

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21394

研究課題名（和文）エピジェネティックリプログラミングを支えるアルデヒド分解酵素のゲノム安定化機能

研究課題名（英文）Genome-stabilizing activity of aldehyde catalyzing enzymes that support epigenetic reprogramming

研究代表者

高田 穰（Takata, Minoru）

京都大学・生命科学研究科・特任教授

研究者番号：30281728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ホルムアルデヒドを分解する酵素群であるADH5/ALDH2が、エピゲノム再構築を支える必須メカニズムであることを検証することを試みた。我々が発見した新規遺伝病であるAldehyde Degradation Deficiency Syndrome (ADDS)患者由来のADH5/ALDH2酵素欠損線維芽細胞においてADH5を誘導性に発現させたところ、明瞭にiPS細胞へのリプログラミング効率を増大させた。しかし、ホルムアルデヒドの除去剤であるDimedone、ALDH2アゴニスト薬剤などの添加効果は少なく、ADH5の作用がホルムアルデヒド分解を解するものかどうか、さらに検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホルムアルデヒド分解酵素ADH5やALDH2は、小児の重篤な遺伝病で骨髄不全症候群であるファンconi貧血、さらに新規に見いだした類似の臨床所見を呈するADD症候群の、病態の根幹にあり、その疾患病態の解明と、新規治療法の開発に重要である。さらに、iPS細胞のリプログラミング効率化に役立つ可能性を秘めており、同細胞の臨床応用にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to verify that ADH5/ALDH2, a group of enzymes that degrade formaldehyde, is an essential mechanism underlying epigenome reconstruction. Inducible expression of ADH5 in ADH5/ALDH2 enzyme-deficient fibroblasts derived from patients with Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome (ADDS), a novel genetic disease we discovered, clearly increased reprogramming efficiency to iPS cells. However, the addition of formaldehyde scavengers such as Dimedone or ALDH2 agonist drugs had little effect. Therefore, further investigation is needed to determine whether the effect of ADH5 on epigenetic reprogramming is by resolving formaldehyde degradation or not.

研究分野：分子生物学、DNA損傷応答

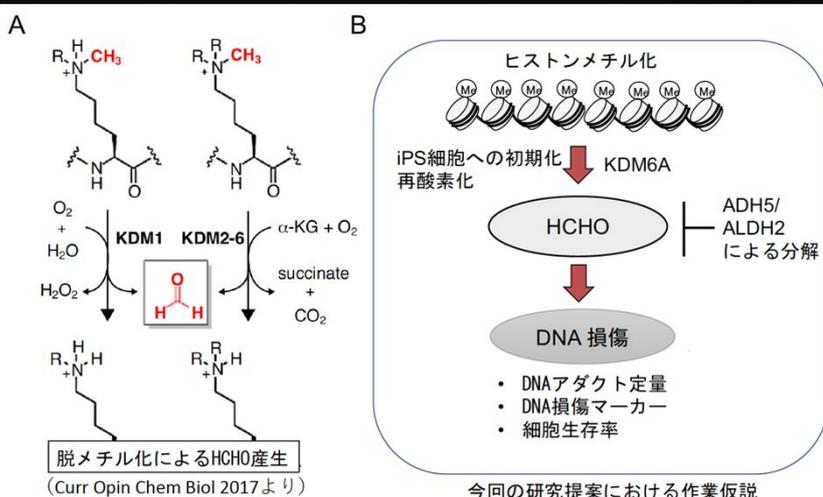
キーワード：DNA 損傷 ホルムアルデヒド エピジェネティック再構築 iPS 細胞 ADH5 ALDH2

1. 研究開始当初の背景

我々は、日本人小児の再生不良性貧血患者ゲノムサンプルの whole exome 解析を行い、ホルムアルデヒド分解酵素 ADH5 と、アセトアルデヒド分解酵素 ALDH2 の両者の複合型変異によって発症する新規の遺伝性骨髄不全症候群を同定した。この解析中に、患者リンパ球が PHA 刺激によって DNA 損傷（姉妹染色分体交換）を蓄積すること、iPS 細胞への初期化に抵抗すること、一旦作成した iPS 細胞は通常培養条件では正常に増殖するのにインビトロ造血分化誘導すると強く細胞増殖が抑制されることなどの知見を得た。これらの実験条件は、いずれもエピゲノム再構築を誘導すると考えられる。エピゲノム再構築がヒストン脱メチル化による内因性ホルムアルデヒド産生を伴い、ADH5/ALDH2 欠損状態ではホルムアルデヒドが分解できず DNA 損傷が蓄積すると仮定すると、これらの現象を説明できる。しかし、より直接的に、ヒストン脱メチル化と DNA 損傷蓄積の関係を検討できる系での検証が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

図 1： 脱メチル化によるHCHO産生とその解毒機構



生体内の発生・分化・強力な転写活性化など、細胞の運命決定のさまざまな場面で、ゲノムにクロマチン修飾・高次クロマチン構造のドラスティックな変化が生じる（これを epigenetic reprogramming、エピゲノム再構築と定義）。本研究では、エピゲノム再構築に伴うヒストン脱メチル化反応によるホルムアルデヒド (HCHO) 産生がゲノムを損傷すること、そして、HCHO を分解する酵素群である ADH5/ALDH2 による解毒作用がエピゲノム再構築を支える必須メカニズムであることを検証することを目的とした。HCHO は反応性が極めて高く、クロマチンや DNA の損傷をもたらす。ヒストン脱メチル化による HCHO 産生は、酵素学的には確立しているが（図 1 A）、細胞レベルでの影響は十分検証されていない。そこで、線維芽細胞からの iPS 細胞への初期化、細胞株における低酸素下から通常酸素濃度への再酸素化、の 2 つのエピゲノム再構築実験系においてヒストン脱メチル化酵素 KDM6A が大きな役割を果たすと報告されていることに着目し（図 1 B）、HCHO 産生 (KDM6A) と分解 (ADH5/ALDH2) に関わるこれら因子の発現・活性を人為的に操作し、DNA アダクトレベル、DNA 損傷レベル、iPS 初期化効率、細胞生存率などを検討することを目的とした（図 1 B）。

3. 研究の方法

本研究では、エピゲノム再構築に伴うヒストン脱メチル化反応によるホルムアルデヒド (HCHO) 産生がゲノムを損傷すること、そして、HCHO を分解する酵素群である ADH5/ALDH2 による解毒作用がエピゲノム再構築を支える必須メカニズムであることを、iPS 細胞初期化、細胞株における低酸素下からの再酸素化、の 2 つの実験系において検証する。

4. 研究成果

研究開始時、上記2つの方法を計画したが、後者は実験的に困難であることが判明した。そこで(1)に集中して検討を進めることにした。まず、我々が発見した患者由来のADH5/ALDH2欠損線維芽細胞AP39Pは、山中4因子を用いたリプログラミング効率が非常に低かった。この患者由来線維芽細胞に、ADH5をドキシサイクリン(DOX)誘導性に発現させたうえで、リプログラミングを試みたが、増殖効率が非常に悪く、明瞭な結果を得ることができなかった。そこで、すでにiPS細胞化した同じ患者由来のADH5/ALDH2欠損iPS細胞(AP39P-iPSC, Anfeng Mu et al. Blood 2021にて既報)に、DOX誘導性のADH5発現カセットをノックインしたものを用意し、インビトロで再度線維芽細胞に分化させた。この細胞の増殖を安定化するため、さらにTERTをステーブルに導入した。

この細胞では、山中4因子をトランジェントに導入して、リプログラミングが可能であることを確認した。この系において、DOXYCYCLINE添加は、明瞭にリプログラミング効率をおよそ20倍に増大させる結果を得た。この系で、様々な薬剤によるリプログラミング効率への影響を調べた。現在までに、以下の薬物の効果を検討している。

KDM 阻害剤：GSK-J1、GSK-J4、GSK-467

ホルムアルデヒドスカベンジャー：Dimedone、2-mercaptoethanol、GSH

JMJD阻害剤：IOX1

ALDH2活性化剤：C1、C2

LSD-1 阻害剤：RN-1

ADH5の活性化剤は、現状報告されていない。

今後の論文に障害となるため、実際のデータは記載せず、およその結果のみ、まとめて述べる。KDM阻害剤やLSD-1阻害剤は、iPSリプログラミング効率を様々な増加させることが確認された。一方、ホルムアルデヒドのスカベンジャーであるDimedoneのリプログラミング増強効果はあまりなく、ALDH2のアゴニスト薬剤C1の効果もわずかであった。

さらに、リプログラミング過程における培養上清中のホルムアルデヒドを測定したが、優位な上昇をいまのところ検出できていない。

これらの結果を素直に解釈すると、iPS化の過程で、ADH5/ALDH2は重要な役割を果たしていることは明らかである。また、ヒストンの脱メチル化を抑えることがiPS化を効率化させており、この点は従来報告と矛盾せず、脱メチル化の過程で産生されるホルムアルデヒドがiPS化を阻害する可能性と一致している。しかし、ADH5/ALDH2が果たす役割は、かならずしもホルムアルデヒド分解によるものではない可能性が考えられそうである。ADH5はS-Nitrosoglutathione Reductase(GSNOR)活性をもち、NOの分解にも関わることが知られている。今回の研究で確立した実験系を用いて、さらに研究継続の必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Mori Tomoharu, Takata Minoru et al. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Lack of impact of the ALDH2 rs671 variant on breast cancer development in Japanese BRCA1/2 mutation carriers | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Medicine | 6. 最初と最後の頁 6594 ~ 6602 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5430 | 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 - |
| 1. 著者名 Kanao Rie, Kawai Hidehiko, Taniguchi Toshiyasu, Takata Minoru, Masutani Chikahide | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 RFWD3 and translesion DNA polymerases contribute to PCNA modification-dependent DNA damage tolerance | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Life Science Alliance | 6. 最初と最後の頁 e202201584 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202201584 | 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 - |
| 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 A, 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 2020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.PMID: 32735670 | 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 Alvi Erin, Mochizuki Ayako L., Katsuki Yoko, Ogawa Minoru, Qi Fei, Okamoto Yusuke, Takata Minoru, Mu Anfeng | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Mouse Slfn8 and Slfn9 genes complement human cells lacking SLFN11 during the replication stress response | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 1038 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05406-9 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Mu Anfeng, Cao Zimu, Huang Denggao, Hosokawa Hiroshi, Maegawa Shingo, Takata Minoru | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Effects of the major formaldehyde catalyzer ADH5 on phenotypes of fanconi anemia zebrafish model | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Biology Reports | 6. 最初と最後の頁 8385 ~ 8395 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-023-08696-8 | 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 Mu Anfeng, Hira Asuka, Mori Minako, Okamoto Yusuke, Takata Minoru | 4. 巻 130 |
| 2. 論文標題 Fanconi anemia and Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome: Metabolism and DNA repair protect the genome and hematopoiesis from endogenous DNA damage | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 DNA Repair | 6. 最初と最後の頁 103546 ~ 103546 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2023.103546 | 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 Qi Fei, Alvi Erin, Ogawa Minori, Kobayashi Junya, Mu Anfeng, Takata Minoru | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 The ribonuclease domain function is dispensable for SLFN11 to mediate cell fate decision during replication stress response | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 663 ~ 673 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13056 | 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 Takata Minoru, Harada Hiroshi | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Meeting report: AT workshop 2023: A platform for discussing cutting edge science in DNA damage signaling, repair, and human disorders | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 642 ~ 645 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13054 | 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 - |

〔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 高田 穰 |
| 2. 発表標題 ファンconi貧血とアルデヒド代謝欠損症候群（ADDS）：DNA 修復とアルデヒド 代謝のゲノム安定性と造血における役割 |
| 3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 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 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 Sobeck, 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) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|