 回繰り返した。その結果 2,214 bp のバンドを得た。

コロニースクリーニング

FLAG タグ付きヒト Pinin 遺伝子の pBluescript SK へのサブクローニングの際には大腸菌のコロニーを爪楊枝で単離し、100 μ g/mL アンピシリンを含む LB 培地 100 μ L に懸濁した。この懸濁液に対して hPinin-fwd2 プライマーと hPinin-rev2 プライマー及び TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は 98°C で 10 秒、65°C で 15 秒、68°C で 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。その結果 508 bp のバンドを得た。

FLAG タグ付きヒト Pinin/pCAGGS ベクターの作成の際には大腸菌懸濁液に対して pCAGGS 5'プライマー (TACAGCTCCTGGGCAAC) と hPinin-rev2 プライマー及び TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は 98°C で 10 秒、55°C で 15 秒、68°C で 30 秒のサイクルを 30 回繰り返した。その結果 1,025 bp のバンドを得た。

HEK293T 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクション前日に、コラーゲンコートした 35 mm ディッシュ 1 枚当たり 0.9×10^6 個の HEK293T 細胞を撒きこんだ。トランスフェクション当日、予め培地を 10% FCS を含み、penicillin と streptomycin を含まない DMEM、1 mL に交換した。発現ベクターを 100 μ L DMEM に懸濁した後、1 mg/mL PEI_{max} (24765、Polyscience 社) を 8 μ L 添加し、穏やかに混和し、室温で 10 分間静置した。その後、各ディッシュに全量を添加し、37°C、5% CO₂ の条件で 5 時間培養した後、培地を 10% FCS を含み、penicillin と streptomycin を含まない DMEM、2 mL に交換した。

細胞質分画と核分画の調製

培養細胞をディッシュ上で氷冷 PBS(-)、1 mL で洗浄した後、氷冷 PBS(-)、1 mL を加えて、セルスクレイパーで回収した。その後、4°C、400 x *g* で 5 分間スイングローターを用いて遠心し、上清を捨てて氷冷 PBS (-) を加える工程を 3 回繰り返した。その後、アングルローターで 4°C、400 x *g* で 5 分間遠心し、完全に上清を取り除いた。沈殿物 (細胞) を 175 μ L Lysis Buffer (10 mM Hepes-NaOH [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, Protease Inhibitor Cocktail) で懸濁した後、175 μ L Lysis Buffer + 80 μ g/mL digitonin (最終 digitonin 濃度 40 μ g/mL) を加えてよく攪拌し、氷上で 5 分間静置した。これを 500 x *g* で、4°C、5 分間遠心して上清と沈殿に分離した。上清をさらに 18,000 x *g*、4°C で 10 分間遠心して得られた上清を細胞質分画として回収した。沈殿は 1 度 350 μ L

Lysis Buffer で洗浄後、175 μ L Lysis Buffer で懸濁した後、175 μ L Lysis Buffer + 1% IGEPAL CA-630 (56741、Merck 社) + 0.65 M NaCl (最終 IGEPAL CA-630 濃度 0.5%、最終 NaCl 濃度 0.4 M) に懸濁し、氷上で 30 分間静置した。その後、18,000 x g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した上清を核分画とした (図 2)。

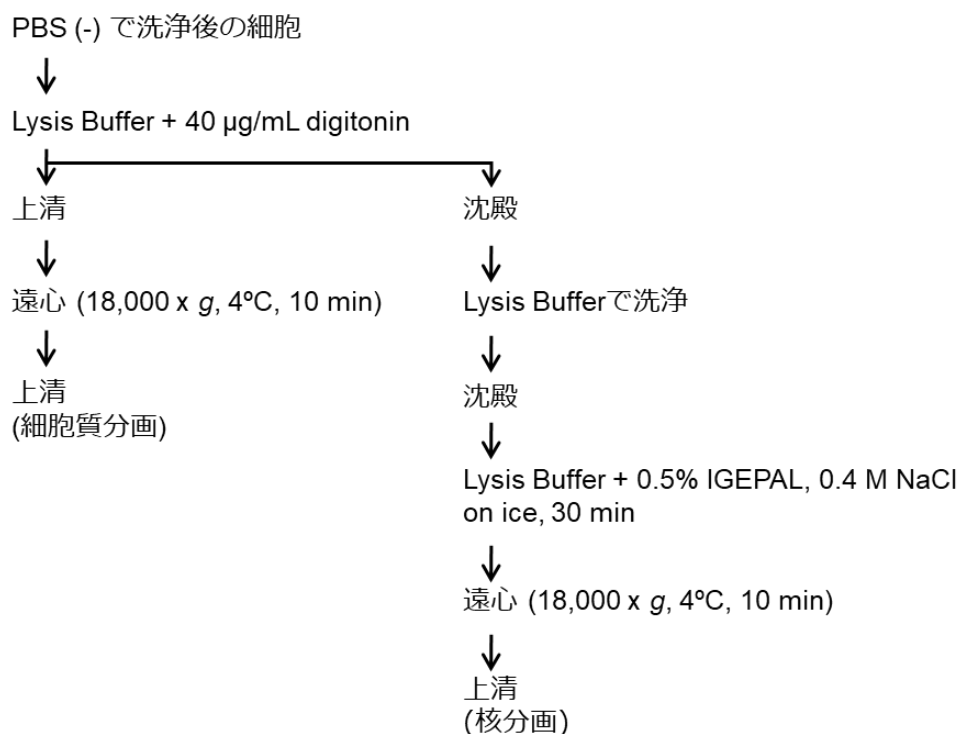


図 2 細胞質分画と核分画の模式図

タンパク定量

BCA 法を用いた (Pierce BCA Protein Assay)。

免疫沈降

調製した核分画に対して最終濃度 8 μ g/mL RNase A と最終濃度 8 U/mL RNase T1 を加えたものを用意する。各サンプルに 2 μ g の抗 DYKDDDDK (FLAG) タグマウスモノクローナル抗体を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。25 μ L Protein G Mag Sepharose を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和した。500 μ L の Wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10% glycerol, 0.25 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 0.5% IGEPAL CA-630) で 4 回洗浄した。Wash buffer を完全に取り除いた後、90 μ L の SDS sample buffer (63 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 5% sucrose, 0.0067% bromophenol blue) + 0.4M NaCl を加えて、5 分間 boil した。

ウエスタンブロット

調製した HEK293T 細胞の細胞質分画と、それに相当する核分画を SDS Sample Buffer (63 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% 2-mercaptethanol, 2% SDS, 5% sucrose, 0.005% BPB) 中で 5 分間 boil し、SDS-PAGE (5-20% gradient gel) を行った。

PVDF membrane に転写後、5% skim milk を含む TPBS (0.1% Tween 20 を含む PBS) で室温、1 時間 blocking を行い、1 次抗体と 4 °C、一晩反応させた。反応後の membrane に対して、TPBS を用いた 5 分間の洗浄を 4 回行った後、2 次抗体と室温で、1 時間反応させた。その後、TPBS による 5 分間の洗浄を 4 回、PBS による 5 分間の洗浄を 1 回行い、化学発光試薬 (イムノスター-LD, FUJIFILM 社) を用いて検出した。

結果

これまで Acin1 がスプライソソームに含まれるどのタンパク質と直接結合しているか明らかとなっていなかったが、最近、私の所属する研究室では Acin1 がマウス胸腺 T 細胞や HEK293T 細胞においてスプライソソーム構成タンパク質 SF3B3 と共沈することを見出している (未発表データ)。そこで私は Acin1 と同様に EJC 周辺因子である Pinin も SF3B3 と共沈するかどうか検証することを計画した。

まず Pinin 遺伝子をクローニングするために 4 つの培養細胞株 (HeLa 細胞、HEK293T 細胞、HepG2 細胞、K562 細胞) から総 RNA を回収し、ヒト Pinin 遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った (図 3)。4 つの培養細胞株すべてにおいて目的の 508 bp のバンドが確認された。これまでの Acin1 タンパク質の解析において HEK293T 細胞を用いてきたのでヒト Pinin 遺伝子のクローニングにも HEK293T 細胞から調製した総 RNA を用いることにした。

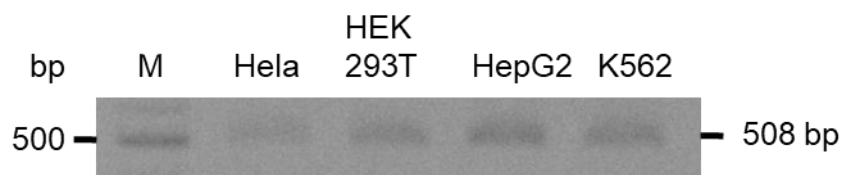


図 3 RT-PCR による各種培養細胞株における Pinin mRNA の発現確認

HeLa 細胞、HEK293T 細胞、HepG2 細胞、K562 細胞それぞれから総 RNA を抽出し、ヒト Pinin 遺伝子に特異的なプライマー (hPinin-fwd2 プライマーと hPinin-rev2 プライマー) を用いて RT-PCR を行った結果、すべてにおいて目的とする 508 bp 付近のバンドが検出された。「M」はサイズマーカーを示す。

FLAG-Pinin 発現ベクターの作成

HEK293T 細胞由来の 1st strand cDNA に対して FLAG-hPinin-fwd1 プライマーと hPinin-rev1 プライマーを用いて PCR 反応を行った結果、2,214 bp のバンドを得た (図 4)。

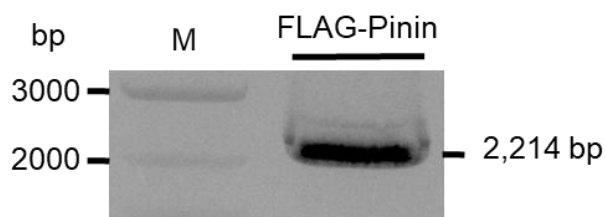


図 4 FLAG タグ付きヒト Pinin 遺伝子の増幅

N 末端に FLAG タグをつけるためのプライマー (FLAG-hPinin-fwd1 プライマーと hPinin-rev1 プライマー) を用いて PCR を行った結果、2,214 bp 付近のバンドが得られた。このバンドから DNA を抽出し、pBluescript へのクローニングに用いた。「M」はサイズマーカーを示す。

このバンドをアガロースゲルから抽出し、ポリヌクレオチドキナーゼによる末端のリン酸化後、制限酵素 EcoRV で切断し脱リン酸化処理を行った pBluescript SK とのライゲーション反応を行った。このライゲーション反応液を用いて大腸菌 DH5 α の形質転換を行った。得られた大腸菌のコロニー 10 個に対して、hPinin-fwd2 プライマーと hPinin-rev2 プライマーを用いて PCR 反応によるスクリーニングを行った結果、8 個のコロニーにおいて目的の 508 bp のバンドが得られた (図 5)。



図 5 FLAG-Pinin/pBluescript で形質転換した大腸菌コロニーの PCR によるスクリーニング

単離した大腸菌コロニーの懸濁液に対して Pinin 遺伝子に特異的なプライマー (hPinin-fwd2 プライマーと hPinin-rev2 プライマー) を用いた PCR を行った。その結果、単離した 10 個のコロニー中、8 個で目的とする 508 bp 付近のバンドが得られた。レーン番号は単離したコロニーの番号に相当する。「M」はサイズマーカーを示す。

このうち 3 番目、4 番目、6 番目のコロニーを用いてプラスミド DNA をミニプレップし、塩基配列の解析を行った結果、3 番目のサンプルの塩基配列はうまく読めていなかったが、4 番目と 6 番目のサンプルについては変異が入ることなく正しく増幅されていることがわか

った(データ省略)。回収された DNA 量の多かった 6 番目のサンプルに対して制限酵素 XhoI による切断を行った結果、約 3,000 bp の pBluescript SK のバンドと目的とする約 2,000 bp の fragment のバンドが得られた (図 6)。

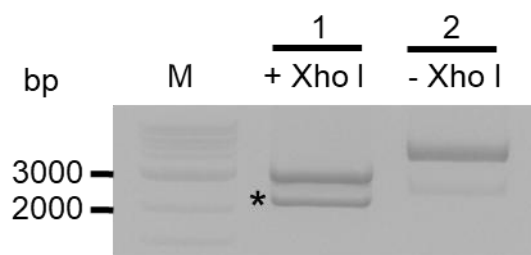


図 6 FLAG-Pinin/pBluescript の制限酵素 XhoI による切断

塩基配列に変異が入っていないことが確認された図 5 の 6 番のコロニーから単離したプラスミド DNA に対して制限酵素 XhoI による切断を行った。切断後のサンプルをレーン 1 に、切断前のサンプルをレーン 2 に示す。レーン 1 の約 2,000 bp のバンド (*) をゲルから切り出し、pCAGGS へのサブクローニングに用いた。「M」はサイズマーカーを示す。

得られた約 2,000 bp の fragment をアガロースゲルから回収し、XhoI で切断し脱リン酸化処理を行った pCAGGS ベクターとのライゲーション反応を行い、大腸菌を形質転換した。得られた大腸菌のコロニー 13 個に対して、pCAGGS 5'プライマーと hPinin-rev2 プライマーを用いて PCR 反応によるスクリーニングを行った結果、5 個のコロニーにおいて目的の約 1,000 bp のバンドが得られた (図 7)。



図 7 FLAG-Pinin/pCAGGS で形質転換した大腸菌コロニーの PCR によるスクリーニング

単離した大腸菌コロニーの懸濁液に対して pCAGGS ベクターに特異的なプライマー (pCAGGS 5'プライマー) とヒト Pinin 遺伝子に特異的なプライマー (hPinin-rev2 プライマー) を用いた PCR を行った。その結果、単離した 13 個のコロニー中、5 個で目的とする 1,025 bp 付近のバンドが得られた。レーン番号は単離したコロニーの番号に相当する。「M」はサイズマーカーを示す。

FLAG-Pinin タンパク質の発現確認

図 7 でバンドが検出されたコロニーのうち、2 番目 (レーン 2) と 4 番目 (レーン 4) と

11 番目（レーン 11）のコロニーから DNA を抽出し、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後、細胞を回収し、digitonin 処理によって細胞質分画を調製した。さらに digitonin 不溶性分画を 0.5% IGEPAL CA-630 および 0.4M NaCl で処理することによってクロマチンに結合したタンパク質を含む核分画を調製した。核マーカである Lamin B1 および細胞質マーカである alpha-tubulin に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより核分画と細胞質分画が分離できていることが確認できた（図 8）。抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロットの結果、大部分の FLAG-Pinin タンパク質が目的の分画である核分画に検出された（図 8 レーン 6, 7, 8）。

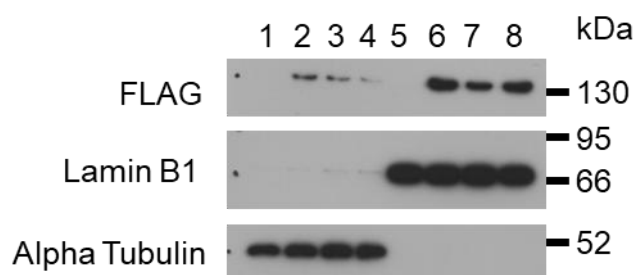


図 8 FLAG-Pinin タンパク質の発現確認

作製した FLAG-Pinin/pCAGGS あるいは pCAGGS ベクターを HEK293T 細胞に transfect し、24 時間後に細胞質分画と核分画を調製し、抗 FLAG 抗体、核マーカ抗 Lamin B1 抗体、細胞質マーカ抗 alpha-tubulin 抗体によるウエスタンブロットを行った。FLAG-Pinin の多くは核分画に検出され（レーン 6-8）、わずかに細胞質分画にも検出された（レーン 2-5）。レーン 1、レーン 5：pCAGGS ベクター、レーン 2、レーン 6：FLAG-Pinin/pCAGGS (#2)、レーン 3、レーン 7：FLAG-Pinin/pCAGGS (#4)、レーン 4、レーン 8：FLAG-Pinin/pCAGGS (#11)。

FLAG-Pinin タンパク質と SF3B3 タンパク質の共沈確認

FLAG-Pinin タンパク質の核分画での発現が確認できたライセート（図 8 レーン 6）を使用し、FLAG-Pinin 免疫沈降物中に SF3B3 タンパク質が検出されるかどうかを免疫沈降-ウエスタンブロット実験により確認した。その結果、対照として用いた FLAG-Acin1 の場合（図 9 Lysate レーン 3、IP レーン 3）と同様、FLAG-Pinin 免疫沈降物中に SF3B3 タンパク質が検出された（図 9 Lysate レーン 2、IP レーン 2）。この結果から、Acin1 タンパク質だけでなく Pinin タンパク質もスプライソソームの構成因子である SF3B3 タンパク質と相互作用することが示唆された。

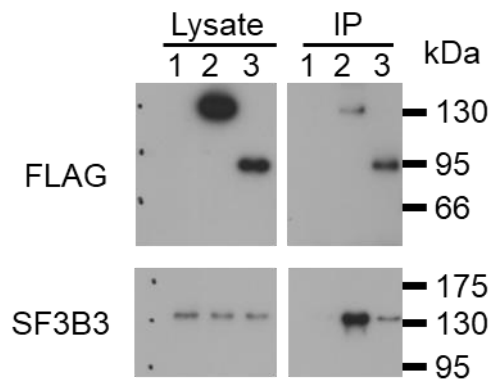


図9 FLAG-Pinin は Acin1 同様 SF3B3 と共沈する

pCAGGS ベクター (レーン 1)、FLAG-Pinin/pCAGGS (#2) (レーン 2)、FLAG-Acin1/pCAGGS (レーン 3) をトランスフェクトした HEK293T 細胞より調製した核分画に対して抗 FLAG マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。各パネルは、核分画 (Lysate) および免疫沈降物 (IP) に対して一次抗体として抗 FLAG ウサギポリクローナル抗体、抗 SF3B3 ウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果を示す。その結果、Pinin タンパク質は Acin1 タンパク質同様に SF3B3 タンパク質と共沈することが分かった。

考察

mRNA 前駆体 (pre-mRNA) のスプライシングは、pre-mRNA、U1、U2、U4/U6、U5 snRNP、および多数の非 snRNP タンパク質を含む、非常に動的で複雑な分子機械であるスプライソソームによって触媒される (図 10)。最初に pre-mRNA の 5' スプライス部位 (5' SS) に U1 snRNP が、分岐部位 (A) に SF1 と U2AF が結合することにより pre-mRNA 上にスプライソソーム E 複合体が形成される。その後、SF1 と U2AF が U2 snRNP と入れ替わることにより A 複合体が形成され、以降順に必要なタンパク質 (複合体) がスプライソソームに取り込まれ、不必要なタンパク質 (複合体) が取り除かれることにより大きく構成因子並びに立体構造を変化させ、最終的に pre-mRNA からイントロンが除去され、エクソンが連結される (Wilkinson ら 2020)。

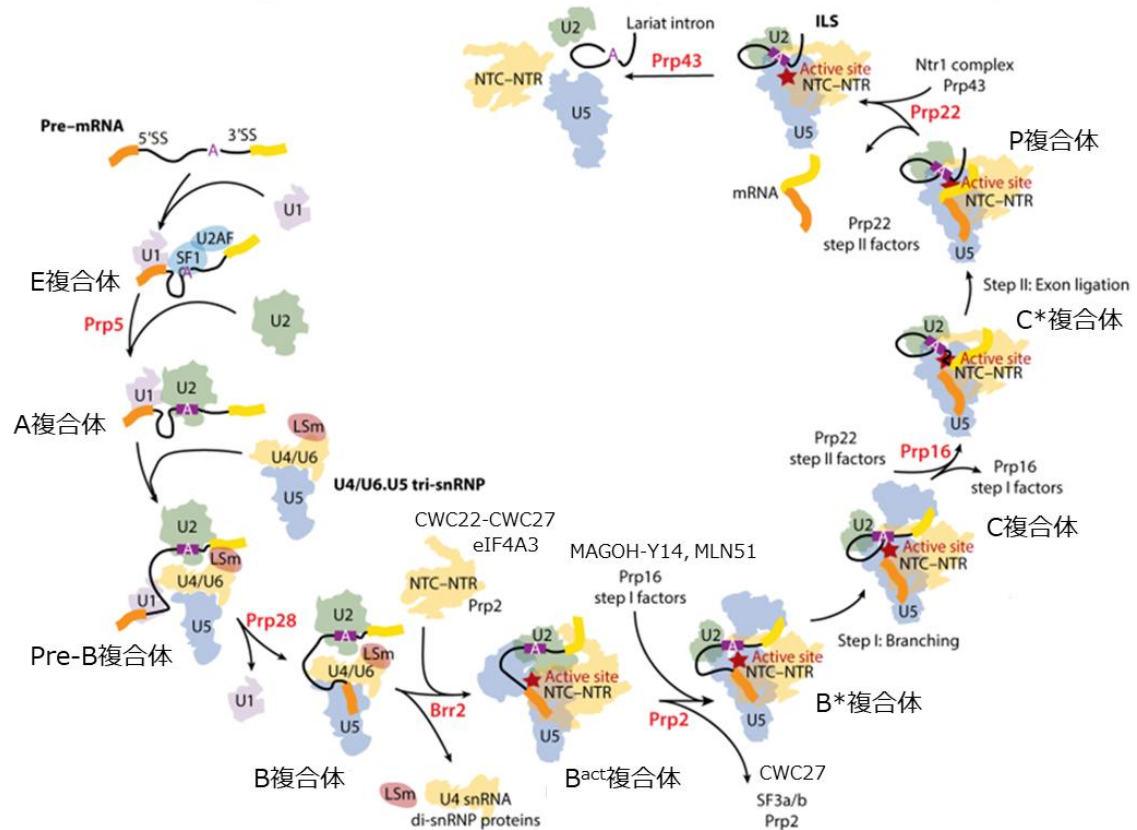


図10 ヒトのスプライシングサイクルの模式図

スプライソソームは高度に秩序立った方法で組み立てられ、活性部位を形成するために活性化され、分岐反応とエクソン連結反応を実行し、mRNA（連結されたエクソン）を放出するために大規模に再構築され、その後スプライソソームは分解される。

略号：ILS, intron-lariat spliceosome; mRNA, messenger RNA; NTC, Prp19-associated complex; NTR, Prp19-related complex; snRNA, small nuclear RNA; snRNP, small nuclear ribonucleoprotein; SS, splice site.

Wilkinson, M. E., Charenton, C., and Nagai, K. RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu Rev Biochem* 89 (2020) 359-388. より引用改変

Acin1 や Pinin が結合することが知られている EJC は、スプライシング過程において段階的に形成される (Busetto ら 2020)。まず、B^{act} 複合体中の CWC22-CWC27 複合体に EJC 構成因子である eIF4A3 が結合し、その後 B^{act} 複合体から B* 複合体あるいは C 複合体への移行に際して CWC27 が解離する。続いて、EJC 構成因子である MAGOH-Y14 複合体と MLN51 が結合することで、成熟した EJC が形成される。したがって、Acin1 や Pinin は、スプライソソーム中の CWC22 を足場として結合した EJC を介して C 複合体やそれ以降の段階のスプライソソームに含まれると考えられる。しかしながら、EJC を含まない A 複合

体、pre-B 複合体、B 複合体においても Acin1 や Pinin の存在が確認されており (Deckert ら 2006、Behzadnia ら 2007、Bessonov ら 2008, 2010、Boesler ら 2016)、これまで Acin1 や Pinin がスプライシングの初期段階においてスプライソソーム中のどのタンパク質と相互作用しているかは不明であった。

私の所属する研究室ではこれまでに Acin1 が SF3B3 と共沈することを見出している (未発表データ)。今回、私は Acin1 だけでなく Pinin も SF3B3 と共沈することを世界で初めて見出した。SF3B3 は U2 snRNP を構成するタンパク質複合体の一つである SF3b 複合体に含まれており、ヒトスプライソソームの A 複合体、pre-B 複合体、B 複合体、B^{act} 複合体に含まれることが知られている (Deckert ら 2006、Behzadnia ら 2007、Bessonov ら 2008, 2010、Boesler ら 2016)。一方で、B*複合体への移行に際して SF3B3 はスプライソソームから解離することが報告されている (Zhang ら 2018)。この知見は、A 複合体から B^{act} 複合体において Acin1 や Pinin が U2 snRNP 中の SF3B3 を介してスプライソソームを構成している可能性を強く示唆するものである。すなわち、Acin1 や Pinin は、スプライシングの初期段階では SF3B3 を介してスプライソソームに局在し、B*複合体以降では EJC を介してスプライソソームに局在するという、二段階の結合様式を持つと考えられる。本研究成果は、これまで不明であった EJC が導入される前の段階のスプライソソーム中での Acin1 や Pinin の存在様式について新たな知見を加えるものであり、スプライシング過程におけるこれらタンパク質の動態の全体像を理解する上で重要な意義を持つと考えられる。

今後は、Acin1 や Pinin と SF3B3 の相互作用部位を同定し、その相互作用の分子基盤を明らかにすることが重要である。さらに、この相互作用の阻害が細胞の増殖や分化に与える影響について解析することによって、細胞の増殖や分化を制御する新たな薬剤の開発につながりたいと考えている。

参考文献

Behzadnia, N., Golas, M. M., Hartmuth, K., Sander, B., Kastner, B., Deckert, J., et al. Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *EMBO J.* 26 (2007) 1737-1748.

Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., and Lührmann, R. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452 (2008) 846-850.

Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M. M., Sander, B., Will, C. L., et al. Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* 16 (2010)

2384-2403.

Boesler, C., Rigo, N., Anokhina, M. M., Tauchert, M. J., Agafonov, D. E., Kastner, B. et al. A spliceosome intermediate with loosely associated tri-snRNP accumulates in the absence of Prp28 ATPase activity. *Nat Commun* 7 (2016) Vol. 7 11997.

Boucher, L., Ouzounis, C.A., Enright, A.J., and Blencowe, B.J. A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* 7 (2001) 1693-1701.

Brandner, J. M., Reidenbach, S., and Franke, W.W. Evidence that “pinin”, reportedly a differentiation-specific desmosomal protein, is actually a widespread nuclear protein. *Differentiation* 62 (1997) 119–127.

Brandner, J. M., Reidenbach, S., Kuhn, C., W.W. and Franke, W.W. Identification and characterization of a novel kind of nuclear protein occurring free in the nucleoplasm and in ribonucleoprotein structures of the “speckle” type, *Eur. J. Cell Biol.* 75 (1998) 295–308.

Buesetto, V., Barbossa, I., Basquin, J., Marquet, É., Hocq, R., Hennion, M., et al. Structural and functional insights into CWC27/CWC22 heterodimer linking the exon junction complex to spliceosomes. *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 5670-5683.

Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149 (2012) 1393-1406.

Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C. L., Kastner, B., et al. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* 26 (2006) 5528-5543.

Le Hir, H., Saulière, J., and Wang, Z. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17 (2016) 41-54

Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., and Steitz, J.A. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293 (2001)

1836-1839.

Murachelli, A. G., Ebert, J., Basquin, C., Le Hir, H., and Conti E. The structure of the ASAP core complex reveals the existence of a Pinin containing PSAP complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (2012) 378-387.

Ouyang, P., and Sugrue, S.P. Characterization of pinin, a novel protein associated with the desmosome-intermediate filament complex, *J. Cell Biol.* 135 (4) (1996) 1027–1042.

Ouyang, P., and Sugrue, S.P. Identification of an epithelial protein related to the desmosome and intermediate filament network, *J. Cell Biol.* 118 (6) (1992) 1477–1488.

Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., and Mann, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12 (2002) 1231-1245.

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401 (1999) 168-173.

Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., et al. ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 2981-2990.

Tange, T.O., Shibuya, T., Jurica, M.S., and Moore, M.J. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 11 (2005) 1869-1883.

Wilkinson, M. E., Charenton, C., and Nagai, K. RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu Rev Biochem* 89 (2020) 359-388.

Zhang, X., Yan, C., Zhan, X., Li, L., Lei, J., and Shi, Y. Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. *Cell Res* 28 (2018) 307-322.

Zhou, Z., Licklider, L.J., Gygi, S.P., and Reed, R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419 (2002) 182-185.