

## 論文審査の要旨

筆頭著者 (学位申請者) 氏名

頼 勇強

主論文の題目  
および  
掲載・審査委員

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)

掲載誌 Scientific Reports 2019; 9: 14257

主査 鈴木 直  
副査 津川 浩一郎  
副査 砂川 優

[論文の要旨・価値] がん細胞におけるゲノム不安定性は、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。Replication protein A (RPA) は DNA の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 2 次構造を防ぐと共に、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関与している。RPA は RPA1、RPA2、RPA3 から構成される複合体であり、RPA2 サブユニットはストレス応答時に ATR によって 33 番目のセリン残基 (Ser33) がリン酸化される。これまでに申請者らは、HECT 型 E3 ユビキチンリカーゼである 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、DNA の 2 次構造であるグアニン四重鎖 (G4) の解除を制御している事実を見出した。そこで、申請者らは 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の関与の解明を目的として研究を進めた。《方法・対象》① Doxycycline (DOX) 誘導性に shRNA によって HERC2 をノックダウンする HeLa 細胞株、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。一過性の蛋白質発現は 293T 細胞を使用し、ATR、RFWD3、BLM、WRN を標的とする siRNA 導入を施行した。②HERC2 の各機能ドメインと RPA 遺伝子をクローニングタグ付の 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 (WB) 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 を免疫沈降し WB で解析した。⑤G4 を認識する BG4 抗体を用いた蛍光免疫染色による定量解析を行った。《結果》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解析した結果、RPA1 と RPA2 が 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。次に HERC2 が RPA2 のリン酸化に及ぼす影響を解析した結果、軽度な複製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。また HERC2 の酵素活性が死した HERC2<sup>ΔE3/ΔE3</sup> 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<sup>ΔE3/ΔE3</sup> 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、このユビキチン化は ATR 阻害剤でも抑止されたことから、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 であることが示された。G4 解除におけるエピスタシスを解析した結果、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。以上申請者らは、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初めて同定し、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 DNA の 2 次構造を解除するために重要な役割を有する事実を示した。HERC2 の機能不全ががん化の要因になることから、本研究は G4 安定化剤など治療薬の開発に繋がる、医学的に大変価値が高い論文であると思われた。

[審査概要] 医学部本館大学院講義室において主査、副査 2 名、指導教授他の陪席のもと審査が行われた。申請者から、良くデザインされたスライドを用いた分かりやすい的確な発表 (約 30 分) が英語にて行われた。約 40 分の英語による質疑では、HERC2 の C 末端と RPA の結合に関して、HECT ドメインを有するフラグメント F5 と F7 の関与について、複製が停止しない軽度なストレスの意義に関して、プロテアソーム抑制剤である MG132 存在下の RPA2 による免疫沈降実験の Figure に図示されている\*の意味に関して、今回の研究を通じて RPA と作用のある 3 つの分子 (RFWD3、PRP19、HERC2) の違いについて、さらに G4 解除を標的とした臨床応用の可能性について等深い討論が展開され、申請者は的確に真摯に全て回答した。

## 最終試験結果の要旨

[研究能力・専門的学識・外国語 (英語) 試験等の評価] 申請者は、研究の背景や要点、将来の展望に併せて、本研究の限界に関しても真摯にかつ明確に発表していた。申請者は十分な専門知識と研究遂行能力を持ち、その人柄を含め学位授与に値する素晴らしい人物であると判断した。審査の発表と質疑応答は全て英語で行われ、英語試験による評価を施行しなかったが、申請者の英語力は高いと判断された。