

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790391

研究課題名(和文) 多能性維持転写因子NACC1による細胞増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of tumor cell proliferation by pluripotency-associated transcriptional repressor NACC1

研究代表者

葛西 秋宅 (KASAI, Shuya)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20609664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：NACC1高発現による腫瘍増殖機構を明らかにするため、次世代シーケンサーの解析から得られた  $\beta$ -catenin/TCF経路の関与について複数の乳癌細胞株を用いて解析した。また、NACC1と相互作用するタンパク質を網羅的に解析し、NACC2、ZKSCAN1およびPLK1との相互作用を新規に同定した。PLK1は細胞分裂を制御するキナーゼであり、分裂期特異的にNACC1と相互作用しリン酸化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Elevated expression of NACC1 associates with tumor recurrence and growth of breast, ovarian and cervical cancers. To clarify the molecular mechanism of tumor growth acceleration by NACC1 overexpression in human malignancies, we determined whether NACC1 regulates  $\beta$ -catenin/TCF pathway in breast cancer cell lines. In parallel, proteomic analysis of NACC1 interacting proteins was carried out. We identified NACC2, ZKSCAN1 and PLK1 as novel NACC1-interacting proteins. NACC1-PLK1 interaction was elevated in cells synchronized at metaphase compared to asynchronous cells. PLK1 expression and NACC1-PLK1 colocalization was observed specifically in metaphase, whereas NACC1 expression was observed in any cell cycle stages. In addition, NACC1 phosphorylation by PLK1 was elevated by metaphase synchronization.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：NACC1 乳癌 腫瘍増殖

### 1. 研究開始当初の背景

NACC1 (nucleus accumbens-associated protein 1)は、大脳辺縁系の側坐核で過剰発現し、核内において HDAC3/4、CoREST、Sim3 などと複合体を形成し転写抑制因子として機能する。また、乳癌や卵巣癌をはじめ種々の再発癌において過剰発現が報告され、卵巣癌や子宮体癌ではその過剰発現は予後不良であり、癌抑制遺伝子 GADD45GIP1 の転写抑制や細胞増殖促進、薬剤抵抗性の獲得に寄与することが知られている。

本研究室の実験結果から NACC1 が細胞質内ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC6)と相互作用し cortactin や tubulin のアセチル化を亢進し細胞運動に寄与することを明らかにした。一方、NACC1 が GADD45GIP1 の発現を抑制することで増殖促進する報告に関して、我々の検証では再現出来なかった。また、NACC1 自体に DNA 結合ドメインは見出されておらず、転写制御機構についても不明な点が多いため、NACC1 の新規標的遺伝子を探索した。乳癌由来細胞株 MCF-7 を用いて、NACC1 ノックダウンにより発現が変動する遺伝子群を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した結果、cyclin D1 および c-myc を含む  $\beta$ -catenin/TCF の標的遺伝子群の発現低下が見出された。また、NACC1 ノックダウンにより発現亢進する遺伝子群で、 $\beta$ -catenin/TCF の転写活性を抑制する CHD8 が転写阻害の標的である可能性が見出された。

### 2. 研究の目的

NACC1 が CHD8 の転写抑制を介して  $\beta$ -catenin/TCF 経路を活性化し増殖促進に寄与している可能性について、複数の細胞株を用いて確認する。また、NACC1 がどのような転写複合体を形成し CHD8 遺伝子の転写調節を行っているか、CHD8 上流のプロモーター解析および NACC1 と相互作用するタンパク質群を網羅的に解析することで、NACC1 による増殖促進の制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

NACC1 ノックダウンによる CHD8 発現誘導を複数の細胞株で確認する。また、その標的遺伝子として cyclin D1、c-myc の発現をリアルタイム PCR およびウェスタンブロットにより確認する。また、cyclin D1 の減少に関しては更に細胞増殖への影響を検討する。

NACC1 が CHD8 遺伝子の発現を抑制していることが確認された場合はさらに CHD8 遺伝子の上流配列を用いたレポーター遺伝子アッセイを作製し、NACC1 応答配列を探索する。NACC1 と応答配列との結合に関しては EMSA および ChIP アッセイによって確

認する。また、CHD8 生理的機能についても不明な点が多いことから、これらの実験条件を元にトランスクリプトーム解析および ChIP-seq を行い、網羅的な機能解析を行う。

NACC1 と相互作用するタンパク質を網羅的に解析するため、3×FLAG-HA タグを付加した NACC1 を発現する安定発現株をクローニングし、tandem-affinity purify (TAP) により結合するタンパク質を LC-MS-MS で同定する。相互作用するタンパク質のリストを作成し、特に転写制御や細胞増殖に関わる因子についてさらに機能解析を行う。

### 4. 研究成果

NACC1 による CHD8、cyclin D1 および c-myc の発現調節に関して、トランスクリプトーム解析で用いた MCF-7、および NACC1 高発現が報告されている子宮頸癌 (HeLa) と大腸癌細胞株 (Caco-2、SW620、HT-29) を用いて確認した (図 1)。NACC1 ノックダウンにより CHD8 の発現亢進、cyclin D1 および c-myc の発現減少が予想されたが、HeLa および HT-29 で CHD8 発現亢進が見られたものの cyclin D1 の減少は見られなかった。一方、cyclin D1 減少が見られた MCF-7 および Caco-2 では CHD8 の変化が認められなかった (図 1)。c-Myc については購入した抗体では解析に耐える結果が得られなかった。

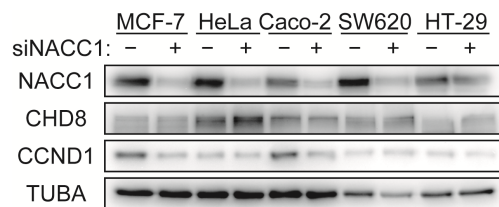


図 1 NACC1 ノックダウンによる CHD8 発現誘導および cyclin D1 (CCND1) 発現抑制

乳癌由来細胞株についても NACC1 ノックダウンによる cyclin D1 の変動を解析した。タンパク質では MCF-7 と MB-231 において cyclin D1 の減少が見られたが、mRNA を定量した結果では MB-231 では逆に発現亢進が認められた (図 2)。

MCF-7 において NACC1 ノックダウンにより cyclin D1 の減少が認められたため、細胞増殖について解析した (図 3)。NACC1 ノックダウンにより cyclin D1 の発現低下および増殖抑制が見られた。また、NACC1 と協調的に働く HDAC6 についても実験を行ったが逆に cyclin D1 発現亢進および増殖の促進が見られたため、NACC1 による cyclin D1 の発現調節に関しては HDAC6 非依存的な経路が考えられた。

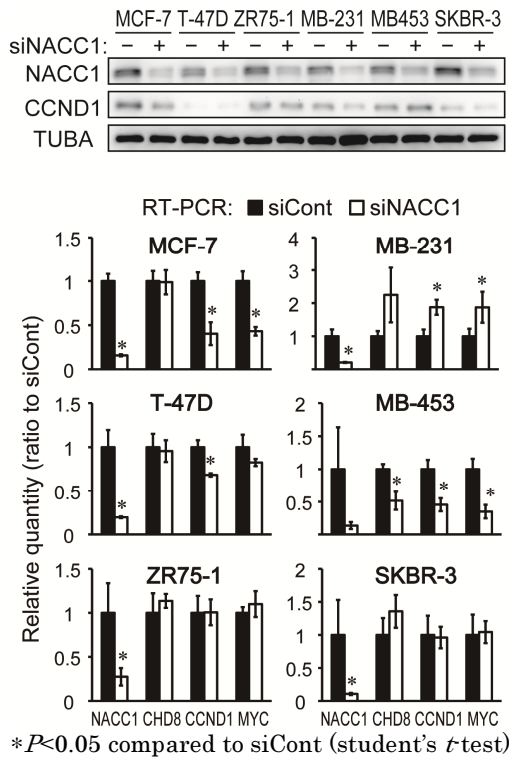


図2 乳癌細胞における NACC1 依存的な cyclin D1 および c-myc 発現

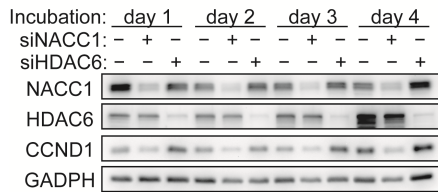
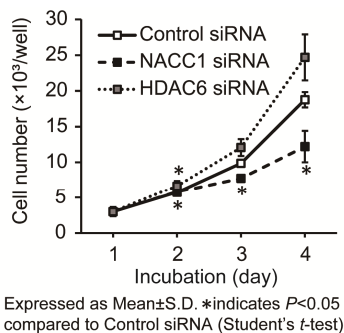


図3 NACC1 および HDAC6 ノックダウンによる増殖への影響

NACC1 による cyclin D1 の発現調節に関して、CHD8 を介さない経路が想定されたため、cyclin D1 遺伝子のプロモーター解析を行うことにした。Cyclin D1 の転写調節には  $\beta$ -catenin/TCF や c-myc など既知の因子が知られており、NACC1 ノックダウンに反応する配列を探索することにした。Cyclin D1 遺伝子上流 2 kb を PCR により増幅し firefly luciferase 発現ベクター (pGL3) に挿入した。補正用の renilla luciferase 発現ベクター

(phRL) と共に MCF-7 にトランスフェクトし、NACC1 ノックダウンによりプロモーター活性が変化するか解析した。

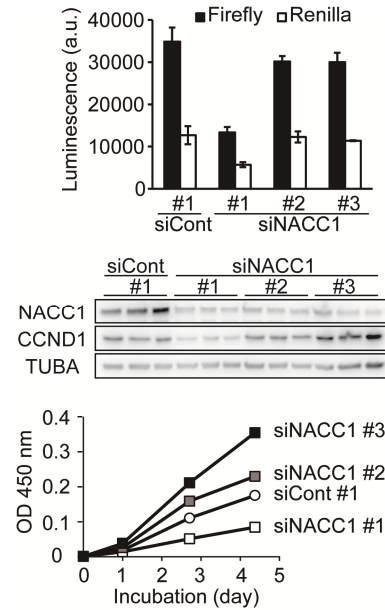


図4 レポーター遺伝子アッセイの構築および NACC1 siRNA の確認

その結果、一連のノックダウン実験に用いてきた siRNA #1 でのみ、firefly luciferase および renilla luciferase の活性が減少した (図4)。また、NACC1 および cyclin D1 の発現についても確認したところ、siRNA #2 および #3 でも同様に NACC1 はノックダウンされていたが、cyclin D1 の発現減少および増殖抑制は認められなかった。以上の結果から siRNA #1 のオフターゲット効果により何らかの基本転写因子が阻害され cyclin D1 および増殖の低下を観察していたと結論づけた。

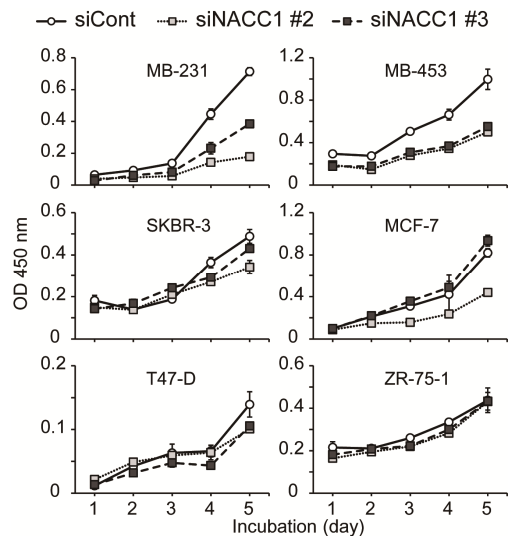


図5 NACC1 依存的に増殖する乳癌細胞株のスクリーニング

MCF-7 細胞において NACC1 による増殖促進が否定されたため、本研究室で保有する乳癌細胞 6 株において NACC1 siRNA #2 および #3 いずれによっても増殖抑制される細胞株をスクリーニングすることにした (図 5)。MCF-7 に関しては NACC1 siRNA #3 では増殖促進する傾向が見られたが再現性に欠ける結果であった。MDA-MB-231 および MDA-MB-453 において siRNA #2 および #3 いずれによっても増殖抑制が見られた。MDA-MB-231 は ER・PR・HER2 トリプルネガティブの乳癌細胞株であり、NACC1 依存的な増殖経路を明らかにすることで分子標的療法へ応用できると考え、 $\beta$ -catenin および cyclin D1 について解析した (図 6)。

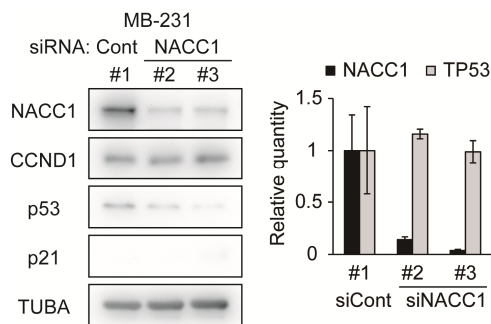


図 6 MDA-MB-231 細胞における cyclin D1 および変異 p53 の発現

MDA-MB-231 細胞で NACC1 ノックダウンにより増殖抑制が見られたにも関わらず cyclin D1 発現量には変化が見られなかった (図 6)。Zhang らの報告で、NACC1 が  $\Delta$ Np63 を介して p53 を抑制することで  $\gamma$  線照射による老化を回避することが報告された (Cancer Res. 2012)。そこで p63、p53 およびその標的遺伝子である p21 についても解析した。p21 および p63 は検出できなかったが、p53 の発現量が NACC1 ノックダウンにより減少することが見出された (図 6)。p63 および p21 に関しては Zhang らの報告で使用されている細胞を用いて、 $\gamma$  線照射および NACC1 ノックダウンの影響を解析したが、本研究室の条件では再現出来なかった。

MDA-MB-231 細胞は p53 にアミノ酸置換変異 (R280K) が報告されており、DNA 認識が変化することで癌化に寄与する機能を獲得することが知られている。NACC1 が変異 p53 の転写調節に関わっている可能性について RT-PCR で確認したが、mRNA 量に変化は見られなかった (図 6)。MDA-MB-231 細胞で NACC1 と相互作用するタンパク質および結合する DNA 配列について網羅的に解析するため、3xFLAG-HA-NACC1 高発現株の作製を試みたがトランスフェクションの段階で発現が全く見られなかったため、この計画を断念した。

平行して進めていた 3xFLAG-HA-NACC1 を高発現する MCF-7 細胞については複数ク

ローン樹立でき、高発現株 (TAP1、TAP2) を以降の網羅的解析に使用することにした。親株およびコントロールベクター発現株に比べ NACC1 高発現株では細胞形態の変化が認められた (図 7)。上皮間葉転換について上皮および間葉のマーカーである E-cadherin および N-cadherin の発現を比較したが、これらの発現には変化が見られなかった (図 7)。

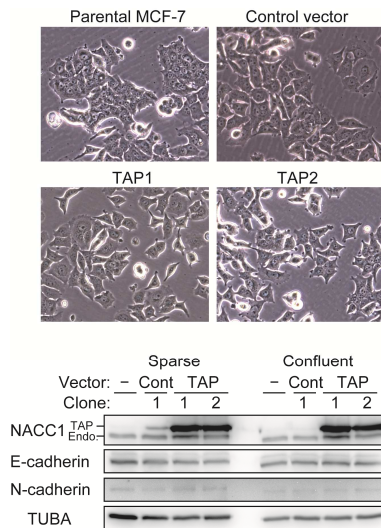


図 7 NACC1 高発現株の形態および上皮マーカーの発現

高発現株から抽出したタンパク質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、精製したタンパク質を SDS-PAGE で展開後、銀染色を行った。コントロールに比べ高発現株でのみ検出されているバンドを精製し、LC/MS/MS 解析を行った。最も濃いバンドは NACC1 由来であり、相同性の高い NACC2 が新規に同定された。また、転写関連では相互作用の報告のある CoREST が同定されたほか、転写抑制因子と考えられる ZKSCAN1 が新規に同定された。また細胞分裂で重要な機能を持つ PLK1 が同定された (図 8)。

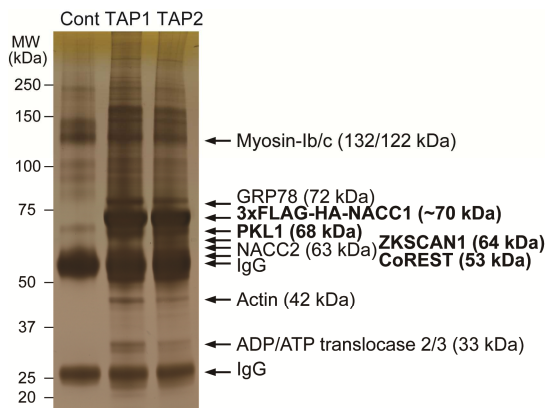


図 8 NACC1 と相互作用するタンパク質のプロテオミクス解析



NACC1 が PLK1 の機能を調節することで細胞増殖に影響があるか解析したが、前述のとおり MCF-7 において NACC1 ノックダウンにより増殖抑制が見られなかったため (図 4、5)、NACC1 が PLK1 の基質である可能性が考えられた。MCF-7 細胞を nocodazole 処理により分裂期で同調したところ、NACC1 発現量に変化はなかったが、PLK1 は増加が見られた (図 9)。また、免疫染色で内在性 NACC1 と PLK1 を検出したところ同様の結果が得られたほか、細胞分裂中期から終期にかけて NACC1 と PLK1 の共局在が見られた。免疫沈降により内在性の NACC1 と PLK1 の相互作用を解析したところ、同期しない細胞ではシグナルが非常に弱いものの、分裂期同調では相互作用しているシグナルが得られた。また、NACC1 の一次配列から PLK1 によりリン酸化されるアミノ酸配列 (S-pT-P) が見出されたため、このリン酸化に特異的な抗体で検出した。分裂期同調したインプットで多くの PLK1 の基質が検出されたほか、NACC1 に相当する位置にリン酸化のシグナルが得られた (図 9)。

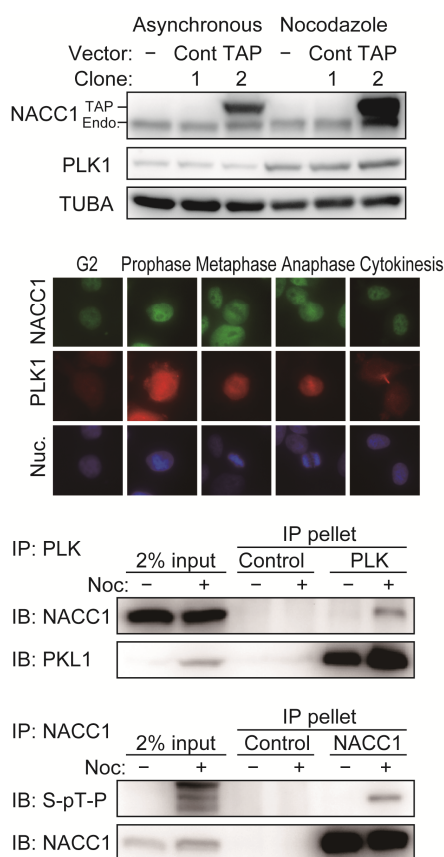


図 9 細胞分裂期特異的な NACC1-PLK1 相互作用および PLK1 による NACC1 リン酸化

PLK1 の基質の多くは別のキナーゼによりリン酸化され、PLK1 がそのリン酸化を認識・結合し近傍の標的配列をリン酸化する。NACC1 については PKC によるリン酸化の報告があるほか、プロテオミクスの結果から

カルボキシ末端に新規のリン酸化部位を同定した。しかし、PLK1 によるリン酸化が NACC1 の機能に影響するかについては、PLK1 が増殖に必須で阻害剤やノックダウンでは解析できないうえ、NACC1 のリン酸化部位変異体の解析については、前述のとおり MDA-MB-231 細胞で強制発現できない問題があるため、今後、別の方法で機能解析を試みる予定である。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

代 3 5 回日本分子生物学会年会  
葛西秋宅、加茂政晴、柴崎晶彦、安平進士、前沢千早  
 多能性維持関連因子 NACC1 (nucleus accumbens-associated protein 1) の細胞周期特異的リン酸化の制御  
 2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葛西 秋宅 (KASAI, Shuya)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・ポストドクター

研究者番号：20609664