

## 転写終結機構の解明とそれ由来生体代謝物の医学的応用

九州大学生体防御医学研究所腫瘍防御学分野

野島 孝之

### 研究背景と目的

近年の大規模転写産物解析 (FAMTOM5 や NONCODE V5) から、タンパク質コード遺伝子数 (20,000) を遥かに超える~100,000 種類の非コード RNA (noncoding RNA, 以降 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考えられている (PMID: 28017589, *Molecular Cell* 2017)。そこで報告者は、ncRNA 自体が機能的であるだけでなく、ncRNA が転写されることも生物学的に重要であると仮説を立てている (PMID: 35079163, *Nature Review Molecular Cell Biology* 2022)。本研究では ncRNA 転写を制御するステップとして最近注目されてきた転写終結機構を解析した。

転写終結は転写再開始のために必須のステップであり、その破綻は機能的 RNA の発現低下に繋がる。それだけではなく、転写終結は転写装置が下流のゲノム領域に侵入することを防いでいる。転写終結が効率的に行われない場合、RNA polymerase II (Pol II) 転写装置は遺伝子間領域でリードスルー転写産物と呼ばれる ncRNA を産生し、DNA 損傷に関わる RNA/DNA ハイブリッド (R-loop) 構造や RNA 転写装置と DNA 複製装置との衝突 (Transcription-Replication conflict, T-Rc) が誘起される (PMID: 30449723, *Molecular Cell* 2018)。しかしながら、その転写終結がどのように制御されているのか、その分子機構についてはよく分かっていない。以前から報告者は、転写の網羅的プロファイルとその制御機構を解析する目的で、転写装置から合成されたばかりの RNA (以降、新生 RNA) を解析する方法 (mNET-seq 法: PMID: 25910207, *Cell* 2015、POINT 法: PMID: 33735606, *Molecular Cell* 2021) を次々に開発してきた。新生 RNA 解析によって分解される前の RNA の解析が可能となり、転写終結によって制御される ncRNA の検出が容易になった。本研究では、独自に開発した新生 RNA シークエンス技術を用いてリードスルー ncRNA を網羅的に解析し、がん特異的な転写終結破綻機構を明らかにする。さらに、報告者は DNA 損傷を誘導する化合物処理によって、遺伝子イントロン内で転写が終結すること (未成熟転写終結)、それ由来の転写産物は ncRNA であることを最近見出した。そこで報告者は、未成熟転写機構とその DNA 損傷との関わりを明らかにする。将来的には、ncRNA を標的とした新たな治療アプローチの開拓を目指す。

### 実験方法

本研究では、新生 RNA 解析に mNET-seq 法や POINT 法を採用した。mNET-seq 法では 1M 尿素を用いてクロマチンを精製し、マイクロコッカルヌクレアーゼを用いてクロマチンを可溶化する。同時に RNA を消化するが、pol II 転写複合体に含まれる RNA は保護される。報告者は、その Pol II 転写複合体に含まれる短い RNA (20-100 塩基) を Pol II に対する抗体で免疫沈降を行うことによって単離する。その RNA は NEBNext small RNA kit によってシークエンスライブラリーを作成、NextSeq 6000 (illumina) によってシークエンスリードを取得、コンピュータ解析によって RNA 3' 末端情報を解析した。以上によって、mNET-seq 法を用いて、Pol II 活性部位を一塩基解像度でプロファイルした。一方、POINT 法ではまず、mNET-seq 法と同様に、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成、NextSeq 6000 (illumina) によって大量のシークエンスリードを取得した (POINT 法)。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 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 (PMID: 32155413, *Molecular Cell* 2020)。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 (U2OS 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

### 1. NELF 依存的な転写終結制御とその細胞機能 (PMID: 38352431, *BioRxiv* 2024)

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。その結果、転写伸長因子として知られているNegative elongation factor (NELF)の転写産物が大腸がんでは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。報告者はウエスタンブロットにより、NELF タンパク質分解が細胞周期阻害タンパク質p21やp57の発現を増加させることを明らかにした。このことから、FACS実験の結果が支持された。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 (がん研究所、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が明らかにしている (PMID: 36434012, *Nature Communications* 2022)。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の転写が優位に増加していることを明らかにした。さらに、NELF タンパク質分解によって、RNA転写装置 (リン酸化CTD Pol II) とDNA複製装置 (PCNA等) とのコンフリクトが細胞内で優位に増加することを検出している。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 (PMID: 38352431, *BioRxiv* 2024, 論文リバイス中)。

### 2. ヒストンメチル化修飾による転写終結制御 (論文投稿準備中)

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、mNET-seq法やPOINT法による新生RNA解析を行った。その結果、SETD2 ノックアウト (KO) 細胞では、転写開始点の変化やncRNA転写の活性化が見られた。さらに、3' RNA-sequencing の結果から、ポリA付加部位の変化も検出された。これら反応は独立して制御されており、SETD2タンパク質によるクロマチン制御は多岐にわたることが示唆された。報告者はPOINT法によって、SETD2KO細胞だけでなく、ヒストンH3メチル基転移活性を失った腎臓がん患者由来細胞で、転写終結の破綻が起きていることが明らかになった。さらに、SETD2メチル基転移活性特異的な阻害剤 (SETD2阻害剤EPZ-719) を処理した細胞においても転写終結破綻が起きていることを確認した。この結果は、SETD2タンパク質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。驚いたことに、H3K36me3はSETD2阻害剤処理後数日で完全に消失したが、転写終結破綻は起きず、SETD2阻害剤による転写終結破綻が検出されるには、1週間以上処理し続ける必要があることがわかった。このことにより、SETD2による転写終結制御は間接的なものであることが示された (論文投稿準備中)。現在、H3K36me3レベル低下時にどのようなクロマチン環境の変化が引き起こされるのかを質量分析や免疫沈降法にて調べているところである。また今後の研究展開として、SETD2機能喪失だけでなく、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予定である。

### 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、ゲノム損傷を引き起こすDNA-タンパク質架橋剤を処理した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、抗がん剤候補であるスプライシング阻害剤によって引き起こされる未成熟転写終結を見出しているが、それによって影響を受ける遺伝子群は約20%ほどである (PMID: 33735606, *Molecular Cell* 2021)。それらはDNA-タンパク質架橋剤が影響を与える遺伝子群と異なっていた。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、新たな遺伝子発現制御機構を明らかにしようとしている。また、ロングリードシーケンサー (PacBio) によって得られた未成熟終結由来のRNA情報を一分子解析しているところであり、そのリスト化を進めている。さらには、それらのncRNAの細胞内局在解析を進めている。スプライシング阻害剤とDNA-タンパク質架橋剤の両者で共通して、

大部分のRNAを核内に係留させていることから、未成熟転写終結が遺伝子発現における重要な制御ステップであることが示唆された。今後さらに分子生物学的な解析を行うことによって、医学的に応用可能なncRNAを発見することを目指す。

## 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-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損傷の増加が確認されている。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、転写終結制御による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、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を明らかにすることを目指す。