

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

竹内 淳

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

Doxycyclin 誘導性 HERC1 および HERC2 同時発現抑制細胞株の樹立

共著者：

呉 文文、鈴木 直、太田 智彦

緒言

HERC (HECT domain and RCC1 domain) ファミリー蛋白質は RCC (regulator of chromosome condensation)-like および HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) ドメインから構成される。RCC-like ドメインは Ran (RAS-related nuclear protein)-GEF (G-protein exchange factor) 活性を持つと考えられており、また HECT ドメインはユビキチンリガーゼ (E3) 活性を有している。HERC1 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 1) と HERC2 (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2) は残基数が 4800 アミノ酸を超える巨大な蛋白質で、複数の RCC-like ドメインと C-末端の HECT ドメインという類似構造を有する。我々は HERC2 が 1) 家族性乳癌および卵巣癌の原因遺伝子産物である BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) を分解する E3 であること、2) 細胞周期の G2/M 期チェックポイントを制御すること、さらに、3) Claspin と結合

してDNA複製を制御することを報告してきたが、その機能については未だに不明な点が多い。本研究の目的は新たなHERC2およびHERC1の機能を発見するための細胞株を作成することである。

#### 方法・対象

まず、HERC1およびHERC2に対するshRNA配列をエントリーベクターにサブクローニングし、Gateway法にてdoxycyclin (Dox) 誘導システムが組み込まれたCS-RfA-ETPuro-shHERC1およびCS-RfA-ETPuro-shHERC1CS-RfA-ETBsd-shHERC2レンチウィルスSINベクタープラスミドを作成した。次にHis-FLAG-HERC2(4389-4834)を大腸菌タンパク質発現系にて発現させ、ニックルアガロースビーズによりリコンビナント蛋白質を精製した。また、抗HERC2抗体はHis-FLAG-HERC2(4389-4834)ペプチドを免疫原として、得られたウサギ抗HERC2血清をプロテインAアガロースカラムにて精製して作成した。細胞培養についてはHCT116細胞、U2OS細胞、Hela細胞、Lenti-X 293T細胞をL-glutamine/Phenol Red含有D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)に10% Fetal Bovine Serum、1%L-glutamine および1% Antibiotic-Antimycoticを加えた培養液中で37° C、5% CO<sub>2</sub>にて培養した。Doxycyclinの誘導は増殖期の細胞に対して1 μg/ml、72時間にて行った。また、RNA interferenceとして、HERC2およびHERC1を標的にしたsiRNAオリゴヌクレオチドをアニーリングし、10 nMの二本鎖RNAを増殖期U2OS細胞にLipofectamine RNAiMAXでトランスフェクションし、72時間培養後に遺伝子発現抑制効果を解析した。次に、上述したCS-RfA-ETBsd-shHERC2あるいはCS-RfA-ETPuro-shHERC1を増殖期Lenti-X 293Tにリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。48時間後ウイルス含有培養上清を回収し、ウイルス懸濁液を増殖期の細胞に感染させ、レンチウィルスを作成した。その後、48時間培養したのちにBlasticidin 0.25 μg/mlあるいはPuromycin 0.25 μg/mlで選択を行い、遺伝子安定導入株を樹立した。免疫沈降およびウェスタンブロットの方法は、まず0.5% NP-40 lysisバッファーで蛋白質抽出液を作成した。各種抗体およびプロテインA/Gアガロースビーズを用いて、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動したのち、PVDF膜に転写し、各種抗体でウェスタンブロットを行った。また、蛍光免疫染色については細胞を-20 ° Cメタノール1時間のインキュベーションにより固定し、-20 ° Cのアセトンを用いて5秒間膜透過を行い、1次抗体と蛍光ラベル2次抗体で染色し、さらに細胞核はDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

## 結果

まず、作成したHERC2抗体の評価を行った。精製したウサギポリクローナル抗体(HERC2#1)はウェスタンブロットにて1  $\mu$ gのリコンビナントHis-FLAG-HERC2蛋白質を検出したが、コントロールのHis-FLAG-BRCA1蛋白質は検出されなかった。この抗体はU2OS、HCT116およびHeLa細胞の内因性HERC2を検出可能であった。さらに、この抗体を用いてHeLa細胞の蛋白質抽出液より免疫沈降を行ったところ、内因性のHERC2とともにBRCA1が共沈した。これまで、内因性のHERC2とBRCA1の結合はBRCA1抗体による免疫沈降でのみ検出可能であったが、改めて両タンパク質の細胞内での結合が確認された。

次に、2種類のsiRNAを用いてウェスタンブロットにてHERC2の発現抑制効果を確認した。このうちの1配列を用いてDox誘導性shHERC2発現細胞株を樹立した。Blasticidin選択で樹立したHCT116-Dox-shHERC2およびU2OS-Dox-shHERC2細胞を用いてDoxによるHERC2の発現抑制を経時的にウェスタンブロットにて解析した結果、72時間で顕著な抑制効果が得られていた。HERC2の蛍光免疫染色では、核内のHERC2の発現も抑制されていることが確認された。

また、HERC1の発現抑制に効果的なsiRNA配列を選択したのち、Dox誘導性のshHERC1発現抑制細胞を樹立し、その有効性をウェスタンブロットで確認した。次にHeLa-Dox-shHERC1/shHERC2、HCT116-Dox-shHERC1/shHERC2細胞およびU2OS-Dox-shHERC1/shHERC2細胞を樹立し、これらの細胞におけるDoxによるHERC1およびHERC2の同時発現抑制効果をウェスタンブロットにて確認した。

最後にIR照射したHeLa-Dox-shHERC1およびHERC2細胞において1本鎖DNA結合タンパク質であるRPA(replication protein A)32のDNA損傷部位への集積を蛍光免疫染色にて認めた。この集積はDox添加によるHERC1あるいはHERC2抑制ではほとんど影響を受けなかった。しかし、HeLa-Dox-shHERC1/shHERC2細胞ではDox添加による両タンパク質の同時抑制によってRPA32の集積は著明に抑制された。

## 考察

HERC1およびHERC2の単独抑制と比較して、両蛋白質を同時に抑制した細胞では顕著に放射線照射後のDNA損傷局所へのRPA蛋白質の集積が阻害されることから両タンパク質はDNA損傷応答において互いに補完的な作用を有するものと考えられる。

## 結論

我々はDoxで誘導可能なHERC1およびHERC2の同時発現抑制細胞株を

樹立した。今後、この細胞株は HERC1 および HERC2 の細胞周期および DNA 損傷応答における役割を解析する上で有用である。