

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06953

研究課題名（和文）RNA activationにおける分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms in RNA activation

研究代表者

大野 慎一郎 (Ohno, Shinichiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90513680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、あまり知られていないmicroRNAによる転写活性化機構（RNA activation: RNAa）の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。結果、miRNA/AGO/TNRC6複合体の他に、転写活性化因子として、DDX21/CDK9複合体を同定した。また、DDX21/CDK9複合体による転写活性化メカニズムとして、RNA pol II pausingの解除を明らかにした。これらのことから、核内にあるmicroRNAの新しい役割とメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAによるRNA干渉は、発生・分化および各種疾病の発症などに関与する重要な機構であることが広く知られている。一方でRNAaは、その解析の難しさから、不明な点が多い現象であり、挑戦的な研究テーマであった。本研究により、転写活性化の分子機構の一端が明らかになったことで、RNAa研究は飛躍的に進歩する可能性がある。またRNAaは、任意の内在性遺伝子の発現を誘導する技術として注目されており、新規の核酸医薬として開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism of transcription activation (RNAa) by microRNAs, which is not well known. In addition to the miRNA/AGO/TNRC6 complex, we identified the DDX21/CDK9 complex as a transcriptional activator. We also identified the release of RNA pol II pausing as the mechanism of transcriptional activation by the DDX21/CDK9 complex. These findings reveal a new role and mechanism for microRNAs in the nucleus.

研究分野：実験病理

キーワード：RNA activation microRNA RNA pol II pausing

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二本鎖 RNA と相補的な塩基配列を持つメッセンジャーRNA (mRNA) が分解される現象は、RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) として広く知られ、発見者であるアンドリュー・ファイアーとクレイグ・メローは2006年のノーベル生理学・医学賞を受賞している。RNA 干渉を起こす核酸は主に2種類あり、一般的には生体内に存在するものを microRNA (miRNA)、人工的にデザインしたものを siRNA (small interference RNA) と呼ぶ。ヒトだけでも2600種類発現する miRNA は、ファインチューナーとして多様な mRNA の発現を複雑に制御している。また、siRNA は、任意の遺伝子に対する Loss of function 解析に広く応用されており、miRNA および siRNA の発見が医学・生物学に与えた影響は計り知れない。その受賞と同じ2006年に発見された新しい生命現象に RNA activation (RNAa) がある。RNAa は、Small RNA が遺伝子の発現を増加させる機構で、RNA 干渉と対照的な現象である。遺伝子のプロモーター配列に相補的な Small RNA を細胞へ導入すると、低い確率でその遺伝子の発現を亢進させられることが知られている (RNAa)。この RNAa を誘導する Small RNA は、Small activating RNA (saRNA) と呼ばれているが、saRNA の結合標的がプロモーターの DNA 配列である可能性は構造解析等から否定されており、そのメカニズムは不明であった。近年、次世代シーケンサーの普及により、発現の低い転写産物まで網羅的に解析された結果、ヒトのプロモーターの約4割はダイバージェントプロモーターであることが明らかになった。ダイバージェントプロモーターとは、mRNA の転写に加えて逆方向に non-coding RNA (Promoter associated non-coding RNA, pancRNA) を低発現するプロモーターの種類である。pancRNA は、対となる上流の mRNA の転写を制御しており、saRNA の結合標的は、この pancRNA と考えられている。生体内では、miRNA が saRNA として多くの遺伝子の転写制御を担っている可能性があり、saRNA による pancRNA の認識および転写を誘導する分子機構を明らかにする事は、依然として未知の部分が多い転写制御の解明に重要である。また、saRNA は分子生物学の実験ツールおよび新規核酸医薬としても期待されている。プラスミドやウイルスベクターによる遺伝子の強制発現は、その現実的でない発現量から正常な複合体形成を阻害し、抑制的もしくは異所的な発現となる場合がある。従って、任意の遺伝子を内在性のプロモーターの活性化により特異的に発現誘導する技術は、より精度の高い Gain of function 実験を実現するために極めて重要である。一方で、RNAa の分子メカニズムは依然として不明な点が多く、生理学的意義も未解明であり、研究ツールとしての応用も進んでいないのが現状である。

### 2. 研究の目的

任意の miRNA を細胞に導入し、網羅的な mRNA 発現解析を行うと miRNA の RNA 干渉作用により発現が低下した多数の mRNA が観察される。その発現が低下した mRNA 群の中から miRNA の重要な標的遺伝子を探索するのが、一般的な miRNA 研究の流れである。しかし、実際に miRNA の導入実験を行うと miRNA により発現が誘導される遺伝子は抑制される遺伝子と同等に観察される。研究代表者等は、miRNA による遺伝子発現誘導に、重要な生理的意義が隠れている可能性があると考え、解析を行った。結果、がん抑制性 miRNA である miR-34a による、がん抑制遺伝子 ZMYND10 の直接的な転写誘導機構を明らかにした。一方で、miRNA による遺伝子発現の誘導が、RNA 干渉の二次的な影響もしくは核酸に対する自然免疫応答の結果である可能性を排除することは非常に難しく、RNAa は挑戦的な研究テーマである。実際に、miRNA による RNAa 現象を証明した例は少なく、我々の研究を含めてまだ数報しか報告されていない。また、miRNA が pancRNA に結合した後、どのような分子機構により転写を誘導するかは依然として不明である。以上のことから本研究は、独自に発見した miR-34a によるがん抑制遺伝子 ZMYND10 の発現誘導を解析の切り口として、RNAa の普遍的な分子機構の解明を目的とする。また、任意の遺伝子の発現を特異的に誘導できる RNAa は、実験ツールおよび新規核酸医薬として特許技術の確立も期待できる研究課題である。

### 3. 研究の方法

本研究では、これまでの研究過程で発見した、miR-34a によるがん抑制遺伝子 ZMYND10 の発現誘導を RNAa 機構の評価系として、この現象に関わる分子群を同定し、最終的には RNAa 現象の普遍的な分子メカニズムを理解したい。この研究目的を達成するために、以下の項目を検討した。

#### RNAa に関わる転写因子の同定

##### -1 プロテオーム解析による核内 AGO/TNRC6 複合体の解析

核内 miRNA は、細胞質中の miRNA と同様に AGO/TNRC6 と複合体を形成して機能する。RNAa の際には、miRNA/AGO/TNRC6 複合体がさらに何らかの転写活性化因子と結合し、プロモーターを活性化させていると考えられる。したがって、核内 AGO および TNRC6 の共免疫沈降により、核内 AGO/TNRC6 と複合体を形成する転写因子を同定する。転写因子の探索は、LC-MS/MS (DIA) プロテオーム解析を用いた。

##### -2 遺伝子欠損細胞株の樹立と解析

RNAa は、RNA 干渉と同様に AGO/TNRC6 複合体が使われるため、候補転写因子の機能解析には、

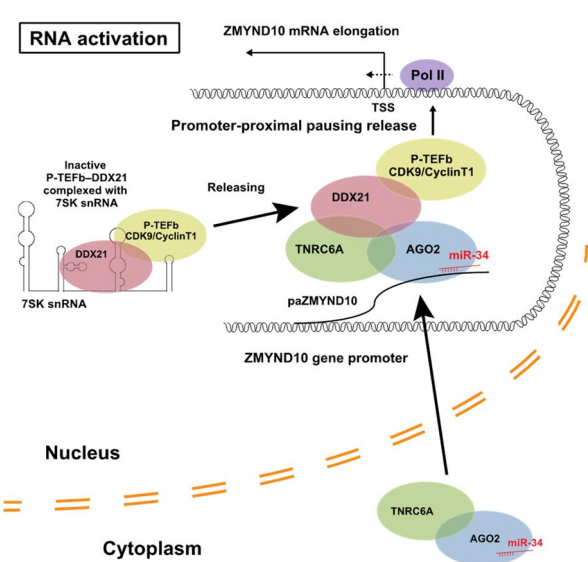
RNA 干渉を用いることができない。実際に、RNAa と RNA 干渉を同時に誘導すると、各々が拮抗的に阻害されることを確認している。したがって、候補となる転写因子の機能解析は、CRISPR/Cas による遺伝子欠損細胞株を作製して検証した。遺伝子欠損細胞株の樹立後は、miR-34a による ZMYND10 の発現誘導解析により、RNAa における転写因子の役割を評価した。

#### miRNA が結合する pancRNA の網羅的解析

miRNA が pancRNA に結合することで、RNAa が惹起されるのであれば、RNAa は pancRNA を発現するプロモーターを有する遺伝子のみ起こる制御機構である。したがって、pancRNA の網羅的な解析により、RNAa の全体像を予測することが可能と考えられる。pancRNA は、非常に発現量が低く、転写途中の RNA (nascent RNA) として核内に存在している。したがって、核画分を用いて抗 AGO 抗体による RNA immunoprecipitation (RIP) assay を行い、miRNA-AGO 複合体と結合している RNA を濃縮精製する。RNA サンプルは、次世代シーケンサーによる網羅的な配列解析を行う。次世代シーケンサーで得られた配列情報は、NCBI および lncRNA データベースと照合し、プロモーターから発現する pancRNA を抽出する。その pancRNA が発現するプロモーターを有する遺伝子は、RNAa による発現制御を受けている可能性が高いと考えられ、RNAa の全体的な規模および生理的意義の予想を行う。

#### 4. 研究成果

はじめにプロテオーム解析による核内 AGO/TNRC6 複合体の解析を実施した。核内 miRNA は、細胞質中の miRNA と同様に AGO/TNRC6 と複合体を形成して機能する。RNAa の際には、miRNA/AGO/TNRC6 複合体がさらに何らかの転写活性化因子と結合し、プロモーターを活性化させていると考えられる。したがって、核内 AGO および TNRC6 の共免疫沈降により、核内 AGO/TNRC6 と複合体を形成する転写因子の同定を試みた。転写因子の探索は、LC-MS/MS (DIA) プロテオーム解析を用いた。結果、核内 AGO/TNRC6 と複合体を形成する多数のタンパク質を同定し、特に AGO および TNRC6 の両方に強く結合するタンパク質として RNA ヘリカーゼの一種である DDX21 を同定した。続いて、DDX21 の RNAa における機能を明らかにするために CRISPR/Cas を用いて DDX21 遺伝子欠損細胞株を作製した。作成した DDX21 欠損細胞株を用いて、miR-34a による RNAa を評価した結果、DDX21 欠損細胞株では RNAa が顕著に低下しており、またこの低下は DDX21 発現ベクターの導入により回復した。加えて、この DDX21 欠損細胞株では、miR-34a の RNA 干渉標的である AXL および MET のノックダウンに影響はなかったことから、DDX21 は miR-34a の RNAa にのみ関与していることが示された。以上のように、核内 AGO/TNRC6 と複合体を形成し、RNAa に重要なタンパク質として DDX21 を同定した。一方で、DDX21 は rRNA の合成に関わる RNA ヘリカーゼであり、転写因子としての機能は報告されていない。このことから、DDX21 は核内 AGO/TNRC6 を中核とする RNAa 複合体を構成する重要な因子であるが、直接的な転写活性化因子は別に存在すると考えられた。DDX21 は、CDK9 と複合体を形成し、Pol II pausing (転写の一時停止) を解除することで転写を活性化させるという Nature 誌の報告 (Nature, 2015 February 12; 518(7538): 249-253.) があることから CDK9 について解析した。結果、CDK9 も核内 AGO/TNRC6 複合体に含まれること、CRISPR/Cas および阻害剤を用いた CDK9 の抑制は、RNAa も抑制することを明らかにした。以上のことから、核内 miRNA/AGO/TNRC6 複合体は、DDX21/CDK9 複合体を介して、Pol II pausing の解放により転写を活性化させている可能性が示唆された (右図)。さらに、CDK9 の阻害因子として知られている 7SK snRNA も、RNAa に関与していることが、明らかとなった。この新しい RNAa 分子機構のモデルは、原著論文として Cell Reports 誌に掲載された (Cell Rep. 2022 Apr 12; 39(2):110673.)。また、第 110~112 回日本病理学会総会および第 81~82 回日本癌学会学術集会にて発表された。



RNAa の標的となりうる遺伝子を網羅的に同定する目的で、pancRNA の網羅的検出を核内 RNA-seq および、理化学研究所で開発された CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)-seq 解析により試みた。残念ながら、発現の低い pancRNA の検出には、どちらも感度が十分でなく、網羅的な pancRNA の検出には至らなかった。シーケンスの際のリード数の拡大および、不要な RNA の除去などで改善が期待されるが、今後の課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shin-ichiro Ohno, Keiki Oikawa, Toshiaki Tsurui, Yuichirou Harada, Kana Ono, Mizumo Tateishi, Aashiq Mirza, Masakatsu Takanashi, Kosuke Kanekura, Kumiko Nagase, Yoshihisa Shimada, Yujin Kudo, Norihiko Ikeda, Takahiro Ochiya, Xiaozhong Wang, Masahiko Kuroda	4. 巻 12;39(2)
2. 論文標題 Nuclear microRNAs release paused Pol II via the DDX21-CDK9 complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110673.	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 A mouse model of DICER1 syndrome develops hepatic mesenchymal hamartoma.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 A mouse model of DICER1 syndrome develops cirrhosis, bile duct hyperplasia and hepatic tumors
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 Model mice that mimic the genotype of DICER1 syndrome develop hepatic mesenchymal hamartoma.
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 Liver-specific DICER1 syndrome model mouse develops cystic liver tumor.
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 A mouse model of DICER1 syndrome develops cirrhosis, bile duct hyperplasia and hepatic tumors.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	熊谷 勝義 (Kumagai Katsuyoshi)  (20567911)	東京医科大学・医学部・助教  (32645)	
研究分担者	黒田 雅彦 (Kuroda Masahiko)  (80251304)	東京医科大学・医学部・主任教授  (32645)	
研究分担者	原田 裕一郎 (Harada Yuichirou)  (80570168)	東京医科大学・医学部・助手  (32645)	

#### 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		
米国	Northwestern University	Weill Cornell Medicine	