

181. 生体内で生じた DNA 損傷が転写に与える影響の評価

荻 朋男

名古屋大学 環境医学研究所 生体適応・防御研究部門 発生・遺伝分野

Key words : アルデヒド代謝異常, DNA 修復, DNA-蛋白質間架橋, AMeD 症候群, コケイン症候群

緒言

生体内では代謝により活性酸素種やアルデヒドなど、様々な高反応性化合物が生成される。これらはゲノム DNA を傷害し、遺伝情報の安定的な伝達や正常な遺伝子の転写を阻害する。よって、生体恒常性を維持するためには、高反応性化合物を無毒化する必要があり、同時に DNA 損傷が生じた際には、これらを除去して、ゲノムの複製や転写を速やかに回復させることが求められる。DNA 損傷の除去が正常に行われない場合、老化や代謝異常症、発がんなどを含む様々なヒト疾患を発症する。生物には DNA 損傷の種類に対応した複数の DNA 修復・損傷応答メカニズムが備わっており、これら個々の分子機構の解析が進みつつある。また、長期的な遺伝子発現の攪乱が、細胞老化ひいては個体の老化を誘発することが知られるようになってきた。しかし、多様な DNA 損傷が転写や個体に与える影響については不明瞭な部分が未だ多数残されている。そこで本研究では、アルデヒド代謝異常・DNA 修復欠損マウスを解析することで、過負荷が生じている DNA 修復経路を明らかにすることを目的とする。また、転写阻害によるリスクの評価および関連する様々なヒト疾患の病態を明らかにすることで、将来的な治療法開発や効果的な疾患予防法の確立に向けた科学的知見の蓄積を目指す。

方法および結果

1. アルデヒド代謝異常マウスを用いた AMeD 症候群の病態解明

アルデヒド脱水素酵素である ALDH2 は、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存的に様々なアルデヒドを酸化する。飲酒後のアルコールフラッシング反応に関係している *ALDH2* の一塩基多型 rs671 (c.G1510A, p.E504K) は、約 40% の東アジア人集団が保有している。*ALDH2*rs671 では立体構造異常により多量体形成が阻害された結果、ヘテロ接合変異の酵素活性は、野生型と比較して 5~20% 程度に減弱すると考えられている。ADH5 はクラス III のアルコール脱水素酵素で、主たる基質はホルムアルデヒドのグルタチオン抱合体である S-ヒドロキシメチルグルタチオンである。これまでに、ADH5 と心筋症、喘息、肝癌などの発症との関連性が示唆されている。

研究代表者は、上述のアルデヒド代謝に関連する *ALDH2* と *ADH5* の同時 2 遺伝子変異が、造血不全、知的障害・神経症状、顕著な低身長・小頭症を主徴とした AMeD 症候群 (aplastic Anemia, Mental retardation, and Dwarfism) の発症原因であることを報告した [1]。本報告では、患者臨床症状ならびに病態モデルマウスの解析から、*ALDH2*rs671 のコピー数が患者表現型の重篤度を規定することを明らかにしている。しかしながら、その病態モデルマウスの個体表現型については十分な解析がなされていなかった。そこで、当該モデルマウスの長期飼育を行った結果、ヒト *ALDH2* の rs671 (p.E504K) に相当するアミノ酸置換変異 (p.E506K) のホモ接合マウス (*Aldh2*^{KI/KI}) と *Adh5* 遺伝子欠損マウス (*Adh5*^{-/-}) の寿命は野生型マウスと同程度であったが、二重機能不全マウス (*Adh5*^{-/-}*Aldh2*^{KI/KI}) は、1 ヶ月以内に全てのマウスが死亡、*Adh5* 欠損/*Aldh2*-E506K ヘテロ接合マウス (*Adh5*^{-/-}*Aldh2*^{+/KI}) は、1.5 年程度であることが明らかになった [1, 2]。

2. アルデヒド代謝・転写共役型 DNA 修復異常マウスの病態解明

アルデヒドは R-CHO を基本骨格とした強力な求電子剤であり、DNA ならびに蛋白質に共有結合することで、様々な疾患を引き起こすことが明らかになっている。最も単純なアルデヒドであるホルムアルデヒドは、生体内では、ヒストンの脱メチル化反応、ヌクレオチドやアミノ酸合成に関与する一炭素反応中に産生されることが知られている [3]。

AMeD 症候群では、ホルムアルデヒドの分解異常により生じた DNA-DNA 鎖間架橋 (DNA interstrand crosslink : ICL) と DNA-蛋白質間架橋 (DNA-protein crosslink : DPC) などの DNA 修復経路の過負荷が原因となり、多様な臨床症状を示すことが予想されるが、その詳細な疾患発症機序は明らかになっていない。

そこで、高精度かつゲノムワイドに DPC の修復動態を検出するため、DPC-seq と呼ばれる次世代ゲノム解析を利用した実験系を開発した。DPC-seq を用いることで、ホルムアルデヒド処理により生じた DPC は転写領域で優先的に修復されることが明らかになった [2]。DPC により RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) の転写が阻害されることから、転写伸長中の RNAP II が DPC を認識し、DPC 修復に関与する蛋白質をリクルートするのではないかと考え、RNAP II に対する抗体を用いてインタラクトーム解析を実施した。その結果、RNAP II との相互作用因子として、早期老化症状を示すコケイン症候群の疾患関連蛋白質である CSB を同定した。次に、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法により CSB 欠損細胞を作製し DPC-seq を実施した結果、転写領域の DPC 修復が遅延することを明らかにした。

次に、AMeD 症候群病態モデルマウスと転写共役型 DNA 修復欠損マウスとを交配させたマウスの解析を実施することで、AMeD 症候群病態モデルマウスで観察された個体表現型が転写領域の過剰な DPC の生成によるものかを検討した。*Adh5*^{-/-}*Aldh2*^{+/^{K1}*Csb*^{-/-}マウスの末梢血を解析した結果、*Adh5*^{-/-}*Aldh2*^{K1/K1}と同様に貧血症状を示すことが分かった。さらに、造血幹細胞の割合を検討するために、マウスの骨髄を回収し、フローサイトメトリー解析を実施した。その結果、*Adh5*^{-/-}*Aldh2*^{+/^{K1}*Csb*^{-/-}マウスでは、造血幹細胞の割合が低下すること、転写領域の DPC が蓄積することを明らかにした (図 1)。}}

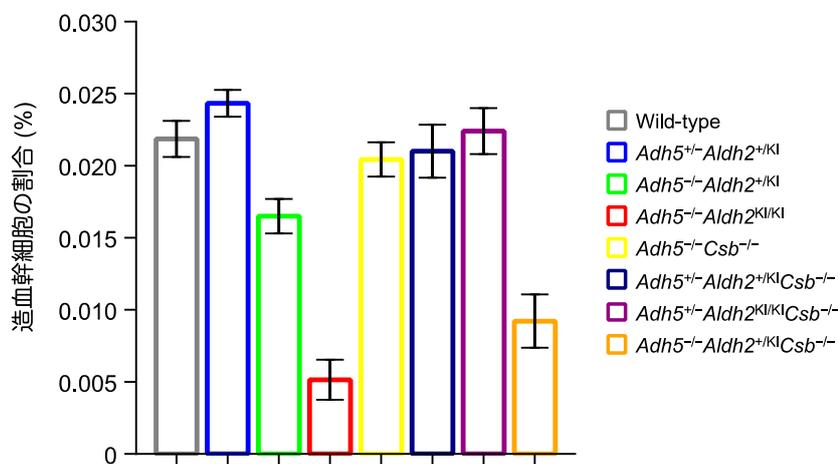


図 1. アルデヒド代謝と転写共役型 DNA 修復の同時機能欠損マウスの表現型解析
マウス骨髄より細胞を回収し、Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD150⁺CD48⁻細胞の割合を測定した。

考 察

本研究から、アルデヒド代謝異常マウスでは DPC が蓄積すること、その DPC の修復が転写共役型 DNA 修復経路に依存的であることが示唆された。さらに、アルデヒド代謝と転写共役型 DNA 修復の同時機能欠損マウスでは、それぞれの単独欠損マウスと比較して、より重篤な個体表現型を示すことが明らかになった。これらの結果は、AMeD 症候群では、アルデヒド代謝異常により過剰な DPC が生成され、RNAP II の転写伸長反応を

阻害することで、多様な臨床症状が現れることを示唆している。今後は、アルデヒド除去効果を示す化合物の探索・開発が、AMeD 症候群ならびにアルデヒド由来の DNA 損傷が原因で発症した疾患の創薬研究に繋がることが期待される。

謝 辞

本研究をご支援くださいました公益財団法人上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, Higasa K, et al. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Sci Adv.* 2020;6(51). Epub 20201218. doi: 10.1126/sciadv.abd7197. PubMed PMID: 33355142.
- 2) Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Ogi T. Endogenous aldehyde-induced DNA-protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair. *Nat Cell Biol.* 2024. Epub 20240410. doi: 10.1038/s41556-024-01401-2. PubMed PMID: 38600234.
- 3) Morellato AE, Umansky C, Pontel LB. The toxic side of one-carbon metabolism and epigenetics. *Redox Biol.* 2021;40:101850. Epub 20201228. doi: 10.1016/j.redox.2020.101850. PubMed PMID: 33418141; PubMed Central PMCID: PMC7804977.