

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19028

研究課題名(和文) SWI/SNFクロマチン再構成因子Brg1のリン酸化修飾と癌の悪性化機構

研究課題名(英文) Phosphorylation of SWI/SNF chromatin remodeling component Brg1 and mechanisms involved in malignant transformation of cancer

研究代表者

木村 鮎子 (KIMURA, Ayuko)

横浜市立大学・先端医科学研究センター・特任助教

研究者番号：50553616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らはこれまでの研究から、SWI/SNF複合体を構成する癌抑制因子の遺伝子変異率が高い卵巣明細胞癌細胞株において、複合体コア因子であるBRG1のリン酸化レベルが顕著に低下していることを見いだしている。本修飾の機能を明らかにするために、本研究では、修飾を欠失・擬態する変異を導入した細胞株を構築し、トランスクリプトーム・プロテオームと変異細胞株の表現型の解析を行った。結果として、リン酸化擬態変異細胞株では、クロマチン不活性化に関わる一連のタンパク質やリン酸化タンパク質が増加しており、さらに細胞増殖や遊走能の抑制に関わる遺伝子の発現亢進と、そのことによって生じる表現型変化も確認された。

研究成果の概要(英文)：The SWI/SNF complex contains many tumor suppressors (e.g., ARID1A and BRG1) that are frequently mutated in cancers including ovarian clear cell carcinoma (OCCC), a malignant subtype of ovarian cancers. Previously, we reported that the phosphorylation of BRG1 was significantly reduced in OCCC cells. To reveal the role of BRG1 phosphorylation, we analyzed the transcriptome, proteome, and phenotypes of cell lines with or without mutations in the phosphorylation site. Proteome analysis revealed the upregulation of proteins and phosphoproteins involved in chromatin inactivation in phosphorylation-mimic mutant. In addition, the proliferative and migratory abilities of phosphorylation-mimic cells was decreased as compared to those of wild-type or phosphorylation-deleted cells. Transcriptome analysis also revealed their quantitative differences in genes involved in cell proliferation and migration, indicating the role of BRG1 phosphorylation in regulation of these genes.

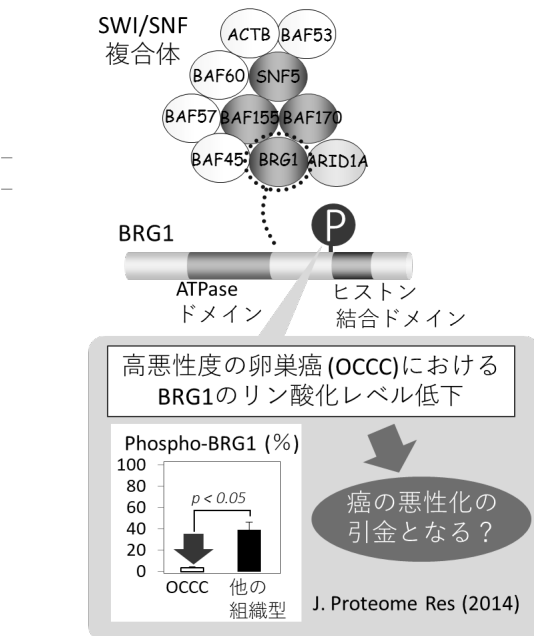
研究分野：分子生物学、タンパク質化学

キーワード：リン酸化 癌 悪性化 プロテオミクス クロマチン再構成複合体

### 1. 研究開始当初の背景

SWI/SNF (SWI/SNF/Sucrose Non-Fermentable) クロマチン再構成複合体は、クロマチン構造をほどいて遺伝子発現や DNA 修復を促し、癌化の抑制に働くことが知られている。SWI/SNF 複合体サブユニットのうち、ATPase として働くコアサブユニットの一つである BRG1 や、DNA 上の AT リッチ配列を認識して結合する ARID1A などの因子をコードする遺伝子は、様々な癌において高頻度な変異を生じることから、癌抑制遺伝子として特に注目を集めている。一方で、申請者は、数多くの卵巣癌組織型の中でも特に悪性度の高いことで知られる卵巣明細胞癌 (Ovarian Clear Cell Carcinoma: OCCC) の病態機構に関わるリン酸化タンパク質の同定を目指して、OCCC とそれ以外の組織型の卵巣癌細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析を行い、OCCC では ARID1A のタンパク質レベル低下とともに、BRG1 のヒストン結合ドメイン N 末端におけるリン酸化修飾レベルが他の組織型と比べて 10%以下にまで低下していることを初めて見いだした (Kimura A et al., J. Proteome Res., 2014, 図 1)。癌における SWI/SNF 遺伝子の変異や発現量低下に関する報告はこれまでも多数存在していたが、SWI/SNF 因子のリン酸化レベル低下に関する報告は、これが初めてであった。

図 1. OCCC 細胞株における BRG1 のリン酸化レベル低下



### 2. 研究の目的

上記の研究によって見出された、SWI/SNF 複合体因子 BRG1 のリン酸化レベル低下と癌の悪性化機構との関係を明らかにするために、本研究では部位特異的変異導入細胞株を用いたプロテオーム・リン酸化プロテオ

ーム・トランスクリプトーム解析による関連分子機構の推定と、癌細胞の悪性化に関わる種々の表現型変化の解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 癌細胞株を用いたリン酸化修飾部位への変異導入と安定発現細胞株の構築

BRG1 のヒストン結合ドメイン N 末端リン酸化修飾の欠失・擬態変異を導入するために、リン酸化部位のセリンをアラニンもしくはアスパラギン酸に置換する変異配列を含むプライマーを用いて、完全長 BRG1 遺伝子の配列を含むプラスミドを鋳型とする Inverse-PCR を行った後、DpnI による鋳型プラスミドの分解と PCR 産物のセルフライゲーションによるプラスミド構築を行った。これを BRG1 欠損細胞株に形質転換し、プラスミド中に含まれるカナマイシン耐性遺伝子を利用した変異体細胞のスクリーニングと 96 ウェルプレートを用いた希釈法によるシングルコロニーの単離により、各変異遺伝子の安定発現細胞株を樹立した。

#### (2) リン酸化修飾部位変異導入細胞株を用いたプロテオーム・リン酸化プロテオームの比較定量解析

正常型およびリン酸化修飾欠失・擬態型 BRG1 の安定発現細胞株から、8M 尿素を含む変性緩衝液を用いてそれぞれタンパク質を抽出し ( $n = 3$ )、さらにタンパク質のトリプシン消化と、C18 樹脂を充填した Stage-tip を用いた脱塩を行った。このうち 100  $\mu$ g 分のペプチドを用いて、さらに、二酸化チタンビーズを詰めたチップカラムによるリン酸化ペプチドの濃縮を行った。調整したペプチド・リン酸化ペプチド試料それぞれについて、Q Exactive Quadrupole-Orbitrap LC-MS (Thermo Fisher Scientific) を用いて分析を行った。得られたペプチドピークデータを基に、Progenesis LC-MS ソフトウェア (Nonlinear Dynamics) を用いたピーク面積値に基づくペプチド比較定量解析と、3 群間での多変量解析を行い、さらに Mascot ソフトウェア (Matrix Science) を用いたタンパク質と各リン酸化修飾部位の同定を行った。

#### (3) リン酸化修飾部位変異導入細胞株を用いたトランスクリプトーム解析

上記の 3 種の変異導入細胞株より、それぞれフェノール・チオシアン酸グアニジンを用いて RNA を抽出した ( $n = 3$ )。さらに、オリゴ dT を結合した磁気ビーズを用いて mRNA を回収し、これを鋳型とする cDNA ライブラリを構築した。これを用いて、illumina HiSeq 1500 (Agilent Technology) による RNA 配列解析を行った。得られた配列データをゲノム上にマッピングし、遺伝子当りの発現 (fpkm 値) の算出と、BRG1 正常型、リン酸化部位欠失型・擬態型変異株の各 2 群

間の組み合わせごとに、T 検定による有意差検定を行った。

(4) リン酸化修飾部位変異細胞株を用いた癌の悪性化に関わる表現型の解析

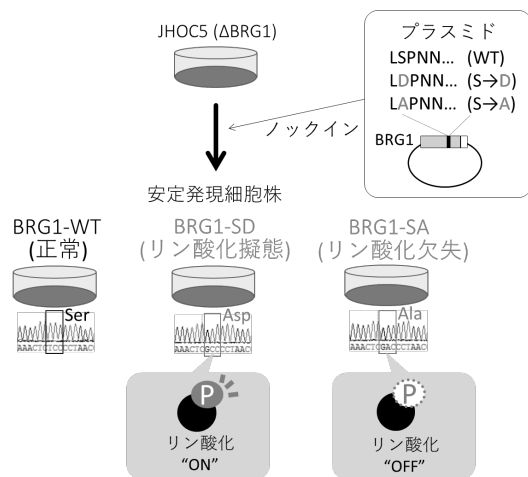
BRG1 のリン酸化修飾部位への変異導入による細胞増殖能の変化の有無を確認するために、96 ウェルプレート中に細胞を同数ずつ数えて添加し、37 °C、CO2 インキュベーター内で一晚培養した後に、各ウェルに MTS テトラゾリウムを添加し、生細胞のもつ NADPH 依存性脱水素酵素による還元反応によって生じる、ホルマザン化合物による 490 nm の発色の検出・定量を行った。さらに、悪性度の高い癌細胞の特徴の一つである細胞遊走能の変化を見るために、各細胞株を 24 ウェルプレート中でコンフルエントの状態まで培養した後に、スクラッチアッセイ(創傷治癒アッセイ)を行った。本方法では、ピペットチップを用いて細胞層上にスクラッチ(創傷部位)を形成し、8~10 時間程度培養した後、遊走細胞によって傷が塞がる速度を指標に、細胞遊走能の定量化を行った。

4. 研究成果

(1) 癌細胞株を用いたリン酸化修飾部位への変異導入と安定発現細胞の構築

BRG1 のリン酸化修飾部位変異導入遺伝子を安定的に発現する細胞株を構築し、それぞれについて、PCR 法による BRG1 遺伝子の増幅と、DNA シーケンサーによる導入配列の確認を行った(図 2)。

図 2. BRG1 リン酸化部位への変異導入



(2) リン酸化修飾部位変異導入細胞株を用いたプロテオーム・リン酸化プロテオームの比較定量解析

プロテオーム・リン酸化プロテオーム解析データの各変異体細胞株間での多変量解析を行った結果、リン酸化欠失・擬態変異導入細胞株において有意に高値もしくは低値を示す、47 種類のリン酸化タンパク質を含む

計 308 種類のタンパク質を同定した ( $p < 0.01$ )。これらのタンパク質の中には、リンカーヒストン H1 や、ヒストンのメチル化/脱メチル化に関わる酵素、ヒストン H1 の競合結合因子など、クロマチン構造の安定化に関わるタンパク質が多く含まれていた。これらの結果から、BRG1 のリン酸化修飾は、クロマチン構造の安定化に関わる一連のタンパク質群の量的、質的变化をもたらすことが推測された。

(3) リン酸化修飾部位変異導入細胞株を用いたトランスクリプトーム解析

BRG1 のリン酸化修飾の有無によるクロマチン構造変化により、どのような遺伝子が発現制御を受けるのかを明らかにするために、BRG1 リン酸化部位変異導入細胞株を用いて、トランスクリプトーム解析による発現遺伝子の比較定量解析を行った。結果として、BRG1 のリン酸化擬態変異細胞株では、細胞の増殖や遊走の抑制、もしくはアポトーシスの促進に関わる複数の遺伝子の発現亢進が認められた一方で、リン酸化欠失変異細胞株では、これらの表現型を正反対の方向に制御する一連の遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。

(4) リン酸化修飾部位変異導入細胞株の表現型解析

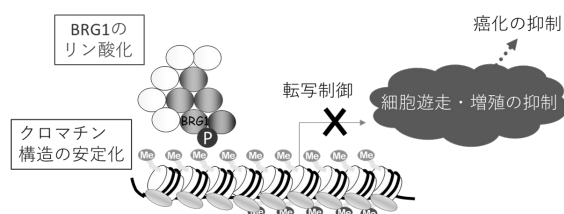
細胞増殖能解析の結果、BRG1 のリン酸化擬態変異細胞株では、他の細胞株と比べてわずかに増殖能の低下が認められた。また、創傷治癒アッセイの結果、正常細胞株と比較した際の創傷治癒の速度は、BRG1 のリン酸化欠失変異細胞株では早く、リン酸化部位擬態変異細胞株では遅くなっていた。これらの結果から、BRG1 のリン酸化修飾は細胞の増殖や遊走など、癌の悪性度に関わる形質の発現を抑制する働きのあることが示唆され、(3)のトランスクリプトーム解析から得られた結論と合致する結果が得られた。

(5) BRG1 のリン酸化修飾と癌の悪性化機構との関連に関する考察

本研究で着目した BRG1 のヒストン結合ドメイン N 末端におけるリン酸化修飾は、様々な臓器由来の癌細胞株など、多数の培養細胞株を用いたリン酸化プロテオーム解析でも繰り返し検出されている、頻度の高い修飾であり、細胞内でも特に重要な機能を担っているものと考えられる(参照: Phosphosite plus, Cell signaling technology, <https://www.Phosphosite.org>)。さらに、悪性度の高い卵巣明細胞癌細胞株では、本修飾部位における著しいリン酸化レベル低下が見られることから、本修飾は、癌化や癌の悪性化にも深く関わるものと考えられる。本研究では、BRG1 のリン酸化修飾がクロマチン構造の安定化に関わる、リンカーヒストンなどの一連の核タンパク

質の存在量やリン酸化修飾レベルの制御を介して、細胞の増殖や遊走など、癌化や癌の悪性化に関わる遺伝子の発現を制御し、実際に変異細胞株におけるこれらの表現型を変化させ、結果として癌化を抑制する方向に働くことが示された (図3)。

図 3. BRG1 のリン酸化と癌の悪性化機構についての推定



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Kyohara M, Shirakawa J, Okuyama T, Kimura A, Togashi Y, Tajima K, Hirano H, Terauchi Y.

Serum quantitative proteomic analysis reveals soluble EGFR to be a marker of insulin resistance in mice and humans. *Endocrinology*. 158(12):4152-4164 (2017) (原著論文, 査読あり)

2. 木村 鮎子, 平野 久  
癌悪性化機構の解明を目指したリン酸化プロテオーム解析 *Proteome letters*. 2(1):37-45 (2017) (原著論文, 査読あり)

3. Nakamura H, Kimura A, Goshima Y et al. (14名中3番目)  
Comprehensive behavioral study and proteomic analyses of CRMP2-deficient mice. *Genes to Cells*. 10: 1059-1079 (2016) (原著論文, 査読あり)

4. Ban T, Kimura A, Tamura T et al. (22人中10番目)  
Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 1 in the TLR-MyD88, *Immunity*. 45(2):319-332 (2016) (原著論文, 査読あり)

5. Hirano H, Kimura Y, Kimura A.  
Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics*. 134:37-46 (2016) (原著論文, 査読あり)

6. Kimura A, Kurata Y, Nakabayashi J, Kagawa H, Hirano H.  
N-Myristoylation of the Rpt2 subunit of

the yeast 26S proteasome is implicated in the subcellular compartment-specific protein quality control system. *J. Proteomics*. 130:33-41 (2016) (原著論文, 査読あり)

〔学会発表〕(計10件)

1. (ポスター発表)

木村 鮎子, 中林 潤, 田村 智彦, 香川 裕之, 木村 弥生, 平野 久

クロマチン再構成複合体因子 BRG1 のリン酸化修飾によるクロマチン関連タンパク質の変化と遺伝子発現制御, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017年

2. (招待講演)

木村 鮎子

Effects of Phosphorylation Site-Specific Mutations in a Component of Chromatin Remodeling Complex, 日本プロテオーム学会 2017年大会 (JHUP0 第15回大会), ホテル 阪急エキスポパーク (大阪), 2017年

3. (ポスター発表)

Kimura A, Nakabayashi J, Tamura T, Kagawa H, Kimura Y, and Hirano H.

Proteome and Transcriptome Analyses of Phosphorylation Site-Specific Mutants of BRG1, a Chromatin Remodeling Component. HUP02017, the 16th Annual World Congress 2017, Dublin, 2017

4. (受賞講演)

木村 鮎子

癌悪性化機構の解明を目指したリン酸化プロテオーム解析, 日本プロテオーム学会 2016年大会 (JHUP0 第14回大会), 北里大学, 2016年

5. (招待講演)

木村 鮎子

卵巣明細胞腺癌の悪性化機構の解明を目指したリン酸化プロテオーム解析, 第13回北里疾患プロテオーム研究会/第66回日本電気泳動学会シンポジウム, 北里大学, 2016年

6. (ポスター発表)

Kimura A, Arakawa N, and Hirano H. Phosphoproteomic analysis aimed at elucidating the mechanisms underlying the high malignancy of ovarian clear cell carcinoma. HUP0 2016, the 15th Annual World Congress 2016. Taipei, 2016

7. (ポスター発表)

Ban T, Kimura A, Tamura T et al.

(22人中10番目)

A critical link between Lyn-mediated suppression of the TLR-MyD88-IRF5 pathway and the development of SLE-like disease, *Immunology* 2016, Seattle, 2016

8. (招待講演)

木村 鮎子

翻訳後修飾プロテオーム解析による疾患関連タンパク質の解析, 第61回プロテオ

ーム医療創薬研究会，和光純薬工業(株)  
湯河原研修所，2015年

9. (ポスター発表)

木村 鮎子，倉田 洋一，香川 裕之，  
平野 久

酵母 26S プロテアソームサブユニットの  
N-ミリスチル化修飾とタンパク質品質  
管理機構，第 38 回 日本分子生物学会年会，  
神戸，2015年

10. (ポスター発表)

Kyohara M, Shirakawa J, Kimura A,  
Hirano H, Terauchi Y.

Quantitative Comparative Proteomic  
Analysis of Serum Proteins Associated with  
the Progression of Diabetes in db/db Mouse.  
American Diabetes Association's 75th  
Scientific Sessions, Boston, USA, 2015

〔図書〕(計1件)

1. 木村 鮎子

「プロテオミクスによる疾病研究とバイオ  
マーカー探索 (第5節)」

In silico 創薬におけるスクリーニングの高  
速化・効率化技術 - 6章システムバイオロジ  
ーによる疾患研究およびバイオマーカー探  
索の具体的事例，全 500 頁中 15 頁を執筆分  
担，技術情報協会 [In press] (2017) (著書)

〔その他〕

1. 日本プロテオーム学会奨励賞受賞  
(2016年7月28日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 鮎子 (KIMURA Ayuko)

横浜市立大学．先端医科学研究センター．

特任助教

研究者番号：50553616