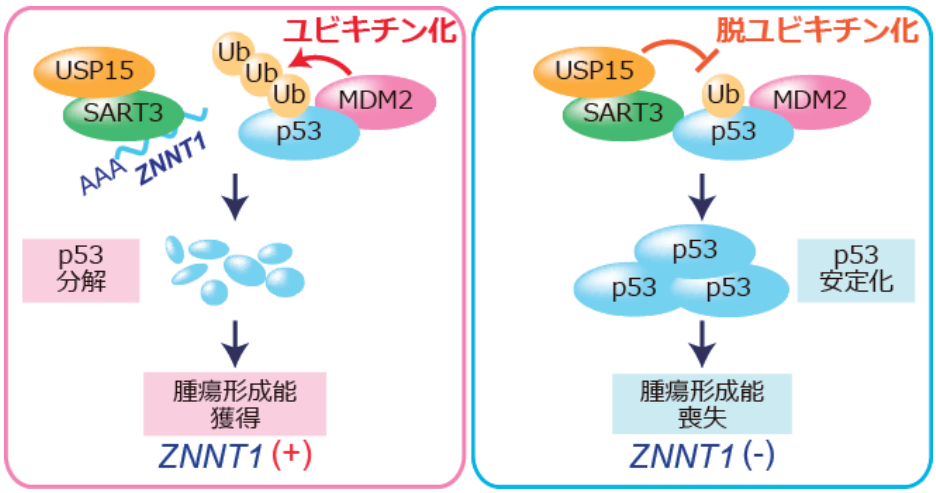
38　RNAから視たp53制御機構の解明	谷上　賢瑞

【目的】ヒトゲノムの大部分の領域からタンパク質をコードしないノンコーディング RNA（ncRNA）が転写されていることが知られている。かつてはその大半がジャンクだと考えられてきたが、増殖・発生・分化・幹細胞性の維持といった様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。中でも 200 塩基以上の長鎖 ncRNA は種類も極めて多様であり、それぞれ多様な特性を持っていると考えられている。また長鎖 ncRNA（lncRNA）は DNA や RNA、タンパク質などと相互作用することで、転写やスプライシング、翻訳など、多くの機能を有していることが報告されており、その機能破綻ががん化を引き起こすことが明らかになってきた。我々は、*UPAT* や *ASBEL* といった新規 lncRNA が大腸癌や卵巣癌の腫瘍形成能を制御することを見出し、その機能解析を行ってきた。研究内容をさらに発展させ、lncRNA *ZNNT1* が RNA 認識モチーフ（RNA recognition motif : RRM）を 2 つ有する核内 RNA 制御因子である SART3 と結合し、p53 依存的に大腸癌の腫瘍形成能を維持していることを見出した。本研究課題では、*ZNNT1*-SART3 複合体によるユビキチン - プロテアソーム機構を介した p53 制御機構を明らかにすることより、*ZNNT1*-SART3 複合体が有する p53 依存的な腫瘍形成能維持機構の分子メカニズムを解明する。

【方法及び結果】まず、HCT116 細胞において *ZNNT1* が p53 にどのような影響を及ぼすのかを調べた。qPCR 解析およびウェスタンブロッティング解析の結果、*ZNNT1* の発現抑制によって、p53 mRNA には影響がなく、p53 タンパク質量が増加することを見出した。また、*ZNNT1* の発現を抑制すると、p53 のユビキチン化が抑えられることが明らかとなった。続いて、SART3 が *ZNNT1* による大腸腫瘍形成能にどのような影響を与えるのかを確認した。SART3 の発現を抑制すると *ZNNT1* の発現抑制による HCT116 細胞株の増殖抑制及び腫瘍形成能の減少が緩和された。また、*ZNNT1* の発現抑制による p53 タンパク質の増加が、SART3 の発現抑制によって緩和されることを見出した。さらに、*ZNNT1* の発現を抑制すると、SART3 と p53 の結合が増加することを見出した。次に、SART3 による p53 タンパク質の安定化機構を明らかにするために、SART3 結合タンパク質の同定を進めた結果、脱ユビキチン化酵素 USP15 が SART3 に結合することが明らかとなった。そこで我々は、*ZNNT1* ノックダウン細胞において、SART3 が USP15 を p53 にリクルートするのではないかと仮説を立て、USP15 の発現を抑制すると、*ZNNT1* ノックダウンによる p53 タンパク質の増加が抑えられることを明らかにした。また USP15 の発現抑制によって、*ZNNT1* ノックダウンによる HCT116 細胞の増殖抑制が緩和されることが明らかとなった。以上の結果から、*ZNNT1* が SART3-USP15 複合体と p53 タンパク質の結合を阻害することによって、p53 タンパク質の分解を促進していると考えられる（図）。

ZNNT1 は SART3-USP15 複合体を介して p53 を不安定化し、大腸癌の腫瘍形成能を制御する



38. RNA から視た p53 制御機構の解明

谷上　賢瑞

東京大学 アイソトープ総合センター

Key words : long non-coding RNA *ZNNT1*, SART3, p53, USP15, tumorigenicity

緒　言

タンパク質をコードしない RNA のうち、200 塩基以上の RNA を長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) と総称し、多くの哺乳類ゲノムに保存されている［1］。多くの lncRNA は、組織の発生時期や細胞タイプに応じて発現が制御されている。近年、lncRNA が増殖、分化、胚形成、神経発生、幹細胞の多能性など、多様な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことが明らかとなってきた［2］。また lncRNA は、クロマチンやゲノム構造のリモデリング、RNA の安定化、転写制御、タンパク質翻訳後修飾、タンパク質分解など、多くの機能を有していることが報告されている［3］。さらに、大腸癌をはじめとするいくつかの癌では、多くの lncRNA の発現が調節され、一部の lncRNA が癌化または癌抑制機能を有することが明らかになっている［3, 4］。しかし、個々の lncRNA が腫瘍の発生や進行に寄与する詳細なメカニズムについては、未だ明らかになっていない点が多く残されている。

癌抑制遺伝子である p53 は、転写因子としての役割がよく知られている［5］。p53 は、DNA 損傷、癌遺伝子発現、低酸素などのシグナルに応答し、細胞周期停止、老化、アポトーシスを引き起こす細胞ストレスセンサーとしての機能を有している［5］。さらに、p53 はオートファジー、代謝の恒常性、幹細胞の多能性など、他の生物学的プロセスも制御している。これらの p53 の機能に、p53 による標的遺伝子群の転写活性化が重要であると考えられているが、一部の p53 の機能は転写活性に依存しない可能性がある。また、p53 は不安定なタンパク質であり、生体内における半減期は 20 分未満である。p53 タンパク質の安定性は、ユビキチン - プロテアソーム機構によって制御されていることが知られており、Mdm2 は p53 の分解や機能停止を促進する最も重要なユビキチンリガーゼである［5］。mRNA、miRNA、circRNA、lncRNA などの RNA 分子も、p53 の発現や機能を制御することが報告されている［6］。さらに、hnRNPK や hnRNPL などの RNA 結合タンパク質（RBP）も p53 と関連していることが示されており、p53 の安定性や機能が RNA や RBP によって調節されていることが示唆されてきたが、RNA による p53 制御機構の多くは未だ不透明である。

我々は、*UPAT* や *ASBEL* といった新規 lncRNA が大腸癌や卵巣癌の腫瘍形成能を制御することを見出し、その機能解析を行ってきた［7, 8］。研究内容をさらに発展させ、lncRNA *ZNNT1* が RNA 認識モチーフ（RNA recognition motif : RRM を 2 つ有する核内 RNA 制御因子である SART3 と結合し、p53 依存的に大腸癌の腫瘍形成能を維持していることを見出した。SART3 は核内構造体であるカハルボディに存在し、転写、pre-mRNA スプライシング、スプライソソームのアセンブリ、mRNA 合成などを制御することにより、幹細胞の増殖と分化、胚発生に関与している［9］。また SART3 は、幹細胞だけでなく、大半の癌組織の核内においても高発現しており、免疫療法の標的抗原としても研究されている［9］。本研究課題では、*ZNNT1*-SART3 複合体によるユビキチン - プロテアソーム機構を介した p53 制御機構を明らかにすることより、*ZNNT1*-SART3 複合体が有する p53 依存的な腫瘍形成能維持機構の分子メカニズムを解明する。

方法および結果

1. *ZNNT1* の発現を抑制すると p53 タンパク質が安定化する

p53 タンパク質は、ユビキチン - プロテアソーム機構を介して、制御されていることが知られている。我々は、HCT116 細胞において *ZNNT1* が p53 にどのような影響を及ぼすのかを調べた。qPCR 解析およびウェスタンブロッティング解析の結果、*ZNNT1* の発現抑制によって、p53 mRNA には影響がなく、p53 タンパク質量が増加することを見出した（図 1A)。続いて、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド（CHX）を用いたタンパク質分解実験によって、*ZNNT1* のノックダウンが p53 タンパク質を安定化していることを明らかにした（図 1B)。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理すると、*ZNNT1* ノックダウンによる p53 タンパク質増加が抑制されることが明らかとなった（図 1C)。さらに、*ZNNT1* の発現を抑制すると、p53 のユビキチン化が抑えられることが明らかとなった（図 1D)。これらの結果から、大腸癌細胞において *ZNNT1* は、p53 ユビキチン化とプロテアソーム依存的な p53 分解を促進することで、p53 タンパク質を不安定化している可能性が見出された。

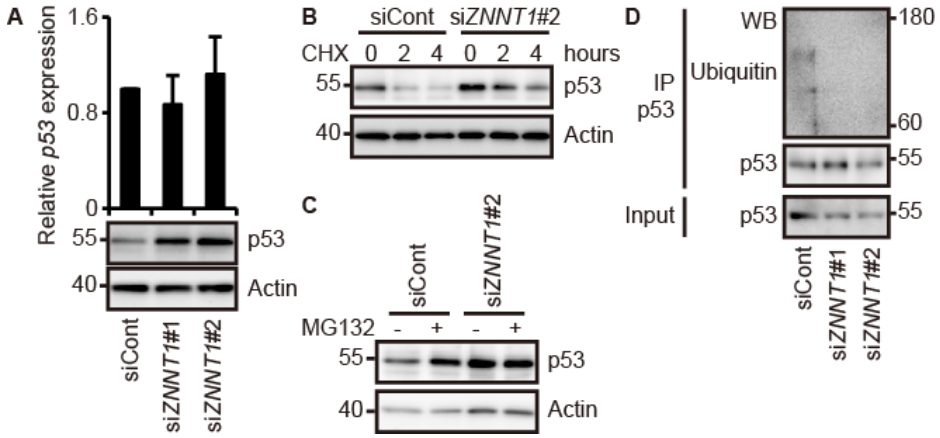


図 1. *ZNNT1* の発現抑制は p53 の分解とユビキチン化を阻害する

A) *ZNNT1* の発現を抑制した HCT116 細胞株における p53 の mRNA レベル（上段）とタンパク質レベル（下段）を qRT-PCR（上段）及びウェスタンブロット法（下段）を用いて測定した。

B、C) *ZNNT1* の発現を抑制し、CHX（B）及び MG132（C）を添加してタンパク質合成及びプロテアソーム機能を阻害し、p53 のタンパク質レベルをウェスタンブロット法により測定した。

D) *ZNNT1* の発現を抑制した HCT116 細胞株における p53 のユビキチン化レベルを測定した。

2. *ZNNT1* と SART3 の結合が p53 タンパク質の不安定化に重要である

次に、SART3 が *ZNNT1* による大腸癌の増殖及び腫瘍形成能にどのような影響を与えるのかを確認した。まず、siRNA を用いて SART3 の発現を抑制すると *ZNNT1* の発現抑制による HCT116 細胞株の増殖抑制がレスキューされることを見出した（図 2A)。さらに、レンチウィルスによって *ZNNT1* および SART3 を恒常的に発現抑制した HCT116 細胞株を作製し、ヌードマウスを用いて腫瘍形成能を確認した（図 2B)。結果、SART3 の発現を抑制すると、*ZNNT1* ノックダウンによる腫瘍形成能の減少が緩和された。またこれまでの結果と一致して、*ZNNT1* ノックダウンによる p53 タンパク質の増加が、SART3 の発現抑制によって緩和されることが明らかとなった（図 2C)。一方、SART3 の発現抑制だけでは、*ZNNT1* や p53 の発現に影響を及ぼさなかった。また *ZNNT1* のノックダウンによって、SART3 の発現には変化は生じなかった。さらに、*ZNNT1* の発現を抑制すると、SART3 と p53 の結合が増加することを明らかにした（図 2D)。これらの結果から、*ZNNT1* は、SART3 による p53 の安定化を阻害することで、大腸癌の腫瘍形成能を制御している可能性を見出した。

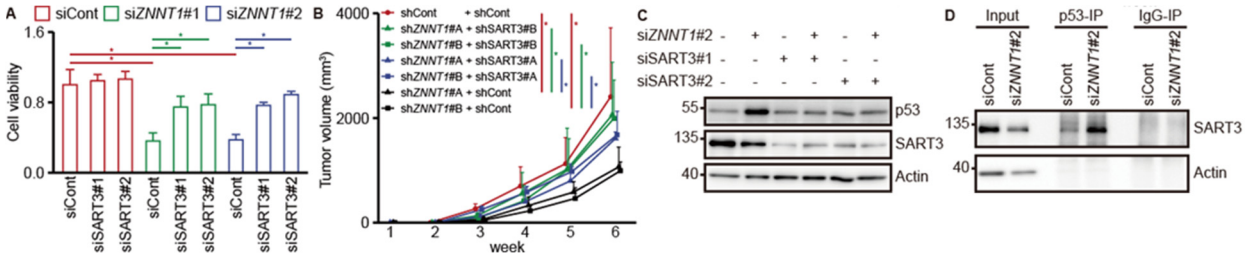


図 2. *ZNNT1* は、SART3 と p53 の結合を阻害することで p53 の安定性を制御している

A) *ZNNT1* 及び SART3 の発現を抑制した HCT116 細胞の細胞数を CellTiter-Glo アッセイを用いて測定した。*p＜0.05（unpaired two-tailed t-test）。

B) レンチウィルスを用いて恒常的に *ZNNT1* 及び SART3 の発現を抑制した HCT116 細胞株のヌードマウスにおける増殖を測定した。*p＜0.05（unpaired two-tailed t-test）。

C) *ZNNT1* 及び SART3 の発現を抑制した HCT116 細胞における p53 タンパク質量をウェスタンブロット法により測定した。

D) *ZNNT1* の発現を抑制することで SART3 と p53 の結合が変化するのかを、免疫沈降 - ウェスタンブロット法を用いて確認した。

3. *ZNNT1* は SART3-USP15 複合体による p53 タンパク質安定化を阻害する

SART3 による p53 タンパク質の安定化機構を明らかにするために、質量分析を用いた SART3 結合タンパク質の同定を進めた結果、脱ユビキチン化酵素である USP15 が SART3 に結合することが明らかとなった。また、SART3 抗体と USP15 抗体を用いた免疫沈降 - ウェスタンブロット解析によって、HCT116 細胞株において SART3 と USP15 が結合していることが実証された。SART3 が USP15 のユビキチン化 H2B への結合を促進し、H2B を脱ユビキチン化することが報告されている。そこで我々は、*ZNNT1* ノックダウン細胞において、SART3 が USP15 を p53 にリクルートするのではないかと仮説を立てた。我々は、USP15 の発現を抑制すると、*ZNNT1* ノックダウンによる p53 タンパク質の増加が抑えられることを明らかにした（図 3A）。また USP15 の発現抑制によって、*ZNNT1* ノックダウンによる HCT116 細胞の増殖抑制が緩和されることが明らかとなった（図 3B）。

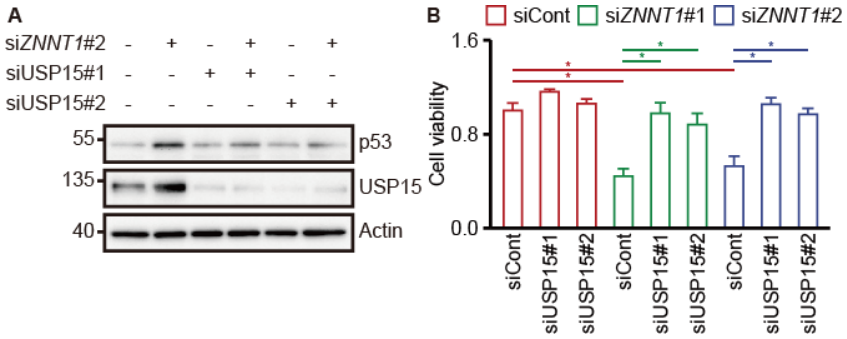


図 3. *ZNNT1* は SART3-USP15 複合体と p53 の結合を阻害することで p53 の安定性を制御している

A) *ZNNT1* 及び SART3 の発現を抑制した HCT116 細胞における p53 タンパク質量をウェスタンブロット法により測定した。

B) *ZNNT1* 及び USP15 の発現を抑制した HCT116 細胞の細胞数を CellTiter-Glo アッセイを用いて測定した。*p＜0.05（unpaired two-tailed t-test）。

考　察

本研究において、我々は大腸癌の腫瘍形成能に寄与する lncRNA の同定を試みた。結果、lncRNA *ZNNT1* が大腸癌組織において高発現しており、発現抑制によって野生型 p53 を有する大腸癌細胞の増殖および腫瘍形成能が抑制されることを見出した。また、*ZNNT1* がユビキチン - プロテアソーム機構を介して、p53 タンパク質を不安定化していることを明らかにした。本課題の推進によって、*ZNNT1* が p53 タンパク質の分解を制御することで大腸癌細胞の増殖と腫瘍形成能を制御していることが明らかになった。

我々は、質量分析を用いて *ZNNT1* が SART3 と結合することを見出した。SART3 は U4 snRNP などと結合し、RNA スプライシング機構のリサイクリング因子として機能することが知られている。また我々は *ZNNT1* の発現抑制によって、SART3 と p53 の結合が増加することを見出した。さらに、*ZNNT1* の発現抑制によって引き起こされる p53 タンパク質の増加が、SART3 の発現抑制によって阻害されることを見出した。これらの結果により、大腸癌細胞において、SART3 が p53 と結合することで p53 量を制御し、*ZNNT1* がこの相互作用を阻害することで p53 タンパク質の安定化に寄与していることが示唆される。さらに、SART3 のノックダウンによって、*ZNNT1* ノックダウンによる大腸癌細胞の増殖と腫瘍形成能の抑制が、緩和されることを明らかにした。以上の結果より、*ZNNT1* が、SART3 依存的な p53 の安定化を制御することで、大腸癌の腫瘍形成能を制御していることが明らかとなった。

p53 タンパク質は、ユビキチン化および脱ユビキチン化によって、その安定性が制御されている。我々は、SART3 が脱ユビキチン化酵素 USP15 と結合していることを見出した。そこで我々は、*ZNNT1* 非存在下において、SART3 が USP15 を p53 にリクルートすると考えた。実際、*ZNNT1* の発現抑制によって引き起こされる p53 タンパク質の増加や細胞増殖の低下が、USP15 のノックダウンによってレスキューされることが明らかになった。p53 タンパク質は通常、MDM2 などによってユビキチン化制御を受けている。*ZNNT1*-SART3-USP15 複合体がユビキチン化酵素による p53 ユビキチン化制御にどのような影響を与えているかはまだ不透明である。

我々は、*ZNNT1* が野生型 p53 を有する大腸癌細胞の腫瘍形成能を制御していることを見出した［10］。また、*ZNNT1* が SART3-USP15 複合体と p53 タンパク質の結合を阻害することによって、p53 タンパク質の分解を促進していることを見出した［10］。本結果は、大腸癌治療に新たな示唆を与えるものと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の推進にあたり、東京大学定量生命科学研究所の秋山徹教授には様々なご支援を頂きました。また東京大学アイソトープ総合センターの秋光信佳教授にはさまざまなご助言やサポートを頂きました。ここに謝辞を申し上げます。

文　献

1） Wang K C, Chang H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Mol Cell 2011 Sep 16;43(6):904-14. PMID: 21925379 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.

2） Batista P J, Chang H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell 2013 Mar 14;152(6):1298-307. PMID: 23498938 DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.012.

3） Taniue K, Akimitsu N. The Functions and Unique Features of LncRNAs in Cancer Development and Tumorigenesis. Int J Mol Sci 2021 Jan 10;22(2):632. PMID: 33435206 DOI: 10.3390/ijms22020632.

4） Takahashi, K, Taniue K, Ono Y, Fujiya M, Mizukami Y, Okumura T. Long Non-Coding RNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer. Front Mol Biosci 2021 Nov 8;8:717890. PMID: 34820419 DOI: 10.3389/fmolb.2021.717890.

5） Levine A J, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. Nat Rev Cancer 2009 Oct;9(10):749-58. PMID: 19776744 PMCID: PMC2771725 DOI: 10.1038/nrc2723.

6) Jain A K. Emerging roles of long non-coding RNAs in the p53 network. RNA Biol 2020 Nov;17(11):1648-1656. PMID: 32432959 DOI: 10.1080/15476286.2020.1770981
7) Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Iwasaki K, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Hiyoshi M, Kitayama J, Negishi L, Kawasaki Y, Akiyama T. Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1. Proc Natl Acad Sci U S A 2016 Feb 2;113(5):1273-8. PMID: 26768845 DOI: 10.1073/pnas.1500992113.
8) Taniue K, Kurimoto A, Takeda Y, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Yuki K, Katsuhiko S, Akiyama T. ASBEL -TCF3 complex is required for the tumorigenicity of colorectal cancer cells. Proc Natl Acad Sci 2016 Nov 8;113(45):12739-12744. PMID: 27791078 DOI: 10.1073/pnas.1605938113.
9) Whitmill A, Timani K A, Liu Y, He J J Tip110: Physical properties, primary structure, and biological functions. Life Sci 2016 Mar 15;149:79-95. PMID: 26896687 DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.062.
10) Taniue K, Oda T, Hayashi T, Kamoshida Y, Takeda Y, Sugawara A, Shimoura Y, Negishi L, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Kawamura Y, Goshima N, Akimitsu N and Akiyama T. LncRNA ZNNT1 induces p53 degradation by interfering with the interaction between p53 and the SART3-USP15 complex. PNAS nexus 2023 Jul 4;2(7):pgad220. PMID: 37448957 DOI: 10.1093/pnasnexus/pgad220.