

ヒト SLFN11 との 類似配列からみる チンパンジーSLFN13 の 機能解明

氏名 神野真帆 番号 52 番

所属研究室 分子遺伝学講座

指導教員 村井純子教授、田手壮太助教、鎌田諒助教

謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、
村井純子教授、田手壮太助教、鎌田諒助教に感謝申し上げます。

要約

現在、ヒト SLFN11 の mRNA 発現量が、多くの DNA 障害型抗がん剤に対する薬剤感受性ときわめて強く相関を示し、その特徴においてヒト SLFN11 遺伝子のアミノ酸配列の K652 であることが重要だということがわかっている。本実験では、ヒト SLFN11 と類似配列を持つチンパンジー-SLFN13 が、ヒト SLFN11 と同様の機能、すなわち薬剤感受性があるかを調べるため、チンパンジー-SLFN13 を含むベクターを作成し、ヒト細胞 K562 に導入後、チンパンジー-SLFN13 による薬剤感受性を検討した。HCT116 と MCF 7 細胞でも同様の検討を行った。結果、K562 細胞では、チンパンジー-SLFN13 を過剰発現させた細胞は、DNA 障害型抗がん剤であるカンプトテシンに対して薬剤感受性を示した。一方で、MCF 7 細胞は過剰発現細胞株が樹立できず、HCT116 細胞では極めて弱く発現する細胞株を得たものの、コントロール細胞に比べて薬剤感受性に変化がなかった。このことから、チンパンジー-SLFN13 にはヒト SLFN11 と類似する機能があることがわかった。

諸言

SLFN11 の重要性は、米国国立がん研究所 (National Cancer Institute : NCI) が主導した NCI-60 プロジェクトにおける網羅的薬剤感受性解析によって、2012 年に初めて報告された。NCI-60 とは、60 種類のヒトがん細胞株に対して 2 万種類を超える化合物の薬剤感受性を評価し、それらを遺伝子発現プロファイルと統合的に解析した大規模がん細胞データベースである¹⁾。この解析により、SLFN11 の mRNA 発現量が、多くの DNA 障害型抗がん剤に対する感受性ときわめて強く相関することが明らかとなった²⁾。その後の研究において、SLFN11 と類似配列を持つ通常のヒト SLFN13(E652)は薬剤感受性が低い、DNA 結合部位 (E652K) を持つヒト SLFN13 は、ヒト SLFN11 を機能的に模倣することからヒト SLFN11 の薬剤感受性には K652 を持つことが重要であることがわかった³⁾。しかし、SLFN13 において E652 を持つのはヒトのみであり、他動物は K652 を持つ。SLFN ファミリーは真獣類以降で顕著に拡大しており、ヒトには 6 種類 (SLFN5、11、12、12L、13、14) が存在し、霊長類間での保存性は高い^{4, 5)}。ヒト SLFN11 と類似配列を持ち、DNA 結合部位(K652)を持つチンパンジー-SLFN13 がヒト SLFN11 と同様の機能 (薬剤感受性) を持っている可能性が示唆される。これを調査することは、ヒト特有の SLFN の進化原因やヒト SLFN13 が E を獲得して得たかっものを知る足がかりになると考えられる。

表 1：ヒト SLFN11、13、チンパンジー-SLFN13 のアミノ酸配列

	E209	E214	K216	S219	T230	Y234	D252	K605	D668	E669	R82	K591	Y722	K652	S753
	■	■	■	▲	▲	■	■	★	◆	◆	●	●	●	★	▲
SLFN11 human	E	E	K	S	T	Y	D	K	D	E	R	K	Y	K	S
SLFN13 human	E	E	K	S	I	Y	D	K	D	E	R	K	Y	E	P
SLFN13 chimpanzee	E	E	K	S	I	Y	D	K	D	E	R	K	Y	K	P

材料と方法

1. インサートの作成

Prime Star Max 10ul、 forward primer (10 uM) 0.4ul、reverse primer (10 uM) 0.4ul、 鋳型 DNA(1 ng/ul) 1ul、 dH₂O 8.2ul 20ul を混合し、PCR により DNA を複製した。PCR cycle は以下の通りである。

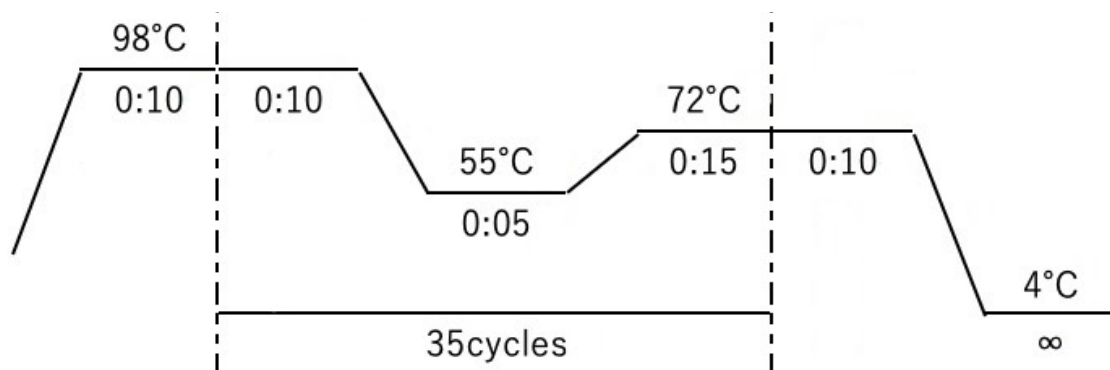


図 1:インサート作成時の PCR cycle

その後、SLFN が PCR で増幅されていることを確認するため、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa)を使用して電気泳動を行なった。

Agarose gel 100mg あたり NT1 を 200uL 加え、50°Cで 5-10min インキュベートし、gel を溶解させた。Spin column を Collection tube にセットし、溶液をデカントで移した。その後、遠心(11000 g, RT, 1min)し、濾液を捨てた。NT3 を 650uL 加え、遠心(11000 g, RT, 1min)し、濾液を捨てた。この操作を 2 回繰り返した後、Spin column を遠心(11000 g, RT, 1min)し、メンブレンを乾燥させた。Spin column を 1.5mL tube にセットし、NE を 30uL 加え、RT で 1min incubate し、遠心(11000 g, RT, 1min)した。

2. In-fusion

pPCIP (1 ug/uL) 1 uL、NotI-HF1 uL、rCutSmart (10x) 5 uL、dH₂O 43 uL を混合し、37°C 15min でベクターを切り、65 °C 20 min で制限酵素不活化した。その後、制限酵素処理前と後のそれぞれのベクターを用いて電気泳動を行い、制限酵素が処理できているかを確認した。使用した pPCIP を図 2 に示す。

その後、nanodrop を用いて、PCR fragment の濃度を測定 SLFN13 – 27.4 ng/uL 5x In-Fusion Snap Assembly Master Mix 2 μL、Linearized vector 2uL、Purified PCR fragment 2 μL、dH₂O 4uL を混合し、50 °C、15 min で In-Fusion した。

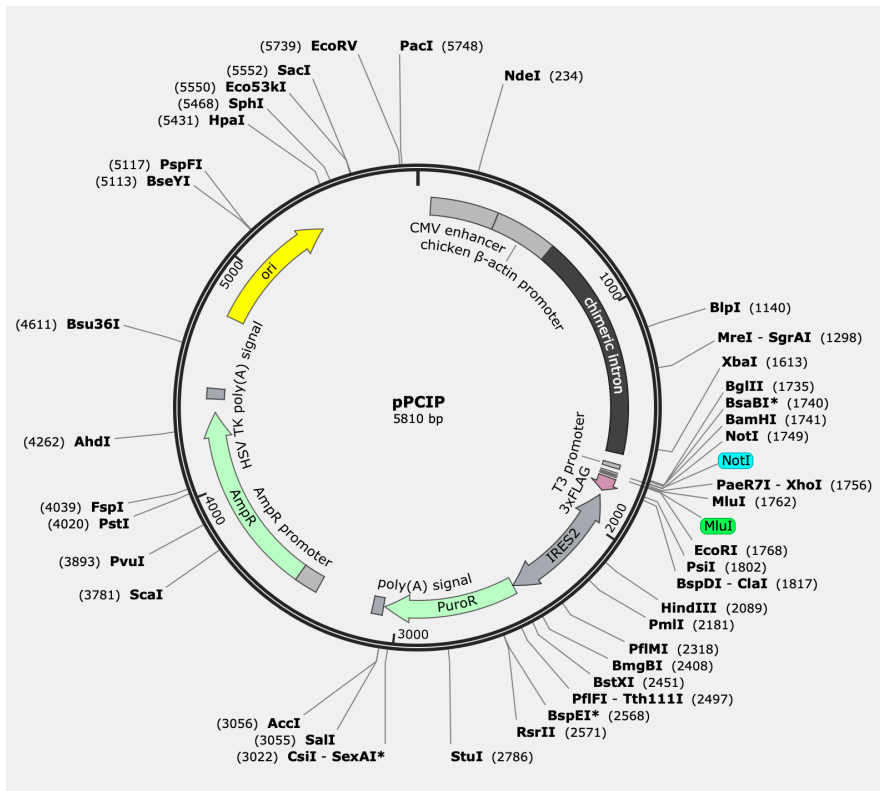


図 2：使用した pPCIP

3.transformation

−80℃で保存していた大腸菌を氷上で解凍した。解凍後、大腸菌懸濁液 50 μl にプラスミド DNA 1 μl を添加し、氷上で静置することで、プラスミドを細胞膜表面に結合させた。次に、42℃で 40 秒間ヒートショックを行うことでプラスミド DNA を細胞内へ導入した。その後、培地を 1 ml 加えて 1 時間振とう培養し、細胞内で β-ラクタマーゼ) を増殖させた。

培養後、細胞を寒天培地上に播種し、1 日培養することで形質転換体のコロニーを形成させた。その後、得られたコロニーは、冷凍保管した。

4.transfection

ベクターを導入する薬剤として K-562、HCT116、MCF 7 を使用した。これらの細胞は、SLFN11、SLFN13 とともに発現量が 5 以下⁶⁾ であるため、SLFN11、SLFN13 がほとんど発現していないと言え、この実験に適している。

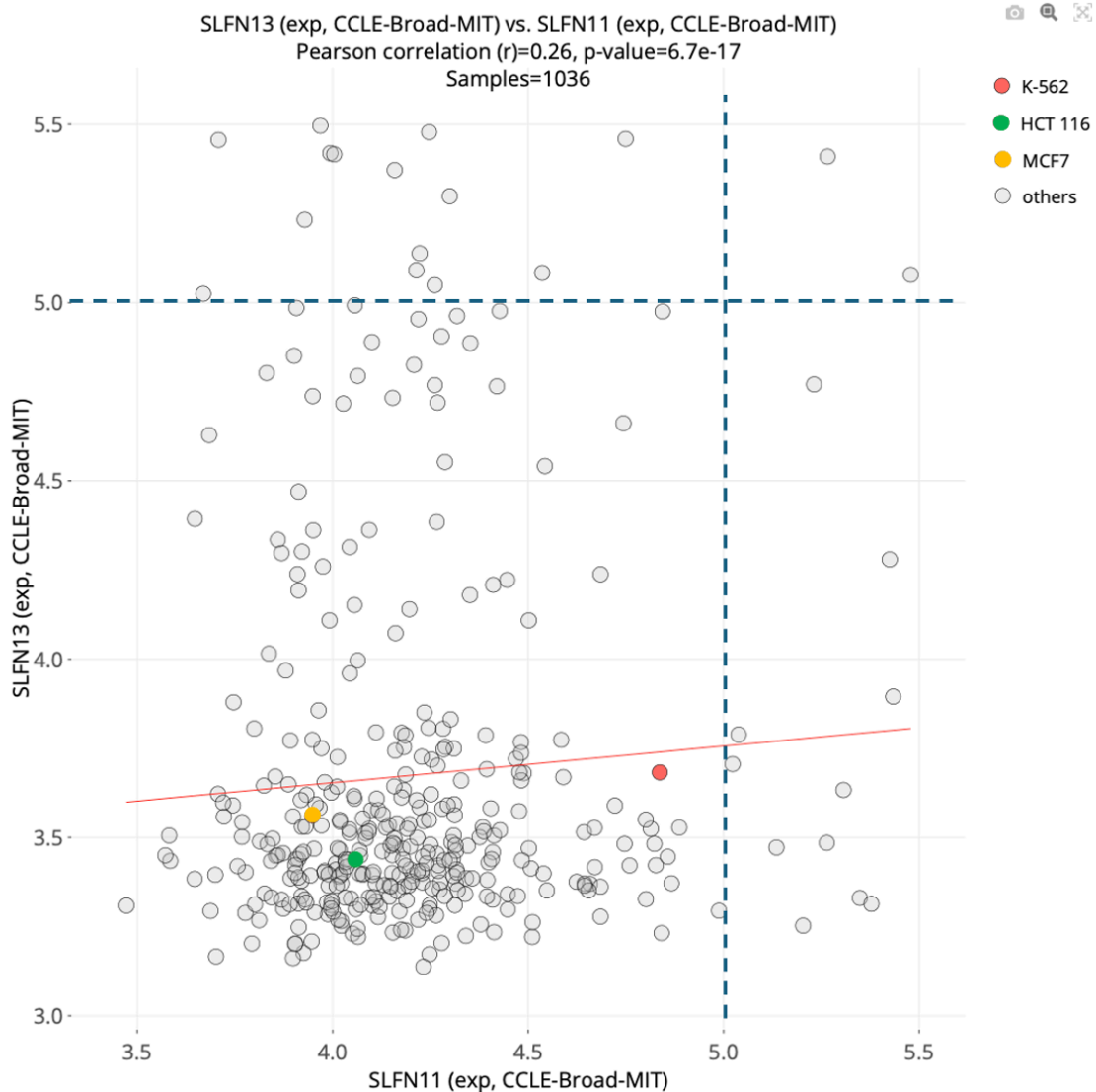


図 3：細胞の SLFN11、SLFN 13 の発現量

K562 は、エレクトロポレーションによるベクター導入を行った。細胞は回収後、遠心分離により沈殿させ、PBS による洗浄を行った。PBS 洗浄後に再度遠心を行った。洗浄後の細胞は PBS100 μ l に懸濁し、1 サンプルあたり 100 μ L 中に 1.0×10^6 個となるよう調整した。これにベクターを添加し、キュベットに移した。エレクトロポレーションは NEPAGENE 装置を用い、電気抵抗値は 0.030–0.050 Ω の範囲でプロトコル 5 に従って実施した。エレクトロポレーション後、キュベット内で気泡の発生を確認した。細胞は速やかに培地へ回収し、あらかじめ培地 5 ml/well を加えておいた 6 ウェルプレートに戻して混和した。その後で培養を行った。

HCT116、MCF7 は接着細胞であるためリポフェクションによるベクター導入を行ない、培養した。リポフェクションは村井純子教授が実施した。

遺伝子導入後の細胞について、抗生物質耐性を指標としたスクリーニングおよびクローニングを行った。まず、6 ウェルプレートで細胞を約1週間培養した後、ベクターにコードされたピューロマイシン耐性遺伝子を利用し、ピューロマイシンを最終濃度が 1/5000 となるように添加して培養を行った。次に得られた細胞集団の一部は、bulky population を行なった。一方で、単一細胞由来クローンを得るため、細胞懸濁液から 限界希釈クローニングを行った。希釈系列は96 ウェルプレートに分注し、1 ウェルあたり 1 細胞となる条件で培養した。

5.薬剤感受性試験

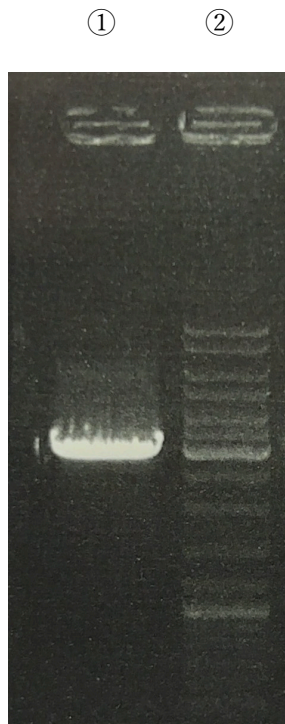
HCT116 細胞の培養上清を除去し、PBS で洗浄した後、2 mL のトリプシンを添加して2分間インキュベートし、細胞を培養プレートから剥離した。剥離した細胞を回収し、8 mL の medium を加えた後、室温にて2分間遠心した。得られた細胞懸濁液の細胞数をセルカウンターで測定し、最終濃度が 3×10^4 cells/mL となるよう培地で希釈した。調製した細胞懸濁液を3枚の96 ウェルプレートに各ウェル 50 μ L ずつ分注した。

その後、カンプトテシン (CPT) 、Paclitaxel をそれぞれ96 ウェルプレートに添加し薬剤感受性を評価した。CPT はトポイソメラーゼ阻害剤に分類され、CPT に対する感受性と SLFN11 に強い相関があることがわかっている。一方、Paclitaxel はタキサン系抗がん剤で SLFN11 はその機序に関与しない。

結果

1. インサートの作成

電気泳動の結果を以下に示す。今回 PCR に使用した鋳型 DNA の長さは約 3000 であり、SLFN のバンドが 3000kDa 付近で確認できたことから、SLFN の DNA 増幅が成功したことが確認できた。



- ①チンパンジーの SLFN11
- ②マーカー

図 4：PCR 後のウェスタンブロット

2. In-fusion

電気泳動の結果を以下に示す。制限酵素処理前のベクターでは開環状、閉環状の 2 本のバンドが確認され、制限酵素処理後のベクターでは直鎖状のバンド 1 本のみが 6000kDa 付近に確認されたため、pPCIP が完全に酵素処理されていることがわかった。

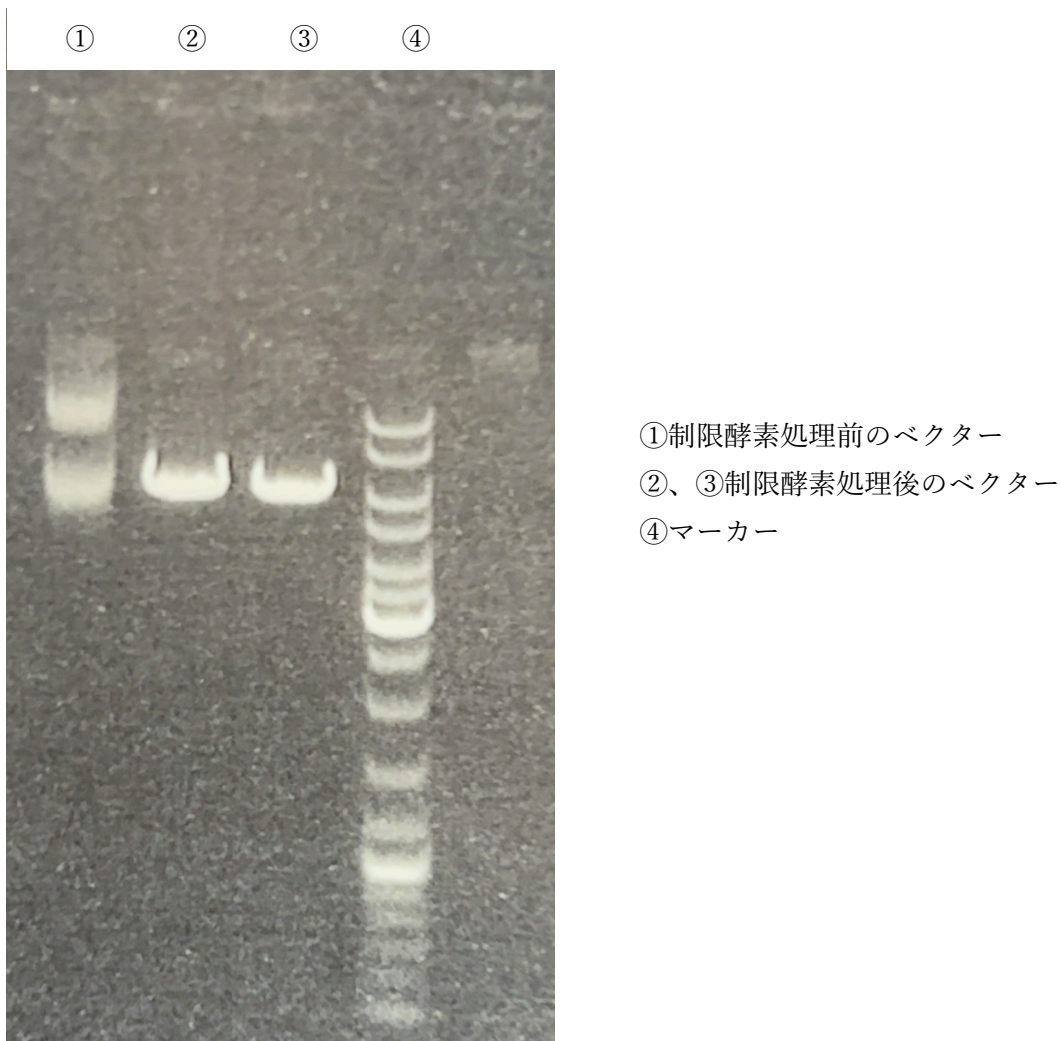


図 5：酵素処理後のウェスタンブロット

4. transfection

K-562、HCT116、MCF7のうちK-562、HCT116は細胞が生存しており、チンパンジーSLFN13が導入できたことがわかった。しかし、HCT116は生存数、チンパンジーSLFN13の発現量がともに少なかった。ヒトSLFN13の抗体を用いてウェスタンブロットしたところ、チンパンジーSLFN13はヒトSLFN13の抗体に対して反応を示した。ウェスタンブロットは村井純子教授が実施した。

表 2：培養後の細胞の生存

	K-562	HCT116	MCF7
empty	○	○	○
chimpanzeeSLFN13	○	○	×

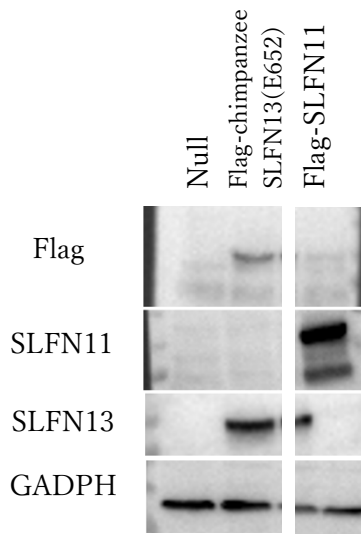


図 7：ベクター導入後の K562 におけるタンパク発現

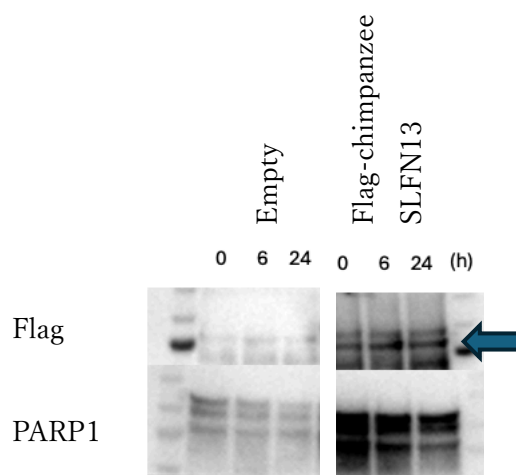


図 6：ベクター導入後の HCT116 におけるタンパクの発現。矢印：Flag シグナルと考えられるバンド

5. 薬剤感受性試験

K562 細胞においてチンパンジー-SLFN13 は低濃度の CPT では薬剤感受性を示さなかったが、高濃度の CPT に対して高い薬剤感受性を示した。Paclitaxel に対しては薬剤感受性を示さなかった。

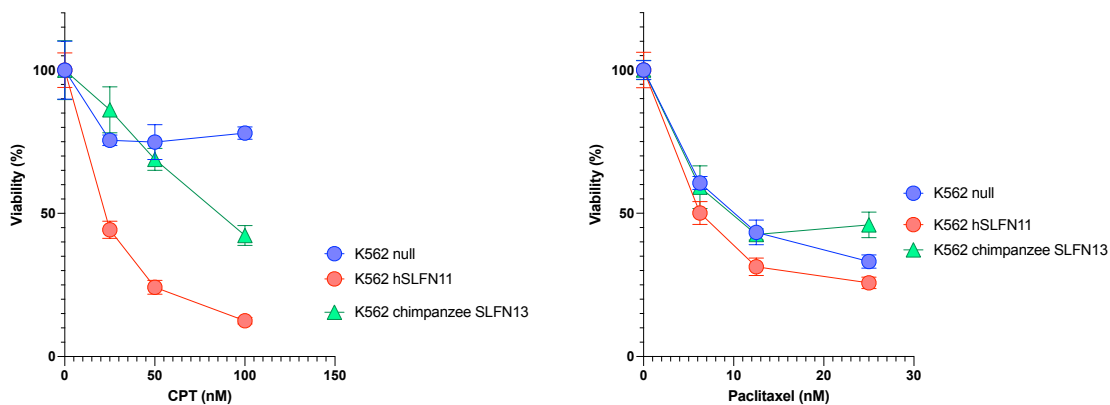


図 8：ベクター導入後の K562 細胞の薬剤感受性（左：CPT、右 Paclitaxel）

HCT116 細胞においてチンパンジー-SLFN13 は CPT、Paclitaxel 両方に対して薬剤感受性を示さなかった。

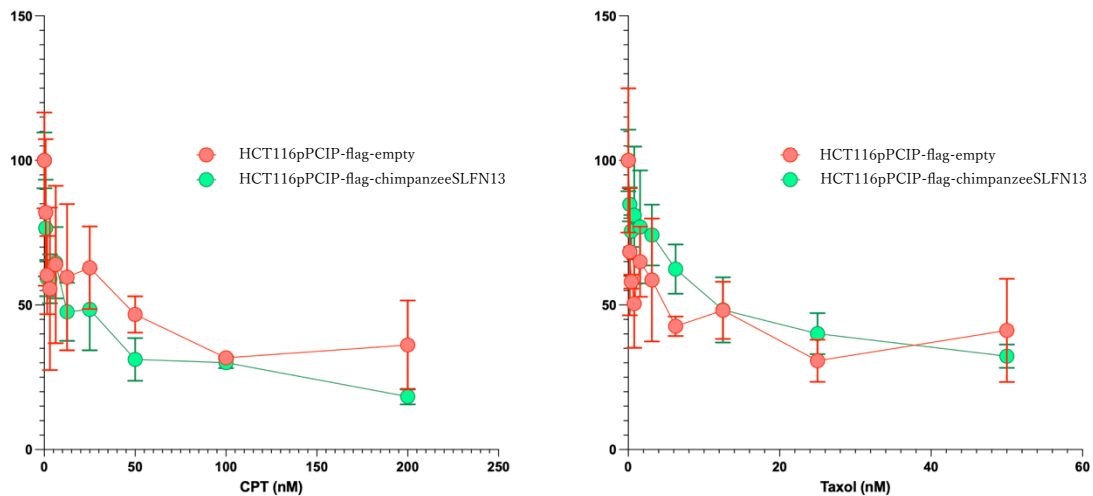


図 9:ベクター導入後の HCT 細胞の薬剤感受性 (左: CPT、右 Paclitaxel)

考察

HCT116 は生存数、チンパンジー-SLFN13 の発現量がともに少なかったことや MCF7 では、過剰発現細胞が樹立できなかったことからチンパンジー-SLFN13 が HCT116、MCF7 に対して何かしらの細胞毒性を持っていたと考えられる。K562 細胞は白血病、HCT116 は大腸がん、MCF7 は乳がん由来の細胞である。チンパンジーは癌の発症率が人間よりも圧倒的に低く、特に乳癌や大腸癌などの上皮性腫瘍は極めて稀である。報告例の多くはリンパ腫や白血病などの造血系腫瘍、あるいは肝細胞癌や肉腫であり、主として高齢個体の剖検時に発見されている^{7, 8)}。このこともチンパンジー-SLFN13 を導入した HCT116、MCF7 がチンパンジー-SLFN13 の発現がないまたは少ない理由かもしれない。ヒトと比べチンパンジーの癌の発症率が低いのは、寿命の短さや発がん性物質への曝露が少ないなどの生活様式の違いであると考えられており、遺伝子的にも決定的なチンパンジー独自の特異的抗がん遺伝子は発見されていない。ヒトは進化における寿命の延長や生活様式の変化に伴い、がんの発生を抑制する機構が相対的に重要になってきた可能性がある。がんは細胞分裂の回数や生存期間の長さに依存して発生確率が上昇するため、霊長類の中でも比較的長寿であるヒトでは、DNA 損傷応答、細胞周期制御、免疫監視といった仕組みが進化的に保持・強化されてきた可能性が考えられ、ヒト SLFN11、13 の機能や分岐、進化と寿命の長さが関係している可能性がある。ただし、SLFN11、13 の進化的意義については未解明な点が多く、ヒトにおける長寿化やがん抑制との直接的な関係については予想に過ぎないため、霊長類の SLFN13 を比較して、ヒト SLFN13 とのアミノ酸配列などの違いと、各霊長類の寿命との相関を見て検討する必要がある。

K562 細胞は高濃度の CPT に対して高い薬剤感受性を示した。一方で HCT116 細胞では薬剤感受性に変化がなかった。この結果はチンパンジー-SLFN13 の発現量の差によるもの

か細胞の種類の違いによるものかの2つの可能性があり、今回の実験のみでは判断できない。細胞の種類の違いによるものだとすると、K562とHCT116の違いからチンパンジーSLFN13の機能予測に繋がる可能性もある。また、別実験においてヒトSLFN13(K652)が導入されたHCT116細胞はCPTへの薬剤感受性を示したため、ヒトSLFN13とのK652部位以外の遺伝子配列の違いも考慮に入れる必要がある。ヒトSLFN11による薬剤感受性には、E209, E214, S219, T239, K605, D668, E669, K652³⁾のアミノ酸配列が必須であると報告されているが、前述部分の塩基配列はヒトSLFN13とチンパンジーSLFN13で一致している。HCT116でチンパンジーSLFN13が薬剤感受性を示さなかったことは、先行研究において未だ発見されていないヒトSLFN11の機能に関して重要なサイトがあることを示唆しており、そのサイトの1つは細胞の種類により機能または発現を調節する因子として機能しているのではないかと考えられる。または、HCT116でのチンパンジーSLFN13の発現量が低かったのが理由とも考えられる。

参考文献

- 1 Reinhold WC, Sunshine M, Liu H, et al. CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set. *Cancer Res.* 2012; 72: 3499-3511.
- 2 Zoppoli G, Regairaz M, Leo E, et al. Putative DNA/RNA helicase Schlafen-11 (SLFN11) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 15030-15035.
- 3 Fujiwara K, Maekawa M, Iimori Y, et al. The crucial role of single-stranded DNA binding in enhancing sensitivity to DNA-damaging agents for Schlafen 11 and Schlafen 13. *iScience.* 2023;26(12):108529. Published 2023 Nov 23. doi:10.1016/j.isci.2023.108529
- 4 Bustos O, Naik S, Ayers G, et al. Evolution of the Schlafen genes, a gene family associated with embryonic lethality, meiotic drive, immune processes and orthopoxvirus virulence. *Gene.* 2009; 447: 1-11.
- 5 Mordier J, Fraisse M, Cohen-Tannoudji M, Molaro A. Recurrent Evolutionary Innovations in Rodent and Primate Schlafen Genes. *Genome Biol Evol.* 2025; 17.
- 6 CellMinerCDB <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D1083/5983630>
- 7 Lapin BA, Yakovleva LA. Spontaneous and experimental malignancies in non-human primates. *J Med Primatol.* 2014;43(2):100-110. doi:10.1111/jmp.12098
- 8 Brown SL, Anderson DC, Dick EJ Jr, Guardado-Mendoza R, Garcia AP, Hubbard GB. Neoplasia in the chimpanzee (*Pan spp.*). *J Med Primatol.* 2009;38(2):137-144. doi:10.1111/j.1600-0684.2008.00321.x