

RNA ヘリケース DDX41 の遺伝子変異が誘因となる R-loop の蓄積が

造血器腫瘍を発症させるメカニズムの解明

平山真弓

熊本大学病院 中央検査部・大学院生命科学部 臨床病態解析学講座

【研究の背景】

骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)などの骨髄系造血器腫瘍では、約2%の割合で、DEAD-box型 RNA ヘリケースをコードする *DDX41* 遺伝子に変異を認める¹⁾。典型的には、*DDX41* 遺伝子の片アレルに機能欠失型の生殖細胞系列変異を持つ例が、後に R525H に代表される体細胞変異を反対アレルに獲得するとともに造血器腫瘍を発症することが知られているが、造血器腫瘍の発症年齢は60代以降であることが多く、遺伝的背景の明らかでない MDS や AML と変わらない²⁾。多くは正常核型であり、併存する遺伝子変異も限定的であるといった特徴を示す。

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は、本研究の対象である *DDX41* 遺伝子の他に、AML M2 において6%程度の割合で *DHX15* 遺伝子の変異を認めるのみであり³⁾、これらの病的意義はまだ明らかでない。また、一般に RNA ヘリケースは、リボソーム生合成、転写、RNA スプライシング、RNA 核外輸送など多岐に渡る役割を担うが、*DDX41* の生物学的な役割もまだ明確でない。我々の研究室では以前に、*DDX41* がプレリボソーム RNA の生合成に関与し、リボソーム RNA の合成障害が二次的に遊離リボソームタンパク質の増加をもたらすことで、様々な細胞増殖障害を惹起することを報告した⁴⁾。

【目 的】

上記のように、多くの RNA ヘリケースは、ひとつの因子が細胞内において、RNA 代謝を伴う多彩な機能を有することが示されている。本研究は、*DDX41* の生物学的な機能、ならびに *DDX41* の異常が造血器腫瘍を誘発する機序を明らかにすることを目的に、特に RNA スプライシングの観点から研究を行った。

【方 法】

(1) Crosslinking and immunoprecipitation シーケンス (CLIP-seq) 法による RNA 結合部位の同定

本手法は、UV 照射により、RNA と結合するタンパク質と相互作用する標的 RNA とをクロスリンクさせ、目的タンパク質に対する抗体で免疫沈降した後に、結合する RNA を次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法である⁵⁾。FLAG タグを付加した *DDX41* (野生型、R525H 変異型) を発現する K562 白血病細胞株を作成し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、ライブラリーを作成した。

(2) RNA シーケンスデータを用いた RNA スプライシング解析

K562 細胞において、shRNA によって *DDX41* 発現抑制細胞を作製し、total RNA を抽出したのち、poly(A) RNA からシーケンスライブラリーを作成して次世代シーケンサーでデータ取得した。得られたシーケンスリードを rMATS に供し、RNA スプライシング解析を行った。あわせて、取得したデータを用い、遺伝子発現解析を実施した。

(3) フローサイトメトリー法による細胞周期の解析、および免疫蛍光染色法による DNA 損傷応答シグナルの検出

DDX41 の発現を抑制した K562 細胞、HeLa 細胞、U2OS 細胞を用い、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー法に

より DNA 損傷応答シグナル関連分子の変動を検出した。また、ヒストン H2-GFP を安定に発現する U2OS 細胞を用い、タイムラプス観察により細胞増殖や細胞分裂を評価した。

【結 果】

まず、CLIP-seq 法により DDX41 が結合する RNA を網羅的に解析した。その結果、DDX41 はリボソーム RNA に加え、コーディング RNA の 5' スプライスサイト近傍に結合することがわかり、DDX41 が RNA スプライシングに関与することを裏付ける結果が得られた。一方で、MDS で典型的な RNA スプライシング因子の変異である SRSF2 P95R 変異の場合と異なり、DDX41 の発現抑制は、顕著なスプライシング部位の変化を伴わなかった。それにも関わらず、DDX41 の発現抑制は成熟 RNA の合成障害をもたらしたことから、DDX41 は RNA スプライシング部位の決定ではなく、スプライシングの効率的な遂行に関与すると結論付けた。これは、DDX41 が RNA スプライシングの後半、すなわちスプライシング部位が決定された後に初めて DDX41 がスプライソゾームにリクルートされるという、免疫沈降実験の結果とも合致する。

細胞株において DDX41 の発現を抑制すると、分裂期において染色体のラギングや多極分裂像を認め、顕著なゲノム不安定性を呈した。またこの際、R-loop がゲノム上に蓄積することが判明した。R-loop は、転写された新生 RNA がそのまま鋳型 DNA にハイブリダイズすることによって形成される構造体で、転写伸長と DNA 複製との衝突がその誘因であるとされる。実際、DDX41 発現抑制細胞では、S 期の軽度の遅延が認められ、DNA 損傷応答シグナルの部分的な活性化が起こることも明らかとなった。

【考 察】

これらの結果から現在、*DDX41* 遺伝子変異が、次のような機序により造血障害を起こすと想定している。(1) *DDX41* 異常により RNA スプライシングの遅延が起こる。(2) RNA スプライシングは転写伸長と共役して進行するため、RNA スプライシングが遅延することにより、転写伸長も障害される。(3) 転写伸長の障害が R-loop の蓄積と DNA 損傷応答シグナルの活性化を招くが、その程度はあくまでマイルドであり、マイルドであるが故に S 期にはこれが見過ごされ、分裂期に移行する。(4) R-loop が残されたまま細胞分裂を迎えることにより、顕著な分裂期の異常が生じ、分裂後の細胞で細胞死やゲノム不安定性を呈する。

また、RNA スプライシングにおける DDX41 の主な役割は、RNA スプライシングと転写伸長との連携であると予想している。これは、DDX41 が活性化スプライシング因子、ならびに活性化 RNA ポリメラーゼ II の双方と相互作用することを根拠とする仮説である。現在、その証明を目指し、DDX41 の発現や機能を抑制した場合の活性化ポリメラーゼ II の動態を、mNET-seq という手法で解析している⁶⁾。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

先天的に DDX41 の片アレル変異を有する例では、血球減少傾向を認め、また造血器腫瘍を発症する場合でも、骨髄不全を伴う傾向にある。上記の機序は、これらの表現型をよく説明できると考えられる。さらに、DNA 複製ストレスを増長するような薬剤による、本遺伝子変異を有する造血器腫瘍の治療への応用も期待される。現在、より詳細な解析を行うとともに、研究成果を論文にまとめ投稿準備を進めている。

【参考・引用文献】

1. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, Singh J, Padgett RA, Gu X, Phillips JG, Clemente M, Parker Y, Lindner D, Dienes B, Jankowsky E, Sauntharajah Y, Du Y, Oakley K, Nguyen N, Mukherjee S, Pabst C, Godley LA, Churpek JE, Pollyea DA, Krug U, Berdel WE, Klein HU, Dugas M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Yoshida K, Ogawa S, Müller-Tidow C, Maciejewski JP. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;27(5):658-70.

2. Sébert M, Passet M, Raimbault A, Rahmé R, Raffoux E, Sicre de Fontbrune F, Cerrano M, Quentin S, Vasquez N, Da Costa M, Boissel N, Dombret H, Peffault de Latour R, Socié G, Itzykson R, Fenaux P, Soulier J, Adès L, Clappier E. Germline DDX41 mutations define a significant entity within adult MDS/AML patients. *Blood*. 2019;134(17):1441-1444.
3. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, Boggs K, Cheng J, Ma J, Radtke I, Chao JR, Walsh MP, Song G, Andersson AK, Dang J, Dong L, Liu Y, Huether R, Cai Z, Mulder H, Wu G, Edmonson M, Rusch M, Qu C, Li Y, Vadodaria B, Wang J, Hedlund E, Cao X, Yergeau D, Nakitandwe J, Pounds SB, Shurtleff S, Fulton RS, Fulton LL, Easton J, Parganas E, Pui CH, Rubnitz JE, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Gruber TA, Mullighan CG, Schlenk RF, Paschka P, Döhner K, Döhner H, Bullinger L, Zhang J, Klco JM, Downing JR. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet*. 2016;48(12):1551-1556.
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;44(8):745-754.
5. Nojima T, Rebelo K, Gomes T, Grosso AR, Proudfoot NJ, Carmo-Fonseca M. RNA Polymerase II Phosphorylated on CTD Serine 5 Interacts with the Spliceosome during Co-transcriptional Splicing. *Mol Cell*. 2018;72(2):369-379.
6. Nojima T, Gomes T, Grosso AR, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M, Proudfoot NJ. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell*. 2015;161(3):526-540.