

審査の結果の要旨

氏名 山本 圭太

本研究は、白血病発症において重要な役割を果たしていると考えられる ASXL1 とその変異について、パラスペックルという新規核内構造体に着目し解析をしたものであり、細胞株および ASXL1-MTcKI マウスを用いた実験系により、下記の結果を得ている。

1. 293T 細胞を用いた遺伝子導入と共免疫沈降 (Co-IP : co-immunoprecipitation) 実験により、野生型および変異型 ASXL1 が NONO と結合することを確認した。ASXL1 は別のパラスペックル因子である SFPQ とも結合した。Co-IP 実験および RNA-IP 実験により、野生型 ASXL1 の共発現で NONO とヒストンタンパク質、NEAT1 の結合が増強することが明らかになった。これらの変化は野生型 ASXL1 によってのみ認められ、変異型 ASXL1 では認められなかった。
2. ASXL1-MTcKI マウスの造血幹・前駆細胞 (HSPCs) を用いて RNA deep sequencing を行ったところ、ES (Exons skipping) を中心とする 1033 の AS (Alternative splicing) が認められ、GGNG の配列を持つ Exon が特異的に include され、CCNG の配列を持つ Exon が skipping を受けていることが明らかになった。
3. 公共データベースおよび ASXL1-MTcKI マウスの CHIP seq データの解析から、ASXL1 が *NEAT1* のプロモーター領域に局在することが明らかとなった。Actinomycin D を用いた転写抑制実験で、野生型 ASXL1 の発現により NEAT1 の degradation が抑制された。一方で変異型 ASXL1 を導入した細胞においては NEAT1 の degradation は亢進していた。細胞分画抽出による RNA の発現解析では、野生型 ASXL1 が核内特異的に NEAT1 の発現量を上昇させており、ASXL1 は細胞内での NEAT1 の安定性に関係し、変異により NEAT1 を安定化させる機能を失っていることが明らかになった。
4. ASXL1-MTcKI マウス HSPCs の免疫染色実験では、本来核内に局在するはずの Nono のシグナルが細胞質に見られる細胞が認められた。細胞分画抽出を行ったウェスタンブロットにおいても、核抽出サンプルで Nono のバンドが減弱し、細胞質抽出サンプルでバンドが増強していることが確認された。さらに ASXL1-MTcKI マウス HSPCs ではパラスペックル形成に必須と考えられる *Neat1v2* の発現が優位に低下し

ており、Neat1v2 の RNA-FISH にてパラスペックルを示すシグナルの低下が認められた。

5. CRISPR-Cas9 システムを用いて ASXL1-MTcKI マウス HSPCs の Nono をノックアウトして競合的幹細胞移植実験を行い、移植後 1 か月後の造血再構築能を評価したところ、Nono をノックアウトした分画に限ってキメリズムの上昇が認められた。
6. NLS (Nuclear localization signal) を欠損した NONO 変異体 (NONO- Δ NLS) を作成し、Kusabira Orange マウス (KuO マウス) の HSPCs にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、競合的移植実験を行った。NONO- Δ NLS を導入したドナー細胞ではキメリズムの低下が認められ、ROS (Reactive oxygen species) が上昇していた。

以上、本論文は ASXL1 がパラスペックル形成に関与すること、ASXL1-MTcKI マウスの造血幹細胞においてパラスペックルの形成障害が認められることを明らかにした。造血器腫瘍における遺伝子変異がパラスペックルをはじめとする Membraneless Organelle に及ぼす影響については全く知られておらず、病態解明の新たな糸口となり得る重要な貢献をなすものである。

よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。