

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06493

研究課題名(和文) 癌細胞でゲノム障害を引き起こすR-loopの包括的制御モデル確立の試み

研究課題名(英文) Establishment of a comprehensive model for understanding genotoxic R-loop in cancer cells

研究代表者

渡邊 孝明 (WATANABE, Takaaki)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：20421365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写過程で生じるR-loopは遺伝子の正常な発現制御に関わる一方、DNA複製の障害やDNA切断の原因となってゲノム異常のリスクとなる。

本研究では、miRNA生成因子であるDGCR8が紫外線照射に応じてSer153がリン酸化され、R-loop制御に関わる転写共役ヌクレオチド除去修復(TC-NER)やRNAヘリカーゼと相互作用し重要な役割を担う可能性を示した。またDNAファイバー解析により紫外線に対する複製制御にも必要であることが示唆された。以上により、DGCR8が紫外線によるR-loop蓄積が引き起こす複製ストレスやDNA切断に関わる可能性を示し、癌R-loopを理解する手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚癌は世界的に深刻な死因の一つであり、日本では近年高齢者の罹患率が大きく上昇し、高齢化社会に伴う患者数増加が予想される。また欧米では、今後20年で皮膚癌の一種のメラノーマの罹患数が倍増し、第二位になると予想されている。紫外線はその最大の要因であるが、癌の引き金となり得るR-loopというゲノム構造との関係には不明な点が残されていた。本研究では異なる経路で働くことが知られるDGCR8が紫外線によるR-loopの過剰な蓄積を防ぐ役割を果たしている可能性を初めて示した。またR-loopは紫外線以外の様々な原因で蓄積するため、DGCR8による制御機構の解明が更なる波及効果を生むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：R-loop structures formed in transcriptional processes cause DNA replication stress and DNA breaks, leading to genome instability, while the structures are involved in the canonical regulation of gene expression. This study provided the possibility that UV-induced phosphorylation at Ser153 of DGCR8, a miRNA processing factor, plays a critical role in R-loop regulation accompanied by the interaction with proteins for transcription-coupled nucleotide excision repair and RNA helicases. In addition, the phosphorylated DGCR8 was suggested to regulate DNA replication in response to UV-irradiation. Thus, DGCR8 has the potential to modulate replication stress and DNA breaks caused by UV-induced accumulation of R-loop, leading to better understanding of cancer-associated R-loop.

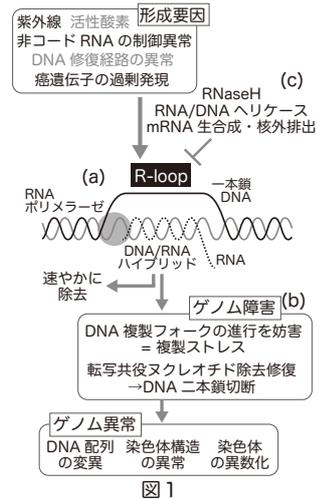
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：R-loop 紫外線 DNA修復 DNA複製ストレス 皮膚癌

1. 研究開始当初の背景

転写過程で生じる RNA が速やかに処理されずに DNA とハイブリッドを形成すると、一本鎖 DNA を解離させた構造、R-loop が生じる(図1a)。この構造は転写開始・終結領域に存在して遺伝子の正常な発現制御に関わる一方で、ゲノムを不安定化させる負の側面を合わせ持つ。R-loop は DNA 複製の妨げとなり複製ストレスと呼ばれる状況を作ることによってゲノムを不安定化させ、DNA 修復経路の一つである転写共役ヌクレオチド除去修復(TC-NER)によって DNA 二本鎖切断にプロセッシングされ染色体異常の大きなリスクとなる(図1b)¹。

これら二つのゲノム異常に関わる経路として、申請者はマイクロ RNA 生合成を担う DGCR8 に注目している。これまで R-loop との関係は報告されていないが、所属研究室は DGCR8 が上述の TC-NER 経路を介して紫外線による DNA 損傷応答に関わることを見出した²。また申請者は癌細胞で長鎖非コード RNA(lncRNA)転写が R-loop を伴って DNA 複製を妨げることを見出し³、転写と共役して lncRNA を分解する DGCR8⁴が R-loop 形成を抑える可能性を示した。



2. 研究の目的

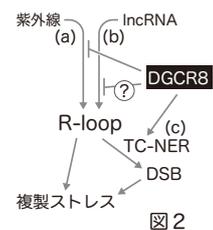
多くの R-loop 制御機構が見出され(図1c)⁵癌の発症や病態に関わる可能性が指摘されてきたが、制御機構の多様さと複雑さ故、癌細胞での R-loop 制御の全体像に迫る研究は不足している。従って R-loop の除去や蓄積に注目するだけでなく、R-loop 形成要因とゲノム障害に至る過程の双方に関わり総合的な理解を助ける制御モデルが必要である。またその理解には、癌の発症・病態に関わる R-loop と正常な細胞機能に関わる R-loop の性質、形成要因、制御経路の違いを明らかにすることが重要である。本研究は、以下の二点を目的とした。

- マイクロ RNA 生合成因子として知られてきた DGCR8 が紫外線や lncRNA による R-loop 形成及びそれに続く DNA 切断や複製ストレスで果たす役割を検証し、癌に関連の深い R-loop 形成要因からゲノム障害に至るプロセスの総合的な理解を加速させる制御モデルを確立する。
- 癌遺伝子の過剰発現による重度の R-loop 蓄積を解消し癌病態を支えている制御因子を探索し同定する。癌細胞でその制御因子を抑制してゲノム障害を頻発させ細胞死を誘導する新たな治療戦略の可能性を模索する。

3. 研究の方法

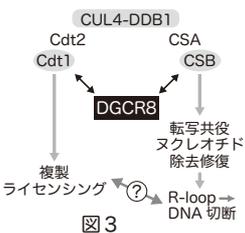
マイクロ RNA 生合成を担う DGCR8 は紫外線による DNA 損傷の応答に重要な役割を果たし、その機能には Ser153 のリン酸化が必要である²。本研究では、主にヒト骨肉腫細胞 U2OS を用いてゲノム編集により独自に作成した DGCR8-KO 細胞と紫外線損傷応答に必要な Ser153 リン酸化が起きない S153A ノックイン細胞を用いて以下の解析を行った。

(a)紫外線照射による R-loop 蓄積に対する DGCR8 の役割: これまで DGCR8 が紫外線による DNA 損傷応答を担う転写共役ヌクレオチド除去修復(TC-NER)に関与することを示したが、詳細は不明である。この TC-NER は R-loop を除去して DNA 切断を生じる経路でもあり¹、予備実験では紫外線照射により R-loop が細胞核に蓄積すること(図2a)、DGCR8 を欠く細胞ではその蓄積が亢進すること、TC-NER を構成する RNA ポリメラーゼ II と DGCR8 の結合が紫外線照射により増強されることを確認した。そこで DGCR8 及び Ser153 のリン酸化状態が TC-NER を介した R-loop 制御に関わる分子機構を明らかにするため上記の細胞に紫外線を照射し、R-loop 認識抗体を用いた R-loop の定量、R-loop から生じる DNA 切断の γ H2AX 抗体による定量、PLA 法による TC-NER タンパク質群と DGCR8 の相互作用解析を行った。



(b)DGCR8 による R-loop 制御への DEAD-box ヘリカーゼの関与: R-loop 制御因子として DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) モチーフをもつ RNA ヘリカーゼが注目を集めており⁶、このうち DHX9、DDX5、DDX17 は DGCR8 との相互作用が報告されている。これらのヘリカーゼが DGCR8 と協調して R-loop を除去するかを調べるため、各 DEAD-box ヘリカーゼと DGCR8 の相互作用を解析した。

(c)複製ストレスに対する DGCR8 の関与: 申請者は癌細胞で長鎖非コード RNA(lncRNA)転写が R-loop を伴って DNA 複製を妨げることを見出し(図2b)、転写と共役した lncRNA 分解に関わる DGCR8 が R-loop 制御を介して複製ストレスを抑える可能性を示唆した。そこで RNA-seq による lncRNA 検出、DNA ファイバーによる複製ストレスの解析を行った。一方、細胞周期に一度だけ染色体が複製されるよう制御するライセンス因子 Cdt1 と TC-NER の中心的役割を担う CSB は共に CUL4-DDB1 複合体によって制御される共通点をもつため(図3)、Cdt1 と DGCR8 の相互作用を検証した。



(d) 癌の病態に関わる R-loop 制御因子の探索: 癌組織では DGCR8 や DEAD-box ヘリカーゼの高発現が見られ^{7,8}、これは遺伝子発現制御が破綻して蓄積した R-loop を除去する癌特異的な R-loop 制御と捉えることができる(図4a)。また複製ストレスに至る R-loop 蓄積の引き金として癌遺伝子の過剰発現が考えられ(図4b)、申請者が R-loop を伴う複製ストレスを見出した癌細胞も癌遺伝子 MYC を過剰発現していた³。MYC 発現による著しい R-loop 蓄積や DNA 切断の増加を解消できず細胞死に至る標的を見出すことができれば(図4c)、癌病態を支える R-loop 制御因子と考えられる。以上より癌特異的な R-loop 制御の可能性を評価するため、上記の細胞に MYC 過剰発現を試みた。



4. 研究成果

(a) 紫外線照射による R-loop 蓄積に対する DGCR8 の役割: U2OS 及び DGCR8 変異細胞を用いて、(i) R-loop 認識抗体を用いた R-loop 定量、(ii) PLA 法による DGCR8、R-loop、TC-NER タンパク質群の間の相互作用解析を行った。その結果、(i) U2OS、ヒトケラチノサイト HaCaT で紫外線照射 2 時間から 4 時間後にかけて R-loop が蓄積し、KO 細胞や S153A 細胞では R-loop 蓄積がより増大した(図5)。また (ii) R-loop を除去して DNA 切断を生じる TC-NER 経路のタンパク質(RNAPII、CSA、CSB、UVSSA、USP7)と DGCR8 の相互作用が紫外線照射に応じて観察された(図6)。さらに S153A ノックイン細胞を用いた結果、TC-NER 複合体のコアとなる RNAPII、CSA、CSB の形成に DGCR8-S153リン酸化が必要である一方、UVSSA、USP7 のリクルートには大きな影響がないことがわかった。また、DGCR8 が関わる TC-NER 経路は R-loop を DNA 二本鎖切断(DSB)に変換し、DNA 修復を誘導する。そこで DSB を認識する γ H2AX に対する抗体で免疫染色を行った結果、紫外線により亢進する γ H2AX 染色が DGCR8 変異細胞では減少した。これより DGCR8 が TC-NER 経路と共に R-loop プロセッシングに関与することが示唆された。

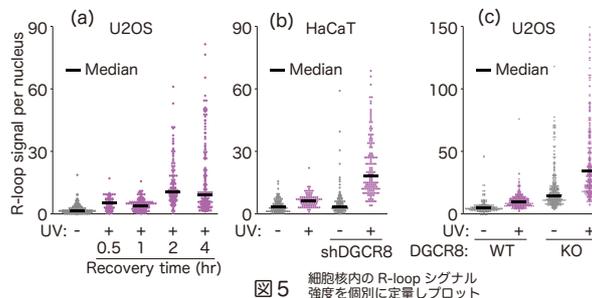


図5 細胞核内の R-loop シグナル強度を個別に定量しプロット

(b) DGCR8 による R-loop 制御への DEAD-box ヘリカーゼの関与: DEAD-box ヘリカーゼ DHX9 と DDX17 が DGCR8 と相互作用し、紫外線照射によりその増強が見られた。また S153A 細胞では紫外線による相互作用が抑えられる傾向が見られた。一方、家族性筋萎縮性側索硬化症4型(ALS4)や眼球運動失行を伴う失調症(AOA2)等に関わり、R-loop を解消する DNA/RNA ヘリカーゼである SETX と DGCR8 の相互作用を調べたが、紫外線照射による明確な変化は見られなかった(図7)。また TCGA データベースで解析した結果、DGCR8 増幅がみられる癌組織の約 47%で DDX17 が増幅し、有意な相関関係を有することが判明した。以上より、DGCR8 は DEAD-box ヘリカーゼの DHX9 や DDX17 と共に R-loop 制御に関わることが強く示唆された。

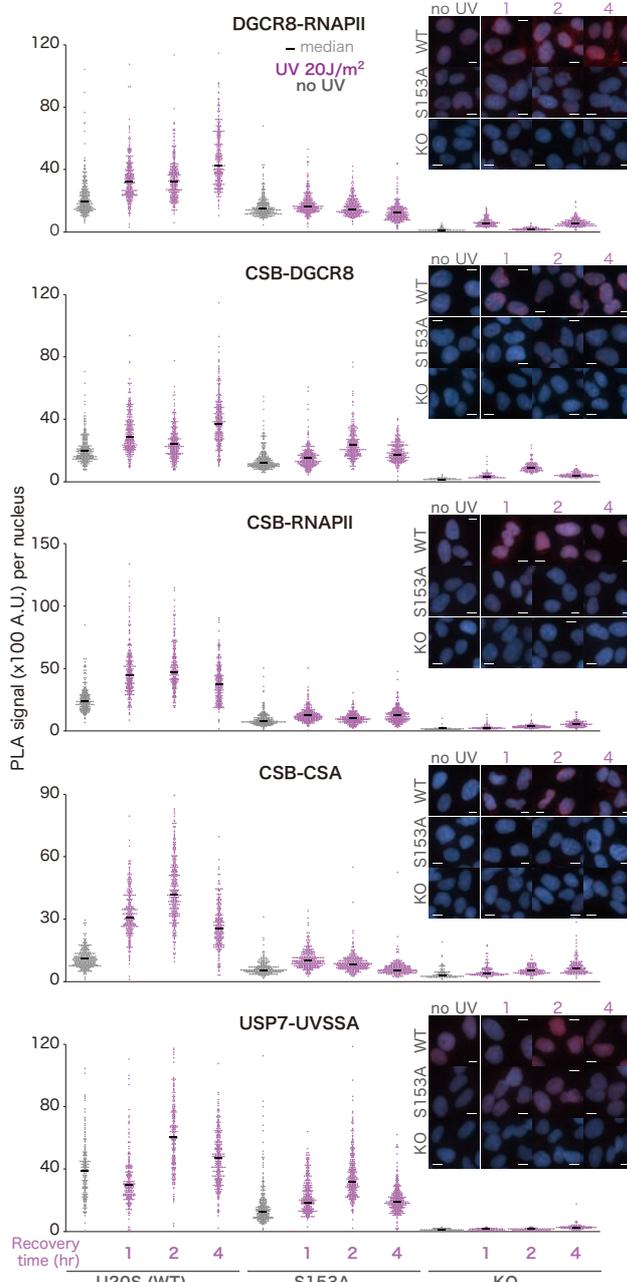


図6 タンパク質間相互作用を示す PLA シグナル強度を細胞核毎に定量しプロット

(c) 複製ストレスに対する DGCR8 の関与: RNA-seq によりコード RNA と lncRNA 両方を検出した結果、U2OS 細胞では紫外線照射による転写産物量が 1.22 倍に増加し、S153A 細胞ではさらに 8%の増加が見られた。転写産物量は発現量と安定性を反映し、後者は R-loop 蓄積量に関係する可能性があるため、これは S153A 細胞でのゲノムワイドな R-loop

蓄積を示唆すると考えられた。

続いて DNA ファイバー解析を行った結果、正常細胞で紫外線照射による複製障害が見られるのに対し、意外にも KO 細胞で障害が見られなかった。また S153A 細胞でも同様の結果が得られ、S153 リン酸化が紫外線に対する複製制御に必要である可能性が高いと考えられた(図8)。そこで複製障害に必要な DNA 損傷チェックポイントへの影響を調べた結果、S153A

細胞では CHK1-Ser345 リン酸化が十分に持続せず、R-loop に起因する可能性がある ATM 活性化が見られた。一方、細胞周期に一度だけ染色体が複製されるよう制御するライセンス因子 Cdt1 が TC-NER タンパク質に類似した制御を受けることに着目したが、DGCR8 との相互作用は検出されなかった。

(d)癌の病態に関わる R-loop 制御因子の探索: 癌組織で DGCR8 高発現がみられることから、癌遺伝子の発現により蓄積する R-loop の除去に癌細胞が DGCR8 を利用していると推測し、癌遺伝子 MYC の過剰発現細胞を樹立した。今後、これを用いて検証を行う。また TCGA データベースでは DGCR8 増幅が見られた癌組織の約 42%に癌遺伝子 MYC の増幅が見られ、有意な相関関係を示していた。以上のように DGCR8 及び Ser153 リン酸化が紫外線により蓄積する R-loop 除去とそれに伴う複製ストレスに関わることを示す知見が得られた。

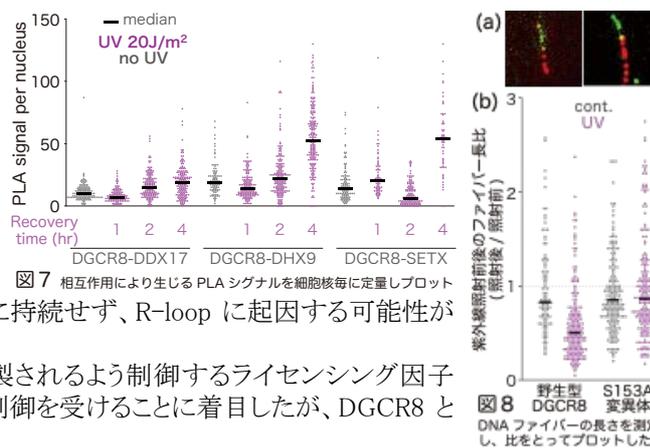


図7 相互作用により生じる PLA シグナルを細胞核毎に定量しプロット

図8 紫外線照射前後の DNA ファイバーの長さを測定し、比をとってプロットした。

References

- 1: Mol Cell, 2014, 56:777; 2: Cell Rep, 2017, 19:162; 3: Cell Rep, 2017, 21:2223; 4: Mol Cell, 65:25, 2017;
- 5: Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21:167; 6: Cell Rep, 2018, 23:1891; 7: Mol Carcinog, 2012, 51:916;
- 8: Cell Rep, 2018, 23:1891

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takaaki Watanabe, Toshiyasu Taniguchi
2. 発表標題 A new regulatory factor, DGCR8, for the complex formation repairing UV-damaged DNA.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------	---------