

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06541

研究課題名（和文）TGF に応答する機能性cis-NATs群の生理・分子機構の解明

研究課題名（英文）Investigating the physiological function and molecular mechanisms of cis-NATs responding to TGF\_beta

研究代表者

大畑 樹也（Ohhata, Tatsuya）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80616459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：TGF は腫瘍抑制・促進作用の二面性を持つ増殖因子である。cis-NATsは、センス鎖と同領域から転写される逆方向の転写産物である。本提案では、TGF 応答遺伝子のcis-NATsを網羅的に探索し、その生理的機能・分子機構の解明を試みた。本研究では独自プログラムCCIVRを開発し、機能的なTGF 応答性cis-NATsを複数同定した（Ohhata T et al., 2022）。さらに非オーバーラップ型のアンチセンスRNAも探索できるCCIVR2を開発した（Suzuki M et al., 2023）。CCIVR/CCIVR2はアンチセンスRNA研究発展の寄与が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cis-NATsは、センス鎖と同領域から転写される逆方向の転写産物である。本研究では、RNA-seqデータから網羅的にcis-NATsを同定できる独自プログラムCCIVRを開発した（Ohhata T et al., Sci Rep., 2022）。さらに非オーバーラップ型のアンチセンスRNAも探索できるCCIVR2も開発した（Suzuki M et al., Sci Rep., 2023）。CCIVR/CCIVR2は異なる生物種や多くの生物学的プロセスの機能的アンチセンス転写産物の解析に寄与する。

研究成果の概要（英文）：TGF is a growth factor with dual functions to promote or suppress tumor growth. cis-NATs are a class of antisense transcripts transcribed from the same genomic region of the sense strand. In this proposal, we attempted to comprehensively identify the TGF -responsive cis-NATs and elucidate their physiological functions and molecular mechanisms. In this study, we developed an original program called CCIVR and successfully identified several functional TGF -responsive cis-NATs (Ohhata T et al., Sci Rep 2022). In addition, we developed another original program, CCIVR2, which also facilitates the identification of non-overlapping antisense transcripts (Suzuki M et al., Sci Rep., 2023). CCIVR/CCIVR2 is therefore a valuable bioinformatics tool for the analysis of functional antisense transcripts in different species and numerous biological processes.

研究分野：分子生物学

キーワード：TGF cis-NATs プログラム

## 1. 研究開始当初の背景

TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )は腫瘍抑制作用と腫瘍促進作用の二面性を持つ増殖因子である。このためTGF $\beta$ の生理作用は多彩であり、増殖抑制作用、アポトーシス誘導、EMT (Epithelial-Mesenchymal transition, 上皮間葉転換)誘導などが知られる。EMTは正常発生、傷の治癒、がんの転移などに関わることが知られる。cis-NATs (cis-Natural Antisense Transcripts)とは、センス鎖 (パートナー遺伝子)と同じ領域から転写される逆方向の転写産物である。申請者はcis-NATsのパラダイムである*Tsix*の分子機構について独自の研究を進めてきた。*Tsix*の様に、一部のcis-NATsはそのパートナーの転写をエピジェネティックにかつ恒常的に抑制する潜在能力を持つと思われる。しかしながら、数多くのcis-NATsの潜在能力は依然不明なままである。

## 2. 研究の目的

*Tsix*などの一部のcis-NATsを除き、多くのcis-NATsの機能は不明であり、特定の生命現象のcis-NATsの基本情報 (構造パターン、進化的保存性など)も著しく不足している。我々はTGF $\beta$ 応答反応における新規lncRNA *ELIT-1*を単離し、EMTに関わる機能を報告した。その過程で、肝がん細胞株Huh-7の中で、TGF $\beta$ 応答により発現変動する遺伝子群を網羅的に単離した。本研究では、特定の生命現象のパラダイムとしてTGF $\beta$ 応答反応に着目し、RNA-seqによる独自の網羅的遺伝子発現変動データを元に、TGF $\beta$ 応答遺伝子のcis-NATsを①体系的に探索・編纂し、その②生理的機能解明、および③分子機構解明を試みた。

## 3. 研究の方法

TGF $\beta$ 応答遺伝子のcis-NATsの①体系的な探索・編纂のために、独自のcis-NATs抽出プログラムを開発した。プログラム開発のプログラミング言語はPythonを用いた。また、TGF $\beta$ 応答遺伝子のcis-NATsの②生理的機能解明および③分子機構解明には、qRT-PCR、ウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法といった一般的な分子生物学的手法を用いた。

## 4. 研究成果

我々はTGF $\beta$ 応答遺伝子のcis-NATsの体系的な探索・編纂を可能にする独自プログラム CCIVR (Comprehensive cis-NATs identifier via RNA-seq data)を開発した。このプログラムはRNA-seqから得られた発現データとゲノムアノテーションに基づいて、あらゆる種類のcis-NATを網羅的に同定することができる (図1)。CCIVRとゲノムデータベースを用いて、11種のモデル生物からcis-NATペアを網羅的に同定することに成功した。雌性発生もしくは雄性発生の胚性幹細胞からのRNA-seqデータを用いたCCIVR解析により、既知のインプリンティングcis-NATペアであるKCNQ1/KCNQ10T1が同定され、CCIVRの有用性が確認された。CCIVRにより、TGF $\beta$ 刺激によって発現が逆相関するcis-NATペアを複数同定することができ、その中にはパートナー遺伝子のプロモーターにエピジェネティックな変化を導入することによってパートナー遺伝子を機能的に抑制するcis-NATも含まれていた (これは*Tsix*と同様の発現調節機構だと思われる)。CCIVRはTGF $\beta$ 応答性cis-NATs解析に限らず全てのRNA-seq dataに応用することができるため、我々はその汎用性に着目し論文として報告した (Ohhata T et al., *Sci Rep.*, 2022)。さらに我々は、CCIVRの機能をさらに拡張したCCIVR2の開発にも成功し、報告した (Suzuki M et

al., *Sci Rep.*, 2023)。CCIVR2 は、転写開始点 (TSS) もしくは転写終了点 (TES) からの特定の相対的領域内から転写されるオーバーラップ/非オーバーラップ型アンチセンス転写産物を網羅的に同定することができる。このように、TGF  $\beta$  反応性 cis-NATs の網羅的単離で始まった本研究であるが、本来の目的である複数の機能性 cis-NATs の同定のみならず、汎用性の高いバイオインフォマティクスツールである CCICVR/CCIVR2 の開発へと展開した。なお、CCIVR/CCIVR2 ともに、github より無償で利用可能である (<https://github.com/CCIVR>)。

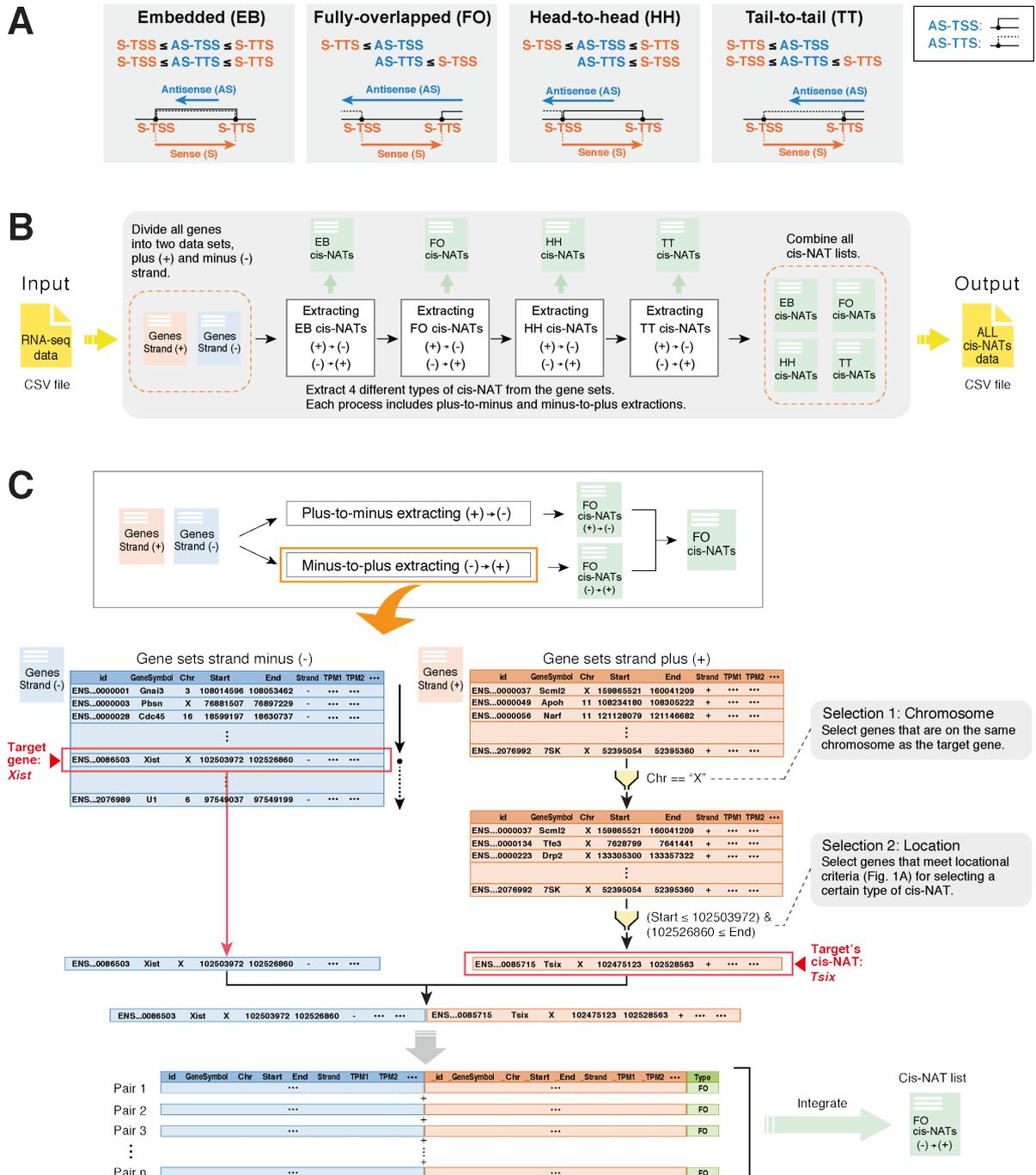


図1. CCIVR の概要とパイプライン

- A CCIVR が定義する 4 種類の cis-NATs のタイプ。Embedded (EB), Fully-overlapped (FO), Head-to-head (HH), Tail-to-tail (TT).
- B CCIVR のパイプライン。RNA-seq data をインプットとし、4 種類の cis-NATs をまとめた 1 つのファイルとしてアウトプットされる。
- C 実際の CCIVR のプロセスの一例。Xist を標的遺伝子、Tsix がその cis-NAT として単離される過程を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohhata Tatsuya, Suzuki Maya, Sakai Satoshi, Ota Kosuke, Yokota Hazuki, Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 CCIVR facilitates comprehensive identification of cis-natural antisense transcripts with their structural characteristics and expression profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19782-5	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 Suzuki Maya, Sakai Satoshi, Ota Kosuke, Bando Yuki, Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Kitagawa Masatoshi, Ohhata Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 CCIVR2 facilitates comprehensive identification of both overlapping and non-overlapping antisense transcripts within specified regions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-42044-x	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大畑樹也、鈴木麻耶、酒井聡、太田幸佑、北川雅敏
2. 発表標題 Cis-Natural antisense transcripts(cis-NATs)を網羅的に同定する独自プログラムCCIVRの開発
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大畑樹也
2. 発表標題 CCIVR2は特定領域内における重複・非重複アンチセンス転写産物の包括的な同定を可能にする
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大畑樹也
2. 発表標題 CCIVR1はcis-NATの構造的特徴と発現プロファイルの包括的同定を可能にする
3. 学会等名 第7回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大畑樹也
2. 発表標題 CCIVR2は指定領域のオーバーラップ型および非オーバーラップ型アンチセンスRNAを網羅的に同定する
3. 学会等名 第4回浜松医科大学研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 CCIVR facilitates comprehensive identification of cis-NATs with their structural characteristics and expression profiles
3. 学会等名 The 20th Kyungpook_Hamamatsu National University Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大畑樹也
2. 発表標題 CCIVR1はcis-NATの構造的特徴と発現プロファイルの包括的同定を可能にする
3. 学会等名 第29回浜松医科学シンポジウム
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------