



「白血病関連遺伝子 ASXL1」が造血幹細胞での膜なし構造体の形成に関与

1. 発表者：

北村 俊雄（東京大学医科学研究所 附属先端医療研究センター 細胞療法分野
/ 附属幹細胞治療研究センター 幹細胞シグナル制御部門 教授）
合山 進（東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻
先進分子腫瘍学分野 教授）
山本 圭太（東京大学医科学研究所 附属先端医療研究センター 細胞療法分野
/ 附属幹細胞治療研究センター 幹細胞シグナル制御部門 特任研究員）

2. 発表のポイント：

- ◆ヒストン修飾因子 ASXL1 はアミノ酸配列内に天然変性領域（IDR：intrinsically disordered region、注1）と呼ばれる構造を取りにくい領域を持ち、代表的な膜の無い構造体（Membraneless Organelles：MOs、注2）パラスペックル(注3)の形成を促進する性質を有することが分かりました。
- ◆一方、白血病の原因となる変異型 ASXL1 はこの機能を失っていることを明らかにしました。
- ◆パラスペックル構成因子の NONO が、造血幹細胞の機能に重要な役割を担っていることが分かりました。パラスペックルに着目することで、造血幹細胞の機能や白血病発症メカニズムの研究に新たな展望が開かれることが期待されます。

3. 発表概要：

生物の細胞内には脂質二重膜によって仕切られた構造体のほかにも、膜を持たない構造体 MOs が多数存在しています。MOs は液-液相分離（LLPS：liquid-liquid phase separation、注4）によって細胞内に形成されることが知られています。近年になって、LLPS が MOs の形成をはじめとする細胞内の様々な現象に関わっていることがわかり、分子生物学における MOs や LLPS 研究が活発に行われています。しかしながら、MOs の機能については未知の部分が多いことでも知られています。

東京大学医科学研究所 細胞療法分野の北村俊雄教授と東京大学大学院新領域創成科学研究科の合山進教授らのグループは、白血病原因遺伝子 *ASXL1* のアミノ酸配列の中に、細胞内で LLPS が起きる上で重要な役割を担う天然変性領域（IDR）が存在することを見出し、*ASXL1* の新たな機能を明らかにしました。

本研究では野生型 *ASXL1* が C 末端に存在する IDR を介して、LLPS を形成することを見出しました。一方で C 末端の IDR を欠損した変異型 *ASXL1* では、LLPS を形成しにくいことが分かりました。野生型 *ASXL1* は LLPS によって形成される MOs の一つである「パラスペックル」の形成を促進するのに対して、変異型 *ASXL1* はこの機能を失っていることが明らかになりました。*ASXL1* 変異を有するマウスの造血幹細胞においては、パラスペックルの形成障害が起きていました。パラスペックルの必須構成因子 NONO をノックアウトした造血幹細胞では、機能障害が認められました。

これらの発見は、パラスペックルの形成が造血幹細胞の機能に重要な役割を担っていることを示しています。パラスペックルをはじめとする MOs に着目することで、今までわからな

かった造血幹細胞の機能や白血病発症メカニズムの研究に新たな展望が開かれることが期待されます。

4. 発表内容：

生物の細胞内には「核」や「小胞体」「ミトコンドリア」など脂質二重膜によって仕切られた構造をもつオルガネラが存在しています。一方で細胞内には、膜を持たない MOs という構造体も多数存在しています。「パラスペックル」「核スペックル」「ストレス顆粒」などに代表されるこれら構造体は、LLPS によって細胞内に形成されています。LLPS とは水と油が分離するように、異なる組成の水溶液同士が互いに分離して液滴を形成する現象のことです。

細胞内で起こる LLPS には、IDR を有する蛋白質が重要な役割を担っています。IDR は決まった立体構造を持たないアミノ酸配列部位であり、その機能は長らく謎に包まれていました。近年になって、LLPS が MOs の形成をはじめとする細胞内の様々な現象に関わっていることがわかり、分子生物学における LLPS 研究が盛んになっています。分子生物学における LLPS の研究はまだ発展途上であり、現在でもその多くは未解明です。

本研究室では白血病原因遺伝子 *ASXL1* の研究を行っています。変異型 *ASXL1* (*ASXL1-MT*) を発現するノックイン (KI) マウスを作成し、本マウスの機能解析を通じて白血病発症の分子メカニズムを研究してきました。また、過去には「*ASXL1* が変異獲得により、C 末端側を欠損した変異型 *ASXL1* を発現すること」を明らかにしました。変異型 *ASXL1* は *BAP1* と協調して白血病発症を促進します。しかし、野生型と変異型 *ASXL1* の蛋白質構造による機能の違いについては、まだ多くの研究の余地が残されていました。

本研究では *ASXL1* のアミノ酸配列に着目し、*ASXL1* が C 末端側に長大な IDR を有することを見出しました。*ASXL1* の IDR は、変異によりその大部分が欠損してしまいます。*ASXL1* の C 末端側にある IDR は、他のエピジェネティック因子と比べても非常に長いものであり、*ASXL1* が LLPS に関与する蛋白質であることが示唆されました。人工合成した *ASXL1* を用いた実験では、実際に *ASXL1* がスライドガラス上で液滴を形成することが確認されました。過去の研究成果から、*ASXL1* がパラスペックルの構成因子と結合する可能性があることが分かっています。生化学的手法により、*ASXL1* とパラスペックル構成因子 *NONO* と *SFPQ* が、実際に細胞内で結合することが明らかになりました。また、野生型 *ASXL1* がパラスペックルの形成に促進的に作用することが分かりました。

興味深いことに、変異型 *ASXL1* は野生型 *ASXL1* と比べて LLPS を起こす能力に劣り、パラスペックル形成を促進する機能も弱い、という性質が見出されました。そこで、*ASXL1-MT-KI* マウス由来の造血幹細胞を調べてみたところ、細胞内でパラスペックルの形成障害が起きていることが分かりました。パラスペックルを正常に形成できないことが、造血幹細胞の機能にどのような影響を及ぼすかを調べるため、*CRISPR/Cas9* システムを用いて造血幹細胞の *NONO* をノックアウトしました(注5)。*NONO* をノックアウトした造血幹細胞は、骨髄再構築能が低下しました。一方で、既にパラスペックルの形成障害が起きている *ASXL1-MT-KI* マウスの造血細胞では *NONO* のノックアウトをしても骨髄再構築能の低下は認められませんでした。

以上の発見は、パラスペックルの形成が造血幹細胞の機能に重要な役割を担っていることを示しています。MOs に着目することで、今までわからなかった造血幹細胞の機能や白血病発症メカニズムの研究に、新たな展望が開かれることが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Cell Reports」 (8月24日付けオンライン版)

論文タイトル：A histone modifier ASXL1 interacts with NONO and is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells

著者：Keita Yamamoto, Susumu Goyama, Shuhei Asada, Takeshi Fujino, Taishi Yonezawa, Naru Sato, Reina Takeda, Akiho Tsuchiya, Tomofusa Fukuyama, Yosuke Tanaka, Akihiko Yokoyama, Hikaru Toya, Ayana Kon, Yasuhito Nannya, Rena Onoguchi-Mizutani, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose, Seishi Ogawa, Nobuyoshi Akimitsu, and Toshio Kitamura*

DOI：10.1016/j.celrep.2021.109576

URL：https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(21)01010-X

6. 問い合わせ先：

<研究に関するお問い合わせ>

東京大学医科学研究所 附属先端医療研究センター 細胞療法分野

教授 北村 俊雄 (きたむら としお)

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/lab/advancedclinicalresearch/section02.html>

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学医科学研究所 国際学術連携室 (広報)

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/index.html>

7. 用語解説：

(注1) 天然変性領域 (IDR：intrinsically disordered region)

IDR は特定のアミノ酸の含有率が著しく偏った領域で、 α ヘリクス構造や β シート構造などのように固定された三次元構造を有さない領域を指す。IDR は決まった構造をとらずにフラフラとした状態で細胞内に存在していると考えられ、その機能については長らく議論の対象となってきた。しかし、近年になり LLPS の概念が分子生物学に普及するとともに、IDR を有する蛋白質が細胞内で LLPS 現象を引き起こすことが分かり、注目を集めている。IDR は MOs に含有される蛋白質や転写・クロマチンリモデリング因子に多く見られることが知られている。

(注2) 膜の無い構造体 (Membraneless Organelles：MOs)

核や小胞体、ミトコンドリアなどの脂質二重膜に囲まれた細胞内小器官と対比して、膜構造を持たずに細胞内に存在する構造体を総称して MOs と呼称する。核内では「核小体」「核スペckル」「パラスペckル」など、細胞質では「ストレス顆粒」「P-body」「生殖顆粒」などが、代表的な MOs である。MOs は構成因子の液-液相分離によって形成される。

(注3) パラスペckル

パラスペckルは、核内に形成される MOs の中でも最も代表的なものの一つである。同じく核内に存在する MOs の「核スペckル」に近接して存在することから「Para-speckle」と名付けられ、ともに核質のクロマチン間に存在する。パラスペckルの形成には、いくつかの RNA 結合蛋白質と長鎖ノンコーディング RNA の NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) が不可欠であることが知られている。パラスペckル形成に必須とされる構成蛋白質としては NONO と SFPQ が有名であり、これらは RNA 制御に幅広く機能している。

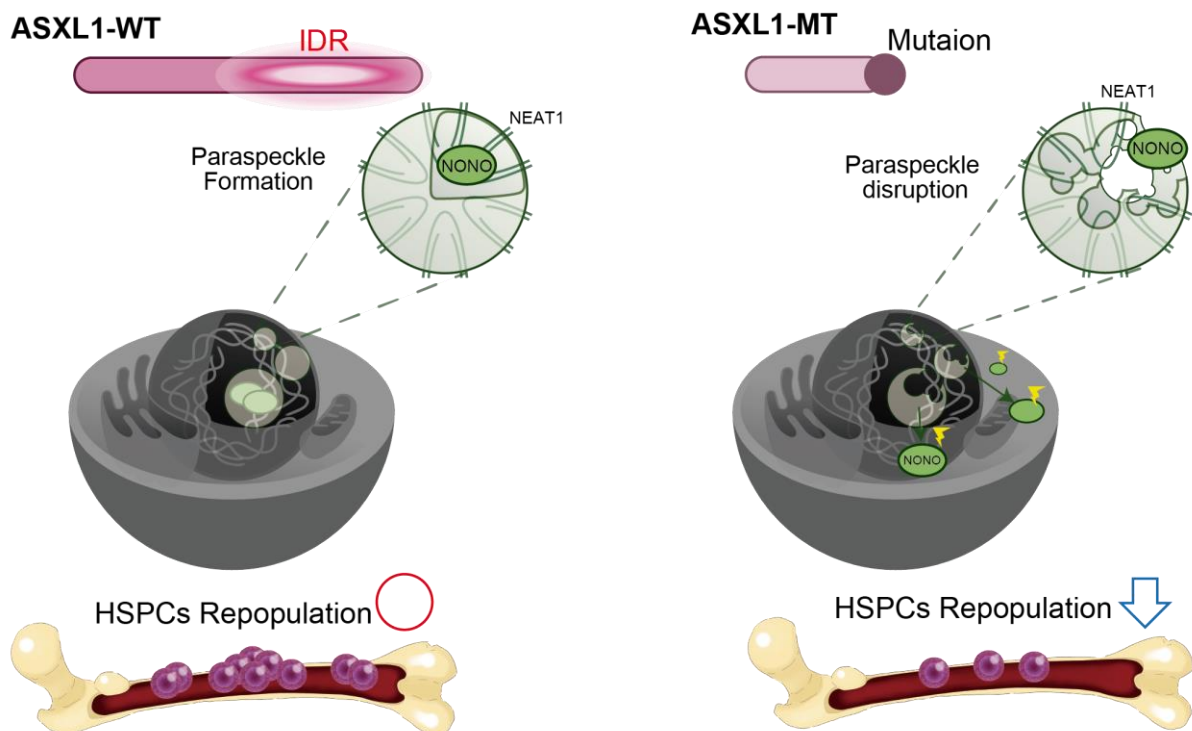
パラスペックルの機能の詳細は明らかになっていない部分も多いが、構成因子を隔離することで遺伝子発現制御に関わっていると考えられている。

(注4) 液-液相分離 (LLPS : liquid-liquid phase separation)

LLPS とは液滴形成の事で、分子生物学のみならず、工学や化学の分野でも共通して知られている基本的な物理現象である。水と油が分離するように異なる組成の水溶液同士が互いに分離して集合する性質であり、この力が細胞内でも働き、蛋白質が特定の領域に効率的に集まって機能したり、反対に望ましくない領域で働かないように隔離したりしている。LLPS によって細胞内の様々な現象が説明出来ることがわかり、近年分子生物学における LLPS の研究が盛んになっている。天然変性領域を有する蛋白質や核酸 (RNA/DNA) は、細胞内で LLPS 現象が起こるうえで重要な役割を担っている。

(注5) NONO はパラスペックルの必須構成因子であり、ノックアウトすることでパラスペックルが形成されなくなることが知られている。

8. 添付資料 :



野生型 ASXL1 と変異型 ASXL1 によるパラスペックル形成能の違い : 野生型 ASXL1 は造血幹細胞内においてパラスペックルの形成を促進する。一方で変異型 ASXL1 を有する造血幹細胞ではパラスペックルの形成障害が起こる。パラスペックルが正常に形成されない造血幹細胞においては、骨髓再構築能が低下する。