

2016 年奨励賞受賞者論文 総合論文

癌悪性化機構の解明を目指したリン酸化プロテオーム解析

木村鮎子*, 平野 久

*E-mail: ayuko@yokohama-cu.ac.jp

横浜市立大学先端医科学研究センター : 236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9

(受付 2017 年 4 月 20 日, 改訂 2017 年 5 月 27 日, 受理 2017 年 6 月 1 日)

タンパク質のリン酸化は、癌の進展や悪性化に関わる重要な因子の一つである。著者らは、卵巣癌組織型の中でも特に悪性度の高い卵巣明細胞癌の病態機構の解明を目指して、癌組織に由来する培養細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析を行った。結果として、卵巣明細胞癌を含む様々な種類の癌での遺伝子変異が多数報告されている ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) をはじめとする, SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) クロマチン再構成複合体の 5 つの構成因子の顕著なリン酸化ペプチドレベル低下を検出した。さらに, MRM 法による高感度なリン酸化・非リン酸化ペプチドの同時比較定量解析系の確立により, 卵巣明細胞癌細胞株では, ARID1A のタンパク質レベルの低下と, SWI/SNF 複合体コア因子 BRG1 (brahma-related gene 1) の顕著なリン酸化レベル低下が生じていることを明らかにし, このことが SWI/SNF 複合体の機能低下による癌悪性化の要因となる可能性を見いだした。

1 序 論

癌細胞は変異を繰り返すことで絶えず自身の性質を変化させる。その過程で, 癌の本質的な性質である無限増殖能・浸潤能・転移能などの悪性度とよばれる性質がより顕著なものや, 抗癌剤耐性を有するものが優先的に増殖し, 選択され, さらに悪性度の高い癌へと進化していく。悪性度の高い癌は治療が困難となる例が多く, 癌の悪性化に関わる分子機構の解明が強く望まれている。癌の悪性化も, 癌化と同様に多数の要因が重なって進行するプロセスであり, その全貌を理解するためには, ゲノム変異や遺伝子・タンパク質の発現量変化だけでなく, タンパク質の質的な変化をもたらす翻訳後修飾の変化に着目した解析を行うことが必要となる。その中でもリン酸化修飾は, 細胞内/細胞間シグナル伝達やタンパク質間相互作用の制御等の多くの生体内機構に関わり, その異常が癌化の直接的な要因となる例も多いことから, 癌の悪性化機構を理解する上で, 重要な意味をもつと考えられる。

近年のリン酸化プロテオミクス技術の発展により, 一回の LC-MS/MS 分析で, 様々な生物学的試料で有意な量的変動を示す数十~数百のリン酸化ペプチドを検出することが可能になった¹⁾。一方で, 検出されたリン酸化ペプチドレベルの変化が, タンパク質のリン酸化レベルの変化によるものか, あるいはタンパク質そのものの量的変化によるものなのかについては, さらに検証を行う必要がある。特定タンパク質のリン酸化レベルの検証には, 標的とするリ

ン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化ペプチド抗体を用いる。適用可能な抗体が存在しない場合には, 三連四重極型質量分析計の二段階の質量フィルター (Q1, Q3) を用いた多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring: MRM) -MS 法を用いて, 標的リン酸化部位を含むリン酸化ペプチドと, これに対応する非リン酸化ペプチドを同時に検出・定量して, タンパク質のリン酸化レベルを算出することも可能である。ただし本解析は, 現状では, (1) 細胞中の標的タンパク質量の含有率が高く, 且つ高レベルでリン酸化を受けている場合^{2)~5)} や, (2) 強制発現系を用いて標的タンパク質を過剰発現させている場合^{6)~8)}, あるいは (3) 脱リン酸化酵素阻害剤やリン酸化シグナルカスケードを活性化する試薬によって, 細胞内の様々なタンパク質のリン酸化レベルを亢進させる処理を行った場合^{6)~8)} にのみ有効であり, 内在性の転写因子などの低発現量タンパク質の解析を行うには, さらに工夫が必要である。

卵巣明細胞癌 (Ovarian Clear Cell Carcinoma: OCCC) は, 上皮性卵巣癌の主要な組織型の中でも, 特に高い悪性度を示すことで知られている。OCCC は, 他の上皮性卵巣癌と比べて組織学的・生物学的・臨床学的な性質がかなり異なっており^{9)~11)}, 癌治療の第一選択薬として用いられることの多いシスプラチンなどの白金製剤系の抗癌剤に対して後天的に耐性を獲得したり, 術後に予後不良となったりする例が多い。本腫瘍に効果的に作用する新規治療法の開発を目指して, 本疾患の病態機構の解明を目指したゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームレベルの

解析がこれまでも多数行われており、OCCC 患者検体や細胞株で特異的に変異もしくは発現が増減する様々な指標分子が多数検出されている。これまでに見いだされた主なものとしては、*KRAS*⁽¹²⁾・*PIK3CA*^{(12), (13)}・*PPP2R1A*⁽¹²⁾・*HNF-1 β* ⁽¹⁴⁾・*VCAN*⁽¹⁴⁾・*BRCA*⁽¹⁵⁾・*PTEN*⁽¹⁶⁾等の遺伝子の高頻度な遺伝子変異や、*CDKN2A/2B* 遺伝子のホモ接合型欠失⁽¹⁷⁾、*MET*⁽¹⁸⁾・*ZNF217*⁽¹⁷⁾・*AKT2*⁽¹⁸⁾・*PPM1D*⁽¹⁹⁾ 遺伝子のコピー数増加、ANXA4・TFPI2 タンパク質の増加などがある^{(20)~(22)}。特に TFPI2 については、OCCC 患者の血清中においても存在量が顕著に増加しており、本疾患のバイオマーカーとしての実用化に向けた検証が進んでいる⁽²¹⁾。また最近では、OCCC 細胞株や患者組織において、46-57% という高頻度で SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) クロマチン再構成複合体の構成因子の一つである ARID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) の遺伝子コード領域でランダムな変異が生じており、ARID1A タンパク質の存在量が顕著に低下していることが相次いで報告されており、注目を集めている^{(12), (23)}。ARID1A の遺伝子変異は OCCC の病態機構に関わる主要なトリガーの一つであると考えられるが、ARID1A 遺伝子が正常に発現している残り半数の OCCC については、これが当てはまらない。OCCC の指標分子の変異・発現パターンや、OCCC の高い悪性度に関わる抗癌剤耐性等の表現型は、患者ごと、細胞株ごとに種々多様であり、OCCC の発症過程では複数の遺伝子変異やタンパク質レベルの変化が段階的に生じているものと考えられる。しかしながら、OCCC においては、がんの悪性化機構の解明につながる重要な情報をもたらすと期待されるリン酸化プロテオームの変化に着目した解析が、これまで全く行われてこなかった。

著者らは、様々な指標分子の発現状態が異なる複数の OCCC 細胞株を用いて、OCCC の高悪性度化に関わる分子機構の解明を目指して、リン酸化プロテオームの比較定量化解析を行った。その結果として、OCCC で高い変異率を示す ARID1A を含む、複数の SWI/SNF 複合体因子のリン酸化ペプチドレベルが著しく低下していることが明らかになった。さらに、これらの低発現量タンパク質のリン酸化レベルの検証を行うために、MRM 法による高感度なタンパク質リン酸化レベル解析法を最適化し、卵巣癌細胞株から調製した試料を用いて、検証を行った⁽²⁴⁾。

2 癌培養細胞株を用いたリン酸化プロテオーム解析⁽²⁴⁾

2-1 リン酸化プロテオームの網羅的な比較定量化解析

他の卵巣上皮性癌組織型と比較して悪性度の高い OCCC において、特徴的なリン酸化レベル異常を示すタンパク質を網羅的に探索するために、OCCC を含む複数の組織型に由来する卵巣癌培養細胞株を用いて、リン酸化プロテオームの比較定量化解析を行った。70-80% コンフルエン

トになるまで培養した OCCC 細胞株 6 種 (RMG-I, RMG-II, OVICE, OVTOKO, OVSAYO, OVMANA), 粘液性卵巣癌細胞株 2 種 (MCAS, OVCAR-3), 漿液性卵巣癌細胞株 2 種 (OVSCHO, OVKATE) から、9M 尿素による変性条件下でタンパク質を抽出し、還元アルキル化・トリプシン消化後に、Titansphere Phos-TiO kit (GL Science) を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行った。精製したペプチドを LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) で分析して得られた 16,305 のペプチドピークデータを基に、Progenesis LC-MS ソフトウェア (ver. 3.1, Nonlinear Dynamics) を用いて、ペプチドピーク面積値に基づく比較定量化解析を行い、さらに OCCC とそれ以外の組織型の卵巣癌 (non-OCCC) の 2 群間での有意差検定を行った。比較に用いた Mascot Score>30, Significant threshold $p<0.05$ の 1,086 のペプチドのうち、374 個のタンパク質に由来する 620 のペプチドにおいて、OCCC・non-OCCC グループ間での有意なリン酸化ペプチド量差が検出された (Anova $p<0.01$)。

2-2 関連するパスウェイ、キナーゼの探索

OCCC の悪性化に関わる生体内経路を明らかにするために、OCCC・non-OCCC 間で有意なリン酸化ペプチド量の差が見られた上記タンパク質のリストを用いて、DAVID Bioinformatic Resources 6.7^{(25), (26)} によるパスウェイ解析を行った。BioCarta データベースに登録された生物学的パスウェイに対する検索では、4 種類のパスウェイが p -value<0.05 で検出された。このうち 2 つは遺伝子発現調節やクロマチン再構成に関わるものであり、いずれも SWI/SNF 複合体を構成する 4 つの因子 (ARID1A, BRG1, BAF155, BAF170) を含む他に、SWI/SNF 複合体に結合して WINAC (William syndrome transcription factor Including Nucleosome Assembly Complex) 複合体⁽²⁷⁾ を形成する RPB1 も見いだされた (Fig. 1, 2)。残り 2 つは、インテグリンシグナル経路および細胞間接着シグナル経路であり、OCCC では、がん細胞の転移・遊走や細胞周期の制御等に関わるリン酸化タンパク質にも、量的変動が生じていることが示された。これらのリン酸化部位は、いずれも機能や責任キナーゼが同定されていないものであったため、リン酸化部位周辺配列のアライメントデータを基に、Motif-X^{(28), (29)} および NetPhosK⁽³⁰⁾ により、特定のリン酸化キナーゼが認識するコンセンサス配列が存在するかどうかの確認を行った。その結果、これらの配列の中には、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーや Cyclin-dependent kinase (CDK) ファミリーが共通して認識する PXS*P のモチーフが多い傾向が見られたが、特定の責任キナーゼの同定には至らなかった。

検出されたタンパク質の中でも、特に OCCC の悪性化機構に深く関わると思われる 5 つの SWI/SNF 因子もし

くは関連因子のうち、OCCC での高頻度な欠失が報告されている ARID1A では、7 箇所のリン酸化部位を含む 4 種類のリン酸化ペプチドの量がそれぞれ OCCC 特異的に低下していた (Fig. 2)。一方で、BAF155・BAF170・RPB1 では 2～4 箇所のリン酸化部位を含むリン酸化ペプチドが 2 種類ずつ、SWI/SNF 複合体のコア因子である BRG1 では

1 箇所のリン酸化部位を含む 1 種類のリン酸化ペプチドが、それぞれ OCCC で顕著に減少していた。

3 ウェスタンブロット解析によるタンパク質レベルの検証²⁴⁾

リン酸化レベルの変化とタンパク質レベルそのものの変化とを区別するために、ARID1A・BRG1 を特異的に認識する抗体を用いて、10 種の OCCC および 4 種の non-OCCC 卵巣癌細胞株を用いた免疫ブロット解析を行った。ARID1A・BRG1 のいずれも、調べた 4 種全ての non-OCCC 細胞株での発現が確認されたのに対し、OCCC 細胞株では、これらのタンパク質の発現がランダムに失われていた。OCCC 細胞株のうち 6 種 (RMG-II, JHOC8, OVISe, OVTOKO, OVSAYO, OVMANA) では ARID1A の発現が、JHOC5 細胞株では BRG1 の発現が認められなかった。本結果を裏付けるように、ARID1A のシグナルが検出されなかった JHOC8 を除く上記 5 種の細胞株では、ARID1A の遺伝子コード領域の様々な部位での塩基置換や欠失が確認された^{12),24)}。これらのことから、リン酸化プロテオーム解析で検出された ARID1A のリン酸化ペプチド量の低下は、タンパク質量そのものの低下を反映したものであることが示唆された。

4 MRM 法を用いた ARID1A・BRG1 リン酸化レベルの検証²⁴⁾

4-1 MRM 法によるリン酸化・非リン酸化ペプチド同時定量法の最適化

次に、三連四重極型質量分析計 QTrap 5500 (Sciex) を用いた MRM 解析により、細胞内の ARID1A・BRG1

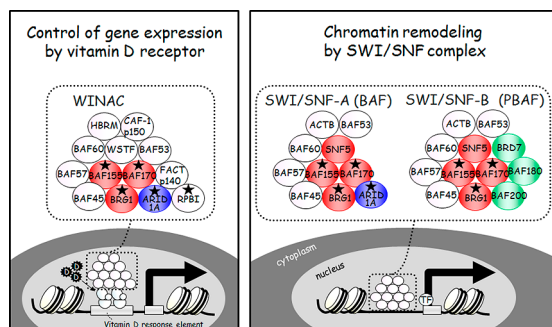


Fig. 1 Pathways related to the proteins with downregulated phosphopeptide levels in OCCC

Two pathways detected in BioCarta database (<http://www.biocarta.com/>) by pathway enrichment analysis using DAVID^{25),26)} are known to contribute to the control of gene expression through WINAC complex and SWI/SNF chromatin remodeling complex²⁷⁾. WINAC complex share many subunits (including four subunits detected by the current research) with SWI/SNF complex and acts as transcription coactivator by vitamin D receptor (left panel). SWI/SNF complex (including two types of complexes called BAF and PBAF) is involved in both transcriptional activation and repression of various genes through its chromatin remodeling activity (right panel)²⁷⁾. Core components shared by BAF and PBAF complexes are shown in red. Components unique to BAF and PBAF are shown in blue and green, respectively. Phosphoproteins detected here are marked by stars.

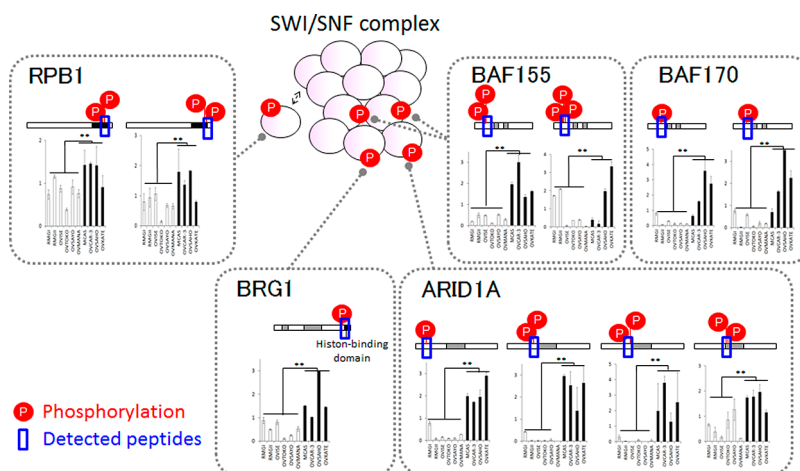


Fig. 2 OCCC-specific downregulation of phosphopeptide levels of SWI/SNF components

A total of 11 phosphopeptides derived from the five SWI/SNF components showed significant downregulation in OCCC cells relative to non-OCCC ovarian cancer cells with p -value < 0.01 (indicated by **) as revealed by comparative phosphoproteomic analysis using LC-MS/MS²⁴⁾. Relative peak intensities of phosphopeptides detected in OCCC cells (open bars) and non-OCCC ovarian cancer cells (closed bars) are shown as the means of duplicated samples.

のリン酸化レベルを直接測定することを試みた (Fig. 3). MRM 法によるタンパク質リン酸化レベルの測定では、リン酸化ペプチドと、これに対応する非リン酸化ペプチドの定量が行われる。一方で、ARID1A と BRG1 は、細胞中での存在量が著しく低く、細胞抽出液の酵素消化物をそのまま用いた MRM 解析では検出できないタンパク質である。リン酸化ペプチドの濃縮によってこれらの低発現量タンパク質のリン酸化ペプチドが初めて検出されたように、これらに対応する非リン酸化ペプチドを検出するには、リン酸化ペプチド濃縮に代わる方法で、標的ペプチドを濃縮する必要がある。そこで、本研究では、細胞抽出液から、免疫沈降法と SDS-PAGE ゲルからのバンドの切り出しによって ARID1A・BRG1 タンパク質をそれぞれ濃縮し、これらを用いてリン酸化・非リン酸化ペプチドを同時に検出することを試みた。また、本解析により、リン酸化ペプチドのショットガン分析結果の再現性についても検証を行った。MRM 法で定量に用いるピークについては、目的のリン酸化・非リン酸化ペプチドに由来するピークであることを確認するために、MRM-EPI (Enhanced Product Ion scan) 解析を行った。この方法では、MRM 法と同様に Q1 で特定の質量のプリカーサーイオンを選択した後に、Q3 で全てのプロダクトイオンのスキャン (MS/MS) を行うため、MRM 法で検出されるペプチドピークの配列が確認で

きる。著者らは、ARID1A・BRG1 を高レベルで発現する HEK293T 細胞から調製した試料を用いた MRM-EPI 解析により、同一試料を用いた目的リン酸化・非リン酸化ペプチドの同時検出が可能であることを確認した (Fig. 3, 左図, Fig. 5A).

また、比較定量解析のための内部標準として、これらのペプチドの C 末端リジン・アルギニンを安定同位体標識体入りのもの (L-Lysine- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$, L-Ariginine- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$) に置換したペプチドをそれぞれ合成し (Scrum Corporation), これらのペプチドをより効率的に検出するための Q1・Q3 質量フィルターセットの組み合わせ (チャンネル) や、Q2 でのプリカーサーイオン断片化の際の衝突エネルギーなどの、MRM 測定条件の最適化を行った。これらの条件を用いた MRM 法による定量性の確認のため、リン酸化・非リン酸化ペプチドを 1:1 で混合した様々な濃度のペプチド混合液の測定を行ったところ、10-500 fmol の範囲において、ペプチドロード量に対して検出されるペプチドピークエリア値のプロットに直線性のあることが認められた ($R^2 > 0.99$) (Fig. 4A).

同一の配列を有しながらイオン化効率や安定性が大きく異なるリン酸化・非リン酸化ペプチドを同時に定量するには、ペプチドロード量に対して検出されるピークエリア値の傾きを、ペプチドごとに補正する必要がある。そこで、

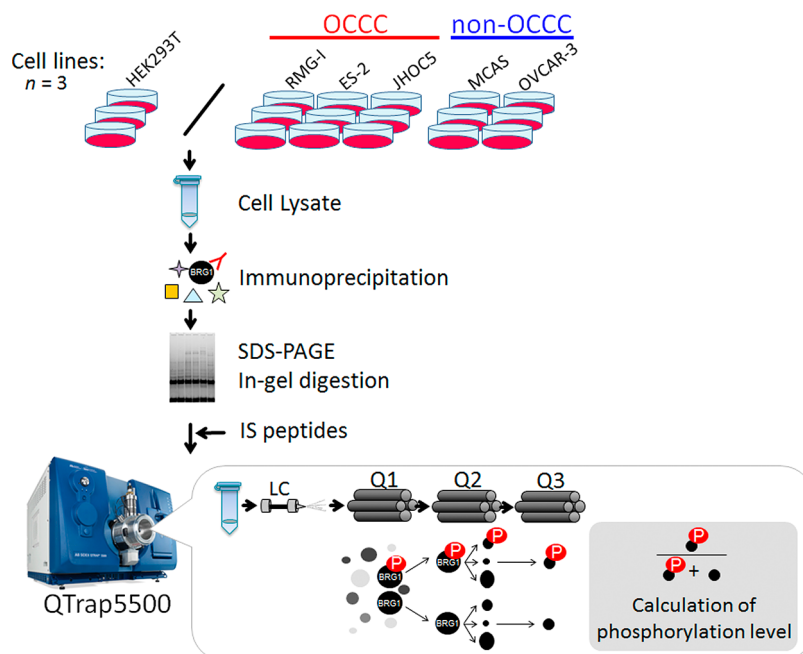


Fig. 3 MRM-based analysis of protein phosphorylation levels

Flowchart of MRM-based confirmation of phosphorylation levels of ARID1A and BRG1 is shown. Proteins were collected from the lysate of HEK293T cells (upper left) or pooled lysate of OCCC or non-OCCC ovarian cancer cell lines (upper right) by immunoprecipitation using anti-ARID1A or anti-BRG1 antibody. Protein bands corresponding to ARID1A and BRG1 were excised from SDS-PAGE gel and subjected to in-gel tryptic digestion. Purified peptides were spiked with a mixture of internal standard (IS) phospho- and nonphosphopeptides, and were analyzed by QTrap 5500 LC-MS/MS system. Pairs of phospho- and nonphosphopeptides for each phosphorylation site were parallelly detected in the same LC-MRM-MS run. Phosphorylation rate was calculated by dividing the phosphopeptide level with sum of phospho- and nonphosphopeptide levels.

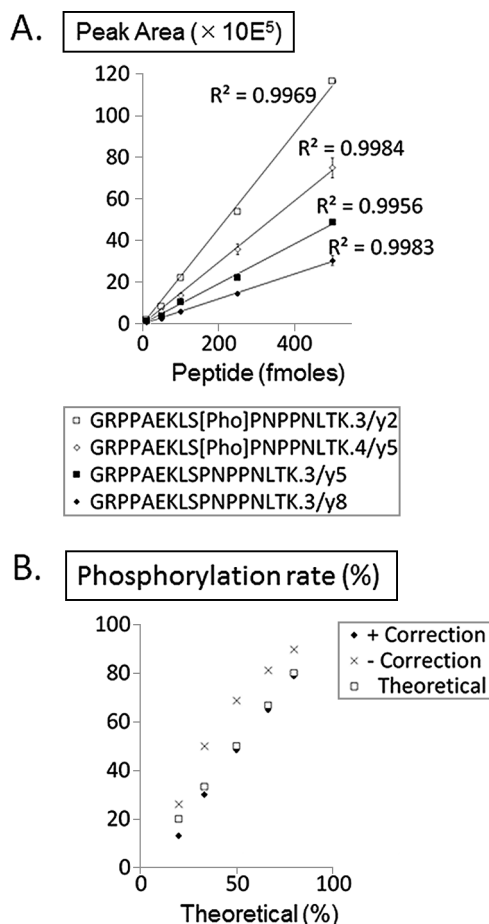


Fig. 4 Detection of the synthetic phospho- and nonphosphopeptides of BRG1 by MRM analysis²⁴⁾

(A) Standard curves of IS phospho- and nonphosphopeptides of BRG1 in 1:1 mixture of each peptide are shown. The peptide amount was measured by calculating the area of the corresponding peaks (vertical axis). Error bars denote standard deviation. The linear dynamic range from 10 to 500 fmol was confirmed for both peptides ($R^2 > 0.99$). (B) Calculation of phosphorylation rate was confirmed by MRM analyses of 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:4 mixtures of IS phospho- and nonphosphopeptides (phosphorylation rate of 80, 66.7, 50, 33.3, and 20%, respectively). Calculated phosphorylation rates with or without correction of phosphopeptide levels by the average p/n ratio (see text) are plotted against the theoretical phosphorylation rate.

補正のための定数として、リン酸化・非リン酸化ペプチドを等量ずつ混合して MRM 測定を行い、それぞれのピークエリア値の比を平均化した値（平均 p/n 値）を算出したところ、BRG1-p (Ser¹⁴⁵²)・ARID1A-p (Ser⁶⁹⁶) でそれぞれ、 2.34 ± 0.13 , 1.06 ± 0.16 という値が得られた。そこで、内部標準ペプチドをリン酸化・非リン酸化ペプチドの比が 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 になるように混合した試料を用いて MRM 測定を行い、得られたピークエリア値を基に、平均 p/n 値を補正に用いる以下の式によってリン酸化ペプチドの割合（リン酸化率 [%]）を求めた。

$$[\text{リン酸化率} (\%)] = A / (A + B) \times 100$$

A : リン酸化ペプチドのピークエリア値 / [平均 p/n 値]

B : 非リン酸化ペプチドのピークエリア値

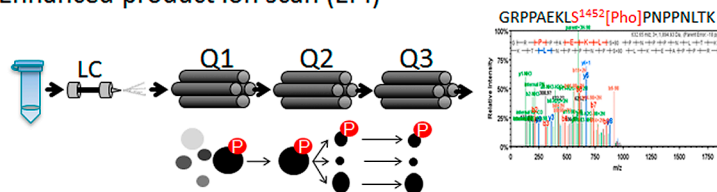
結果として、平均 p/n 値による補正により、ほぼ理論値に近いリン酸化率が求められることが確認された (Fig. 4, 右図)。

さらに、MRM 法によって検出されるリン酸化ペプチドピークの確認のために、HEK293T 細胞から調製したペプチド試料に、安定同位体標識を導入した合成リン酸化・非リン酸化ペプチドを内部標準として加えて二等分し、片方のチューブにフッ化水素酸 (HF) を加えて 4°C で一晩インキュベートして化学的脱リン酸化反応を行い、MRM 法で解析した (Fig. 5B)。HF 処理により、内部標準・試料由来のいずれについても、リン酸化ペプチドピークがほぼ消失することが確認された。一方で、これらのリン酸化ペプチドに対応する非リン酸化ペプチドのピーク強度は、HF 処理に伴って増加していた。これらのデータは、HF 処理での脱リン酸化によって、リン酸化ペプチドピークが非リン酸化ペプチドピークへとシフトしたことを示しており、目的とするリン酸化・非リン酸化ペプチドのピークが正しく検出されていることが示された。

4-2 卵巣癌細胞株におけるタンパク質リン酸化レベルの検証²⁴⁾

上記で確立した測定手法を用いて、OCCC および non-OCCC 卵巣癌細胞株における ARID1A・BRG1 のリン酸化レベル測定を行った (Fig. 3, 右図)。ウェスタンブロット解析によって BRG1 の発現が確認された OCCC 細胞株 3 種 (OVISE, OVMANA, ES-2) および non-OCCC 卵巣癌細胞株 2 種 (MCAS, OVCAR-3) の細胞抽出液から、タンパク質を同量ずつ測りとしてそれぞれ合計 1 mg のタンパク質を含む OCCC・non-OCCC 抽出液のプールを作製し、これを用いて上記と同様に標的タンパク質の濃縮とペプチド試料の調製を行った後、内部標準ペプチドを 100 fmol ずつ添加して MRM 解析を行った。結果として、OCCC の BRG1-p (Ser¹⁴⁵²) ペプチドの量は non-OCCC の約半分であったのに対し、対応する非リン酸化ペプチドの量は OCCC で約 10 倍となっていた (Fig. 6 上段)。これらの値を基に BRG1 のリン酸化率を計算すると、OCCC で $3.6 \pm 1.5\%$, non-OCCC で $39 \pm 7.2\%$ となり、OCCC では non-OCCC の 1/10 以下に減少していた ($p < 0.05$) (Fig. 6 下段)。一方で、OCCC の ARID1A-p (Ser⁶⁹⁶) ペプチドと、これに対応する非リン酸化ペプチドの量は、いずれも non-OCCC の半分程度となっており、ARID1A のリン酸化率は OCCC で $86 \pm 0.6\%$, non-OCCC で $88 \pm 0.7\%$ と算出され、2 群間での有意差はなかった ($p > 0.05$)。

A. Enhanced product ion scan (EPI)



B. Chemical dephosphorylation

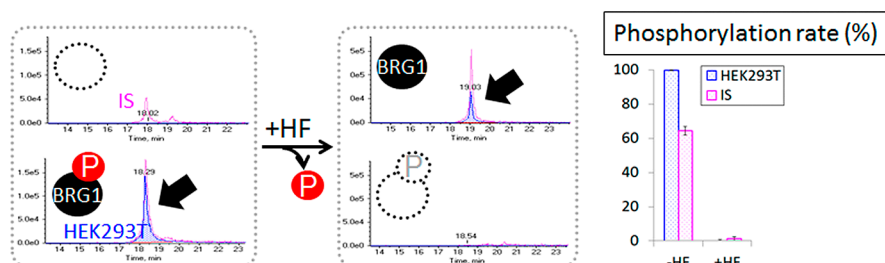


Fig. 5 Evaluation of peaks detected by MRM analysis using peptide samples prepared from HEK293T cells²⁴⁾

(A) Peptide detection by MRM analysis was evaluated by MRM-EPI scanning, in which the precursor ion of target peptide was filtered (Q1), fragmented (Q2), and trapped and subjected to full scan MS/MS analysis (Q3). Peptide identification was performed by searching against human BRG1 or ARID1A sequence by using MASCOT software. Peptide samples were prepared from HEK293T cell lysate by immunoprecipitation using anti-ARID1A or anti-BRG1 antibody. (B) Detection of phosphopeptide with its cognate nonphosphopeptide was also evaluated by the chemical dephosphorylation by hydrofluoric acid (HF) treatment. Peptide samples prepared above were spiked with 100 fmol each of IS phospho- and nonphosphopeptides. Peptide mixture was separated into two tubes, one of which was incubated in HF overnight at 4°C. Peaks for both IS and internal phosphopeptides of BRG1-p almost disappeared by HF treatment, while those for their cognate nonphosphopeptides showed significant increase (left panel). As a result, calculated phosphorylation rates of both IS and internal peptides showed significant downregulation in HF-treated sample (right panel).

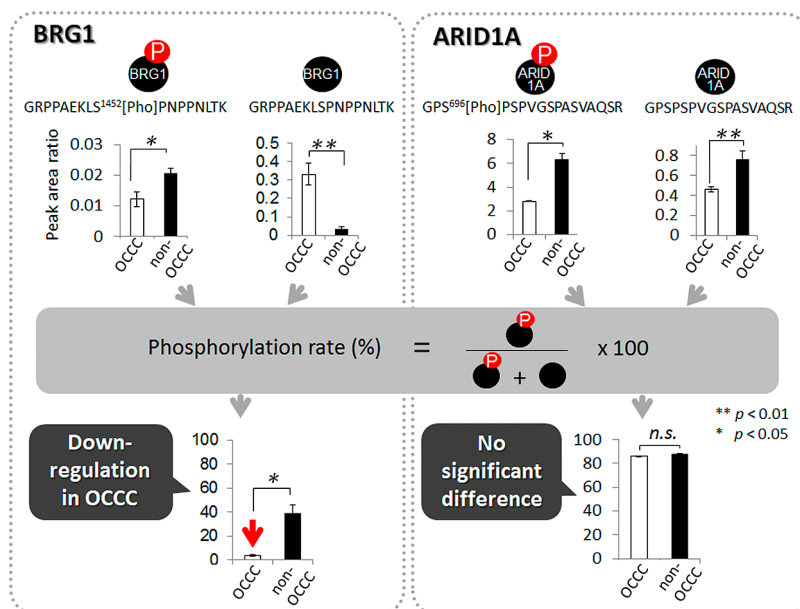


Fig. 6 MRM-based detections of the phosphorylation levels of BRG1 and ARID1A in ovarian cancer cell lines²⁴⁾

Average peak area ratio of phospho- and nonphosphopeptides obtained from three independent experiments (upper panel) were used for calculation of phosphorylation rate of BRG1 and ARID1A (lower panel). Phosphorylation rate of BRG1 showed greater than ten-fold decrease in OCCc cells relative to non-OCCc ovarian cancer cells, while that of ARID1A showed no significant differences between OCCc and non-OCCc cells ($p > 0.05$). Average peak area ratio was calculated by dividing the average peak area of the internal peptide by that of corresponding IS peptide. Error bars show standard deviations. Asterisks denote the significant differences (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

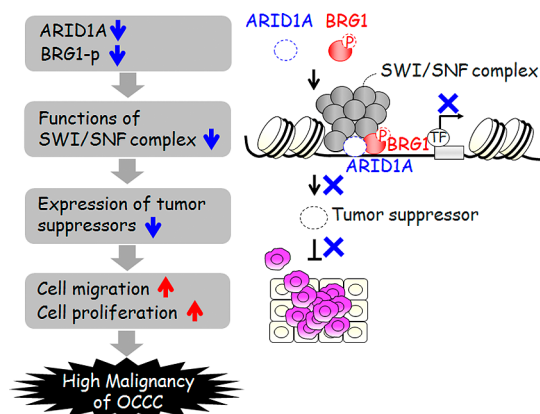


Fig. 7 Deduced mechanisms involved in the malignant transformation of OCCC

Reduced phosphorylation level of BRG1 as well as down-regulation of ARID1A level is expected to result in decreased activity of SWI/SNF complex. SWI/SNF complex is implicated in various inhibitory functions in malignant transformation of cancers through activation of various nuclear functions (e.g. transcription of tumor suppressor genes and promotion of DNA repair). Functional deficiency of SWI/SNF complex is expected to result in expression of various malignant features of OCCC.

5 OCCCの悪性化機構の推定

これらの結果から、OCCCの半数でARID1Aのタンパク質レベル低下が生じていることに加え、ARID1Aが正常に発現する残り半数のOCCCでは、SWI/SNF複合体のコア因子であるBRG1のSer¹⁴⁵²におけるリン酸化レベルが著しく低下していることが示唆された。様々な種類のがんで、ARID1Aをはじめとする様々なSWI/SNF複合体構成因子の変異やタンパク質量低下が報告されている一方で^{31),32)}、SWI/SNF因子のリン酸化レベル変化に関する報告は、これまで全くなされていなかった。今回検出されたBRG1のリン酸化部位は、ヒストンや他の転写調節因子等のアセチル化リジンに結合する機能を持つといわれているBromoドメインのN末端に存在することから、SWI/SNF複合体を介したクロマチン構造や遺伝子発現の調節に関わることが予想される。OCCCで特徴的に見られるこれらの因子の変化は、SWI/SNF複合体の機能低下による癌抑制因子の発現低下や癌の異常増殖・転移を促し、がんの悪性化を進行させる第二の要因となることが考えられる (Fig. 7)。

6 結論

近年のリン酸化プロテオーム解析技術の著しい発展により、培養細胞や組織を含む様々な試料を用いて、一度の分析で数千種以上のリン酸化ペプチドの比較定量解析を同時に行うことが可能となり、膨大な数のリン酸化部位の情報が様々な公共データベース上で閲覧できるようになっている。一方で、これらのリン酸化部位の多くは未だに機能が

解明されておらず、その中から機能的に意味のあるものを選別していくことが、次の段階として重要となる。本研究で用いたMRM法では、標的とするリン酸化部位を含むリン酸化・非リン酸化ペプチドを同時に検出・定量することができる。これにより、機能未知のものを含む幅広い種類のタンパク質を標的とした、リン酸化修飾レベルの化学量論的な解析を行うことも可能となる。存在量の少ない転写因子等のタンパク質については、現状では、事前に免疫沈降や電気泳動などで目的タンパク質の濃縮を行う必要がある。それでもなお、本方法は、有用な特異性抗体の存在しないリン酸化修飾のダイナミックな変化を検証し、その中から機能的に重要なものを絞り込んでいくための手法として、きわめて有効である。

本解析で見いだされたBRG1のリン酸化部位については、現在、さらに抗リン酸化ペプチド抗体やリン酸化部位を擬態・置換した安定発現細胞株を構築して機能解析を進めており、本修飾が様々な転写調節因子などの量的・質的变化や、変異細胞の表現型変化に関わることを示す結果が得られている。SWI/SNF複合体を構成する20種の因子や、これに結合する9種の関連因子においては、今回検出されたリン酸化修飾に加えて、アセチル化・メチル化・SUMO化を含む、合わせて200箇所近い翻訳後修飾部位が同定されている (<http://www.uniprot.org/>)。これらの修飾の機能はこれまでのところ全く解明されていないが、SWI/SNF複合体の安定性や局在、他の転写調節因子・ヒストン・DNA等との相互作用などのダイナミックな制御に関わることが予想される。これらの翻訳後修飾の異常は、OCCCのみならず、様々ながんの悪性化機構にも関わる可能性が高いことから、さらにこれらの修飾に着目した解析を進めていきたい。

謝 辞

本論文で紹介した研究は、文部科学省イノベーションシステム整備事業(11800122)およびJSPS科研費(15K19028)の支援の下に行われたものである。また、本研究の共同研究者である荒川憲昭と、本研究の遂行にあたってご助言・ご助力を頂いた、木村弥生、酒井和徳、野村文子、岡山明子、井野洋子、秋山知子、増石有佑、香川裕之、戸田年総(敬称略)に感謝する。

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Harsha HC, Pandey A. Phosphoproteomics in cancer. *Mol Oncol*. 2010;4:482-495.
- 2) Zhang G, Fang B, Liu RZ, *et al*. Mass spectrometry mapping of epidermal growth factor receptor phosphorylation related to oncogenic mutations and tyrosine kinase inhibitor sensitivity.

- J Proteome Res. 2011;10:305–319.
- 3) Gerber SA, Rush J, Stemman O, *et al.* Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6940–6945.
- 4) Hahn B, D'Alessandro LA, Depner S, *et al.* Cellular ERK phospho-form profiles with conserved preference for a switch-like pattern. *J Proteome Res.* 2013;12:637–646.
- 5) Domanski D, Murphy LC, Borchers CH. Assay development for the determination of phosphorylation stoichiometry using multiple reaction monitoring methods with and without phosphatase treatment: application to breast cancer signaling pathways. *Anal Chem.* 2010;82:5610–5620.
- 6) Eissler CL, Bremmer SC, Martinez JS, *et al.* A general strategy for studying multisite protein phosphorylation using label-free selected reaction monitoring mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2011;418:267–275.
- 7) Jin LL, Tong J, Prakash A, *et al.* Measurement of protein phosphorylation stoichiometry by selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2010;9:2752–2761.
- 8) Liu X, Jin Z, O'Brien R, *et al.* Constrained selected reaction monitoring: quantification of selected post-translational modifications and protein isoforms. *Methods.* 2013;61:304–312.
- 9) Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, *et al.* Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer.* 2000;88:2584–2589.
- 10) Itamochi H, Kigawa J, Akesima R, *et al.* Mechanisms of cis-platin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Oncology.* 2002;62:349–353.
- 11) Itamochi H, Kigawa J, Sugiyama T, *et al.* Low proliferation activity may be associated with chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol.* 2002;100:281–287.
- 12) Jones S, Wang TL, Shih Ie M, *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science.* 2010;330:228–231.
- 13) Kuo KT, Mao TL, Jones S, *et al.* Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2009;174:1597–1601.
- 14) Yamaguchi K, Mandai M, Oura T, *et al.* Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene.* 2010;29:1741–1752.
- 15) Alsop K, Fereday S, Meldrum C, *et al.* BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 2012;30:2654–2663.
- 16) Sato N, Tsunoda H, Nishida M, *et al.* Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res.* 2000;60:7052–7056.
- 17) Kuo KT, Mao TL, Chen X, *et al.* DNA copy numbers profiles in affinity-purified ovarian clear cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1997–2008.
- 18) Yamashita Y, Akatsuka S, Shinjo K, *et al.* Met is the most frequently amplified gene in endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with worsened prognosis. *PLoS One.* 2013;8:e57724.
- 19) Tan DS, Lambros MB, Rayter S, *et al.* PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2269–2280.
- 20) Arakawa N, Miyagi E, Nomura A, *et al.* Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Proteome Res.* 2013;12:4340–4350.
- 21) Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, *et al.* Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Serum Biomarker Candidate for Ovarian Clear Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2016;11:e0165609.
- 22) Morita A, Miyagi E, Yasumitsu H, *et al.* Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Proteomics.* 2006;6:5880–5890.
- 23) Guan B, Wang TL, Shih Ie M. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res.* 2011;71:6718–6727.
- 24) Kimura A, Arakawa N, Hirano H. Mass spectrometric analysis of the phosphorylation levels of the SWI/SNF chromatin remodeling/tumor suppressor proteins ARID1A and BRG1 in ovarian clear cell adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res.* 2014;13:4959–4969.
- 25) Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44–57.
- 26) Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1–13.
- 27) Trotter KW, Archer TK. The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal.* 2008;6:e004.
- 28) Chou MF, Schwartz D. Biological sequence motif discovery using motif-x. In: *Curr Protoc Bioinformatics.* Bethesda: John Wiley and Sons Inc.; 2011. Chapter 13:Unit 13 p.15–24.
- 29) Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, *et al.* Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* 2004;4:1633–1649.
- 30) Schwartz D, Gygi SP. An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1391–1398.
- 31) Weissman B, Knudsen KE. Hijacking the chromatin remodeling machinery: impact of SWI/SNF perturbations in cancer. *Cancer Res.* 2009;69:8223–8230.
- 32) Wilson BG, Roberts CW. SWI/SNF nucleosome remodelers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:481–492.

Phosphoproteomic Analysis to Elucidate the Mechanisms for Malignant Transformation of Cancers

Ayuko Kimura*, Hisashi Hirano

*E-mail: ayuko@yokohama-cu.ac.jp

Advanced Medical Research Center, Yokohama City University, Fukuura 3-9, Kanazawa, Yokohama 236-0004, Japan

(Received: April 20, 2017; Revised: May 27, 2017; Accepted: June 1, 2017)

Aberrant phosphorylation state of proteins is one of the major causes of tumorigenesis and cancer malignancy. Here, we performed a quantitative phosphoproteomic study aimed at revealing the molecular mechanisms underlying the pathology of ovarian clear cell carcinoma (OCCC), a highly malignant tumor among various histological subtypes of epithelial ovarian carcinoma. Comparative phosphoproteomic analysis using OCCC-derived cell lines indicated OCCC-specific downregulation of phosphopeptides derived from five components of SWI/SNF chromatin remodeling complex, including ARID1A, a tumor suppressor with frequent somatic mutations (46–57%) in OCCC tumors and cell lines. Native phosphorylation levels of ARID1A and BRG1, core components of SWI/SNF complex, were also analyzed by multiple reaction monitoring (MRM)-MS analysis, which we developed to perform parallel detection of phosphopeptide and its cognate nonphosphopeptide of these proteins. As a result, we detected significant downregulation of the phosphorylation level of BRG1, whereas diminished phosphopeptide level of ARID1A was likely to reflect decreased ARID1A level. These results indicated that not only decreased protein level of ARID1A but also downregulation of phosphorylation level of BRG1 might be related to the high malignancy of OCCC, which is induced by the impaired chromatin remodeling activity of SWI/SNF complex.

Keywords: malignancy; mass spectrometry; multiple reaction monitoring; ovarian cancer; phosphorylation.