

令和元年5月30日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19040

研究課題名(和文) Swi/Snf複合体による転写制御システムの解明

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional regulation by Swi/Snf complex

研究代表者

今村 優子 (IMAMURA, Yuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：50610937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ATP依存性クロマチンリモデリング因子Swi/Snf複合体の発癌制御における役割を解明するものである。Swi/Snf複合体の構成因子は、多くの癌において変異や欠失が同定されている。主要な構成因子Snf5のN末端が欠失しているSnf5bを含むSwi/Snf複合体は、in vitroにおけるアンドロゲン転写誘導系においてPSAの転写を抑制することを見出した。この結果は、前立腺癌に対する新たな治療アプローチになることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの知見により、クロマチンリモデリング因子であるSwi/Snf複合体は癌抑制因子として働き、癌の悪性化に関与することが明らかになってきた。しかし、Swi/Snf複合体は細胞増殖に必須な遺伝子の転写を制御するため、in vivoにおける実験系では詳細な機能の解析が困難であった。本研究では、in vitroにおいてクロマチンリモデリングを介した遺伝子転写を誘導する系を用いて、新たなSwi/Snf複合体の機能を調べたものである。本研究結果は、Swi/Snf複合体の癌化における役割を解明できるものであり、癌の治療に対する新たなアプローチを開拓していくものである。

研究成果の概要(英文)：This study elucidates the roles of ATP-dependent chromatin remodeling complex, Swi/Snf complex in oncogenic mechanism. Numerous cancers have gene mutations or deletions in subunits of Swi/Snf complex. We found that Snf5b deleting N-terminal domain of Snf5 suppressed the transcription of PSA in in vitro androgen induced transcriptional system.

研究分野：分子生物学

キーワード：Swi/Snf complex クロマチン 転写 癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類において必須な ATP 依存性クロマチンリモデリング因子 Swi/Snf 複合体は、細胞増殖や分化、転写、DNA 修復において重要な役割を果たしており、これらの複合体の構成因子は多くの癌において変異又は欠失が同定されている。Swi/Snf 複合体の主要な ATP 分解酵素である Brg1 と Brm は、アミノ酸レベルで約 75%と高い相同性を示し、SNF5 や BAF155、BAF170 などの共通したサブユニットをもつ。Brg1-又は Brm-Swi/Snf 複合体はクロマチン構造を変化させ、転写因子のプロモーター部位における結合を誘導することで転写活性化因子として働く一方、クロマチンと結合することで転写の抑制にも働くことが知られているが、二つの複合体の機能的な役割の違いは未だ不明なままである。

(2) Swi/Snf 複合体は癌抑制因子として働き、癌の悪性化を促進することが明らかになってきているが、癌細胞における制御メカニズムは解明されていない。Swi/Snf 複合体の主要な構成因子 BRG1 や SNF5 のノックアウトマウスは胎生致死性を示し、培養細胞におけるノックダウンは構成因子の多くが細胞増殖停止を引き起こすため、解析に必要な実験系の確立が困難であった。本研究では、*in vitro* においてクロマチンリモデリングを介する転写誘導系を用いて、Swi/Snf 複合体の癌細胞における転写調節を明らかにするものである。

2. 研究の目的

本研究は、Swi/Snf 複合体の癌細胞における生理学的機能を明らかにすることを目的としている。特に、()Brg1-Swi/Snf 複合体と Brm-Swi/Snf 複合体の転写制御における役割の違い、() *in vitro* における Swi/Snf 複合体の機能解析に用いるアッセイ系の確立、() 癌細胞における Swi/Snf 複合体の転写制御機構の解明、の三点を行っていく。本研究成果により、抗癌剤の新たなターゲット因子としての Swi/Snf 複合体の有効性を検討し、実用化を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、*in vitro* の実験系を用いて Swi/Snf 複合体又は癌変異型 Swi/Snf 複合体の転写制御に対する影響、協調的に働く新規転写因子の同定を行う。

(1) 培養細胞に Flag タグを付加した Brg1 又は Brm を発現し、Swi/Snf 複合体を精製する。取得された複合体に特異的に結合している転写因子や構成因子を immunoblotting 又は質量分析により同定する。

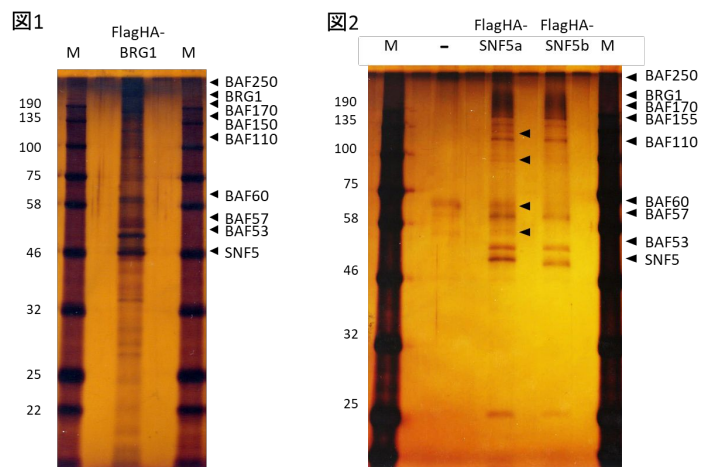
(2) Brg1 や Snf5 は癌細胞において変異や欠失が多数見つかったことから、癌変異型の Brg1 と Snf1 を作製し、癌化における Brg1-Swi/Snf 複合体の役割を調べる。特に多くの癌細胞で発現している Snf5b を発現し、野生型である Snf5b との複合体の違いを解析する。

(3) これまでに、Swi/Snf 複合体はアンドロゲンによる転写を活性化することが報告されていることから、*in vitro* においてクロマチン構造変換を伴い、アンドロゲンによって誘導されるターゲット遺伝子 PSA の転写を評価する系を構築する。この評価系に(1)(2)で精製した複合体を加えることで、転写における Brg1-Swi/Snf 複合体の機能を評価する。

(4) 癌変異型 BRG1 又は SNF5 発現細胞における RNA-seq を行うことにより、ターゲット遺伝子の転写量の変化を網羅的に解析する。この解析結果により、癌細胞における Swi/Snf 複合体の転写調節に対する影響を明らかにする。

4. 研究成果

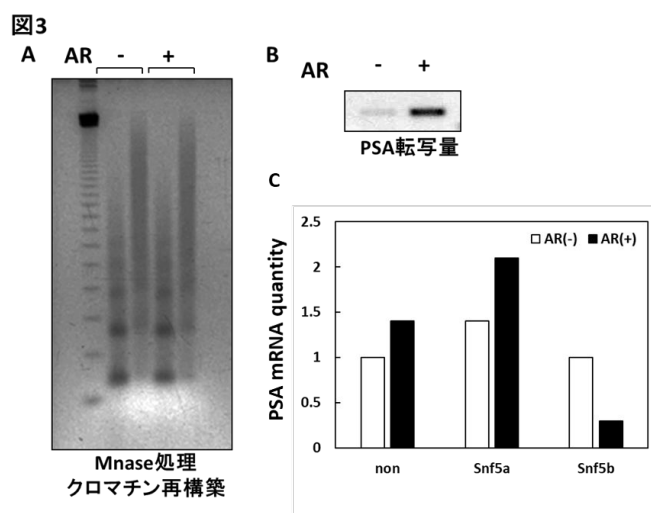
(1) Brg1-Swi/Snf 複合体と Brm-Swi/Snf 複合体の構成因子の違いを明らかにするために Swi/Snf 複合体の精製を行った。ヒト胎腎細胞 HEK293 細胞又は HeLa 細胞に Flag-HA タグを付加した Brg1 又は Snf5 を発現させ、Brg1-Swi/Snf 複合体を精製した(図1)。その結果、これまでに報告のある Brg1-Swi/Snf 複合体のサブユニット以外のタンパク質が含まれていたことから、新規の構成因子又は転写因子である可能性があるため、タンパク質の同定を行っている。



(2) 悪性ラブドイド腫瘍の原因遺伝子として知られている Snf5 には 2 つの isoform(Snf5a, b)

が存在しているが、生理学的な機能の違いは明らかになっていない。しかし、野生型である Snf5a の N 末端領域の 9 アミノ酸が欠失した Snf5b は、多くの癌細胞で発現していることが明らかになっており、発癌における関与が示唆される。そこで、精製した Snf5a 又は Snf5b を含む Swi/Snf 複合体を精製し比較したところ、明らかに構成しているタンパク質に違いがあった (図 2)。Snf5b は N 末端領域の欠失により、複合体構成因子の安定性が低下したためであると考えられる。

(3) Swi/Snf 複合体はアンドロゲンレセプターのターゲット遺伝子の転写を活性化することが報告されている。そこで、*in vitro* においてクロマチン構造変換を伴いアンドロゲン誘導によってターゲット遺伝子である PSA が転写される系を構築した (図 3A, B)。そこで、精製した Snf5a 又は Snf5b 複合体をアンドロゲンレセプターによる *in vitro* 転写誘導系に加えたところ、Snf5a 複合体では転写が活性化されたのに対して、Snf5b 複合体では転写が抑制された (図 3C)。これらの結果より、Snf5a と Snf5b に機能的な違いが存在することを見出した。



(4) ATP 分解酵素 Brg1 と BRM は機能的にオーバーラップしていると考えられていたが、近年膵臓ランゲルハンス島の細胞において Brg1 が特異的に転写制御していることが明らかになった。そこで、Brg1 と BRM の癌細胞における機能的な違いを明らかにするために、HeLa 細胞において BRG1、BRM、SNF5 をノックダウンしたところ、BRM のノックダウンは BRG1 のノックダウンと同レベルの増殖抑制を示した。このことから、BRM もまた癌における細胞増殖を制御していることが予想された。今後、BRG1 と BRM のノックダウンによる転写への影響を RNA-seq により解析する予定である。

5. 主な発表論文等

Hitoshi Aihara, Takeya Nakagawa, Hirofumi Mizusaki, Mitsuhiro Yoneda, Masanori Kato, Masamichi Doiguchi, Yuko Imamura, Miki Higashi, Tsuyoshi Ikura, Tomonori Hayashi, Yoshiaki Kodama, Masaya Oki, Toshiyuki Nakayama, Edwin Cheung, Hiroyuki Aburatani, Ken-ichi Takayama, Haruhiko Koseki, Satoshi Inoue, Yukio Takeshima, Takashi Ito
 Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1
 Molecular Cell, 査読有, Vol.64, No.1, 2016, pp.176-188
 DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.012.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。