

# 学位論文

大腸癌細胞の造腫瘍性における  
長鎖非コード RNA *UPAT* の役割  
(The role of long non-coding RNA *UPAT*  
in tumorigenicity of colon cancer cells)

平成26年12月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

杉政 宏信

## Abstract

近年、long non-coding RNA (lncRNA) が増殖や、分化、胚発生、神経発生及び幹細胞性の維持において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。lncRNA は幅広い機能を持ち、クロマチンリモデリング、転写、スプライシング、mRNA 輸送、翻訳といった多くの遺伝子発現制御機構に関わっていることが報告されている。また、lncRNA が癌の発生や進行に重要であることも示されつつある。

本研究において、大腸癌細胞の造腫瘍性に必要な lncRNA のスクリーニングを行い、lncRNA *UPAT* (UHRF1 Protein Associated Transcript) を見出した。*UPAT* の詳細な機能解析を行った結果、*UPAT* はエピゲノム制御因子 UHRF1 に結合し、 $\beta$ -TrCPs を介したユビキチン化を阻害することで UHRF1 タンパク質を安定化することが明らかになった。これまでに、UHRF1 は大腸癌を含む多くの癌で発現亢進し、癌細胞の増殖と生存に重要であることが報告されている。さらに、*UPAT*-UHRF1 経路が SCD1 及び SPRY4 の発現を制御することで大腸癌細胞の生存に寄与していることを明らかにした。

本研究において、新規 lncRNA が転写関連因子のユビキチン化を阻害し、タンパク質レベルで安定化することにより癌細胞の増殖を制御していることが明らかとなった。さらに、*UPAT*-UHRF1 経路は大腸癌の新規治療分子標的として有効である可能性が示唆された。

## Abstract

Recent studies suggest that long non-coding RNAs (lncRNAs) play critical roles in a diverse set of biological processes, including proliferation, differentiation, embryogenesis, neurogenesis and stem cell pluripotency. It has been also reported that many lncRNAs regulate gene expression and various post-transcriptional processes, including splicing, transport, translation and degradation of mRNA. Furthermore, increasing evidence has shown that many lncRNAs play critical roles in tumor development and progression.

I attempted to identify lncRNAs critical for the tumorigenicity of colon tumor cells. I have found that a lncRNA termed *UPAT* (UHRF1 Protein Associated Transcript) is required for the survival and tumorigenicity of colorectal cancer cells. It has also been shown that *UPAT* interacts with and stabilizes the epigenetic factor UHRF1 by interfering with its  $\beta$ -TrCP-mediated ubiquitination. It has been reported that UHRF1 is overexpressed in various tumors, including colon cancer, and plays a critical role in the proliferation and survival of tumor cells. Furthermore, I demonstrate that both *UPAT* and UHRF1 regulate the expression of Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) and Sprouty 4 (SPRY4), which play critical roles in the survival of colon tumor cells.

In the present study, it is shown that a novel lncRNA regulates proliferation of colon tumor cells by interacting with an epigenetic factor and interfering with its ubiquitination and degradation. Results from several experiments indicate that the *UPAT*-UHRF1 axis may be a promising molecular target for colon cancer therapies.

## 目次

第1章 序論	1
1.1 long non-coding RNA 研究の変遷	1
1.2 エピゲノム制御因子 UHRF1	2
1.3 ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解と E3 ユビキチンライゲース $\beta$ -TrCP	3
1.4 大腸癌細胞の造腫瘍性に重要な lncRNA の探索と機能解析	4
第2章 材料と方法	5
2.1 細胞培養	
2.2 抗体	
2.3 レンチウイルス作製	
2.4 造腫瘍性アッセイ	
2.5 RNAi	
2.6 Cell Titer-Glo アッセイ	
2.7 アポトーシス	
2.8 RNA 抽出、逆転写、qRT-PCR	
2.9 コンストラクト作製、トランスフェクション	
2.10 分画	
2.11 RNA プルダウンアッセイ、MS 解析	
2.12 ウェスタンブロット	
2.13 RIP アッセイ	
2.14 共免疫沈降アッセイ	

2.15	細胞内ユビキチン化アッセイ	
2.16	UHRF1 相互作用因子の精製	
2.17	シーケンスデータ解析	
第3章	結果	
3.1	<i>UPAT</i> は大腸癌細胞の造腫瘍性に必要である	17
3.2	大腸癌細胞において <i>UPAT</i> は UHRF1 と結合する	19
3.3	<i>UPAT</i> は UHRF1 を安定化することにより、大腸癌細胞 の増殖及び生存に寄与する	20
3.4	<i>UPAT</i> は $\beta$ -TrCP1/2 を介した UHRF1 のユビキチン化及び 分解を阻害する	21
3.5	UHRF1 のユビキチン化部位は Lys-663 残基である	22
第4章	考察	23
第5章	結論	29
Figure		31
引用文献		63
謝辞		69

## 第1章 序論

### 1.1 long non-coding RNA 研究の変遷

1990年代に行われたヒトゲノムプロジェクトによって、ヒトゲノムの全容が明らかとなった結果、タンパク質をコードする遺伝子の数はわずか 21,000 ほどであること、全ゲノムに対してタンパク質をコードする領域はわずか 1%程度であることが判明した<sup>1-3</sup>。このことから、タンパク質をコードしない領域 (non-coding region) が何らかの重要な役割を担っていると考えられた。近年、転写産物の総体トランスクリプトームの解析が行われるようになった結果、ゲノムのほぼ全体から膨大な種類のタンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA, ncRNA) が転写されていることが明らかになった<sup>4, 5</sup>。

ncRNA は大きく低分子 ncRNA、長鎖 ncRNA の 2 つに分類される。低分子 ncRNA には転移 RNA (tRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、核内小分子 RNA (snRNA)、核小体 RNA (snoRNA)、PIWI 結合 RNA (piRNA) などが、長鎖 ncRNA にはリボソーム RNA (rRNA) や long non-coding RNA (lncRNA) などが含まれる。タンパク質合成経路に関わる tRNA や rRNA に加え、遺伝子発現制御機能を有する miRNA や piRNA、RNA スプライシング複合体を構成する snRNA、核小体において rRNA の成熟に機能する snoRNA などの ncRNA は、その作用機序も含めて詳細な機能解析が進んできた<sup>6-10</sup>。しかしその一方で、lncRNA は他の ncRNA と比較して極めて多様であり、その機能解析は遅れてきた。しかし近年になり、精力的に lncRNA を対象とした研究が行われ、いくつもの新たな知見が蓄積されその重要性が明らかになりつつある (Figure 1)。また、lncRNA の発現は細胞種や発生段階によって厳密に制御されており<sup>11-13</sup>、増殖・分化・胚発生・神経発生・幹細胞性の維持といった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<sup>14-19</sup>。また、いくつかの lncRNA はクロマチンリモデリング複合体をリクルートすることで遺伝子発現を制御

していることが知られている<sup>20</sup>。lncRNA *Xist* は X 染色体をコーティングし、PRC2 (polycomb repressive complex 2、ヒストン H3K27 のトリメチル化を誘引) をリクルートすることで X 染色体不活性化を引き起こす<sup>21</sup>。また、*HOTAIR* は PRC2 やヒストン H3K4 のジメチル化を誘引する LSD1 と結合する<sup>22, 23</sup>。さらに、転写調節因子の活性を制御することで遺伝子の転写に関わる lncRNA も多く報告されている<sup>14-16, 24-26</sup>。lncRNA の中には遺伝子の転写後調節にも関わっているものもあり、mRNA スプライシングや細胞質輸送、mRNA 不安定化、翻訳に関与している<sup>15, 16, 26</sup>。

近年、lncRNA と癌の関連についての報告も増加してきた (Figure 2)<sup>27</sup>。*HOTAIR* は乳癌において発現が亢進し、PRC2 を介して浸潤や転移を促進している<sup>28</sup>。また、p53 によって発現誘導される *lncRNA-p21* は転写抑制因子として働き、p53 依存的なアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしている<sup>29</sup>。さらに本研究室で発見された *ASBEL* は癌抑制遺伝子 *ANA/BTG3* mRNA と 2 本鎖を形成することで mRNA を核内に係留し、翻訳を抑制することで卵巣癌の造腫瘍性に必要である<sup>30</sup>。

## 1.2 エピゲノム制御因子 UHRF1

UHRF1 (ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1) はエピゲノム制御因子であり、DNA のメチル化状態やヒストンの修飾を制御することで遺伝子の転写に関与している<sup>31, 32</sup>。また、UHRF1 は E3 ユビキチンライゲース活性を持ち、ヒストンや DNMT1 (DNA methyltransferase 1) を基質とし、クロマチン構造や DNMT1 の安定性を制御する<sup>33-37</sup>。UHRF1 は細胞増殖や発生といった生物学的プロセスにおいて重要な役割を担っていることが知られている。また、大腸癌、乳癌、膀胱癌、前立腺癌、肺癌において発現亢進しており、癌細胞の増殖と生存に寄与していることが既に報告されている<sup>38-42</sup>。

### 1.3 ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解と E3 ユビキチンライゲース $\beta$ -TrCP

ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解は細胞周期制御、シグナル伝達、免疫応答といった多くの生物学的プロセスの制御に関わっていることが報告されている。タンパク質のユビキチン化はユビキチン活性化酵素 (E1-UBA, ubiquitin activating enzyme), ユビキチン結合酵素 (E2-UBC, ubiquitin conjugating enzyme) 及びユビキチンライゲース (E3, ubiquitin ligase) によって行われ、E3 ユビキチンライゲースは基質特異性に重要であることが知られている<sup>43</sup>。

E3 ユビキチンライゲースである  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 は細胞周期亢進や分化を初めとした多くの生物学的プロセスの制御に関わっていることが示されている。既に知られている  $\beta$ -TrCP ファミリーの基質としては、 $\beta$ -catenin, Cdc25, REST, Mdm2 及び I $\kappa$ B $\beta$  などのタンパク質が知られており、癌との関連も報告されている<sup>44-48</sup>。

### 1.4 大腸癌細胞の造腫瘍性に重要な lncRNA の探索と機能解析

近年、日本において大腸癌は罹患率・死亡率ともに上昇傾向にあり、2008-2009年の部位別癌死亡率では男性では肺癌・胃癌に続いて3位、女性では1位となっており、更なる治療法の改善が待ち望まれている。本研究では、大腸癌細胞の造腫瘍性に重要な lncRNA を同定し、その機能解析を行うことで新規治療法確立の足掛かりを得ることを目標とした。具体的には、大腸癌細胞株 CCSC#P 及び CCSC#P からサブクローン化することによって得られた造腫瘍性の著しく低い細胞株 CCSC#11 における遺伝子発現プロファイルを RNA-seq 解析を用いて比較し、CCSC#11 細胞において発現減少している lncRNA を抽出した。続いて、得られた lncRNA の一つである *UPAT* (UHRF1 Protein Associated Transcript) が大腸癌細胞の造腫瘍性に必須であることを明らかにした。また、*UPAT* が UHRF1 と結合して  $\beta$ -TrCP 依存的な



UHRF1 のユビキチン化及び分解を阻害することで、大腸癌細胞の増殖と生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、UPAT-UHRF1 経路が、SCD1 (*Stearoyl-CoA desaturase 1*) や SPRY4 (*Sprouty 4*) の発現を促進することで大腸癌細胞の生存に寄与していることを明らかにした。

本研究において見出した UPAT-UHRF1 経路は大腸癌治療の有望なターゲットである可能性が高いと考えられる。

## 第2章 材料と方法

### 2.1 細胞培養

CCSC#P 細胞は Celprogen から購入した (San Pedro, CA, Human colon cancer stem cell, Cat. #36112-39, Lot. #710011-05)。CCSC#P 及び CCSC#11 細胞は DMEM/F12 に 10%牛胎児血清を添加した培地で培養した。HCT116 細胞 (ATCC) は、McCoy's Medium (Sigma) に 10%牛胎児血清を添加した培地で培養した。DLD1 細胞(ATCC) は、RPMI1640 (NISSUI) に 10%牛胎児血清を添加した培地で培養した。HaCaT (ATCC) 及び 293FT 細胞 (ATCC) は DMEM (NISSUI) に 10%牛胎児血清を添加した培地で培養した。細胞培養は全て 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。

### 2.2 抗体

抗 Flag (F3165) 抗体及び抗 Actin (A-2066) 抗体は Sigma から購入した。抗 UHRF1 (612264) 抗体及び抗 Lamin A/C (612162) 抗体は BD Biosciences から購入した。抗  $\alpha$ -tubulin (CP-06) 抗体は CALBIOCHEM から、抗 HA (16B12) 抗体は COVANCE から、抗 Myc (9E10) 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。2次抗体と ECL-plus は GE Gealsthcare から購入した。

### 2.3 レンチウイルス作製

H1 プロモーターの下流に shRNA を組み込んだレンチウイルスベクター (CS-Rfa-CG) は pCAG-HIV-gp ベクター及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev ベクターと共に 293FT 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションには polyethylenimine 'MAX' (PEI, Polyscience, Inc. Cat. 24765) を用いた。すべての

プラスミドベクターは三好 浩之先生 (RIKEN BioResource Center, Japan) からご厚意により提供して頂いた。ウイルスは 25,000 rpm 90 min の超遠心 (SW28 roter, Beckman) によって精製し、感染効率は GFP の発現量を指標として揃えた。shRNA の配列を以下に示す。

UPAT#A.....CTCCAGAGGCTGTGAGAAACA

UPAT#B.....GTCTCCATGCCTAGCTTTAAA

UPAT#C.....GGGCATGGGTATGCTGTAATC

## 2.4 造腫瘍性アッセイ

*UPAT* をターゲットとする shRNA を発現するレンチウイルスを HCT116 または CCSC#P 細胞に感染させた。感染から 3 日後に細胞を 6 週齢の免疫不全マウス (BALB/cAJcl-nu/nu, CLEA Japan) に皮下注射し、経過観察及び腫瘍の大きさを測定した。すべての動物実験は the Animal Ethics Committee of the University of Tokyo のガイドラインに基づいて行われた。

## 2.5 RNAi

Stealth siRNA (UHRF1,  $\beta$ -TrCP1,  $\beta$ -TrCP2) は Invitrogen から購入した。*UPAT* (NR\_002773), NR\_027161, NR\_015379, NR\_002795 に対する siRNA は Dharmacon から購入した。AOC1, AOC2, AOC3, SCD1, SPRY4, PGM1, GPRC5A に対する siRNA は Ambion から購入した。細胞へのトランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用した。コントロールとしては Validated Stealth negative control RNAi duplex with MED GC content #2 (Invitrogen), siGENOME NON-Targeting siRNA #3 (Dharmacon, D-001210-03), Silencer Select negative control siRNA #1 (Ambion) を用いた。siRNA の配列を以

下に示す。

UPAT (NR\_002773)#1.....GGTAAGGCATCCTGGCAGA

UPAT (NR\_002773)#2.....CCAGAGGTATGGAAACAAA

NR\_027161.....GTTGCAAATTCGTGAAGAA

NR\_015379.....GCTTAATCCAGGAGACAAA

NR\_002795.....GAGCTGAGGACTCGGGAAA

AOC1#1.....CCGUGUUUCUCAUCGAGAUTT

AOC1#2.....CUUCAACUGUCUACAAUUATT

AOC2#1.....GGAUUUUUGAUGUUCGGUUTT

AOC2#2.....CCAGUACAGUGUGCAAGGATT

AOC3#1.....CCACCUUGCUCUACUAUGATT

AOC3#2.....AGACUAGUUUAUGAGAUAAATT

SCD1#1.....CCACCACUCCUUUCCCUAUTT

SCD1#2.....CCCUGUAUGGGAUCACUUUTT

SPRY4#1.....UGUGGAGAAUGACUACAUATT

SPRY4#2.....CAACGGCUCUUAGACCACATT

UHRF1#1.....GCCAGGTGGTCATGCTCAACTACAA

UHRF1#2.....TGGAGGACTTGTCTGACTCACTCTG

$\beta$ -TrCP2#1.....CAGTGGCCTACGAGATAATTCTATT

$\beta$ -TrCP1#2.....CCAACATGGGCACATAAACTCGTAT

## 2.6 Cell Titer-Glo アッセイ

細胞の生存率は、Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて細胞内の ATP レベルを測定することにより間接的に算出した。蛍光強度は Mithras LB 940 (Berthold) を用いて測定した。

## 2.7 アポトーシス

アポトーシスの検出には細胞表面へのフォスファチジルセリン (PS) の露出を指標とした。検出には Annexin V-Biotin Apoptosis Detection Kit (MBL) 及び Streptavidin-APC conjugates (S888, Invitrogen) を用いた。

## 2.8 RNA 抽出、逆転写、qRT-PCR

RNA の抽出には、Total RNA Isolation kit (MACHEREY-NAGEL) を用いた。抽出した RNA に対して DNase I (TAKARA) 処理し、PrimeScript RT-PCR Master Mix (TAKARA) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA の qPCR 解析には Syber Green PCR mastermix (Applied Biosystems) 及び LightCycler 480 (Roche Applied Science) を用いた。各 primer の配列を以下に示す。

UPAT\_Fw.....AAAGGAGGTGAGAGGGAATGT

UPAT\_Rev.....GCTGGGCACTGGGAGATAC

NR\_027161\_Fw.....CTGCCAGAGCCTGGAGTC

NR\_027161\_Rev.....CGTCGTCAGTTATCGCTTCTG

NR\_015379\_Fw.....CGGGTAACTCTTACGGTGGA

NR\_015379\_Rev.....ACCGGGTAGGGTCTGGTC

NR\_002795\_Fw.....GCTTTAGAGGCGCTGACATC

NR\_002795\_Rev.....GCTAAGCTCGGCTGTTGG

$\beta$ -Actin\_Fw.....CGTCACCAACTGGGACGACA  
 $\beta$ -Actin\_Rev.....CTTCTCGCGGTTGGCCTTGG  
U1\_Fw.....ATACTTACCTGGCAGGGGAG  
U1\_Rev.....CAGGGGGAAAGCGCGAACGCA  
AOC1\_Fw.....CGTGGTCTTTGAGCAGTTTCTT  
AOC1\_Rev.....TGTGGCTGTGTTGGGAATGT  
AOC2\_Fw.....GACTTCATCAACAATGAAACCCTCT  
AOC2\_Rev.....CGGAGCAAGAAGCCAACCTCT  
AOC3\_Fw.....CAATGAGACCATTGCTGGAA  
AOC3\_Rev.....TCCTCTGCATGTGGGATATG  
ASBEL\_Fw.....CTCCTGTGGACGCTTGTGT  
ASBEL\_Rev.....GGAGCCTCTCCTTTATGCAA  
UCA1\_Fw.....CGGGTAACTCTTACGGTGGA  
UCA1\_Rev.....ACCGGGTAGGGTCTGGTC  
SCD1\_Fw.....CACCTCTTCGGATATCGTCCTT  
SCD1\_Rev.....GGGAAAGGAGTGGTGGTAGTTG  
SPRY4\_Fw.....CCCCGGCTTCAGGATTTA  
SPRY4\_Rev.....CTGCAAACCGCTCAATACAG  
UHRF1\_Fw.....CCTGGCGTCACTCAAGGA  
UHRF1\_Rev.....TCCTGACAGCAGATACTGGA  
 $\beta$ -TrCP2\_Fw.....GACTCGGTGATTGAGGACAAGA  
 $\beta$ -TrCP2\_Rev.....ATGGCCTCTTTCTGGAGACG  
 $\beta$ -TrCP1\_Fw.....GCTATGAAGACTGAGAATTGTGTGG  
 $\beta$ -TrCP1\_Rev.....TGAGAGTTTCCGTTGCTTGG

## 2.9 コンストラクト作製、トランスフェクション

UPAT 及び UPAT の欠失変異体は PCR 法によって増幅し、pcDNA3.1(+) ベクターに挿入した。In Vitro Transcription には pBlueScript II SK+ベクターを用いた。UHRF1 及び UHRF1 の欠失変異体、 $\beta$ -TrCP1,  $\beta$ -TrCP2, その他の F-box protein family は PCR 法によって増幅し、pcDNA3.1(+)-Flag、pcDNA3.1(+)-HA 及び pcDNA3.1(+)-5xMyc ベクターに挿入した。細胞へのトランスフェクションには polyethylenimine 'MAX' (PEI, Polyscience, Inc. Cat. 24765) を用いた。クローニング用いた primer の配列を以下に示す。

### 【UPAT 関連】

UPAT\_Fw.....AGTGAATTCCAGCACCCACACCAGGACCCT

UPAT\_Rev.....GACGATATCGTTCAGTCACGCAGGATGGAGTG

Del1\_Rev.....AAACTCGAGCCTGCTACATCCAGGTCCAC

Del2\_Rev.....AAACTCGAGCCAAAGCCACTATCTATGTA

Del3\_Fw.....AGTGAATTCCAGCTTCCCCATTGCCCTCCGTAT

### 【UHRF1 関連】

UHRF1\_Fw.....AGGAAGCTTATGGGGGTTTTTGCTGTCCC

UHRF1\_Rev.....AGGCTCGAGTCACCGGCCATTGCCGTAGC

UTPS (736)\_Rev.....AGGCTCGAGTTACTGGAACGTCTCCTCCACTT

UTP (426)\_Rev.....AGGCTCGAGTTAGACGATGGTACATTCCCTTGG

UT (310)\_Rev.....AGGCTCGAGTTACTTCCGTCTCATGGGGTTGT

PSR (296)\_Fw.....AGGGAATTCCCGGGTGAAGGGAGCCCCAT

SR (381)\_Fw.....AGGGAATTCAGCGAGGTGGTACTGGCGGG

UHRF1\_400\_Fw.....AGGGAATTCGCCTCGGCCACATCGTCCTC

UHRF1\_621\_Fw.....AGGGAATTCCCAGAAGGCTACCTGGAAGC  
 UHRF1\_736\_Fw.....AGGGAATTCTGTATCTGCTGTCAGGAGCT  
 UHRF1\_636\_Fw.....AGGGAATTCGAGAACAGCAAGAGGGAGGA  
 UHRF1\_671\_Fw.....AGGGAATTCAGGGCCGGGTCCCCGCGCCG  
 UHRF1\_670\_Rev.....AGGCTCGAGTTAGCTCGGGCCACCTCCTGCC  
                   GACTTCCGCTT  
 UHRF1\_635\_Rev.....AGGCTCGAGTTACTTCTCTCGCTCTCGGTTGG  
                   CCAGGGCTTC  
 639KR\_Fw.....AGCGAGAGAAGGAGAACAGCAgGAGGGAGGAGGA  
                   GGAGCAGCA  
 639KR\_Rev.....TGCTGCTCCTCCTCCTCCCTCcTGCTGTTCTCCTTC  
                   TCTCGCT  
 657KR\_Fw.....TCGCGTCCCCCAGGACGGGCAgGGGCAAGTGGA  
                   GCGGAAGTC  
 657KR\_Rev.....GACTTCCGCTTCCACTTGCCCcTGCCCGTCCTGGG  
                   GGACGCGA  
 659KR\_Fw.....CCCCCAGGACGGGCAAGGGCAgGTGGAAGCGGAA  
                   GTCGGCAGG  
 659KR\_Rev.....CCTGCCGACTTCCGCTTCCACcTGCCCTTGCCCGT  
                   CCTGGGGG  
 661KR\_Fw.....GGACGGGCAAGGGCAAGTGGAgGCGGAAGTCGGC  
                   AGGAGGTGG  
 661KR\_Rev.....CCACCTCCTGCCGACTTCCGCcTCCACTTGCCCTTG  
                   CCCGTCC  
 663KR\_Fw.....GCAAGGGCAAGTGGAAGCGGAgGTCGGCAGGAGG



TGGCCCGAG

663KR\_Rev.....CTCGGGCCACCTCCTGCCGACcTCCGCTTCCACTTG  
CCCTTGC

**【F-box タンパク質関連】**

βTrCP1\_Fw.....AAACCATGGACCCGGCCGAGGCGGTGCTGC

βTrCP1\_Rev.....AAAGATATCTTATCTGGAGATGTAGGTGT

βTrCP2\_Fw.....AAACCATGGAGCCCGACTCGGTGATTGAGG

βTrCP2\_Rev.....AAAGATATCTTATCTAGAGATGTAAGTGT

FBXW2\_Fw.....AGGGAATTCATGGAGAGAAAGGACTTTGA

FBXW2\_Rev.....AGGCTCGAGTCAGCCGTGCTCCTTCCACAACA

FBXW4\_Fw.....AGGGAATTCATGGCGGCGGCGGCCGGGGAGGAG  
GAGGAG

FBXW4\_Rev.....AGGCTCGAGTCATGGGTTTTGAAAATCCAGGA

FBXW5\_Fw.....AGGGAATTCATGGACGAGGGCGGCACGCCCTGCT

FBXW5\_Rev.....AGGCTCGAGTCAGCGCCTCTGGCTGGCAAGCC

FBXW7A\_Fw.....AGGGAATTCATGAATCAGGAACTGCTCTC

FBXW7A\_Rev.....AGGGCGGCCGCTCACTTCATGTCCACATCAAAGT

FBXW8\_Fw.....AGGGAATTCATGGACGACTACAGCCTGGA

FBXW8\_Rev.....AGGCTCGAGCTAAACATGGTTATAGGGAAAGG

**【UPAT 標的遺伝子関連】**

SCD1\_Fw.....AAAGAATTCATGCCGGCCCACTTGCTGCA

SCD1\_Rev.....AAACTCGAGTCAGCCACTCTTGTAGTTTC

SPRY4\_Fw.....AGGGAATTCATGCTCAGCCCCCTCCCCAC

SPRY4\_Rev.....AGGCTCGAGTCAGAAAGGCTTGTCGGGCC

## 2.10 分画

細胞ペレットを Hypotonic buffer [10 mM HEPES pH7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Nonidet-P40 (NP40)] に懸濁し、氷上で 10 分静置した。次に、25 G 注射針とシリンジを用いて 10 回ピストン運動することで細胞膜を破壊した後、1,000 x G, 4°C, 10 min 遠心した。上清に対して更に 15,000 x G, 15 min 遠心して上清を取り、細胞質画分とした。沈殿に対しては Hypotonic buffer を用いて 2 度洗った後に、Hypertonic buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP40) に懸濁し、4°C, 30 min ローテーションした。その後、15,000 x G, 15 min 遠心して上清を取り、核画分とした。

## 2.11 RNA プルダウンアッセイ、MS 解析

Normal CTP と Biotin-14-CTP (Invitrogen) の量比を 4:1 とし、MAXIscript T3 Kit (Ambion) を用いてビオチン標識 RNA の合成を行った。HCT116 細胞の核画分 (200 µg) とビオチン標識 *UPAT* またはアンチセンス鎖 *UPAT* を混和し、4°C, 1 h インキュベートした後に Streptavidin-Coupled Dynabeads (Invitrogen) を用いて RNA 及び RNA に結合するタンパク質を回収した。結合タンパク質は SDS-PAGE により分離した後、銀染色またはウェスタンブロットティングにより検出した。銀染色には SilverQuest Silver Staining Kit (Invitrogen) を用いた。*UPAT* に特異的な泳動バンドを切り出し、そこに含まれるタンパク質を nanoflow LC system (Dina-2A, KYA Technologies) と linear ion trap-orbitrap mass spectrometer (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific) により同定した。タンパク質の同定には RefSeq のヒトタンパク質データベースを基とし、Mascot ver. 2.4.01 (Matrix Science) プログラムを

用いた。

## 2.12 ウェスタンブロット

細胞は Lysis buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.5% NP40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, protease inhibitors) を用いて溶解した。細胞溶解液は 15,000 x G, 4°C, 15 min 遠心した後 SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) に転写した。PVDF 膜は Tween 20 及び 5% スキムミルクを添加した TBS で 4°C, overnight ブロッキングした後に 1 次抗体で標識した。2 次抗体には HRP-conjugated secondary antibody (GE Healthcare) を用いた。検出には Enhanced Chemiluminescence Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare)、LAS-4000EPUVmini Luminescent Image Analyzer (GE Healthcare) を用いた。

## 2.13 RIP アッセイ

6 ウェルプレートで培養した細胞は 0.5 mL の Lysis buffer [50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.5% NP40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, protease inhibitors, RNase Inhibitor (Promega)] を用いて溶解し、15,000 x G, 10 min 遠心した。その上清に各抗体 (抗 UHRF1, 抗 HA, 抗 Flag, 抗 mouse IgG, 抗 rabbit IgG 抗体) を添加し、4°C, 3 h ローテーションした。その後、30  $\mu$ L の Protein G Dynabeads (Invitrogen) を加え更に 4°C, 3 h ローテーションした。ビーズは Wash buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.05% NP40) を用いて 3 度洗った後に、PBS で 2 度洗い、Total RNA Isolation kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて共沈された RNA を回収し、qRT-PCR により解析した。

## 2.14 共免疫沈降アッセイ

プラスミドをトランスフェクションした HCT116 及び 293FT 細胞を Lysis buffer [50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.5% NP40, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, protease inhibitors, RNase Inhibitor (Promega)] を用いて溶解した後、15,000 x G, 15 min 遠心した。その上清に対して anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を添加し、4°C, 2 h ローテーションした。ビーズは Wash buffer (50 mM HEPES pH7.5, 150 mM KCl, 0.05% NP40) を用いて 3 度洗った後に PBS で 2 度洗った。その後、Flag peptide (Sigma) を用いて競合的にタンパク質の溶出し、SDS-PAGE 及び ウェスタンブロットイングによって検出を行った。

## 2.15 細胞内ユビキチン化アッセイ

293FT 細胞にあらかじめ HA-ubiquitin, Myc- $\beta$ -TrCP1, Myc- $\beta$ -TrCP2, FLAG-UHRF1 または UPAT 発現ベクターをコトランスフェクションしておき、10  $\mu$ M MG132 を添加した 3 h 後に Ubi Lysis buffer [1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10mM N-ethyl maleimide, protease inhibitors and RNase Inhibitor (Promega)] に溶解した。その後、15,000 x G, 15 min 遠心し、上清に anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を添加し 4°C, 2 h ローテーションした。ビーズは Ubi Wash buffer [1% Tritone X-100, 50 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% SDS, 10mM N-ethyl maleimide, protease inhibitors and RNase Inhibitor (Promega)] を用いて 3 度洗った後に PBS で 2 度洗った。その後、Flag peptide (Sigma) を用いて競合的にタンパク質の溶出し、SDS-PAGE 及び抗 Flag, 抗 HA, 抗 Myc 抗体を用いてウェスタンブロットイングを行った。

## 2.16 UHRF1 相互作用因子の精製

Flag-UHRF1 発現ベクターをトランスフェクションした HCT116 細胞を溶解し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降した後、Flag peptide (Sigma) を用いて競合的に Flag-UHRF1 及び共沈タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質はメタノール/クロロホルム沈殿により脱塩した後に、トリプシン (Promega) 処理しエレクトロスプレーイオン化多段質量分析 (ESI-MS/MS) システムで解析を行った。HPLC には DiNa system (KYA Tech Corporation) と C-18 ESI capillary column (100  $\mu\text{m}$   $\times$  150 mm, NIKKYO Technos) を用いた。検出には LTQ Velos Orbitrap ETD instrument (ThermoFischer Scientific) を用いた。タンパク質の同定には Proteome Discoverer Version 1.2 (ThermoFisher Scientific) を用いた。

## 2.17 シーケンスデータ解析

CCSC#P 及び CCSC#11 細胞の RNA 発現プロファイルは Illumina Genome Analyzer Iix を用いて解析した。その後、RNA-Seq Analyzer (rSeq) (ver.0.0.7) を用いてマッピングと発現量の計算を行った。RPKM を遺伝子の発現量の指標として用いた。遺伝子のアノテーションには Refseq 及び Entrez Gene database を用いた。CCSC#P と CCSC#11 細胞の間で 2.5 倍以上発現量に差のある lncRNA を発現に差異のある lncRNA として抽出した。

UPAT の発現を抑制した HCT116 細胞の遺伝子発現プロファイルは Illumina HiSeq2000 を用いて解析を行った。その後、TopHat 2.0.8 を用いて hg19 にマッピングし、Cuffdiff 2 を用いて遺伝子発現レベルを計算した。コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞と UPAT ノックダウン細胞との間で 2 倍以上発現量に差のある遺伝子を発現に差異のある遺伝子として抽出した。Functional analysis は、MSigDB “Investigate Gene Sets”を用いて行った。

## 第3章 結果

### 3.1 UPATは大腸癌細胞の造腫瘍性に必要である

癌組織は単一の細胞で構成されているわけではなく、様々な性質を持った細胞の不均一な集団であると考えられている。本研究は、癌細胞内における不均一性に着目した。まず大腸癌組織由来細胞株である CCSC#P を限界希釈し、得られた単一細胞由来の細胞株の造腫瘍性を検討した。得られた 34 クローンを調べた結果、CCSC#11 細胞が CCSC#P 細胞と比較して免疫不全マウスにおける造腫瘍性が著しく減少していることが明らかとなった (Figure 3)。この造腫瘍性の差異が生み出される分子機構を明らかにするために、CCSC#P 及び CCSC#11 細胞を用いた RNA-seq 解析を行い、両細胞株の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。CCSC#11 細胞において発現が減少しており、1000 塩基以上の長さを持ち、タンパク質をコードする遺伝子のスプライシングバリエーションではない lncRNA に限定したところ、4 つの lncRNA (NR\_027161, NR\_015379, NR\_002773, NR\_002785) が抽出された。次に、大腸癌細胞株 HCT116 及び CCSC#P において個々の lncRNA の発現を抑制した際に細胞増殖に与える影響を調べた。その結果、AOC3 (amine oxidase copper) 遺伝子の偽遺伝子である UPAT (UHRF1 Protein Associated Transcript: NR\_002773) の発現を抑制すると、HCT116 及び CCSC#P 細胞の増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった (Figure 4)。また、UPAT は CCSC#11 細胞と比較して CCSC#P 細胞において発現が亢進していることが確認された (Figure 5A)。さらに、細胞分画及び qRT-PCR 解析によって、UPAT が核内に存在していることが明らかになった (Figure 5B, C)。

大腸癌細胞の造腫瘍性における UPAT の重要性を明らかにするため、UPAT をターゲットとする shRNA を発現するレンチウイルスを HCT116 及び CCSC#P 細胞に感染させて恒常的に UPAT の発現を抑制し、免疫不全マウスにおける造腫瘍性を検

討した。結果、*UPAT* の発現を抑制した細胞は、コントロール細胞と比較して造腫瘍性が顕著に減少することが明らかとなった (Figure 6)。さらに、siRNA を用いて各種細胞株における *UPAT* の発現を抑制し、Cell Titer-Glo アッセイを用いて増殖に対する影響を確認した。結果、*UPAT* の発現を抑制すると、大腸癌細胞株 HCT116, CCSC#P 及び DLD1 の増殖は抑えられるが、表皮角化ケラチノサイト細胞 HaCaT の増殖には影響しないことが明らかとなった。(Figure 7)。さらに、AnnexinV アッセイを用いて、*UPAT* がアポトーシスに影響を与えるかを確認した。結果、*UPAT* の発現を抑制することによって、HCT116 細胞はアポトーシスを引き起こすが、HaCaT 細胞には影響しないことが明らかとなった (Figure 8)。一方、AOC1, AOC2, AOC3 からなる AOC family 遺伝子の発現をそれぞれ抑制しても、HCT116 及び CCSC#P 細胞の増殖には影響を与えなかった (Figure 9)。以上の結果より、*UPAT* は AOC3 とは独立に機能し、大腸癌細胞の生存に必須の因子であることが示唆された。

続いて、大腸癌細胞における *UPAT* の役割を明らかにするために、HCT116 細胞において *UPAT* の発現を抑制した際の遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。2倍以上発現が減少した遺伝子群を用いて GSEA 解析を行ったところ、*UPAT* を発現抑制した細胞において RAS 関連遺伝子、CDH1 関連遺伝子、低酸素関連遺伝子の発現が減少していることが明らかとなった (Figure 10)。続いて、これらの遺伝子群に含まれる 25 遺伝子の発現を抑制し、HCT116 細胞のアポトーシスに影響を及ぼす遺伝子を探索した。結果、SCD1 及び SPRY4 の発現を抑制すると、有意なアポトーシス誘導が引き起こされることが明らかとなった (Figure 11, 12)。さらに、*UPAT* の発現抑制による HCT116 細胞の増殖抑制は、SCD1 または SPRY4 を過剰発現することにより、部分的にレスキューされることが明らかとなった (Figure 13)。以上の結果より、*UPAT* は SCD1 及び SPRY4 の発現制御を介して、大腸癌細胞の生存に関与していることが示唆された。

### 3.2 大腸癌細胞において *UPAT* は *UHRF1* と結合する

多くの lncRNA はタンパク質と複合体を形成して機能することが知られている。そこで、*UPAT* の機能を明らかにするために、RNA pull-down アッセイを用いた *UPAT* 結合タンパク質の同定を試みた。ビオチン標識した *UPAT* のセンス鎖またはアンチセンス鎖 RNA を *in vitro* で合成し、HCT116 細胞の核抽出液と混和した後にストレプトアビジンビーズを用いてビオチン標識した RNA に結合するタンパク質を回収した。回収したタンパク質を SDS-PAGE により分離し、銀染色によって検出した結果、センス鎖の *UPAT* 特異的に共沈される泳動バンドを見出した (Figure 14A)。この泳動バンドをゲルから切り出し、LC/MS 解析及びウェスタンブロットティング法を行い、センス鎖の *UPAT* に結合するタンパク質としてエピゲノム制御因子 *UHRF1* を同定した (Figure 14B)。さらに、HCT116 細胞溶解液と抗 *UHRF1* 抗体を用いた Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (RIP) アッセイを行い、*UHRF1* が内在性の *UPAT* に結合することを確認した (Figure 15A)。*GAPDH* mRNA 及び *U1* snRNA, lncRNA *ASBEL*, lncRNA *UCA1* はネガティブコントロールとして用いた。加えて、HA-*UHRF1* を過剰発現した HCT116 細胞溶解液と抗 HA 抗体を用いた RIP アッセイにより、一過的に発現した *UHRF1* はアンチセンス鎖 *UPAT* や *GAPDH* mRNA と比較して、センス鎖の *UPAT* に強く結合することが判明した (Figure 15B)。これらの結果から、大腸癌細胞において *UPAT* は *UHRF1* と結合していることが示唆された。

さらに両因子の詳細な結合領域を明らかにするために、*UHRF1* の欠失変異体を用いた RIP アッセイを行った。結果、*UHRF1* の 636-670 アミノ酸領域が *UPAT* との結合に必要であることが判明した (Figure 16)。さらに、*UHRF1* の 636-736 アミノ酸領域 (UBR, *UPAT* Binding Region) があれば *UPAT* との結合に十分であることを明らかにした (Figure 16D)。加えて、*UPAT* の 5' 及び 3' 領域が *UHRF1* との結合に重



要であることが明らかとなり、*UPAT*はその領域を用いて UHRF1 の 636-736 アミノ酸領域に結合していることが示唆された (Figure 17)。

### 3.3 *UPAT* は UHRF1 を安定化することにより、大腸癌細胞の増殖及び生存に寄与する

これまでに、UHRF1 はプロテアソームを介した分解制御を受けていることが報告されている<sup>33, 49-51</sup>。そこでまず、HCT116 細胞を用いて *UPAT* が UHRF1 の発現レベルに影響しているかどうかを qRT-PCR 及びウェスタンブロットティングを用いて検証した。結果、*UPAT* の発現を抑制することによって、*UHRF1* mRNA には影響を与えないが、UHRF1 タンパク質の劇的な減少が引き起こされることが判明した (Figure 18)。続いて、翻訳阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を用いたタンパク質安定性アッセイを行った結果、*UPAT* の発現を抑制すると UHRF1 タンパク質が不安定化することが明らかとなった (Figure 19A)。また、*UPAT* の発現を抑制した際の UHRF1 タンパク質の減少は、プロテアソーム阻害剤 MG132 によって抑えられることが明らかとなった (Figure 19B)。さらに、*UPAT* の発現を抑制すると UHRF1 のユビキチン化が亢進することが明らかとなった (Figure 19C)。以上の結果より、*UPAT* は UHRF1 のユビキチン化を抑制し、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を阻害していることが示唆された。

UHRF1 は癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしていることが既に報告されている。実際、HCT116 や CCSC#P 細胞において siRNA を用いて UHRF1 の発現を抑制すると、細胞の増殖が著しく低減した (Figure 20)。加えて、UHRF1 の発現を抑制すると *UPAT* の発現を抑制した時と同様に HCT116 細胞のアポトーシスが誘導されることが AnnexinV アッセイによって示された (Figure 20)。さらに、UHRF1 の発現抑制は *SCD1* 及び *SPRY4* mRNA の発現減少を引き起こすことが明らかとなった

(Figure 21)。また、*UPAT* の発現抑制による HCT116 細胞の増殖抑制は、UHRF1 を過剰発現することにより部分的に回復することが明らかとなった (Figure 22)。以上の結果より、*UPAT* は UHRF1 タンパク質を安定化することにより、大腸癌細胞の増殖に寄与している可能性が示唆された。

### 3.4 *UPAT* は $\beta$ -TrCP1/2 を介した UHRF1 のユビキチン化及び分解を阻害する

UHRF1 を標的とするユビキチン化酵素を明らかにする為に、Flag-UHRF1 を強制発現した HCT116 細胞溶解液に Flag 抗体を加えて免疫沈降し、共沈されたタンパク質を LC/MS によって同定した (Figure 23A)。結果、2013 年に *Molecular and Cellular Biology* 誌で報告された論文と同様に、F-box protein family である  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 が同定された<sup>49</sup>。さらに、既知の UHRF1 結合タンパク質である TRIM28 及び HDAC1 も併せて同定され<sup>52, 53</sup>、共沈実験の正当性は高いと考えられる。続いて、293FT 細胞の溶解液を用いたプルダウン実験により UHRF1 と  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 の共沈が確認された (Figure 23B-E)。一方、他の F-box protein family である FBWX2, 4, 5, 7A 及び 8 との共沈は確認されなかった (Figure 24)。さらに、 $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 と結合する UHRF1 の領域を同定する為に UHRF1 の欠失変異体を用いたプルダウンアッセイを行ったところ、N 末端側の領域 (1-310 アミノ酸) が  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 との結合に必要であることが明らかとなった (Figure 25)。

$\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 が UHRF1 のユビキチン化酵素として働くかどうかを確かめるためにユビキチン化アッセイを行ったところ、293FT 細胞において  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 を過剰発現することによって、UHRF1 のユビキチン化が亢進することが明らかとなった (Figure 26)。その際、*UPAT* を過剰発現すると、 $\beta$ -TrCP1 及び

$\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化が減少した (Figure 26)。また、*UPAT* の発現を抑制することによる UHRF1 の分解は、 $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 の発現を抑制しておくことと起こらなくなることが明らかとなった (Figure 27)。さらに、HCT116 細胞において  $\beta$ -TrCP2 を過剰発現すると UHRF1 のタンパク質量が減少し、同時に *UPAT* を過剰発現することにより  $\beta$ -TrCP2 依存的な UHRF1 の減少が回復することが明らかとなった (Figure 28)。また、*UPAT* の過剰発現によって UHRF1 と  $\beta$ -TrCP1、 $\beta$ -TrCP2 との結合が少し減少した (Figure 29)。以上の結果より、*UPAT* は  $\beta$ -TrCP1、 $\beta$ -TrCP2 依存的な UHRF1 タンパク質のユビキチン化及び分解を阻害することが示唆された。

### 3.5 UHRF1 のユビキチン化部位は Lys-663 残基である

*UPAT* による UHRF1 ユビキチン化阻害機構の詳細を明らかにするために、UHRF1 のユビキチン化部位の同定を試みた。*UPAT* が UHRF1 の 636-670 アミノ酸に結合することから、*UPAT* によるユビキチン化阻害もこの領域で起こっているのではないかと推測した。そこで、リジン残基をアルギニン残基に変えることで UHRF1 の非ユビキチン化変異体 (UHRF1-K639R, -K657R, -K659R, -K661R or -K663R) を作製し、293FT 細胞において  $\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化を検証した。結果、UHRF1-K663R においてのみ、 $\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化が減少すること (Figure 30)、及び UHRF1-K663R は  $\beta$ -TrCP2 過剰発現によるタンパク質分解に耐性であることが明らかとなった (Figure 31)。以上の結果より、 $\beta$ -TrCP2 は UHRF1 の Lys-663 残基をユビキチン化することで UHRF1 の分解を促進していることが示唆された。

## 第4章 考察

本研究において、大腸癌細胞の造腫瘍性に重要な役割を持つ lncRNA を探索し、lncRNA *UPAT*を見出した。次に、*UPAT*はエピゲノム制御因子 UHRF1 に結合し、 $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2によるユビキチン化を阻害することで UHRF1 タンパク質を安定化していることを明らかにした。過去の知見と同様に<sup>38-41</sup>、UHRF1 は大腸癌細胞の増殖及び生存に大きく寄与していることが確認され、*UPAT*による UHRF1 の安定化が大腸癌細胞の増殖や造腫瘍性に重要であることが示唆された (Figure 32)。

RNA-seq 解析により、*UPAT*を発現抑制した細胞において RAS 関連遺伝子、CDH1 関連遺伝子、低酸素関連遺伝子の発現が減少していることが判明した。実際、*UPAT*の発現を抑制すると SCD1, SPRY4 の発現が顕著に減少した。さらに、*UPAT*による SCD1, SPRY4 の発現制御が大腸癌細胞の生存に必要であることを明らかにした。飽和脂肪酸の合成に関わる酵素である SCD1 は癌細胞の増殖や生存に重要である他、スフェロイドの形成にも重要であるという報告がある<sup>54, 55</sup>。また、SPRY4が属する Sprouty ファミリーの遺伝子は ERK シグナルの調節因子であり、癌の発症と進行に関与しているという報告がある<sup>56</sup>。本研究において、UHRF1 は SCD1 及び SPRY4 の発現制御に関わっていることが判明したが、UHRF1 による SCD1 や SPRY4 の発現制御機構及び、その機構に *UPAT* が関わっているか否かについては不明であり、今後明らかにしていかなければならない。

E3 ユビキチンライゲースである  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 は細胞周期制御や分化を初めとした多くの生物学的プロセスの制御に関わっていることが既に報告されている<sup>45</sup>。最近、 $\beta$ -TrCP ファミリーが UHRF1 を DNA ダメージ依存的にユビキチン化し、プロテアソームを介したタンパク質分解を促進していることが報告された<sup>49</sup>。本研究の結果からも、 $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 が UHRF1 のユビキチン化と分解を促進していることが示された。さらに *UPAT*が  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 による UHRF1 のユビキ

チン化と分解を阻害することが判明した。加えて、 $\beta$ -TrCP2 が UHRF1 の Lys-663 残基をユビキチン化すること、及び *UPAT* が UHRF1 の 636-736 アミノ酸 (Lys-663 を含む) に結合することが明らかになり、*UPAT* が Lys-663 を覆い隠すことで UHRF1 のユビキチン化を阻害している可能性が示唆された。

lncRNA によるタンパク質のユビキチン化制御機構はまさに今明らかにされつつある。例えば、lncRNA *HOTAIR* は足場として働くことで基質タンパク質のユビキチン化及び分解を促進し、lncRNA-*p21* は低酸素条件において HIF1 $\alpha$  のユビキチン化を阻害することで解糖系を亢進することが報告されている<sup>57, 58</sup>。lncRNA の機能としてクロマチンリモデリング複合体のリクルートによる転写制御が最も知られていたが、本研究において見出した *UPAT* や近年の報告などから、タンパク質のユビキチン化と分解を制御する lncRNA のクラスが存在するのではないかと推測している。

機能的な偽遺伝子として lncRNA *PTENP1* が知られている。*PTENP1* は癌抑制遺伝子 PTEN の偽遺伝子であり、*PTEN* mRNA を標的とする miRNA をトラップし、*PTEN* mRNA のデコイとして働くことが報告されている<sup>59</sup>。*UPAT* は AOC3 遺伝子の偽遺伝子であり、AOC3 と類似した配列を持つが、大腸癌細胞において AOC3 を含めた AOC family の発現を抑制しても、細胞の増殖に影響は与えなかった (Figure 9)。また、*UPAT* の発現抑制は AOC family の発現に影響を与えず、逆に AOC family の発現を抑制しても *UPAT* の発現に影響を与えなかった。このことから、*UPAT* は AOC3 とは関係なく独自の機能を獲得したのではないかと考えられる。

Figure 13 において、*UPAT* の発現抑制による大腸癌細胞の増殖抑制効果は、SCD1 及び SPRY4 を過剰発現しても完全にはレスキューすることができなかった。ひとつの要因としてはトランスフェクション効率の問題が挙げられる。HCT116 細胞のトランスフェクション効率は 30-50%と言われており、さらに個々の細胞ごとにトランスフェクションされたプラスミドの分子数は変動が大きいと考えられている。本研究においては、コトランスフェクションした膜タンパク質を指標として、比較的多くのプラスミド

が導入された細胞を磁気ビーズで選択したが、それでも SCD1 及び SPRY4 の発現量が十分ではなかった可能性がある。もうひとつの要因としては、SCD1 及び SPRY4 以外の遺伝子が大腸癌細胞の増殖に寄与していることが考えられる。本研究においては、pathway 解析の結果から、RAS 経路、CDH1 経路、低酸素経路に限定して UPAT 下流遺伝子を抽出し、その 25 候補遺伝子に対して増殖アッセイを行った。そのため、他の経路に関わる遺伝子や、機能が未知であるが故に pathway 解析から弾かれてしまった遺伝子の中には、大腸癌細胞の増殖に重要な遺伝子が隠れている可能性がある。この点に関しては、pathway 解析だけでなく、大腸癌組織において発現亢進しているか否かといった基準により UPAT 下流候補遺伝子の再抽出を行っている。

Figure 14 において、ビオチン標識 UPAT をプルダウンし、銀染色及び MS 解析により UPAT 結合タンパク質として UHRF1 を同定した。一般に、銀染色の検出限界は 1 ng、ウェスタンブロットティングの検出限界は 1 pg と言われ、銀染色で検出された泳動バンドはウェスタンブロットティングでは容易に検出できるのではないかと推測されるが、実際に銀染色で得られた泳動バンドに比べ、ウェスタンブロットティングによって検出された UHRF1 のシグナルは弱く感じられた。この理由として、銀染色の泳動バンドが単一タンパク質由来ではなく、多くのタンパク質が含まれている可能性が考えられる。実際、MS 解析により図の泳動バンドからは約 100 種類のタンパク質が検出された。lncRNA に結合するタンパク質の探索法としてビオチン標識 RNA によるプルダウンは広く行われているが、精製法（2 段階精製等）や検出法（2 次元電気泳動等）には更なる改良が必要であると考えられる。

Figure 11, 12 及び 21 において、SCD1 及び SPRY4 の発現が UPAT-UHRF1 経路によって制御されている可能性が示唆されたが、実際にどのようなメカニズムで遺伝子発現を制御しているのかは明らかになっていない。現在、ゲノム上における

UHRF1 の挙動を CHIP assay により解析し、転写制御・ヒストン修飾・DNA 修飾の可能性について検討している。

Figure 22 において、*UPAT* の発現を抑制したことにより引き起こされる大腸癌細胞の増殖抑制効果は UHRF1 の過剰発現では完全にレスキューするには至らなかった。この原因としては、先にも述べたように、トランスフェクション効率の問題と、UHRF1 以外の経路の存在が挙げられる。

本研究において UHRF1 を標的とするユビキチンリガーゼとして  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 を同定した。Figure 27 において、*UPAT* の発現抑制により引き起こされる UHRF1 のタンパク質レベルの減少が、 $\beta$ -TrCP1 または  $\beta$ -TrCP2 の発現を抑制することによりレスキューされることが明らかとなった。このことから、 $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 の総量が一定以上存在する場合に UHRF1 のユビキチン化が起こるのではないかと考えられる。

Figure 29 において、*UPAT* の過剰発現により UHRF1 と  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 の結合が減弱することが示唆された。*UPAT* が UHRF1 と  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 の結合に与える影響を明確にするために、内在性タンパク質を対象として同様の結合検証を行う必要があると考えている。

Figure 30 及び Figure 31 の結果から、UHRF1 -663KR 変異体は、 $\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化及びタンパク質分解に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。この結果は  $\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化が UHRF1 の Lys-663 残基を標的としていることを示唆しているが、Figure 25 の結果から、 $\beta$ -TrCP2 は UHRF1 の N 末領域 (1-310 アミノ酸) に結合することが示唆された。 $\beta$ -TrCP2 は結合領域から 300 残基以上も離れた Lys-663 残基をユビキチン化する機構については不明な点が多い。UHRF1 についてドメイン単位での立体構造は明らかになりつつあるが、全長の立体構造は解かれていない<sup>60, 61</sup>。*UPAT* は UHRF1 の Lys-663 残基を覆い隠すだけでな

く、UHRF1 の立体構造に影響を与え、その結果  $\beta$ -TrCP2 によるユビキチン化を阻害している可能性も十分に考えられる。

本研究において、結合検証 (IP) 及びユビキチン化検証には細胞系を用いた実験手法を用いた。細胞内において UPAT や UHRF1,  $\beta$ -TrCPs が機能していることを示すことはもちろん重要であるが、*in vitro* において結合や機能を示すことも同様に重要であると考え。その理由は、細胞や細胞の溶解液を用いたアッセイでは間接的な影響を完全に排除することが不可能であることが挙げられる。本研究において *in vitro* の追加検証が必要な項目としては、①UPAT と UHRF1 の結合検証及びドメイン解析、② $\beta$ -TrCPs による UHRF1 のユビキチン化活性の検証及び UPAT によるユビキチン化活性阻害効果の検証、③UPAT が UHRF1 と  $\beta$ -TrCPs の結合に与える影響の検討が考えられる。

UHRF1 の脱ユビキチン化酵素として USP7 が既に報告されている。本研究では検証するには至らなかったが、大腸癌細胞において USP7 が機能しているのか否か、また、UPAT による UHRF1 タンパク質の安定化に USP7 が関与している可能性の検討も行っていかなければならない。

UPAT の発現抑制により発現変動する遺伝子リストと UHRF1 の発現抑制により発現変動する遺伝子リストを照合した際に、両者により共通して発現制御されている遺伝子が少なかった。その原因として、UPAT は UHRF1 とは別の経路により遺伝子発現制御に関わっている可能性がまず考えられる。また、UPAT は UHRF1 タンパク質の安定化だけでなく、UHRF1 の機能を制御している可能性がある。つまり UHRF1 により発現制御される遺伝子が、UPAT により限定されているのではないかと推測している。このことを検証するためには、UPAT の発現を抑制し、さらに MG132 または  $\beta$ -TrCPs の発現抑制により UHRF1 タンパク質を安定化した上で、UHRF1 タンパク質の挙動を ChIP assay により検討する必要があると考えている。



大腸の正常組織と大腸癌組織を比較した場合、*UPAT* 及び  $\beta$ -TrCP1/2 の発現量の変化は検出されなかった。一方で、大腸癌組織において UHRF1 は mRNA レベル・タンパク質レベル共に発現亢進している。また、Figure 7 において、*UPAT* の発現抑制により大腸癌細胞の増殖は抑えられるが、同じ上皮系の細胞である表皮角化細胞 HaCaT の増殖には影響を与えなかった。これらのことから、*UPAT* は大腸癌細胞において発現亢進した UHRF1 に対して作用し、UHRF1 タンパク質の安定化を引き起こしているのではないかと推測した。この仮説を示すために、まずは HaCaT 細胞においても *UPAT* が UHRF1 タンパク質の安定化に寄与しているかどうかを確かめたい。また、HaCaT 細胞を含めた正常細胞に対して UHRF1 を過剰発現した場合、過剰発現された UHRF1 に対して *UPAT* が働き得るのかどうかを、ユビキチンアッセイ及びタンパク質安定化アッセイ (CHX, MG132) を用いて検討していきたい。加えて、他の癌腫においても *UPAT*-UHRF1 経路が成立しているかどうかを確認し、本研究において見出した現象の一般性を示していきたいと考えている。

## 第5章 結論

本研究の結果をまとめる。

- 大腸癌細胞の造腫瘍性に重要な lncRNA として *UPAT* を見出した。
- *UPAT* は大腸癌細胞の増殖と生存に必要であることが示唆された。
- *UPAT* によって発現制御され、大腸癌細胞の増殖に関わる遺伝子として *SCD1* 及び *SPRY4* を同定した。
- *UPAT* に結合するタンパク質としてエピゲノム制御因子 *UHRF1* を同定した。
- *UPAT* の発現を抑制すると *UHRF1* タンパク質の劇的な減少が引き起こされることが判明した。
- *UPAT* は *UHRF1* のユビキチン化及びプロテアソーム依存的な分解を阻害することが示唆された。
- *UHRF1* も *SCD1* 及び *SPRY4* の発現を制御していることが示唆された。
- *UHRF1* に対するユビキチンライゲースとして  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 を同定した。
- *UPAT* は  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 による *UHRF1* のユビキチン化を阻害することが示唆された。
- *UHRF1* の Lys-663 残基が  $\beta$ -TrCP2 によってユビキチン化されることが示唆された。

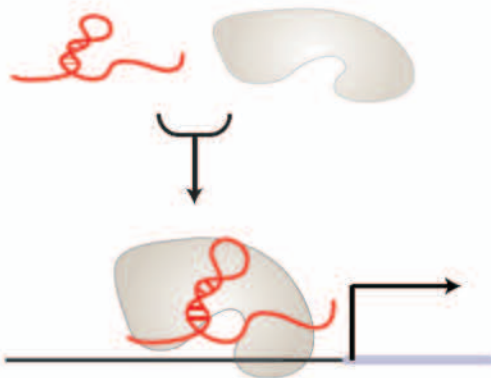
以上の結果から、大腸癌細胞の増殖及び造腫瘍性における lncRNA *UPAT* の重要性が示唆された。さらに、*UPAT* はエピゲノム制御因子 *UHRF1* に結合し、ユビキチンリガーゼ  $\beta$ -TrCPs によるポリユビキチン化を阻害することで、*UHRF1* タンパク質の安定化に寄与していることが明らかとなった。*UHRF1* は、大腸癌を初めとした多くの癌において高発現し、癌細胞の増殖と生存に重要であることが知られている。また、

*UPAT-UHRF1* 経路の共通の標的遺伝子として *SCD1* 及び *SPRY4* を同定し、*UPAT* はその両遺伝子の発現制御を介して大腸癌細胞の増殖を制御していることが示唆された。本研究はエピゲノム制御因子のユビキチン化と分解に関する lncRNA に関する初の知見であり、本研究において見いだされた *UPAT-UHRF1* 経路は大腸癌の治療の標的として有望であると期待している。

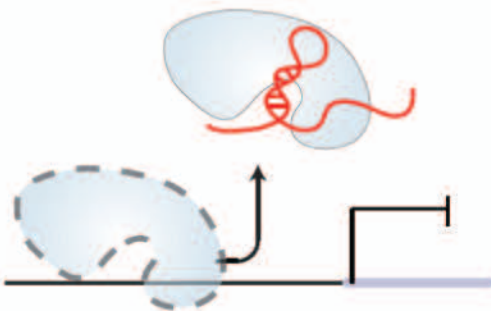
# Figure

## Epigenetic and transcriptional

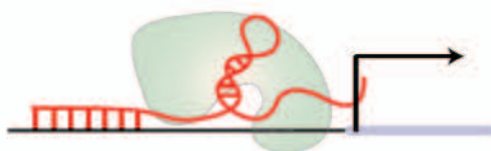
a Transcriptional activator



b Transcriptional repressor



c Transcriptional guide



d Scaffold for chromatin modification complex



## Post-transcriptional

e RNA editing regulator



f RNA splicing regulator



g miRNA harbor



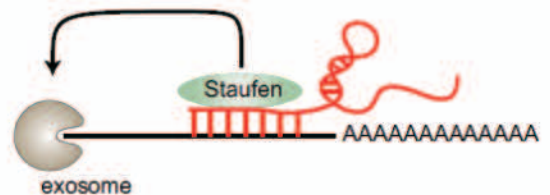
h miRNA sequester



i miRNA blocker



j RNA degradation regulator



k Translational efficiency regulator

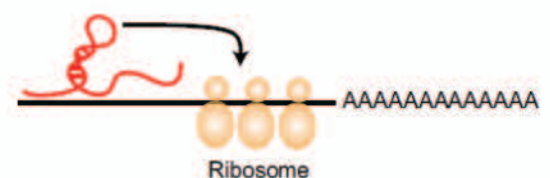


Figure 1: これまでに報告されている lncRNA の機能

Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1839**: 1097-1109, Figure 1 からの引用

LncRNA	Function in tumorigenesis	Functional mechanism
<i>HOTAIR</i>	Oncogene	Increased cancer invasiveness and metastasis in a manner dependent on PRC2
<i>PRNCR1</i>	Oncogene	Regulates androgen receptor activity
<i>PCGEM1</i>	Oncogene	Regulates androgen receptor activity
<i>ASBEL</i>	Oncogene	Forms duplexes with <i>ANA/BTG3</i> mRNA in the nucleus and suppresses its cytoplasmic transportation
<i>lincRNA-p21</i>	Tumor suppressor	Mediates p53-dependent transcriptional repression
<i>PTENP1</i>	Tumor suppressor	Titrate the miRNAs targeting <i>PTEN</i> mRNA

Figure 2: lncRNA と癌の関連

*HOTAIR*: 乳癌において PRC2 依存的な浸潤・転移を促進する

*PRNCR1* & *PCGEM1*: 前立腺癌において androgen receptor を活性化する

*ASBEL*: 卵巣癌において癌抑制遺伝子 *ANA/BTG3* mRNA の翻訳を抑制する

*lincRNA-p21*: p53 によって発現誘導され、転写抑制因子として働く

*PTENP1*: 癌抑制遺伝子 *PTEN* の偽遺伝子。*PTEN* を標的とする miRNA に対するデコイとして働く

Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1839**: 1097-1109, Table 2 を一部改編

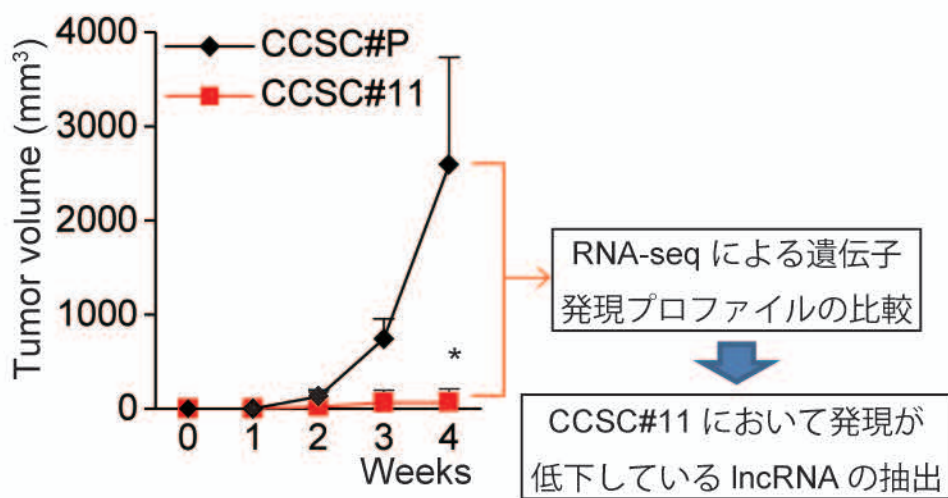


Figure 3: CCSC#11 細胞は著しく低い造腫瘍性を示す

大腸癌細胞株 CCSC#P を限界希釈することで得られた単一細胞由来の細胞株 CCSC#11 を免疫不全マウスに皮下注射し、腫瘍の成長を経時観察した。用いた細胞数は 1,000 細胞/匹。横軸は皮下注射後の時間 (週)、縦軸は形成された腫瘍の大きさを表す。

Error bar は標準偏差を表す (n = 7)。\* $P < 0.05$

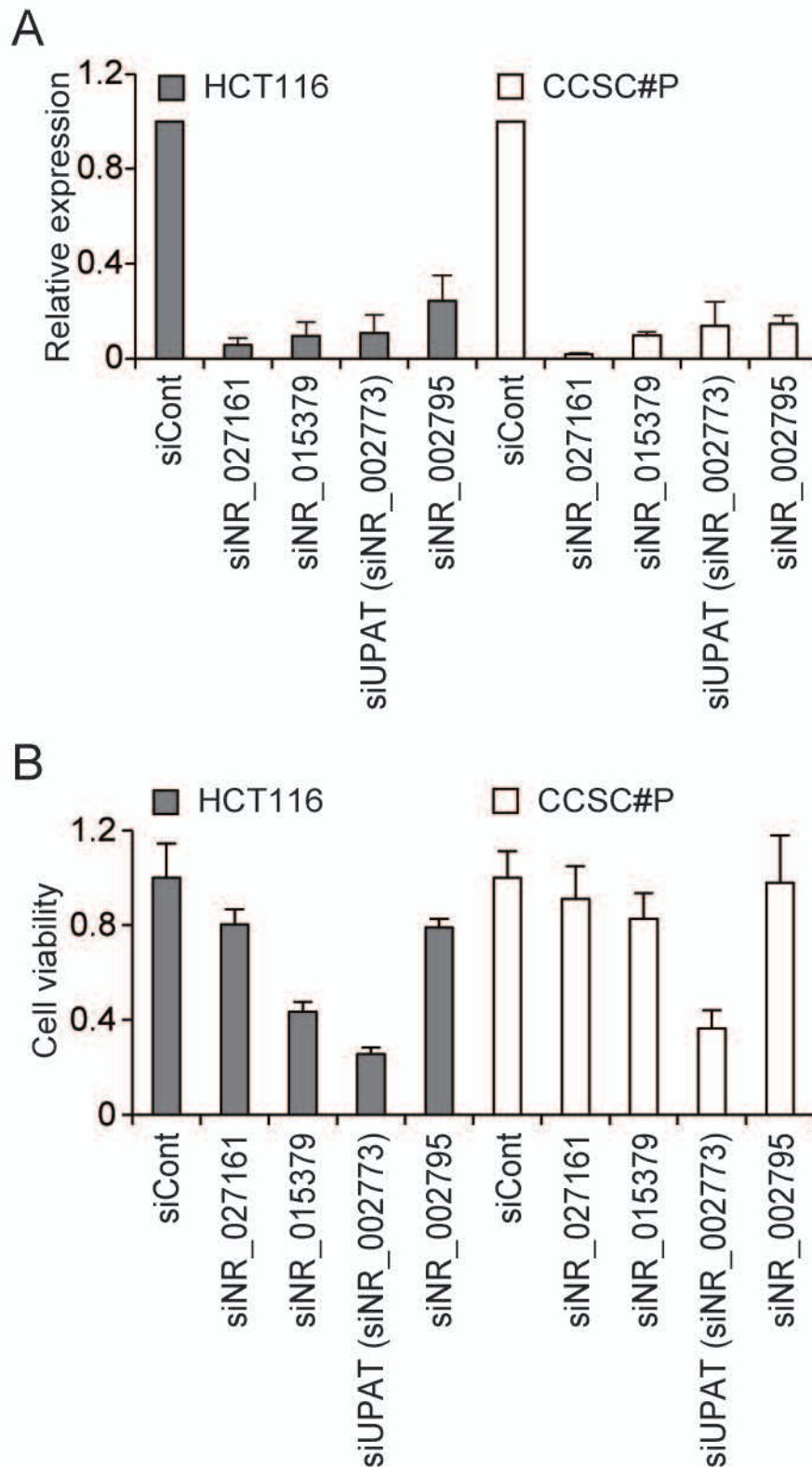


Figure 4: *UPAT* (NR\_002773) の発現を抑制すると大腸癌細胞の増殖が抑えられる大腸癌細胞HCT116及びCCSC#Pに対して各lncRNAに対するsiRNAをトランスフェクションし、細胞の増殖に与える影響を検討した。

(A) トランスフェクションから72時間後にRNAを回収し、qRT-PCRにより発現抑制効率を確認した。Error barは標準偏差を表す (n = 3)。internal controlとしては $\beta$ -actin mRNAを用いた。

(B) 各細胞株の生存率をCell Titer-Gloアッセイにより検出した。Error barは標準偏差を表す (n = 3)。

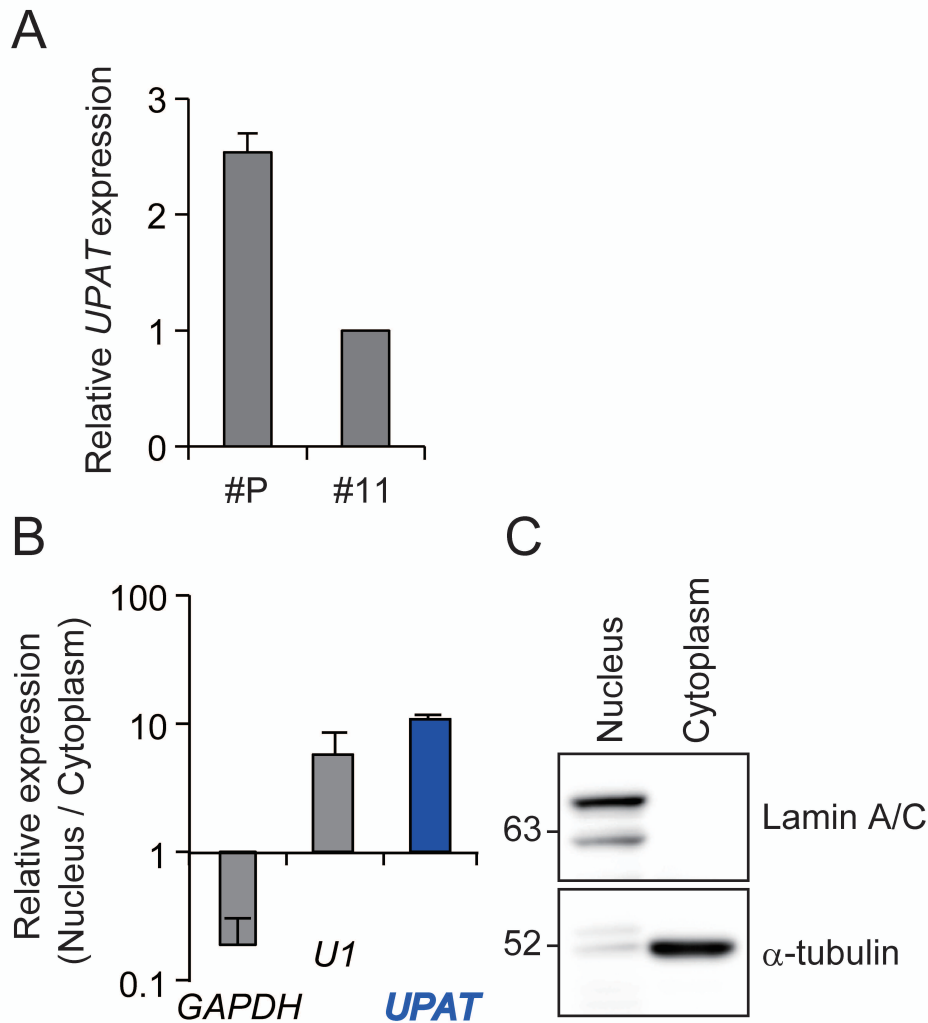


Figure 5: *UPAT*はCCSC#P細胞において高発現しており、核に多く存在する  
 (A) CCSC#P及びCCSC#11細胞からRNAを回収し、qRT-PCRにより*UPAT*の発現量を比較した。  
 Error barは標準偏差を表す (n = 3)。  
 (B, C) HCT116細胞を核と細胞質に分画し、RNA及びタンパク質を回収した。  
 qRT-PCRにより核と細胞質における*UPAT*の発現量を検出した。(B)  
*GAPDH* mRNAは細胞質RNA、*U1* snRNAは核RNAのポジティブコントロールとして用いた。  
 Error barは標準偏差を表す (n = 3)。  
 各分画のタンパク質を用いてウェスタンブロッティングを行い、分画の確認を行った。(C)  
*Lamin A/C*は核タンパク質、 $\alpha$ -tubulinは細胞質タンパク質のマーカーとして用いた。



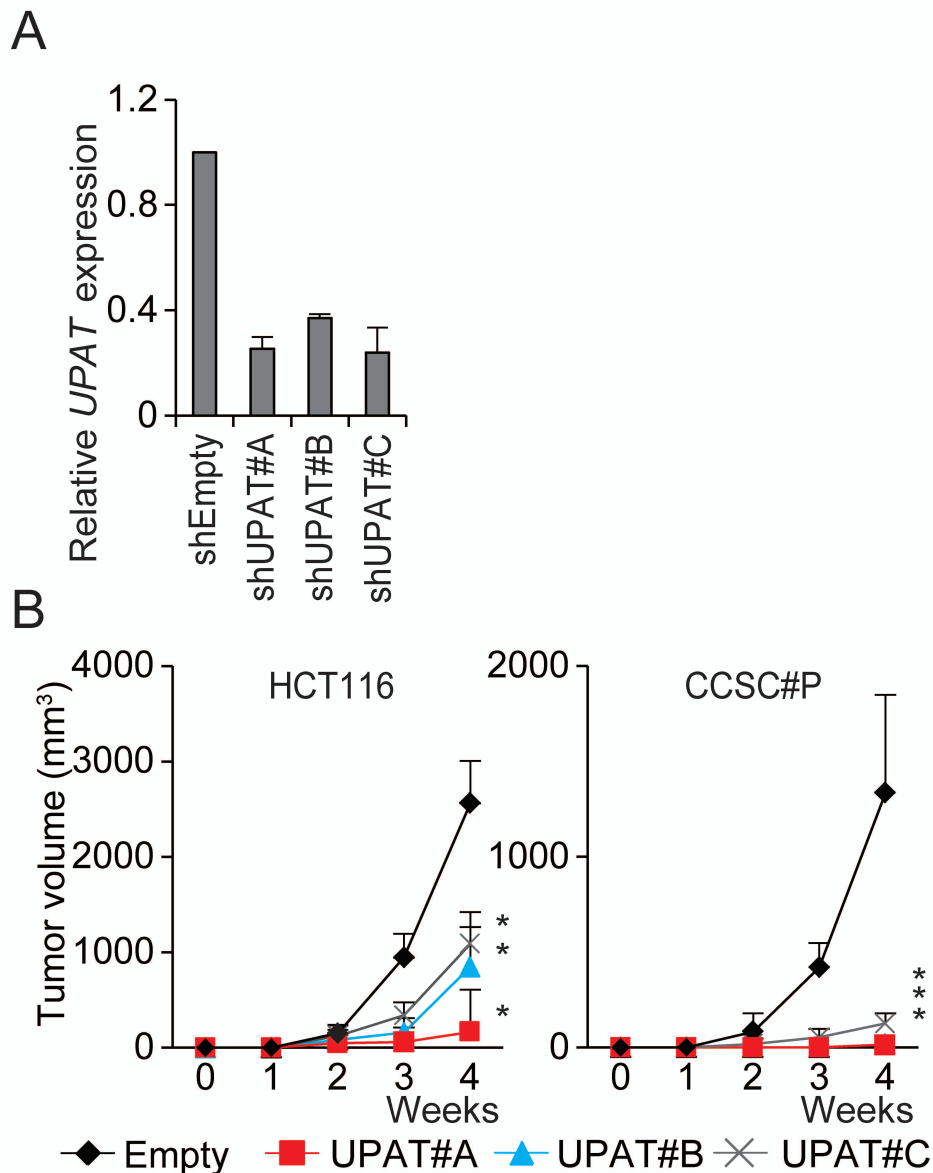


Figure 6: *UPAT* は大腸癌細胞の造腫瘍性に重要である

*UPAT* に対する shRNA を発現するレンチウイルスを HCT116 および CCSC#P 細胞に感染させ、造腫瘍性に与える影響を検討した。

(A) 感染から 72 時間後の HCT116 細胞から RNA を回収し、qRT-PCR により *UPAT* に対する発現抑制効率を確認した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(B) 感染から 72 時間後の HCT116 及び CCSC#P 細胞を免疫不全マウスに皮下注射し、腫瘍の成長を経時的に計測した。用いた細胞数は 1,000 細胞/匹。横軸は皮下注射後の時間 (週)、縦軸は形成された腫瘍の大きさを表す。

Error bar は標準偏差を表す (n = 7)。\* $P < 0.05$

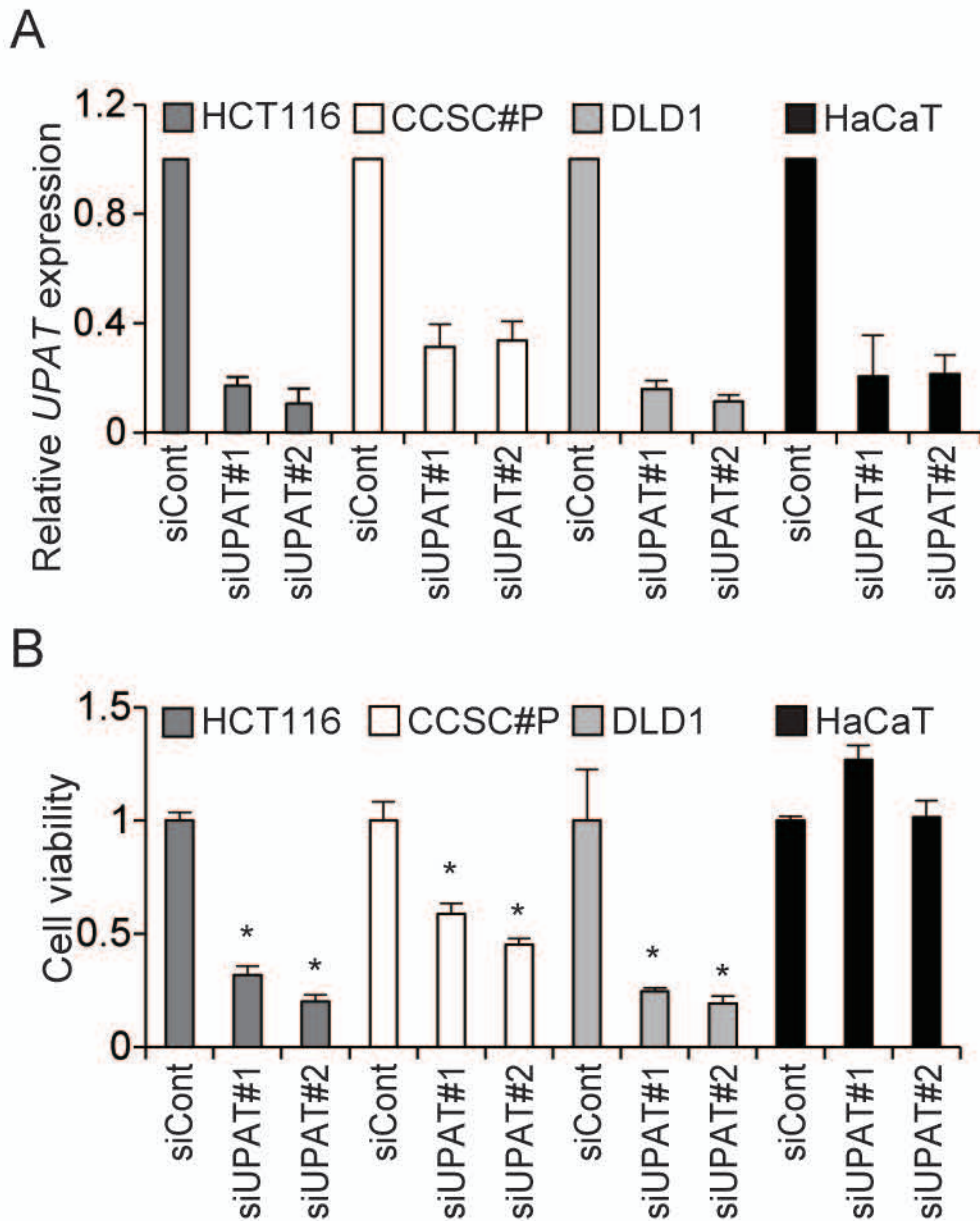


Figure 7: *UPAT* の発現を抑制すると大腸癌細胞の増殖が抑えられる  
大腸癌細胞 HCT116, CCSC#P 及び DLD1, 表皮角化細胞 (ケラチノサイト) HaCaT に  
対して siRNA による *UPAT* の発現抑制を行った。

(A) トランスフェクションから 72 時間後に各細胞から RNA を回収し、qRT-PCR により  
*UPAT* の発現抑制効率を算出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。internal control と  
しては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(B) 各細胞株の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより検出した。Error bar は標準偏差を  
表す (n = 3)。\* $P < 0.05$

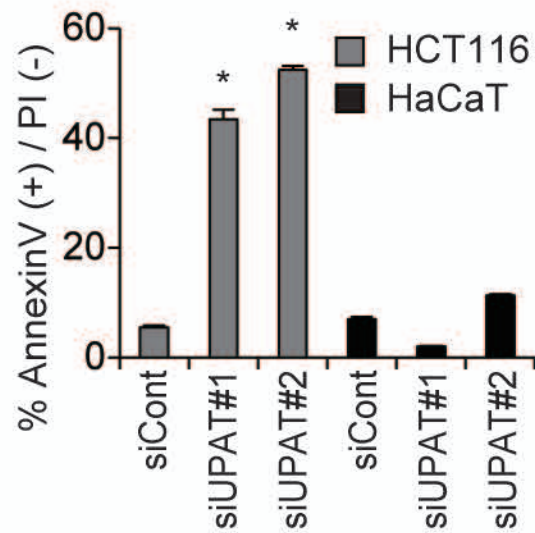
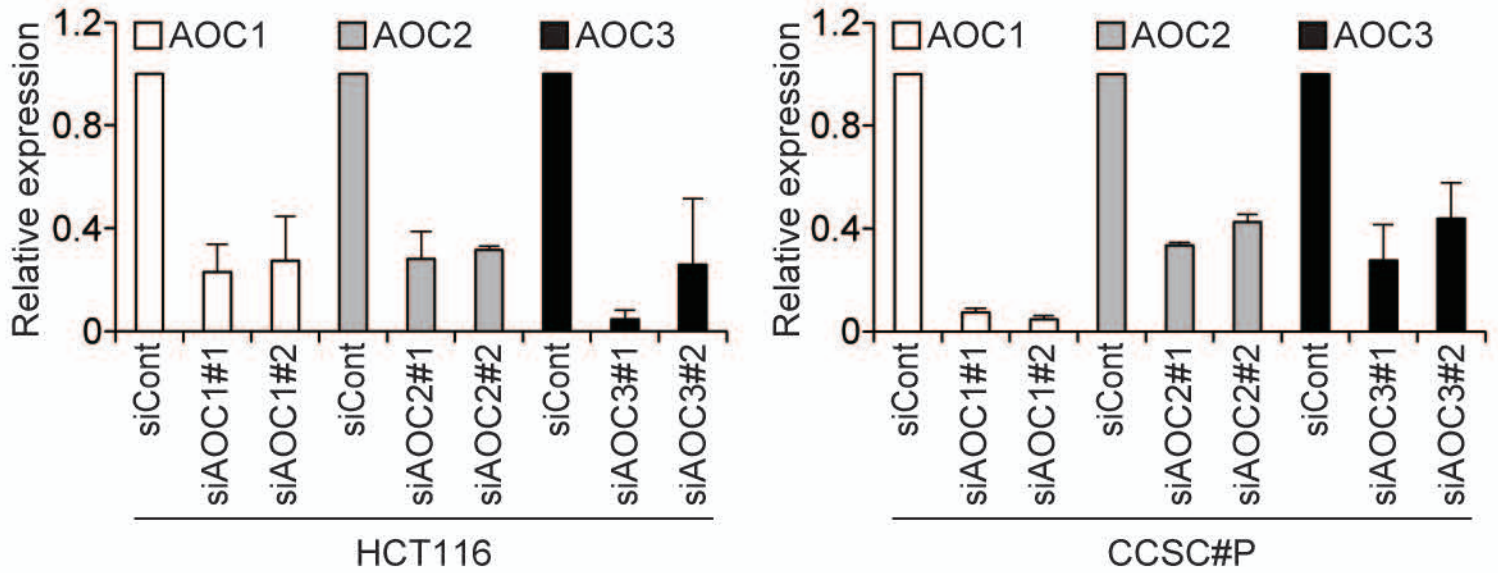


Figure 8: *UPAT* の発現を抑制すると大腸癌細胞のアポトーシスが誘導される

大腸癌細胞 HCT116 及び表皮角化細胞 (ケラチノサイト) HaCaT に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制した。トランスフェクションから 96 時間後に AnnexinV アッセイを行い、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\* $P < 0.05$

A



B

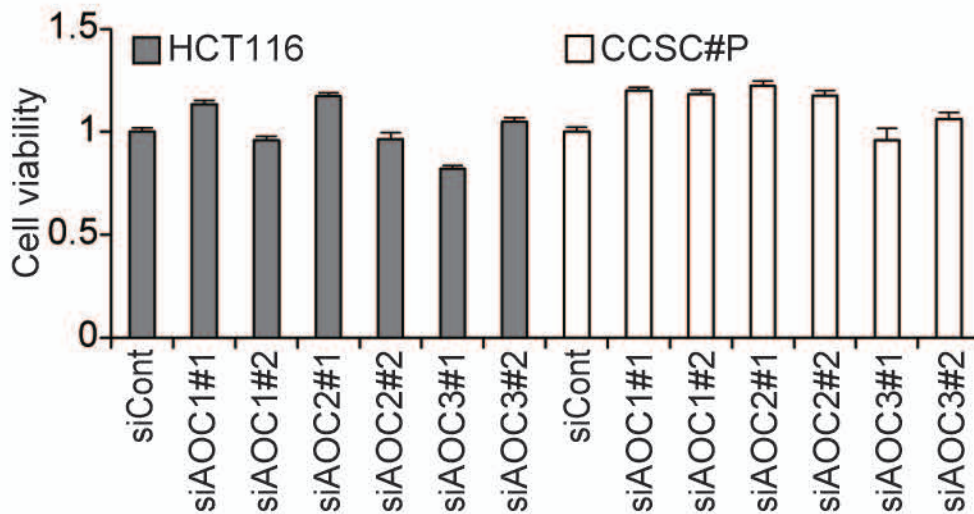


Figure 9: AOCファミリーの発現抑制は、大腸癌細胞の増殖に影響しない

HCT116及びCCSC#P細胞に対してAOCファミリー (AOC1, AOC2, AOC3) に対するsiRNAをトランスフェクションし、細胞の増殖に与える影響を検討した。

(A) siRNAトランスフェクションから72時間後に各細胞からRNAを回収し、qRT-PCRによりAOCファミリーの発現抑制効率を算出した。Error barは標準偏差を表す (n = 3)。internal controlとしては $\beta$ -actin mRNAを用いた。

(B) 各細胞株の生存率をCell Titer-Gloアッセイにより検出した。Error barは標準偏差を表す (n = 3)。

Name	Description	p-value
BILD_HRAS_ONCOGENIC_SIGNATURE	Genes selected in supervised analyses to discriminate cells expressing activated HRAS [GeneID=3265] oncogene from control cells expressing GFP.	4.26E-26
ZWANG_CLASS_3_TRANSIENTLY_INDUCED_BY_EGF	Class III of genes transiently induced by EGF [GeneID =1950] in 184A1 cells (mammary epithelium).	2.05E-24
GRAESSMANN_APOPTOSIS_BY_DOXORUBICIN_DN	Genes down-regulated in ME-A cells (breast cancer) undergoing apoptosis in response to doxorubicin [PubChem=31703].	4.39E-24
KOINUMA_TARGETS_OF_SMAD2_OR_SMAD3	Genes with promoters occupied by SMAD2 or SMAD3 [GeneID=4087, 4088] in HaCaT cells (keratinocyte) according to a ChIP-chip analysis.	5.86E-24
ENK_UV_RESPONSE_EPIDERMIS_DN	Genes down-regulated in epidermis after to UVB irradiation.	2.34E-21
ZWANG_CLASS_1_TRANSIENTLY_INDUCED_BY_EGF	Class I of genes transiently induced by EGF [GeneID =1950] in 184A1 cells (mammary epithelium).	3.89E-21
DACOSTA_UV_RESPONSE_VIA_ERCC3_DN	Genes down-regulated in fibroblasts expressing mutant forms of ERCC3 [GeneID=2071] after UV irradiation.	1.02E-20
NUYTEN_EZH2_TARGETS_UP	Genes up-regulated in PC3 cells (prostate cancer) after knockdown of EZH2 [GeneID=2146] by RNAi.	6.16E-20
CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_BASAL_DN	Genes down-regulated in luminal-like breast cancer cell lines compared to the basal-like ones.	6.96E-20
KIM_WT1_TARGETS_UP	Genes up-regulated in UB27 cells (osteosarcoma) at any time point after inducing the expression of a mutant form of WT1 [GeneID=7490].	7.04E-20
BUYTAERT_PHOTODYNAMIC_THERAPY_STRESS_UP	Genes up-regulated in T24 (bladder cancer) cells in response to the photodynamic therapy (PDT) stress.	7.06E-20
ONDER_CDH1_TARGETS_2_DN	Genes down-regulated in HMLE cells (immortalized nontransformed mammary epithelium) after E-cadherin (CDH1) [GeneID=999] knockdown by RNAi.	1.24E-19
BLALOCK_ALZHEIMERS_DISEASE_UP	Genes up-regulated in brain from patients with Alzheimer's disease.	6.31E-19
DACOSTA_UV_RESPONSE_VIA_ERCC3_COMMON_DN	Common down-regulated transcripts in fibroblasts expressing either XP/CS or TDD mutant forms of ERCC3 [GeneID=2071], after UVC irradiation.	3.65E-18
NAGASHIMA_NRG1_SIGNALING_UP	Genes up-regulated in MCF7 cells (breast cancer) after stimulation with NRG1 [GeneID=3084].	4.09E-18
SENESE_HDAC1_TARGETS_UP	Genes up-regulated in U2OS cells (osteosarcoma) upon knockdown of HDAC1 [GeneID=3065] by RNAi.	6.95E-18
DURCHDEWALD_SKIN_CARCINOGENESIS_DN	Genes down-regulated upon skin specific knockout of FOS [GeneID=2353] by cre-lox in the K5-SOS-F mice (express a constitutively active form of SOS1 [GeneID=6654] in the skin).	9.64E-18
KRIEG_HYPOXIA_NOT_VIA_KDM3A	Genes induced under hypoxia independently of KDM3A [GeneID=55818] in RCC4 cells (renal carcinoma) expressing VHL [GeneID=7428].	2.54E-17
FORTSCHEGGER_PHF8_TARGETS_DN	Genes down-regulated in HeLa cells (cervical carcinoma) upon knockdown of PHF8 [GeneID=23133] by RNAi.	4.52E-17
JIANG_HYPOXIA_NORMAL	Genes up-regulated in RPTEC cells (normal kidney) by hypoxia.	4.06E-16

Figure 10: *UPAT* によって発現制御される遺伝子の探索

大腸癌細胞 HCT116 に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制した。トランスフェクションから 72 時間後に細胞から RNA を回収し、Illumina Hiseq2000 を用いて RNA-seq 解析を行った。次に、*UPAT* の発現抑制により 2 倍以上発現が減少する遺伝子リストに対して GSEA 解析を行い、結果を図に示した。

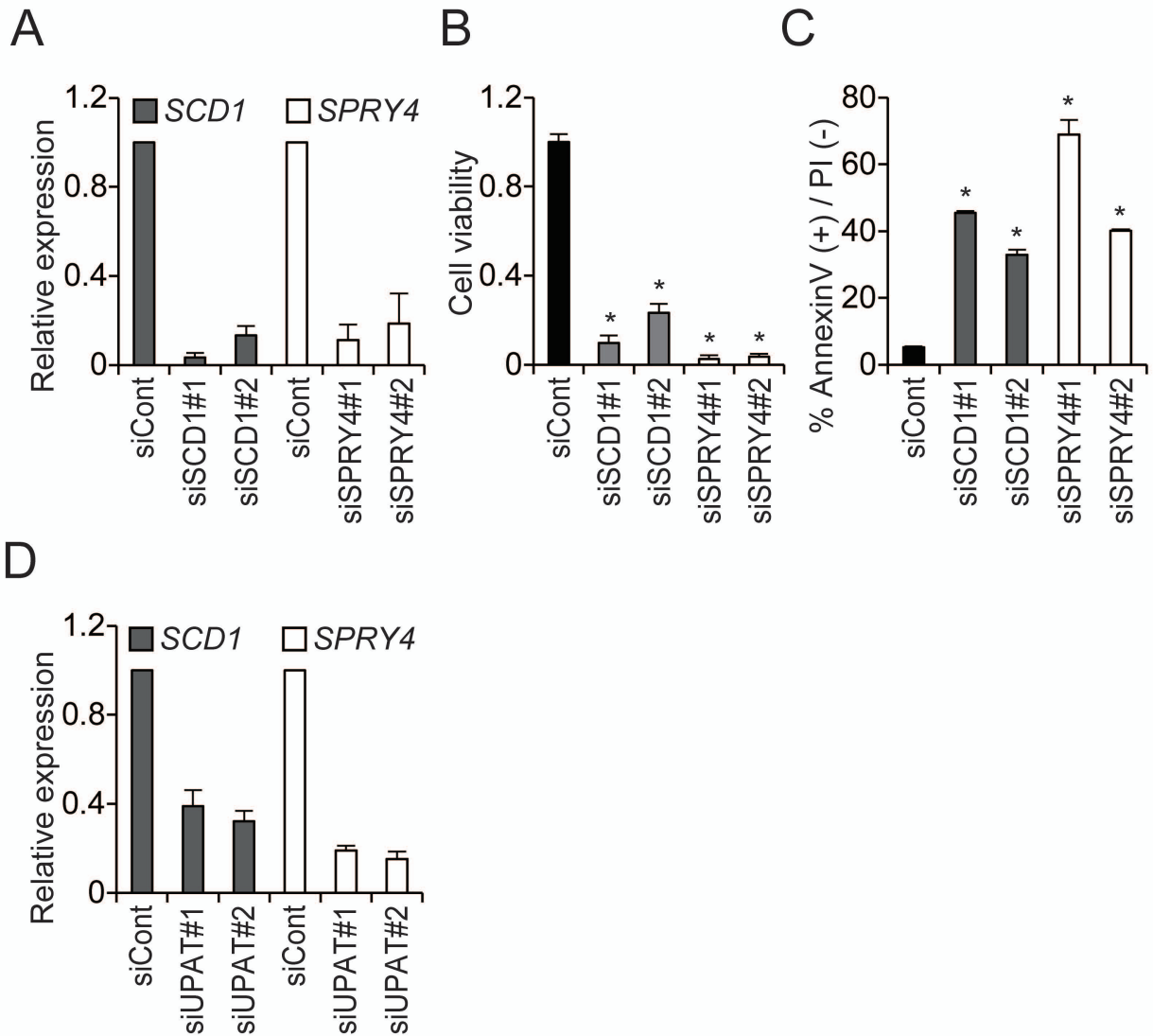


Figure 11: *SCD1* 及び *SPRY4* の発現は *UPAT* によって制御され、HCT116 細胞の増殖及びアポトーシスに関与する

(A) 大腸癌細胞 HCT116 に対して *SCD1* 及び *SPRY4* に対する siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクションから 72 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR により発現抑制効率を算出した。internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(B) 各細胞株の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより検出した。

(C) トランスフェクションから 96 時間後に AnnexinV アッセイを行い、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。

(D) HCT116 細胞に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制した。トランスフェクションから 72 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR により *SCD1* 及び *SPRY4* の発現変化を見た。internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(A~D) Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\* $P < 0.05$

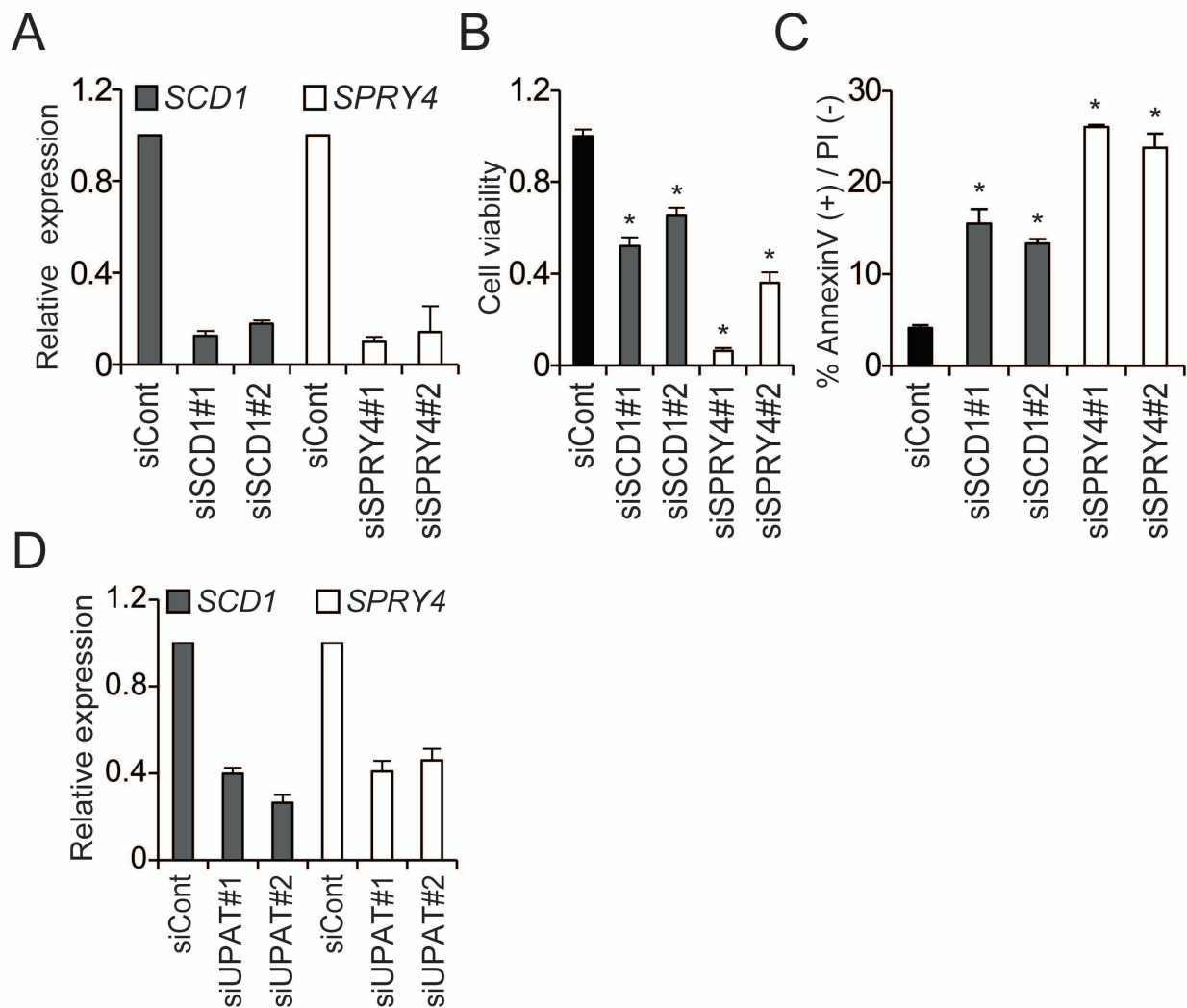


Figure 12: *SCD1* 及び *SPRY4* の発現は *UPAT* によって制御され、CCSC#P 細胞の増殖及びアポトーシスに参与する

(A) CCSC#P 細胞に対して *SCD1* 及び *SPRY4* に対する siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクションから 72 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR により発現抑制効率を算出した。internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(B) 各細胞株の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより検出した。

(C) トランスフェクションから 96 時間後に AnnexinV アッセイを行い、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。

(D) CCSC#P 細胞に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制した。トランスフェクションから 72 時間後に RNA を回収し、qRT-PCR により *SCD1* 及び *SPRY4* の発現変化を見た。internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。

(A~D) Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\* $P < 0.05$

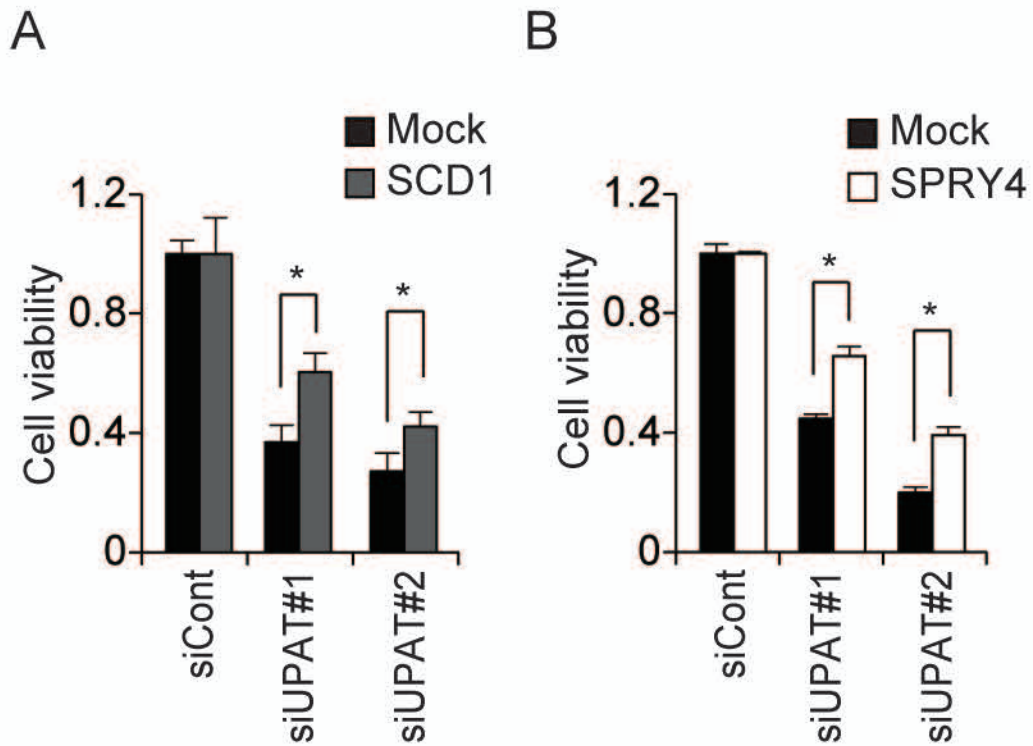
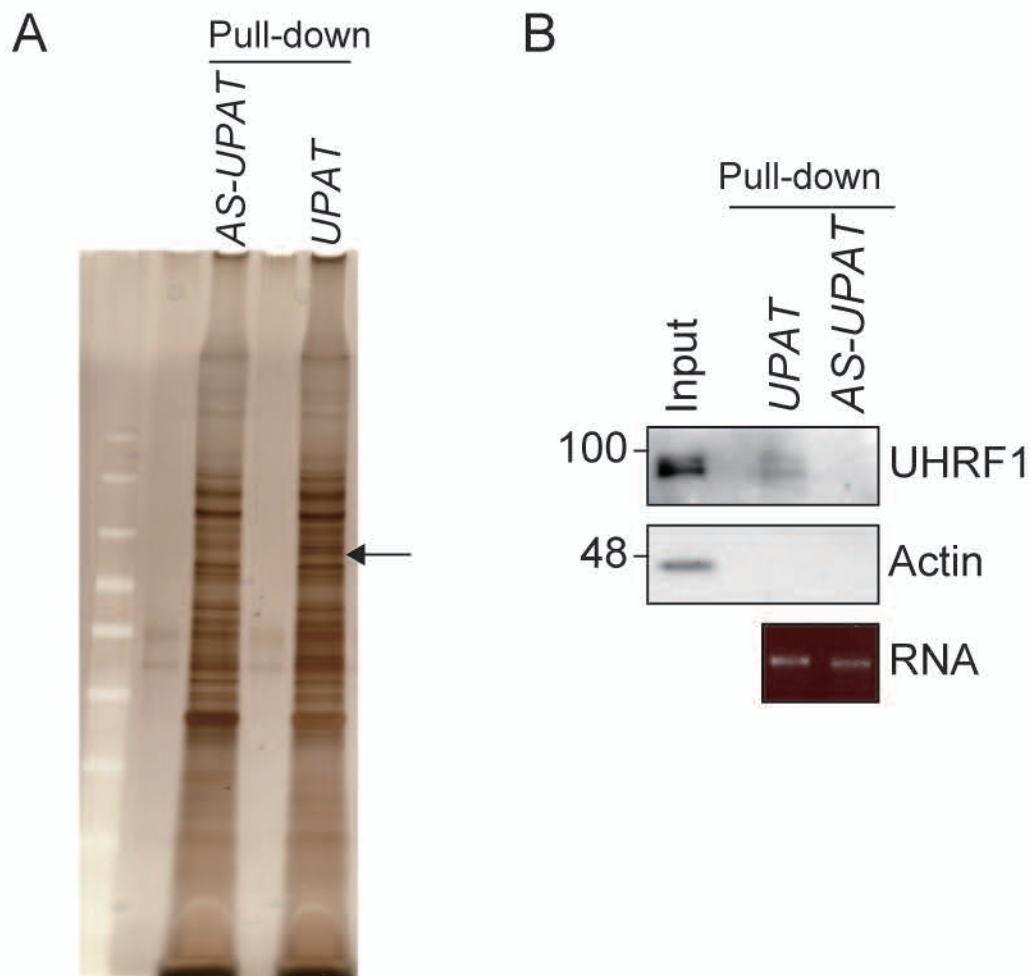


Figure 13: siUPAT による増殖抑制効果は SCD1 または SPRY4 の過剰発現により部分的にレスキューされる

大腸癌細胞 HCT116 に対して SCD1 発現ベクター (A) または SPRY4 発現ベクター (B) と pMACS K<sup>k</sup> II をコトランスフェクションし、24 時間後に MACS でポジティブ細胞のみを回収し、培養プレートにまきなおした。その更に 24 時間後に UPAT に対する siRNA 及び control siRNA をトランスフェクションした。siRNA トランスフェクションから 72 時間後に HCT116 細胞の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより検出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\*P < 0.05





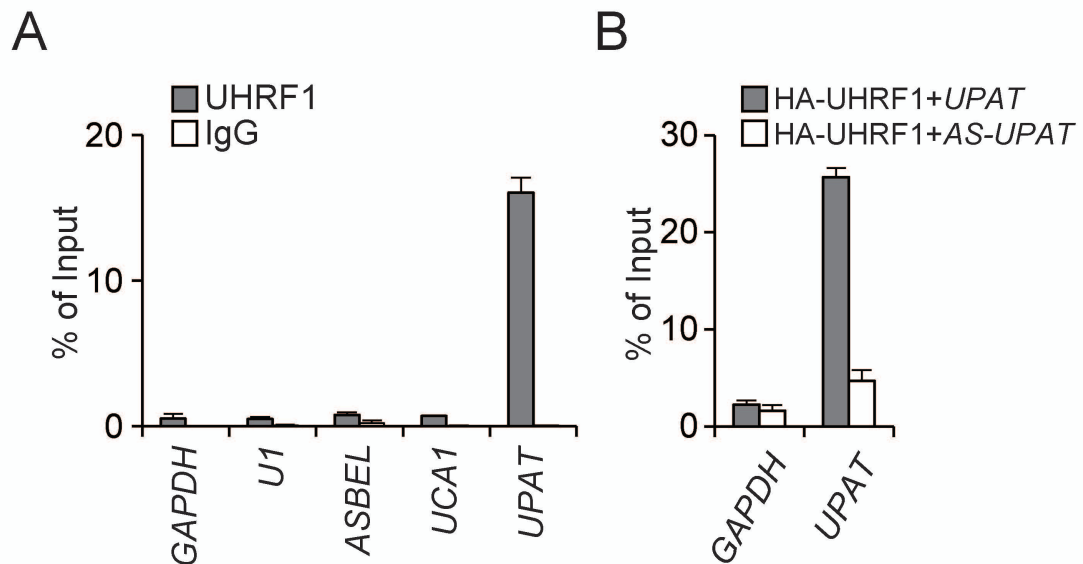
### Figure 14: *UPAT* 結合タンパク質の探索

大腸癌細胞 HCT116 の核タンパク質抽出液及びビオチン標識した *UPAT* を用いてプルダウン実験を行い、*UPAT* に結合するタンパク質を回収した。

(A) プルダウンされたタンパク質を SDS-PAGE 及び銀染色により検出した。ネガティブコントロールとしてはアンチセンス鎖の *UPAT* (*AS-UPAT*) を用いた。

矢印は *UPAT* 特異的な泳動バンドの位置を指し示す。

(B) プルダウンされたタンパク質を、抗 UHRF1 抗体または抗 Actin 抗体を用いたウェスタンブロットングにより検出した。Actin はネガティブコントロールとして用いた。ウェスタンブロット図の下に、プルダウンに用いたビオチン標識 RNA の泳動図を示した。



### Figure 15: UHRF1 は *UPAT* に結合する

大腸癌細胞 HCT116 の細胞溶解液を用いて、Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (RIP) アッセイを行い、UHRF1 と *UPAT* の結合検証を行った。

(A) 抗 UHRF1 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈されてきた RNA を qRT-PCR により解析した。*GAPDH* mRNA、*U1* snRNA、*ASBEL* lncRNA 及び *UCA1* lncRNA はネガティブコントロールとして用いた。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

(B) HCT116 細胞に HA-UHRF1 発現ベクター及び *UPAT* または *AS-UPAT* 発現ベクターをコトランスフェクションした。24 時間後に抗 HA 抗体を用いて RIP アッセイを行い、HA-UHRF1 と *UPAT* または *AS-UPAT* との結合力を比較した。*GAPDH* mRNA はネガティブコントロールとして用いた。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

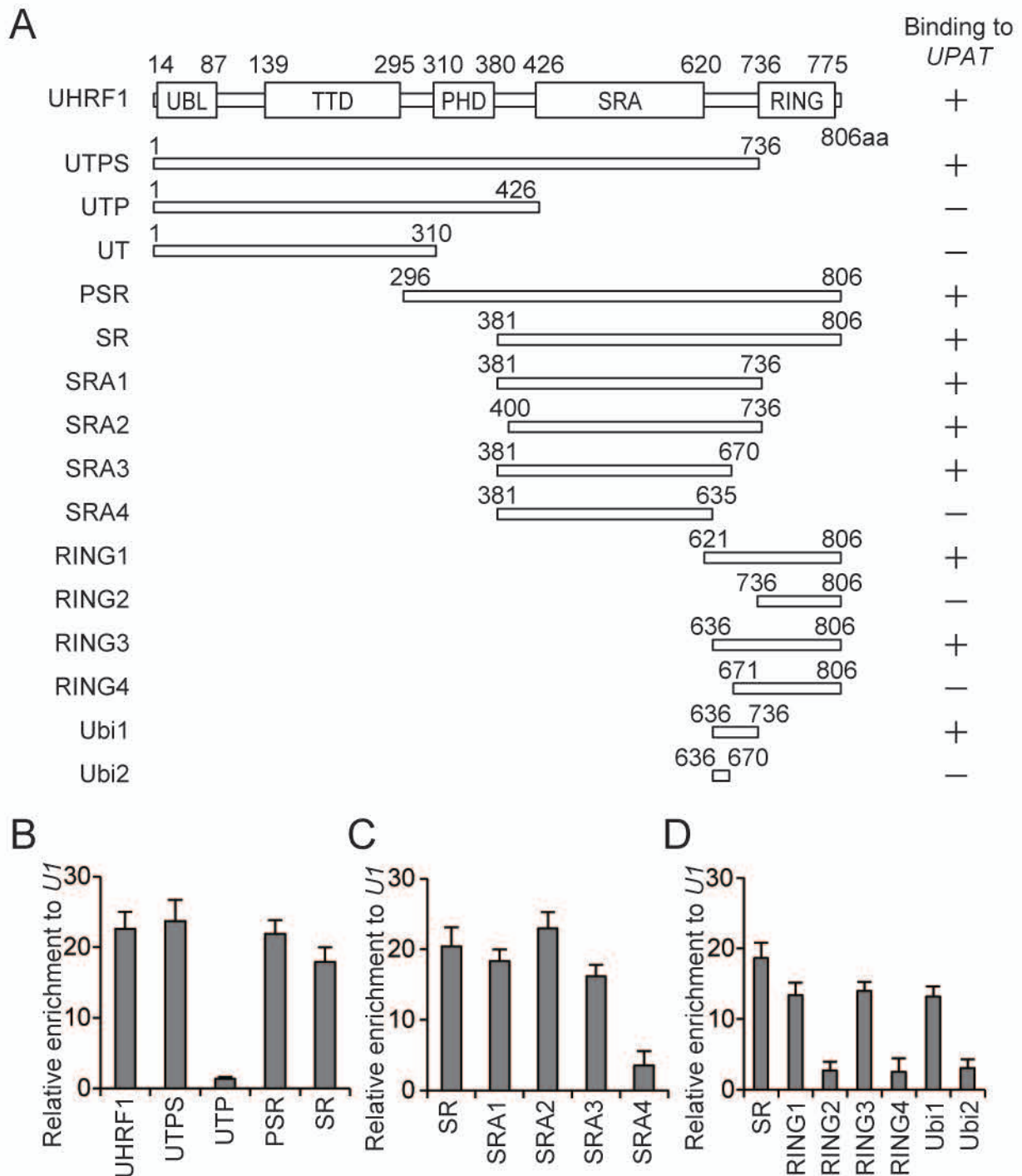


Figure 16: *UPAT* は UHRF1 の 636-736 アミノ酸領域に結合する

(A) UHRF1 の欠失変異体の模式図を示す。UHRF1 には UBL (ubiquitin-like domain), TTD (tandem tudor domain), PHD (plant homeodomain), SRA (SET and RING-associated domain), 及び RING (really interesting new gene) ドメインが存在する。右に *UPAT* との結合の有無を示した。

(B-D) 大腸癌細胞 HCT116 に対して野生型 UHRF1 または UHRF1 欠失変異体発現ベクターをトランスフェクションした (B に用いたコンストラクトの UHRF1 には HA タグ、C 及び D に用いた UHRF1 には Flag タグが付加されている)。24 時間後に抗 HA または抗 Flag 抗体を用いて RIP アッセイを行い、*U1* snRNA を基準とした *UPAT* に対する相対結合力を算出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

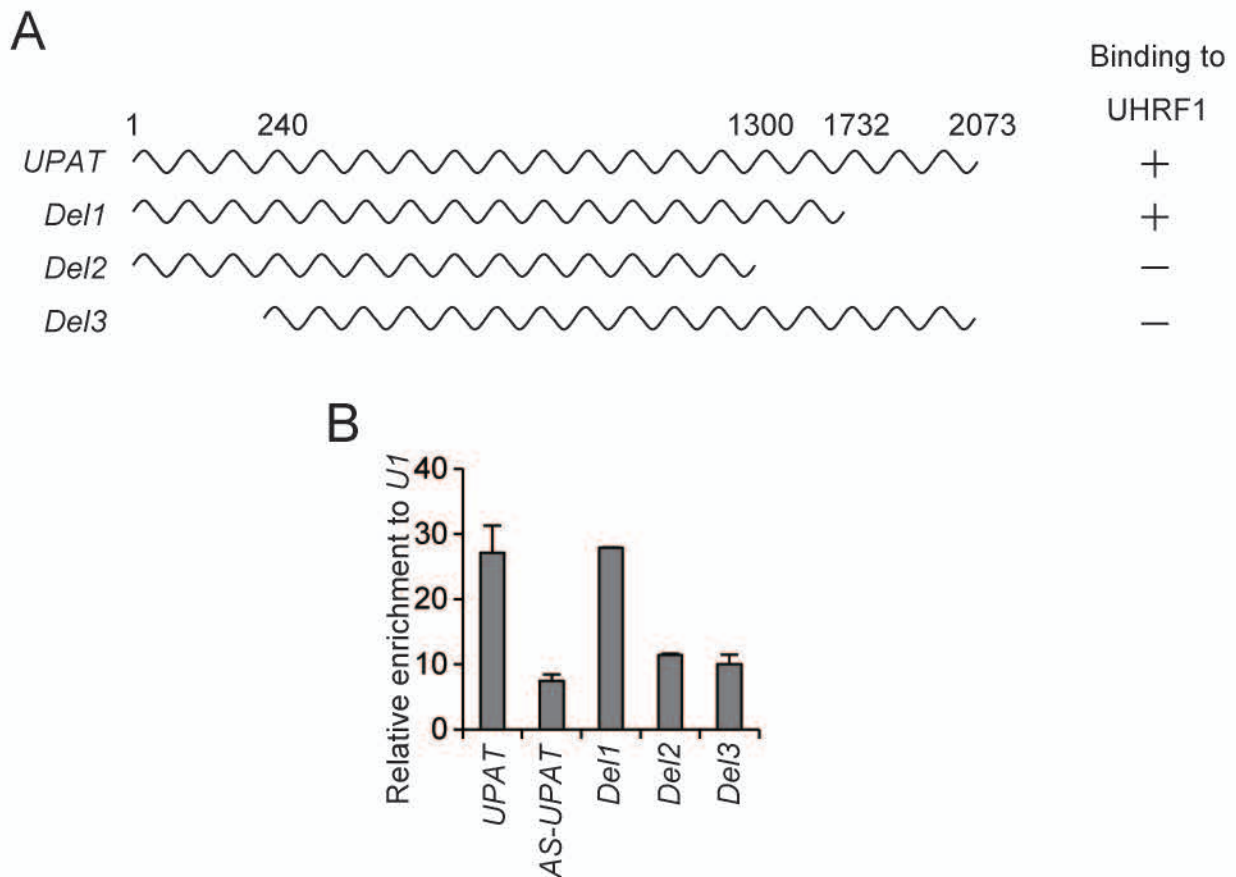


Figure 17: *UPAT* の 5' 及び 3' 領域が UHRF1 との結合に重要である

(A) *UPAT* の欠失変異体の模式図。

(B) 大腸癌細胞 HCT116 に対して野生型 *UPAT* または *UPAT* 欠失変異体発現ベクターと HA-UHRF1 発現ベクターをコトランスフェクションした。24 時間後に抗 HA 抗体を用いて RIP アッセイを行い、*U1* snRNA を基準とした *UPAT* に対する相対結合力を算出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

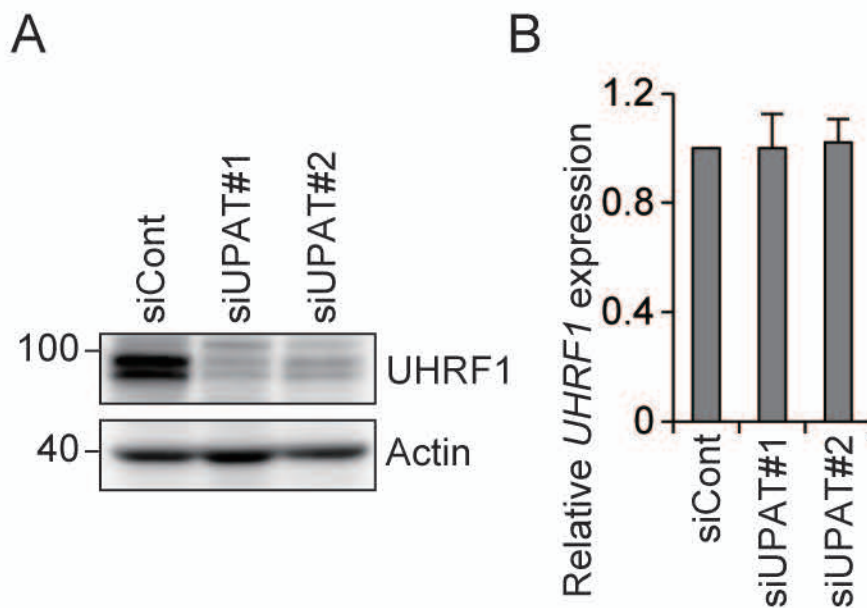


Figure 18: *UPAT* の発現を抑制すると UHRF1 タンパク質が減少する  
 大腸癌細胞 HCT116 に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制した。トランスフェクションから 72 時間後にタンパク質及び RNA を回収し、それぞれウェスタンブロッティング (A)、qRT-PCR (B) を行い UHRF1 の発現量を検出した。タンパク質の loading control として Actin, qRT-PCR の internal control としては  $\beta$ -actin mRNA を用いた。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

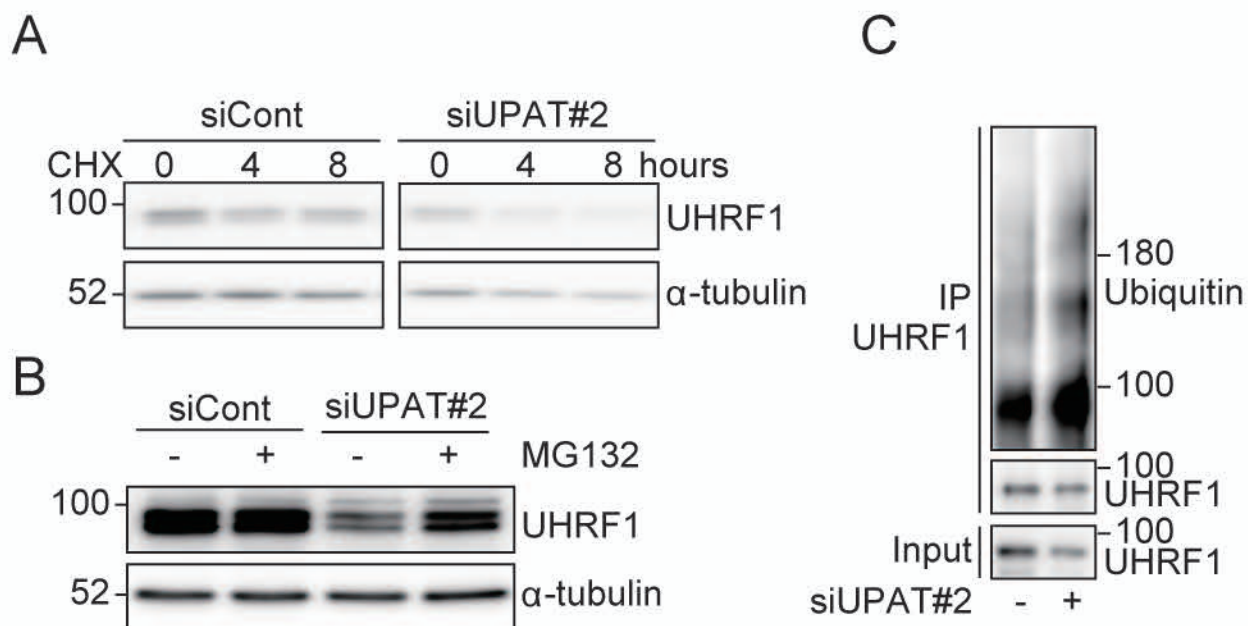


Figure 19: *UPAT* の発現を抑制すると、UHRF1 のユビキチン化亢進とプロテアソーム依存的なタンパク質分解が起こる

大腸癌細胞 HCT116 に対して siRNA を用いて *UPAT* の発現を抑制し、UHRF1 タンパク質の安定性に与える影響を検討した。

(A) トランスフェクションから 66 時間後に cycloheximide (終濃度 10  $\mu$ M) を培地に添加しタンパク質の合成を阻害し、4 または 8 時間後に細胞からタンパク質を回収してウェスタンブロットングにかけることで、UHRF1 タンパク質の安定性を確認した。

loading control として  $\alpha$ -tubulin を用いた。

(B) トランスフェクションから 69 時間後にプロテアソーム阻害剤 MG132 (終濃度 10  $\mu$ M) を培地に添加し、さらに 3 時間後に細胞からタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法で UHRF1 タンパク質量の変化を確認した。loading control として  $\alpha$ -tubulin を用いた。

(C) トランスフェクションから 77 時間後にプロテアソーム阻害剤 MG132 を培地に添加し、さらに 3 時間後に細胞からタンパク質を回収し、抗 UHRF1 抗体を用いて免疫沈降を行った。回収したタンパク質に対して、抗 UHRF1 抗体及び抗 Ubiquitin 抗体を用いたウェスタンブロットングを行い、UHRF1 のユビキチン化状態を確認した。

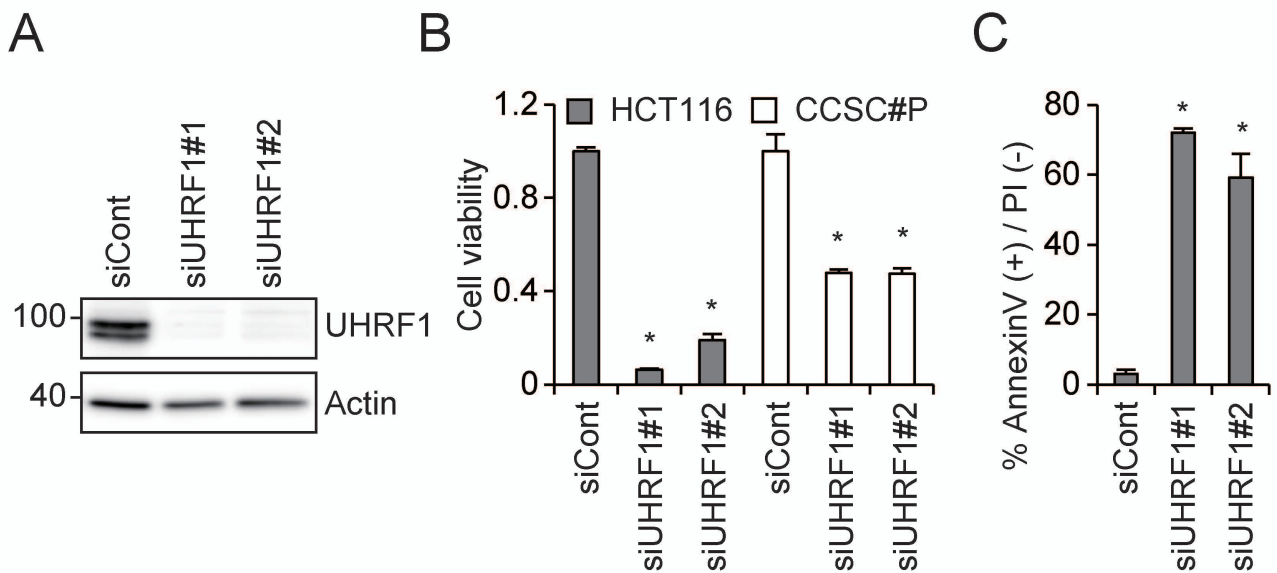


Figure 20: UHRF1 の発現を抑制すると、大腸癌細胞の増殖が抑えられ、アポトーシスが誘導される

(A) トランスフェクションから 72 時間後に HCT116 細胞からタンパク質を回収し、ウェスタンブロットングにより UHRF1 の発現抑制効率を確認した。loading control として Actin を用いた。

(B) トランスフェクションから 72 時間後の HCT116 及び CCSC#P 細胞の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより算出した。

(C) トランスフェクションから 96 時間後の HCT116 細胞に対して AnnexinV アッセイを行い、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。

(B, C) Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\*P < 0.05

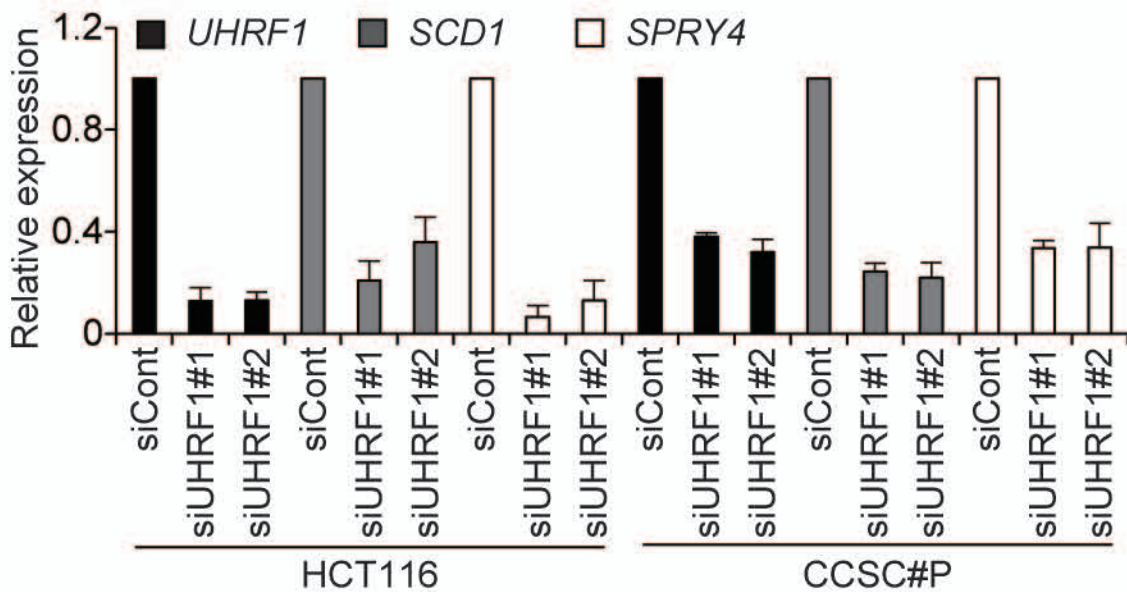


Figure 21: UHRF1 の発現を抑制すると、SCD1 及び SPRY4 の発現が減少する

大腸癌細胞 HCT116 及び CCSC#P に対して siRNA を用いて UHRF1 の発現を抑制し、SCD1 及び SPRY4 の発現に与える影響を検討した。

トランスフェクションから 72 時間後に各々の細胞から RNA を回収し、qRT-PCR により UHRF1, SCD1, SPRY4 の発現量を算出した。internal control として  $\beta$ -actin mRNA を用いた。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。



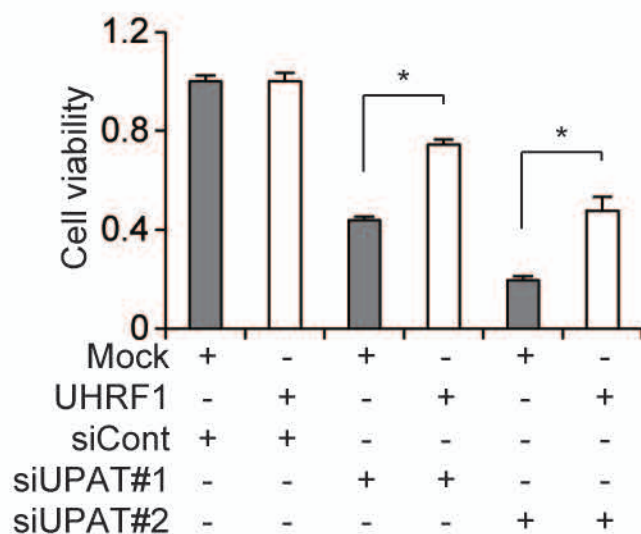


Figure 22: siUPAT による増殖抑制効果は UHRF1 を過剰発現することにより部分的にレスキューされる

大腸癌細胞 HCT116 に対して UHRF1 発現ベクターと pMACS K<sup>+</sup> II をコトランスフェクションし、24 時間後に MACS でポジティブ細胞のみを回収し、培養プレートにまきなおした。更に 24 時間後に UPAT に対する siRNA 及び control siRNA をトランスフェクションした。siRNA トランスフェクションから 72 時間後に細胞の生存率を Cell Titer-Glo アッセイにより算出した。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。\*P < 0.05

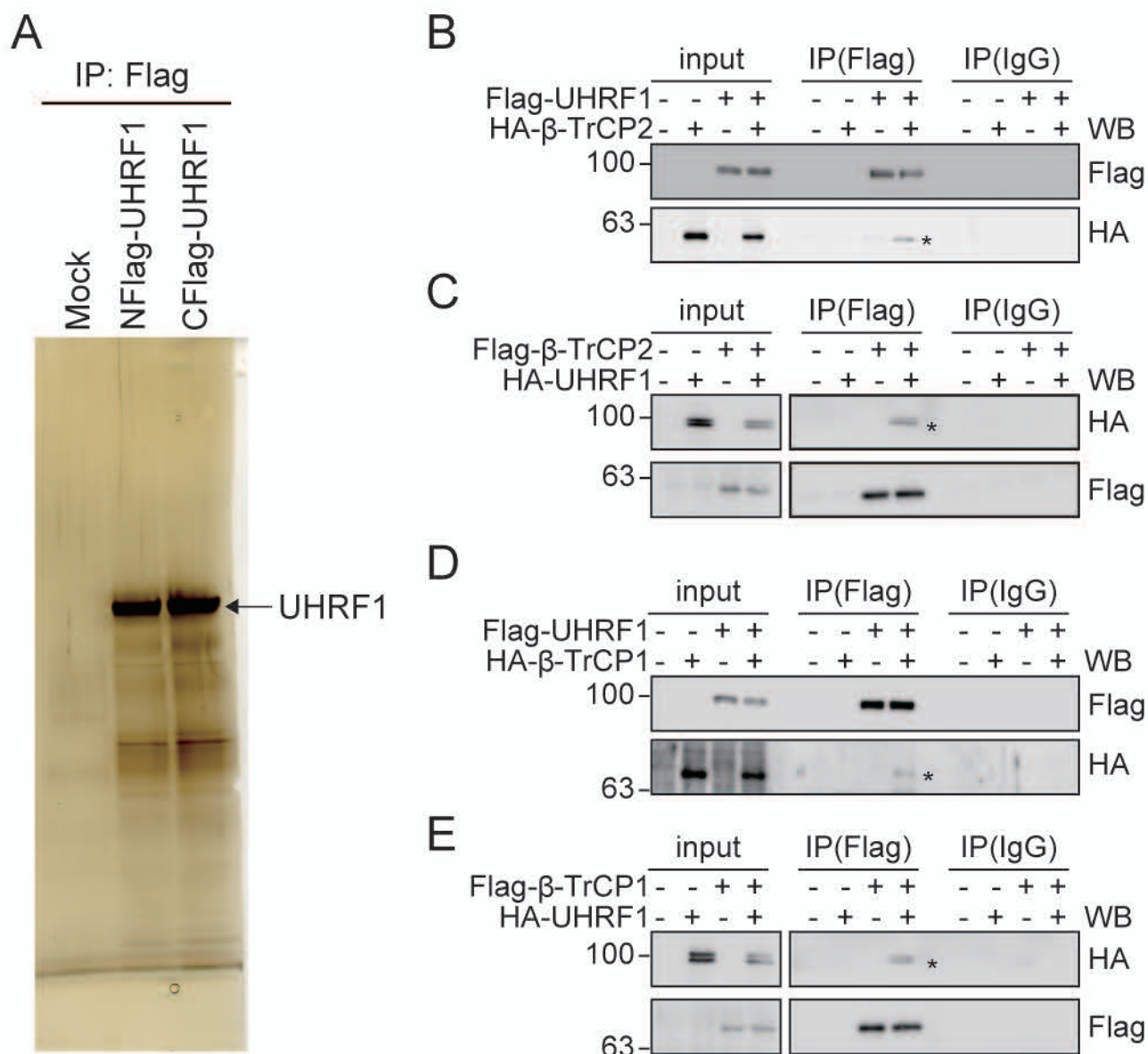


Figure 23: F-box タンパク質β-TrCP1 及びβ-TrCP2 は UHRF1 に結合する

(A) 大腸癌細胞 HCT116 に対して Flag-UHRF1 発現ベクターまたは空ベクターをトランスフェクションし、24 時間後の細胞溶解液と抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。

Flag ペプチドにより競合的に溶出された共沈タンパク質は SDS-PAGE 及び銀染色により検出した。矢印は UHRF1 を表す。

(B, D) 大腸癌細胞 HCT116 に対して Flag-UHRF1 発現ベクター及び HA-β-TrCP1 または HA-β-TrCP2 発現ベクターをコトランスフェクションし、24 時間後に MG132 処理を加え、さらに 3 時間後の細胞溶解液に対して、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈タンパク質に対して抗 Flag 抗体または抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。\*は共沈バンドを示す。

(C, E) 293FT 細胞に対して HA-UHRF1 発現ベクター及び Flag-β-TrCP1 または Flag-β-TrCP2 発現ベクターをコトランスフェクションし、24 時間後に MG132 処理を加え、さらに 3 時間後の細胞溶解液に対して、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈タンパク質に対して抗 Flag 抗体または抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。\*は共沈バンドを示す。

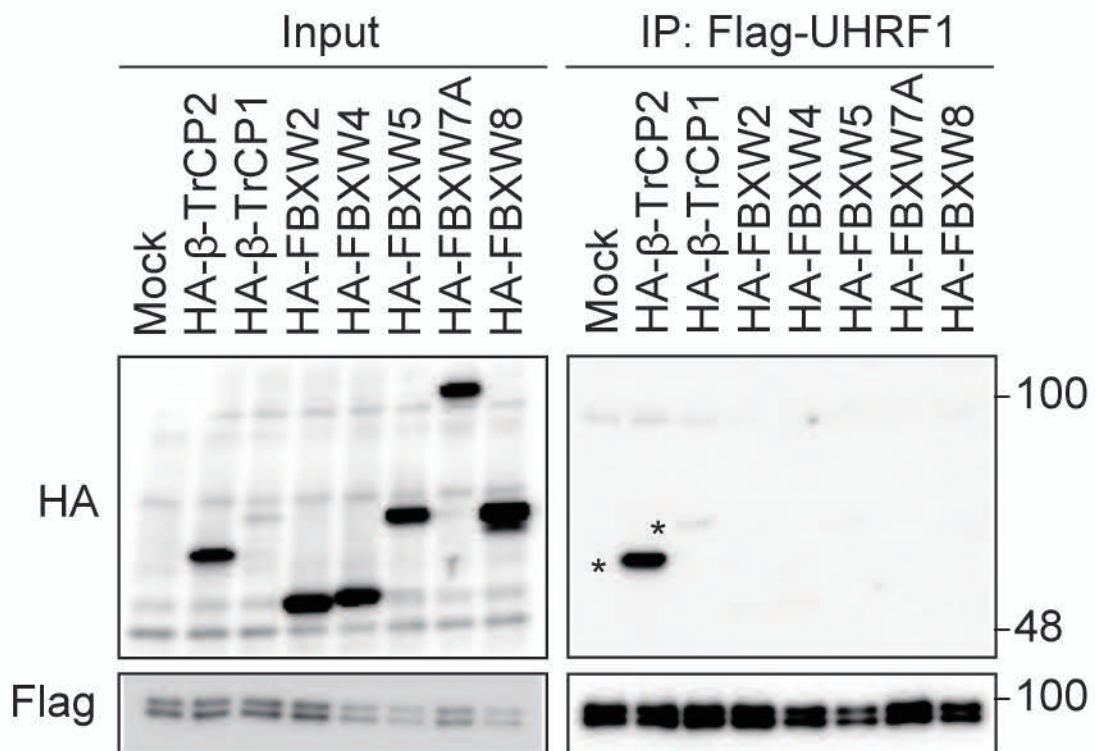
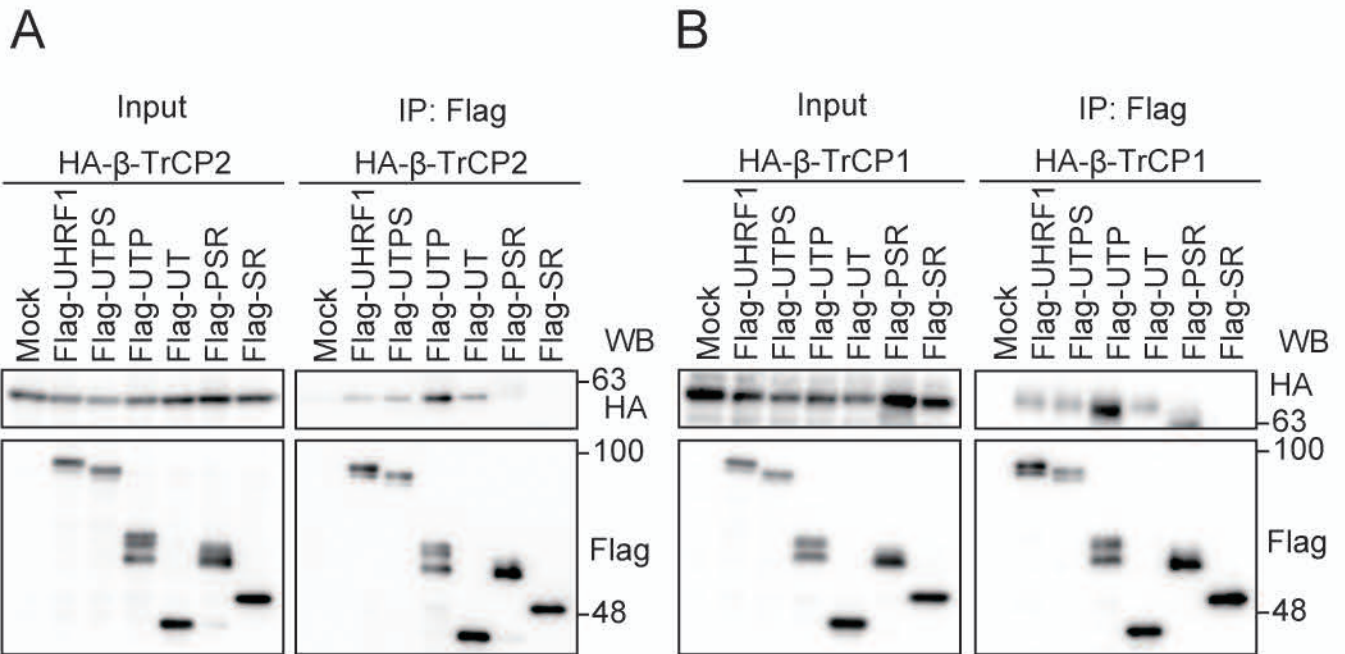


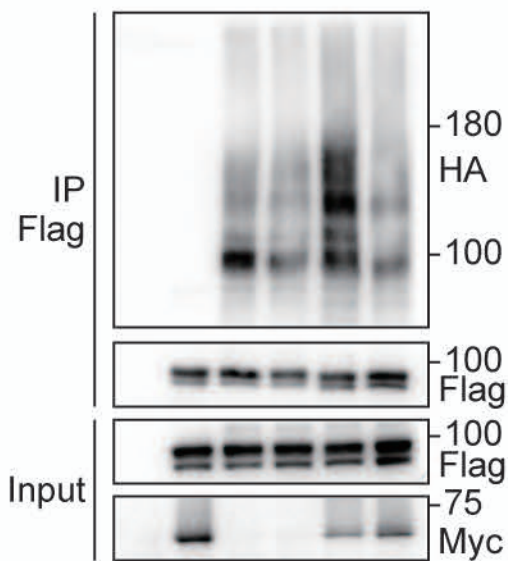
Figure 24: F-box タンパク質 FBXW2, 4, 5, 7A, 8 は UHRF1 に結合しない  
 293FT 細胞に対して Flag-UHRF1 発現ベクター及び HA-F-box proteins ( $\beta$ -TrCP1, 2, FBXW2, 4, 5, 7A, 8) をコトランスフェクションし、24 時間後の細胞溶解液に対して抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈タンパク質に対して抗 Flag 抗体または抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。\*は共沈バンドを示す。



**Figure 25:  $\beta$ -TrCP1 及び  $\beta$ -TrCP2 は UHRF1 の N 末端領域に結合する**  
 (A) 293FT 細胞に対して HA- $\beta$ -TrCP2 発現ベクター及び空ベクターまたは Flag-UHRF1 欠失変異体発現ベクターをコトランスフェクションし、24 時間後の細胞溶解液に対して抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈タンパク質に対して抗 Flag 抗体または抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。  
 (B) 同様の実験を HA- $\beta$ -TrCP1 を用いて行った。

A

HA-Ubiquitin	+	-	+	+	+	+
Flag-UHRF1	-	+	+	+	+	+
Myc- $\beta$ -TrCP2	-	+	-	-	+	+
<i>UPAT</i>	-	-	-	+	-	+



B

HA-Ubiquitin	+	-	+	+	+	+
Flag-UHRF1	-	+	+	+	+	+
Myc- $\beta$ -TrCP1	-	+	-	-	+	+
<i>UPAT</i>	-	-	-	+	-	+

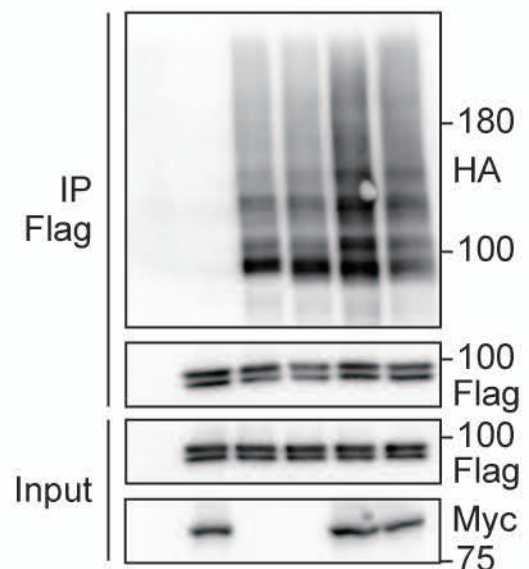


Figure 26:  $\beta$ -TrCP1 または $\beta$ -TrCP2 の過剰発現により UHRF1 のユビキチン化が亢進し、*UPAT* を共発現させることによりそのユビキチン化が阻害される

(A) 293FT 細胞に対して図に示した発現コンストラクトをコトランスフェクションして 45 時間後に MG132 を加え、さらに 3 時間後に細胞を溶解し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。抗 Flag 抗体または抗 HA 抗体、抗 Myc 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(B) 同様の実験を Myc- $\beta$ -TrCP1 を用いて行った。

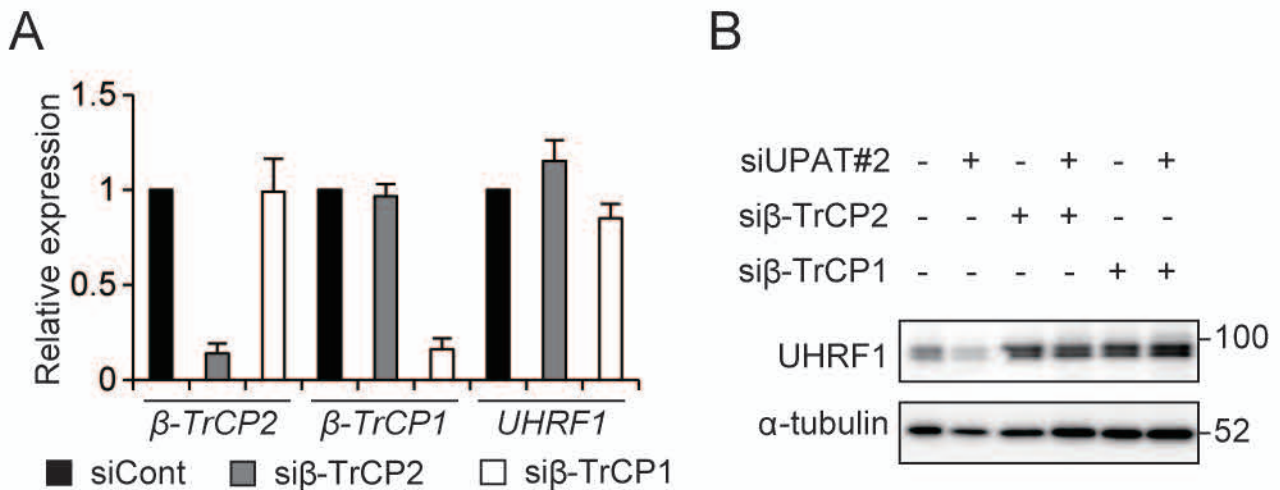


Figure 27:  $\beta$ -TrCP1 または $\beta$ -TrCP2 の発現を抑制すると、siUPAT によって引き起こされる UHRF1 タンパク質の減少が抑えられる

(A) HCT116 細胞に対して siRNA を用いて $\beta$ -TrCP1 または $\beta$ -TrCP2 の発現を抑制した。トランスフェクションから 72 時間後に細胞から RNA を回収し、qRT-PCR により $\beta$ -TrCP1 及び $\beta$ -TrCP2, UHRF1 mRNA の発現量を検出した。internal control として $\beta$ -actin mRNA を用いた。Error bar は標準偏差を表す (n = 3)。

(B) HCT116 細胞において $\beta$ -TrCP1 または $\beta$ -TrCP2 に対する siRNA と UPAT に対する siRNA または control siRNA をコトランスフェクションし、72 時間後に細胞からタンパク質を回収し、抗 UHRF1 抗体及び抗 $\alpha$ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。loading control として $\alpha$ -tubulin を用いた。

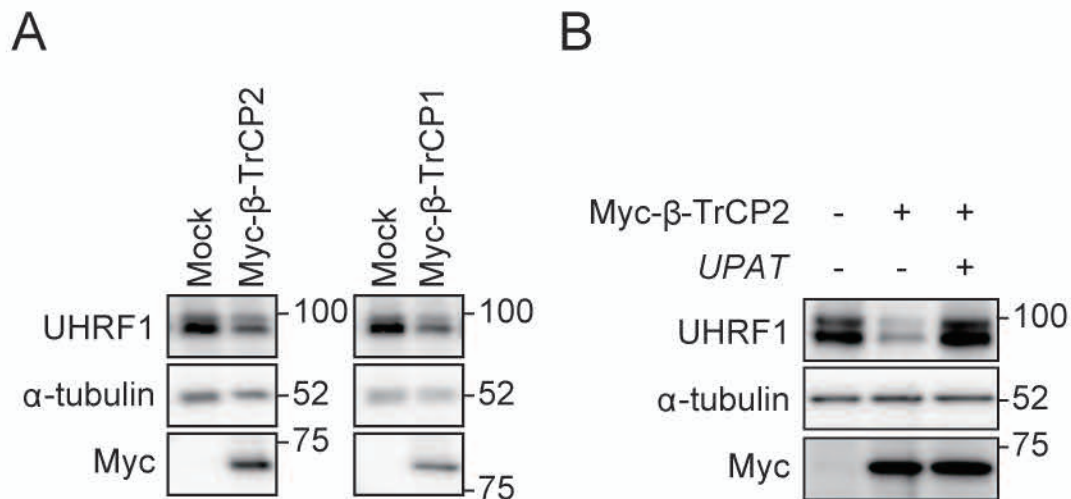


Figure 28:  $\beta$ -TrCP1 または  $\beta$ -TrCP2 を過剰発現すると UHRF1 タンパク質量が減少し、同時に UPAT を過剰発現すると、UHRF1 タンパク質量の減少が抑えられる

(A) HCT116 細胞に対して Myc- $\beta$ -TrCP1 または Myc- $\beta$ -TrCP2 発現ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞からタンパク質を回収し、抗 UHRF1 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体及び抗 Myc 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

loading control として  $\alpha$ -tubulin を用いた。

(B) HCT116 細胞に対して Myc- $\beta$ -TrCP2 発現ベクター及び UPAT 発現ベクターをコトランスフェクションし、48 時間後に細胞からタンパク質を回収し、抗 UHRF1 抗体、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体および抗 Myc 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

loading control として  $\alpha$ -tubulin を用いた。

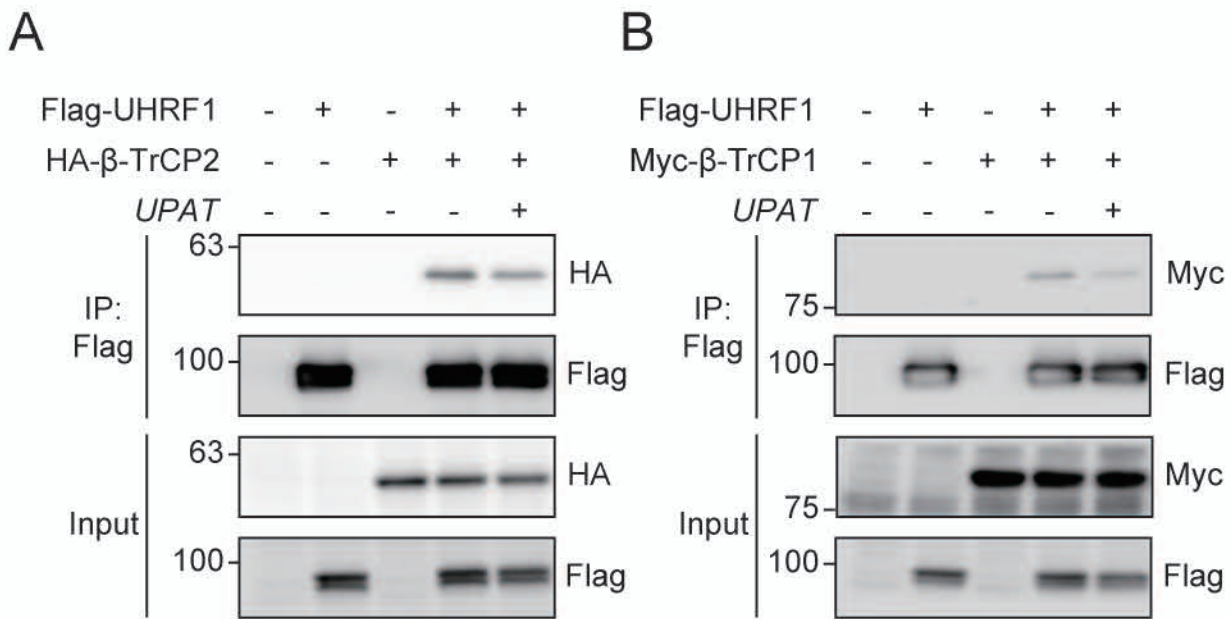


Figure 29: *UPAT*を過剰発現すると、UHRF1とβ-TrCP1またはβ-TrCP2との結合が減弱する

(A) HCT116細胞に対してFlag-UHRF1, HA-β-TrCP2及び*UPAT*発現ベクターをコトランスフェクションし、24時間後の細胞溶解液に対して抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、抗Flag抗体及び抗HA抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(B) 同様の実験をMyc-β-TrCP1を用いて行った。



A

```

          636 639                                657 659 661 663                                670
UHRF1-WT  ENSKREEEEEQEGGFASPRTGKGKWKRKSAGGGPS
UHRF1-639KR ENSRREEEEEQEGGFASPRTGKGKWKRKSAGGGPS
UHRF1-657KR ENSKREEEEEQEGGFASPRTGRGKWKRKSAGGGPS
UHRF1-659KR ENSKREEEEEQEGGFASPRTGKGRWKRRKSAGGGPS
UHRF1-661KR ENSKREEEEEQEGGFASPRTGKGKWRRKSAGGGPS
UHRF1-663KR ENSKREEEEEQEGGFASPRTGKGKWKRRSAGGGPS
  
```

B

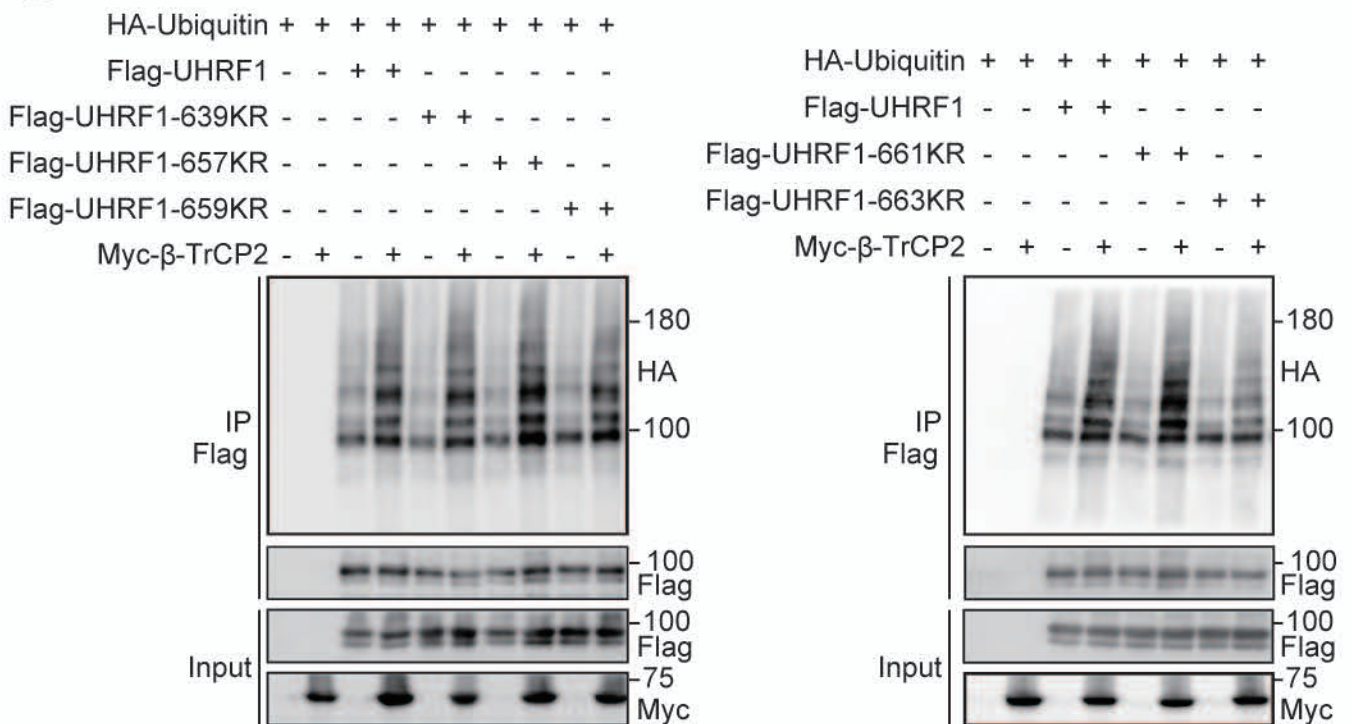


Figure 30: UHRF1-K663R 変異体はβ-TrCP2 過剰発現による  
ユビキチン化亢進に対して抵抗性を示す

(A) UHRF1 の 1 アミノ酸置換変異体の模式図。UHRF1 の 636-670 アミノ酸領域に存在する  
リジン残基 (赤) をアルギニン残基 (緑) に置換した変異体を 5 つ用意した。

(B) 293FT 細胞に対して図に示した発現コンストラクトをコトランスフェクションして 45  
時間後に MG132 を加え、さらに 3 時間後に細胞を溶解し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降  
を行った。その後、抗 Flag 抗体、抗 HA 抗体及び抗 Myc 抗体を用いてウェスタンブロッ  
ティングを行った。

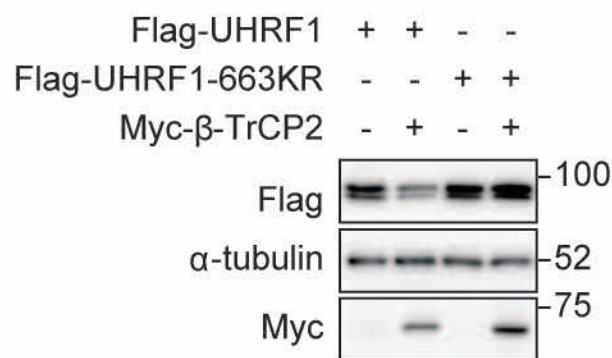


Figure 31: UHRF1-K663R 変異体は $\beta$ -TrCP2 過剰発現によるタンパク質減少に対して抵抗性を示す

293FT 細胞に対して Myc- $\beta$ -TrCP2 発現ベクター及び Flag-UHRF1 または Flag-UHRF1-663KR 発現ベクターをコトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞からタンパク質を回収し、抗 Flag 抗体、抗 Myc 抗体及び抗 $\alpha$ -tubulin 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。loading control として $\alpha$ -tubulin を用いた。

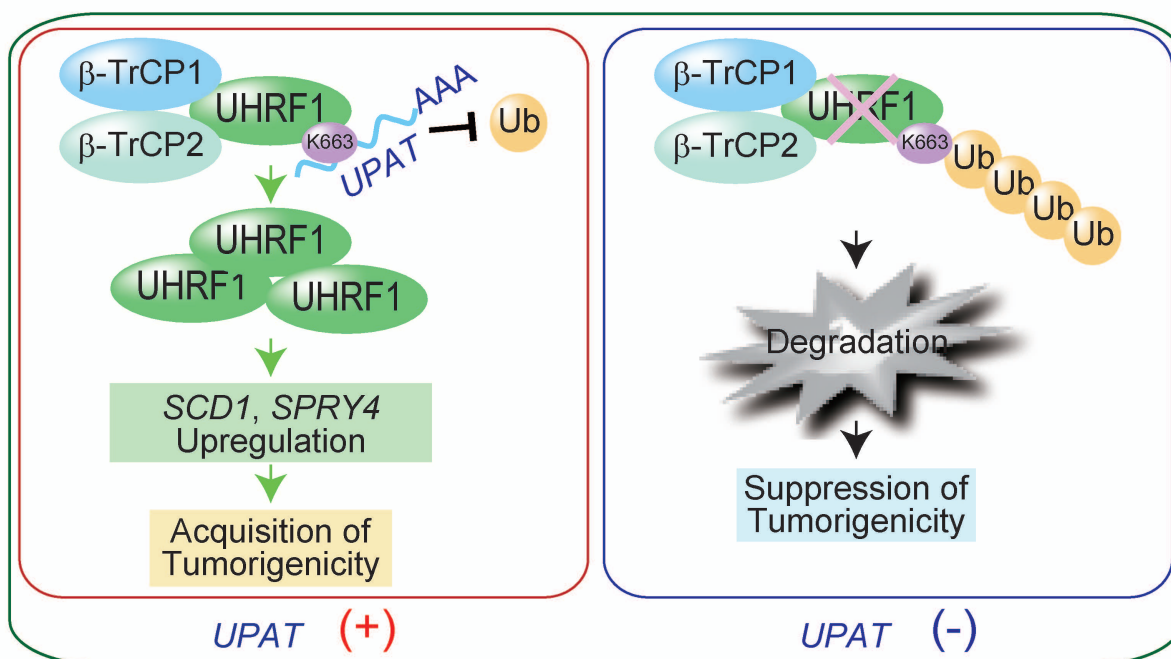


Figure 32: *UPAT*はUHRF1の分解を阻害することにより  
大腸癌細胞の増殖と造腫瘍性に寄与する (モデル図)

*UPAT*はUHRF1に結合し、β-TrCP1及びβ-TrCP2によるUHRF1のユビキチン化を阻害する。  
安定化したUHRF1は大腸癌細胞の生存に必要な*SCD1*や*SPRY4*遺伝子の発現を亢進する。

## 引用文献

- 1 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**: 860-921.
- 2 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG *et al.* The sequence of the human genome. *Science* 2001; **291**: 1304-1351.
- 3 Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, Snyder M, Gerstein MB. Annotating non-coding regions of the genome. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 559-571.
- 4 Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N *et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; **309**: 1559-1563.
- 5 Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; **447**: 799-816.
- 6 Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; **14 Spec No 1**: R121-132.
- 7 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215-233.
- 8 Luhrmann R, Kastner B, Bach M. Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1087**: 265-292.
- 9 Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 209-220.
- 10 Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K *et al.* MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 2010; **24**: 887-892.
- 11 Amaral PP, Mattick JS. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome* 2008; **19**:

- 454-492.
- 12 Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. RNAs as extracellular signaling molecules. *J Mol Endocrinol* 2008; **40**: 151-159.
  - 13 Mercer TR, Dinger ME, Mariani J, Kosik KS, Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs in Long-Term Memory Formation. *Neuroscientist* 2008; **14**: 434-445.
  - 14 Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* 2012; **338**: 1435-1439.
  - 15 Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 2013; **152**: 1298-1307.
  - 16 Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 2013; **154**: 26-46.
  - 17 Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 2014; **15**: 7-21.
  - 18 Flynn RA, Chang HY. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; **14**: 752-761.
  - 19 Yao B, Jin P. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. *Genes Dev* 2014; **28**: 1253-1271.
  - 20 Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 2012; **81**: 145-166.
  - 21 Chaumeil J, Le Baccon P, Wutz A, Heard E. A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev* 2006; **20**: 2223-2237.
  - 22 Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; **129**: 1311-1323.

- 23 Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F *et al.* Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 2010; **329**: 689-693.
- 24 Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**: 300-307.
- 25 Sabin LR, Delas MJ, Hannon GJ. Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. *Mol Cell* 2013; **49**: 783-794.
- 26 Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 2014; **157**: 77-94.
- 27 Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1839**: 1097-1109.
- 28 Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; **464**: 1071-1076.
- 29 Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D *et al.* A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 2010; **142**: 409-419.
- 30 Yanagida S, Taniue K, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Kobayashi M *et al.* ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma. *Sci Rep* 2013; **3**: 1305.
- 31 Bronner C, Krifa M, Mousli M. Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem Pharmacol* 2013; **86**: 1643-1649.
- 32 Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007; **317**: 1760-1764.
- 33 Qin W, Leonhardt H, Spada F. Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the

- maintenance DNA methyltransferase Dnmt1. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 439-444.
- 34 Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K *et al.* Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* 2013; **502**: 249-253.
- 35 Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, Sharma P, Pearsall D, Warner J *et al.* Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5621-5629.
- 36 Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S *et al.* DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal* 2010; **3**: ra80.
- 37 Citterio E, Papait R, Nicassio F, Vecchi M, Gomiero P, Mantovani R *et al.* Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 2526-2535.
- 38 Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L *et al.* The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene* 2012; **31**: 4878-4887.
- 39 Unoki M, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**: 98-105.
- 40 Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, Tsuchiya E, Hamamoto R, Nakamura Y. UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer. *Br J Cancer* 2010; **103**: 217-222.
- 41 Sabatino L, Fucci A, Pancione M, Carafa V, Nebbioso A, Pistore C *et al.* UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression. *Oncogene* 2012; **31**: 5061-5072.
- 42 Li XL, Xu JH, Nie JH, Fan SJ. Exogenous expression of UHRF1 promotes proliferation and metastasis of breast cancer cells. *Oncol Rep* 2012; **28**: 375-383.

- 43 Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 1983; **258**: 8206-8214.
- 44 Guardavaccaro D, Frescas D, Dorrello NV, Peschiaroli A, Multani AS, Cardozo T *et al.* Control of chromosome stability by the beta-TrCP-REST-Mad2 axis. *Nature* 2008; **452**: 365-369.
- 45 Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 438-449.
- 46 Lee EK, Diehl JA. SCFs in the new millennium. *Oncogene* 2014; **33**: 2011-2018.
- 47 Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 2003; **11**: 1445-1456.
- 48 Inuzuka H, Tseng A, Gao D, Zhai B, Zhang Q, Shaik S *et al.* Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 2010; **18**: 147-159.
- 49 Chen H, Ma H, Inuzuka H, Diao J, Lan F, Shi YG *et al.* DNA damage regulates UHRF1 stability via the SCF(beta-TrCP) E3 ligase. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 1139-1148.
- 50 Felle M, Joppien S, Nemeth A, Diermeier S, Thalhammer V, Dobner T *et al.* The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 8355-8365.
- 51 Ma H, Chen H, Guo X, Wang Z, Sowa ME, Zheng L *et al.* M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 4828-4833.
- 52 Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S *et al.* In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 2011; **44**: 361-372.



- 53 Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 2004; **23**: 7601-7610.
- 54 Igal RA. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 1509-1515.
- 55 Noto A, Raffa S, De Vitis C, Roscilli G, Malpicci D, Coluccia P *et al.* Stearoyl-CoA desaturase-1 is a key factor for lung cancer-initiating cells 2013; **4**: e947.
- 56 Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Morris DL. The developing story of Sprouty and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2014; **33**: 695-720.
- 57 Yoon JH, Abdelmohsen K, Kim J, Yang X, Martindale JL, Tominaga-Yamanaka K *et al.* Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nat Commun* 2013; **4**: 2939.
- 58 Yang F, Zhang H, Mei Y, Wu M. Reciprocal regulation of HIF-1alpha and lincRNA-p21 modulates the Warburg effect. *Mol Cell* 2014; **53**: 88-100.
- 59 Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 2010; **465**: 1033-1038.
- 60 Xie S, Jakoncic J, Qian C. UHRF1 double tudor domain and the adjacent PHD finger act together to recognize K9me3-containing histone H3 tail. *J Mol Biol* 2012; **415**: 318-328.
- 61 Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C *et al.* Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* 2008; **455**: 822-825.

## 謝辞

本研究の全般にわたって御指導、御教授をいただいた東京大学分子細胞生物学研究所所長、秋山徹教授には心から深く感謝申し上げます。

理化学研究所統合生命医科学研究センターの岡田眞里子先生、長嶋剛史博士には、RNA-seq 解析を行っていただきました。東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリーの尾山大明准教授と秦裕子博士には、質量分析を行っていただきました。東京大学腫瘍外科の北山丈二准教授、日吉雅也先生には多くの助言をいただきました。併せて感謝申し上げます。

秋山研究室助教の谷上賢瑞先生には研究の進め方や柔軟なデータ解釈、論文の書き方などとても多くの助言をいただきました。秋山研究室講師の川崎善博先生には、実験手法や研究の方向性など多くの助言をいただきました。厳しい研究生活を共にしてきた、同期の高井弘基氏、平岡巧士氏、宮本昌弥氏に深く感謝しています。また、非常に充実した 5 年間を支えてくださった東京大学分子細胞生物学研究所、分子情報研究分野（秋山研究室）の皆様には深く御礼申し上げます。最後に、私のこれまでの研究生活を経済的・精神的に支えてくれた両親に心から感謝いたします。

2014 年 12 月 18 日

杉政 宏信