

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03450

研究課題名(和文) DNA損傷応答感受性を規定するSLFN11遺伝子の停止複製フォークにおける役割

研究課題名(英文) The role of SLFN11 gene that determines DNA damage sensitivity at the stalled replication forks

研究代表者

高田 穰 (Takata, Minoru)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30281728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：SLFN11遺伝子はSLFNファミリーの一つであり、そのがん細胞における発現は、多くの抗がん化学療法剤の殺細胞活性や高感受性と相関し、患者にとって良好な予後因子となるとされている。しかし、SLFN11の機能とそのメカニズムはいまだ明らかではない。我々は、SLFN11発現によるDNA損傷感受性増大がDNA複製フォークの分解促進に起因すること、そのメカニズムとしてフォーク保護因子のRAD51集積を低下させることを見出した。さらに、SLFN11の各ドメイン構造の機能や、構造が類似した他のSLFNファミリーの機能検討をすすめ、マウスのSLFN11ホモログ候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLFN11機能の解明は、抗がん化学療法の効果の理解、改善法の開発などへの発展が期待できる。造血幹細胞に高発現しているため、造血幹細胞におけるDNA損傷応答の解明にも寄与し、まれな難病で造血不全を呈するファンconi貧血症の新たな治療ターゲットとしても期待される。また、SLFN11は、類似遺伝子ファミリーが多数存在し、進化上急速に多様化している。おそらくそれに関連してウイルス感染防御に機能するなどの免疫系における役割が示唆されている。SLFNファミリー全体の機能を理解することは、免疫系とDNA損傷や複製ストレス応答の接点の全体像解明に重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The SLFN11 gene is a member of the SLFN family, and its expression in cancer cells has been correlated with cytotoxic activity and high sensitivity to many anticancer chemotherapeutic agents and is a favorable prognostic factor for patients. However, the function and mechanism of SLFN11 remain unclear. We found that the increased susceptibility to DNA damage caused by SLFN11 expression is due to enhanced degradation of DNA replication forks, which in turn reduces RAD51 accumulation, a fork protection factor. In addition, we investigated the function of each domain structure of SLFN11 and other structurally similar SLFN family members. We propose a candidate SLFN11 homologue in mice.

研究分野：分子生物学、DNA損傷応答

キーワード：SLFN11 複製ストレス 複製フォーク RAD51 DNA2 MRE11

1. 研究開始当初の背景

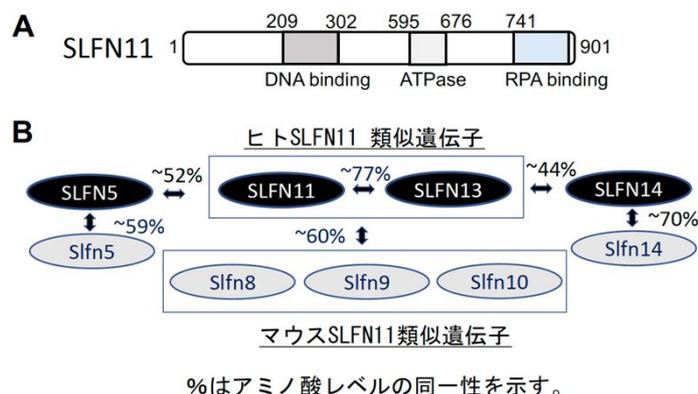
(1) 抗がん化学療法の効果・DNA 損傷応答を規定する遺伝子 SLFN11

がんや白血病患者に対して施行される「化学療法」は、悪性腫瘍治療の大きな柱の一つである。化学療法の多くは、悪性細胞のゲノムに DNA 損傷をもたらす殺細胞効果を誘導することで臨床効果を発揮する。したがって、抗がん化学療法の効果、あるいは耐性を考える上で、ゲノムに与えられた DNA 損傷からのシグナル伝達や修復などの DNA 損傷応答を理解することは非常に重要である。

最近、抗がん化学療法剤の殺細胞効果とその発現レベルがよく相関する遺伝子として SLFN11 が同定された(Barretina et al. Nature 2012; Zoppoli et al. PNAS 2012)。SLFN11 発現は、発がんプロセス中に、あるいは抗がん剤投与中にしばしば失われ、抗がん剤耐性に寄与する(Gardner et al. Cancer Cell 2017)。現在、SLFN11 発現が予後や抗がん剤の有効性の予測に有用であることが確立されつつある(Ballestrero et al. J Transl Med 2017)。汎用されるがん細胞株の多くで SLFN11 は発現しておらず、その DNA 損傷応答における機能は従来見逃されている。SLFN11 の機能解明は重要な新規の研究課題である。

SLFN11 は、SLFN ファミリーのメンバーで、一本鎖 DNA 結合蛋白質である RPA と会合し、ATPase 活性を担うドメインを持っており、DNA/RNA ヘリカーゼとしての活性を持つと予想される(図 1 A)。SLFN11 は、複製フォーク停止に応答して顕微鏡下で観察できるフォーカスを形成し、RPA のクロマチン集積・フォーカスを低下させる。相同組換え修復活性については低下させるとの報告(Mu et al. EMBO Rep 2016)や、影響なしとの報告(Murai et al. Mol Cell 2018)など、一致した見解は得られていない。SLFN11 による DNA 損傷感受性増大がいかなるメカニズムによるものか、明確な説明はされていないのが現状である。

図 1. SLFN11 蛋白質のドメイン構造 (A) とヒトとマウスの SLFN ファミリーの相同性 (B)



(2) ファンコニ貧血 (FA) 原因遺伝子の形成する FA 経路

我々は、小児の遺伝性骨髄不全症候群である FA の病態解析を継続してきた。FA は、内因性の DNA クロスリンク損傷の修復不全によって造血幹細胞に損傷と変異が蓄積し、細胞老化、細胞死、幹細胞数の低下をまねき、ゲノム変異の蓄積によって白血病化・がん化をもたらす重篤な疾患である。FA 経路の中心分子 FANCD2 は、損傷 DNA に集積し、フォーカスを形成して、DNA クロスリンクの切断と修復に必須の分子 SLX4 のリクルートや RAD51 制御などの機能をにない、DNA クロスリンク修復と、複製ストレス下の複製フォーク保護に機能するとされている。しかし、その分子機構の詳細にはまだまだ不明点が多く、新たな治療ターゲットの同定が望まれている。SLFN11 が DNA 損傷への感受性を増大させることから、FA 細胞において SLFN11 発現抑制を実施したところ、予想どおり FA 細胞の DNA 損傷感受性を低下させた(論文投稿中)。したがって、FANCD2 の修復機能ないしフォーク保護機能(後述)と SLFN11 機能は何らかの関連を有する可能性が想定される。

(3) 複製ストレス応答と複製フォーク分解・保護

S 期において DNA 複製を妨げる障害が生じると、複製フォーク進行が停止し、複製ストレス応答が活性化される。複製ストレスは、DNA 合成の阻害剤 (hydroxyurea) による複製停止、複製フォーク進行を阻害 (フォークブロック) する DNA 損傷 (mitomycin C (MMC), シスプラチンなど) 等によって誘発される。フォーク進行が停止すると、一本鎖 DNA (ssDNA) が露出し、RPA が会合し、複製起点発火抑制や、相同組換え、損傷乗り越え合成などの修復応答が起こる。さらに、SMARCAL1 などのフォークリモデリング因子によって、停止複製フォークはリバースされ、reversed fork 構造を取る(図 2)。これは、停止した複製フォークにおいて新生鎖がアニールして形成される 4-way 構造で、チキンフットとも呼ばれる。リモデリングされたフォークは、RAD51, BRCA2, BRCA1, FANCD2 などの相同組換え因子・FA 因子などが協調して DNA2 や MRE11 など

のヌクレアーゼによる新生 DNA 鎖分解から保護され、フォーク進行が再開される。合成 DNA の長さを 1 分子レベルで解析できる DNA ファイバー法によってこれらの機構の解明が進んでいる。分解からのフォーク保護は、RAD51 等の相同組換え因子・FA 因子の重要な生理的役割であり、変異体を用いた遺伝学的解析によって相同組換えとは異なる機能として区別されている(Schlacher et al. Cancer Cell 2012)。フォーク分解と保護のバランスが保護に傾くことは、抗がん剤耐性の分子基盤のひとつであり、抗がん剤の感受性・耐性を考える上で重要である(図2)(Chaudhuri et al. Nature 2016)。我々は、SLFN11 抑制による FA 細胞の DNA 損傷感受性低下の分子機構を検討し、その結果、SLFN11 発現によって複製フォークの不安定化が起こっていることを独自に見出した(後述)。

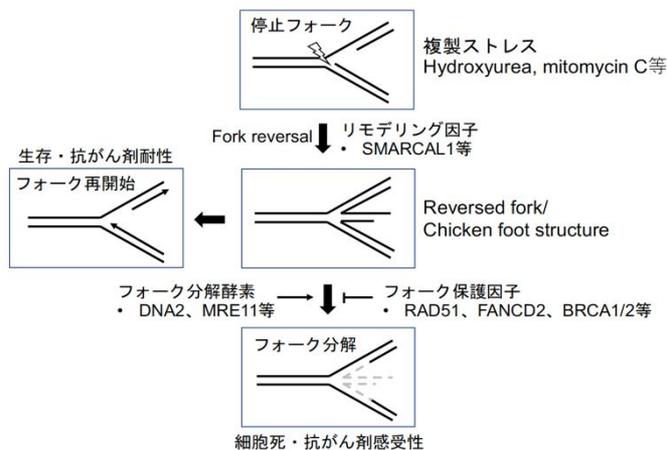


図2：複製ストレスと複製フォーク分解・保護メカニズム

2. 研究の目的

本研究の目的は、SLFN11 とその類似ファミリー分子の分子機構の解明によって、DNA 損傷応答や複製ストレスの分子機構の理解を推し進めることである。

3. 研究の方法

SLFN11 の複製フォーク分解促進メカニズムを明らかにするため、ヒト白血病由来細胞株 HAP1 における SLFN11 ノックアウトと再発現(野生型、変異型)の系を用いて、複製ストレスへの感受性、DNA ファイバーによる複製フォーク分解の程度を検討した。また SLFN11 のフォーク分解因子(DNA2, MRE11)、SLFN11 のフォーク保護因子(RAD51)への影響を核内フォーカスによって調べた。停止複製フォークへのこれら蛋白質因子の局在を見るには、まず細胞の新規合成 DNA を EdU や BrdU などの核酸アナログでパルスラベルし、PLA 法では、目的の蛋白質と合成された DNA との近接性 (proximity) を Proximity ligation assay (PLA) キットによって検出した。また、iPS 細胞では SLFN11 発現はみられないが、インビトロで造血分化させると高発現するため、iPS 細胞におけるノックアウトとインビトロ造血分化系による機能を調べた。SLFN11 の DNA 損傷への局在を、マイクロレーザー照射によって追跡した。同時に、ヒトにおける類似分子 SLFN5, SLFN13、マウスにおける Slfn8 と Slfn9 について検討した。Slfn8 と Slfn9 の機能をさぐるため、マウス ProB 細胞株 Ba/F3 において pseudogene である Slfn10 とともに、トリプルノックアウト細胞を作成し表現型を調べた。さらに各種 SLFN を導入して機能相補が可能であるか検討した。

4. 研究成果

SLFN11 の発現を抑制することにより、SLFN11 発現した野生型、ファンコニ貧血(FA)モデル細胞とも、複製ストレス応答が低下し、FA 細胞では感受性が低下し表現型のリバースが認められた。

FA 細胞においては、複製ストレス中の複製フォーク分解が亢進していることが知られており SLFN11 のフォーク分解への関与が疑われた。実際、DNA ファイバーアッセイによって、SLFN11 発現の有無がフォーク分解の程度の相関していた。

SLFN11 のフォーク分解への影響は、フォーク保護因子 RAD51 のフォーカス形成の低下とストレス下複製フォークへの集積を低下させていた。これにより、フォーク分解因子である DNA2 と MRE11 の集積が亢進し、分解を促進していると考えられた。しかし、SLFN11 が直接 RAD51 の複製フォークや DNA 損傷への集積を低下させているかどうかは、現在不明である。

SLFN11 の複製フォーク分解促進は、ヘリケースドメインに依存していた。

ここまでの成果は、*Blood* 2021 Jan 21;137(3):336-348. doi: 10.1182/blood.2019003782. にて報告した。

SLFN11 の複製フォーク分解促進は、RNase ドメインには依存していなかった。GFP と融合させた SLFN11 は、マイクロレーザー照射による核内 DNA 損傷トラックに迅速に集積することがわかった。この集積は、RPA のノックダウンである程度低下し、SLFN11 の C 末に存在する既報の RPA 結合ドメインに依存していた。したがって、DNA 損傷後に局所に集積する RPA が SLFN11 をリクルートすることが想定される。一方、SLFN11 類似因子の SLFN5 と SLFN13 については、このような DNA 損傷への集積は認められず、基本的な機能の違いが明らかとなった。従来、存在しないとも言われているマウスの SLFN11 ホモログについて、構造のかなり類似した Slfn8 と Slfn9 について、ノックアウト Ba/F3 細胞を作成したところ、ヒトにおける SLFN11 同様、複製ストレスへの応答が低下していた。また、GFP-Slfn8 と GFP-Slfn9 も、レーザー照射部位への集積を観察することができた。そこで、ヒト SLFN11 ノックアウト細胞と、マウス Slfn8/9/10 ノックアウト細胞に、SLFN11,Slfn8,Slfn9 をそれぞれ導入し、複製ストレス感受性を調べたところ、いずれも同様に、感受性を相補していた。また、DNA ファイバー法では、複製フォーク分解が亢進することが観察された。これらの結果は、SLFN11 と Slfn8,Slfn9 が少なくとも検索した局面において同等の機能を発揮することを示している。また、Slfn8 と Slfn9 はそれぞれ単独で機能しうることが確認された。

ここまでの成果は、現在 2 つの論文原稿として投稿中である。

ヒト iPS 細胞において SLFN11 遺伝子のノックアウトに成功した。現在、その機能について、インビトロの造血分化系を用いて検討している。今後の目標は、ファンconi貧血患者由来の iPS 細胞を作成し、SLFN11 ノックアウトを加えて検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katsuki Yoko, Abe Masako, Park Seon Young, Wu Wenwen, Yabe Hiromasa, Yabe Miharuru, van Attikum Haico, Nakada Shinichiro, Ohta Tomohiko, Seidman Michael M., Kim Yonghwan, Takata Minoru	4. 巻 37
2. 論文標題 RNF168 E3 ligase participates in ubiquitin signaling and recruitment of SLX4 during DNA crosslink repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109879 ~ 109879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Xu Xinlin, Xu Yixi, Guo Ruiyuan, Xu Ran, Fu Congcong, Xing Mengtan, Sasanuma Hiroyuki, Li Qing, Takata Minoru, Takeda Shunichi, Guo Rong, Xu Dongyi	4. 巻 28
2. 論文標題 Fanconi anemia proteins participate in a break-induced-replication-like pathway to counter replication stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 487 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-021-00602-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mu Anfeng, Hira Asuka, Niwa Akira, Osawa Mitsujiro, Yoshida Kenichi, Mori Minako, Okamoto Yusuke, Inoue Kazuko, Kondo Keita, Kanemaki Masato T., Matsuda Tomonari, Ito Etsuro, Kojima Seiji, Nakahata Tatsutoshi, Ogawa Seishi, Tanaka Keigo, Matsuo Keitaro, Saito Megumu K., Takata Minoru	4. 巻 137
2. 論文標題 Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2021 ~ 2032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020009111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dingler FA†, Wang M†, Mu A† (Co-first), ...Takata M, Patel KJ.	4. 巻 80
2. 論文標題 Two aldehyde clearance systems are essential to prevent lethal formaldehyde accumulation in mice and humans.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell	6. 最初と最後の頁 996-1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.10.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okamoto Y, Abe M, Mu A, Tempaku Y, Rogers CB, Mochizuki AL, Katsuki Y, Kanemaki MT, Takaori-Kondo A, Sobeck AT, Bielinsky AK, Takata M.	4. 巻 137
2. 論文標題 SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 336-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019003782.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Anfeng Mu, Asuka Hira, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Minako Mori, Yusuke Okamoto, Megumu K. Saito, Minoru Takata.
2. 発表標題 Discovery of a novel FA-like disorder Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome caused by ADH5/ALDH2 mutations
3. 学会等名 2021Fanconi anemia Research Fund Scientific Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本裕介1,3、牟安峰 1,2、望月綾子 1,2、勝木陽子 1,2、高折晃史3、高田穰
2. 発表標題 SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells.
3. 学会等名 第16回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 穰1, Alvi Erin1, 小川 みのり1, 勝木 陽子1, 岡本 祐介1, Canela Andres1,2, 望月 綾子1, 牟 安峰
2. 発表標題 SLFN11とSLFNファミリー機能の統一的理解を目指して
3. 学会等名 2021年日本分子生物学会第44回年会 ワークショップ 「あなたの知らないSLFN11の世界」オーガナイザー: 村井 純子 (慶應義塾大学) 高田 穰 (京都大学) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牟安峰1, 平明日香1, 丹羽明2, 大澤光次郎2, 森美奈子1, 岡本裕介1, 齋藤潤2, 高田 穰
2. 発表標題 新規遺伝性骨髄不全症アルデヒド分解不全(ADD)症候群の発見：代謝異常によって引き起こされるゲノム不安定性
3. 学会等名 2021年日本分子生物学会第44回年会 ワークショップ「ゲノム安定性：その破綻を誘導する分子機構と破綻によりおこるゲノム異常」 オーガナイザー：中田 慎一郎(大阪大学)、廣田 耕志(東京都立大学)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minoru Takata
2. 発表標題 Responses to replication stress and human disease mechanisms
3. 学会等名 第12回未来先端研究機構 国際シンポジウム “Genome Action” (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Okamoto, Masako Abe, Mu Anfeng, Yasuko Tempaku, Colette B. Rogers, Ayako L. Mochizuki, Yoko Katsuki1, Masato T. Kanemaki, Akifumi Takaori-Kondo, Alex Sobock, Anja-Katrin Bielinsky, and Minoru Takata.
2. 発表標題 Loss of SLFN11 gene expression rescues the Fanconi anemia phenotype by stabilizing stalled replication forks.
3. 学会等名 Fanconi Anemia Research Fund Virtual Scientific Symposia (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RBC index http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牟 安峰 (Mu Anfeng) (20894455)	京都大学・生命科学研究科・特定助教 (14301)	
研究分担者	勝木 陽子 (Yoko Katsuki) (00645377)	京都大学・生命科学研究科・特定講師 (14301)	
研究分担者	望月 綾子 (Ayako Mochizuki) (80817148)	京都大学・生命科学研究科・研究員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関