

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830073

研究課題名(和文)大腸癌におけるEHFによるp53機能抑制の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for p53 inactivation by EHF in colorectal cancer.

研究代表者

谷上 賢瑞(Taniue, Kenzui)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：90648627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、EHFが大腸癌細胞において、FOSL1やH3K4メチル化酵素KMT2Dによって、直接転写制御を受けていることを明らかにした。また、FOSL1やKMT2Dが大腸がん細胞の増殖に必須であることを明らかにした。続いて我々は、大腸癌細胞においてEHFの発現を抑制すると、p53タンパク質が安定化することを明らかにした。また、EHFはp53のユビキチン化酵素であるMDM2と直接結合し、MDM2のユビキチン化を阻害することによってMDM2タンパク質を安定化していることが明らかにした。さらに我々は、MDM2の新規ユビキチン制御因子としてRAD18などを同定した。

研究成果の概要(英文)：We revealed that FOSL1 and KMT2D, a histone H3K4 methyltransferase, regulated the expression of EHF in colorectal cancer cells. Moreover, we found that FOSL1 and KMT2D were required for the proliferation of colon cancer cells. Furthermore, we show that EHF knockdown stabilizes p53 protein. In addition, EHF interacts with and stabilizes the MDM2, a ubiquitin ligase, by interfering with its ubiquitination, which in turn destabilizes p53 protein. Finally, we identified RAD18 as a novel ubiquitinase for MDM2.

研究分野：分子生物学

キーワード：EHF p53 MDM2 ユビキチン化 FOSL1 KMT2D

1. 研究開始当初の背景

1990年代後半に登場したマイクロアレイ技術により、細胞のがん化の過程で遺伝子発現プロファイルに劇的な変化が生じることが明らかとされている。しかし、このような遺伝子発現プロファイルの異常が生じる分子機構やその生理的意義については十分に明らかになっていない。そこで我々は、ヒト大腸がんにおける異常な遺伝子発現の分子機構について、以下に述べるような研究を進めてきた¹。

1. 大腸がん細胞は EHF を高発現することにより p53 依存性のアポトーシスを回避している

2. EHF は RUVBL1 の高発現を誘導することにより p53 依存性のアポトーシスを抑制している

本研究は、以上の結果をもとに、さらに大腸がんで遺伝子発現の異常が起こる機構とその生理的意義の解明を進めることを目的としている。

1) Taniue K, et al. *EMBO Rep.* **12**, 682-689 (2011).

2. 研究の目的

これらの結果から、大腸がんで EHF が高発現している意義の一つは、RUVBL1 の発現増大を引き起こして p53 を介したアポトーシスから大腸がん細胞を守ることでありと考えられる。しかし、RUVBL1 を過剰発現しても EHF の発現抑制による大腸がん細胞の p53 依存性のアポトーシス誘導は部分的にしか抑制されない。そこで本研究では、これまでの研究で明らかになっていない以下の2点について解析することを目的とした。

1. 大腸がんにおいて EHF が高発現している分子機構を明らかにする

2. EHF-RUVBL1 経路以外に EHF が p53 依存性アポトーシスに関わる機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 大腸がんにおいて EHF が高発現している分子機構の解明

転写因子を標的とした RNAi Screening を行い、EHF の発現を制御する転写因子の同定を行った。

2. EHF-RUVBL1 経路以外に EHF が p53 依存性アポトーシスに関わる機構を明らかにする

RNAi Screening を用いた MDM2 を制御するユビキチン、脱ユビキチン化酵素の同定を行う。

当研究室にある RNAi library を用いて HCT116 細胞、HeLa 細胞におけるユビキチン関連酵素の発現を網羅的に抑制することによって、MDM2 の分解もしくは安定化を引き起こす因子の探索を行う。

4. 研究成果

我々は、RNAi Screening によって FOSL1 や H3K4 メチル化酵素 KMT2D の発現を抑制することによって EHF の発現が抑制されることを見出し、ChIP assay によって EHF が直接のターゲット遺伝子であることを見出した。また、大腸がん細胞において EHF の gene body に KMT2D によって H3K4Me1 修飾がなされていることを明らかにした。さらに、FOS1L や KMT2D が大腸がん細胞の増殖に必須であることを明らかにした。

続いて我々は、EHF による p53 依存性アポトーシス制御機構を明らかにするために、大腸がん細胞において EHF の発現を抑制すると、p53 タンパク質が安定化することを明らかにした。また、EHF は p53 のユビキチン化酵素である MDM2 と直接結合し、MDM2 のユビキチン化を阻害することによって MDM2 タンパク質を安定化していることが明らかにした。さらに我々は、MDM2 の新規ユビキチン制御因子として RAD18 などを同定した。

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 6 件)

1. Yanagida S*, Taniue K*, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Kobayashi M, Yamamoto T, Okamoto A, Akiyama T.

*Both authors contributed equally to this work. ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma.

Scientific Reports 3, Article number: 1305. 査読有. (2013). 10.1038/srep01305

2. Koyama-Nasu R, Haruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T. The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells.

Oncogene, 33, 2236-44. 査読有. (2014). 10.1038/onc.2013.168

3. Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T.

PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells.

Biochem Biophys Res Commun., 444, 13-8. 査読有. (2014). 10.1016/j.bbrc.2013.12.138

4. Tsuji S, Kawasaki Y, Furukawa S, Taniue K, Hayashi T, Okuno M, Hiyoshi M, Kitayama J, Akiyama T.

The miR-363-GATA6-Lgr5 pathway is critical for colorectal tumourigenesis.

Nature Communications, Article number: 3150. 査読有. (2014). 10.1038/ncomms4150

5. Sugimasa H*, Taniue K*, Kurimoto A, Takeda Y, Kawasaki Y, Akiyama T.

*Both authors contributed equally to this work.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K upregulates the kinetochore complex component NUF2 and promotes the tumorigenicity of colon cancer cells.

Biochem Biophys Res Commun. 459, 29-35. 査読有. (2015). 10.1016/j.bbrc.2015.02.043.

6. Oura F, Yajima Y, Nakata M, Taniue K, Akiyama T, Nakada H, Yamamoto K, Fujita-Yamaguchi Y.

Susceptibility to proteases of anti-Tn-antigen MLS128 binding glycoproteins expressed in human colon cancer cells.

Biosci Trends. 9, 49-55. 査読有. (2015). 10.5582/bst.2014.01127.

〔学会発表〕(計 6 件)

(口頭)

1. Kenzui Taniue.

ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma.

第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

2. Kenzui Taniue.

Functional analysis of a novel long ncRNA involved in the tumorigenicity of colorectal cancer.

第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25-27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

(ポスター)

1. Kenzui Taniue, Akiko Kurimoto, Hironobu Sugimasa, Emiko Nasu, Takeshi Nagashima, Mariko Okada-Hatakeyama, Tetsu Akiyama.

Functional analysis of a novel long ncRNA involved in the tumorigenicity of colorectal

cancer.

AACR Annual Meeting 2013. 2013 年 4 月 6-10 日. Washington convention center (Washington DC, United States).

2. Kenzui Taniue.

antisense ncRNA ASBEL の大腸がんにおける機能解析. NGS 現場の会 第三回研究会. 2013 年 9 月 4-5 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).

3. Kenzui Taniue, Akiko Kurimoto, Hironobu Sugimasa, Yasuko Takeda, Mana Kobayashi, Tetsu Akiyama.

Long non-coding RNA ASBEL required for tumorigenicity of colon cancer.

Keystone symposia "Long Noncoding RNAs: Marching toward Mechanism". 2014 年 2 月 27 日-3 月 4 日. Eldorado Hotel & Spa (New Mexico, USA).

4. Kenzui Taniue, Satoshi Yanagida, Hironobu Sugimasa, Yasuko Takeda, Tadashi Yamamoto, Aikou Okamoto, Tetsu Akiyama.

ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma.

第 37 回 日本分子細胞生物学会. 2014 年 11 月 25-27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

谷上 賢瑞 (TANIUE KENZUI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：90648627

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：