

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790077

研究課題名（和文）

哺乳動物細胞核に局在化する長いノンコーディング RNA による転写制御機構の解明

研究課題名（英文）

Transcriptional regulation of nuclear long noncoding RNA in mammalian cells

研究代表者 秋光 信佳 (AKIMITSU NOBUYOSHI)

東京大学・アイソトープ総合センター・准教授

研究者番号：40294962

研究成果の概要（和文）：

本研究では、哺乳動物細胞の細胞核に局在する非常に長いノンコーディング RNA（非翻訳 RNA、非翻訳 RNA と呼ぶ）である MALAT1 による転写制御の分子機構解明を目指して研究した。その結果、MALAT1 ががん抑制因子である p53 の遺伝子プロモーターを負に制御することを見いだした。この結果は、MALAT1 の高発現ががんの悪性度と関連する事実をうまく説明する分子機構である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I examined the function of MALAT1, a nuclear long noncoding RNA, in transcriptional regulation. I found that MALAT1 negatively regulates the promoter activity of p53, a well-known anti-cancer gene. This result can well-explain the relationship between MALAT1 and cancer based on gene regulation of p53.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3, 400, 000	1, 020, 000	4, 420, 000

研究分野：医歯薬学系

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ノンコーディング RNA、がん、転写、p53

1. 研究開始当初の背景

大規模トランスクリプトーム解析の結果、哺乳動物細胞のゲノム DNA からノンコーディング RNA（タンパク質のアミノ酸一次配列情報をコード（含有）しないため翻訳されない RNA、非コード RNA あるいは非翻訳 RNA と呼ばれる）が大量に発現していることが判明した。ヒトでは、全転写産物の 90 パーセント以上がノンコーディング RNA であると推定されている。そのため、ヒトの高度な細胞内ネットワークの制御機構を真に理解する上で、ノンコーディング RNA の生理機能を明らかにすることが極めて重要と強く認識されてきている。また、近年では疾患に関連したノンコーディング RNA も次々と発見されてきたため、疾患の原因を分

子レベルで理解し、効果的な診断や治療法を開発するためにも、ノンコーディング RNA の機能を理解することが重要であると考えられるようになってきた。すなわち、診断・治療を目的として解析すべき生体分子として、薬学領域でもノンコーディング RNA は極めて重要な解析対象分子となってきている。現在までに様々なノンコーディング RNA が報告されている。この中で、マイクロ RNA などの 20-30 塩基の短いノンコーディング RNA については生理機能が判明しており、マイクロ RNA の異常が疾患の原因となっている例も報告されている。一方、全長が数千塩基長の長いノンコーディング RNA もゲノム DNA から大量に発現しているが、これらの中で生理的機能が判明しているものはご

くわずかである。

MALAT1 は高転移性がん細胞で発現が上昇しているノンコーディング RNA として見出された (Ji, P. et al. (2003) *Oncogene*, **22**, 8031-8041)。しかしながら、がん細胞の転移能力の獲得に MALAT1 が直接寄与しているか、あるいは細胞のがん化・高転移化に伴って副次的に発現が上昇しただけなのかは不明であった。そこで申請者は、がん細胞の転移に影響する様々な細胞機能 (運動性、接着性など) に MALAT1 が影響するかを系統的に検索した。その結果、細胞運動に関連する遺伝子群の転写制御を通じて、MALAT1 が細胞運動性を促進する機能を持つことを明らかにした (Tano K. et al., *FEBS letters*, in press)。すなわち、(1)RNA 干渉法で MALAT1 の発現量を減少させることでがん細胞の運動性が非常に低下すること、(2)MALAT1 が細胞運動を促進する遺伝子 (HMMR, LYN, CTHRC1 など) の転写を制御していることを見出した。

2. 研究の目的

申請者は、哺乳動物細胞の細胞核に局在する非常に長いノンコーディング RNA (非翻訳 RNA、非翻訳 RNA と呼ぶ) である MALAT1 が、細胞運動促進遺伝子の転写制御を通じて、がん細胞の運動性を促進する事を最近報告した。本研究では、MALAT1 による転写制御の分子機構解明を目指す。第一のアプローチでは、転写のレポーターアッセイ系を利用して、MALAT1 の制御下にあるプロモーターに結合する転写因子を同定・解析する。第二のアプローチでは、申請者が確立した MALAT1 結合タンパク質同定系を用いて、MALAT1 に結合するタンパク質の中で転写制御に関わるタンパク質を同定・解析する。これらの結果を総合し、MALAT1 による転写制御の分子機構を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

①MALAT1 response gene 側からアプローチでは、MALAT1 response gene の転写プロモーターに着目し、MALAT1 による転写制御を受けるために必須なプロモーター領域を確定して、この領域に結合する転写因子を同定する。同時に、MALAT1 response gene のエピジェネティックな制御が MALAT1 によって影響されている可能性についても検討するため、クロマチン免疫沈降法を用いて MALAT1 の発現有無によって MALAT1 response gene のプロモーター領域にエピジェネティックな変化が起きるかも調べる。次に、②MALAT1 結合タンパク質同定のアプローチとして、MALAT1 とタンパク質との複合体の分離を行い、MALAT1 結合タンパ

ク質を同定する。MALAT1 結合タンパク質の中に転写制御因子が存在しなかった場合には、MALAT1 結合タンパク質と結合する核タンパク質 (転写因子) を核抽出液から検索する。

4. 研究成果

がん抑制遺伝子である p 53 は癌化において中心的に働く遺伝子である。したがって、p 53 の発現制御は発癌機構を理解する上で極めて重要である。本研究では、ノックダウン実験、ウエスタンブロットによる p53 発現量変動検出、定量 RT-PCR 法による p 53 の mRNA 発現量検出、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたプロモーター活性測定、の実験を系統的に実施することにより、MALAT1 がこの p 53 遺伝子のプロモーター活性を負に制御することを示した。

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 15 件)

1. Salam KA., Furuta A., Noda N., Tsuneda S., Sekiguchi Y., Yamashita A., Moriishi K., Nakakoshi M., Tsubuki M., Tani H., Tanaka J. and Akimitsu N., (2013) Psammaphin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase, *J. Natur. Med.*, in press. (査読有り)
2. Furuta A, Salam KA, Akimitsu N., Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. (2013) Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, in press. (査読有り)
3. 秋光信佳, (2013) RNA ダイナミクスから迫る生命現象、薬事日報、3 月特集号 (査読無し)
4. Tani T., Torimura M. and Akimitsu N., (2013) The RNA degradation pathway regulates the function of GAS5 a non-coding RNA in mammalian cells, *PLoS ONE.*, **8**, e55684. (査読有り)
5. Tani H., Imamachi N., Salam KA., Mizutani R., Ijiri K., Irie T., Yada T., Suzuki Y., and Akimitsu N., (2013) Identification of hundreds of novel UPF1 target transcripts by direct determining whole transcriptome

- stability in mammalian cells, *RNA Biology*, 9, 1370-1379. (査読有り)
6. Fujimoto Y., Salam KA., Furuta A., Matsuda Y., Fujita O., Tani H., Ikeda M., Kato N., Sakamoto N., Maekawa S., Enomoto N., de Voogd NJ., Nakakoshi M., Tsubuki M., Sekiguchi Y., Tsuneda S., Akimitsu N., Noda N., Yamashita A., Tanaka J. and Moriishi K., (2012) Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon sp.*, *PLoS ONE*, 7, e48685 (査読有り)
 7. Tani H., Mizutani R., Salam KA. Tano K., Ijiri K., Wakamatsu A., Isogai T., Suzuki Y. and Akimitsu N., (2012) Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived non-coding transcripts in mammals, *Genome Res.*, 22, 947-956. (査読有り)
 8. Miyagawa R., Tano K., Mizuno R., Nakamura Y., Ijiri K., Rakwal R., Shibato J., Masuo Y., Mayeda A., Hirose T. and Akimitsu N., (2012) Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles., *RNA.*, 18, 738-751. (査読有り)
 9. Mizutani R., Wakamatsu A., Tanaka N., Yoshida H., Tochigi N., Suzuki Y., Oonishi T., Tani H., Tano K., Ijiri K., Isogai T. and Akimitsu N., (2012) Identification and characterization of novel genotoxic stress-inducible nuclear long noncoding RNAs in mammalian cells., *PLoS ONE*, 7, e34949. (査読有り)
 10. Yamashita A., Salam KA., Furuta A., Matsuda Y., Fujita O., Tani H., Fujita Y., Fujimoto Y., Ikeda M., Kato N., Sakamoto N., Maekawa S., Enomoto N., Nakakoshi M., Tsubuki M., Sekiguchi Y., Tsuneda S., Akimitsu N., Noda N., Tanaka J., Moriishi K., (2012) Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia.*, *Marine Drugs*, 10, 744-761. (査読有り)
 11. Salam KA., Furuta A., Noda N., Tsuneda S., Sekiguchi Y., Yamashita A., Moriishi K., Nakakoshi M., Tsubuki M., Tani H., Tanaka J. and Akimitsu N. (2012) Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by Manoalide., *J. Nat. Prod.*, 75, 650-654. (査読有り)
 12. 秋光信佳, (2012) ゲノムワイドな RNA 分解測定、細胞工学別冊「次世代シーケンサー 目的別アドバンスドメソッド」、100-108. (査読無し)
 13. 秋光信佳, (2012) ノンコーディング RNA から理解する「がん」のメカニズム、科学フォーラム、338、36-39. (査読無し)
 14. 秋光信佳, (2012) 核内構造とエピジェネティック制御をつなぐ核内長鎖ノンコーディング RNA、細胞工学、31、917-922(査読無し)
 15. 谷英典、水谷玲菜、鈴木穰、秋光信佳、(2012) RNAの安定性を指標にして機能不明な長鎖ノンコーディング RNA の性質を定義する、細胞工学、31、926-927. (査読無し)
- [学会発表] (計 1 件)
日本薬学会 113 年会、パシフィコ横浜、横浜市、平成 25 年 3 月 27 日から 30 日
秋光信佳、核内 RNA 分解機構を介した非コード RNA 機能制御
- [産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)
名称：修飾核酸を用いた細胞内 RNA 量の変化の測定方法
発明者：谷英典、秋光信佳
権利者：東京大学
種類：特許
番号：特願 2010-152640
出願年月日：平成 22 年 7 月 5 日
国内外の別：国内
- [その他]
ホームページ等
<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/akimitsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋光 信佳 (AKIMITSU NOBUYOSHI)

東京大学・アイソトープ総合センター・准教授

研究者番号：40294962