

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700975

研究課題名(和文) p53を制御する新規長鎖ノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of novel long non-coding RNA regulating p53

研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE, Yojiro)

近畿大学・工学部・准教授

研究者番号：90531963

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)：本研究では、最近申請者らが網羅的解析によって同定した長鎖ノンコーディングRNA、POLOP (Positive regulator lncRNA of p53) の機能を解明することを目的とした。本研究の結果、POLOPはヒト骨肉腫細胞で高発現していることが明らかとなった。また、POLOPは抗ガン剤(エトポシド)添加や活性化型H-RAS変異体の過剰発現により、発現誘導されることが分かった。さらにPOLOPをノックダウンすると、ヒト骨肉腫細胞の増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、POLOPは、骨肉腫細胞の増殖を促進する機能があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed the functional analysis of long non-coding RNA, POLOP (Positive regulator lncRNA of p53). We found that POLOP highly expresses in human osteosarcoma cells. The expression of POLOP was induced by the treatment of etoposide and forced expression of H-RASG12V. The depletion of POLOP in human osteosarcoma cells decreased cell growth. These results suggest that POLOP promotes the cell growth of human osteosarcoma cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：ノンコーディングRNA 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA: lncRNA) は、キャップ構造やポリ(A)鎖など、mRNA と同様の構造を持つ ncRNA であり、ヒトでおよそ 1 万種類以上あることが分かっている。ほとんどの lncRNA の機能は不明であるが、いくつかのは、重要な細胞機能を持つことが明らかとなってきた。これまで我々も、ANRIL という lncRNA が、ポリコーム複合体と結合し、INK4 遺伝子座へのポリコーム結合を促進することによって、INK4 遺伝子座の転写を抑制していることを明らかとした (Kotake et al. *Oncogene*. 2011)。また ANRIL は、細胞老化を抑制する機能を持つことを明らかとした。しかし、多くの lncRNA の作用機序や、その生理機能は未だ不明である。

2. 研究の目的

最近申請者は、網羅的解析によって同定した新規 lncRNA の一つが、癌抑制遺伝子産物 p53 タンパク質を安定化させる機能を持つことを見出した (POLOP と命名)。そこで本研究では、POLOP の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

POLOP の発現解析は、RT-PCR 法によって行った。エトポシドは、各種最終濃度 0.5、5、50 μ M で添加した。活性型 H-Ras 変異体の過剰発現は、レトロウイルスを用いて行った。POLOP の発現抑制は、POLOP を標的とする siRNA オリゴを用いて RNAi 法により行った。

4. 研究成果

(1) POLOP の細胞機能

様々なヒト培養細胞を用いて、POLOP の発現解析を RT-PCR 法により行った結果、骨肉腫細胞において POLOP が高発現していることが明らかとなった。興味深いことに、POLOP は、抗がん剤 (エトポシド) 添加や活性型 H-RAS 変異体の過剰発現により、発現量が増加することが分かった。さらに、siRNA オリゴを用いた siRNA 法により、POLOP をノックダウンすると、骨肉腫細胞の増殖が顕著に抑制された。これらの結果から、POLOP は骨肉腫細胞増殖を促進する機能を持つことが示唆された。

(2) p53 抑制因子 YB1 による細胞老化制御機構

転写因子 YB1 は様々ながん組織で高発現しており、重要ながん遺伝子であると考えられている。この YB1 は、p53 のネガティブレギュレーターであることが分かっている。また本研究の結果、マウス胎児線維芽細胞に

YB1 を過剰発現すると、細胞老化が抑制されることが分かった。逆に YB1 をノックダウンすると、細胞増殖が抑制された。YB1 をノックダウンした細胞では、CDK インヒビター p16 の転写が活性化していた。Chromatin immunoprecipitation assay の結果、YB1 は p16 プロモーター上に結合することが分かった。これらの結果から、YB1 は直接 p16 プロモーターに結合し、p16 転写を抑制することにより、細胞老化を抑制する機能があることが示唆された。今後、p53 に対して逆の作用を示す POLOP と、YB1 との関連を解析することは、重要な課題であると考えている。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

1. YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene: Yojiro Kotake, Yuichi Ozawa, Masanori Harada, Ktoko Kitagawa, Hiroyuki Niida, Yasutaka Morita, Kenji Tanaka, Takafumi Suda, Masatoshi Kitagawa. *Genes Cells*, 査読有, 18:999-1006, 2013.
2. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs: Masatoshi Kitagawa, Kyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Hiroyuki Niida, Tatsuya Ohhata. *Cell Mol Life Sci.*, 査読有, 70:4785-94, 2013.
3. Long Non-coding RNAs Involved in Cancer Development and Cell Fate Determination: Masatoshi Kitagawa, Yojiro Kotake, Tatsuya Ohhata. *Curr Drug Targets*, 査読有, 13:1616-1621, 2012.
4. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling: Ning Liu1, Masaki Matsumoto, Kyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Sayuri Suzuki, Senji Shirasawa, Keiichi I Nakayama, Makoto Nakanishi, Hiroyuki Niida and Masatoshi Kitagawa. *The EMBO Journal*, 査読

有, 31:2365-2377, 2012.

5. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2^{-/-} p27^{-/-} mice: Sayuri Suzuki, Hiroataka Fukasawa, Taro Misaki, Akashi Togawa, Naro Ohashi, Kyoko Kitagawa, **Yojiro Kotake**, Ning Liu, Hiroyuki Niida, Keiko Nakayama, Keiichi I. Nakayama, Tatsuo Yamamoto and Masatoshi Kitagawa. *PLoS One*, 査読有, 7(4):e36249, 2012.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 苗村円佳、**神武洋二郎**: 高分子非コードRNA, ANRILの作用機序と細胞機能の解明、日本農芸化学会2014年度大会、川崎市、2014年3月29日
2. **神武洋二郎**、北川雅敏: The regulation of RB/p53 pathway by long noncoding RNAs、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸市、2013年12月3日
3. 苗村円佳、北川雅敏、**神武洋二郎**: Elucidation of the action mechanism of long non-coding RNA, ANRIL which regulates cell proliferation、第36回日本分子生物学会年会、神戸市、2013年12月3日
4. 原田雅教、**神武洋二郎**、大畑樹也、アルディヤンティ アストリッド、北川恭子、丹伊田浩之、梶村春彦、須田 隆文、北川 雅敏: 非小細胞肺癌においてYB-1はcyclinD1の転写を亢進させる、第36回日本分子生物学会年会、神戸市、2013年12月3日
5. 苗村円佳、**神武洋二郎**: 長鎖非コードRNA, ANRILによる細胞老化制御機構の解明、

近畿大学サイエンスネットワーク・院生サミット、飯塚市、2013年11月23日

6. 苗村円佳、**神武洋二郎**: 癌化シグナルによる細胞内環境変化に伴って発現変動する長鎖ノンコーディングRNAの探索と機能解析、第12回近畿大学環境科学研究会、飯塚市、2013年8月8日
7. 苗村円佳、**神武洋二郎**: 長鎖ノンコーディングRNA, ANRILによる細胞増殖制御機構の解明、第50回化学関連支部合同九州大会、北九州市、2013年7月6日
8. **神武洋二郎**、北川雅敏: 癌化シグナルによって発現変動する長鎖非コードRNA, ANRILの機能解析、日本農芸化学会2013年度大会、仙台市、2013年3月25日
9. 鈴木小由里、深澤洋敬、三崎太郎、戸川証、大橋温、北川恭子、**神武洋二郎**、Liu Ning、丹伊田浩行、山本龍夫、北川雅敏: Skp2 ノックアウトマウスで見られた腎障害の軽減はSkp2-p27 ダブルノックアウトマウスで解除される、第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012年12月14日
10. 原田雅教、**神武洋二郎**、鈴木小由里、大畑樹也、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏: 転写因子 YB-1 の新規標的遺伝子としてのCyclin D1 の解析と非小細胞肺癌における解析、第35回日本分子生物学会年会、福岡市、2012年12月12日
11. 大畑樹也、**神武洋二郎**、北川雅敏: Recent progress of long non-coding RNA research、第71回日本癌学会、シンポジウム、札幌市、2012年9月19日

12. Kitagawa masatoshi, Kitagawa Kyoko,
Kotake Yojiro, NIIDA Hiroyuki, Liu Ning: Chk1
phosphorylates the tumor suppressor Mig-6,
regulating the activation of EGF signaling、第 45
回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物
学会合同大会、神戸市、2012 年 5 月 28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://blog.cc.fuk.kindai.ac.jp/biochem/labo/kotake/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE, Yojiro)
近畿大学・産業理工学部・准教授
研究者番号：90531963

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：