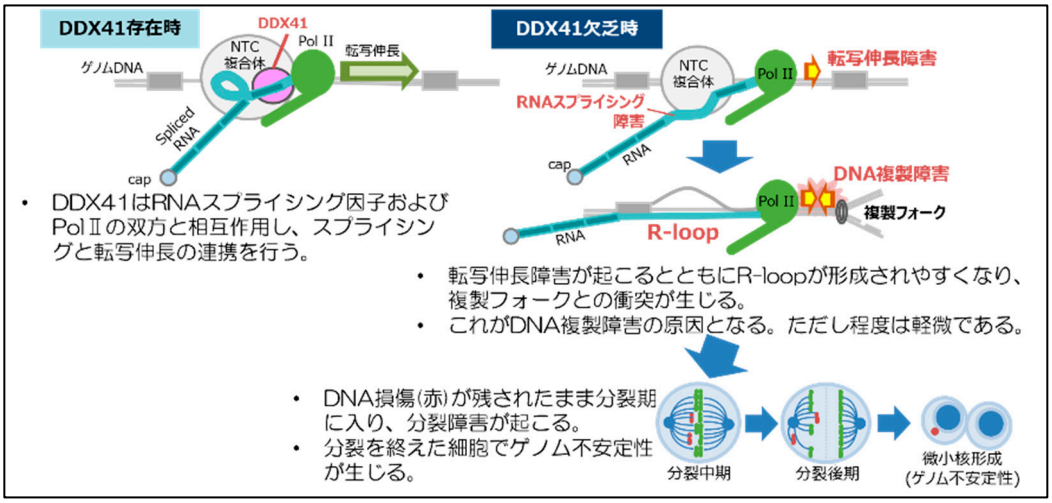
188　R-loopの蓄積が造血器腫瘍を形成する機序の解明	平山　真弓

【目的】近年、急性骨髄性白血病（AML）や骨髄異形成症候群（MDS）などの骨髄性造血器腫瘍において、RNA ヘリケースをコードする遺伝子の変異を伴う例があることが明らかにされた。特に興味深いのは DEAD-box 型 RNA ヘリケースの *DDX41* に変異を有する例で、他の AML／MDS と異なり骨髄不全を示す傾向が多いなど、典型的な AML や MDS とは異なる疾患表現型を示す傾向がある。しかしながら、RNA ヘリケースの遺伝子変異が、造血幹・前駆細胞におけるどのような生命現象に障害をもたらし腫瘍化させるのか、これまで明らかにされていない。RNA ヘリケースは、転写・翻訳・リボソーム RNA 合成など、RNA 代謝を伴うほぼすべての局面において重要な役割を担うが、そうであるが故に、特定の RNA ヘリケースの障害が実際に細胞内で何をもたらすか解析することを困難にしている。そこで本研究では、特に DDX41 に焦点を絞り、1）RNA ヘリケース異常が DNA 複製障害とゲノム不安定性をもたらす機序、2）RNA スプライシングにおける DDX41 の役割、3）RNA スプライシング異常が転写伸長を障害するメカニズム、を中心に詳細な解釈を加えることとした。

【方法】CLIP シーケンス法により、DDX41 が RNA に結合する配列や部位の解析を行った。また、DDX41 の発現を抑制させた場合の RNA スプライシングパターンの変化や、DDX41 が相互作用する分子の解析を通じて、DDX41 の RNA スプライシングへの関与を検討した。さらに、細胞周期を同調したうえで DDX41 の発現や機能を阻害することで、DDX41 が DNA 複製においてどのような役割を担うか検討した。

【結果】DDX41 が、主にコーディング RNA の 5'スプライスサイト（SS）に結合することを見出し、また実際、本分子が多くの RNA スプライシング関連分子と相互作用することが確認された。一方で、DDX41 の発現抑制は特定の RNA スプライシング変化を呈さず、この点は、MDS ですでによく知られている RNA スプライシング関連遺伝子の変異の場合と異なるが、これは、DDX41 が RNA スプライシングの後半である C 複合体において機能するという解析結果と整合性がとれるものであった。細胞周期の S 期のみにおいて DDX41 を阻害すると、S 期の進行は軽度に障害され、これには R-loop の増加を伴うが、この際の DNA 損傷応答シグナルの活性化は限定的であった。しかしながら、この細胞は分裂期に時間を要し、分裂後の細胞において顕著な DNA 不安定性を示した。加えて、ChIP シーケンスなどの結果から、DDX41 が転写伸長複合体とスプライシング複合体の双方と相互作用し、両者をコーディネートする役割を担うことを明らかにした。以上の結果から、DDX41 は RNA スプライシングの効率的な遂行を介して、転写伸長を制御することがわかった。*DDX41* 変異・発現低下による RNA スプライシング異常や DNA 複製障害はあくまで軽微であるが、軽微であるがゆえにチェックポイント機構がこれを見逃し、そのまま細胞分裂を迎え、分裂後に顕著な DNA 複製障害が生じるという機序が明らかになった。

DDX41 障害がゲノム不安定を伴う造血障害をもたらす機序



188. R-loop の蓄積が造血器腫瘍を形成する機序の解明

平山　真弓

*熊本大学 病院 中央検査部

Key words：骨髄異形成症候群，急性骨髄性白血病，R-loop，RNA スプライシング，DNA 複製ストレス

緒　言

近年、急性骨髄性白血病（AML）や骨髄異形成症候群（MDS）などの骨髄性造血器腫瘍において、RNA ヘリケースをコードする遺伝子の変異を伴う例があることが明らかにされた。特に興味深いのは DEAD-box 型 RNA ヘリケースの *DDX41* に変異を有する例で、他の AML／MDS と異なり骨髄不全を示す傾向が多く、加えて、同遺伝子の生殖細胞系列変異が遺伝性造血器腫瘍の原因となるにも関わらず、発症年齢が比較的高齢で生命予後も決して悪くないなど、典型的な AML や MDS とは異なる疾患表現型を示す傾向がある［1］。また、DEAH-box 型 RNA ヘリケース *DHX15* の遺伝子変異は、AML の特定の病型（M2）においてのみ検出される［2］。しかしながら、これら RNA ヘリケースの遺伝子変異が、造血幹・前駆細胞におけるどのような生命現象に障害をもたらし腫瘍化させるのか、これまで明らかにされていない。RNA ヘリケースは、転写・翻訳・リボソーム RNA 合成など、RNA 代謝を伴うほぼすべての局面において重要な役割を担うが、そうであるが故に、特定の RNA ヘリケースの障害が実際に細胞内で何をもたらすか解析することを困難にしている。

造血器腫瘍で *DDX41* 遺伝子変異が最初に報告された際、DDX41 が RNA スプライシングに関与する可能性が示された。しかしながら、MDS で高頻度に認める RNA スプライシング因子（SRSF2、U2AF1、SF3B1）の変異の場合と疾患表現型は異なり、また SRSF1 や U2AF1 は、RNA スプライシング・プロセスのうち 3’スプライスサイト（SS）を認識する U2snRNP 関連因子であるのに対して、DDX41 や DHX15 は、よりスプライシング段階が進んだ C 複合体・P 複合体の構成因子であると考えられることから、*DDX41* 変異や *DHX15* 変異は、典型的な RNA スプライシング変異とは病的意義が異なると予想される。

こうしたことを踏まえ本研究では、とくに DDX41 に焦点をあて、1）RNA ヘリケース異常が DNA 複製障害とゲノム不安定性をもたらす機序、2）RNA スプライシングにおける RNA ヘリケースの役割、3）RNA スプライシング異常が転写伸長を障害するメカニズム、を中心に詳細な解釈を加えることとした。最近、DDX41 が small nucleolar RNA（snoRNA）のプロセシングに関与し、snoRNA を介したリボソーム RNA の偽ウリジン化により、タンパク質合成能を調節することが報告された［3］。ただし、リボソーム合成やタンパク質合成の障害のみでは、我々が見出した DNA 複製障害の惹起を説明できない。結果に示すように、我々は他に先駆けて DDX41 の RNA 結合部位を明らかにするとともに、RNA スプライシングの後半において機能することを見出した。加えて、DDX41 が RNA スプライシングと転写伸長とをコーディネートする役割を担い、*DDX41* 変異などによりその機能が失われると、R-loop の蓄積を伴う DNA 複製障害を起こすが、その障害の程度はあくまで軽微であることに気づいた。しかしながら、むしろそうした軽微な DNA 複製障害が生じた場合には、DNA 複製チェックポイント機構がこれに対して十分に反応せず、複製ストレスを抱えたままで分裂期を迎え、分裂後の細胞において顕著な DNA 不安定性を認めた。これが、生殖細胞系列バリアントとして *DDX41* 変異を持つ個体が血球減少傾向を示し、かつ造血器腫瘍の発症に至るまで長期間を要することを説明できる機序であると考えている。

*現在の所属：熊本大学 国際先端医学研究機構

方法および結果

1. DDX41 が結合・相互作用する核酸およびタンパク質の同定

これまでに、さまざまな DDX41 の生物学的な役割が提唱されてきた。例えば、細胞質において外来核酸を認識し自然免疫応答を惹起する経路への関与、RNA スプライシング、リボソーム RNA の生合成などが報告されている [4, 5]。多くの RNA ヘリケースは細胞内の複数のプロセスにおいて役割を担うことから、これらのすべてに関与する可能性も十分に考えられるが、ここでは、造血器腫瘍における DDX41 の関与をより明確にすることを目指し、CLIP-seq 法により、RNA 結合配列の検討を行った。紫外線照射によりタンパク質と核酸のクロスリンクを行った K562 細胞を用い、免疫沈降法で、結合する RNA とともに DDX41 を回収した。そこから RNA を精製し、増幅したシークエンスライブラリーから次世代シーケンサーで配列を解析した。その結果、DDX41 はリボソーム RNA とコーディング RNA の双方に結合し、とくにコーディング RNA においては、5'スプライスサイト（SS）に強く結合することが判明したことから、RNA スプライシングへの関与が示唆された（図 1）。また、DDX41 で免疫沈降を行ったサンプルを質量分析装置で網羅的に解析することにより、DDX41 が多くの RNA スプライシング関連因子と相互作用することが判明した。

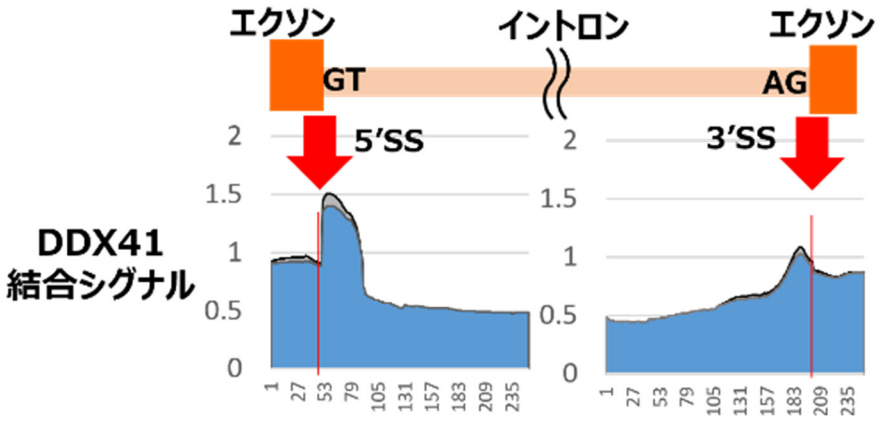


図 1. DDX41 が結合する RNA の部位
CLIP シーケンス法により、DDX41 が結合するコーディング RNA 部位を検討した結果。DDX41 は 5'SS 直下のイントロン部位にピークを有し、3'SS 部位にも弱い結合ピークを示した。

2. RNA スプライシングにおける DDX41 の役割

上記により DDX41 が RNA スプライシングに関与することが推定されたため、DDX41 の発現を抑制した細胞を用い、RNA シーケンス法により RNA スプライシング変化を解析した。その結果、DDX41 発現抑制細胞ではある程度の RNA スプライシング変化が認められたが、スプライシング部位に変化が生じる遺伝子や変化のパターンに一定の傾向を示さなかった。一方で、RNA スプライシング段階特異的にスプライソゾームに加わる分子との相互作用を解析することにより、DDX41 がスプライシング C 複合体の構成因子であることが判明した。C 複合体の段階では、スプライシング複合体はすでに 5'SS、3'SS の認識を終えていることから、DDX41 の発現抑制がスプライシング部位にあまり影響を及ぼさないことは理解できるし、実際、同様の段階で機能する他の RNA スプライシング因子の場合にも、発現抑制がスプライシング部位の選択を大きく変化させないことが示されている。しかしながら、DIG 標識 oligo（dT）をプローブとした RNA-FISH 法により細胞内の mRNA の局在を検討したところ、DDX41 発現抑制細胞では核内にスペックル状に RNA が蓄積することが判明した（図 2）。したがって、DDX41 は RNA スプライシング後半で機能し、スプライシング部位の選択には影響を及ぼさないが、mRNA の効率的な産生に関与するものと考えられた。

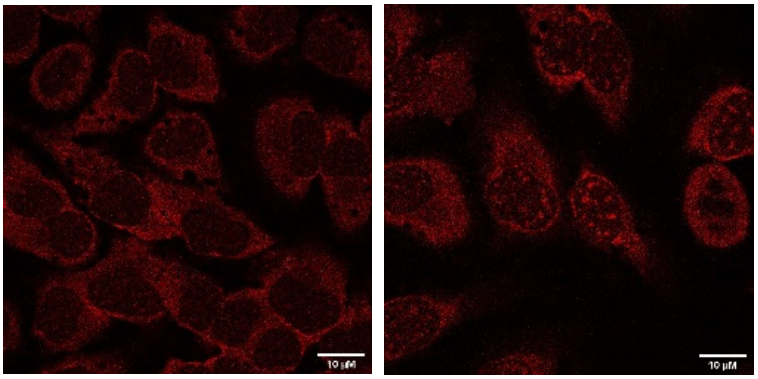


図 2. DDX41 発現抑制による mRNA 生合成障害
RNA-FISH 法により mRNA の細胞内分布を検討した結果。DDX41 発現抑制細胞（右図）では、核内にスペックル状のシグナルが観察された（スケールバー：10 μm）。

3. DDX41 の発現抑制による DNA 複製障害の誘導

続いて、DDX41 の発現や機能を抑制した際の表現型の変化を詳細に解析した。DDX41 を発現抑制すると、細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導が観察され、細胞周期は G2/M 期で停止した。また、ヒストン H2B を GFP で標識した細胞を用いてタイムラプス観察を行うと、DDX41 発現抑制細胞では、細胞分裂に長時間を要し、分裂後の細胞において顕著な核形態異常を呈することがわかった。血液系の細胞株においても同様の変化を認め、とくに微小核の形成が目立つことなどから、DDX41 の発現抑制がゲノム不安定性の惹起につながることが判明した。

一方で、S 期特異的に DDX41 を阻害し細胞周期の変化を観察した範囲において、S 期の進行の遅れは軽微であり、また細胞分裂を経ない限りは、DNA 損傷シグナルの増加もあまり顕著でなかったが、この細胞が分裂期を迎えると、前述のような分裂障害と、分裂後の DNA 損傷シグナルの増強が認められた。したがって、DDX41 の発現・機能抑制による細胞分裂期および分裂後の障害は、おそらく分裂期そのものにあるのではなく、S 期の障害が分裂期に影響を及ぼすものであることが示唆された。

4. DDX41 の発現抑制による DNA 複製障害の誘導

最近、DDX41 が DNA：RNA ハイブリッドの形成を伴う R-loop の解消に直接関与することが報告された［6］。確かに我々の検討でも、DDX41 を発現抑制すると R-loop の増加が観察された。しかしながら、タグ付きの *RNaseH1* 変異体（R-loop に結合するが消化できない変異体）を発現させた細胞を用いて、R-loop に相互作用するタンパク質を網羅的に同定した実験では、相互作用因子のなかに DDX41 は検出されなかった。DepMap データベースを用い、DDX41 と相互依存的な分子を検討したところ、DDX41 と RNA スプライシング因子、とくにスプライシング第二段階（3'SS を切断する第二のエステル転移反応段階）に関わる因子と相互依存的な関係があることが判明したことから、現時点で我々は、DDX41 の主たる役割は RNA スプライシングであり、DDX41 発現抑制に伴う R-loop の増加は、RNA スプライシングの障害に伴い R-loop が形成されやすい状況が誘導された結果であると推定している。

5. DDX41 による転写伸長と RNA スプライシングの連携

前項の DepMap データベース解析において、DDX41 が転写伸長関連因子とも相互依存的な関係にあることが示唆されたこと、また DDX41 発現抑制細胞の RNA シーケンスデータからも、DDX41 が転写伸長に対して促進的に機能することが示唆されたことから、続いて DDX41 と転写伸長との関係性を検討した。ChIP シーケンス法で観察した RNA ポリメラーゼⅡ（PolⅡ）のクロマチン上の分布から、PolⅡは 5'SS 近傍でやや速度を落とすことが示唆されたが、DDX41 を発現抑制すると、その現象が観察されなくなった（図 3）。これまでの解析結果、すなわち DDX41 が 5'SS を認識し、かつ RNA スプライシングの効率的な進行に関与するという結果と統合して考えると、DDX41 は RNA スプライシングと転写伸長との連携を担い、DDX41 が十分に機能しない場合には、R-loop が形成されやすい状況に陥ることを契機に、DNA 複製ストレスが生じると考えられた。

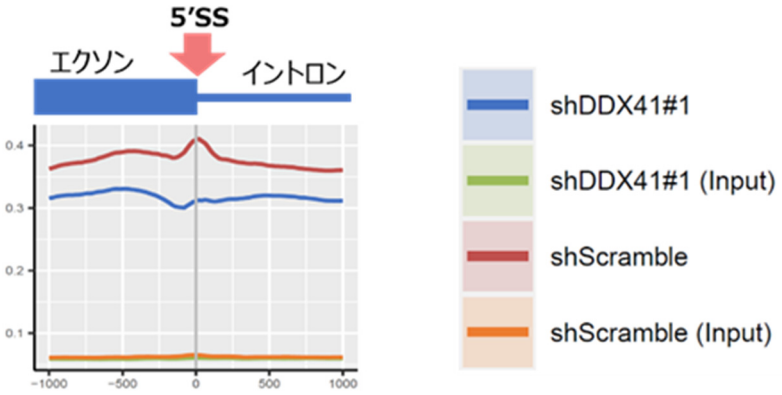


図 3. DDX41 発現抑制による 5'SS 近傍の Pol Ⅱ分布の変化

ChIP シーケンスにより、5'SS 近傍の Pol Ⅱ分布を可視化した結果。対照細胞では 5'SS において Pol Ⅱのポージングが観察されたが（緑色ライン）、DDX41 を発現抑制するとその現象が消失した（オレンジライン）。

考　察

近年、特定の遺伝子バリアントを生殖細胞系列に有する造血器腫瘍の存在が徐々に明らかになりつつあり、最新の WHO 分類において、その種の造血器腫瘍が新たにカテゴリーに加えられた。*DDX41* も責任遺伝子のひとつに含まれており、典型的には、片アレルに機能欠失型の生殖細胞系列バリアントを有する例が、後に R525H 変異を主体とする体細胞変異を獲得して造血器腫瘍を発症することが知られている。しかしながら、特定の RNA ヘリケース変異が造血器腫瘍を発症させる機序はまだ不明の部分が多い。とくに、*DDX41* 変異例では他の遺伝子に生殖細胞系列バリアントを伴う例に比べ発症年齢が遅いこと、骨髄不全傾向を伴うことが多いこと、骨髄異形成症候群だけでなく急性骨髄性白血病を発症する場合もあることなど、既存の造血器腫瘍とは異なる特徴を示すことから、遺伝子変異特異的な病態が存在するものと推定される。

本研究で我々は、DDX41 が RNA スプライシングを担いつつ、転写伸長機構と RNA スプライシングとをコーディネートすることを見出した。そのため、DDX41 が十分に機能しない場合には、DNA 複製ストレスを惹起させるが、その程度はむしろ軽微であり、軽微であるがゆえに DNA 複製期にはそのストレスが完全に解消されないままに細胞分裂期を迎えるという興味深い現象を発見した。造血幹細胞は slow cycling であり、通常は軽微な DNA 複製ストレスには耐性であると考えられるが、加齢や炎症などのストレス環境下においては、*DDX41* 変異を有する細胞では正常細胞に比べ DNA 複製ストレスが生じやすい可能性がある。そうした細胞が分裂すると DNA 不安定性が導かれるため、腫瘍発生が起こりやすい状況に陥るとすれば、本変異を有する例が比較的遅い時期に造血器腫瘍を発症しやすいことが説明できるかもしれない。

共同研究者・謝辞

本研究は、熊本大学大学院生命科学研究部臨床病態解析学講座の神力悟、松井啓隆とともに行った。また、本研究は他に、国立がん研究センター鶴岡連携拠点の横山明彦、広島大学原爆放射線医科学研究所がん分子病態研究分野の稲葉俊哉、長町安希子、東京大学大学院新領域創成科学研究科生命システム観測分野の金井昭教、東京大学大学院農学生命科学研究科細胞生化学研究室の片岡直行、広島大学大学院医系科学研究科薬学分野の河合秀彦、熊本大学大学院先端科学研究部 RNA 分子生物学研究室の谷時雄、井手上賢らとの共同研究として行われたものである。ご協力いただいた関係諸氏、ならびに研究助成をいただいた上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Li P, White T, Xie W, Cui W, Peker D, Zeng G, Wang HY, Vagher J, Brown S, Williams M, Kovacsovics T, Patel JL.. AML with germline DDX41 variants is a clinicopathologically distinct entity with an indolent clinical course and favorable outcome. Leukemia. 2022 Mar; 36(3): 664-674. PMID: 34671111 DOI: 10.1038/s41375-021-01404-0

2) Christen F, Hoyer K, Yoshida K, Hou HA, Waldhueter N, Heuser M, Hills RK, Chan W, Hablesreiter R, Blau O, Ochi Y, Klement P, Chou WC, Blau IW, Tang JL, Zemojtel T, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Thol F, Ganser A, Löwenberg B, Linch DC, Bullinger L, Valk PJM, Tien HF, Gale RE, Ogawa S, Damm F. Genomic landscape and clonal evolution of acute myeloid leukemia with t(8;21): an international study on 331 patients. Blood. 2019 Mar 7; 133(10): 1140-1151. PMID: 30610028 DOI: 10.1182/blood-2018-05-852822

3) Chlon TM, Stepanchick E, Hershberger CE, Daniels NJ, Hueneman KM, Kuenzi Davis A, Choi K, Zheng Y, Gurnari C, Haferlach T, Padgett RA, Maciejewski JP, Starczynowski DT. Germline DDX41 mutations cause ineffective hematopoiesis and myelodysplasia. Cell Stem Cell. 2021 Nov 4; 28(11): 1966-1981. PMID: 34473945 DOI: 10.1016/j.stem.2021.08.004

4) Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. Exp Hematol 2016 Aug; 44(8): 745-754 e4. PMID: 27174803DOI: 10.1016/j.exphem.2016.04.017

5) Andreou AZ. DDX41: a multifunctional DEAD-box protein involved in pre-mRNA splicing and innate immunity. Biol Chem 2021 Mar 15; 402(5): 645-651. PMID: 33711218　DOI: 10.1515/hsz-2020-0367

6) Mosler T, Conte F, Longo GMC, Mikicic I, Kreim N, Möckel MM, Petrosino G, Flach J, Barau J, Luke B, Roukos V, Beli P. R-loop proximity proteomics identifies a role of DDX41 in transcription-associated genomic instability. Nat Commun 2021 Dec 16; 12(1): 7314. PMID: 34916496 DOI: 10.1038/s41467-021-27530-y