

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16791

研究課題名(和文)がんドライバーMYCの新規結合パートナーの同定とその機能的意義の検討

研究課題名(英文)Identification of a novel binding partner of an oncogenic protein MYC

研究代表者

宮本 亮(Miyamoto, Ryo)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：40770863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：MYCは多くのがん種で増幅が認められる転写因子であり、その発現量はしばしばがんの悪性度を規定する。MYCはその構造上、薬剤の標的としては適さず異なる制御戦略が必要とされてきた。本研究では独自の免疫沈降法を用いて新規のMYC結合因子を同定した。この結合パートナーとの結合領域を欠損させることでMYCの*in vitro*での細胞不死化能は減弱した。また結合パートナーのノックダウンもMYCの不死化能を低下させ、同定した結合タンパク質がMYC制御に向けた新規標的になる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCはがんの発生・悪性化に関わる重要な因子であるが、薬剤を用いたMYC機能の制御は困難とみられている。別の制御戦略を探るため、本研究では独自の手法によりMYCと結合するタンパク質を解析し、未報告の結合タンパク質を特定した。MYCタンパク質を用いてMYC側の結合部位を明らかにし、かつMYC過剰発現細胞を用いて結合タンパク質の減少が細胞増殖を抑えることを見出した。本研究は特定した新規のMYC結合タンパク質がMYC制御に向けた新たな創薬対象になることを示す。

研究成果の概要(英文)：MYC is a transcriptional factor to control a large number of genes associated with cellular metabolism and proliferation. MYC is deregulated in the majority of human cancers, and its overexpression is often correlated with poor prognosis. Although the blockade of MYC is an attractive approach to abrogate the MYC-overexpressed cancers, direct targeting of MYC has been a challenge due to its undruggable protein structure. This study utilized a unique ChIP method to identify a novel MYC binding partner. MYC associated with the binding protein at its multiple protein portions. knockout of the identified protein significantly reduced clonogenic potential of MYC in a colony formation assay. This study provides a potential alternative approach to control MYC by targeting its binding partner.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：MYC タンパク質相互作用 免疫沈降 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MYC は多くのがん種で増幅が認められる転写因子であり、細胞増殖やエネルギー代謝に関わる遺伝子発現を上昇させることでがん化に寄与する。MYC の発現量はしばしばがんの悪性度を規定することから、その機能制御が治療戦略につながると見られている。しかし多くの転写因子と同様に MYC には創薬デザインの標的となりうる構造が見当たらず、直接的な阻害は困難と見られている。一方で MYC は MAX をはじめとしていくつかの核内タンパク質と複合体を形成し、かつこの複合体形成が MYC の十分な機能発現には不可欠である。近年この性質に着目して、複合体におけるタンパク質-タンパク質間結合を阻害することで MYC 機能を制御しようとする試みがなされている。

2. 研究の目的

研究代表者らはクロマチン上のタンパク質間相互作用を検出する独自の実験系 (fan-ChIP 法) を確立していたため、この手法を利用してこれまで未同定であった MYC の新規結合因子の検出と結合の機能的意義の解明を試みた。

3. 研究の方法

fan-ChIP 法ではまず細胞を可溶化して細胞質画分を除去した。続いて核画分に対して MNase を処理し、ゲノム DNA を断片化・可溶化し、免疫沈降に用いた。コロニー形成実験ではマウス骨髄から c-Kit をマーカーとして造血前駆細胞を分離し、この細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子を導入した。続いてメチルセルロースから成る半固形培地で培養し、薬剤選択により遺伝子導入細胞を得た。Fluoppi システムでは専用ベクターに目的遺伝子を導入し、HEK293T 細胞に一過性発現させ、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 新規 MYC 結合タンパク質の特定

MYC 結合因子の探索のため HEK293T 細胞に FLAG タグ付き MYC を強制発現させ、fan-ChIP 法により MYC タンパク質を回収した。質量分析により MYC と共沈するタンパク質を解析したところ、MAX など既知の MYC 結合タンパク質に加えて未報告のタンパク質が検出された。このうちウエスタンブロット法により結合が確認されたタンパク質 (以下 Protein-T) に絞って詳細な解析に進んだ。

MYC 側の結合部位を特定するため、まず N 末端側からおよそ 4 分の 1 ずつ欠損させたフラグメント 4 種類 (MYC d1/4-MYC d4/4) を HEK293T 細胞で発現させ、免疫沈降を実施したところ、欠損型フラグメント 4 つのうち 3 つ (d2/4、d3/4、d4/4) で Protein-T の結合が低下し、MYC が広範な領域で Protein-T と結合を維持することが示唆された (図 1)。MYC には種間およびパラログ間で保存されている領域が存在することから、この保存領域を欠損させたフラグメントを用いて検討したところ、「MYC BOX II」と呼ばれる領域と C 末端の「DNA 結合領域」で結合低下が認められた。大きな結合低下が認められた MYC d3/4 領域をさらに細分化してフラグメントを発現させたところ、この領域の一部を欠損させることでも結合が低下した。

fan-ChIP 法は MNase でおおよそ 150bp 長に DNA を断片化する。そのため本法を用いた免疫沈降ではこの 150bp 程度の DNA が介在することで近傍に局在するが直接結合はないタンパク質を回収してしまう可能性がある。しかし Protein-T の結合は DNase 処理の影響を受けず、この結合が DNA を介さない直接的な結合であることが確認された。

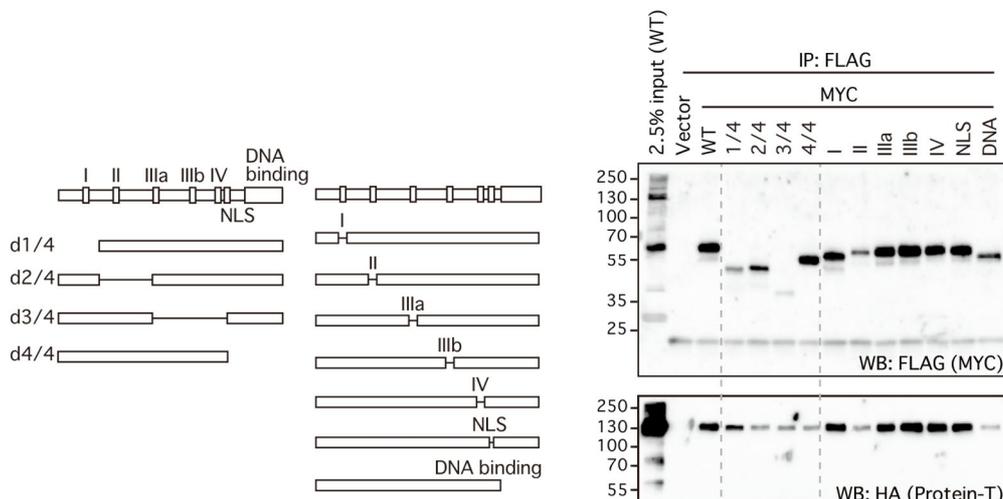


図 1. fan-CHIP 法による MYC 側の結合部位の特定

作製した MYC フラグメントの概要 (左) と免疫沈降・ウエスタンブロットの結果 (右)。大きな欠損部位をもつ MYC (d1/4、d2/4、d3/4、d4/4) および保存領域を欠損する MYC (I、II、IIIa、IIIb、IV、NLS、DNA binding) を作製した。これらは全て FLAG タグ配列を N 末端にもつ。これらのいずれかか HA タグをつけた Protein-T を共発現させ、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を実施した。

(2) コロニー形成実験における結合の機能的意義の検討

MYC 遺伝子をマウス造血前駆細胞に発現させると不死化し、半固形培地でコロニーを形成する。これは MYC のがん化能を反映したものである。Protein-T との結合が MYC のがん化能にどのように影響するか確かめるため、MYC の欠損フラグメントや shRNA を用いてコロニー形成能を評価した。マウス骨髄から c-Kit⁺ の造血前駆細胞を回収し、レトロウイルスを用いて野生型 MYC および欠損型 MYC フラグメントを導入した。この培養下では Vector コントロールは 3rd および 4th 培養でコロニーを形成しなかったが、MYC は細胞を不死化させ、3rd、4th 培養で自己増殖によるコロニーを形成した。大きなタンパク質欠損 (MYC d1/4-MYC d4/4) はいずれもコロニー形成能を著しく低下させたが、d1/4 では他のフラグメントとは異なりわずかにコロニー形成能を保持していた。MYC 保存領域の欠損を伴うフラグメントでは BOX II、IIIb、IV、DNA 結合部位の欠損はコロニー形成能を低下させ、それ以外のドメインの欠損は影響を与えなかった。欠損フラグメントによるコロニー形成能は、Protein-T との結合パターンと一致しており、Protein-T が正常な MYC 機能発現に必要であることを支持している。

MYC のがん化能における Protein-T の関与の有無を調べるため、MYC で不死化した細胞で内在性 Protein-T のノックダウンを実施した。Protein-T のノックダウンは MYC 不死化細胞のコロニー形成能を大きく低下させた。しかし MYC 標的遺伝子として解析した Ldha や Slc2a1 の mRNA 量は変化しなかった。

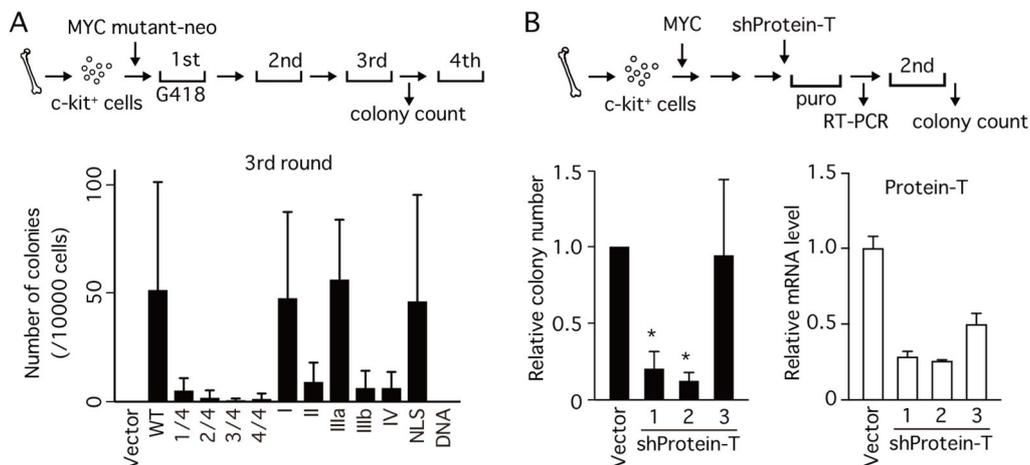


図 2. MYC の欠損フラグメントによる不死化能の評価と MYC 不死化細胞に対する Protein-T ノックダウンの効果

A. MYC 欠損フラグメントを c-Kit 陽性の造血前駆細胞に発現させ、半固形培地で培養した。グラフは 3 回目 (2 継代後) の培養時のコロニー数。B. MYC で不死化させた細胞に Protein-T に対する shRNA を導入し、薬剤選択・継代・培養後にコロニー数をカウントした。

(3) 生細胞における MYC と Protein-T との結合評価

細胞における MYC と Protein-T の結合の有無を調べるため、MYC に Ash タグ、Protein-T に AzamiGreen を融合させ、Fluoppi システムにより結合を評価した。本法では直接結合がある場合に細胞内で foci (凝集) を形成するが、Protein-T は単独で発現させた場合でも foci を形成した。Ash タグを発現させた MYC を共発現させたところ、foci は認められず、逆に核内で認められた Protein-T 由来の foci 状の蛍光が細胞質内の均一な蛍光に変化した。Protein-T タンパク質はダイマー構造をとるとされており、単独発現時に認められた foci はダイマー形成によるのかもかもしれない。MYC 共発現で foci が消失したことは MYC と Protein-T における物理的相互作用を反映している可能性がある。

考察

本研究では新たな MYC 結合因子として Protein-T を同定し詳細な検討を行った。コロニー形成実験から Protein-T が MYC のがん化に必要不可欠な役割を果たしている可能性が示唆された。

一方で MYC と Protein-T の詳細な結合様式については十分に解明できたとはいえず、Protein-T 側の結合部位の同定や、これまでとは別の実験系で結合を示すなど、詳細かつ多角的な検討が必要である。またこれらが MYC の機能にどう影響するのかについても手がかりは得られていな

い。MYC 高発現細胞株などで Protein-T をノックダウンまたはノックアウトし、MYC 標的遺伝子やクロマチン環境にどう影響を与えるかなど、オミクス解析を併用して検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Miyamoto R, Kanai A, Okuda H, Takahashi S, Matsui H, Inaba T, Yokoyama A	4. 巻 .
2. 論文標題 HOXA9 promotes MYC-mediated leukemogenesis by maintaining gene expression for multiple anti-apoptotic pathways.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.10.20.347765	査読の有無 無
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 Miyamoto R, Yokoyama A	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for fractionation-assisted native ChIP (fanChIP) to capture protein-protein/DNA interactions on chromatin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100404.	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 Miyamoto R, Okuda H, Kanai A, Takahashi S, Kawamura T, Matsui H, Kitamura T, Kitabayashi I, Inaba T, Yokoyama A	4. 巻 32
2. 論文標題 Activation of CpG-Rich Promoters Mediated by MLL Drives MOZ-Rearranged Leukemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108200.	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
---------------------------	-----------------------	----

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