

課題番号 22

エピゲノム制御因子 ASXL1 の DNA 損傷応答と転写制御を介したゲノム安定性維持機構における機能

[1] 組織

代表者：榎本 豊

(東京大学)

対応者：宇井 彩子

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

エピゲノム制御因子である *DNMT3A*、*TET2*、および *ASXL1* の変異は、骨髄系腫瘍でしばしば認められる。近年、一見正常に見えるが、骨髄系腫瘍で見られる遺伝子変異が造血幹細胞に生じ、クローナルに増殖するクローン性造血 (Clonal Hematopoiesis) という現象が注目されている。高齢者の約 10% にクローン性造血が見られると考えられており、白血病発症のリスクが上昇する他、心血管疾患との関連も報告されており、高齢化が進む日本において重要な研究対象となっている。クローン性造血において様々な遺伝子変異が報告されているが、特にエピゲノム制御因子である *DNMT3A*、*TET2*、および *ASXL1* は頻度が高い遺伝子変異である。我々は、その一つ *ASXL1* に着目して研究を進めている。

ASXL1 は、ヒストン H3 の K4/K27 のメチル化に関与することが知られているが、我々は *ASXL1* の変異体が脱ユビキチン化酵素 BAP1 と協調して、H2AK119 の脱ユビキチン化を強く促進することを明らかにした (Asada et al. Nat. Commun, 2018)。ASXL1 自体に酵素活性はなく、ヒストン修飾の足場蛋白質として機能することが示唆されている。さらに加齢医学研究所の宇井准教授により、転写装置による DNA 修復の阻害を防ぐため、DNA 損傷部位近傍に抑制性ヒストン修飾である H2AK119Ub が付加され、転写が抑制されることが示された (Ui et al. Molecular Cell, 2015)。クロマ

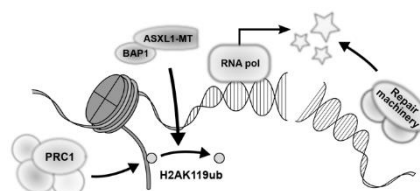


図 1 DNA 損傷時に変異型 ASXL1 がヒストン修飾に与える影響の仮説。DNA 損傷部位において、PRC1 による H2AK119 のユビキチン化が転写を抑制し、転写装置による DNA 修復反応の阻害は防がれる。変異型 ASXL1 は DNA 損傷応答能が野生型に比べて高いことが示された。このことから、変異型 ASXL1 は BAP1 の脱ユビキチン化活性を増強するため、DNA 損傷部位において H2AK119 を脱ユビキチン化することで脱抑制を引き起こし、DNA 修復反応を妨げる可能性がある。

チン動態の変化と DNA 損傷応答の関連性が明らかになりつつあるが、その分子機構や疾患との関連性には今も不明な点が多い。

本研究の目的は、*ASXL1* 変異の解析を通して、DNA 損傷応答におけるエピジェネティクスの役割を明らかにし、DNA 損傷の蓄積の原因を解明することである。今まで宇井准教授との共同研究により、(1) *ASXL1* 変異蛋白質は野生型に比べて過剰に DNA 損傷に応答すること、またこの応答は PARP1 のシグナル依存的に応答することを見出した。そこで本研究では下記を明らかにする。宇井准教授とは共同研究期間中に数回に渡り、メールやオンラインで実験相談や打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまでの解析で、C 末欠失型 *ASXL1* と野生型 *ASXL1* を発現する造血幹細胞に 2 グレイ放射線照射して DNA 修復を γ H2AX 染色によって解析したところ、C 末欠失型 *ASXL1* を発現する細胞では照射後の γ H2AX の立ち上がりが遅く、消失も遅いことを確認していた (図 1)。

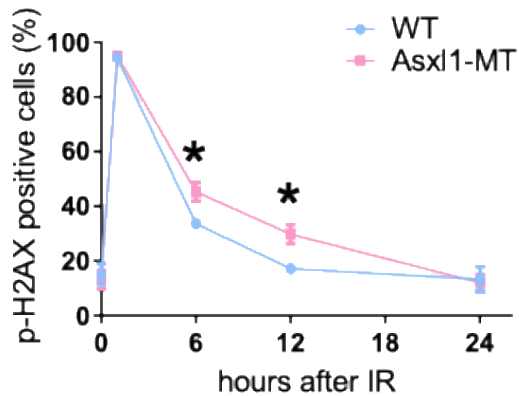


図2 変異型 ASXL1 は DNA 修復を遅延させる

次に正常マウスと ASXL1-MT マウスの骨髄細胞を競合的に移植し、4 ヶ月後に X 線を照射した。末梢血および骨髄中の Asxl1-MT マウス由来細胞のキメリズムを観察したところ、ASXL1-MT マウスの骨髄は正常マウス骨髄細胞に凌駕された (図3)。

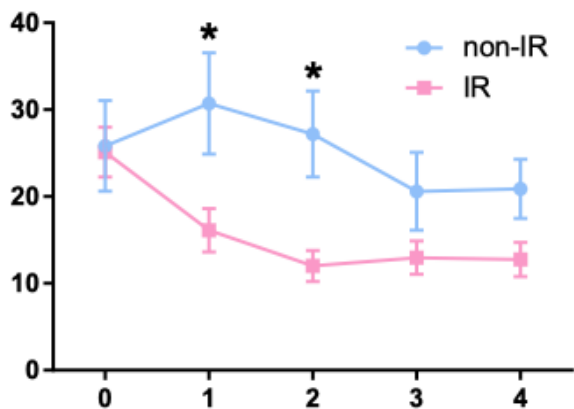


図3 正常骨髄と ASXL1-MT 骨髄の競合移植。移植後2 ヶ月 (0) で照射

そこで、照射後の幹細胞におけるアポトーシスを評価したところ、アポトーシスが亢進していることが明らかになった (図4)。

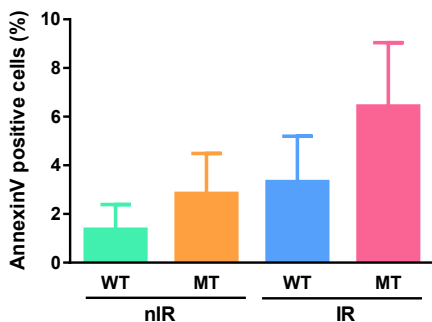
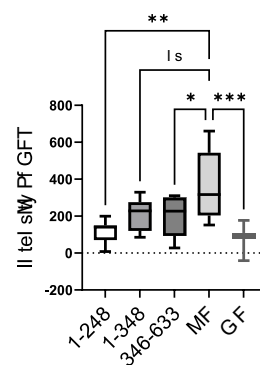


図4 照射後の LSK 分画におけるアポトーシス評価

また、免疫沈降後の質量分析解析により、ASXL1 は NHEJ に関連する分子と結合していることが示唆された。そしてこの結合は、免疫沈降後のウェスタンブロット解析により確かめられた。

そこで、NHEJ による DNA 修復能を評価したところ、ASXL1-MT を発現させた細胞においては NHEJ が低下していることも明らかになった。これらの結果は ASXL1 変異が DNA 修復を遅延することを介して幹細胞機能に影響を及ぼしていることを示唆している。

次に Laser micro-irradiation を行なった後、ASXL1-WT/MT の細胞内における局在を検討したところ、ASXL1-MT が強く DSB に集積することが明らかになった。



これらの結果は、ASXL1-MT が NHEJ に関連する分子と結合して DSB に強く集積することで DNA 修復を遅延し、最終的に幹細胞のアポトーシスが亢進されることを示唆している。今後はより詳細な分子機構を解析し、ASXL1-MT と DNA 修復の関係性について明らかにしていきたい。

(3-2) 波及効果と発展性など

今後は、がんで変異がみられるスプライシングファクターの DNA 修復における機能評価を行う。これらファクターの DSB における機能の意義が明らかになれば、今後は PARP 阻害剤に対する適応拡大につながる可能性があり、より適した治療選択の基盤的研究になる可能性が見込まれる。

[4] 成果資料

こちらは現在解析や実験が進行中の研究であり、未だ学会や論文で発表を行っていないが、今後は成果を発表していく予定である。