

## 研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		特定のがん細胞で形成される核内 RNA 顆粒の網羅的タンパク質相互作用解析			
研究テーマ (欧文) AZ		A comprehensive analysis of protein interactions within the nuclear bodies built around RNAs in specific cancer cell lines			
研究氏 代表 表名 者	カタカナ CC	姓) マンネン	名) タロウ	研究期間 B	2017 ~ 2018 年
	漢字 CB	萬 年	太 郎	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	MANNEN	TARO	研究機関名	立命館大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		立命館大学・助教			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>近年、ノンコーディング RNA の一部はいくつかの核内構造体 (核内 RNA 顆粒) の形成の骨格として機能し、RNA-タンパク質相互作用を介して遺伝子発現制御などの重要な生理機構に関与していることが明らかになってきている。申請者は、核内 RNA 顆粒が特異的ながん細胞で形成されることを明らかにしている。本研究では、プロテオミクス解析によりこの核内 RNA 顆粒の新規構成因子を同定し、がん細胞におけるこの構造体の形成機構や生理機能を理解するために研究をおこなった。</p> <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。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。現在、共通して同定されたタンパク質が Sam68 構造体に共局在するか解析をおこなっている。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。また、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>					
キーワード FA	核内構造体	RNA 結合タンパク質	プロテオミクス	がん	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要<sup>EZ</sup>

The mammalian cell nucleus contains nuclear bodies characterized by a distinct set of proteins and RNAs. The nuclear bodies serve as the sites for biogenesis of various RNA species, the storage and assembly of RNP complexes. We discovered that a long noncoding RNA acts as structural scaffold of the specific nuclear body and investigated how the RNA acts for the nuclear body assembly with multiple protein factors. I revealed that the Sam68 nuclear body (SNB) is disrupted by RNase treatment. Interestingly, SNB is composed of two distinct RNase-sensitive substructures. One of the substructures can be present as the distinct nuclear body called DBC1 body in certain physiological conditions and the more dynamic another substructure including Sam68 joins to form the intact SNB [T. Mannen et al., J Cell Biol 214, 45-59 (2016)]. In this study, to understand how SNB and DBC1 body assembly and function in cancer cell, we are currently engaged in performing immunoprecipitation to identify novel proteins specifically associating with SNB and DBC1 body using LC-MS/MS.

I constructed stable cell line that inducible expression of FLAG-tagged components of SNB and DBC1 body. In HeLa cell, I carried out IP and LC-MS/MS analysis and identified 96 interacting proteins with Sam68, 70 interacting proteins with DBC1 and 21 interacting proteins with HNRNPD. In U2OS cells, I carried out IP and LC-MS/MS analysis and identified 27 interacting proteins with DBC1. Currently, I have confirmation of subcellular localization these proteins. In HCT116 cell, I carried out IP and LC-MS/MS analysis with or without RNase treatment. I identified 5 interacting proteins with DBC1, which disappear after RNase treatment. I confirmed subcellular localization of these proteins, 2 proteins co-localized with DBC1 body. Currently, I have carry out RNAi of these proteins and confirm that mechanism of the formation of DBC1 body.