

研究報告書
令和3年度：A課題

2023年 3月 2日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 熊本大学 大学院生命科学研究部
臨床病態解析学講座

住 所 熊本県熊本市中央区本荘1-1-1

研究者氏名 松井 啓隆

(研究課題)

RNA ヘリケース変異が RNA スプライシングと転写伸長の連携を妨げ造血器腫瘍に至る機序の解明

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[背景および目的]

RNA ヘリケースは、RNA の構造変換や RNA/タンパク質の相互作用を制御することで、RNA スプライシング・リボソーム RNA 生合成・RNA 核外輸送・翻訳など、RNA 代謝を伴う多くの生命現象において重要な役割を担う。これまでの解析から、造血細胞において DDX41 は RNA スプライシングに対し促進的に作用するが、一方で、MDS で典型的な U2 snRNP 関連因子(SF3B1, SRSF2, U2AF1 など)の遺伝子変異の場合と異なり、RNA スプライシング部位の決定には関与しないことを明らかにした。一方で DDX41 は、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持ち、特に、RNA スプライシングを終えるのを待つため、RNA ポリメラーゼ II が 5'スプライスサイト(SS)において一旦停止する作用を調節するものと考えている。本研究は、この RNA スプライシング・転写伸長間の連携をより詳細に解析し、DDX41 変異を伴う造血細胞の増殖が障害され、ゲノム不安定性を呈するに至る機序を解明することを目的として、立案・遂行されたものである。

[方法と結果]

1. DDX41 の RNA スプライシングにおける役割

われわれは、CLIP-seq 法による解析から、DDX41 がコーディング RNA の 5'SS に主に結合する因子であることを明らかにした。また、スプライソソームを構成する様々な因子との相互作用の解析から、DDX41 がスプライシング後半の C 複合体を構成する因子であることを見出した。C 複合体の段階では、すでにスプライシング部位は決定され 5'SS も切断されていることから予想さ

れたように、DDX41 の発現を抑制しても RNA スプライシングパターンに顕著な変化は見られなかったが、一方で、未成熟の RNA が核内に蓄積し、mRNA 合成が障害された。以上の結果から、DDX41 は RNA スプライシング部位の決定には関与しないが、スプライシングの後半において、RNA スプライシングを促進する役割を有していることが明らかになった。

2. DDX41 発現・機能低下による DNA 損傷応答の誘導

DDX41 の発現を抑制した細胞は、増殖が抑制されアポトーシスを起こすが、その際に DNA 損傷応答シグナルの活性化が認められた。また、G2/M 期での細胞周期の停止が観察された。そこで、細胞周期を同調したうえで DDX41 の機能を阻害したところ、細胞周期の進行が軽微に遅延し、また細胞分裂の際に分裂異常を起こすことがわかった。S 期においては、DNA 複製能が低下し、Chk1 のリン酸化が亢進・遷延する傾向にはあるものの、 γ H2AX の増加に代表される顕著な DNA 損傷シグナルの活性化は明確ではなく、細胞分裂を経て初めて γ H2AX シグナルの増加が観察された。

以上より、DDX41 の阻害による DNA 複製障害はそれほど顕著ではないものの、一方で、複製障害が軽微であるがゆえに、損傷修復機構が十分に働かず、DNA 複製が完全でないままに細胞分裂に入ることを許容してしまうことが判明した。

3. DDX41 による転写伸長と RNA スプライシングの連携

前述の通り DDX41 は RNA スプライシング因子と相互作用するが、それに加えて RNA ポリメラーゼ II とも結合することが判明した。RNA ポリメラーゼ II 抗体による ChIP-seq 解析では、RNA ポリメラーゼ II がコーディング RNA の 5' スプライスサイト(SS)近傍でいったん停止しつつ転写伸長するのに対し、DDX41 を発現抑制した細胞ではそのポージングが消失することを発見した。

以上の結果から、DDX41 が転写伸長と RNA スプライシングの連携に関与し、DDX41 が機能しないと、RNA スプライシングが遅延することによって R-loop が形成されやすい状況となることが判明した。このことは *Ddx41* 遺伝子改変マウス由来の造血細胞を用いた実験でも確かめられ、DDX41 異常が造血障害を引き起こす機序が明らかとなった。

[今後の展望]

今回の研究により、DDX41 が造血細胞の機能維持に重要な役割を担い、DDX41 が十分に機能しないと造血障害を起こすことが示された。一方で、DDX41 異常がどのように造血器腫瘍の発症にまで至るかという点では、まだ十分な解明に至っていない。DDX41 の生殖細胞系列バリエーションを持つ造血器腫瘍の発症年齢が 60 歳代以降と遅いこと、DDX41 異常と共存しうる遺伝子変異に *CUX1* 変異が特徴的であることなどがカギになると考えられ、マウスモデルを中心として機能解析を行う計画を立案・遂行している。

[発表論文]

1. Tungalag S, Shinriki S, Hirayama M, Nagamachi A, Kanai A, Inaba T, Matsui H. Ribosome profiling analysis reveals the roles of DDX41 in translational regulation. *Int J Hematol* 2023 (in press). doi: 10.1007/s12185-023-03558-2
2. Shinriki S, Hirayama M, Nagamachi A, Yokoyama A, Kawamura T, Kanai A, Kawai H, Iwakiri J, Liu R, Maeshiro M, Tungalag S, Tasaki M, Ueda M, Tomizawa K, Kataoka N, Ideue T, Suzuki Y, Asai K, Tani T, Inaba T, Matsui H. DDX41 coordinates RNA splicing and transcriptional elongation to prevent DNA replication stress in hematopoietic cells. *Leukemia* 236(11): 2605-2620, 2022.
3. Shinriki S, Matsui H. Unique role of DDX41, a DEAD-box type RNA helicase, in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Oncol.* 12:992340, 2022.
4. Singh RS, Vidhyasagar V, Yang S, Arna AB, Yadav M, Aggarwal A, Aguilera AN, Shinriki S, Bhanumathy KK, Pandey K, Xu A, Rapin N, Bosch M, DeCoteau J, Xiang J, Vizeacoumar FJ, Zhou Y, Misra V, Matsui H, Ross SR, Wu Y. DDX41 is required for cGAS-STING activation against DNA virus infection. *Cell Rep.* 39(8):110856, 2022.

[謝辞]

本研究課題にご支援くださいました公益財団法人がん研究振興財団に厚く御礼申し上げます。また、共同研究にご協力いただいた多くの研究者に、この場をお借りして感謝申し上げます。