

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15112

研究課題名(和文)新規核内構造体DBC1ボディの形成機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of DBC1 nuclear bodies built around RNAs

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞においてRNAを骨格に形成される核内構造体であるDBC1ボディの構成タンパク質の役割を研究した。まず、免疫沈降-MS解析によりDBC1ボディの新規構成因子を同定した。次にDBC1ボディの構造体形成に必須の構成因子を明らかにした。また、構造体形成に必要なタンパク質のRNA結合ドメインと天然変性領域であるプロリンドメインが構造体の形成に必要なドメインであることを見出した。天然変性領域は相分離を介したタンパク質間相互作用をする性質を持つことから、この性質がDBC1ボディの構造体構築を司る機構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

がん細胞においてRNAを骨格にDBC1ボディが形成されることから、腫瘍形成の制御因子として知られているDBC1をRNAによる機能制御という観点から解析することができる。また、DBC1ボディの新規構成因子を同定することにより、がん細胞で形成される意義や生理機能を解明することができる。さらにRNAによる構造体形成を介して制御される核内現象などの基礎的解析にとどまらず、腫瘍形成の新しい制御経路が明らかになる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The roles of the component proteins that DBC1 nuclear bodies built around RNA were intensively studied. First, novel component proteins of DBC1 body were identified by affinity purification mass spectrometry. Second, RNA binding proteins that are essential for nuclear body formation were identified by siRNA treatment. Moreover, RNA binding domain and proline-rich domain, predicts the disordered region, were shown to be required for nuclear body formation. It was detected that the disordered region can cooperate to modulate liquid-liquid phase separation, suggesting this feature underlies the mechanism of the structural roles of the nuclear body built around RNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内構造体 ノンコーディングRNA RNA結合タンパク質 プロテオミクス 核内RNA顆粒 相分離 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞の核内には染色体と共に核内構造体と呼ばれる様々な構造体が存在し、RNA 複合体の形成や遺伝子発現制御の場として機能している。近年、ヒトゲノムからタンパク質をコードしないノンコーディング RNA が大量に産生され、その一部は核内構造体の骨格として機能することが解明されている。しかし、これらの核内構造体の形成機構および生理的機能は未知のままである。実施者は、RNA を骨格として形成される新規の核内 RNA 顆粒を探索するため、10432 種類の蛍光タンパク質融合ヒト発現型 cDNA クローンの細胞内局在情報から、RNase 処理によって RNA 骨格が分解され構造体が崩壊するものをスクリーニングした。その結果、核内 RNA 顆粒候補に局在する 32 種類のタンパク質を同定し、そのうち 7 種類が Sam68 核内ボディ (SNB) に局在することを明らかにした。SNB の新規構成因子である DBC1 (deleted in breast cancer 1) について細胞内局在解析を進めると、特定のがん細胞株では独立した新規核内 RNA 顆粒 (DBC1 ボディ) が形成されること、また特定のストレス条件下では SNB 構成因子の大部分が構造体から消失し、DBC1 ボディのみが残存することを明らかにした。

2. 研究の目的

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、これらの生理機構を解明するためには骨格となる RNA のみではなく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。実施者が発見した DBC1 ボディの構成因子はまだ DBC1 しかなく、その生理機能も未知のままである。そこで本申請では、DBC1 ボディの新規構成因子を探索し、DBC1 ボディの形成機構を明らかにすることにより、がん細胞種において異なる RNA を骨格として形成される DBC1 ボディの生理機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

DBC1 ボディ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。

(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。

(3) LC-MS/MS 解析

DBC1 相互作用因子の同定には LC-MS/MS を用いた。免疫沈降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

DBC1 ボディ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。

4. 研究成果

(1) 一部の核内構造体は RNA が骨格となって形成されていることが明らかにされている。このような構造体を探索するために開発した「核内構造体の RNase 感受性スクリーニング法」を Bio-Protocol 誌の論文として発表した。

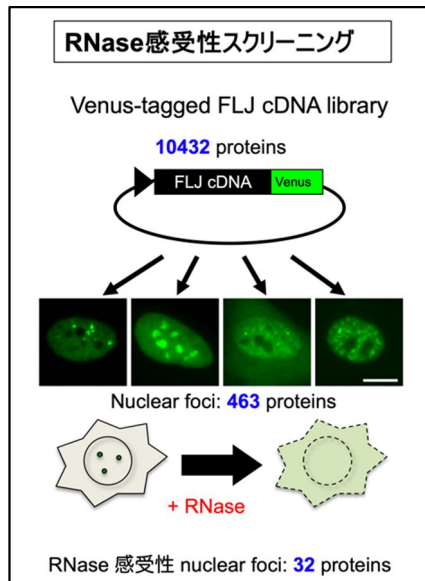


図 1. RNase 感受性スクリーニングの流れ

(2)HCT116 細胞で形成される DBC1 ボディの新規構成因子を探索するため Flip-in システムを用いて、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 安定発現株を作製した。作製した細胞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ところ、複数のタンパク質を同定した。DBC1 ボディは RNA を骨格に形成されることから RNA を介して DBC1 と相互作用していることが示唆される。そこで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探索したところ、5 つの RNA 結合タンパク質を同定した。同定されたこれらの 5 つタンパク質を DIRBP (DBC1 interacting RNA binding protein)_1~5 と名付けた。各 DIRBP の細胞内局在を観察したところ、DIRBP_1 と DIRBP_2 は DBC1 ボディに局在し、さらに RNase 処理や RNA ポリメラーゼ阻害剤により DBC1 ボディと同様にタンパク質の局在が消失したことから、これらのタンパク質は DBC1 ボディの新規構成因子であることが明らかになった。さらに、DBC1 および DIRBP_1 と 2 の siRNA による DBC1 ボディへの影響を確認したところ、DBC1 または DIRBP_1 のノックダウンにより DBC1 ボディが消失した。この結果、RNA を骨格に形成される DBC1 ボディの形成には、DBC1 と DIRBP_1 が必須であることが明らかになった。

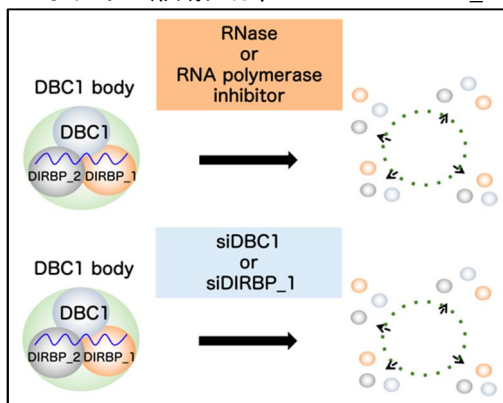


図 2. DBC1 ボディの形成機構のモデル図

(3)DBC1 ボディの形成に DIRBP_1 のどの領域が関与しているか明らかにするため、siRNA で DIRBP_1 をノックダウンし DBC1 ボディを消失させた後に、DIRBP_1 を導入するレスキュー実験をおこなった。その結果、DIRBP_1 の 2 つの RNA 結合ドメインとプロリン領域が DBC1 ボディの形成維持に必要であることを明らかにした。一方、DBC1 ボディは相分離様の相互作用により形成されていることを確認している。DIRBP_1 のプロリン領域は相分離による構造体の形成に関与する天然変性領域でもあることから、この領域を介した相分離による相互作用により DBC1 ボディは形成されている可能性が示唆された。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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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, T. and Hirose, T.	4. 巻 7
2. 論文標題 RNase Sensitivity Screening for Nuclear Bodies with RNA Scaffolds in Mammalian Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e2232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.2232	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19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 萬年太郎
2. 発表標題 がん細胞で形成される核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第7回生命医科学科コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2019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 がん細胞で形成されるDBC1核内RNA顆粒のタンパク質相互作用解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萬年 太郎、早野 俊哉
2. 発表標題 がん細胞で形成されるDBC1核内RNA顆粒の機能解析
3. 学会等名 稀少疾患カンファランス、国際稀少疾患シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤雅人、岸田真実、西浦未来、早田美帆、萬年太郎、早野俊哉
2. 発表標題 がん細胞で形成されるSam68核内構造体とDBC1核内構造体の生理機能の解析
3. 学会等名 稀少疾患カンファランス、国際稀少疾患シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taro Mannen, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Analysis of protein-protein interactions within the Sam68 and DBC1 nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line
3. 学会等名 EMBO workshop~RNP network dynamics indevelopment and disease (国際学会)
4. 発表年 2019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 Analysis of protein-protein interactions within the DBC1 nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤雅人、岸田真実、西浦未来、早田美帆、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核内構造体とDBC1核内構造体の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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 LLPS様の相互作用を介して形成される核内RNA顆粒の機能解析
3. 学会等名 第4回LLPS研究会・ASUKA若手交流会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第20回 日本RNA学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西浦未来、早田美帆、和田彩花、寧 韻詩、萬年太郎、早野俊哉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第4回 稀少疾患セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Mannen, Ayaka Wada, Yunshi Ning, Miku Nishiura, Miho Hayata, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano
2. 発表標題 Analysis of protein-protein interactions within the nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line
3. 学会等名 The 2nd JAJ (Joint Australia-Japan/Japan-Australia Joint) RNA Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萬年 太郎、西浦 未来、早田 美帆、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野 俊哉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西浦未来、早田美帆、萬年太郎、山下 暁朗、廣瀬 哲郎、早野俊哉
2. 発表標題 核内RNA顆粒であるSam68構造体とDBC1構造体の機能解析
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro Mannen, Ayaka Wada, Yunshi Ning, Miku Nishiura, Miho Hayata, Akio Yamashita, Tetsuro Hirose, Toshiya Hayano
2. 発表標題 Characterization of Sam68 and DBC1 nuclear bodies built around RNAs in cancer cell line
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萬年 太郎、山下征輔、富田耕造、五島直樹、廣瀬哲郎
2. 発表標題 癌細胞種により、異なるRNAポリメラーゼ転写産物が競合的にDBC1核内構造体の足場となる
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 萬年 太郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 技術シーズ交流発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taro Mannen, Seisuke Yamashita, Kozo Tomita, Naoki Goshima, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL
3. 学会等名 第3回 稀少疾患セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taro Mannen, Seisuke Yamashita, Kozo Tomita, Naoki Goshima, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Distinct RNA polymerase transcripts competitively function as scaffold of the DBC1 nuclear bodies in specific cancer cell lines
3. 学会等名 第19回日本RNA学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 萬年 太郎
2. 発表標題 特定のがん細胞でRNA顆粒が融合して核内構造体を形成するメカニズム
3. 学会等名 第5回 生命医科学科コロキウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立命館大学 生命科学部 生命医科学科 プロテオミクス 研究室 ホームページ
<http://www.ritsumeai.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
--	---------------------------	-----------------------	----