

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：朱 明章

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 Inactivation Abrogates Nucleolar Localization of RecQ Helicases BLM and WRN

(HERC2機能欠失によるRecQ ヘリカーゼBLMとWRNの核小体への局在異常)

共著者：

Wenwen Wu, Yukiko Togashi, Weixin Liang, Yasuo Miyoshi, Tomohiko Ohta

### 緒言

核小体はリボソーム DNA (rDNA) から構成される核内構造で、リボソーム RNA (rRNA) の合成からリボソーム生合成を行う細胞小器官である。また、核小体は DNA 損傷応答でも重要な役割を果たしており、RecQ DNA ヘリカーゼである BLM と WRN など、DNA 修復に必要な因子を貯蔵する器官でもある。rDNA はグアニンに富み、DNA の 2 次構造であるグアニン四重鎖 (guanine-quadruplex; G4) を形成しやすく、DNA 複製や転写の過程で、BLM と WRN 等による G4 解除を必要とする。BLM と WRN は遺伝子不安定症候群の原因遺伝子で、その遺伝子変異によってそれぞれ Bloom 症候群と Werner 症候群を発症する。先行研究において我々の教室は、HECT 型 E3 ユビキチンリカーゼである HERC2 が、BLM および WRN と 1 本鎖 DNA 結合タンパク質である Replication protein A (RPA) との結合を仲介し、BLM と WRN の G4 抑制機能に必要な役割を果たしており、HERC2 機能不全細胞は G4 安定化剤に対する

感受性が亢進していることを見出した。そこで本研究では HERC2 機能不全が BLM と WRN の核小体局在および rRNA の合成に与える影響を解析した。また、rRNA 合成をおこなう Polymerase I (Pol I) 阻害作用と G4 安定化作用を同時に有し、抗がん剤として期待されている CX-5461 の効果における HERC2 機能不全の影響をあわせて検討した。

#### 方法・対象

1) Doxycycline (DOX) 誘導性 shRNA によって HERC2 をノックダウンし得る HeLa および HCT116 細胞株と、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<sup>ΔE3/ΔE3</sup>) を使用した。2) siRNA による BRCA1、BLM および WRN のノックダウンはプロトコールに沿って行った。3) 発現抑制効率はウェスタンブロットにて確認した。4) BLM および WRN の核小体への局在は、NPM1 を核小体のマーカーとした蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて定量的に解析した。線維質領域 (fibrillar center: FC) への局在は Fibrillarin (FBL) および RPA194 を、また、複製ストレス時の停止した複製フォークへの BLM の局在は RPA2 をマーカーとして解析した。5) CX-5461 暴露後の pre-rRNA 転写状況はリアルタイム定量 RT-PCR を用いて解析した。6) CX-5461 の殺細胞効果は Clonogenic Survival assay にて解析した。7) 統計学的解析は Student *t* 検定及び Two-way ANOVA 検定を用いた。

#### 結果

1) DOX により HERC2 の発現が抑制された HeLa 細胞では、コントロール細胞に比較して BLM および WRN の核小体への局在が顕著に抑制された (BLM: 28.7 ± 13.1% vs 98.2 ± 1.6%,  $p=0.0008$ 、WRN: 29.0 ± 3.6% vs 70.2 ± 9.8%,  $p=0.0024$ )。異なる HERC2 の配列を標的とした shRNA でも同様な所見が得られ、off-target 作用ではないと考えられた。HERC2<sup>ΔE3/ΔE3</sup> 細胞でも同様な結果であった (BLM: 27.6% ± 12.5% vs 93.8% ± 6.2%,  $p=0.0012$ 、WRN: 25.5 ± 4.0% vs 75.8% ± 15.2%,  $p=0.0052$ )。2) Hydroxyurea による複製ストレスによって BLM は核小体から消退し、RPA2 とともに核内 foci に集積したが、HERC2 発現抑制下では、核内 BLM foci 形成は顕著に低下した (62.0% ± 5.5% vs 16.6% ± 3.3%,  $p=0.0021$ )。3) HERC2 は核小体 FC に局在して

いた。このことから HERC2 が BLM と WRN の機能を介して Pol I による rRNA の合成に関与していることが考えられた。そこで、HERC2 機能不全が pre-rRNA 合成に与える影響を解析したところ、HERC2 ノックダウン HeLa, HCT116 および HERC2<sup>ΔE3/ΔE3</sup> 細胞のいずれにおいても CX-5461 投与による pre-rRNA 合成抑制効果が有意に増強した ( $p=0.0006$ ,  $p=0.0001$  および  $p<0.0001$ )。一方、mRNA 合成に対してはこのような影響は認められなかった。4) CX-5461 は Pol I 阻害薬であると同時に G4 安定化剤であり、また HERC2 機能不全が G4 を蓄積させて G4 安定化剤への感受性を増強させることから、HERC2 機能不全細胞の CX-5461 に対する感受性を解析した。しかし、HERC2<sup>ΔE3/ΔE3</sup> 細胞では予想通り CX-5461 に対する感受性が亢進したが、HERC2 ノックダウン細胞では感受性に変化は認められなかった。さらに意外なことに、既報にある通り BRCA1 ノックダウン細胞では CX-5461 感受性が亢進したが、BRCA1 ノックダウン細胞における HERC2 機能不全は CX-5461 に対して逆に抵抗性を生じさせた。

#### 考察

G4 はテロメア、プロモーター領域および核小体 rDNA において生理的に必須な役割を果たすと同時に、DNA 複製や転写の障害となる。BLM と WRN は G4 を解除する主要なヘリカーゼであり、核小体において rRNA 合成に重要な役割を果たす。本研究にて我々は BLM と WRN の G4 解除機能に必須な HERC2 が、BLM と WRN の核小体への局在にも必須な役割を果たしていることを示した。さらに HERC2 による BLM と WRN の核小体局在は DNA 複製ストレスへの対応と rRNA 合成においても重要であることが示された。CX-5461 は Pol I 阻害薬および G4 安定化剤としてがん治療への応用が注目されている。

本研究では HERC2 が CX-5461 の薬剤作用に影響を与えることが示された。HERC2 は多くのがんで発現が抑制されており、がん治療における CX-5461 の効果を考える上で重要と思われる。