

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20345

研究課題名(和文) 小児悪性腫瘍の新規治療法の開発：ユーイング肉腫癌遺伝子不活性化タンパク質の同定

研究課題名(英文) Identification of novel binding partners for oncogenes of Ewing sarcoma

研究代表者

北川 孝雄 (KITAGAWA, Takao)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20614928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000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。ヒト cDNA two-hybridライブラリーを持つ酵母でEWS-FLI1との相互作用タンパク質スクリーニングを行ったが、同定できなかった。また、EWS-FLI1に対する共免疫沈降を行った結果、RBM14を同定したが再現性が得られなかった。そこでBioID法を行った結果、相互作用候補タンパク質として、SFPQ、FUS、NONO、PSPC1を同定した。しかし、NanoBitによるEWS-FLI1との相互作用試験では、再現性が得られなかった。現在、Piggybacシステムで相互作用タンパク質の同定を目指している。

研究成果の概要(英文)：Ewing sarcoma is a bone or soft tissue cancer, which is caused by chromosomal rearrangement. The resulting EWS-FLI1, EWS-ERG, EWS-E1AF show oncogenic activity, but its molecular mechanism is almost unclear. To identify binding partners for EWS-FLI1, I performed Two-hybrid screening for human cDNA and co-immunoprecipitation of EWS-FLI1. As a result, no binding partners were obtained in the two-hybrid screening, but RBM14 was obtained in the co-immunoprecipitation screening. Further, I tried BioID method, which is proximity biotination assay for target proteins. I obtained SFPQ, NONO, PSPC1, and FUS, which are part of paraspecter components, as a interaction partner. However, these proteins did not show any interaction for EWS-FLI1. Now, I have tried development of piggybac system of BioID method for EWS-FLI1.

研究分野：癌生物学

キーワード：BioID プロテオミクス ユーイング肉腫

1. 研究開始当初の背景

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り、悪性度が高く、転移頻度も共に高い。がん化の原因として、染色体の相互転座による転写活性化部位を持つEWS遺伝子とDNA結合部位を持つFLI1遺伝子の融合遺伝子EWS-FLI1が85%以上の症例で検出される(図1)。他にもEWS-ERG、EWS-E1AFなどの組合せもユーイング肉腫で検出される。がん遺伝子が同定されているにもかかわらず、有効な分子標的治療は確立されていない。

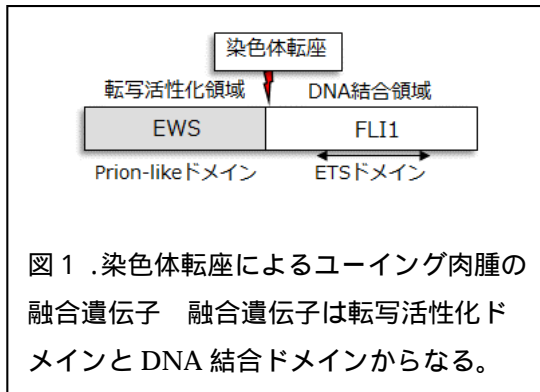


図1. 染色体転座によるユーイング肉腫の融合遺伝子 融合遺伝子は転写活性化ドメインとDNA結合ドメインからなる。

2. 研究の目的

EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AF 遺伝子を酵母で発現させると著しい増殖低下を示すことから、増殖低下を解除する変異体を同定した。その結果、酵母で同定した3種の融合遺伝子の変異部位は、ETSファミリーのFLI1、ERG、E1AFのETSドメインのみに集中しており、HEK293細胞では、EWS-FLI1の転写活性に必要であることを見出した(図2)(引用文献)

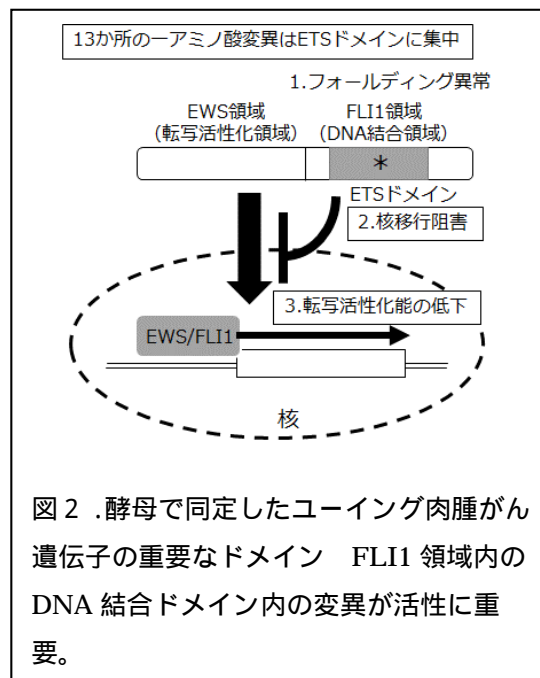


図2. 酵母で同定したユーイング肉腫がん遺伝子の重要なドメイン FLI1領域内のDNA結合ドメイン内の変異が活性に重要。

本研究では、ETSドメインを介したユーイング肉腫のがん化作用機序の解明のため、

ETSドメイン結合タンパク質の同定を行うことを目的とした。研究計画は、酵母とユーイング肉腫細胞を使った(1)ETSドメインを標的とする結合タンパク質の同定、(2)EWS-FLI1の増殖に関する遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

(1)ETSドメインを標的とする結合タンパク質の同定の方法として2つのアプローチを行った(図3)。a.はETSドメインと結合するタンパク質を共免疫沈降を用いて同定する方法である。b.はヒトcDNAを酵母で発現させ、結合するタンパクをスクリーニングする方法である。

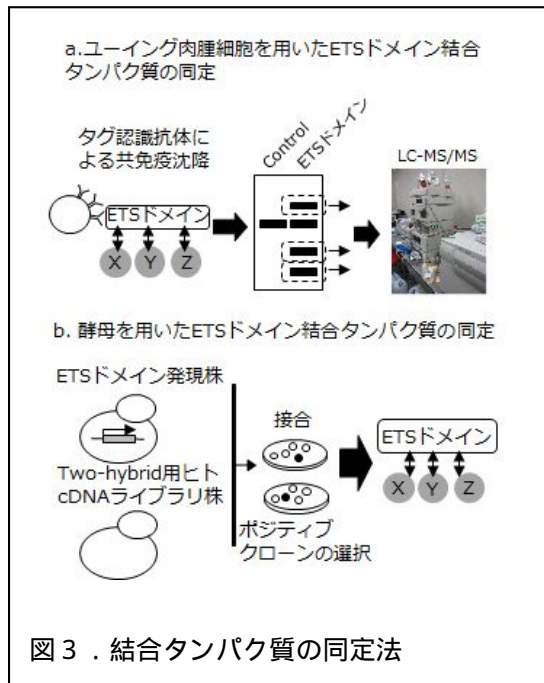


図3. 結合タンパク質の同定法

(2)EWS-FLI1の増殖に関する遺伝子の同定に関しては、4800遺伝子を破壊した酵母遺伝子破壊株ライブラリーを使用した(図4)。



図4. 酵母遺伝子破壊株へのEWS-FLI1遺伝子の導入による増殖阻害試験 ライブラリー内の特定の遺伝子破壊株では、EWS-FLI1による増殖阻害が抑圧される。

4. 研究成果

(1)共免疫沈降試験。HEK293 へ EWS-FLI1 遺伝子をトランスフェクションし、FLAG 抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE で共免疫沈降したタンパク質を分離した。その結果、RNA-binding protein 14(accession number:Q96PK6)を同定した。しかし、共免疫沈降による再現ができなかった。

(2)酵母 Two-hybrid cDNA スクリーニング。酵母用の EWS および FLI1 を発現できるプラスミドを作製し、ヒト cDNA ライブラリー (Mate&Plate library- universal Human (Normalized), clontech) を発現する酵母と接合させ、スクリーニングした (図 5)。そ

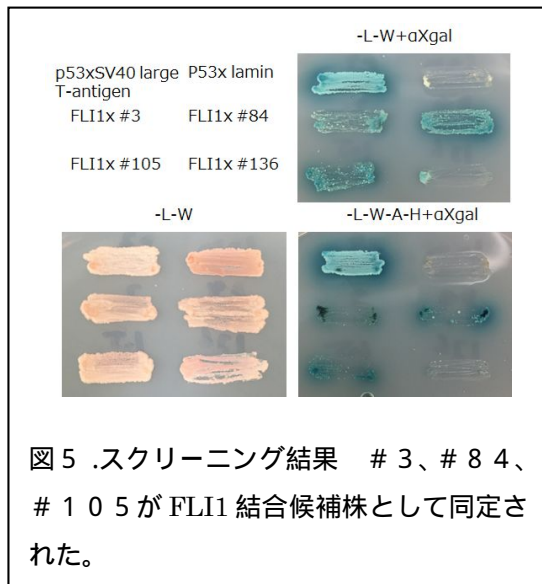


図 5 .スクリーニング結果 # 3、# 8 4、# 1 0 5 が FLI1 結合候補株として同定された。

の結果、3株 (# 3、# 8 4、# 1 0 5) がポジティブクローンとして同定できた。# 3 はリソソームのプロテアーゼ cathepsin V の C 末端、# 8 4 は CD59 noncoding RNA の一部であることが分かった。残念ながら、既知あるいは新奇な遺伝子の同定には至らなかった。

(3)EWS-FLI1 の増殖に關与する遺伝子の同定。酵母の遺伝子のうち、約 8 割を網羅した 4800 遺伝子を破壊した酵母遺伝子破壊株ライブラリーに対して 9 6 ウェルで形質転換する方法を確立している (引用文献)。EWS-FLI1 を発現すると細胞増殖が著しく阻害されるので、増殖阻害を解除するような遺伝子破壊株の遺伝子は EWS-FLI1 の機能に關与していることが予想される。遺伝子破壊株ライブラリーへ形質転換した結果、snf2 遺伝子破壊株が EWS-FLI1 による増殖阻害を解除した (図 6)。

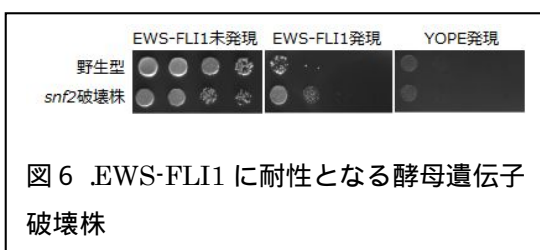


図 6 .EWS-FLI1 に耐性となる酵母遺伝子破壊株

SNF2 はクロマチンリモデリング複合体の ATPase 活性を持つ中心の遺伝子であり、ヒトでは Brg/Brm と相動性がある。Brg/Brm は、最近 EWS-FLI1 と相互作用する分子であることが報告された (引用文献③)。このことから酵母によるスクリーニングによって EWS-FLI1 の機能と關連する分子を同定することができるツールであることを示した。残念ながら、先に報告されたので、新規分子を同定するために BioID 法による相互作用分子の同定を目指した。BioID 法は、大腸菌の Biotin ligase (BirA)に変異が入った BirA*と任意の遺伝子を融合させて利用する方法である。BirA*は培地中にビオチンがあると約 10nm 範囲のタンパク質をランダムにビオチン化することができ、細胞が生きた状態でのタンパク質複合体を同定することが

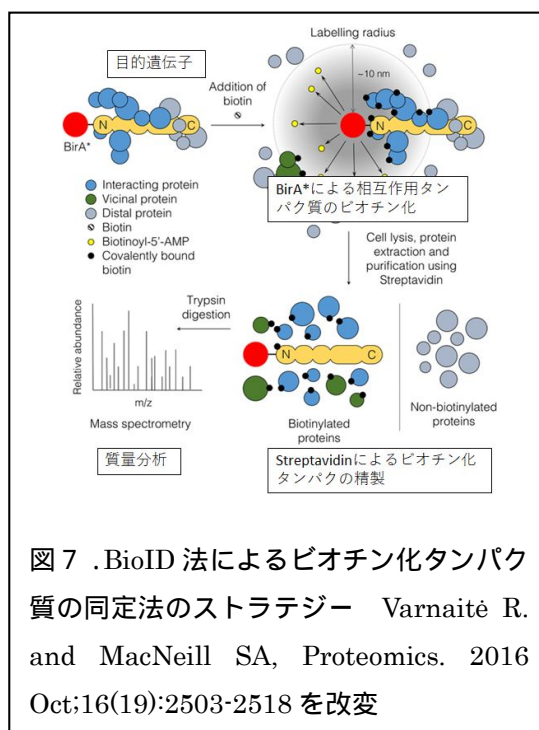


図 7 .BioID 法によるビオチン化タンパク質の同定法のストラテジー Varnaité R. and MacNeill SA, Proteomics. 2016 Oct;16(19):2503-2518 を改変

できる方法である (引用文献) (図 7)。この方法を EWS-FLI1 に応用することを試みた。BirA*に EWS-FLI1 を融合し、HEK293 に CMV プロモーターで発現させ、50μM Biotin となるように培地に加え 1 日培養した。培養後、論文の方法に従って Streptavidin-磁気ビーズでビオチン化タンパク質を回収しトリプシン消化後に質量分析装置でタンパク質を同定したところ、Paraspeckle component である SFPQ、FUS、NONO、PSPC1 などが同定された。これらの分子は DNA 損傷時部位に Parp1 の poly(ADP)ribosyl 化依存的に DNA に局在する分子であり、転写や転写後調節など多彩な機能を持つ RNA 結合タンパク質である。EWS もこれらの複合体の一部であることから、Paraspeckle component が EWS-FLI1 の機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図 8)。これらの分子が

EWS-FLI1 と相互作用しているのかどうかを調べるために、Split luciferase 法である

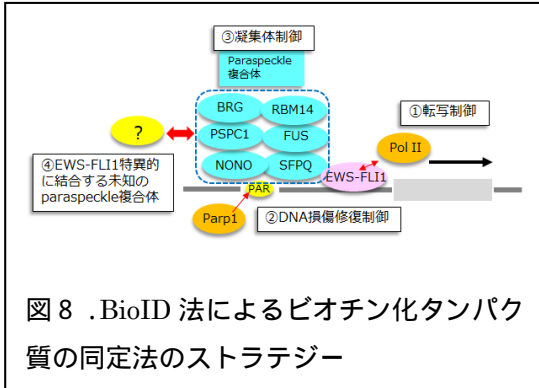


図 8 . BioID 法によるビオチン化タンパク質の同定法のストラテジー

NanoBit (プロメガ社) を使用した。この方法は任意の二つのタンパク質に split した Luciferase を融合遺伝子として発現させることで、Luciferase 活性がある場合は 2 分子が隣接していることが予想される新規のタンパク質相互作用の検出法である。この方法を利用して EWS-FLI1 および SFPQ、NONO を融合させた nanobit を発現させて luciferase 活性を調べた。その結果、SFPQ および NONO と EWS-FLI1 との結合が確認できなかった。

一過性のプラスミドによる発現では、相互作用タンパク質の同定ができなかった。そこで染色体に簡単に遺伝子を導入できる方法である Piggybac 法を利用した。Piggybac 用のプラスミドに Tet-on システムを導入し、BioID-EWS-FLI1、BioID-EWS-ERG、BioID-EWS-E1AF を発現できるようなプラスミドを作製した。作製したプラスミドを HEK293 細胞ではなくユーイング肉腫細胞である A673 へ導入した。作製した株で導入した遺伝子が発現され、ビオチン化されるかどうかを調べるために免疫染色 (図 9) およびウエスタンブロッティング (図 10) を行っ

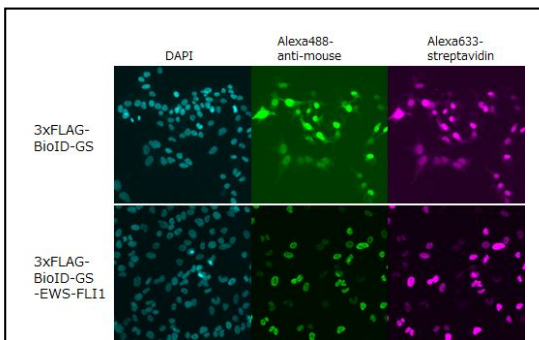


図 9 . ユーイング肉腫細胞の BioID-EWS-FLI1 発現によるビオチン化染色体で導入された遺伝子の発現を 1 μ g/mL doxyxycine, 50 μ M biotin で一日誘導後固定し、染色した。

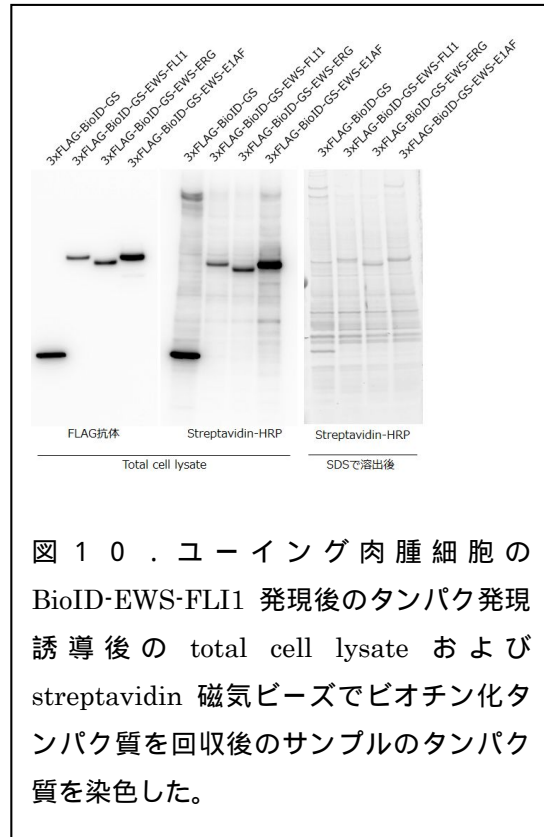


図 10 . ユーイング肉腫細胞の BioID-EWS-FLI1 発現後のタンパク質発現誘導後の total cell lysate および streptavidin 磁気ビーズでビオチン化タンパク質を回収後のサンプルのタンパク質を染色した。

た。その結果、7 から 8 割の細胞で遺伝子の発現および、ビオチン化が確認された。また、Streptavidin 磁気ビーズによるビオチン化タンパク質の回収を行うことができることが分かった。現在、共同研究で高感度な質量分析装置での解析を行っているところである。

引用文献

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, 99(16):6737-44. doi: 10.1007/s00253-015-6621-2.

Kitagawa T, Hoshida H, Akada R., Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast., Infect Immun. 2007 Mar;75(3):1393-402

③Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, Awad ME, Rengarajan S, Volorio A, McBride MJ, Broys LC, Zou L, Stamenkovic I, Kadoch C, Rivera MN., Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain., Cell. 2017, 171(1):163-178.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.036.

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, 196(6):801-10. doi:

10.1083/jcb.201112098.

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 5 件)

Nishihara H, Shimizu F, Kitagawa T, Yamanaka N, Akada J, Kuramitsu Y, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Nakamura K, Kanda T., Identification of galectin-3 as a possible antibody target for secondary progressive multiple sclerosis, *Mult Scler.* 2017, 23(3):382-394. doi: 10.1177/1352458516655217. (査読有り)

Wang Y, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Akada J, Maehara SI, Maehara Y, Nakamura K., PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells., *Int J Oncol.* 2017, 50(2):606-612., doi: 10.3892/ijo.2016.3804. (査読有り)

③Ito Y, Kitagawa T, Yamanishi M, Katahira S, Izawa S, Irie K, Furutani-Seiki M, Matsuyama T., Enhancement of protein production via the strong DIT1 terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*., *Sci Rep.* 2016, 15;6:36997., doi: 10.1038/srep36997. (査読有り)

Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda N, Kobayashi M, Kimura K, Sonoda KH, Nakamura K. Changes in metabolic proteins in ex vivo rat retina during glutamate-induced neural progenitor cell induction., *Mol Cell Biochem.* 2016, 419(1-2):177-184., doi: 10.1007/s11010-016-2769-z. (査読有り)

Fujiwara S, Kawazoe T, Ohnishi K, Kitagawa T, Popa C, Valls M, Genin S, Nakamura K, Kuramitsu Y, Tanaka N, Tabuchi M., RipAY, a Plant Pathogen Effector Protein, Exhibits Robust -Glutamyl Cyclotransferase Activity When Stimulated by Eukaryotic Thioredoxins., *J Biol Chem.* 2016, 25;291(13):6813-30. doi: 10.1074/jbc.M115.678953. (査読有り)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 孝雄 (KITAGAWA, Takao)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20614928

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし