

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03182

研究課題名(和文) 新規プロテオーム解析を駆使した転写終結・ポリA付加部位選択機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the selection mechanism of transcription termination and polyadenylation sites by using novel proteomic approach

研究代表者

山口 雄輝 (Yamaguchi, Yuki)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：50345360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、転写終結・3'プロセシング部位の選択機構を「反応場(構造)」と「機能」の両面から明らかにすることである。前者については、我々が開発した抗体を用いた周辺因子の proximity-dependent biotinylation法を用いて構造面の解析を進めた。後者については、候補因子のノックダウンや1,6-ヘキサンジオール処理が選択的ポリ(A)付加に及ぼす影響をRNA-seq等により解析した。これらにより、NELF、CBC、CF-Im等の転写・RNAプロセシング因子がCajal Bodyの構成因子と協力して多くの遺伝子の選択的ポリ(A)付加を制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的ポリ(A)付加は、初期発生やB細胞の成熟分化、に関わるほか、その異常はグリオーマ等の疾患にも深く関与しており、選択的スプライシングや選択的プロモーターの使用と並んで、多様で複雑なトランスクリプトームの形成に重要な役割を果たしていることが分かってきている。本研究成果は、こうした多様で複雑なトランスクリプトームの形成機構、特に核内構造との関わりを理解を深めるのみならず、今後、転写・RNAプロセシング因子の遺伝子変異と疾患との関連の解明にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the selection mechanism of transcription termination and 3' processing sites from the viewpoints of both "reaction field (structure)" and "function." For the former, we analyzed the structural aspect using our proximity-dependent biotinylation method using antibodies. For the latter, we analyzed the effects of knockdown of candidate factors and 1,6-hexanediol treatment on alternative polyadenylation by RNA-seq. These results revealed that transcription and RNA processing factors such as NELF, CBC, and CF-Im cooperate with Cajal Body components to regulate alternative polyadenylation in many genes.

研究分野：分子生物学、生化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：RNAポリメラーゼII 転写伸長 選択的RNAプロセシング 核内構造

1. 研究開始当初の背景

転写終結・3'プロセッシング部位の選択機構として、選択的ポリ(A)付加という細胞分化やシグナル伝達等に関わる制御機構と、望ましくない遺伝子内部の潜在的ポリ(A)付加シグナルを読み飛ばす機構の2種類が知られている。これらの分子機構の全体像は未だ明らかでないが、申請者らは最近、NELF bodies という核内ドメインが後者に重要な役割を果たしていることを見出した。

2. 研究の目的

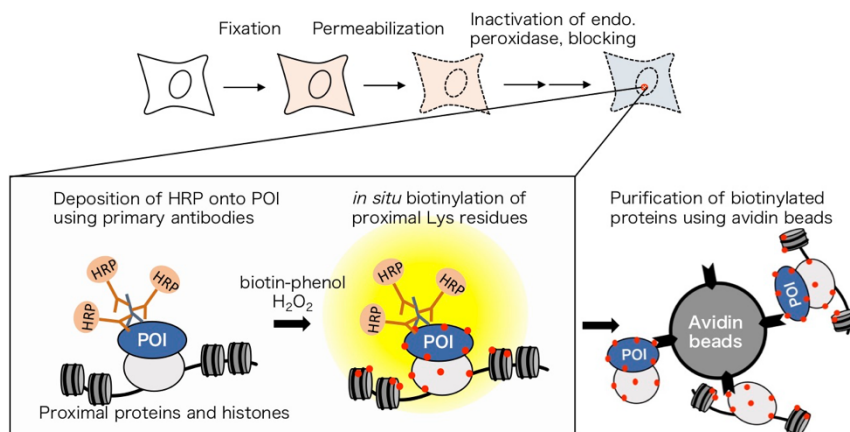
本研究の目的は、転写終結・3'プロセッシング部位の選択機構について「反応場(構造)」と「機能」の両面から明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では主に以下に述べる2つの相補的なアプローチにより目的の達成を目指す。

構造面からのアプローチ

申請者らは液液相分離によって形成される細胞内ドメインの構成成分を解析する新規プロテオーム解析法を開発した。本研究では proximity-dependent biotinylation through antibody and peroxidase (PBAP) 法を用いて NELF bodies の構成成分を網羅的に同定する。PBAP 法とは (i) 細胞を免疫染色の要領でホルムアルデヒド固定した後、(ii) 抗原抗体反応を介して HRP を配置し、(iii) そこにフェノールビオチンと H₂O₂ を添加し、ペルオキシダーゼ活性によって短寿命のフェノキシラジカルを発生させて周辺タンパク質の Tyr, Trp, His, Cys 残基等をビオチン化するというもので、既存の方法よりも数十倍高感度である。アビジンビーズ精製後、インプットやコントロールとともに SILAC プロテオーム解析を行って、特異的な周辺タンパク質を網羅的に同定する (図 1)。クロマチンや RNP も共精製されるので、次世代シーケンサーを用いて周辺 DNA/RNA を解析することもできる。



機能面からのアプローチ

申請者らは転写終結・3'プロセッシング部位の変化を検出できるレポーターアッセイ系を確立した。本研究ではこのレポーターアッセイ系を用いて機能的スクリーニングを行い、選択的 PAS や cryptic PAS の制御に関わる因子群を網羅的に同定する。

4. 研究成果

(1) PBAP 法を用いて 1,6-ヘキサンジオール-/+で NELF 周辺因子のビオチン化反応を行い、SILAC 法により比較定量プロテオーム解析を行った。その結果、NELF bodies と共局在する複数のタンパク質を同定した。

(2) さらに、PBAP 法の水平展開として、核内にドット状の局在を示す 3'末端プロセッシング因子 CF-Im に注目した。HeLa 細胞を 1,6-ヘキサンジオールで処理したところ、CF-Im の核内局在が変化し、CF-Im の集積が液液相分離によるものであることが示唆された。さらに、熱ショックやその他のストレスを加えたところ、ある種の条件下で CF-Im の核内局在が変化することが判明した。

(3) PBAP 法を用いたプロテオーム解析により CF-Im の周辺因子を探索し、多数の周辺因子を同定した。この結果を以前、Cajal Body マーカーの Coilin に対して実施した PBAP 法のデータと比較したところ、部分的なオーバーラップが認められ、Cajal Body タンパク質がエンリッチしていることが確認できた。このことは、免疫染色をおこなったとき、CF-Im が Cleavage Body という核内ドメインにある程度局在し、Cleavage Body と Cajal Body が部分的に重なるという知見と整合的である。

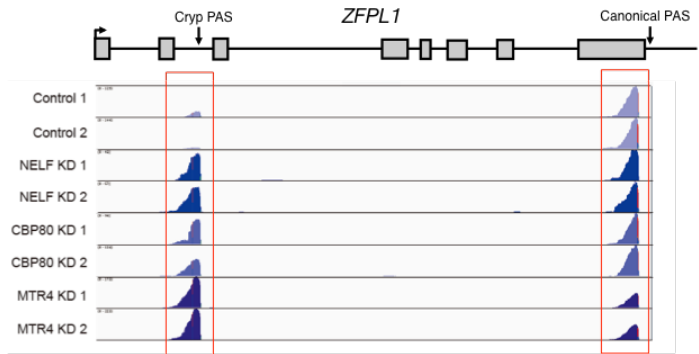


図 2. NELF、CBC、MTR4 による cryptic PAS 抑制

(4) 1,6-ヘキサンジオール処理の有無で PBAP 法を行い、CF-Im 周辺でビオチン化される因子を調べたところ、多くの周辺因子でビオチン化レベルが 1,6-ヘキサンジオール処理によって低下したことから、これらの因子を含む核内ドメインへの集積が液液相分離によるものであることが示唆された。

(5) RNA-seq データを用いて、1,6-ヘキサンジオール処理、CF-Im ノックダウン、NELF ノックダウンによって共通して alternative polyadenylation (APA) に影響を受ける遺伝子の候補を特定し、その影響を 3'-RACE 等によりバリデーションした (図 2)。

(6) 当初計画では、転写終結・3'プロセッシング部位の変化を検出できる RFP/GFP デュアルレポーターアッセイ系を用いて機能的スクリーニングを行い、選択的 PAS や cryptic PAS の制御に関わる因子群を網羅的に同定する予定だった。しかし pooled sgRNA ライブラリースクリーニングの予備検討を行ったところ、RFP/GFP の蛍光量比が個々の細胞間でかなりバラつき、集団としての解析はできてもシングルセルレベルでは難しいことが判明した。

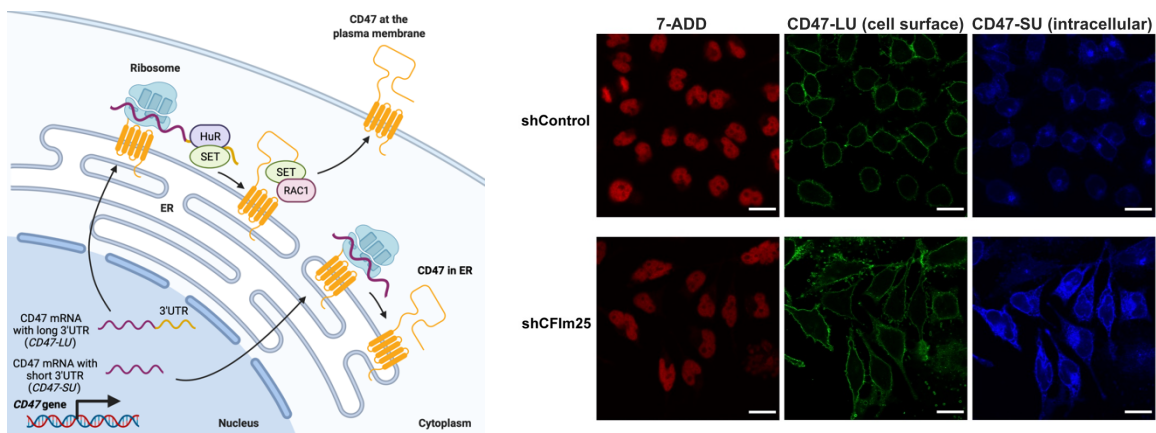


図 3. CD47 遺伝子の APA は CFIm による制御を受ける

(7) そこで方針を切り替え、選択的ポリ(A)付加により異なるアイソフォームを発現する内在遺

伝子 *CD47* の発現変化を捉えるスクリーニング系を代わりに確立した。*CD47* 遺伝子からは APA により 2 種類の mRNA バリエーションが生じるが、long isoform から翻訳される *CD47* は細胞表面に提示されるのに対し、short isoform から翻訳される *CD47* は細胞内に保持される。細胞表面と細胞内の *CD47* をそれぞれ緑と赤で標識された抗 *CD47* 抗体で免疫染色し、APA の変化を高感度で検出できる実験系を確立した (図 3)。

(8) 確立されたスクリーニング系に基づき、sgRNA ライブラリー (約 19,000 のタンパク質コード遺伝子に対する約 76,000 の sgRNA を発現するレンチウイルスベクター) を導入し、内在遺伝子をランダムに不活化した後、抗 *CD47* 抗体で細胞を染色し、FACS で赤緑比が増減した細胞集団を回収し、ゲノム DNA を鋳型にして sgRNA 配列を PCR 増幅し、次世代シーケンサーにより sorting 前後でエンリッチした sgRNA 配列を特定した。以上により、*CD47* の APA に関わる遺伝子の候補群を同定した。

(9) 横浜市大の高橋秀尚教授、鈴木秀文助教のグループとの共同研究で、Mediator と Cajal Body が複製依存的ヒストン遺伝子の 3'末端における Pol II の一時停止に重要な役割を果たすことを明らかにした。この共同研究において PBAP 法の技術供与等に貢献した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki, H., Abe, R., Shimada, M., Hirose, T., Hirose, H., Noguchi, K., Ike, Y., Yasui, N., Furugori, K., Yamaguchi, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Yamamoto, T., Saitoh, N., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R., Conaway, J., and Takahashi, H.	4. 巻 13
2. 論文標題 The 3 Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30632-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Azuma, N., Yokoi, T., Tanaka, T., Matsuzaka, E., Saida, Y., Nishina, S., Terao, M., Takada, S., Fukami, M., Okamura, K., Maehara, K., Yamasaki, T., Hirayama, J., Nishina, H., Handa, H., and Yamaguchi, Y.	4. 巻 ddad034
2. 論文標題 Integrator complex subunit 15 controls mRNA splicing and is critical for eye development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hum. Mol. Genet.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddad034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, J., Ito, T., Yamaguchi, Y., and Handa, H.	4. 巻 51
2. 論文標題 Discovery of CRBN as a target of thalidomide: a breakthrough for progress in the development of protein degraders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Soc. Rev.	6. 最初と最後の頁 6234-6250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cs00116k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu, N., Asatsuma-Okumura, T., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y., Handa, H., Ito, T.	4. 巻 4
2. 論文標題 PLZF and its fusion proteins are pomalidomide-dependent CRBN neosubstrates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 1277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02801-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuda, M., Suwa, T., Suzuki, H., Yamaguchi, Y., and Nishimura, Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Three human RNA polymerases interact with TFIIH via a common RPB6 subunit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito, T., Yamaguchi, Y., and Handa, H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Exploiting ubiquitin ligase cereblon as a target for small-molecule compounds in medicine and chemical biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 987-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, J., Suwa, T., Murase, Y., Tateno, S., Mizutome, H., Asatsuma-Okumura, T., Shimizu, N., Kishi, T., Momose, S., Kizaki, M., Ito, T., Yamaguchi, Y., and Handa, H.	4. 巻 16
2. 論文標題 ARID2 is a pomalidomide-dependent CRL4CRBN substrate in multiple myeloma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 1208-1217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-020-0645-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tateno, S., Iida, M., Fujii, S., Suwa, T., Katayama, M., Tokuyama, H., Yamamoto, J., Ito, T., Sakamoto, S., Handa, H., and Yamaguchi, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide screening reveals a role for subcellular localization of CRBN in the anti-myeloma activity of pomalidomide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61027-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi, H., Ranjan, A., Chen, S., Suzuki, H., Shibata, M., Hirose, T., Hirose, H., Sasaki, K., Abe, R., Chen, K., He, Y., Zhang, Y., Takigawa, I., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Fujii, S., Iida, M., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y., Suzuki, Y., Matsumoto, M. et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14849-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木秀文, 阿部竜太, 嶋田美穂, 廣瀬智威, 廣瀬博子, 野口慶介, 池陽子, 安井七海, 古郡華月, 山口雄輝, 豊田敦, 鈴木穰, 山本達郎, 斉藤典子, Sato Shigeo, Tomomori-Sato Chieri, Conaway Ronald, Conaway Joan, 高橋秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による新規の転写スピード調節機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口慶介, 鈴木秀文, 阿部竜太, 池陽子, 井野洋子, 木村弥生, 梁明秀, 土井宏, 田中章景, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 新規ピオチン標識法を用いたマルチオミクス解析によるCajal body構成因子の網羅的解析とCajal body形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋秀尚, 鈴木秀文, 阿部竜太, 嶋田美穂, 廣瀬智威, 廣瀬博子, 野口慶介, 池陽子, 安井七海, 古郡華月, 山口雄輝, 豊田敦, 鈴木穰, 山本達郎, 斉藤典子, Sato Shigeo, Tomomori-Sato Chieri, Conaway Joan, Conaway Ronald
2. 発表標題 Pol IIの一時停止および核体凝集体の制御におけるメディエーター複合体の役割
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田昌彦, 諏訪哲史, 鈴木秀文, 山口雄輝, 西村善文
2. 発表標題 ヒトRNAポリメラーゼと基本転写/修復因子TFIIHの新たな相互作用の構造生物学的研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本淳一, 山口雄輝, 半田宏
2. 発表標題 レナリドマイド耐性多発性骨髄腫細胞の生存に重要なポマリドマイド依存性CRL4CRBNのネオ基質ARID2の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原口大和, 坂本聡, 山口雄輝
2. 発表標題 二次元的スクリーニング解析を駆使した既存抗がん剤の新規作用機序の解明を目指した研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口雄輝
2. 発表標題 RNAポリメラーゼとTFIIHの相互作用部位の細胞機能解析
3. 学会等名 BINDS-NMR報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本淳一, 山口雄輝, 半田宏
2. 発表標題 ポマリドミド依存的なCRBNのネオ基質ARID2の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口慶介, 鈴木秀文, 阿部竜太, 池陽子, 井野洋子, 木村弥生, 梁明秀, 土井宏, 田中章景, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 新規ビオチン標識法を用いたマルチオミックス解析によるCajal body形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口大和, 坂本聡, 山口雄輝
2. 発表標題 ナノ磁性ビーズ精製とCRISPRライブラリースクリーニングによる薬剤標的分子の網羅的同定を目指した研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古屋智基, 山口雄輝
2. 発表標題 In situビオチン化によるコヒーシン近傍因子の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諏訪哲史, 奥田昌彦, 鈴木秀文, 西村善文, 山口雄輝
2. 発表標題 共通サブユニットRPB6を介したヒトRNAポリメラーゼIIと基本転写因子TFIIHの相互作用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木秀文, 阿部竜太, 嶋田美穂, 廣瀬智威, 廣瀬博子, 野口慶介, 古郡華月, 池陽子, 安井七海, 豊田敦, 鈴木穰, 山本達郎, 斉藤典子, Ronald Conaway, Joan Conaway, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による新規の3' Pol IIポージング制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田昌彦, 諏訪哲史, 山口雄輝, 西村善文
2. 発表標題 RNAポリメラーゼと基本転写/修復因子TFIIHの新たな相互作用
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 フェロトキシ抑制タンパク質1(FSP1)活性向上剤及びその用途、並びにFSP1活性向上剤をスクリーニングする方法	発明者 小坂仁、宮内彰彦、 神保恵理子、小林 瑞、山口雄輝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-185356	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗骨髄腫剤および抗骨髄腫剤のスクリーニング方法	発明者 半田宏、伊藤拓水、 山口雄輝、日置(山 本)淳一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-141689	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

RNAポリメラーゼの共通テイルの役割を解明
<https://www.titech.ac.jp/news/2021/061510>
疾患関連タンパク質PLZFの選択的分解が可能に 白血病などの治療につながる発見
https://educ.titech.ac.jp/bio/news/2021_11/061510.html
東京工業大学生命理工学院山口研究室
<http://yamaguchi.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------