

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名： 頼 勇強

専攻分野： 応用分子腫瘍学

指導教授： 太田 智彦

主論文の題目：

HERC2 Regulates RPA2 by Mediating ATR-Induced Ser33

Phosphorylation and Ubiquitin-Dependent Degradation

(HERC2によるRPA2のATR誘導性Ser33残基リン酸化とユビキチン依存性分解の制御)

共著者：

Mingzhang Zhu, Wenwen Wu, Nana Rokutanda, Yukiko Togashi, Weixin Liang, Tomohiko Ohta

緒言

がん細胞の最大の特徴の 1 つは、ゲノムの不安定性で、その多くはがん遺伝子の活性化や異常増殖によって生じる DNA 複製ストレスに対する不正確な反応に起因する。DNA の複製を正確に行うためには複雑なメカニズムが存在するが、その中で中心的な役割を演じているのは、Replication protein A (RPA) である。RPA は複製ストレスにより露出される一本鎖 DNA に速やかに結合してアニーリングによる 2 次構造を防ぐと共に、足場蛋白質として ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein) をリクルートし、細胞周期チェックポイントや複製フォークの安定化に必須である。RPA は三つのサブユニット RPA1, RPA2, RPA3 から構成される複合体である。その中で RPA2 はサイクリン依存キナーゼ CDK および ATR によりリン酸化を受けるサブユニットで、ストレス応答時、ATR によって 33 番目のセリン残基 (Ser33) がリン酸化される。その後、さらに高度なダメージが生じると、21 番目のチオリン残基 (Thr21)、4 と 8 番目のセリン残基 Ser4/8 順次リン酸化されて、DNA 複製・修復の過程が進む。このように、RPA2

のリン酸化についてはこれまでに詳細な解析が行われてきたが、RPA2 がどのように安定性を維持しているかについては未だに判然としない点が多い。これに対し最近我々は、HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼである HERC2 が、ゲノムの安定維持に関わる DNA ヘリカーゼ BLM/WRN と RPA の結合を調節し、DNA2 次構造であるグアニン四重鎖 (G4) の解除を制御していることを見出した。今回、我々は HERC2 が ATR による RPA2 Ser33 残基のリン酸化および、そのリン酸化した RPA2 の分解に必要で、この機能が G4 の解除に重要な役割を果たしていることを解明した。

方法 . 対象

①Doxycycline (DOX) 誘導性に shRNA によって HERC2 をノックダウンする HeLa 細胞株、および CRISPR/Cas9 ゲノム編集で HERC2 の E3 リガーゼを失活させた HCT116 細胞株 (HERC2^{ΔE3/ΔE3}) を使用した。トランスフェクションによる一過性の蛋白質発現は 293T 細胞で行った。ATR、RFWD3、BLM、WRN を標的とする siRNA (Ambion 社) の導入はプロトコールに沿って行った。②HERC2 の各機能ドメインと RPA 遺伝子をクローニングし、Myc 又は Strep タグ付の pcDNA3 プラスミドを構築した。③各蛋白質の発現および複製ストレス時の RPA2 のリン酸化をウェスタンブロットにて解析した。④RPA2 のユビキチン化は変性溶解条件で、基質である RPA2 を StrepTactin によるプルダウンあるいは抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロットで解析した。⑤G4 を特異的に認識する BG4 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、ソフトウェア SpotDetector[®]にて定量解析を行った。

結果

1) HeLa-shHERC2 細胞を用いて、DOX 投与で内因性 HERC2 の発現が抑制された条件下で、HERC2 の各機能ドメインを RPA とともにトランスフェクションし、結合部位をマッピングした。その結果、細胞内で RPA1 および RPA2 とともに HERC2 の C 末端と結合していた。この結合は、プロテアソーム抑制剤である MG132 を加えた場合のみに検出可能であり、HERC2 が RPA をユビキチン化して、分解することが示唆された。

2) 次に、HERC2 による RPA2 のユビキチン化を解析した。内因性およびトランスフェクションによる外因性の RPA2 のユビキチン化は HERC2 のノックダウンで抑制された。この条件で、さらに検出 HERC2 の C 末端、HECT ドメインを過剰発現させることで RPA2 のユビキチン化が再び検出可能となった。以上より、RPA2 は HERC2 によってユビキチン化され、分解されることが示唆された。

3) 次に、HERC2 が RPA2 のリン酸化に及ぼす影響を解析した。高度な複製ストレス下においては RPA2 のリン酸化に HERC2 が及ぼす影響

は認められなかったが、複製停止が起こらない低容量 (0.2mM) の hydroxyurea あるいは 5 μ M aphidicolin による軽度なストレス下で生じる RPA2 Ser33 のリン酸化は HERC2 のノックダウンによって顕著に抑制された。この際に生じるリン酸化が ATR によるリン酸化であることを ATR のノックダウンにて確認した。RPA2 のユビキチンリガーゼとしてすでに報告されている RFWD3 のノックダウンでも RPA2 Ser33 のリン酸化が抑制されたが、その効果は HERC2 より軽微であった。以上より、HERC2 は軽度な複製ストレス時の ATR による RPA2 のリン酸化に必須であることが示された。

4) 次に、トランスフェクションを行わず、内因性の蛋白質で RPA2 のリン酸化およびユビキチン化における HERC2 の影響を解析した。その結果、HERC2 の酵素活性が死活した HERC2 ^{Δ E3/ Δ E3} 細胞では RPA2 Ser33 のリン酸化が亢進していた。さらに、野生型で検出される RPA2 のユビキチン化は HERC2 ^{Δ E3/ Δ E3} 細胞では検出されず、HERC2 によって RPA2 がユビキチン化されることが実証された。重要なことに、このユビキチン化は ATR 阻害剤でも抑止されることから、HERC2 によってユビキチン化され、分解される RPA2 は ATR によってリン酸化された RPA2 であることが示唆された。

5) 上述した反応の機能的な意義を明らかにするため、G4 解除におけるエピスタシスを解析した。G4 の解除において RPA は BLM/WRN に対してエピスタシスな作用を示した。HERC2 の E3 活性も RPA とエピスタシスな関係にあった。すでに報告している BLM/WRN と HERC2 のエピスタシスな関係を考え合わせ、BLM、WRN のそれぞれの機能に HERC2 と RPA が必須であることが示された。

考察

RPA2 のユビキチンリガーゼとしてはこれまでに RFWD3 と PRP19 の 2 つが報告されているが、いずれも高度な複製ストレス時の DNA 損傷に対して機能し、また、PRP19 による PRPA2 のユビキチン化は分解のシグナルではない。我々は初めて複製が停止しない軽度なストレスにおいて RPA2 を分解するユビキチンリガーゼを同定した。HERC2、RFWD3、PRP19 は DNA 複製およびストレス時にそれぞれ異なった局面で働いていると考えられる。HERC2 による RPA2 のリン酸化およびその分解は正常な DNA 複製にともなって生じる G4 に代表される DNA の 2 次構造を解除するために働いているものと考えられ、HERC2 の機能不全はがん化の要因となると同時に G4 安定化剤の感受性の指標になるものと思われる。