

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07199

研究課題名(和文)プリオン様タンパク質が引き起こす発癌機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of an oncogenic mechanism that induced by the prion-like proteins

研究代表者

北川 孝雄(KITAGAWA, Takao)

北海道医療大学・先端研究推進センター・助教

研究者番号：20614928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ユーイング肉腫は小児や10代の若年性の骨及び軟部組織に発生する腫瘍である。ユーイング肉腫のキメラがん転写因子EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AFに大腸菌の活性型ビオチンリガーゼをつける BioID法を使うことで、3種類のキメラがん転写因子に共通する相互作用タンパク質の同定を行い、167種類の候補タンパク質の同定に成功した。これらの中には、クロマチンリモデリング複合体、転写因子、RNA結合タンパク質、スーパーエンハンサー形成分子などの多数のタンパク質が同定された。候補タンパク質のうち、8種類については抗体を用いて再現性を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユーイング肉腫は小児で起こる癌であり、癌遺伝子に対するタンパク質の相互作用ネットワークを明らかにすることは、がん化の分子メカニズムを解明するだけでなく、抗がん剤のターゲット候補の同定も期待できる。本研究課題では、ユーイング肉腫細胞で新規の相互作用タンパク質同定法によって新しいタンパク質複合体の同定をすることができた。しかし、分子メカニズムの解明には至っていないため、今後同定したタンパク質の解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Ewing's sarcoma is a tumor that arises from bone and soft tissue in young children. We performed an identification of the proximal proteins of the chimeric oncogenic transcription factors, using the BioID method, which is used active biotin ligase from *E. coli* for a biotinylation of the proximal proteins. Finally, we were able to identify 167 proteins that are commonly present in the three chimeric cancer transcription factors. Among these, a large number of proteins were identified, including chromatin remodeling complexes, transcription factors, RNA-binding proteins, and super enhancer-forming molecules. We were able to reproduce eight of the candidate proteins using antibodies. We are currently conducting phenotypic analysis of the candidate proteins by suppressing their expression.

研究分野：がん生物学

キーワード：ユーイング肉腫 インタラクトーム解析 BioID

### 1. 研究開始当初の背景

ユーイング肉腫は小児や若年者の骨などに発生する肉腫で、小児に発生する骨腫瘍では骨肉腫に次ぐ多量の腫瘍である。腫瘍は EWSR1 遺伝子と ETS 転写因子ファミリー遺伝子との染色体の転座によって生じ、85%以上が EWSR1 と FLI1 との染色体転座によって生じる。融合遺伝子ががん化を引き起こす分子メカニズムは未だに不明である。

我々はキメラがん転写因子のどの領域がその機能に必須であるかどうかを明らかにするために、酵母の遺伝学を用いた解析を行っている。我々はユーイング肉腫のキメラがん転写因子 EWS/FLI1、EWS/ERG、EWS/E1AF を酵母で発現させると、細胞増殖低下を示すことを明らかにした。この系を利用しキメラがん転写因子発現による増殖低下を解除する変異解析を行った結果、13種類の一アミノ酸変異はすべて転写因子内の ETS ドメインに集中することがわかった。すなわち、酵母の遺伝学解析からキメラがん転写因子の機能に必須な領域は DNA 結合領域である ETS ドメインであった(文献①)。さらに、ヒト培養細胞 HEK293 を用いて、変異キメラがん遺伝子の表現型解析を蛍光抗体染色法とプロモーターのレポーター活性で評価した。その結果 ETS ドメインの一アミノ酸変異により、①フォールディング異常、②核移行阻害、③転写活性化能力低下が起こることを明らかにした。これらのことから、ETS ドメインあるいはその周辺に相互作用するタンパク質が存在し、転写因子としての機能をサポートしているのではないかと仮説を立てた。

本研究課題では、キメラがん転写因子と相互作用する分子の同定を行うためのツールの開発として、BioID 法を扱いやすいシステムに構築し、さらに解析を行った。

### 2. 研究の目的

キメラがん転写因子と相互作用する分子の同定のためには、共免疫沈降法による同定が一般的であるが、キメラがん転写因子は通常の共免疫沈降法で使用する界面活性剤では可溶化せず、免疫沈降による回収率が悪いので、相互作用タンパク質の質量分析解析を行った。しかしほとんどタンパク質同定ができず、有望な候補タンパク質同定には至らなかった。そこで、大腸菌の活性型ビオチンリガーゼ BirA\*による隣接タンパク質複合体のビオチン化によるラベル法 (BioID 法) (文献②)によって生きた状態でキメラがん転写因子と相互作用する分子の同定のために、① BioID 法をユーイング肉腫で動かすための系の開発、②ユーイング肉腫での BioID 法によるビオチン化タンパク質の同定を主に目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) BioID tet-on system の作製

一般的な CMV promoter を使った発現系のプラスミドを使い、BirA\*-キメラがん遺伝子の一過的なトランスフェクションと過剰発現を 15cm ディッシュで行った。しかし、トランスフェクション効率と大量の試薬を消費するために実験系として適切でないと判断し、Piggybac system によるゲノムへの導入及び誘導型の tet-on system を組合せたベクターを作製した。

#### (2) ユーイング肉腫での piggybac tet-on BioID の発現

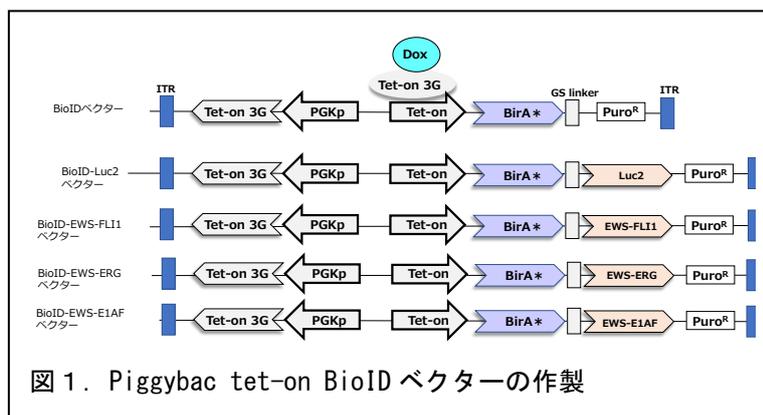
(1) で作製したベクターが動くかどうかを調べ、BirA\*による隣接タンパク質のビオチン化が起こるかどうかを検討し、Streptavidin agarose ゲルでの精製、ThermoFisher 製オービトラップ Fusion にて解析を行う。

#### (3) BioID 法で同定したビオチン化タンパク質の再現実験

(2) で同定したタンパク質に再現性があるかどうかを検討するために抗体を使ってウェスタンブロッティングで解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) Piggybac ベクター pPB-LR5 にタカラバイオの Tetone システム、puromycin 耐性遺伝子を入れ込み、Tet-on promoter の下流に BirA\*及びグリシン/セリンリンカー (GS linker) を導入した。GS linker の下流にネガコンとして、ホタルルシフェラーゼ (Luc2) 及びキメラがん遺伝子 (EWS-FLI1, EWS-ERG, EWS-E1AF) を組み込んだベクターを作製した (図1)。



(2) ユーイング肉腫 A673 細胞へ高活性型 transposase ベクター(文献③)とともに作製した piggybac ベクターをトランスフェクションし、puromycin にて薬剤選択をした。選択した細胞で 1 $\mu$ g/mL doxycycline 及び 50 $\mu$ M biotin を培地に添加し 1 日培養した。その結果、蛍光免疫染色では、FLAG タグ抗体で染色し、キメラがん転写因子は核内に存在することが確認された (図 2 A)。また、Alexafluor633-streptavidin にて染色したところ、FLAG タグ抗体と同様の場所で染色されていることが分かった (図 2 A)。また、ウエスタンブロッティングにおいても、目的サイズに融合タンパク質が発現されていることが分かった (図 2 B)。また、Streptavidin-HRP にてビオチン化タンパクを検出したところ、すべての細胞でビオチン化が確認できた (図 2 B)。以上より、作製した piggybac ベクターはゲノムへ組み込むことができた。さらに tet-on システムで目的サイズにタンパク質を誘導でき、BirA\* によって細胞内タンパク質のビオチン化も確認できた。

(3) ビオチン化タンパク質の回収のために、10cmdish1 枚分を培養し、同様の方法で誘導し、細胞を RIPA buffer で回収した。回収したタンパク抽出物は、Streptavidin agarose ビーズを使いビオチン化タンパク質を精製し、Trypsin/LysC にてペプチド回収した。回収したペプチドは精製後、ThermoFisher 製 Fusion オービトラップ (熊本大学 荒木令江先生) と共同研究しタンパク質を同定した。解析データは protein discovery にて N=3 で統計解析した。

EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AF それぞれで 292、192、242 のタンパク質が同定できた (図 3)。3 種類で共通しているタンパク質が 167 個あることが分かった。共通した 167 個のタンパク質を String にて既知の相互作用との関係を可視化した (図 4)。その結果、既知の相互作用で可視化した部分で共通すると思われる複合体を見出すことができた。例えば、BRG1 は EWS-FLI1 と相互作用することが知られているが (文献④)、BRG1 を含めたクロマチンリモデリング複合体を多数同定することができた。また、MED などのスーパーエンハンサー形成に関わるタンパク質、ポリ A 付加に関わるような RNA 結合タンパク質の複合体も多数同定された。

質量分析装置によって同定されたタンパク質が本当にビオチン化されているかどうかを調べるために、再度培養し、ビオチン化したタンパク質を streptavidin agarose ビーズで回収しウエスタンブロッティングで再現性があるのかどうかを検討した (図 5)。一例として RBM33 の場合を示す。RBM33 は Whole cell lysate でどれも発現していた。Streptavidin agarose ビーズで回収後、ネガティブコントロール (BioID、BioID-Luc2) と比較して、キメラがん転写因子 (EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AF) のほうがビオチン化された RBM33 が多く検出された。また、GAPDH を同様に検出したが、

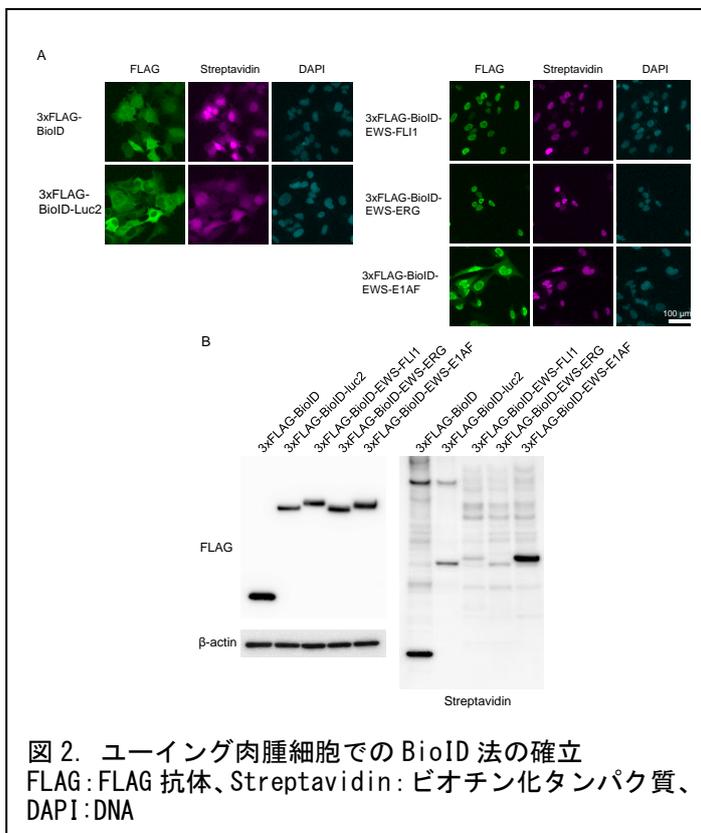


図 2. ユーイング肉腫細胞での BioID 法の確立  
FLAG: FLAG 抗体、Streptavidin: ビオチン化タンパク質、DAPI: DNA

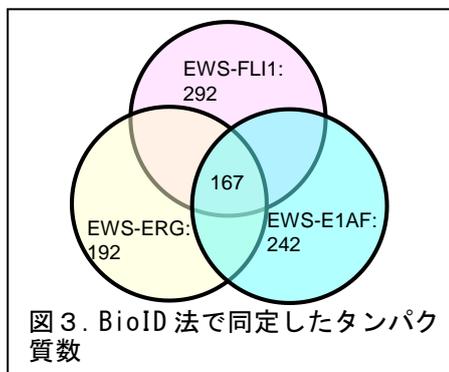


図 3. BioID 法で同定したタンパク質数

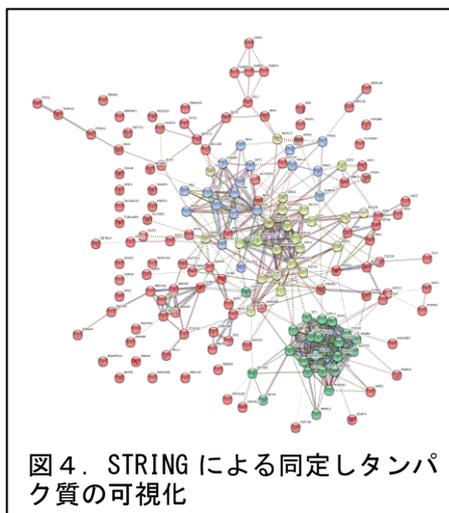


図 4. STRING による同定したタンパク質の可視化

streptavidin agarose ビーズでは全く検出されなかった。これらのことから、RBM33 はキメラがん転写因子と隣接して存在する可能性が高いことが示唆された。他にも、c-Jun, Jun-B, Jun-D, FosL2, CPSF6, CPSF7, TLE3 は抗体を使いウエスタンブロッティングで再現性があることが分かった。一方、CREB5, FosL1, Asf1, PIAS4, SUMO2/3, RBM12, RBM26, TCERG はコントロールと比較してウエスタンブロッティングでは再現性を得ることができなかった。現在、レンチウイルス-shRNA によるターゲット遺伝子のノックダウンによる発現抑制実験によってユーイング肉腫細胞で細胞増殖などの表現型が得られるのかどうかを検討している。

<引用文献>

- ① Kitagawa T, Okita H, Baron B, Tokuda K, Nakamura M, Wang Y, Akada J, Hoshida H, Akada R, Kuramitsu Y, Nakamura K. Mutant screening for oncogenes of Ewing's sarcoma using yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Aug;99(16):6737-44
- ② Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012 Mar 19;196(6):801-10
- ③ Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1531-6.
- ④ Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, Awad ME, Rengarajan S, Volorio A, McBride MJ2, Broye LC, Zou L, Stamenkovic I, Kadoch C, Rivera MN, Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell.* 2017 Sep 21;171(1):163-178. e19

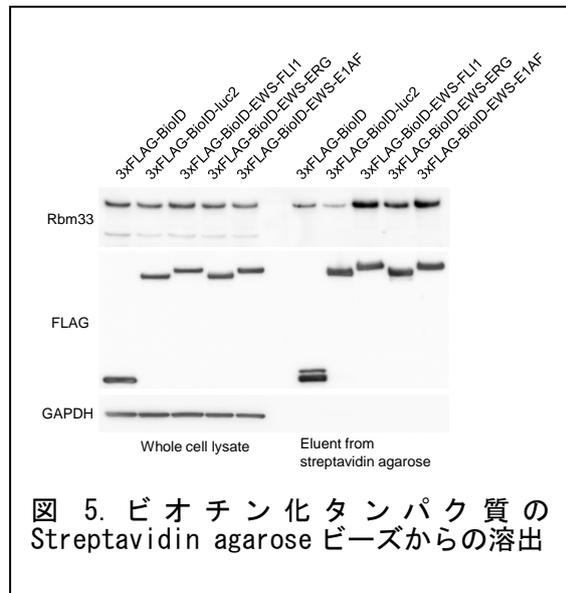


図 5. ビオチン化タンパク質の Streptavidin agarose ビーズからの溶出

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokuda Kazuhiro, Baron Byron, Yamashiro Chiemi, Kuramitsu Yasuhiro, Kitagawa Takao, Kobayashi Masaaki, Sonoda Koh Hei, Kimura Kazuhiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Up regulation of the pentose phosphate pathway and HIF 1 expression during neural progenitor cell induction following glutamate treatment in rat ex vivo retina	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 137 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11212	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 該当する
1. 著者名 Kuhara K, Tokuda K, Kitagawa T, Baron B, Tokunaga M, Harada K, Terasaki M, Uehara O, Ohta T, Takai R, Hamada JI, Kobayashi M, Shimo T, Nagayasu H, Kuramitsu Y	4. 巻 38
2. 論文標題 CUB Domain-containing Protein 1 (CDCP1) Is Down-regulated by Active Hexose-correlated Compound in Human Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 6107-6111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12961	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 該当する
1. 著者名 Shimada T, Nanimoto Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Kuramitsu Y	4. 巻 32
2. 論文標題 Enzyme-treated Asparagus Extract Down-regulates Heat Shock Protein 27 of Pancreatic Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 759-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11305	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 該当する
1. 著者名 Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda N, Morishige N, Kobayashi M, Kimura K, Nakamura K, Sonoda KH.	4. 巻 62
2. 論文標題 Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson's fixative and other fixation solutions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 481-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0592-7	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	荒木 令江  (Araki Norie)  (80253722)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授   (17401)	

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
---------	---------