

長鎖非コードRNA, *ANRIL*, *PANDA*による 細胞増殖, アポトーシス制御機構

神武 洋二郎, 苗村 円佳, 紫 千大

1. はじめに

長鎖非コードRNA (long noncoding RNA : lncRNA) は、200ヌクレオチド以上の長さであり、キャップ構造やポリ(A)鎖など、mRNAと同様の構造を持つncRNAである。超高解像度タイリングアレイ解析や次世代RNAシーケンスなどの大規模トランスクリプトーム解析の結果、lncRNAはヒトにおいて1万個以上存在することが明らかとなっている。ほとんどのlncRNAは機能未知であるが、近年いくつかのlncRNAが、分化、がん化、アポトーシスや細胞老化といった細胞運命決定において、重要な役割を担っていることがわかってきた^{1,2)}。これらlncRNAの作用機構は実に多種多様である。これまでの研究により、lncRNAが、さまざまなタンパク質との相互作用を介して、転写制御、翻訳制御、核内構造体形成やタンパク質輸送などに関与することがわかってきた。

これまでに筆者らも、*ANRIL* (antisense non-coding RNA in the *INK4* locus) がポリコム群 (Polycomb group : PcG) と結合し、*INK4* 遺伝子座上へのPcG結合を促進することによって、CDK (cyclin-dependent kinase) インヒビター *p15* および *p16* の転写を抑制すること、さらに *ANRIL* が細胞老化制御に関与することを報告した³⁾。また、Changらのグループとの共同研究の結果、CDK インヒビター *p21* 遺伝子座上流に存在する *PANDA* (*p21* associated ncRNA DNA damage activated) が、転写因子NF-YA (nuclear transcription factor YA) と結合し、そのDNA結合を阻害することにより、アポトーシス誘導遺伝子群の転写抑制を介して、アポトーシスを抑制することが明らかとなった⁴⁾。本稿では、これら *ANRIL* と *PANDA* による細胞増殖およびアポトーシス制御機構について、筆者らの研究成果を中心に、

最新情報をあわせて概説する。

2. *INK4* 遺伝子座に存在する lncRNA, *ANRIL*

1) *INK4* 遺伝子座

INK4 遺伝子座は、ヒト染色体9p21領域に存在する。この領域は、非常にユニークな構造を持つ。およそ40kb内に、CDKインヒビターである *p15* および *p16* 遺伝子が存在する。さらに、*p16* と同じエキソンを共有するが、異なるリーディングフレームを持つ *ARF* (*p53* 安定化因子) も存在する。*p15* および *p16* タンパク質は、CDK4/6の活性阻害を介してがん抑制遺伝子産物RBを正に制御する。*ARF* タンパク質は、ユビキチンリガーゼMDM2の活性阻害を介してがん抑制遺伝子産物 *p53* を正に制御する。したがって、*INK4* 遺伝子座は、がん抑制において重要な領域であると考えられている。実際、多くのヒトのがん組織において、この領域の欠損、点変異および転写抑制が報告されている^{5,6)}。

2) *ANRIL* の構造

ANRIL は、フランスの家族性メラノーマ-神経系腫瘍において欠損している領域内に存在する遺伝子として、EST (expressed sequence tag) データベースを用いた解析により同定された⁷⁾。*ANRIL* は、*INK4* 遺伝子座内の *p15* および *ARF* 遺伝子間から、これらとは逆向きに転写される。*ANRIL* のゲノムDNAは約120kbの長さで、19個のエキソンからなる。19番目のエキソンにポリアデニル化部位を持ち、転写後ポリ(A)付加およびスプライシングを受け、約3.8kbの長さになる。これまでに、少なくとも13個以上の *ANRIL* アイソフォームの存在が確認されている⁸⁾。興味深いことに、*ANRIL* アイソフォームの一部は、スプライシング後、環状構造をとることがわかっているが、その機能は不明である⁹⁾。

3) *ANRIL* の発現制御

SatoやWanらの解析により、*ANRIL* は、転写因子E2F1によって転写活性化されることが報告された^{10,11)}。*ANRIL* のプロモーター領域には、E2F結合部位がある。クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation : ChIP) やルシ

近畿大学産業理工学部生物環境化学科細胞生物工学研究室
(〒820-8555 福岡県飯塚市柏の森11-6)

Regulation of cell proliferation and apoptosis by long noncoding RNA, *ANRIL* and *PANDA*

Yojiro Kotake, Madoka Naemura and Chihiro Murasaki
(Department of Biological and Environmental Chemistry, Faculty of
Humanity-Oriented Science and Engineering, Kinki University, 11-6
Kayanomori, Iizuka, Fukuoka 820-8555, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870230

© 2015 公益社団法人日本生化学会

フェラーゼアッセイにより、E2F1が*ANRIL*プロモーターに直接結合し、そのプロモーターを活性化することが示された。その上流シグナルとして、DNA損傷応答経路を介していることがわかっている。DNA損傷により活性化するATM (ataxia-telangiectasia mutated) 依存的に、E2F1は*ANRIL*プロモーターに結合し、転写を活性化することが示された。¹¹⁾

筆者らは、活性型H-Ras変異体の過剰発現により、*ANRIL*の発現量が顕著に減少することを示した³⁾。ヒト胎児肺線維芽細胞において、過剰のRasシグナルが入ると、細胞は一過性に過増殖するが、やがて*INK4*遺伝子座にある*p15*および*p16*遺伝子の転写が活性化され、早期細胞老化が誘導される。この経路は、がん化シグナルに対する防御機構として働いている。*ANRIL*は、*p15*および*p16*の転写を抑制する機能を持つことから、Rasシグナルによる*ANRIL*の発現抑制は、*p15/p16*経路を介したがん抑制において重要であると考えられる。しかしながら、Rasシグナルによる*ANRIL*発現抑制機構については、いまだ不明である。

4) *ANRIL*による細胞増殖制御機構

筆者らの解析の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞WI38において、*ANRIL*をノックダウンすると、*INK4*遺伝子座の*p15*および*p16*の転写が活性化することが明らかとなった³⁾。細胞周期のブレーキである*p15*および*p16*の発現量増加に伴い、*ANRIL*をノックダウンした細胞は、増殖が顕著に抑制され、最終的に早期細胞老化が誘導された。これらの結果から、*ANRIL*は*p15*および*p16*遺伝子の転写を抑制し、細胞増殖、老化を抑制する機能を持つことが示唆された。*ANRIL*による*INK4*遺伝子座転写抑制機構として、筆者らやYapらは、*ANRIL*がこの領域へのPcGリクルートメントに関与することを報告した^{3, 12)}。PcGは、PRC1 (Polycomb repressive complex 1) とPRC2という二つの複合体に大別される。PcGは、PRC2によるヒストンH3の27番目のリシン残基 (H3K27) のメチル化と、その修飾を認識して結合するPRC1によるヒストンH2AK119のモノユビキチン化によって、標的遺伝子の転写を抑制する。以前筆者らは、PcGがヒストンH3K27のメチル化を介して、*INK4*遺伝子座の転写を抑制していることを報告した¹³⁾。筆者らのChIPアッセイの結果、*ANRIL*をノックダウンすると、*INK4*遺伝子座上のPRC2構成因子、SUZ12の結合量が減少することが示された³⁾。さらに、SUZ12抗体を用いたRNA immunoprecipitation (RIP) アッセイの結果、*ANRIL*がSUZ12と結合していることが示された。一方、YapらのUV cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) アッセイの結果、クロマチン画分において、*ANRIL*がPRC1構成因子、CBX7と結合していることが示された¹²⁾。これら

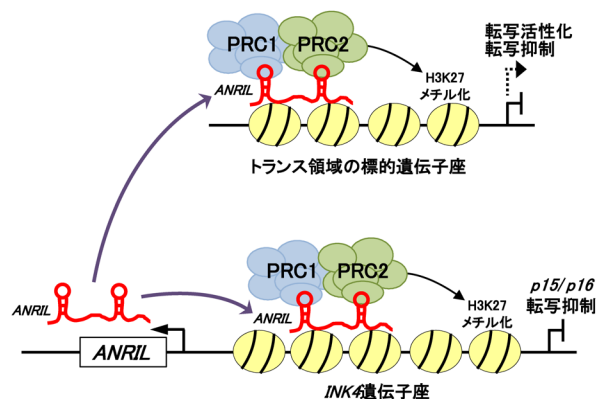


図1 *ANRIL*による転写制御機構のモデル

*INK4*遺伝子座から転写される*ANRIL*は、PRC1/PRC2と結合し、*INK4*遺伝子座にリクルートすることにより、*p15/p16*の転写を抑制する。一方、*ANRIL*は、トランス領域 (異なる染色体) の標的遺伝子座に、PRC1/PRC2をリクルートすることにより、その転写を抑制する。*ANRIL*は、トランス領域の標的遺伝子を転写活性化させる場合もある。

の結果から、*ANRIL*は転写された後、クロマチン上にとどまり、PRC1およびPRC2と結合し、これらPcGによる*INK4*遺伝子座のヒストン修飾を促進させることにより、この領域の転写抑制状態を維持していることが考えられた (図1)。

*ANRIL*ノックダウンによる細胞増殖の抑制は、RB経路が不活化した細胞でもみられた (未発表データ)。このことは、*ANRIL*が*p15/p16*以外の標的遺伝子を持つこと、つまりトランス領域の転写制御にも関与することを示唆した。最近、これを支持する研究結果が相次いで報告された。Congrainsらは、ヒトの大動脈血管平滑筋細胞において、*ANRIL*をノックダウンすると、アテローム性動脈硬化症関連遺伝子群の発現量が変動することを示した¹⁴⁾。興味深いことに、*ANRIL*のエキソン1とエキソン19領域のノックダウンでは、各々変動する遺伝子群が異なっていた。*ANRIL*には複数のアイソフォームが存在することから、各々のアイソフォームは異なる標的遺伝子あるいは機能を持つのかもしれない。一方、Holdらは、*ANRIL*を異所的に過剰発現すると、細胞接着能、増殖能、代謝活性が亢進し、アポトーシスが抑制されることを示した⁸⁾。さらにHoldらは、*ANRIL*過剰発現により、トランス領域 (異なる染色体) の標的遺伝子座上のSUZ12およびCBX7結合量が増加することを示した。*ANRIL*依存的にPcGがリクルートされた標的遺伝子の転写は、抑制されるものもあれば、逆に活性化されるものもあった。*ANRIL*は、PcGだけでなく、他の転写制御因子 (この場合、転写活性化因子?) のリクルートメントにも関与しているのかもしれない。この*ANRIL*によるトランス領域の標的遺伝子発現制御には、*ANRIL*中にあるAlu配列が必要であった。以上の

ことから、*ANRIL*は*INK4*遺伝子座だけでなく、トランス領域の標的遺伝子発現を制御することにより、細胞増殖、老化、アポトーシス、接着および代謝調節といった、多様な細胞機能に関与していることが考えられた(図1)。今後、*ANRIL*によるシス/トランス領域の標的遺伝子座認識機構の解明や、結合タンパク質の網羅的探索が、さらなる*ANRIL*の機能解明に必要であると考えている。

3. *p21* 遺伝子座上流に存在する lncRNA, *PANDA*

1) *PANDA*の構造と発現

Changらと筆者らの共同研究により、細胞周期関連遺伝子群(サイクリン/CDKs/CDKインヒビター)のプロモーター領域に、216個の推定新規lncRNAが存在することが明らかとなった⁴⁾。これらlncRNAの発現と、周辺の遺伝子との発現のパターンに相関性はみられなかった。この結果は、ほとんどのlncRNAがシス領域の遺伝子の転写制御に関与していないことを示唆した。これらlncRNAの中で、機能が解明されたのが*PANDA*である。*PANDA*ゲノムDNAは、CDKインヒビター*p21*遺伝子の転写開始点の約5kb上流に存在し、1個のエキソンからなる(図2)。*PANDA*は、*p21*とは逆向きに転写され、5'末端にキャップ構造を、3'末端にポリ(A)鎖を持つ転写産物(長さ1.5kb)

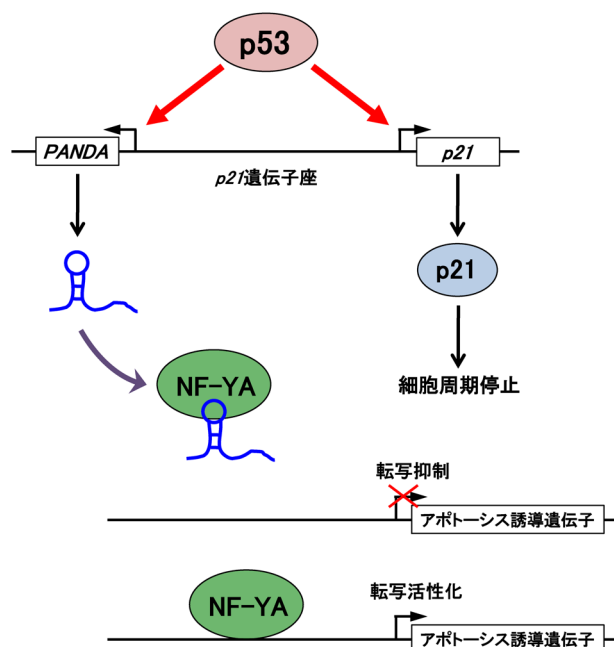


図2 *PANDA*による転写制御機構のモデル

p21 遺伝子座上流から、p53 依存的に発現誘導される *PANDA* は、転写因子 NF-YA と結合し、その標的遺伝子(アポトーシス誘導遺伝子群)プロモーターへの結合を阻害することにより、アポトーシス誘導遺伝子群の転写を抑制する。*PANDA* と同じく、p53 によって発現誘導される CDK インヒビター *p21* は、細胞周期を G1 期に停止させる。

となる。その発現は、DNA 損傷に応答して、p53 依存的に誘導された。*PANDA* と *p21* は、互いの発現には影響を及ぼさなかった。

2) *PANDA* によるアポトーシス制御機構

PANDA はアポトーシス制御に関与することが示された⁴⁾。*PANDA* をノックダウンした細胞は、DNA 損傷によるアポトーシスが起りやすくなった。マイクロアレイ解析の結果、DNA 損傷誘発とともに *PANDA* をノックダウンすると、アポトーシス誘導遺伝子群(*APAF1*, *BIK*, *FAS*, *LRDD* など)の発現量が増加することが明らかとなった。これらの結果から、*PANDA* はアポトーシス誘導遺伝子群の転写を抑制することにより、アポトーシスを抑制する機能を持つことが示唆された。

p53 下流のアポトーシス誘導遺伝子のプロモーターは、転写因子 NF-Y 複合体によって活性化される。RIP アッセイの結果、*PANDA* は、NF-Y 複合体の構成因子である NF-YA と結合することが示された。さらに ChIP アッセイの結果、*PANDA* をノックダウンすると、アポトーシス誘導遺伝子群のプロモーター上の NF-YA 結合量が増加することが示された。これらの結果から、DNA 損傷にตอบสนองして誘導される *PANDA* は、NF-YA と結合し、その標的遺伝子プロモーターへの結合を阻害することによって、アポトーシス誘導遺伝子群の転写を抑制することが考えられた(図2)。

4. おわりに

近年、lncRNA の機能解明が進むにつれ、lncRNA は多様な作用機構と細胞機能を持つことがわかってきた。本稿で注目した *ANRIL* と *PANDA*、両者とも転写制御に関与するが、その作用機構や細胞機能はまったく異なるものであった。この点が、lncRNA 研究の興味が尽きない理由であるが、反面、一つ一つの lncRNA に対して、手探りで地道に作用機構を解明していかなければならず、解析に時間がかかる理由でもある。全機能性 lncRNA の作用機構の分類や構造モチーフの同定ができる日は、はたしてやってくるのだろうか？

近年、*ANRIL* 遺伝子座上の一塩基多型(single-nucleotide polymorphisms: SNPs)が、冠状動脈疾患、虚血性脳卒中や II 型糖尿病に関連することが明らかにされた。また、*ANRIL* 遺伝子上の SNPs の一つが、*ANRIL* の発現量減少と神経線維腫に関連することが報告された¹⁵⁾。*ANRIL* はがん抑制遺伝子である *p15* および *p16* の転写を抑制し、細胞増殖を促進する機能を持つことから、がん化に関与する可能性が考えられる。今後、*ANRIL* や *PANDA* の生理機能の解明が重要な課題である、と筆者らは考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、浜松医科大学分子生物学講座北川雅敏教授、ノースカロライナ大学Yue Xiong教授、スタンフォード大学Howard Y. Chang教授をはじめ、多くの共同研究者のご指導、ご協力によるものであります。深く御礼申し上げます。

文 献

- Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., & Ohhata, T. (2013) *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 4785–4794.
- Kitagawa, M., Kotake, Y., & Ohhata, T. (2012) *Curr. Drug Targets*, **13**, 1616–1621.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., & Xiong, Y. (2011) *Oncogene*, **30**, 1956–1962.
- Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P., Kong, B., Langerod, A., Borresen-Dale, A.L., Kim, S.K., van de Vijver, M., Sukumar, S., Whitfield, M.L., Kellis, M., Xiong, Y., Wong, D.J., & Chang, H.Y. (2011) *Nat. Genet.*, **43**, 621–629.
- Ruas, M. & Peters, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1378**, F115–F177.
- Sharpless, N.E. (2005) *Mutat. Res.*, **576**, 22–38.
- Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., & Bieche, I. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 3963–3969.
- Holdt, L.M., Hoffmann, S., Sass, K., Langenberger, D., Scholz, M., Krohn, K., Finstermeier, K., Stahring, A., Wilfert, W., Beutner, F., Gielen, S., Schuler, G., Gabel, G., Bergert, H., Bechmann, I., Stadler, P.F., Thiery, J., & Teupser, D. (2013) *PLoS Genet.*, **9**, e1003588.
- Burd, C.E., Jeck, W.R., Liu, Y., Sanoff, H.K., Wang, Z., & Sharpless, N.E. (2010) *PLoS Genet.*, **6**, e1001233.
- Sato, K., Nakagawa, H., Tajima, A., Yoshida, K., & Inoue, I. (2010) *Oncol. Rep.*, **24**, 701–707.
- Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Liu, Y., Zhang, X., Peng, G., & Lu, X. (2013) *Cell. Signal.*, **25**, 1086–1095.
- Yap, K.L., Li, S., Munoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., & Zhou, M.M. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 662–674.
- Kotake, Y., Cao, R., Viatour, P., Sage, J., Zhang, Y., & Xiong, Y. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 49–54.
- Congrains, A., Kamide, K., Katsuya, T., Yasuda, O., Oguro, R., Yamamoto, K., Ohishi, M., & Rakugi, H. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 612–616.
- Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Ortonne, N., Laurendeau, I., Melin, L., Ferkal, S., Hernandez, L., Leroy, K., Valeyrie-Allanore, L., Parfait, B., Vidaud, D., Bieche, I., Lantieri, L., Wolkenstein, P., & Vidaud, M.; NF France Network. (2011) *J. Natl. Cancer Inst.*, **103**, 1713–1722.

著者寸描

●神武 洋二郎 (こうたけ ようじろう)



近畿大学産業理工学部准教授。博士（医学）。

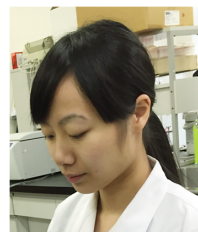
■略歴 1975年福岡県に生まる。99年九州大学農学部農芸化学科卒業。2001年同大学大学院生物資源環境科学研究科修士課程修了。05年同大学大学院医学系学府博士課程修了。05年米国ノースカロライナ大学博士研究員。08年浜松医科大学助教を経て12年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞老化、がん化、分化、アポトーシスなどの細胞運命決定機構の解明。特に最近では、細胞老化、がん化に関与する長鎖非コードRNAに注目し、その探索、機能解析を行っている。ヒトの疾患治療薬の分子標的やバイオマーカーとなりうる長鎖非コードRNAを見つけたい。

■ウェブサイト <http://blog.cc.fuk.kindai.ac.jp/biochem/labo/kotake/>

■趣味 三線、アウトドア活動。

●苗村 円佳 (なえむら まどか)



近畿大学大学院産業理工学研究科博士後期課程1年。

■略歴 1990年大阪府に生まる。13年近畿大学産業理工学部生物環境化学科卒業。15年同大学大学院産業理工学研究科修士課程修了を経て同年より現職。

■研究テーマと抱負 長鎖非コードRNAの機能と作用機序の解明。特に細胞周期に関与する長鎖非コードRNAに着目し、それらの機能解析を行っている。少しでも多くの長鎖非コードRNAの機能を解明したい。

■趣味 ドライブ、温泉巡り。

●紫 千大 (むらさき ちひろ)

近畿大学大学院産業理工学研究科修士課程2年。

■略歴 1991年福岡県に生まる。2014年近畿大学産業理工学部生物環境化学科卒業。同年より現職。

■研究テーマと抱負 がん細胞に特異的に発現している長鎖非コードRNAの機能と作用機序の解明。特に細胞死に関与する長鎖非コードRNAに注目し、その作用機序と発現制御の解明を目指している。

■趣味 映画鑑賞、ジョギング。