

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 4月 23日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700880

研究課題名（和文） INK4 遺伝子座の制御機構とその破綻による発癌機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the regulation of INK4 locus and oncogenic mechanism by the dysregulation of INK4 locus.

研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE YOJIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：研究者番号：90531963

研究成果の概要（和文）：INK4 遺伝子座は、癌抑制遺伝子 p15/p16/ARF をコードしており、ヒトの癌の 30-40% で変異が見つかっていることから、癌抑制において重要な領域と考えられている。しかし、この領域の発現制御機構はほとんど明らかとされていない。本研究により、INK4 遺伝子座が、ポリコムタンパク質、p53 及び長鎖ノンコーディング RNA によって、統合的に転写制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：INK4 locus encodes for three distinct tumor suppressors, p15, p16 and ARF, and is altered in an estimated 30-40% of human tumors. However, the mechanism of regulation of INK4 locus is unclear. In this study, we revealed that INK4 locus is regulated by Polycomb proteins, p53 and long noncoding RNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：細胞老化・転写制御

1. 研究開始当初の背景

細胞周期を負に制御する CDK インヒビター p15、p16 及び p53 安定化因子 ARF をコードする INK4 遺伝子座は、肺癌、乳癌、大腸癌、食道癌及び悪性黒色腫等で高頻度に遺伝子欠損や転写抑制されていることが報告されており、癌抑制において重要な領域であると考えられている。この p16、p15 及び ARF は非常に安定性の高いタンパクであり、その発現制御は主に転写レベルで行われている。継代の若い正常線維芽細胞や胎児期において p16 及び ARF の転写は抑制されているが、培

養継代を重ねるにつれ転写活性化され、pRB 経路を介した不可逆的な細胞周期停止（細胞老化）を引き起こす。また、Ras の活性化変異等による癌化シグナルによって p15、p16 及び ARF の転写は活性化し、一過性に過増殖した細胞を早期細胞老化へと誘導する。

2. 研究の目的

INK4 遺伝子座は細胞老化や発癌ストレスに対する防御において重要な役割を担っているにも関わらず、その転写制御機構に関してはほとんど明らかとされていなかった。そ

ここで本研究では、INK4 遺伝子座の転写制御機構の全容を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) INK4 遺伝子座は老化に伴ってその転写が活性化されることから、これら遺伝子の生理的な転写制御機構を解析するためには、不死化した細胞株を用いることは不適切であると考えられる。従って、本研究ではヒト正常線維芽細胞である WI38 を用いる。各種遺伝子はレトロウイルスを用いてノックダウン(pSuper-retro. shRNA ベクター使用)あるいは過剰発現(pBabe-puro ベクター使用)し、p16/ARF/p15 mRNA 量を Q-RT-PCR 及び Western Blot により検討する。

(2) 転写制御因子の INK4 遺伝子座への結合を検討するため、INK4 遺伝子座全体(約 40 kb)をカバーする PCR 用プラマーセットを作成し、ChIP アッセイ(クロマチン免疫沈降法)あるいは Q-PCR を組み合わせた実験系(ChIP-Q-PCR)で検討する。

4. 研究成果

(1) 高解像度タイリングアレイ解析により、INK4 遺伝子座近隣に複数の新規ノンコーディング RNA が存在することを明らかとした。同定したノンコーディング RNA の一つが、ARF の転写活性化に関与することを明らかとした。

(2) クロマチンサイレンシング因子であるポリコムタンパク質が、直接マウス ARF 遺伝子座に結合し、ARF 遺伝子の転写を抑制することを明らかとした(雑誌論文④)。さらに ARF 遺伝子座上へのポリコムタンパク質リクルートメントを、癌抑制因子 p53 及びヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が促進することを明らかとした。

(3) ポリコムタンパク質によって p15、p16 遺伝子座の転写が抑制されていることを明らかとした。さらに INK4 遺伝子座から転写される長鎖ノンコーディング RNA ANRIL が、ポリコム複合体構成因子 SUZ12 と結合し、p15、p16 遺伝子座へのポリコムタンパク質リクルートメントを促進していることを明らかとした。また ANRIL は、p15、p16 転写を抑制することにより、細胞老化を抑制する機能を持つことを明らかとした(発表論文②)

以上本研究により、ポリコムタンパク、p53、長鎖ノンコーディング RNA ANRIL によって、INK4 遺伝子座の転写が統合的に制御されていることが明らかとなった。INK4 遺伝子座は、癌抑制において重要な役割を担う領域である。従って、本研究によって明らかとなった INK4 遺伝子座制御因子は、癌化との関

連が高いと予想される。今後、明らかとした INK4 遺伝子座制御因子と癌化との関連を解析することにより、新たな発癌機序を提唱できると期待される。

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 8 件)

① Sayuri Suzuki, Hiroataka Fukasawa, Taro Misaki, Akashi Togawa, Naro Ohashi, Kyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Hiroyuki Niida, Akira Hishida, Tatsuo Yamamoto and Kitagawa, Masatoshi: Up-regulation of Cks1 and Skp2 with TNF α /NF- κ B Signaling in Chronic Progressive Nephropathy. *Genes to Cells*, 16(11):1110-1120, 2011.

② Yojiro Kotake, Tadashi Nakagawa, Kyoko Kitagawa, Sayuri Suzuki, Ning Liu, Masatoshi Kitagawa and Yue Xiong: Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15^{INK4B} tumor suppressor gene. *Oncogene*, 30: 1956-1962, 2011.

③ Tiffany Hung, Yulei Wang, Michael F. Lin, Ashley K. Koegel, Yojiro Kotake, Gavin Grant, Hugo M. Horlings, Nilay Shah, Christopher Umbricht, Pei Wang, Yu Wang, Benjamin Kong, Anita Langerod, Seung K. Kim, Marc van de Vijver, Saraswani Sukumar, Michael L. Whitfield, Manolis Kellis, Yue Xiong, David J. Wong and Howard Y. Chang: Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature Genetics*, 43(7):621-629, 2011.

④ Yaxue Zeng, Yojiro Kotake, Xin-Hai Pei, Matthew Smith and Yue Xiong: p53 binds to and is required for the repression of Arf tumor suppressor by HDAC and Polycomb. *Cancer Research*, 71: 2781-2792, 2011.

⑤ 神武洋二郎、北川雅敏: 長鎖ノンコーディング RNA と細胞老化. *細胞工学*, 学研メディカル秀潤社, Vol. 30. No. 7:729-733, 2011.

⑥ 神武洋二郎、北川雅敏: 長鎖 ncRNA によるクロマチン修飾因子のリクルートメント機構. *実験医学*, 羊土社, Vol. 29. No. 11:1716-1721, 2011.

⑦ Kyoko Kitagawa, Yojiro Kotake, Yoshihiro Hiramatsu, Ning Liu, Sayuri

Suzuki, Satoki Nakamura, Akira Kikuchi and Masatoshi Kitagawa: GSK3 regulates the expressions of human and mouse c-Myb via different mechanisms. *Cell Division*, 5: 27, 2010.

⑧ Tsukasa Fujiki, Miyako Udono, Yojiro Kotake, Makiko Yamashita, Sanetaka Shirahata and Yoshinori Katakura: NFAT5 regulates transcription of the mouse telomerase reverse transcriptase gene. *Experimental Cell Research*, 316(20): 3342-3350, 2010.

〔学会発表〕(計 16 件)

① 神武洋二郎

長鎖ノンコーディング RNA *ANRIL* による癌抑制遺伝子 *p15/p16* の転写制御機構
第 6 回浜松医科学シンポジウム、2012 年 2 月 24 日、浜松

② Yojiro Kotake, Tadashi Nakagawa, Kyoko Kitagawa, Sayuri Suzuki, Ning Liu, Hiroyuki Niida, Yue Xiong, Masatoshi Kitagawa
The epigenetic regulation of INK4 locus by Polycomb and long noncoding RNA, ANRIL
第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日～16 日、横浜

③ Yojiro Kotake, Kyoko Kitagawa, Hiroyuki Niida and Masatoshi Kitagawa.
Long noncoding RNA *ANRIL* represses the *INK4* locus via polycomb recruitment.
第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日～5 日、名古屋

④ 鈴木小由里、深澤洋敬、三崎太郎、戸川証、北川恭子、神武洋二郎、丹伊田浩行、菱田明、山本龍夫、北川雅敏
慢性進行性腎障害における NF- κ B 経路による Skp2 および Cks1 の発現亢進
第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日～24 日、京都

⑤ 神武洋二郎、中川直、北川恭子、鈴木小由里、劉寧、丹伊田浩行、Yue Xiong、北川雅敏
長鎖ノンコーディング RNA *ANRIL* によるポリコムリクルートメントを介した *INK4* locus 転写抑制機構
第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日～24 日、京都

⑥ 北川雅敏、神武洋二郎
Long non-coding RNA ANRIL negatively regulates cell proliferation via silencing of INK4 locus
第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27～29 日、札幌

⑦ Yojiro Kotake, Tadashi Nakagawa, Kyoko Kitagawa, Hiroyuki Niida, Yue Xiong and Masatoshi Kitagawa.

Long non-coding RNA *ANRIL* is required for the Polycomb recruitment to and silencing of *INK4* locus.

Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society、2011 年 6 月 14 日～18 日、Kyoto

⑧ 神武洋二郎、中川直、北川恭子、丹伊田浩行、Yue Xiong、北川雅敏
長鎖ノンコーディング RNA による *INK4* locus 制御機構

第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011 年 5 月 19 日～20 日、熊本

⑨ 神武洋二郎

Polycomb/noncoding RNA による癌抑制遺伝子 *p16* 転写制御機構の解明
第 2 回浜松医科学シンポジウム、2010 年 12 月 17 日、浜松

⑩ Ning Liu、北川恭子、神武洋二郎、丹伊田浩行、北川雅敏
癌抑制遺伝子産物 Mig-6 のリン酸化とその責任酵素の解析

第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会 合同大会、
2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸

⑪ 鈴木小由里、深澤洋敬、三崎太郎、戸川証、北川恭子、神武洋二郎、山本龍夫、北川雅敏
慢性進行性腎障害における Cks1 および Skp2 の発現亢進の意義

第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会 合同大会、
2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸

⑫ 北川恭子、神武洋二郎、北川雅敏
GSK3 による c-Myb の量的制御機構
日本分子生物学会・日本生化学会合同大会
2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸

⑬ 神武洋二郎、Yue Xiong、北川恭子、北川雅敏

CUL4-DDB1/MLL complex activates the *p16* transcription through histone H3K4 methylation

第 33 回日本分子生物学会年会／第 83 回日本生化学会 合同大会、
2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸

⑭ Yojiro Kotake, Kyoko Kitagawa, Tadashi Nakagawa T, Yue Xiong and Masatoshi Kitagawa.

The epigenetic regulation of INK4 locus by Polycomb and noncoding RNA
International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells、2010 年 11 月、Fukuoka

⑮ 北川恭子、神武洋二郎、北川雅敏
c-Myb の量的制御機構における GSK3 の関与
第 69 回日本癌学会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪

⑯ 神武洋二郎、北川恭子、北川雅敏
CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase and MLL histone methyltransferase are required

for the oncogene-induced $p16^{INK4a}$
activation

第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22
日～24 日、大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/wla/biol/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神武 洋二郎 (KOTAKE YOJIRO)

浜松医科大学・医学部・助教

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：