

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07154

研究課題名(和文) 上皮がん細胞におけるSRF-MKL1/2複合体の転写活性化能の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms involved in SRF-MKL1/2 complex in epithelial tumors

研究代表者

伊庭 英夫 (Iba, Hideo)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授

研究者番号：60111449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は上皮癌由来細胞株ではクロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体の触媒サブユニット Brmの発現の有無と、MKL1やMKL2 (MKL1/2) がcofactorとして機能するSRFの標的遺伝子群の有無が逆相関すること、さらにBrmがMKL1/2の機能を負に制御することを見出した。この分子機構を解析したところ、1) Brmの発現を欠失する細胞では、MKL1/2は細胞核内に局在するが、Brm型SWI/SNFを完備する細胞ではMKL1/2は細胞質に留まる2) Importin の一種がBrm依存的な発現をすることを見出したが、これはMKL1/2の細胞内の局在には影響を与えない、ことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの上皮がん細胞では、SWI/SNF複合体の触媒サブユニット Brmの発現の有無によって細胞内の多くの遺伝子群の制御ネットワークが決定的に違う2群に分けられることを見出してきた。その分子機構を理解することは、両群ごとに適切な治療法を開発する上で重要であると考えられることから、本研究では、MKL1/2の機能がBrmにより負に制御することに注目した。その結果MKL1/2の細胞内局在がBrmの発現により大きく影響を受けていることが判明した。現在その機構は解明には至っていない。

研究成果の概要(英文)：We showed that in human epithelial tumors, expression the catalytic subunit of SWI/SNF complex, Brm is negatively correlated with the expression of target genes of transcription factor, SRF and that Brm expression negatively regulates SRF function. By examining this molecular mechanism, we have found that 1) MKL1/2, important cofactors of SRF, were regulated by its subcellular localization; in Brm competent cells, MKL1/2 is retained in cellular cytoplasm. 2) Expression of one member of importin family genes was shown to be Brm-dependent, but this importin protein has no effects on the subcellular localization of MKL1/2.

研究分野：腫瘍学

キーワード：SWI/SNF複合体 Brm MKL1/2 SRF

1. 研究開始当初の背景

転写制御因子 Serum response factor (SRF)は、即時性初期遺伝子や間充織細胞等で特に高い発現が見られる細胞骨格関連遺伝子等の発現を制御する因子で上皮癌細胞への間充織性の特性付与にも重要な役割を果たしている。我々はこれまでヒト上皮癌由来細胞株のパネルを精査して、クロマチン構造変換因子、SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット Brm の発現の有無と、MKL1 や MKL2 (MKL1/2) が cofactor として機能する SRF の標的遺伝子である EGR1/2/3/4, CTGF, MYL9, 発現の有無が逆相関すること、さらに Brm が MKL1/2 の機能を負に制御していることを示してきた。Brm の発現の有無によって細胞内の多くの遺伝子群の制御ネットワークが大きく違う 2 群に分けられる一因となっている SRF とその標的遺伝子の発現制御機構を理解することは、両群ごとに適切ながん治療法を開発する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では上皮細胞において SWI/SNF 複合体がどのような分子機構を介して、SRF-MKL1/2 複合体の活性化能を制御して上皮癌細胞の特性を規定しているのかを明らかにすることを目標とする。Brm が SRF-MKL1/2 活性を制御する機構としては、1) Brm の発現の有無によって MKL1/2 遺伝子の発現量に大きな差が見られなかったことから、MKL1/2 タンパク質にどのような機能上の差異が存在しているかを追求する 2) Brm 型 SWI/SNF 複合体によって転写活性化される遺伝子の産物が SRF-MKL1/2 複合体に働いてその活性を阻害する 3) Brm 型 BAF 複合体が核内アクチンの重合・解離の平衡を制御して、間接的に MKL1/2 やその制御因子の細胞内局在性を制御する等の可能性があることから、これらを併行して解析した。

3. 研究の方法

(1) Brm の存在の有無により MKL1/2 タンパク質にどのような機能上の差異が存在している可能性の追求

MKL1/2 の細胞内局在を解析する。また Brm 型 SWI/SNF 複合体が直接 SRF や MKL1/2 と結合して、SRF-MKL1/2 間の結合を阻害する可能性についても PLA 法等を使用して解析する。

(2) Brm 型 SWI/SNF 複合体によって転写活性化される遺伝子の産物が SRF-MKL1/2 複合体に働いてその活性を阻害する可能性の追求

Brmのみを発現する A549 細胞に対して shBrmRNA または対照 shRNA を導入した細胞の mRNA についてマイクロアレイ法、および qRT-PCR スクリーニングにより両者を比較して MKL1/2-SRF 活性の制御に関わる因子の探索を進める。

(3) SWI/SNF 複合体が核内アクチンの解離・重合の平衡を制御をして、間接的に MKL1/2 やその制御因子の細胞内局在性を制御する可能性の追求

Brm が核内アクチンの制御を介して、SRF-MKL1/2 活性の制御している場合、核内アクチンは細胞質内にあるアクチンよりもその存在量が少ない為その解析が大変困難であったことが現在まで核内アクチンの研究が進展してこなかったもっとも大きな理由である。しかしながら、最近になってアクチンに結合する probe タンパク質の発見に伴い、それに核内移行シグナルを付加した GFP を融合したタンパク質 (Lifeact や UTr230) が開発され、核内アクチンの動態を観察することができるようになった。本研究ではこうした蛍光タンパク質を用いて Brm の核内アクチンへの影響を観察する。shBrm または Brm の発現ベクターと核内アクチンの挙動に関連が見られた場合は、G タンパク質の MKL1/2 との結合活性を欠いた変異体を作製することにより、shBrm によって変動した MKL1/2 の局在性が各種のタンパク質との結合部位に関する Actin の変異体の導入により回復するかを検証する。

4 . 研究成果

(1) Brm の発現を欠失する細胞 (SW13) では、MKL1/2 は細胞核内に局在するが、Brm 型 SWI/SNF を完備する細胞 (A549) では MKL1/2 は細胞質に留まることを見出した。そこで Brm の発現を欠失する細胞 4 株と Brm 型 SWI/SNF を完備する細胞 6 株からなるヒト上皮癌由来細胞株のパネルを用いて、MKL1/2 の細胞内局在性を評価した。その結果 SW13 と A549 でみられた結果は、パネルすべての細胞で成立した。

(2) Importin subunit alpha-8 をコードする遺伝子 (KPNA7) が Brm 依存的事であることが判明した。そこで、KPNA7 の発現ベクターおよび shRNA を作製し、発現ベクターを Brm の発現がない SW13 細胞、shRNA を Brm の発現がある A549 細胞にレンチウイルスベクターで導入して、SRF-MKL1/2 標的遺伝子の変動を解析した。しかしながら、両者とも標的遺伝子の変動に影響はなかった。さらに、転写因子 SOX2 についても同様に Brm 依存的事であることがマイクロアレイ等により

判明したため、KPNA7同様の実験を行ったが、Sox2 はMKL1/2の局在を制御する因子ではなかった。これまでのところ、Brmの標的遺伝子群の中で、MKL1/2の局在を制御している因子の特定には至っていない。

(3)最後に、核内アクチンに結合するレポーター (Lifeact-NLS-GFP)をA549細胞に導入したレポーター細胞を用いて、shBrmによる核内アクチンへの影響を調べた。その結果、コントロールの細胞に比べ、shBrmを導入した細胞では、GFPの凝集が見られた。これは、SWI/SNF複合体に含まれるBeta-actinがBrmの欠失により複合体が消失し、フリーとなり、レポーターと結合したことが示唆される。つまり、SWI/SNF複合体は核内のFアクチンとG-アクチンの平衡状態を決定する重要な因子であり、その結果MKL1/2の局在が影響を受ける可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 伊庭 英夫	4. 巻 269
2. 論文標題 miRNAが形成する制御ネットワークと疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 383-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 1.Kobayashi, K*, Hiramatsu, H*, Nakamura, S., Kobayashi, K., Haraguchi, T. and Iba, H. (* equally contributed)	4. 巻 7
2. 論文標題 Tumor suppression via inhibition of SWI/SNF complex-dependent NF- B activation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports,	6. 最初と最後の頁 11772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-11806-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 2.Kobayashi, K., Suemasa, F., Sagara, H., Nakamura, S., Ino, Y., Kobayashi, K., Hiramatsu, H., Haraguchi, T., Kurokawa, K., Todo, T., Nakano, A., and Iba, H.	4. 巻 7
2. 論文標題 MiR-199a inhibits secondary envelopment of Herpes Simplex Virus-1through the downregulation of Cdc42-specific GTPase activating protein localized in Golgi apparatus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports,	6. 最初と最後の頁 6650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-06754-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 3.Hiramatsu H., Kobayashi K., Kobayashi K., Haraguchi T., Ino Y., Todo T., and Iba H.	4. 巻 7
2. 論文標題 The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports,	6. 最初と最後の頁 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-00982-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原口 健
2. 発表標題 テトラサイクリン誘導型miRNA阻害ベクターを用いた、miR-200 ファミリー阻害により誘導されるEMTの動的解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第2回年会 札幌
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 和善
2. 発表標題 Inhibition of SWI/SNF complex-dependent NF- κ B activation suppresses tumor formation (SWI/SNF 複合体依存性のNF- κ B 標的遺伝子の阻害による腫瘍抑制)
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 横浜
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平松 寛明
2. 発表標題 The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in maintaining the stemness of glioma initiating cells (グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持に働くクロマチン構造変換因子SWI/SNF 複合体の解析)
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 横浜
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林和善、伊庭英夫	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬ジャーナル社	5. 総ページ数 195
3. 書名 miRNAの最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学 真菌医学研究センター RNA感染治療学分野
<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/research/project/iba.html>

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	原口 健 (Haraguchi Takeshi) (10549455)	千葉大学・真菌医学研究センター・特任准教授 (12501)	