

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2021～2023

課題番号：19K24692

研究課題名（和文）RNAプロセッシングと共役するゲノム転写とその破綻機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of transcription coupled to RNA processing and its defect

研究代表者

野島 孝之（Nojima, Takayuki）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：80431956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 42,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、遺伝子発現の重要な制御ステップであるゲノム転写とそれに共役するRNAプロセッシング機構の理解を目標に掲げ、それに必要な解析方法の開発と医学的に役立つ知見を得ることを目的とした。まず、転写されたばかりのRNAを解析可能なPOINT法論を確立に成功した。POINT法により、正確な転写開始点、RNA切断点、スプライシングのキネティクスを明らかにした。また、発生段階における選択的スプライシングの重要性も明らかにした。さらには、大腸がんや腎臓がんにおける転写終結破綻機構についても新たな知見を得た。本研究の成果は、基礎生物学の発展に貢献するだけでなく、がん等の病気の治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生命の根幹をなす遺伝子発現制御の理解に大きく貢献するものである。今回開発したPOINT法は、転写解析法として簡便で得られる情報量が多いため、現在世界中で広く使われている。本研究において、POINT法はがんが破綻している転写終結反応を検出し、その破綻ががん細胞の増殖に影響していることを明らかにした。このことは、転写終結反応が抗がん剤開発の標的となりうることを示している。本研究の成果は、がんのみならずウイルス感染や神経疾患などの病気に関わる遺伝子発現を正確に解析することを通して、今後医学的な発展に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to understand a gene transcription and its coupled RNA processing, which are important regulatory steps in eukaryotic gene expression, and to develop necessary analytical methods and gain medical insights. Firstly, we successfully established the POINT method, which allows analysis of newly transcribed RNA. My POINT method reveals precise transcription start sites, RNA cleavage sites, and kinetics of co-transcriptional splicing. We also demonstrates the importance of alternative splicing during developmental stages. Additionally, the mechanisms of transcription termination defect in colorectal cancer and kidney cancer are revealed. The findings of this research contribute to the advancement of basic biology and also the development of treatment methods for diseases such as cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：新生RNA 転写終結 RNA polymerase II RNAプロセッシング クロマチン

1. 研究開始当初の背景

本研究者は、遺伝子発現の重要な制御ステップであるゲノム転写とそれに共役する RNA プロセッシング機構の理解を目標に掲げ、研究開始当初、以下のような知見を得ていた。

超高解像度新生 RNA 解析法 mNET-seq の開発とその応用

哺乳類 RNA polymerase II (Pol II) の C 末端ドメイン (C-terminal domain, CTD) は、7 アミノ酸 (Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇) 52 回リピートから構成され、真核生物において進化的に保存されている。試験管内生化学実験から、CTD のリン酸化は RNA プロセッシング因子群と Pol II 転写装置の相互作用を制御していることが知られているが、細胞内での制御機構は解析技術の制限により未だによくわかっていない。今までのゲノムワイドな転写解析方法は、全細胞から得られた Total RNA や poly A 付加 RNA など、定常状態の RNA のプロファイルに役立ってきた。しかし、細胞内 RNA 安定性がそれぞれで異なることから、転写活性を調べるためには、Pol II から新たに合成されたばかりの転写産物 (新生 RNA) を解析する必要がある。本研究者はゲノム転写を理解する目的で、Pol II 転写活性を CTD リン酸化と同時に解析可能な方法を初めて確立した。本研究者はその方法を mammalian Native Elongating Transcript (mNET)-seq 法と名付けた (Nojima et al., *Cell* 2015; Nojima et al., *Nature Protocol* 2016)。mNET-seq 法は単純かつ強力なゲノムワイド新生 RNA 解析技術である。mNET-seq 法は Pol II 転写活性中心を一塩基解像度でプロファイルし、Pol II CTD リン酸化修飾特異的な新生 RNA を検出可能である。例えば、4 番目スレオニンのリン酸化 (T4P) が転写終結部位、5 番目のセリン 5 のリン酸化 (S5P) がエクソン上での Pol II 一時停止に関わることを明らかにした。また、同じ条件下で質量分析法 (Mass Spectrometry, MS) 行うことにより CTD リン酸化特異的な Pol II 転写装置の構成因子を同定 (mNET-MS 法、Nojima et al., *Mol Cell* 2018a)、ヒストン修飾特異的なヌクレオソームで保護されている DNA 断片を解析することにより高解像度エピジェネティクス解析 (monoNucleosome-seq, mNuc-seq 法、Nojima et al., *Mol Cell* 2018b) にも適応可能である。以上のように、mNET-seq 法は応用性が高く、転写に関わる多くの反応機構を明らかにするための有力なツールである。

転写と共役した RNA スプライシング機構

RNA スプライシング反応は遺伝子機能の多様性獲得に必要なだけでなく、RNA の安定性や品質管理にも重要である。また RNA スプライシングは転写後に行われるのではなく、Pol II 転写中に共役して行われる反応であることが知られている。本研究者は mNET-seq 法を用いて、Pol II CTD S5P がスプライシング中間体 RNA 保持に重要であること (Nojima et al., *Cell* 2015)、さらに活性型スプライソソームが CTD S5P 特異的に Pol II 転写装置へ呼び込まれることを明らかにした。またスプライシング中間体 RNA 解析により、多くのイントロン除去が上流から順番に行われるなど RNA スプライシングのキネティクスの一端を示した (Nojima et al., *Mol Cell* 2018a)。

非コード遺伝子の RNA 代謝と転写制御機構

本研究者は、mNET-seq 法をはじめとする種々の RNA-seq 法を組み合わせたトランスクリプトーム解析から、タンパク質コードと非コード遺伝子 (特に遺伝子間領域非コード RNA) から産生される転写産物の発現機構、さらにその転写産物の安定性の違いを明らかにした (Schlackow, Nojima et al., *Mol Cell* 2017)。特に、非コード遺伝子群の転写産物は、その RNA プロセッシング効率がタンパク質コード遺伝子群に比べ有意に低く、転写後の RNA 分解を引き起こすことが示された。このことは、転写と共役した RNA プロセッシングが非コード RNA の安定性や機能を決定

していることを示唆している。さらに、タンパク質コードと非コード遺伝子の転写制御機構の違いを調べるために、mNuc-seq 法によりクロマチンの修飾状態を調べた。興味深い事に、リジン 36 番目のトリメチル化ヒストン H3 (H3K36me3) がタンパク質コード遺伝子に特異的に見られ、非コード領域にはほとんど検出されないことが示された。本研究者は、mNET-MS 法にて同定されたヒストンシャペロン SPT6 タンパク質が H3K36me3 のコード領域特異性を決定し、非コード RNA 転写を抑制していることを明らかにした。重要なことに、SPT6 タンパク質の欠失は非コード領域に多く見られる DNA 複製部位のゲノム転写を大幅に活性化していた。このことから、非コード領域での転写制御破綻が DNA 複製装置と Pol II 転写装置との衝突を引き起こし、DNA 複製ストレスを誘導することが示された (Nojima et al., *Mol Cell* 2018b)。この成果により、非コード領域ゲノム転写による細胞ストレス制御モデルが提唱された。

2. 研究の目的

本研究者は哺乳類の遺伝子発現制御、特にゲノム転写と RNA プロセッシング機構を明らかにすることを目標としている。特に、遺伝子多様性に関わる RNA プロセッシングと Pol II 転写装置のクロストークや時空間的制御機構は未だに明らかにされていない重要な問いである。それらゲノム転写制御機構の破綻は、がんやウイルス感染などで頻繁に見られるが、その分子機構は明らかでない。さらに、哺乳類ゲノムの大部分を占める非コード RNA 領域の転写がどのように制御され、細胞にどのように影響を与えるのかも不明である。本研究では、独自に開発した革新的ゲノム転写解析技術やその応用法によるトランスクリプトーム解析によって、ゲノム作動原理の包括的理解することを目的とした。

3. 研究の方法

ゲノム転写サイクルにおける RNA スプライシングのキネティクス

RNA プロセッシングの一つであるスプライシング反応は転写中に起こることにより、その反応効率を上げ、エクソン選択を精密に制御している。しかしながら、Pol II 転写装置がどの領域に到達した際にスプライシングが完了しているのかなど、基本的な分子機構でさえ明らかでない。本研究者は転写と共役した RNA プロセッシング、特にスプライシングのキネティクスを解明する目的で、新生 RNA 一分子解析法を開発した (Sousa-Luis et al., *Molecular Cell*, 2021)。本研究者は Pol II 転写装置から合成されているインタクトな新生 RNA を単離し、Oxford Nanopore Technologies (ONT) ロングリードシーケンサーにより解析した (研究開始当初 mNET-nano 法、現在は POINT-nano 法に改名)。POINT-nano 法は Pol II 転写活性部位を一塩基解像度でプロファイリングすると同時に、スプライシング前後の新生 RNA を区別可能である。さらには、ゲノム転写終結領域の新生 RNA の一分子解析も可能となるため、転写終結機構の解析にも有用である (リードスルー RNA)。転写中のイントロン除去の順序は選択的スプライシングや RNA 品質管理を制御すると考えられる。本研究では、ゲノム編集によって AID (Auxin-induced degradation) タグが付加された選択的スプライシング制御因子 PTBP1 を発現する ES 細胞 (Makeyev 研究室、UCL から提供) を用いて迅速にそのタンパク質を欠失させ、mNET 法や POINT 法にて転写中のエクソン選択ルールを明らかにした。

ゲノム転写終結機構とその破綻機構の解明

ゲノム転写終結反応は効率的な転写サイクルに必須とされる。興味深いことに、ヒストン H3K36 メチル化酵素 *SETD2* 遺伝子の変異が検出される腎臓がん細胞 (ccRCC)、単純ヘルペスウイルスやインフルエンザウイルス感染は非常に強い転写終結破綻を引き起こしていることが明らかに

なっている (Bauer et al., *Cell Rep* 2018; Zhao et al., *NSMB* 2018; Rutkowski et al., *Nature Comm* 2015; Grosso et al., *eLife* 2015)。しかしながら、その制御機構は未だに不明な点が多い。本研究者はゲノム転写終結がどのように制御され、上記した ccRCC 細胞でどのように破綻しているかを調べている。Pol II 転写活性は mNET-seq 法により正確に解析し、mNET-MS 法により転写複合体の同定を試みている。さらには、転写終結に重要なヒストン修飾、DNA 配列、DNA 構造や DNA 修飾などを詳細に調べている。これらのアプローチから、Pol II 転写装置が転写終結反応によって、どのように活性化遺伝子領域に制限され、下流非コード領域でのゲノムストレスを回避しているかを理解する。

さらに、ゲノム転写終結破綻は異常遺伝子間 RNA スプライシングによって融合遺伝子産物(キメラ RNA) を産生する。このキメラ RNA 産生は、融合上流・下流遺伝子の発現やその機能を低下させることが知られており、がん化またはがん細胞増殖促進に貢献していると考えられている。しかしながら技術的な問題により、その制御機構は長らく不明である。本研究者は、ccRCC 細胞または SETD2 ノックアウト細胞を用いて、POINT 法による新生 RNA 解析、クロマチン免疫沈降法やメチル化 DNA プルダウン法によるクロマチン環境解析を行うことで、転写終結破綻と異常 RNA スプライシングを引き起こしている因子群を同定しようとしている。その因子群の転写やスプライシングへの影響は mNET 法や POINT 法で解析する。このアプローチから、SETD2 を介する転写終結機構、さらにはその破綻によるキメラ RNA 産生機構を理解し、その産生機構を標的としたがん細胞増殖抑制を目指す。

4. 研究成果

新生 RNA 解析法 POINT の開発

本研究者は以前確立した mNET-seq 法 (Nojima et al., *Cell* 2015) を応用し、Pol II 転写装置から合成されているインタクトな新生 RNA を単離する方法を確立した (Sousa-Luis et al., *Molecular Cell* 2021)。この方法を Polymerase Intact Nascent Transcript (POINT) technology と名付けた。このインタクト新生 RNA は illumina シークエンサーを用いてゲノムワイドに解析できる (POINT-seq 法)。また、新生 RNA の 5' 末端はゲノムワイド 5' RACE によって解析する (POINT-5 法)。そのことによって、転写開始点や RNA 切断部位を一塩基解像度、かつ高感度に検出可能になった。さらには、Oxford Nanopore Technologies (ONT) ロングリードシークエンサーと組み合わせることで、一分子新生 RNA 解析も可能となった (POINT-nano 法)。

転写と共役したスプライシング機構の解明

POINT-nano 法は、Pol II 転写活性部位を一塩基解像度でプロファイリングすると同時に、スプライシング前後の新生 RNA を区別する。さらには、ゲノム転写終結領域の新生 RNA の一分子解析も可能となるため、RNA 切断のタイミングやスプライシングとの関係性を知ることができる。本研究で行った POINT-nano 法の解析により、哺乳類の Pol II 転写と共役したスプライシングは Pol II が下流のエクソンに侵入した直後に完了可能であること、さらには 3' RNA プロセッシングが未完了な RNA は上流のスプライシングも未完了であることが明らかになった (Sousa-Luis et al., *Molecular Cell* 2021)。また、選択的 RNA スプライシング因子と知られていた PTBP1 の転写に対する役割を調べた。mNET-seq 法の解析により、特定の遺伝子群の選択的スプライシングが、転写中に PTBP1 によって制御されているが明らかになった。特に、細胞分化と共に変化する DNA メチル化酵素の選択的 RNA スプライシング、それに伴う DNA メチル化状態の維持に PTBP1 が重要であることを示した (Iannone et al., *Molecular Cell* 2021)。

がんにおける転写終結破綻機構の解明とその生理学的影響

がんではTranscriptional addictionと呼ばれる現象が見られ、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。公共RNA-seq データ (TCGAやGTEx) 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有意に高発現していることを明らかにした。さらに、初年度に開発した新生RNA解析法POINTを用いて、NELF 発現抑制時に転写終結破綻が起きていること、その破綻がDNA 複製開始反応の抑制、それに伴う細胞周期の停止が引き起こされることを明らかにした (Nakayama et al., BioRxiv)。

がんクロマチン環境と転写終結についても調べた。クロマチン環境と転写産物の相関性はよく調べられているが、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。本研究では、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の (KO) 細胞やメチル基転移活性を失った腎臓がん患者由来細胞を用いて、新生RNA解析を行った。その結果、転写終結の破綻が起きていることが明らかになり、その破綻ががんでのDNA損傷オリジンになっていることが示唆された。現在、クロマチン環境をシーケンスや生化学的手法で解析しており、詳細な転写終結機構を分子レベルで明らかにしようとしている (論文投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tellier Michael, Zaborowska Justyna, Neve Jonathan, Nojima Takayuki, Hester Svenja, Fournier Marjorie, Furger Andre, Murphy Shona	4. 巻 23
2. 論文標題 CDK9 and PPA2 regulate the link between RNA polymerase II transcription termination and RNA maturation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202154520	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 Iannone Camilla, Kainov Yaroslav, Zhuravskaya Anna, Hamid Fursham, Nojima Takayuki, Makeyev Eugene V.	4. 巻 83
2. 論文標題 PTBP1-activated co-transcriptional splicing controls epigenetic status of pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 203 ~ 218.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.12.014	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 Wilton J, Tellier M, Nojima T, Costa AM, Oliveira MJ, and Moreira A	4. 巻 655
2. 論文標題 Simultaneous studies of gene expression and alternative polyadenylation in primary human immune cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 349-399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2021.04.004	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 Nojima T and Proudfoot NJ	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanism of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-021-00447-6	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 Nakayama Chihiro, Daigaku Yasukazu, Aoi Yuki, Fang Qi, Kimura Hiroshi, Shilatifard Ali, Tellier Michael, Nojima Takayuki	4. 巻 NA
2. 論文標題 NELF coordinates Pol II transcription termination and DNA replication initiation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv [Preprint]	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.01.31.578294	査読の有無 無
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 Sousa-Luis Rui, Dujardin Gwendal, Zukher Inna, Kimura Hiroshi, Weldon Carika, Carmo-Fonseca Maria, Proudfoot Nick J., Nojima Takayuki	4. 巻 81
2. 論文標題 POINT technology illuminates the processing of polymerase-associated intact nascent transcripts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1935 ~ 1950.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.02.034	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11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 新生RNAエンド
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 新生RNA解析で理解するゲノム作動
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会 染色体安定維持研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 Transcription termination: Forgotten mechanism in RNA synthesis cycle
3. 学会等名 熊本大学リエゾンラボ/HIGO最先端研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Nojima
2. 発表標題 POINTing toward transcription termination
3. 学会等名 Hot spring harbour symposium、クロマチン潜在能 合同国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Nojima
2. 発表標題 Mechanism of Co-transcriptional RNA splicing
3. 学会等名 生命科学ネットワークシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Nojima
2. 発表標題 End of RNA synthesis
3. 学会等名 第94回 日本生化学会 ジェットラグシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 転写終結による RNA転写とDNA複製の棲み分け
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takayuki Nojima
2. 発表標題 Catch RNA polymerase II in transcription cycle
3. 学会等名 第35回 Tokyo RNA Club (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 リードスルーRNA転写による 細胞周期の停止
3. 学会等名 日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 新生RNA解析から理解するゲノム転写サイクル制御
3. 学会等名 第6回サテライトシンポジウム「RNA が制御する多様な生命機能 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野島孝之
2. 発表標題 NELF restricts deleterious readthrough RNAs in replicating cells
3. 学会等名 日本RNA学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野島研究室website https://pol2-nascentrna.net/

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		
	英国	University of Oxford	King's College of London
ポーランド	Adam Mickiewicz University		
米国	Northwestern University		
ポルトガル	University of Porto	University of Lisbon	