

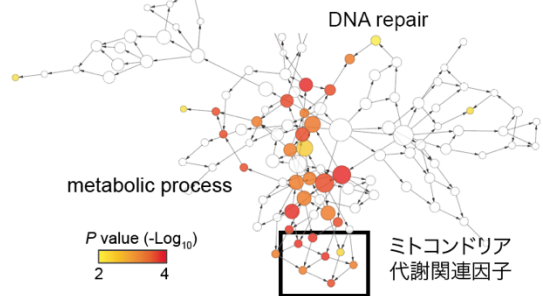
# エピゲノム制御を介したミトコンドリア制御機構の解明

千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学  
星居 孝之

ヒストンH3のK4トリメチル化は細胞の未分化性維持やがん化に必須とされており、修飾酵素は重要な薬剤標的である[1]。H3K4メチル化酵素であるMLLファミリー蛋白はMLL1-4, SETD1A/Bによって構成される。酵母では単一のメチル化酵素であるSET1がH3K4メチル化を担うが、脊椎動物では複数の酵素が重複した機能と独自の機能を併せ持つことにより、複雑な制御機構が構築されている。MLL1の転座やMLL3の欠損は白血病の原因として同定されており、白血病細胞では変異蛋白の機能獲得や他のファミリー分子の異常な活性化などが生じていることが示唆され、創薬標的として盛んに研究が行われてきた[1, 2]。特に染色体11q23上のMLL1の転座は急性骨髄性白血病（AML）にて検出される代表的な変異であり、予後不良因子であるが、標準治療は確立されていない。私たちはMLL1転座を有するAML細胞において、ES細胞で必須とされるH3K4メチル化酵素SETD1Aが増殖・生存に必須であり、DNA修復遺伝子群の発現を制御することを報告した[3]。同時に、白血病細胞や骨肉腫細胞の増殖において、SETD1AのH3K4メチル化酵素活性は不要であり、新規の転写制御機構が介在することを明らかにした。私たちはSETD1A 蛋白上の機能未知領域が新規の蛋白-蛋白間相互作用に必須であることを見出し、機能解析からその領域をFLOS (Functional Location on SETD1A) と名付けた。FLOSはSETD1Aと非常に類似した構造を持つ蛋白であるSETD1Bとの機能的差別化を決定付ける領域であり、他のファミリー分子にも存在しないことから、SETD1A 特異的な創薬を実現する上で、極めて重要な蛋白ドメインであることが明らかとなった。一方でFLOS ドメインがどのようにして特異的な遺伝子群を制御するかは全く不明であった。

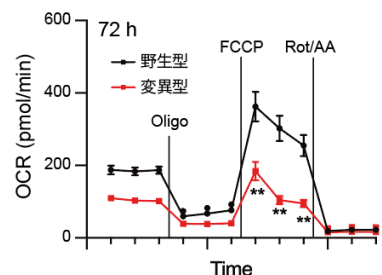
まずSETD1A FLOSドメインに依存する遺伝子群の同定を目指し、白血病細胞でSETD1A欠損により速やかに発現の減少する遺伝子群の同定を試みた。本研究ではPROteolysis TArgeting Chimera (PROTAC) の技術を応用し、低分子化合物にてSETD1A蛋白の分解誘導が可能となるシステムを構築した[4]。蛋白分解誘導処理後に野生型細胞とSETD1A分解後の細胞を比較した結果、SETD1A蛋白は処理後1時間で速やかに消失した。処理後の変異型細胞は24時間までに生存に大きな変化は認められず、48時間以降に明らかなアポトーシスによる細胞死を示すことが明らかとなった。SETD1Aのクロマチン上の局在をクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーを組み合わせたChIP-seq 法により解析し、SETD1Aの制御する遺伝子群を同定した。さらに蛋白分解誘導後の遺伝子発現変動をRNA-seq法により網羅的に解析し、SETD1Aによって最も速やかに変動する標的下流因子の同定を試みた。SETD1A の結合を持ち、かつ遺伝子発現に変動を示す遺伝子群のパスウェイ解析を実施した結果、新たにミトコンドリア代謝関連因子の変動を見出した (図1)。

図1. SETD1A変異による発現低下因子のパスウェイ解析



ミトコンドリアの機能は白血病の発症や薬剤耐性機構獲得に重要である。本研究で同定された遺伝子群が機能的に白血病細胞の増殖や生存に重要であるかどうかを検証するため、CRISPR-Cas9技術により、ミトコンドリア代謝関連因子を含むSETD1A 下流標的候補の機能解析を行なった。sgRNAを構築し、Cas9発現白血病細胞株に導入した結果、ミトコンドリア代謝関連因子群を破壊すると白血病増殖の抑制効果が認められた。ミトコンドリア特異的な蛍光プローブにてSETD1A変異細胞のミトコンドリア総量を算出したが、ミトコンドリアの形態や数には影響は観察されなかった。一方で、代謝関連因子群が呼吸鎖複合体の形成に必要であったことから、ミトコンドリア呼吸鎖への影響を検証するためにSETD1A変異細胞の酸素消

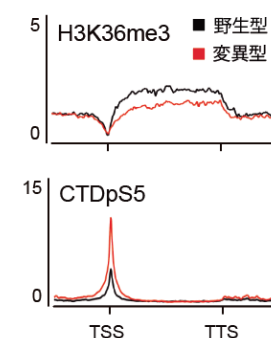
図2. ミトコンドリアの酸素消費量



費量を計測した結果、ミトコンドリア酸素消費量の有意な低下を見出した(図2)。同様の酸素消費量の低下は代謝関連因子群を破壊した細胞でも検出されたことから、SETD1Aの下流標的の低下が呼吸鎖抑制に関わり、白血病細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

SETD1Aによるミトコンドリア関連因子の特異的な制御機構を明らかにするため、標的遺伝子群のエピゲノム状態と転写機構活性化状態をChIP-seq法により解析した。まずSETD1AがH3K4メチル化酵素であることから、H3K4モノ/トリメチル化(H3K4me1/me3)を測定したが、SETD1A標的遺伝子群においても変化は認められなかった。遺伝子発現と関連することが報告されている各種ヒストン修飾アセチル化/メチル化(H3K27Ac、H3K36me3、H3K79me2など)を同じくChIP-seq法を用いて解析した結果より、SETD1A標的因子群に特徴的な変化として、新たにH3K36me3の有意な減少を同定した。H3K36me3はSETD1Aとは異なるヒストンメチル化酵素であるSETD2によって修飾されることや、SETD1Aの局在とも一致しないことから、副次的な影響を反映していることが考えられた。H3K36me3は転写が活発な遺伝子領域の広範囲に認められるヒストン修飾である。主にRNA polymerase II (RNAP2)の伸長反応と相関するヒストン修飾として認知されており、SETD1Aの分解に伴いRNA合成酵素の活性低下が遺伝子発現の低下とH3K36me3の減少を誘導することが示唆された(図3)。転写産物量は転写後修飾によっても制御されるものであり、必ずしも転写機構のみの影響を反映しているものではない。そのためSETD1Aが転写後のRNA修飾に寄与することも想定されたが、H3K36me3の減少から、少なくとも転写の伸長反応制御よりもさらに上流の制御機構にSETD1Aが必須の役割を持つことが明らかとなった。

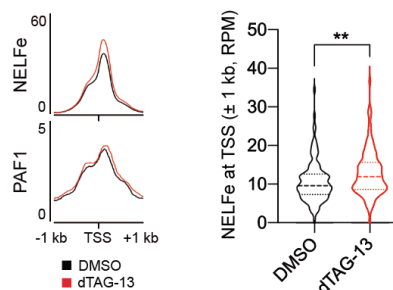
図3. 標的分子の転写異常



私たちがこれまでに同定したSETD1Aの機能において最も重要な相互作用因子はCyclin Kである。Cyclin KはRNA合成酵素のリン酸化酵素であるCDK9/CDK12/CDK13の補酵素として知られていることから、SETD1Aの阻害はCyclin Kの働きを阻害し、RNA合成酵素の活性を低下させることが予想される。SETD1A欠損後のRNA合成酵素の活性状態をより直接的に評価することを目的として、SETD1A分解誘導後にRNAP2のC末端領域(CTD)のリン酸化レベルをChIP-seq法により測定した。RNAP2 CTDはY1-S2-P3-T4-S5-P6-S7の繰り返し配列で構成されており、それぞれのセリン残基(Ser2, Ser5, Ser7)は転写の過程でリン酸化/脱リン酸化反応により制御されることが報告されている[5]。遺伝子上の分布より、Ser5, Ser7は転写開始時にリン酸化され、Ser2はH3K36me3と同様に転写伸長時にリン酸化される。RNAP2 CTD上のSer2, Ser5, Ser7のリン酸化を特異的に検出する抗体にてChIP-seq解析を行なったところ、SETD1A分解後にはSETD1A標的遺伝子上にてSer2のリン酸化減少が観察され、H3K36me3と共通して転写の伸長が低下していることを示す結果を得た。一方でSer7のリン酸化には変化が認められなかった。さらに興味深いことに、Ser5のリン酸化は転写開始点にて著しい増加を示した(図3)。Ser5は転写開始複合体形成部位において、CTDのリン酸化酵素であるCyclin-dependent kinase 7/9(CDK7/9)によりリン酸化される。以上の結果から、SETD1A分解細胞では転写開始複合体は形成されうるが、伸長反応が進行しないことが明らかとなった。

遺伝子発現制御機構において、転写開始複合体形成から伸長までの制御過程では、RNA合成酵素を中心とする動的な蛋白複合体形成が進行する。近年ではクライオ電子顕微鏡技術が発達し、巨大な蛋白複合体の構造解析が可能となったことにより、転写を司る蛋白複合体の構造が次々と解明されている[6-9]。転写開始点においてRNA合成酵素複合体形成後は恒常的に転写が開始するのではなく、まず転写開始点周辺に留まる。その際にはPaused Elongation Complex(PEC)と呼ばれる特殊な複合体が関与し、転写の進行を停止させている[10]。この複合体ではRNAP2は転写の活性レベルと正の相関を示すCTD-Ser5のリン酸化を有するが、転写の伸長は抑制される。以上の知見から、私たちの観察したSETD1A分解後のRNAP2動態異常はPEC形成が関与していることが強く示唆された。PECにおいて転写を阻害する因子群としてNELF Complex(NELF-A, NELF-B, NELF-C, NELF-E)が同定されている[11]。SETD1A分解誘導後のNELF-Eのクロマチン上の挙動を解析した結果、発現の低下した遺伝子ではより多くのNELFが結合していることが明らかとなった(図4)。一方で転写伸長を正に制御する複合体として知られているDSIF複合体やPAF複合体には有意な変化は認められなかった。以上の結果より、白血病細胞においてSETD1Aの欠損はミトコンドリアの代謝関連遺伝子の転写の停止を誘導し、細胞の呼吸機能を低下させることが明らかとなった[12]。

図4. 転写休止部位におけるNELFとPAF1の分布



以上を踏まえ、SETD1A分解細胞では転写開始複合体は形成されうるが、伸長反応が進行しないことが明らかとなった。この結果から、SETD1Aの欠損は転写開始複合体の形成を促進する一方で、転写の伸長を抑制していることが示唆された。この抑制はNELF複合体の増加によるものと考えられる。以上を踏まえ、SETD1Aの欠損は転写開始複合体の形成を促進する一方で、転写の伸長を抑制していることが示唆された。この抑制はNELF複合体の増加によるものと考えられる。以上を踏まえ、SETD1Aの欠損は転写開始複合体の形成を促進する一方で、転写の伸長を抑制していることが示唆された。この抑制はNELF複合体の増加によるものと考えられる。

本研究からSETD1Aの持つ転写制御作用を介した代謝制御機構が明らかとなった。本研究では蛋白分解誘導系を活用することにより、細胞周期と相関の強いDNA損傷修復因子やミトコンドリア関連因子がヒストンメチル化酵素SETD1Aにより協調的に制御されていることを明らかにした。このことはSETD1Aの転写制御機能は細胞周期と密に連動しており、白血病やがんにおいて必須となる要因であると考えられた。SETD1AのFLOSドメインと結合するCyclin Kは細胞周期の制御因子であるサイクリン因子と類似したcyclin boxドメイン構造を持つ因子であるが、発現レベルでの細胞周期との連動は認められていない。今後SETD1A-Cyclin K経路の役割を解明することが、新たな細胞周期依存的な転写制御の分子機序の解明に結び付くことが期待される。

また本研究にてSETD1Aの制御下にあることを明らかにしたミトコンドリアを介した代謝制御機構はAMLの創薬標的経路の一つである[13]。ミトコンドリアの呼吸鎖に関連する分子群は既存のBcl-2阻害剤への抵抗性を生み出すことも報告されており、SETD1Aの阻害は既存薬の薬剤抵抗性を解除することによって相乗的に効果を発揮することも期待される[14]。SETD1Aは白血病では必須の分子であるが、一方で統合失調症の患者の脳では機能欠失変異が報告されている[15]。SETD1A欠損マウスは統合失調症のモデル動物とされているが、神経細胞の転写制御における役割は未だ明らかではない[16, 17]。統合失調症を含む神経変性疾患ではミトコンドリアの異常が原因になる可能性が多数報告されており、本研究で明らかとなったSETD1Aとミトコンドリアの関連は将来的にがん以外の疾患のメカニズム解明にも大きなインパクトを与えることが期待される。今後は本研究を基盤とした創薬や治療法の開発を実施し、現在では根治の困難なAMLやその他の疾患に対しても適用が可能な転写機構標的型治療法の創出に貢献したい。

#### 引用文献

1. Rao, R. C. and Y. Dou, Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*, 2015. 15(6): p. 334-46.
2. Chen, C., et al., MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2014. 25(5): p. 652-65.
3. Hoshii, T., et al., A Non-catalytic Function of SETD1A Regulates Cyclin K and the DNA Damage Response. *Cell*, 2018. 172(5): p. 1007-1021 e17.
4. Nabet, B., et al., The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nat Chem Biol*, 2018. 14(5): p. 431-441.
5. Harlen, K. M. and L. S. Churchman, The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(4): p. 263-273.
6. Abdella, R., et al., Structure of the human Mediator-bound transcription preinitiation complex. *Science*, 2021. 372(6537): p. 52-56.
7. Plaschka, C., et al., Transcription initiation complex structures elucidate DNA opening. *Nature*, 2016. 533(7603): p. 353-8.
8. Rengachari, S., et al., Structure of the human Mediator-RNA polymerase II pre-initiation complex. *Nature*, 2021. 594(7861): p. 129-133.
9. Schier, A. C. and D. J. Taatjes, Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev*, 2020. 34(7-8): p. 465-488.
10. Core, L. and K. Adelman, Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev*, 2019. 33(15-16): p. 960-982.
11. Vos, S. M., et al., Structure of paused transcription complex Pol II-DSIF-NELF. *Nature*, 2018. 560(7720): p. 601-606.
12. Hoshii T., et al., SETD1A regulates transcriptional pause release of heme biosynthesis genes in leukemia. *Cell Reports*, 2022. 41, p. 111727.
13. Panina, S. B., J. Pei, and N. V. Kirienko, Mitochondrial metabolism as a target for acute myeloid leukemia treatment. *Cancer Metab*, 2021. 9(1): p. 17.
14. Lin, K. H., et al., Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. *Cell Metab*, 2019.
15. Singh, T., et al., Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nat Neurosci*, 2016. 19(4): p. 571-7.
16. Nagahama, K., et al., Setd1a Insufficiency in Mice Attenuates Excitatory Synaptic Function and Recapitulates Schizophrenia-Related Behavioral Abnormalities. *Cell Rep*, 2020. 32(11): p. 108126.
17. Mukai, J., et al., Recapitulation and Reversal of Schizophrenia-Related Phenotypes in Setd1a-Deficient Mice. *Neuron*, 2019. 104(3): p. 471-487 e12.