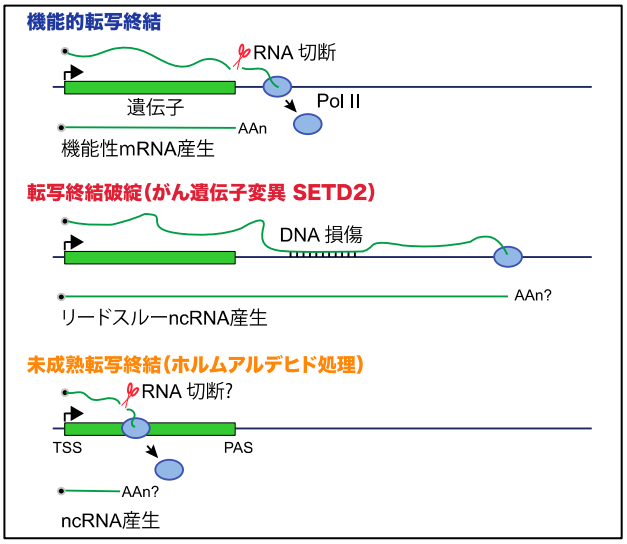
36　非コードRNA異常産生を防ぐ転写終結機構の解明	野島　孝之

【目的】ゲノムのダークマターと呼ばれる非コードRNA（noncoding RNA：ncRNA）の発見から現在まで、機能が明らかなncRNAはほんの一握りである。最近その中で、哺乳類細胞ががん化した場合や特定のストレス下に置かれた場合において、RNA転写の終結が破綻し、遺伝子間領域でリードスルー転写産物と呼ばれるncRNAが産生されることがわかってきた（下図）。しかしながら、哺乳類細胞の転写終結は複雑であり、未だにその制御機構には不明な点が多い。そこで本研究では、がんで破綻している転写終結機構を明らかにすることを目的とする。また、化学物質等によって誘導される未成熟転写終結（遺伝子イントロン内で転写が終結すること）の制御機構も明らかにしようとしている（下図）。さらには、がんや細胞ストレスによって誘導されるncRNAを網羅的に同定することで、将来的に人工ncRNAやそれに由来するペプチドを利用したり、ncRNAを標的とした新たな治療アプローチの開拓を目指す。

【方法】本研究では、がん細胞や化学物質処理した細胞の転写プログラムを、独自に開発した新生RNAシークエンス技術POINT（Polymerase-Intact Nascent Transcript）法にて解析し、転写終結に注目した研究を行った。まず、TCGAに収録されたがん転写産物の解析により、大腸がんで高発現している遺伝子として*NELF*（Negative elongation factor）に注目した。次に、共同研究者（Ali Shilatifard研究室）から分与された、オーキシン依存的NELFタンパク質分解誘導大腸がん細胞（HCT116 NELF-C-AID）を用いて、POINT法解析を行った。さらには、がんで頻繁に変異しているヒストンメチル基転移酵素遺伝子*SETD2*に注目し、そのタンパク質発現や活性を失った細胞を用いたり、化学物質処理（DNA架橋剤）による転写プログラムの影響もPOINT-seq法解析した。それらのシークエンスデータは、バイオインフォマティクスにより統計学的に解析した。

【結果】本研究では、公共がんRNA-seqデータを再解析し、がんにおける転写関連因子のRNA発現を調べた。その結果、転写伸長因子として知られている*NELF*の転写産物が大腸がんで有意に高発現していることが明らかになった。さらに、NELF発現抑制時に転写終結破綻が起きていること、その破綻がDNA複製開始反応の抑制、それに伴う細胞周期の停止が引き起こされることが明らかになった（プレプリント Nakayama et al., *BioRxiv* 2024）。また、クロマチン環境変化がどのように転写へ影響するのかも調べた。本研究では、複数のがんで機能を失っている*SETD2*に注目し、転写における機能解析を行った。その結果、*SETD2*ノックアウト（KO）細胞やメチル基転移活性を失った腎臓がん患者由来細胞では、転写終結の破綻が起きていることが明らかになった（論文投稿準備中）。本研究ではさらに、DNA架橋剤によって、未成熟転写終結が誘導されることを見出した。これは、以前報告したスプライシング阻害剤によって誘導される未成熟転写終結機構とは異なるもので、今後の研究展開が期待される。

転写終結破綻と未成熟転写終結から生じるncRNA



36. 非コードRNA異常産生を防ぐ転写終結機構の解明

野島　孝之

九州大学 生体防御医学研究所 腫瘍防御学分野

Key words：非コードRNA，転写終結，RNA polymerase Ⅱ，クロマチン，DNA損傷

緒　言

近年の大規模転写産物解析から、タンパク質コード遺伝子数（20,000）を遥かに超える約 100,000 種類の非コードRNA（noncoding RNA：ncRNA）が検出され、それらの機能が盛んに解析されてきた。しかしながら、現在機能が明らかになっているncRNAは一握りであり、ほとんどのncRNAは転写のノイズではないかとも言われている。その中で、ncRNA自体ではなく、むしろncRNAが転写されることの生物学的重要性がわかってきた［1］。例えば、人為的なncRNA転写活性化により、RNA/DNAハイブリッド（R-loop）形成が誘導され、ゲノムが不安定化される［2］。さらに、DNA二重鎖切断が非コードゲノム領域で多く検出され、その部位から産生されるncRNAは効率的な相同組換DNA修復に必要とされる。これらは独立した転写ユニットから産生されるncRNAである。

加えて、報告者らの最近の研究から、ncRNAは独立したncRNA遺伝子ユニットからだけではなく、タンパク質コード遺伝子からも転写終結制御を介して産生されることが明らかになった［1］。転写終結は種々の細胞ストレス（高浸透圧、熱ショック）によって異常制御を受けることが最近報告され、新しいクラスの機能性ncRNA産生にも一役買っている［3，4］。現在のところ、タンパク質コード遺伝子の転写終結に必要とされる既知のRNAシス配列としてポリA付加シグナル（PolyAdenylation Signal：PAS）が知られているが、最近PASに依存しない転写終結制御シス配列やトランス因子の存在も報告されてきた。しかしながら、転写終結機構は多様性に富むことが分かりつつあり、未だに不明な点が多く残されている。また、転写終結反応由来の転写産物は非常に不安定であることが多く、転写終結解析を困難にしている。そのため、RNA分解される前、つまりは転写装置から産生されたばかりのRNA（新生RNA）を解析する必要がある。

報告者は独自に新生RNAシークエンス技術mNET法［5］を開発し、その派生法としてPOINT法［6］も開発に成功している。本研究では、迅速なタンパク質分解技術とPOINT法を組合せることで、ncRNAを創出するがん特異的な転写終結破綻機構や抗がん剤による未成熟転写終結機構の解明を目標とする。将来的には、それらncRNAを標的とした新たながん治療アプローチの開拓を目指す。

方　法

本研究では、新生RNA解析にPOINT法を採用した。POINT法ではまず、細胞から高度に精製したクロマチンを単離し、DNA分解酵素によってクロマチンDNAを消化後、PolⅡ転写複合体を免疫沈降した。報告者は、そのPolⅡに含まれるRNAをPolymerase-Intact Nascent Transcript（POINT）と名付けており、そのRNAは全長新生RNAとして解析できる。報告者は、NEBNext Ultra II directional RNA kitを用いて、全長新生RNAからシークエンスライブラリーを作製、NextSeq 6000（illumina）によって大量のシークエンスリードを取得した。その後、コンピュータ解析により、ゲノムブラウザー上で可視化、さらには統計学的に解析した。

本研究に用いた細胞は、共同研究者（Ali Shilatifard研究室）から分与された、オーキシン依存的Negative elongation factor（NELF）タンパク質分解誘導大腸がん細胞（HCT116 NELF-C-AID）である。HCT116 NELF-C-AID細胞では、オーキシン添加依存的に細胞内に存在するNELF-Cタンパク質の90%以上を数時間以内に分解可能である［7］。

この条件を用いて、POINT 法による新生 RNA 解析や細胞増殖、細胞周期などを調べた。さらに、がんクロマチンの転写制御を調べるために、骨肉腫細胞（wild type または *SETD2* 遺伝子 KO）等も用い、POINT 法による新生 RNA 解析を行った。

結　果

本研究では、ncRNA産生を制御する転写終結機構を理解するために、がんゲノム情報やRNA発現情報、化学物質処理した細胞を用いて、新生RNAシークエンス解析POINTを行った。以下、それぞれの項目について、結果の詳細を述べる。

1. NELF 依存的な転写終結制御とその細胞機能

がんでは、特定の転写因子が優位となった転写プログラムが確立されることが知られている。まず本研究では、TCGA や GTEX 等の公共 RNA-seq データを再解析し、大腸がんにおける転写関連因子の RNA 発現を調べた（図 1）。その結果、転写伸長因子として知られている *NELF* の転写産物が大腸がんで有意に高発現していることが明らかになった。次に、大腸がんの転写プログラムにおける NELF の役割を調べるために、HCT116 NELF-C-AID 細胞を用いて、NELF タンパク質を効率良く分解し、POINT 法による新生 RNA 解析を行った。報告者は、NELF タンパク質分解時に転写終結破綻を由来とするリードスルーncRNA を検出した。このことより、NELF は転写終結を促進する転写因子であることがわかった。次に、NELF タンパク質分解による細胞増殖への影響を調べた結果、NELF タンパク質分解時に細胞は死滅せず、細胞分裂が停止しているような現象が観察された。そこで、NELF タンパク質分解時の細胞周期を FACS 解析にて調べたところ、細胞周期 G1 期の細胞集団の増加とともに、S 期の細胞集団の劇的な減少が観察された。転写終結破綻と細胞周期の停止の相関性は得られたが、どのような分子機構が考えられるであろうか。報告者は、転写終結破綻によって、Pol Ⅱ転写装置が遺伝子間領域の DNA 複製領域に侵入する可能性を考えた。興味深いことに、共同研究者（大学保一博士）は独自に開発した DNA 複製解析法 Pu-seq 法により、多くの DNA 複製は遺伝子間領域で開始することを明らかにしている [8]。報告者は、Pu-seq データの再解析から、NELF タンパク質分解時において、DNA 複製開始点でリードスルーRNA の優位に増加していることを明らかにした。以上のように、NELF は転写終結を促進し、遺伝子間領域での DNA 複製開始を正常に行わせる役割を担っていることが示唆された（プレプリント Nakayama et al., *BioRxiv* 2024）。

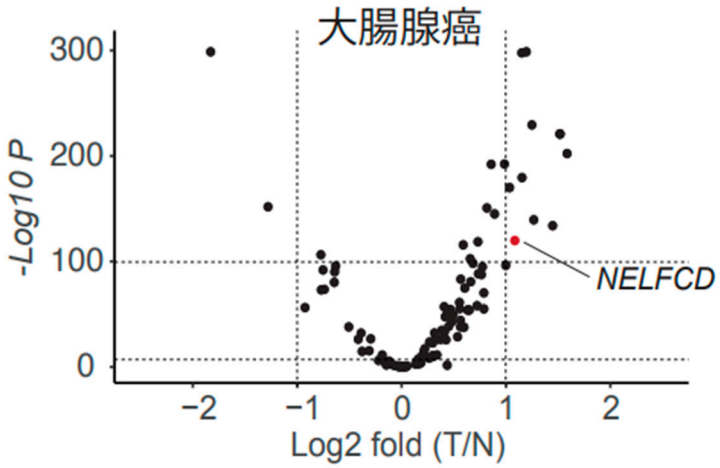


図 1. 大腸腺がんにおける転写関連遺伝子群 RNA 発現レベル解析
公共がん RNA データベースの再解析。大腸腺癌（T）とその周囲の正常組織（N）由来の RNA 発現レベルを相対的に比較した。

2. ヒストンメチル化修飾による転写終結制御

クロマチン環境と転写には大きな相関性があることが知られている。しかしながら、今までの研究は、“クロマチン環境と転写産物の相関性”を調べたものがほとんどであり、クロマチン環境変化がどのように転写へ影響するのか、はほとんどわかっていない。そこで報告者は、複数のがんで機能を失っているヒストンメチル基転移酵素遺伝子 *SETD2* に注目し、POINT-seq による新生 RNA 解析を行った。その結果、*SETD2* ノックアウト（KO）細胞やメチル基転移活性を失った腎臓がん患者由来細胞では、転写終結の破綻が起きていることが明らかになった（論文投稿準備中）。この結果は、SETD2 によるヒストンメチル化が転写終結を促進していることを示唆している。今後、複数のがんで変化するクロマチン環境における、転写終結制御を詳細に解析する。

3. ゲノム損傷による未成熟転写終結誘導

未成熟転写終結は、遺伝子イントロン内で転写が終結する反応であり、最近注目されている比較的新しい遺伝子発現機構である。本研究では、DNA 架橋剤を処理した HCT116 細胞を用いて POINT-seq 法による新生 RNA 解析を行った。その結果、HCT116 細胞で発現している遺伝子の半数以上で未成熟転写終結が誘導されることが明らかになった。報告者は以前、スプライシング阻害剤によって未成熟転写終結機構を見出しているが、それによって影響を受ける遺伝子群は約 20%ほどである［6］。また、それらは DNA 架橋剤が影響を与える遺伝子群と異なるため、新規の未成熟転写終結であることが示唆される。現在、これら 2 つの異なる未成熟転写終結の比較解析から、新たな遺伝子発現機構を解明することを目指している。将来、未成熟転写終結由来の ncRNA を網羅的に同定し、細胞機能を明らかにする。

考　察

本研究から、がんと転写終結には繋がりがあることが示唆された。そのため、引き続き、個々のがん細胞に有利な転写プログラムを明らかにする。

現在までに、転写終結に関わる因子として、新たに NELF と SETD2 タンパク質を見出した。NELF タンパク質発現抑制時には転写終結破綻とそれに伴う転写 - 複製コンフリクトが生じることによって、細胞周期が G1 で停止した。NELF はがん、特に大腸がんで発現上昇が見られたため、大腸がんでは NELF 依存的な転写経路が確立されていることが示唆される。そこで今後、NELF を阻害するような化合物を見出すことにより、転写 - Negative elongation factor 複製コンフリクトを誘導する、新たながん細胞増殖抑制アプローチの実現可能性を模索する。また、*SETD2* KO 細胞やメチル基転移酵素活性を失っている *SETD2* 遺伝子変異を有する腎臓がん患者細胞では、転写終結破綻と DNA 損傷誘導が確認されている。この DNA 損傷は、新たな体細胞遺伝子変異を引き起こすことが考えられるため、SETD2 活性抑制による転写終結破綻を抑制できれば、がん悪性化を食い止められる可能性がある。そのため今後、転写終結破綻による DNA 損傷を抑制するアプローチの開発にも取り組む。

未成熟転写終結がどのように制御されているのか、今後特に、RNA スプライシングやポリ A 付加反応依存的・非依存的な分子機構について明らかにする。さらに、未成熟転写終結によって産生される ncRNA の同定とそれらの機能解析を行うことにより、医学的に応用可能な ncRNA をリスト化することを目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、英国レスター大学 Michael Tellier 研究室の Michael Tellier 博士、がん研究所がんゲノム動態プロジェクトの大学保一博士、米国 Northwestern 大学の Ali Shiratifard 研究室の Ali Shilatifard 教授、青井勇樹博士、ポーランド AMU STOP Lab の Kinga Kamieniarz-Gdula 博士である。また、当研究室のスタッフ、学生らにこの場を借りて感謝する。

文　献

1) Nojima T, Proudfoot NJ. Mechanism of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2022 Jun;23(6):389-406. PMID: 35079163 DOI: 10.1038/s41580-021-00447-6.

2) Nojima T, Tellier M, Foxwell J, Ribeiro de Almeida C, Tan-Wong SM, Dhir S, Dujardin G, Dhir A, Murphy S, Proudfoot NJ. Deregulated expression of lncRNA through loss of SPT6 induces R-loop, DNA replication stress and cellular senescence. Mol Cell. 2018 Dec 20;72(6):970-984.e7. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30449723 DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.011.

3) Cugusi S, Mitter R, Kelly GP, Walker J, Han Z, Pisano P, Wierer M, Stewart A, Svejstrup JQ. Heat shock induces premature transcript termination and reconfigures the human transcriptome. Mol Cell. 2022 Apr 21;82(8):1573-1588.e10. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35114099 DOI: 10.1016/j.molcel.2022.01.007.

4) Vilborg A, Passarelli MC, Yario TA, Tycowski KT, Steitz JA. Widespread Inducible Transcription Downstream of Human Genes. Mol Cell. 2015 Aug 6;59(3):449-61. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26190259 DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.016.

5) Nojima T, Gomes T, Grosso ARF, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing. Cell. 2015 Apr 23;161(3):526-540. PMID: 25910207 DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.027.

6) Sousa-Luís R, Dujardin G, Zukher I, Kimura H, Weldon C, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ, Nojima T. POINT Technology Illuminates the Processing of Polymerase-Associated Intact Nascent Transcripts. Mol Cell. 2021 May 6;81(9):1935-1950.e6. Epub 2021 Mar 17. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.02.034.

7) Aoi Y, Smith ER, Shah AP, Rendleman EJ, Marshall SA, Woodfin AR, Chen FX, Shiekhattar R, Shilatifard A. NELF regulates a Promoter-Proximal Step Distinct from RNA Pol II Pause-Release. Mol Cell. 2020 Apr 16;78(2):261-274.e5. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32155413 DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.014.

8) Koyanagi E, Kakimoto Y, Minamisawa T, Yoshifuji F, Natsume T, Higashitani A, Ogi T, Carr AM, Kanemaki MT, Daigaku Y. Global landscape of replicative DNA polymerase usage in the human genome. Nat Commun. 2022 Nov 24;13(1):7221. PMID: 36434012 DOI: 10.1038/s41467-022-34929-8.