

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え 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、Pol II 転写複合体を免疫沈降した。報告者は、その Pol II 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) 等も使い、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シーケンス解析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において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)。

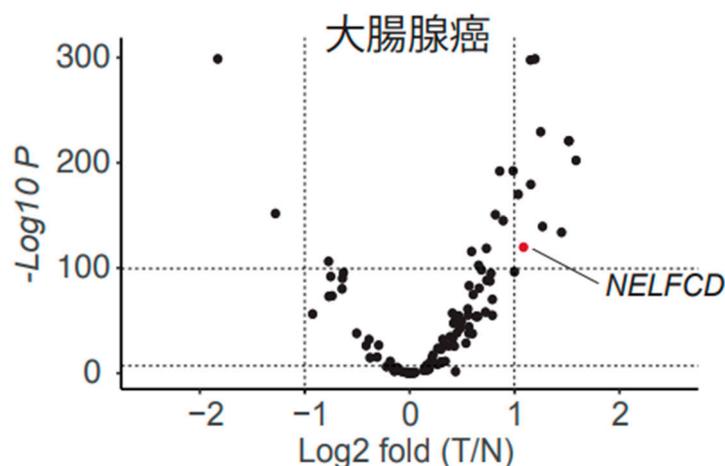


図1. 大腸腺がんにおける転写関連遺伝子群 RNA 発現レベル解析
公共がん RNA データベースの再解析。大腸腺癌 (T) とその周囲の正常組織 (N)
由来の RNA 発現レベルを相対的に比較した。

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. Dereglated 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.