助成番号 170989	5－2

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	免疫細胞の大規模な核構造変化における RNA-RBP 複合体の機能解析				
研究テーマ（欧文） AZ	Investigation into roles of RNA-RBP complexes in a large-scale alteration of nucleus during blood cell differentiation				
研究代表者氏名 カタカナ CC	姓）ハマダ	名）キョウコ	研究期間 B	2017 ～ 2019 年	
漢字 CB	濵田	京子	報告年度 YR	2019 年	
ローマ字 CZ	HAMADA	KYOKO	研究機関名	基礎生物学研究所	
研究代表者 CD 所属機関・職名	自然科学研究機構 基礎生物学研究所 ・ 助教				

概要 EA （600 字～800 字程度にまとめてください。）

本研究では、クロマチンとRNA-RBP(RNA-binding protein)複合体の物理的相互作用を解明すべく、RNase処理によってクロマチン画分から遊離されるタンパク質を質量解析を用いて解析し、ヒトHeLa S3細胞とK562細胞でRNAを介してクロマチンに結合しているRBPsの網羅的スクリーニングを試みた。その結果、hnRNPs、spliceosome構成因子、Ku80やDNA-PKcsを含むDNA損傷修復に関わる因子、ILF3/2複合体、クエン酸回路で働く酵素の一部を含む約160種のタンパク質がRNase A処理によってクロマチン画分から優先的に遊離されることがわかった。また、転写伸長の阻害剤であるDRBを用いて、クロマチンとRNA-RBP複合体との相互作用が転写の過程とカップルしているのかどうかを検討した結果、DNA損傷修復に関わる因子のRNAを介したクロマチン結合は転写の伸長と連結していることが示唆された。また、RNA-RBP複合体を濃縮し解析する別の技法として、細胞核内のRNAとRBPをUV架橋した後にシリカマトリックスを用いて核内RNA-RBP複合体を精製する手法の最適化にも取り組んだ。その結果、上述の方法に加えて転写因子やエピジェネティクな遺伝子発現制御因子などがRNA結合因子として同定された。よって、これらの比較的に簡単で安価な手法でクロマチン上や核内に存在するRBPを同定できることがわかった。今後の研究で、上記の手法やCLIP-seq法を未分化と赤血球様に分化させたK562細胞に適用し、1)同定されたRBPに結合するRNAの解析や 2)血球細胞の分化時に重要な核内RNA-RBP複合体の同定を行い，更に3)CRISPR/Cas9等で同定したRBPのRNA結合能を欠損させた細胞を作製し表現型を解析することで血球分化や脱核などの大規模ゲノム編成におけるRNAとRBPの相互作用の分子機構や生物学的意義が明らかにされる事が期待できる。

キーワード FA	クロマチン	RNA	RBP	プロテオミクス

（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GB	該当なし							
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
雑誌	論文標題GB								
	著者名 GA		雑誌名 GC						
	ページ GF	～	発行年 GE					巻号 GD	
図書	著者名 HA	該当なし							
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	
図書	著者名 HA								
	書名 HC								
	出版者 HB		発行年 HD					総ﾍﾟｰｼﾞ HE	

欧文概要 EZ

Here we investigated physical interaction between chromatin and RNA-RBP (RNA binding protein) complexes by performing mass spectrometry analysis of RNase-solubilized chromatin-associated proteins using HeLa S3 and K562 cells. As a result, we identified approximately 160 proteins including hnRNPs, sliceosome components, DNA damage repair factors and several enzymes involved in citric acid cycle, as candidate RBPs associated with chromatin via RNA interaction.

Furthermore, the treatment of the cells with an inhibitor of transcriptional elongation, DRB revealed that the RNA-mediated interaction of DNA damage repair factors with chromatin is coupled with transcriptional elongation. In addition to the above-mentioned method, we attempted to purify and concentrate nuclear RNA-RBP complexes by UV-crosslinking and following silica matrix column purification. This resulted identification of additional RBP candidates such as several transcription factors and epigenetic regulators. Taken together, we believe that these simple and relatively cost-effective methods successfully enabled us to identify (mainly known) nuclear or chromatin-associated RBP candidates. Future studies including application of the above-mentioned methods and CLIP-seq to undifferentiated and erythrocyte-like differentiated K562 cells and CRISPR/Cas9-based mutagenesis of identified RBPs will help to unravel molecular mechanisms and biological significance of physical and functional RBP-RNA-chromatin interactions in erythrocyte differentiation and large-scale genome reorganization during the process.