

No.	22-1084	
研究課題名	アルギニンメチル基転移酵素PRMT5による膵臓癌発症を制御する分子機構の解明	
研究代表者	阿部 芳憲（日本医科大学先端医学研究所・助教）	
研究組織	受入教員	武川 睦寛（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者	尾山 大明（疾患プロテオミクスラボラトリー・准教授）
	分担者	秦 裕子（疾患プロテオミクスラボラトリー・技術専門員）
	分担者	小川 容史（日本医科大学医学部・第5学年）

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書 (年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (年次終了)

本研究は質量分析を行って、アルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 の膀胱癌特異的な基質分子を同定する。過去に HeLa 細胞を使った PRMT5 の基質分子の網羅的な解析が行われている (Mushiani et. al., Science Signaling 12 eaat8388 (2019))。2022 年度は HeLa 細胞での実験をもとに、実際に PRMT5 の基質分子が同定可能か否かについて検証を行った。

実施内容

1. ウェスタンブロット法を行って膀胱由来癌細胞株における PRMT5 基質分子の検出

上皮系膀胱由来癌細胞株 2 種、間葉系膀胱由来癌細胞株 2 種、ハイブリット型膀胱由来癌細胞株 1 種からタンパク質を回収し、PRMT5 特異的なアルギニン残基メチル化を認識する抗体を使ったウェスタンブロットを行い、PRMT5 基質分子の検出を試みた。その結果、上皮系膀胱由来癌細胞株とハイブリット型膀胱由来癌細胞株で HeLa 細胞と同程度の検出感度で、多くの基質分子と思しきバンドを検出できた。さらに細胞株ごとに異なる基質分子がある可能性が示唆される結果を得た。間葉系膀胱由来癌細胞株でも基質分子を検出できたが、上皮系膀胱由来癌細胞株と比べ、検出できたバンドは少なかった。以上のことから、上皮系膀胱由来癌細胞株またはハイブリット型膀胱由来癌細胞株を用いれば、質量分析を使って多くの PRMT5 基質分子を同定できる可能性が高いことが分かった。PRMT5 は核内では遺伝子発現制御に関わることが知られている。そこで核タンパクを回収し、ウェスタンブロットを行って PRMT5 基質分子の検出を試みた。その結果、核内における PRMT5 基質分子も上皮系膀胱由来癌細胞株で、多くの基質分子と思われるバンドを検出することができた。

2. 質量分析を用いた膀胱細胞における PRMT5 基質分子の同定

次にパイロット実験として、実際に質量分析を行って膀胱細胞で PRMT5 基質分子同定を行った。1. の結果を元に、使用する細胞は上皮系膀胱由来癌細胞株 AsPC-1 細胞とした。AsPC-1 細胞を 8×10^7 細胞まで増やし (タンパク質 8 mg 相当)、そのうちの 1 mg 相当の細胞 (1×10^7 細胞) から PTMScan® Symmetric Di-Methyl Arginine Motif キット (Cell Signaling Technology) を用いて質量分析に用いるサンプルを準備した。疾患プロテオミクスラボラトリー所有の質量分析装置を使って解析を実施した結果、約 100 種類の基質分子を同定することができた。その中には既知の基質分子も複数同定できたことからパイロット実験は成功したと判断し、策定した 2023 年度の実験計画を実施できる目処が立った。パイロット実験では、細胞分裂や転移に関わることが推測される新規基質分子も同定できた。

今後の内容

2023 年度は以下の条件で、PRMT5 の基質同定を目指す。

- ハイブリット型膀胱由来癌細胞株における PRMT5 基質分子 (細胞質、核)
- AsPC-1 細胞の核内における PRMT5 の基質分子
- 上皮系膀胱由来癌細胞株およびハイブリット型膀胱由来癌細胞株由来の癌幹細胞における PRMT5 基質分子