

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06493

研究課題名(和文)核内RNA顆粒の構造構築機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of nuclear bodies built on RNA

研究代表者

萬年 太郎 (Mannen, Taro)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：50535763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、RNase感受性を示すDBC1核内構造体の新規構成因子の探索のため免疫沈降-MS解析をおこない、HNRNPLとHNRNPKを同定した。また、DNB構成因子のsiRNAにより、DBC1とHNRNPLがDNBの形成に必須であることを明らかにした。さらにHNRNPLがDNBの形成にどのように関与しているのか解析した結果、HNRNPLのRNA結合ドメインと天然変性領域が細胞内でのDNB形成とin vitroでの液滴形成に関与していることが明らかになった。このことから、DNB形成にはHNRNPLとRNAやタンパク質との多価相互作用による相分離の誘導が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、膜を持たない細胞内構造体が液-液相分離という現象によって形成されていることが明らかになってきた。最近では、この現象がクロマチン形成や転写活性化機構に関与すること、さらには天然変性領域のアミノ酸変異による相分離異常が神経変性疾患と関連していることも明らかになってきている。本研究では、膜を持たない細胞内構造体の中でも、がん細胞でRNAを骨格に形成される2つの核内構造体Sam68 nuclear body (SNB)とDBC1 nuclear body (DNB)の構成因子や骨格となるRNAの同定をおこない、構造体の形成機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mammalian cell nucleus is a highly organized organelle which contains membraneless structures referred to as nuclear bodies (NBs). Some NBs carry specific RNA types that play architectural roles in their formation. Here we show the presence of two types of RNase-sensitive DBC1 nuclear body (DNB) in HCT116 cells and Sam68 nuclear body (SNB) in HeLa cells, which exhibit phase-separated features and are constructed out of RNA polymerase I or II transcripts in a cell type-specific manner. We identified additional protein components present in DNB by immunoprecipitation-mass spectrometry, some of which (DBC1 and HNRNPL) are required for DNB formation. The rescue experiment using the truncated HNRNPL mutants revealed that two RNA-binding domains and intrinsically disordered regions of HNRNPL play significant roles in DNB formation possibly via both RNA-protein and protein-protein interactions. Moreover, the intrinsically disordered regions of HNRNPL promote in vitro droplet formation.

研究分野：分子生物学

キーワード：液液相分離 核内RNA顆粒 がん プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り、ヒトゲノムの大部分の領域から機能未知な RNA が大量に合成されていることが分かってきた。これらの RNA は、タンパク質の情報をコードすることなく non-coding RNA (ncRNA)として RNA 自身が固有の機能を果たすと考えられているが、その大部分の機能は未解明のままである。一部の ncRNA 群はパラスペックルや核内ストレスポディーなどの核内構造体の形成の骨格として機能することが明らかになっており、RNA により形成された核内構造体を核内 RNA 顆粒と呼ぶ。これまでの研究により核内 RNA 顆粒は、RNA を介したタンパク質間相互作用により遺伝子発現制御などへの関与、さらにガンや筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などの発症に関与と様々な生命現象に重要であることが明らかになっている。この核内 RNA 顆粒の生理機構を解明するためには骨格となる RNA や構成因子の特徴を明らかにすることが重要となっている。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の発見したガン細胞(HeLa 細胞、HCT116 細胞、U2OS 細胞)で形成される 2 つの核内 RNA 顆粒である Sam68 核内構造体(SNB)と DBC1 核内構造体(DNB)の構成因子や骨格となる RNA の同定をおこない構造体の形成機構を明らかにすることで、ガン細胞における核内 RNA 顆粒の生理機構の解明を目的とする。本研究の結果は核内 RNA 顆粒の新規構成因子や形成機構などの基礎的解析にとどまらず、ガン細胞特有の ncRNA により遺伝子発現が後天的に制御されているという新たな視点でのガン病態解明につながる事が期待できる。

3. 研究の方法

(1)細胞

DNB とその構成因子に関する研究は、大腸癌由来の培養細胞である HCT116 細胞を用いた。また、ドキシサイクリン存在下で DBC1 と FLAG タグ融合タンパク質、および TurboID と FLAG タグ融合タンパク質の発現が誘導される安定発現株の作製には、HCT116 細胞に 1 つの FRT サイトと Tet レプレッサーを発現する細胞株を用いた。

SNB とその構成因子に関する研究は、子宮頸癌由来の培養細胞である HeLa 細胞を用いた。また、ドキシサイクリン存在下で Sam68 または HNRNP D、HNRNPL、DBC1 と SBP と FLAG タグ融合タンパク質、および TurboID と FLAG タグ融合タンパク質の発現が誘導される安定発現株の作製には、HeLa 細胞に 1 つの FRT サイトと Tet レプレッサーを発現する細胞株を用いた。

(2)分子間相互作用実験

タンパク質間相互作用は、特異的抗体を用いた免疫沈降により複合体を回収し、ウエスタンブロットティングによって、共沈降タンパク質を検出した。また、RNA を介したタンパク質間相互作用の解析は、免疫沈降後に RNase 処理をおこなった。

近接依存性標識法を用いたタンパク質間相互作用は、細胞内で目的タンパク質と近接するタンパク質をビオチン標識し、ストレプトアビジンを用いたアフィニティー精製によりビオチン標識タンパク質を回収し、ウエスタンブロットティングによって、近接タンパク質を検出した。

(3)LC-MS/MS 解析

各タンパク質の相互作用因子の同定には LC-MS/MS を用いた。免疫沈降またはアフィニティー精製したタンパク質を酵素消化によりペプチド断片化し、脱塩処理等をおこなった MS 試料を LC-MS/MS によるショットガン解析によりタンパク質を同定した。

(4)核内構造体の観察

DNB や SNB およびその他の核内構造体は、その構成因子の免疫染色により観察した。観察には共焦点レーザー顕微鏡によりおこなった。

(5)遺伝子機能の阻害実験

標的遺伝子の機能阻害には、siRNA の細胞内導入による RNAi 法を用いておこなった。

(6)レーザーマイクロダイセクション

DNB や SNB のダイセクションは共同研究者がおこなった。切り出した構造体からタンパク質および RNA の解析をおこなった。

(7)核内 RNA 顆粒の骨格となる RNA の解析

核内 RNA 顆粒の骨格となる RNA は、特異的抗体を用いた免疫沈降により複合体を回収し、複合体から RNA を回収した。回収した RNA を Urea-PAGE で泳動し、検出した。

(8)in vitro 液滴形成解析

MBP タグ融合タンパク質を大腸菌から回収し、アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。MBP タグを TEV 処理により切り離し、in vitro でのタンパク質の相分離の性質を解析した。

4. 研究成果

(1) DNB の新規構成因子を探索するため、DBC1-3xFLAG タンパク質をドキシサイクリンにより発現誘導できる HCT116 安定発現株を用いた免疫沈降-MS 解析により、DBC1 と相互作用しているタンパク質の同定をおこなった。DNB は RNA を骨格に形成されることから、免疫沈降したビーズ上で RNase 処理をおこなうことにより RNA を介して DBC1 と相互作用するタンパク質を比較解析した。その結果、HNRNPL および HNRNPK を新規 DNB 構成因子として同定した。さらに、各構成因子の siRNA による DNB 形成への影響を確認したところ、DBC1 または HNRNPL のノックダウンにより DNB が消失した。DNB の形成に HNRNPL のどの領域が関与しているか明らかにするため、siRNA で HNRNPL をノックダウンし DNB を消失させた後に、HNRNPL を導入するレスキュー実験をおこなった。その結果、HNRNPL の 2 つの RNA 結合ドメインとプロリン領域が DNB の形成維持に必要であることを明らかにした。また、DNB は相分離様の相互作用により形成されていることを明らかにしたので、HNRNPL の *in vitro* 液滴形成解析をおこなった。その結果、DNB の形成維持に必要である HNRNPL の 2 つの RNA 結合ドメインとプロリン領域が液滴形成にも必須であることが明らかになった(図 1)。これらの結果、HNRNPL の相分離による相互作用を介して DNB が形成されていることが示唆された(図 2)。この研究内容を Molecular Biology of the Cell 誌の論文として発表した。

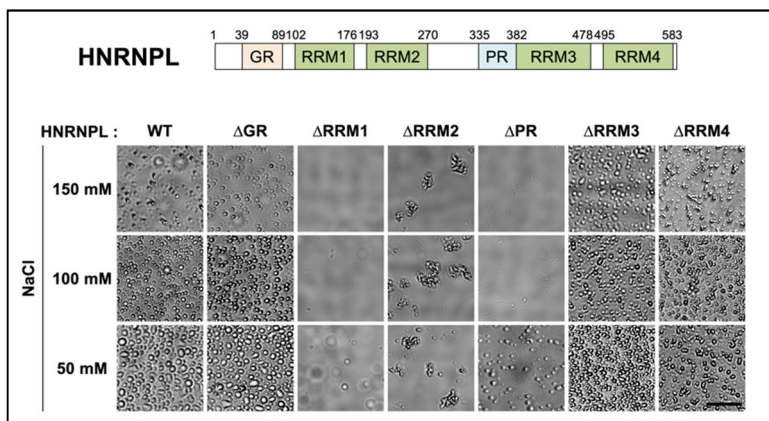


図 1 : HNRNPL の *in vitro* 液滴解析

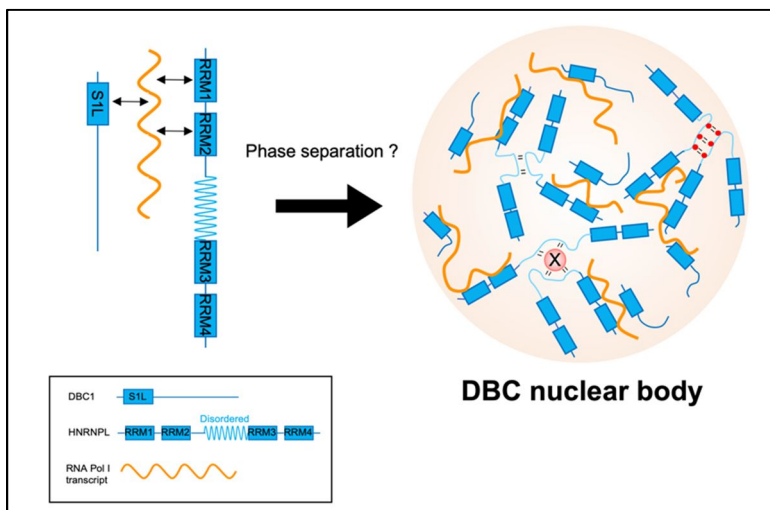


図 2 : DNB 形成の模式図

(2) SNB の新規構成因子を探索するため、SNB 構成因子である Sam68 または HNRNPD、HNRNPL、DBC1 と SBP と FLAG タグ融合タンパク質をドキシサイクリンにより発現誘導できる HeLa 安定発現株を用いた免疫沈降-MS 解析により、SNB 構成因子と相互作用しているタンパク質の同定をおこなった。SNB は RNA を骨格に形成されることから、免疫沈降したビーズ上で RNase 処理をおこなうことにより RNA を介して SNB 構成因子と相互作用するタンパク質を比較解析した。その結果、45 種類の SNB 構成因子候補タンパク質を同定した。そのうち免疫染色により、少なくとも 4 つのタンパク質が新規 SNB 構成因子であることを明らかにした。現在、これらの研究成果を国際誌に発表するためにまとめている。

(3) レーザーダイセクションによる細胞内から DNB と SNB の切り出しをおこない LC-MS/MS 解析によりタンパク質の解析をおこなった。その結果、25 種類のタンパク質を同定することができた。しかしながら、その中には既知の構成因子は含まれていなかった。引き続きレーザーダイセクションによる構造体の切り出しを試みている。

(4) DNB の骨格となる RNA を同定するため、DNB 構成因子と相互作用している RNA の解析をおこなった。DNB 構成因子複合体より RNA を回収し、Urea-PAGE で泳動したところ、複数のバンドが検出された。現在、これらの RNA の解析をおこなっている。

(5) 本研究により DNB や SNB が液-液相分離を介して形成されることが明らかになった。液-液相分離は、タンパク質-RNA 間相互作用だけではなく、天然変性領域同士の弱いタンパク質間相互作用が組み合わさった多価効果により形成されていることがわかっている。これまでは我々は免疫沈降により新規構成因子を探索していたが、その過程で相分離により結合しているタンパク質は失われている可能性がある。そこで、細胞内で標的タンパク質と相互作用または近傍に存在するタンパク質をビオチン標識できる近接依存性標識法を用いて解析をおこなった。この方法では、細胞内で近接に存在するタンパク質を直接ビオチン標識するので、タンパク質間相互作用に関係なくタンパク質を同定できる。DNB や SNB の新規構成因子を探索するため、構成因子と TurboID タグの融合タンパク質をドキシサイクリンにより発現誘導できる安定発現株を用いた近接依存性標識法-MS 解析をおこなった。DNB の形成有無において比較解析をおこなった結果、24 種類のタンパク質を同定した。現在、これらのタンパク質の解析をおこなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mannen Taro, Goto Masato, Yoshizawa Takuya, Yamashita Akio, Hirose Tetsuro, Hayano Toshiya	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct RNA polymerase transcripts direct the assembly of phase-separated DBC1 nuclear bodies in different cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E21-02-0081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano, Uehara Takeru, Aiba Yuichiro, Nakanishi Mari, Shiota Tomo, Hibino Masaki, Wiryaserkul Pattama, Kikuchi Sotaro, Nagata Riko, Matsubayashi Masaya, Shinkai Yoichi, Niwa Tatsuya, Mannen Taro, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Shinichi, Yamazaki Tomohiro, Mannen Taro, Hirose Tetsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 ArcRNAs and the formation of nuclear bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-021-09881-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萬年 太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 Characterization of phase-separated DBC1 nuclear body using the proximity labelling approach
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 友近 愛、後藤 雅人、萬年 太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 Characterization of Sam68 nuclear body built around RNA in HeLa cells
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳森 美貴、萬年 太郎、吉澤 拓也、山下 暁朗、早野 俊哉
2. 発表標題 Characterization of the abnormal cross polymer formed by ALS-linked FUS mutants
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 友近 愛、後藤 雅人、萬年 太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 HeLa細胞においてRNAによって形成されるSam68核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萬年 太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 近接依存性標識法を用いた相分離様DBC1核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 友近 愛、後藤 雅人、萬年 太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 質量分析を用いたSam68核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳森 美貴、萬年 太郎、吉澤 拓也、山下 暁朗、早野 俊哉
2. 発表標題 ALS型FUS変異体における異常クロス ポリマー形成機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taro Mannen, Masato Goto, Takuya Yoshizawa, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano
2. 発表標題 Distinct RNA polymerase transcripts direct the assembly of phase-separated DBC1 nuclear bodies in different cell lines
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Mannen, Masato Goto, Takuya Yoshizawa, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, and Toshiya Hayano
2. 発表標題 相分離を介して形成されるDBC1核内RNA顆粒の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友近愛、萬年太郎、山下暁朗、廣瀬哲朗、早野俊哉
2. 発表標題 HNRNPDのアイソフォームを用いたSam68核内構造体の新規構成因子の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤雅人、柳森美貴、早田美帆、寧韻詩、萬年太郎、山下暁朗、廣瀬哲郎、早野俊哉
2. 発表標題 がん細胞で形成されるSam68核内構造体の構成因子の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萬年 太郎、後藤 雅人、吉澤 拓也、山 下暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 細胞種により異なるRNAポリメラーゼ転写産物が相分離を介してDBC1核内構造体を形成する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Mannen, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano
2. 発表標題 Characterization of DBC1 nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤雅人、友近愛、早田美帆、寧韻詩、萬年太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野俊哉
2. 発表標題 がん細胞で形成されるSam68核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 白木 賢太郎 編、一部執筆：萬年太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 416
3. 書名 相分離生物学の全貌（現代化学増刊46）、執筆箇所：71.質量分析装置LC-MS/MS	

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学生命科学部プロテオミクス研究室ホームページ http://www.ritsumeiji.ac.jp/lifescience/bm/hayano/ 立命館大学 生命科学部 プロテオミクス研究室 http://www.ritsumeiji.ac.jp/lifescience/bm/hayano/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	八谷 如美 (Hachiya Naomi) (30408075)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員 (82670)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------