

研究題目 SLFN11 の機能の独自性を生み出す分子機構の解明

研究組織

研究代表者：村井純子（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：藤原昂平（慶應義塾大学大学院薬学研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

SLFN11 は幅広い DNA 障害型抗がん剤に対する感受性を増強するタンパク質であることから、精密医療の有望な標的である。ヒトの5つのSLFNファミリータンパクのうち、SLFN11 のみが複製ストレスに応じてクロマチン上でDNA複製を阻害し、細胞死を亢進させることが分かっている。一方で、その詳細な分子機構は未だ不明である。そこで申請者はSLFN11 と76%のアミノ酸相同性を持ちながら、上記の機能を持たないSLFN13 をSLFN11 との比較対象として用い、機能発揮に重要なアミノ酸ドメインを探索した。

申請者はこれまでにSLFN11 に存在するssDNA結合サイト(K652)とリン酸化サイト(S753)がSLFN13 に保存されていないことを見つけ、変異体を用いた生化学的な検証から、K652、S753の両方がSLFN11 の機能発揮に必須であることを見出した。特にSLFN11 のS753をリン酸化ミミックさせた変異体であるSLFN11^{S753D}を発現させた細胞では、SLFN11 のクロマチンリクルートが確認されず、表現型が認められなかったことから、SLFN11 の局在変化および機能発揮にはS753の脱リン酸化が必要であることが考えられた。また、結合モチーフ配列の探索によりS753の脱リン酸化を担う脱リン酸化酵素の候補としてPP2Aを新たに見出し、PP2Aの相互作用の有無がSLFN11 とSLFN13 の機能性の違いを示唆する根拠となりうることを示した(Fujiwara et al., iScience. 2023)。

一方で、以上の結果はいずれもアミノ酸点変異による機能解析をもとにしていて実際にS753のリン酸化状態をモニタリングしているわけではない。従って今後は、実際にSLFN11 のS753のリン酸化状態を確認すること、SLFN11 とPP2Aとの相互作用を確認した上で、

PP2AがS753の脱リン酸化に実際に寄与しているのかを証明する必要がある。

[1-2]研究の方法・経過

SLFN11 野生型、SLFN13 にDNA結合サイトK652 とリン酸化サイトS753 を置換導入したSLFN13^{E652K/P753S}、SLFN11 のPP2A結合モチーフに変異を入れたSLFN11^{L358A/L361A/E363D}を発現する細胞に対して複製ストレスを惹起するカンプトテシン(CPT)の有無でリン酸化プロテオミクスを行い、S753のリン酸化状態の確認及びその他のリン酸化部位の検出を行う。現在はリン酸化プロテオミクスで検出するためのサンプル調製の条件検討中である。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

2023年度は、実際にSLFN11のリン酸化部位の検出をリン酸化プロテオミクスで行った。予想外なことに、CPT投与前後において、S753やそれ以外の過去に報告のあった部位のリン酸化のほとんどは検出されなかった。唯一S180のリン酸化は検出されたが、これはCPT投与後にシグナルが増強していた。この結果を受けて、S180のリン酸化サイトの変異SLFN11を作製したものの、SLFN11のもつ薬剤感受性の増強作用や複製停止機能への影響は全く認められなかった。また、SLFN13のリン酸化サイトとしてS170が検出された。このSLFN13のS170はSLFN11のアミノ酸配列には保存されておらず、他のSLFNファミリータンパク質にも保存されていなかった。従ってSLFN13のみが有しているリン酸化サイトである。しかし、S170はCPT投与後前後でシグナルに変化はなかった。

このリン酸化プロテオミクスによってSLFN11と相互作用するタンパク質が複数検出

された。その中には PP2A のサブユニットである PPP2R1A、PPP2R2A、PPP2CB が検出されていて、SLFN11 の脱リン酸化に PP2A が関与している可能性がこの結果からも考えられる。一方で、これらのサブユニットの相互作用シグナルは SLFN11 と SLFN13^{E652K/P753S}、SLFN11^{L358A/L361A/E363D} の間で大きな差は認められなかった。前述の論文で相互作用を確認した PP2A のサブユニット B56 γ (PPP2R5C) は今回のプロテオミクスでは検出されなかったが、存在量が少ないからだと思われる。今後はサンプル調製の条件検討を行い、最適な条件下での相互作用タンパク質の検出を試みる。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

SLFN11 は DNA 障害型抗がん剤の薬効予測バイオマーカーとして注目され、臨床レベルでの有用性を示す論文が続々と報告されている。これまで、DNA 障害型抗がん剤の感受性を高めるために SLFN11 の発現を増加させる薬剤のスクリーニングが行われてきた。一方で、本研究によって得られる結果は SLFN11 の活性化がリン酸化状態のスイッチングによって行われることを示す。また、本研究の成果により、SLFN11 の活性化に関与するリン酸化サイトの検出系が確立され、リン酸化に関与するキナーゼやホスファターゼの同定が期待される。同定されたリン酸化に関わる酵素に介入することで、SLFN11 のリン酸化状態を制御し、DNA 障害型抗がん剤の感受性を向上させる新たな可能性を示すことができると考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表
なし

[3-2] 学会発表
なし

[3-3] 成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

これまでの実験では SLFN11 のリン酸化が十

分に検出できなかった。SLFN11 の S753 のリン酸化が薬剤感受性のスイッチング機能を持つことには、細胞実験の結果から確信を持っており、なぜ S753 のリン酸化が検出されなかったかについては、いくつかの仮説を立てている。その一つとして、SLFN11 が機能を発揮するクロマチン周囲のミクロな環境においてのみスイッチングが生じている可能性を考えている。

現在、SLFN11 のリン酸化状態が維持できる条件を検討しており、核画分のみを濃縮させたときに、リン酸化 SLFN11 がより強く検出されることをウェスタンブロッティングで見出している。2024 年度は、このサンプル条件で、再度リン酸化プロテオミクスを行い、リン酸化部位の検出を試みることを考えている。

また、今回のリン酸化プロテオミクスにおいて、SLFN11 と相互作用するタンパク質が複数検出され、その中に PP2A のサブユニットも含まれていた。その他にもキナーゼも複数検出されており、SLFN11 のリン酸化に関与する可能性を考えている。今後は上記の条件でスイッチングの生じている SLFN11 を濃縮してプロテオミクスを行うことで、より SLFN11 の機能に関与する相互作用タンパク質を精度よく検出することができると期待している。