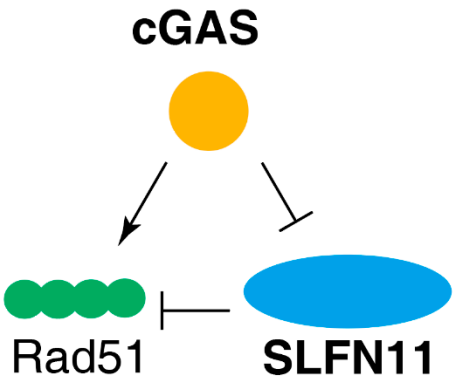
141　SLFN11とクロマチン制御因子の機能的相互作用解明	牟　安峰

【目的】SLFN11 は、DNA 損傷と複製ストレス応答への細胞運命決定因子であり、ウイルス感染に対する防護機能をもつ。一方、自然免疫における DNA センサーcGAS は、核内ではクロマチンに結合し、何らかのクロマチン制御を行っていることが想定される。我々は、SLFN11 が cGAS の mRNA 発現に寄与し、cGAS が SLFN11 の複製フォーク不安定化を抑制するなど、SLFN11 と cGAS の密接な機能的関連を見出した。本研究では、cGAS と SLFN11 の機能的相互作用のメカニズムを解析し、両者の生理的かつ本質的な分子機能解明を目的とする。

【方法】cGAS 遺伝子プロモーターを Luciferase につないだレポータを作製し、SLFN11 発現の cGAS プロモーター活性に及ぼす影響を確認した。SLFN11 欠損により cGAS 発現が消失したことが HAP1 細胞における特異的な現象の可能性があるため、両因子を発現している細胞株として、肺がん由来細胞株 A549 を用いて、SLFN11$^{-/-}$細胞を作製し cGAS の発現レベルを調べた。cGAS 発現ベクターやレンチウイルスを用意し、SLFN11$^{-/-}$HAP1 細胞に発現させた。また、cGAS$^{-/-}$HAP1 細胞を作製した。これにより、SLFN11 の DNA 複製フォーク保護因子への影響は直接か、cGAS を介する間接的なものかを検証した。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の検証をつづけた。

【結果】まず、HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞を親株にして、Tet-on システムによって SLFN11 を単独発現する細胞、cGAS 単独発現細胞、SLFN11 と cGAS 両方を発現する細胞を作製した。これらの細胞と、HAP1 野生型細胞と HAP-SLFN11$^{-/-}$細胞を用いた Hydroxyurea（HU）感受性試験では、SLFN11$^{-/-}$細胞に SLFN11 や cGAS を発現させた細胞において高い HU 感受性が見られ、SLFN11 と cGAS 両者を発現させると野生型と同等の感受性を戻すことができた。DNA ファイバーアッセイでは、SLFN11$^{-/-}$細胞において SLFN11 を単独発現させると複製フォーク分解が起こり、cGAS 単独発現細胞でも軽度にフォーク分解が促進された。しかし、SLFN11 と cGAS の両方の発現細胞では、SLFN11 による複製フォーク分解が cGAS 発現によってキャンセルされていた。これらの結果から、cGAS は単独では複製フォーク分解を促進し、かつ SLFN11 による複製フォーク分解を阻害することが示唆される。一方、複製フォーク安定性と薬剤感受性が完全には相関しないという矛盾が生じた。cGAS の単独発現細胞における薬剤感受性の結果は今後のさらなる検討が必要である。本研究の結果は cGAS が何らかのメカニズムによって SLFN11 による複製フォーク分解に抑制的に働くという関連性を明らかにした。

複製フォーク保護因子をめぐる SLFN11 と cGAS の機能的相互作用



141. SLFN11 とクロマチン制御因子の機能的相互作用解明

牟　安峰

京都大学 大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター

Key words：SLFN11，cGAS，複製ストレス，ゲノム不安定性

緒　言

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［1］。SLFN11 は、発がんプロセスの複製ストレスに応答して細胞死をもたらすが、がん細胞において発現はしばしば失われ、細胞は抗がん剤耐性となるなどがん抑制遺伝子的な挙動を示す。汎用される細胞株の多くで SLFN11 発現は失われており、その機能は従来詳細な解析を免れてきた。SLFN11 の DNA 損傷応答機能を探る基礎研究においては、主な知見として、Jun Huang らの中国からの論文と［2］、米国 NIH の Pommier 研からのものがある［3］。これらの論文は SLFN11 の機能について価値の高い情報を提供しているが、SLFN11 機能の統合的かつ本質的な理解にはまだ及んでいない。

我々は、SLFN11 の造血系における高発現に着目し、DNA 損傷修復欠損病態であるファンコニ貧血（FA）において、SLFN11 が停止複製フォークの分解を促進して、病態悪化因子として機能することを報告した［4］。同様の機能は、野生型の細胞においても認められ、SLFN11 が DNA 損傷と複製ストレスに応答して、複製フォークを不安定化することを示している。SLFN ファミリーは、Interferon 添加で発現増大する interferon stimulated gene（ISG）であり、特定の tRNA を分解することでウイルスタンパク質の翻訳を阻害し免疫効果を発揮する自然免疫因子とも報告されている［5］。

一方、細胞質 DNA センサーである cGAS（cyclic GMP-AMP synthase）も ISG であり、cGAS を介した自然免疫応答は生体防御機構において重要な役割を果たしている。がん、ウイルス感染や自己免疫疾患との関与が多数報告されている。cGAS は核内にも存在し、近年、CryoEM による構造解析によってヒストンに会合して DNA 結合による活性化が抑制されることが解明された（論文多数）。cGAS はあらたなクロマチン因子であり、相同組換えや DNA 複製に影響することが示唆されている。

我々はヒト白血病由来細胞株 HAP1 における SLFN11$^{-/-}$細胞と野生型の細胞の RNA−seq 解析を行い、SLFN11 の転写調節ターゲット候補として、*cGAS* 遺伝子を同定した。SLFN11 は、cGAS 等の発現制御を行うことで、自然免疫分子の発現制御因子として重要な機能を果たしている可能性が浮上した。SLFN11 と cGAS の相互作用メカニズムやその生物学的意義についての研究が期待される。

本研究では、複製ストレス応答における SLFN11 と cGAS の関連性の解析を目的とした。そして、cGAS は細胞の薬剤感受性を高める一方、SLFN11 による複製フォーク分解には抑制的に働くことが分かった。さらに、複製フォーク分解と薬剤感受性が必ずしも一致しないのではないかという問題を新たに提起する結果となった。また、SLFN11 の機能解析及びマウスにおけるヒトの SLFN11 のホモログを同定し、論文を発表した［6，7］。

方　法

1. SLFN11 による cGAS 転写制御機構の解明

cGAS 遺伝子プロモーターを Luciferase につないだレポータを作製し、SLFN11 発現の cGAS プロモーター活性に及ぼす影響を検討した。SLFN11 を、TY1（tag）をノックインし、anti-TY1 により ChIP-seq を実行した。

2. 複数の細胞株における SLFN11$^{-/-}$株の作製と cGAS 発現の検討

SLFN11 欠損により cGAS 発現が消失したことが HAP1 細胞における特異的な現象の可能性があるため、両因子を発現している細胞株として、肺がん由来細胞株 A549 を用いて、SLFN11$^{-/-}$細胞を作製し cGAS の発現レベルを調べた。

3. SLFN11$^{-/-}$細胞における cGAS の戻し発現と cGAS$^{-/-}$細胞作製による解析

cGAS 発現ベクターやレンチウイルスを用意し、SLFN11$^{-/-}$HAP1 細胞に発現させた。また、cGAS$^{-/-}$HAP1 細胞を作製した。これにより、SLFN11 の DNA 複製フォーク保護因子への影響は直接か、cGAS を介する間接的なものか DNA ファイバーアッセイを用いて検証した。

4. SLFN11 と cGAS の DNA 損傷部位集積解析によるその相互作用解明

cGAS は DNA 損傷部位に集積することが知られている。405 nm の紫外線レーザーを備えたコンフォーカル顕微鏡によって、SLFN11 が DNA 損傷に迅速に集積することを検出した。この系を用いて、cGAS と SLFN11 集積に、互いの発現が与える影響の検出を続けた。cGAS のクロマチン結合変異体や、DNA 結合変異体の影響の検討を続けた。

5. 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検証

正常人由来 iPS 細胞を用いて、SLFN11$^{-/-}$、cGAS$^{-/-}$、SLFN11$^{-/-}$cGAS$^{-/-}$のノックアウト細胞株を作製した。これらの細胞を用いて、造血分化への影響の検討を続けた。

結果および考察

1. cGAS は SLFN11 ノックアウト細胞において発現が低下する

所属研究室からの先行研究では、SLFN11 が FA 細胞において複製フォーク分解の促進によりゲノム不安定性を高め、DNA 損傷の増悪に関与していることが明らかとなった。SLFN11 が複製フォーク分解を促すメカニズムとして、SLFN11 による停止フォークへの RAD51 のリクルート低下を検出しており、RAD51 のフォーク保護効果の低下による効果の可能性を提案した [4]。しかし、その分子メカニズムの詳細の解明には至っていない。SLFN11 による複製フォーク分解は、SLFN11 が複製フォークに直接作用しているのか、あるいは SLFN11 が他の因子と相互作用して複製フォーク分解を促進しているのかといった点は明らかになっていない。

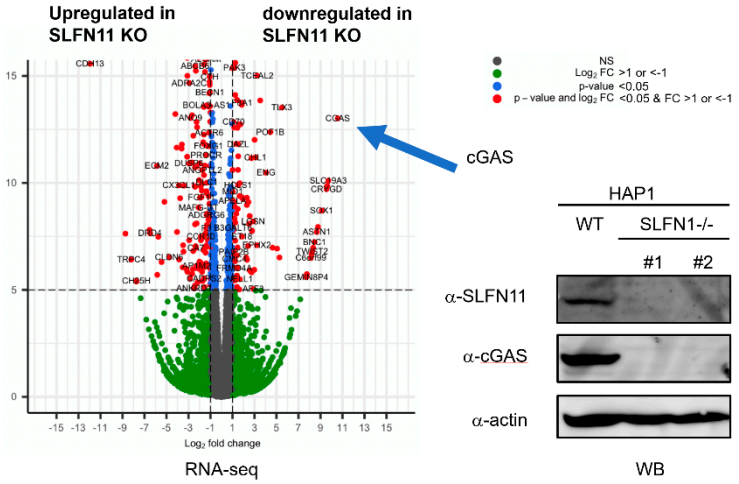


図 1. HAP1 細胞 SLFN11$^{-/-}$における RNA-seq 解析

RNA-seq 解析により cGAS を同定した。また、ウェスタンブロッティングにより SLFN11 と cGAS の発現量を確認した。

SLFN11$^{-/-}$細胞の特徴を解明するため、HAP1 野生型細胞と HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞から、RNA シークエンス解析が行われた（図 1）。そこで、SLFN11$^{-/-}$細胞において発現が低下するいくつかの遺伝子が得られ、その一つとして cyclic GMP-AMP synthase（cGAS）が同定された。また、ウェスタンブロットによって、SLFN11$^{-/-}$細胞における cGAS タンパク質発現の低下が確認された（図 1）。cGAS は dsDNA センサーとして作用し、主に免疫に関与する因子として知られている。一方で、近年では核内で DNA ストレス応答に影響しているという報告がされている。そのため、本研究において、SLFN11 と相互作用して複製フォーク分解を促進させる因子であると仮定し、SLFN11 との関連性を分析することとした。

2. SLFN11 が cGAS 転写に及ぼす影響の検討

SLFN11 は C 末側のドメインに Walker A と Walker B モチーフと呼ばれる、ATPase 活性を持つ領域が含まれている。これは、SLFN11 が RNA/DNA ヘリカーゼ活性によって、クロマチンリモデリングに作用することが示唆されている。そこで、SLFN11 が cGAS の転写活性化因子としての働きを持つ可能性があると仮定し、研究を開始した。この仮説を検証するため、cGAS のプロモーター領域をルシフェラーゼの上流に接続してプラスミドを構築し、レポーターアッセイを実施した。

293T 細胞では SLFN11 の発現が消失しているため、SLFN11 発現するプラスミドを同時にトランスフェクションした。また、SLFN11$^{-/-}$HAP1 細胞においてドキシサイクリン誘導的に SLFN11 を発現する HAP1-SLFN11$^{-/-}$-SLFN11GFP を用意した。これにより、内因性と外因性の SLFN11 によるルシフェラーゼ発現への影響を検討した。HAP1-WT では、cGAS プロモーター付きルシフェラーゼプラスミドを導入した細胞では、穏やかではあるがルシフェラーゼ発光が観察された（図 2a）。しかし、293T 細胞と HAP1-SLFN11$^{-/-}$-SLFN11GFP においても、ルシフェラーゼの発光量は SLFN11 の有無によって有意な変化は見られなかった（図 2b）。したがって、今回の結果からはプロモーターの発現の有無によって、cGAS プロモーターがドライブする GAS 転写が大きな影響を受けておらず、SLFN11 が cGAS mRNA の転写因子として作用しているとは考えにくいと結論される。

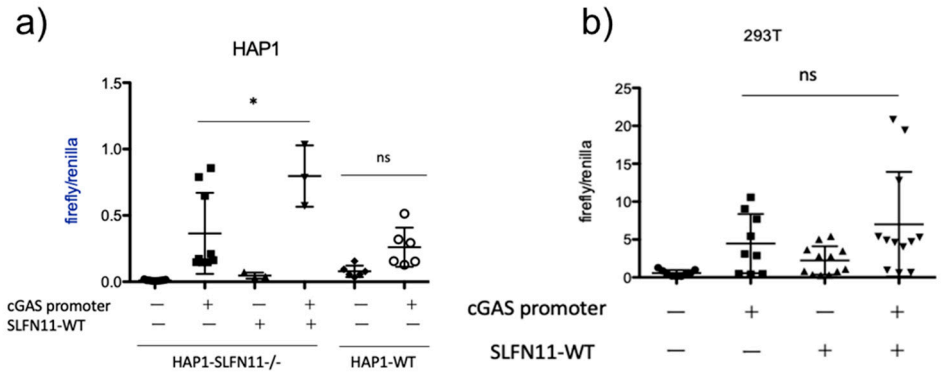


図 2. cGAS レポーターアッセイの結果

a） HAP1-WT 細胞と HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞を使用した。HAP1-SLFN11$^{-/-}$では、SLFN11-WT を発現するプラスミドの有無によるルシフェラーゼ発光強度を比較した。

b） cGAS プロモーター配列を持つ、あるいは持たないプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、SLFN11 の有無によるルシフェラーゼの発光への影響を測定した。

*****$p < 0.05$、ns=not significant（P-value の算出には one-way ANOVA pair-wise comparison を用いた）。

3. SLFN11 は cGAS と相加的に Hydroxyurea（HU）感受性を増大させる

先行研究において、HAP1 野生型と比較して SLFN11$^{-/-}$細胞では HU やシスプラチン（CDDP）などによる DNA 損傷や複製ストレスに対する細胞の生存率が高まることが明らかになった［4］。そこで、DNA 損傷薬剤に対する

感受性において、SLFN11 と cGAS が与える影響について調べるため、HU 感受性アッセイを行った。HAP1-WT、HAP1-SLFN11$^{-/-}$+SLFN11-GFP、HAP1-SLFN11$^{-/-}$＋cGAS-Flag、HAP1-SLFN11$^{-/-}$＋SLFN11-GFP/cGAS-Flag 細胞を doxycycline（DOX）存在あるいは非存在下で 24 時間培養後、HU を加えて 72 時間複製ストレスを与えた。その後、生細胞を Cell Count Reagent（nacalai tesque）を用いて測定した。HU を加えていない（0μM）における生存率を 100%として細胞生存率をグラフに表した（図 3）。

先行研究で示されたように、SLFN11$^{-/-}$細胞では、野生型と比較して HU 処理後の細胞の生存率が高いことが確認された。また、HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞において、SLFN11 を単独で補完すると生存率が低下し、先行研究と同様な結果が得られた。さらに、cGAS を単独発現させた細胞でも、SLFN11 の単独発現細胞と同様な HU 感受性の増大が確認された。この結果から、複製ストレス下において、SLFN11 と cGAS はそれぞれ独立して細胞生存率を低下させていると考えられる。一方で、HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞に SLFN11 と cGAS を両方過剰発現させた細胞では、SLFN11$^{-/-}$細胞にそれらの因子を単独で発現させた細胞と比較して生存率がさらに低下した。つまり、SLFN11 と cGAS が相加的に働き、DNA 損傷に対する感受性を高めていると考えられる。したがって、SLFN11 と cGAS は細胞の複製ストレスに応答して独立した影響を与えているが、それぞれの単独発現と比較して両方が発現しているときは複製ストレス感受性をより高めていることを示唆している。また、この知見は、SLFN11$^{-/-}$細胞の HU 感受性を SLFN11 単独では部分的にしか相補できないのは、cGAS の発現が戻っていないためであることを示唆している。

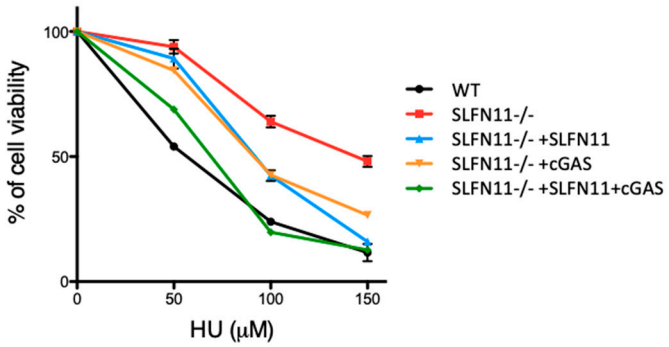


図 3. 1HAP1 細胞における HU 感受性アッセイの結果
HU を、0、50、100、150μM 加え、非添加時に比しての生細胞数の%をグラフに表した。

4. SLFN11 は停止複製フォーク分解を促進し cGAS は保護する

HU 処理によって複製停止と、RAD51、BRCA1、BRCA2、FANCD2 などが停止した複製フォークに集積し、DNA2 や MRE11 などのヌクレアーゼから複製フォークが分解されることを防ぐ働きをしている。停止複製フォークの保護は、ゲノムの安定化と細胞の抗がん剤耐性化の原因となるとされている。先行研究から、HAP1-FANCD2$^{-/-}$細胞において観察される複製フォークの過剰分解は、SLFN11 をノックアウトすることにより解除されることが明らかになった。さらに、DNA2 ノックダウンや MRE11 インヒビターの添加によって、SLFN11 を発現している HAP1-FANCD2$^{-/-}$細胞でも複製フォークの短縮が起こらなくなることが示された [4]。これらのことから、SLFN11 は DNA2 や MRE11 などのヌクレアーゼ依存的に複製フォークの分解を促進し、細胞の HU 感受性に寄与していることが分かった。そこで、SLFN11 による複製フォーク分解における cGAS の影響を調べるため、DNA ファイバーアッセイを行い、複製フォークダイナミクスを観察した。HAP1-WT、HAP1-SLFN11$^{-/-}$、HAP1-SLFN11$^{-/-}$+SLFN11-GFP、HAP1-SLFN11$^{-/-}$+cGAS-Flag、HAP1-SLFN11$^{-/-}$+SLFN11-GFP/cGAS-Flag の 5 種類の細胞を用意した。IdU、CldU でそれぞれ 30 分間新生鎖 DNA をラベリングし、続けて 5 時間の HU 処理によって複製ストレスを与えた（図 4）。HU 処理によって起こる複製フォーク分解の程度を、CldU にラベルされた DNA の長さが短縮することによって測定できる。

野生型と比較して、SLFN11$^{-/-}$細胞ではHU処理後のCldUファイバーの短縮は見られなかった。さらに、SLFN11$^{-/-}$細胞にDOXを添加してSLFN11を単独発現させると、CldUファイバーの長さは著明に短くなった（図4）。これらの結果は、SLFN11をノックアウトすると複製フォーク分解が抑制されるが、DOX誘導的にSLFN11を発現させることで再び複製フォーク分解が起こったことを示唆しており、先行研究と同様な結果が得られた。

さらに、HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞にcGASを単独発現させた細胞では、SLFN11$^{-/-}$細胞と比較してCldUファイバーが短縮した（図4）。しかし、これはSLFN11$^{-/-}$にSLFN11単独発現細胞と比較するとCldUファイバーの短縮は軽度であった。さらに、HAP1-SLFN11$^{-/-}$細胞にSLFN11とcGASを両方発現させた場合も同様に、WTと比較してCldUの短縮が起こるものの、SLFN11単独発現細胞と比較すると短縮は抑えられていることが分かった。この結果は、cGASは複製フォーク分解を促進する作用を持つ一方で、SLFN11によるフォーク分解には抑制的な働きをすることを示唆している。

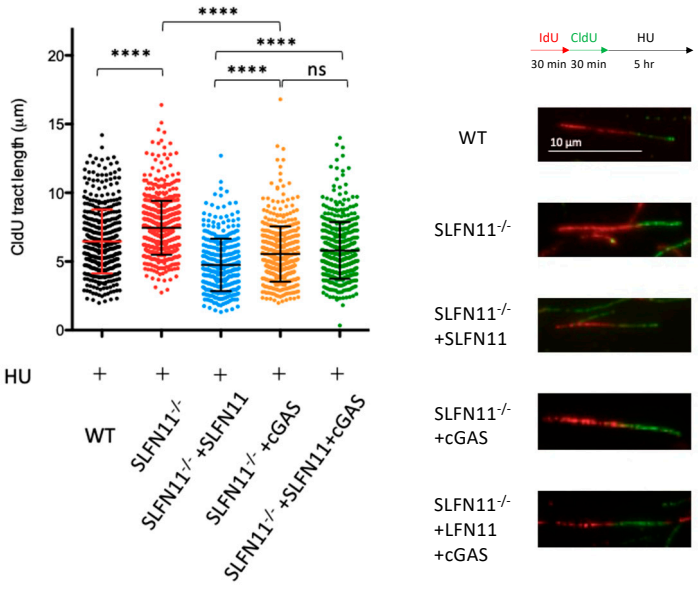


図4. DNAファイバーアッセイによるCldUファイバーの長さの比較

全てのサンプルで、300以上のDNAファイバーをカウントしている。P-valueの算出にはone-way ANOVA pair-wise comparisonを用いた。観察者バイアスを低減するため、DNAファイバーの計測はブラインドで行った。****$P<0.001$、ns=not significant。

謝　辞

本研究は、京都大学大学院生命研究科附属放射線生物研究センター髙田穣教授、安原崇哲教授、ならびに実験を担当して頂いた方々の協力によって得られたものであり、感謝申し上げる。pXL330-cGAS_FLプラスミドをご供与いただいたロックフェラー大学の船引宏則教授、東京大学の胡桃坂仁志教授に謹んで御礼申し上げる。

文 献

1) Gabriele Zoppoli, Marie Regairaz, Elisabetta Leo, William C Reinhold, Sudhir Varma, Alberto Ballestrero, James H Doroshow, Yves Pommier. Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. Proc Natl Acad Sci. 2012 Sep 11;109(37):15030-5. PMID: 22927417 doi: 10.1073/pnas.1205943109.

2) Yanhua Mu, Jiangman Lou, Mrinal Srivastava, Bin Zhao, Xin-hua Feng , Ting Liu, Junjie Chen, Jun Huang. SLFN11 inhibits checkpoint maintenance and homologous recombination repair. EMBO Rep. 2016 Jan;17(1):94-109. PMID: 26658330 doi: 10.15252/embr.201540964.

3) Junko Murai, Sai-Wen Tang, Elisabetta Leo , Simone A Baechler, Christophe E Redon, Hongliang Zhang, Muthana Al Abo, Vinodh N Rajapakse, Eijiro Nakamura, Lisa M Miller Jenkins, Mirit I Aladjem, Yves Pommier. SLFN11 Blocks Stressed Replication Forks Independently of ATR. Mol Cell. 2018 Feb 1;69(3):371-384.e6. PMID: 29395061 doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.012.

4) Yusuke Okamoto, Masako Abe, Anfeng Mu, Yasuko Tempaku, Colette B Rogers, Ayako L Mochizuki, Yoko Katsuki, Masato T Kanemaki, Akifumi Takaori-Kondo, Alexandra Sobeck, Anja-Katrin Bielinsky, Minoru Takata. SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells. Blood. 2021 Jan 21;137(3):336-348. PMID: 32735670 doi: 10.1182/blood.2019003782.

5) Manqing Li, Elaine Kao, Xia Gao, Hilary Sandig, Kirsten Limmer, Mariana Pavon-Eternod, Thomas E Jones, Sebastien Landry, Tao Pan, Matthew D Weitzman, Michael David. Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11. Nature. 2012 Nov 1;491(7422):125-8. PMID: 23000900 doi: 10.1038/nature11433. Epub 2012 Sep 23.

6) Fei Qi, Erin Alvi, Minori Ogawa, Junya Kobayashi, Anfeng Mu, Minoru Takata. The ribonuclease domain function is dispensable for SLFN11 to mediate cell fate decision during replication stress response. Genes Cells. 2023 Sep;28(9):663-673. PMID: 37469008 doi: 10.1111/gtc.13056. Epub 2023 Jul 19.

7) Erin Alvi, Ayako L Mochizuki, Yoko Katsuki, Minori Ogawa, Fei Qi, Yusuke Okamoto, Minoru Takata, Anfeng Mu. Mouse Slfn8 and Slfn9 genes complement human cells lacking SLFN11 during the replication stress response. Commun Biol. 2023 Oct 13;6(1):1038. PMID: 37833372 doi: 10.1038/s42003-023-05406-9.