

## 平成 30 年度 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	がん細胞で RNA 顆粒が融合して核内構造体を形成するメカニズムの解明	
新規・継続の別	新規	
研究代表者	所属	立命館大学・生命科学部
	職名・氏名	助教・萬年太郎
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	
	職名・氏名	
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	教授・廣瀬哲郎
概要 (100～150 字程度)	<p>核内 RNA 顆粒(Sam68 構造体と DBC1 構造体)の新規構成因子を同定するため、核内 RNA 顆粒が形成される HeLa 細胞、U2OS 細胞、HCT116 細胞の構造体タンパク質安定発現株を用いて解析をおこなった。HeLa 細胞で形成される Sam68 構造体の 3 つの構成タンパク質を免疫沈降後、LC-MS/MS により相互作用タンパク質を解析したところ、Sam68 で 96 個、DBC1 で 70 個、HNRNPD で 21 個のタンパク質を同定した。また、U2OS 細胞で形成される DBC1 構造体の構成タンパク質の DBC1 の相互作用タンパク質を 27 個のタンパク質を同定した。さらに、HCT116 細胞においては DBC1 構造体の新規構成タンパク質を 2 個同定した。</p>	
研究目的 (300 字程度)	<p>ノンコーディング RNA (ncRNA) を骨格として形成される核内構造体 (核内 RNA 顆粒) が重要な生理機能に関与していることが近年明らかになってきている。核内 RNA 顆粒は RNA-タンパク質相互作用を介して形成されることから、これらの生理機能を解明するためには骨格となる RNA と構造体の構成因子やその形成機構を明らかにすることが重要となる。これまでに申請者は、特異的ながん細胞において形成される複数の核内 RNA 顆粒を見出している (Mannen et al., J Cell Biol. 2016)。本研究では、核内 RNA 顆粒の新規構成因子や形成機構を明らかにすることにより、がん細胞における RNA を骨格として形成される核内 RNA 顆粒の生理機能を解明することが目的である。</p>	
研究内容・成果 (1000 字程度)	<p>がん細胞で RNA を骨格として形成される核内 RNA 顆粒の新規構成因子を明らかにし、がん細胞における構造体の形成機構や生理機能を理解していくことを目指す。そのために、特異的ながん細胞において形成される核内 RNA 顆粒の構成因子安定発現株を用いて、様々な生理条件下において構成タンパク質と相互作用する新規構成</p>	

	<p>因子をプロテオミクス解析により明らかにする。また同定された新規構成因子が構造体形成にどのように関与するのか解析するため、構成因子のsiRNAを行い構造体形成の制御因子を探索する。さらに、それらの制御因子と結合する構造体の骨格となるRNAを同定することで、核内RNA顆粒の生理機能を明らかにする。</p> <p>HeLa細胞で形成されるSam68構造体の3つの構成タンパク質を免疫沈降後、LC-MS/MSにより相互作用タンパク質を解析したところ、Sam68で96個、DBC1で70個、HNRNPDで21個のタンパク質を同定した。さらにこれらの相互作用タンパク質の中で8個が3つの構成タンパク質で共通して同定しており、その中には既知のSam68構造体タンパク質のHNRNPLも含まれていた。また、U2OS細胞で形成されるDBC1構造体の構成タンパク質のDBC1を免疫沈降後、LC-MS/MSにより相互作用タンパク質を解析したところ、27個のタンパク質を同定した。DBC1タンパク質の相互作用している核内タンパク質についてU2OS細胞とHeLa細胞とで比較したところ、共通したタンパク質はなかった。これは、これまでの細胞種間で核内RNA顆粒の機能が異なっているという可能性をサポートする結果となった。さらに、HCT116細胞で形成されるDBC1構造体の構成タンパク質のDBC1を免疫沈降後、RNA分解酵素処理をおこないLC-MS/MSにより相互作用タンパク質を解析したところ、RNA分解酵素処理により5個のタンパク質の相互作用が減少または消失した。これらのタンパク質の細胞内局在を免疫染色により確認した結果、2個のタンパク質がDBC1構造体と共局在した。現在、これらのタンパク質がDBC1構造体の形成・維持にどのように関与するのかsiRNAを用いて解析をおこなっている。</p>
<p>成果</p>	<p>【学会報告】</p> <p>参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Taro Mannen</u>, Ayaka Wada, Yunshi Ning, Miku Nishiura, Miho Hayata, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano, Characterization of Sam68 and DBC1 nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line, The 20th Takeda Science Foundation Symposium, 武田薬品研修所, 2019/02/01</li> <li>2. 西浦未来、早田美帆、<u>萬年太郎</u>、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野俊哉, 核内RNA顆粒であるSam68構造体とDBC1構造体の機能解析, 第41回 日本分子生物学会年会, 横浜パシフィコ, 2018/11/30</li> <li>3. <u>萬年太郎</u>、西浦 未来、早田 美帆、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉, 特定のがん細胞で形成される新規核内RNA顆粒の構成因子の探索, 第41回 日本分子生物学会年会, 横浜パシフィコ, 2018/11/30</li> <li>4. <u>Taro Mannen</u>, Ayaka Wada, Yunshi Ning, Miku Nishiura, Miho</li> </ol>

	<p>Hayata, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano, Analysis of protein-protein interactions within the nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line, The 2nd JAJ (Joint Australia-Japan/Japan-Australia Joint) RNA Meeting, 北海道大学, 2018/11/06</p> <p>5. 西浦未来、早田美帆、和田彩花、寧韻詩、萬年太郎、早野俊哉, 核内 RNA 顆粒である Sam68 構造体と DBC1 構造体の構成因子の探索, 第 4 回 稀少疾患セミナー, 立命館大学, 2018/09/03</p> <p>6. 萬年太郎、和田彩花、寧韻詩、西浦未来、早田美帆、山下暁朗、廣瀬哲郎、早野俊哉, 特定のがん細胞で形成される核内 RNA 顆粒のタンパク質相互作用解析, 第 20 回 日本 RNA 学会, 大阪市ホテルコスモスクエア国際交流センター, 2018/07/10</p>
	<p><b>【論文発表】</b>          著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のことなし</p>
	<p><b>【新聞報道】</b>          なし</p>