

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06153

研究課題名(和文) エンハンサー同定の新技术を開発し、腫瘍に認める遺伝子発現異常の原因を解明する

研究課題名(英文) Development of a novel NET-CAGE technology to elucidate fundamental transcriptional mechanism underlying tumorigenesis

研究代表者

村川 泰裕 (Murakawa, Yasuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50765469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムに散りばめられたエンハンサーは、遺伝子の発現を制御する最も重要なゲノム領域である。近年、エンハンサー領域のゲノム変異が、多様な疾患と関連することが明らかになりつつある。そして、エンハンサーを同定する手法の確立は急務であった。今回我々は、活性エンハンサー領域を超高感度かつ高塩基解像度に同定できる画期的な新技术NET-CAGE法を開発した。NET-CAGE法をがん細胞に適用することで、腫瘍に一般的に認める遺伝子発現異常の原因解明を目指し、腫瘍の発生・維持のメカニズムに迫った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エンハンサー領域は、様々な病気に関連しており、ヒトゲノムの最も重要な領域の一つである。このエンハンサー領域を、正確かつ高い塩基解像度で同定できる新技术NET-CAGE法の開発に成功した。そして、ヒトゲノムに存在する約9万箇所のエンハンサー領域を決定した。近年、がんの全ゲノム配列を解読することが医療の分野で導入されつつある。しかし、蛋白質をコードしない非コード領域に同定された変異の意味の解釈は困難であった。今回の我々が開発した技術や同定された新規エンハンサーは、こうしたゲノム医療に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Enhancers are key cis-regulatory elements that control gene expression. In recent years, it has become more and more apparent that genomic mutations within enhancer regions are associated with various kinds of diseases. Here we have developed a powerful and novel technology, NET-CAGE, that can identify active enhancer regions with ultra-high sensitivity and high base resolution. By applying NET-CAGE technology to cancers, we aimed to elucidate the cause of gene expression abnormalities generally found in cancers as well as the mechanism of tumor development and maintenance.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノム科学 転写ネットワーク バイオインフォマティクス エンハンサー CAGE解析 NET-CAGE法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンハンサーは遺伝子上流、下流や遺伝子内に存在する数百塩基長のゲノム領域である。エンハンサーには転写因子が結合し、標的遺伝子の発現を増大させる。とりわけ、エンハンサーは、極めて時空間特異的に活性化され、転写制御の最も重要な調節因子の一つであると考えられている。近年、悪性疾患において後天的に生じたゲノム変異が腫瘍特異的エンハンサーを形成し腫瘍を促進することや、自己免疫疾患に関連する先天的な塩基多型の大多数がエンハンサー領域に存在することが報告された。エンハンサー領域における DNA の後天性変異や先天的多型が、多様な疾患と関連することが明らかになりつつあり、エンハンサー領域を高塩基解像度および高感度にゲノムワイド同定する手法の確立は急務であった。

次世代シーケンサーの登場によりゲノムワイドなエンハンサー予測が可能になった。一般的な Chromatin signature profiling 法は、エンハンサー周辺に認める H3K27ac などのヒストン修飾に対する Chromatin Immunoprecipitation combined with sequencing (ChIP-seq) を行うことでエンハンサー領域を予測する手法である。しかし、エンハンサー領域自体はヒストンが除去されており、ヒストン修飾はエンハンサー周辺に広汎に広がっている。そのためエンハンサーを高い塩基解像度で絞り込めず、予測特異度は低い。さらに本手法ではエンハンサー活性は計測できない。さらには、活性化したエンハンサーのみに絞り込むには、様々な網羅的手法を組み合わせる必要があり、エフォートとコストを要する。

エンハンサーは単なるシスエレメントと捉えられてきたが、近年驚くべきことに、エンハンサーにも基本転写因子や RNA ポリメラーゼがリクルートされ、エンハンサーそのものからも両方向性に RNA が合成されていることが示された(エンハンサー-RNA)。申請者が所属する機関で開発された Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) は、転写された RNA のキャップ構造を利用して 5' 末端をゲノムワイドに一塩基レベルで同定・定量する技術である。メッセンジャー-RNA (mRNA) のみならずエンハンサー-RNA もキャップ構造を持つことが明らかになり、細胞内のトータル RNA を用いて CAGE を行い、エンハンサー-RNA の転写開始点 (CAGE シグナル) も同定され、これをもとに約 44,000 箇所の転写されるエンハンサー(活性エンハンサー) が同定された (Andersson et al. Nature 2014)。CAGE による活性エンハンサー同定は、ChIP-seq 法と比べて、高塩基解像度を持つことや、mRNA の発現量も同時計測できエンハンサーの標的プロモーターが推定できるなどの利点をもつ。しかし、エンハンサー-RNA は合成されても活発に分解されるため、以下の深刻な問題点を持つ。

第一に、エンハンサー同定の感度が低い。エンハンサー-RNA は活発な分解のため極微量にしか存在せず、ほとんどの CAGE データは細胞質に安定に存在する多量の mRNA に使われる。現時点では単独のサンプルのみから検出されるエンハンサー-RNA は細胞内全体の極一部に過ぎず、高感度にエンハンサーを同定できない。Andersson らは約 1 千種類もの細胞・組織からの膨大な CAGE データを総合して解析することで、数万箇所のエンハンサーを同定した。第二に、エンハンサー活性の絶対定量はできない。エンハンサー活性の計測にはエンハンサー-RNA の合成の絶対量を知ることは重要であるが、現行法のようにトータル RNA からエンハンサー-RNA 量を計測しても、合成と分解の結果によっておこる平衡状態を見ているに過ぎなかった。このようにエンハンサーを同定する網羅的解析手法は、ブレイクスルーを必要としており、細胞の正常や異常状態の転写ネットワークの解明には十分ではなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、こうした上記の欠点を克服し、今日の前にある 1 サンプルのみからでも高感度かつ一塩基レベルの高塩基解像度に活性エンハンサーを同定・活性定量できる新技術を開発することを目指した。本新技術を NET-CAGE 法と命名した。そして NET-CAGE 法を血液腫瘍に応用し、腫瘍における特異的なエンハンサー活性を計測し、遺伝子ネットワークを可視化することで、腫瘍に一般的に認める遺伝子発現異常の原因解明を目指し、腫瘍の発生・維持のメカニズムに迫った。

3. 研究の方法

上述の二点の問題点を克服するには、細胞内のトータル RNA を用いて CAGE を施行するのではなく、RNA 分解を受ける前の RNA ポリメラーゼによって新規合成中の RNA (以下 Nascent RNA と呼ぶ) を精製した後に CAGE を施行することである。Nascent RNA はエンハンサー-RNA をより高い割合で含むため、エンハンサー-RNA の検出感度は飛躍的に向上する。また、Nascent RNA 中のエンハンサー-RNA の量は、エンハンサーからの“真の合成量”を意味し、エンハンサーの活性度を反映する。こうして、活性エンハンサー(とプロモーター)をゲノムワイドに単独サンプルからだけでも高感度に同定し、同時に活性度も定量することが可能になる。

NET-CAGE 法の確立において、もっとも重要視したことは、プロトコールの簡便さであった。簡便なプロトコールからは、再現性の高いデータが産み出され、多検体のサンプル間の比較を可能にする。そのため、Nascent RNA を回収する際に、RNA ポリメラーゼに対する免疫沈降や人工核酸アナログのパルス付加などを行わず、細胞内 RNA の分画化を工夫することのみで Nascent RNA の効率的に収集する細胞分画化法を開発した。

4. 研究成果

Nascent RNA を細胞の分画化のみにより効率的に回収するプロトコルの確立に成功した。DNA-RNA ポリメラーゼ II-Nascent RNA は非常に安定な三者複合体を形成しており、高濃度の塩およびウレアを含む変性バッファーによっても複合体は維持される。よって、三者複合体は、細胞から調整した核分画に 300mM NaCl, 1M Urea, 1% NP-40 を含む変性バッファーで処理して得られたクロマチン分画に残る。そして DNA-RNA ポリメラーゼ II-RNA 三者複合体からトリゾールにて Nascent RNA を回収する。この工程は、1 年間以上におよぶ最適化実験を行い、one step の工程のみで簡便・短時間かつ効率的に Nascent RNA を高い純度で回収することに成功した (2017 年 1 月特許 PCT 出願)。

回収された Nascent RNA を用いて CAGE 法を行う NET-CAGE 法を立ち上げ、1 サンプルのみからでも、エンハンサーおよびスーパーエンハンサーを飛躍的な高感度で同定することに成功した。

この NET-CAGE 法を、ENCODE の主要細胞株 5 種 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562、リンパ芽球細胞 GM12878、HepG2、HeLa S3、MCF7) に対して行い、ENCODE の膨大なエピジェネティクスデータ (正解セット) をもとに NET-CAGE のバイオインフォマティクス解析のパラメーターの最適化し、NET-CAGE 法からエンハンサーを新規に同定するバイオインフォマティクスパイプラインを構築した。

白血病細胞、および ENCODE の主要細胞に対して、NET-CAGE 法を適用することで、これまで FANTOM5 コンソーシウムが同定してきたエンハンサーと合わせて、合計約 9 万箇所の活性エンハンサー領域を同定することに成功した。本データセットは今後の WGAS 解析や癌ゲノム解析に役立つ。

エンハンサーの活性特性を解析することで、エンハンサーが極めて細胞特異的に活性化することを証明した。このことは、プロモーターは多種の細胞で共通に使われていることと異なり、エンハンサー独自の特性を明らかにした。

さらに、NET-CAGE 法と通常の CAGE 法を組み合わせることで、異なる転写開始点から転写される RNA の半減期を推定することに世界で初めて成功した。

上記のように、新技術 NET-CAGE を確立することに成功し、その結果エンハンサーの活性特性における多くの知見を見出した (Nature Genetics, Accepted in principal)。得られた成果をもとに、白血病細胞の発生・維持に関して詳細な解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Hirabayashi S., Bhagat S., Matsuki Y., Takegami Y., Uehata T., Kanemaru A., Itoh M., Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Takeuchi O., Carninci P., Katayama S., Hayashizaki Y., Kere J., Kawaji H., Murakawa Y. Dynamics and Topology of Human Transcribed Cis-regulatory Elements. Nature Genetics Accepted in principal 査読有り

(2) Hia F., Fan Yang S., Shichino Y., Yoshinaga M., Murakawa Y., Vandenberg A., Fukao A., Fujiwara T., Landthaler M., Natsume T., Adachi S., Iwasaki S., Takeuchi O. Codon Optimality Confers GC-Rich-Induced Stability to mRNAs in Humans bioRxiv (2019) 査読無し

(3) Yamazaki H., Shirakawa K., Matsumoto T., Hirabayashi S., Murakawa Y., Kobayashi M., Sarca AD., Kazuma Y., Matsui H., Maruyama W., Fukuda H., Shirakawa R., Shindo K., Ri M., Iida S., Takaori-Kondo A. Endogenous APOBEC3B Overexpression Constitutively Generates DNA Substitutions and Deletions in Myeloma Cells. Scientific Reports 9, 7122 (2019) 査読有り

(4) Bardales J., Wieser E., Kawaji H., Murakawa M., Darzacq X. Selective activation of alternative MYC core promoters by Wnt-responsive enhancers. Genes, 23, E270 (2018) 査読有り

(5) Yoshihara M., Araki A., Kasama Y., Sunayama M., Abe M., Nishida K., Kawaji H., Hayashizaki Y., Murakawa Y. Hotspots of de novo point mutations in induced pluripotent stem cells. Cell Reports, 21:308-315. (2017) 査読有り

(6) Cap Analysis of Gene Expression, 平林茂樹、村川泰裕、腎臓内科・泌尿器科第 5 巻第 1 号 70-76 査読無し

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 新規の NET-CAGE-seq 法により明らかになる遺伝子発現ネットワークの正体、村川泰裕、第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018 年 4 月 26 日

(2) ゲノムデータの再生医療への応用 iPS 細胞におけるゲノム変異の解明、村川泰裕、第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月 21 日

(3) Multi-disciplinary cutting edge technologies to dissect human diseases、村川泰裕、第 7 回京都大学血液・腫瘍内科リトリート、2018 年 2 月 10 日

(4) 新規 NET-CAGE 法による遺伝子発現解析、村川泰裕、第 5 回 理研・順天堂共同研究発表会、2017 年 12 月 27 日

- (5) RNA の生と死から観る遺伝子の発現制御、村川泰裕、千葉大学リーディング大学院セミナー、2016年10月20日
- (6) Genome-wide analysis of the post-transcriptional gene regulation, Yasuhiro Murakawa, Symposium, Life of Genome, Kazan Russia, 2016年8月23日
- (7) RNA の生と死からヒトゲノム情報を考える、村川泰裕、第11回 Meet the Hematologists、2016年7月2日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：RNA の末端領域に対応する核酸の塩基配列を解読する方法およびDNAエレメントの分析方法
発明者：村川泰裕、竹上雄二郎
権利者：株式会社ダナフォーム
種類：バイオテクノロジー
番号：W0/2017/130750
取得年：2017
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。