

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08676

研究課題名(和文) DNA複製とストレス応答におけるHERC2の機能解析

研究課題名(英文) Study on the role for HERC2 in the response to replication stress

研究代表者

呉 文文 (Wu, Wenwen)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10434408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において研究代表者らはHECT型ユビキチンリガーゼであるHERC2がRecQヘリカーゼであるBLMおよびWRNと1本鎖DNA結合タンパク質であるRPAとの結合を仲介し、DNAの二次構造物であるグアニン4重鎖(G4)を抑制するための主要因子であることを発見した。HERC2の欠失あるいはCas9/CRISPRゲノム編集によるHERC2の酵素活性の死活化は姉妹染色分体の増加およびG4の蓄積をもたらした。G4蓄積においてHERC2はBLMおよびWRNに対してエピスタシスな関係を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HERC2あるいはそのE3活性の欠失により、DNAヘリカーゼであるBLMとWRNの機能が損なわれてG4が蓄積し、細胞はG4安定化剤であるピロスタチンおよびテロメスタチンに対して高い感受性を示した。多くのタイプのがんにおいてHERC2の発現が減少していることから、HERC2の機能不全によるG4の蓄積はがん治療においてG4安定化剤の標的あるいは効果の指標となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that an HECT E3 ligase HERC2 interacts with RecQ helicases BLM and WRN, and is a master regulator of G4 suppression. HERC2 depletion resulted in elevated level of sister chromatid exchange and in a dramatic G4 accumulation in a manner epistatic to depletion of BLM and WRN. Inactivation of E3 ligase activity of HERC2 by Cas9/CRISPR-mediated gene editing demonstrates an essential role of the activity to prevent the phenotype. Mechanistically, HERC2 regulates the interaction of the helicases with replication protein A (RPA), which is known to support the helicase activity to unfold G4s. In addition, HERC2 regulates ATR-phosphorylated RPA2 levels through induction and degradation. Importantly, the HERC2 dysfunctions sensitize cells to G4 stabilizers telomestatin and pyridostatin. Given that the HERC2 expression is frequently reduced in many types of cancers, the G4 accumulation by HERC2 deficiency may provide a therapeutic target for the G4 stabilizers.

研究分野：腫瘍学(腫瘍生物学)、基礎医学(病態医化学)

キーワード：HERC2 BLM RPA DNA複製ストレス応答 グアニン4重鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)DNA複製とがん：ゲノム不安定性はがんの特徴であり、その大きな要因はDNA複製の不確実性である。がん化の原因となるがん遺伝子産物あるいはがん抑制産物の機能不全はさらにDNA複製の脆弱性をもたらし、ゲノム不安定性を助長する。一方、その機能不全はがんに特異的な効果をもたらす治療薬の標的としても重要である。DNA複製はDNAヘリカーゼによる2本鎖DNAの開裂とDNAポリメラーゼによるDNA合成によって進行するが、この役目を担うDNAヘリカーゼがMCM (minichromosome maintenance) 複合体である。一方、DNAに損傷や付加体が生じると複製の際にこれを修復する必要があるが、この過程ではFanconi貧血の原因遺伝子であるFANCD1、Werner症候群の原因遺伝子であるWRN、Bloom症候群の原因遺伝子であるBLMなど、複数のDNAヘリカーゼが関わっている。その中で、BLMはDNA相同組換えにおける過剰な姉妹染色分体の相同配列への侵入を防いで合成依存的単鎖対合 (Synthesis dependent strand annealing; SDSA) へ誘導し、あるいは姉妹染色分体が解離する際にdissolutionと呼ばれる解離を促すことによって、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; SCE) を抑制している。さらにBLMがDNA複製の障害となるグアニン四重鎖 (G-quadruplex; G4) と呼ばれるDNAの高次構造を解除することが明らかとなっている (Nat Commun 5:5556, 2014, PNAS 113:8448-53, 2016)。G4については、その解除を阻害してDNA複製障害をきたすG4安定化剤が多種同定されており、BRCA1/2不全乳癌を特異的に死滅させることが報告されている (Mol Cell 61:1-12, 2016)。正確なDNA複製を遂行するにはMCMとこれらの修復機構の協調が重要である。

(2)HERC2の機能：HERC2は残基数4834アミノ酸の巨大な蛋白質で、Ran-GEF活性を有すると考えられている複数のRCC-likeドメインおよびユビキチンリガーゼ (E3) 活性を有するHECTドメインをC末端に有している。研究代表者らはHERC2がBRCA1を抑制してG2/Mチェックポイントから細胞周期へのリカバリーに働いていること (Cancer Res. 70:6384-92, 2010)、チェックポイントシグナルに必須なATR-Chk1経路を仲介するClaspinと結合してDNA複製を制御することを報告してきた (Cancer Res. 71:5621-5, 2011)。これに対して同時期にHERC2がDNA 2本鎖切断の相同組換え修復においてRNF8とUBC13の会合を司る因子として報告されたが (Nat Cell Biol 12:80-86, 2010)、その後、同グループよりDT40細胞では相同組換え修復に必要でないことが報告されている (DNA repair 11:892-905, 2012)。一方、最近になりHERC2がClaspinの安定性を介してChk1の活性を制御していることが報告され (Nucl Acids Res 42:13110-21, 2014, Nucl Acids Res 42:13074-81, 2014)、研究代表者らの知見が裏付けられている。

(3)着想に至った経緯：研究代表者らは本研究課題の申請に先立ち、HERC2の免疫複合体に、BLM複合体 (BLM/TOP3A/RMI1/RMI2)、Replication protein A 複合体 (RPA1/RPA2/RPA3)、MCM複合体 (MCM2~7) およびImportin 複合体が存在するという事前解析結果を得ており、HERC2がBLMとWRNの姉妹染色分体交換 (SCE) およびG4解除機能に重要な役割を果たすというプレリミナリーな結果を得ていた。そこで本研究では、がんのHERC2機能不全が、DNA複製ストレス応答、G4解除機能を攪乱し、G4安定化剤を含む化学療法剤に対する感受性を亢進させることを明らかにすることに取り組んだ。

2. 研究の目的

DNAの正確な複製は生体の恒常性維持の基盤であり、内因性あるいは外因性の複製ストレスに対して多様なメカニズムで維持されている。その破綻はがんを誘発する。研究代表者はBRCA1と共役するHERC2が、細胞周期チェックポイントおよびDNA複製制御に関わることを解明してきた。最近新たにHERC2が正常複製に必須なDNAヘリカーゼであるMCM複合体および損傷応答DNAヘリカーゼであるBLM複合体と相互作用し、その機能を制御していることを見いだした。本研究ではHERC2がこれらDNAヘリカーゼの制御メカニズムを解明する。さらに、がんに認められるHERC2の反復性体細胞変異が、これらの機能に及ぼす作用を解析し、HERC2ががんの表現型と薬剤感受性に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではDNAの複製および複製ストレス応答におけるHERC2の機能解析としてDNAヘリカーゼを含む複合体の解析、さらにHERC2の核移行や細胞内局在に関わる相互作用の解析を行った。すでに作成してあるDox誘導性にHERC2に対するshRNAを発現するshHERC2細胞株各種とCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集にてHERC2のE3活性を死滅させた細胞 (HERC2^{E3/-}細胞) を用いて主な機能解析を行った。生化学的な解析としてRPAとの相互作用を中心に、複製およびストレス関連蛋白質の挙動を解析した。表現型の解析としてはSCE、G4の解析を中心に行い、薬剤感受性の解析も行った。

(1) HERC2と各DNAヘリカーゼとの相互作用の解析：Thymidine-nocodazole blockにて細胞周期を同調させた細胞を用いて細胞周期におけるHERC2とMCM及びBLM複合体の可溶性クロマチン分画における結合を免疫沈降にて解析した。DNA複製進行時またはmitomycin C (MMC)、hydroxyurea (HU)などで複製ストレスを加えた際のHERC2と関連タンパク質の細胞内局在変化を解析した。各複合体形成様式について、それぞれの構成因子をsiRNAにて発現を抑制した際、他の構成因子の結合状況を免疫沈降にて解析し、それぞれの複合体の結合が他の複合体に依存しているか否かを解析した。HERC2のフラグメントを用いて、HERC2と相互作用のある構成因子の結合部位を同定し、さらにそのフラグメントの過剰発現が複合体形成に対する影響も検

討し、HERC2 がこれらのアッセムブリー因子であるか否かを解析した。

(2) グアニン四重鎖(G4)の検出: Dox 誘導性 shHERC2 発現細胞株および HERC2^{E3/ E3}細胞を用いて、G4 を特異的に認識する BG4 抗体による蛍光免疫染色を行い、ソフトウェア SpotDetector^R による G4 の定量解析で G4 の蓄積を解析した。上記の細胞に BLM および WRN を同時にノックダウンし、エピスタシスを解析した。

(3) 姉妹染色分体交換 (SCE) への影響: Dox 誘導性 shHERC2 発現細胞株および HERC2^{E3/ E3}細胞を用いて、非刺激および低濃度の複製ストレス存在下での SCE の解析を行った。

(4) HERC2 免疫複合体と長さの異なるピオチン標識 1 本鎖 DNA を用いて、HERC2 に結合した BLM および RPA と 1 本鎖 DNA の結合様式を *in vitro* にて解析した。

(5) 上記細胞を用いて、非刺激および低濃度の複製ストレス存在下における、RPA2 のリン酸化およびユビキチン化を解析した。

(6) 上記細胞を用いて、放射線による DNA 2 本鎖切断、PARP 阻害剤、DNA 架橋剤、複製阻害剤および G4 安定化剤に対する感受性を Clonogenic survival アッセイにて解析した。

4. 研究成果

(1) HERC2 複合体形成: 質量分析にて HERC2 との結合が認められた BLM 複合体、WRN、RPA 複合体の結合様式を解析した。免疫沈降・ウェスタンブロット解析にて、HERC2 は BLM、TOP3A、RMI2、WRN、RPA1、RPA2、RPA3、BRCA1、BARD1 と細胞周期 S 期のクロマチン分画にて結合することが判明した。各構成因子をノックダウンで抑制して解析した結果、HERC2 と BLM/TOP3A/RMI2 複合体の結合は BLM を介している一方、HERC2 と RPA 複合体の結合は BLM および WRN に非依存的であった。Sephacrose 6 を用いたクロマトグラフィにて RPA 複合体は通常 669kDa 以上の巨大分子に BLM とともに存在するが、HERC2 が欠失した細胞では 44~440 kDa の BLM の存在しない分子内に存在することが判明した。また、HERC2 存在下であっても MMC にて複製ストレスを与えた細胞では RPA は HERC2 が欠失した状態と同じ挙動を示した。複製ストレス下で RPA が BLM および WRN 複合体から離脱することは免疫沈降・ウェスタンブロット解析でも確認された。

(2) HERC2 による SCE 制御: Dox 誘導性 shHERC2 発現 HeLa および HCT116-HERC2^{E3/ E3}細胞を用いて、非刺激および低濃度の CPT11 あるいは MMC による複製ストレス時における SCE を解析した。その結果、いずれの細胞においても、HERC2 の機能不全によって SCE は有意に増加し、特に複製ストレス時に顕著であった (いずれも $p < 0.0001$)。

(3) HERC2 による G4 制御: Dox 誘導性 shHERC2 発現 HeLa および HCT116 細胞を用いて G4 の蓄積を解析した。その結果、HERC2 ノックダウン細胞ではコントロールに比較しておよそ 3 倍程度の有意な G4 の蓄積を認め、この蓄積は BLM あるいは WRN のノックダウンに対してエピスタシスな関係を有していた。一方、BLM と WRN はエピスタシスな関係になく、両ヘリカーゼのダブルノックダウンにて相加的な G4 の蓄積増加が認められたが、この相加したダブルノックダウンの効果に対しても HERC2 のノックダウンはエピスタシスな関係にあった。一方、RPA1 のノックダウンは単独で HERC2 と同等な G4 の蓄積を示し、HERC2 とエピスタシスな関係にあった。HCT116-HERC2^{E3/ E3}細胞を用いた解析でも同様な結果が得られた。以上より HERC2 およびその E3 活性は RPA の機能を介して BLM あるいは WRN の G4 解除機能に必須な役割を果たしていることが示唆された。

(4) 複製ストレス時の BLM の RPA 核内 foci への集積における HERC2 の役割: 蛍光免疫染色にて、非ストレス時に HERC2 は RPA 核内複製フォークでの foci と共局在し、複製ストレス後に形成される stalled フォークにおける RPA foci からは離脱した。一方、*in vitro* では HERC2 が RPA を ssDNA 上供給する役割を果たすことが判明した。以上より、HERC2 は RPA の細胞内ストックとして重要な役割を果たし、複製ストレス時に RPA を ssDNA 局所に供給し、BLM、WRN と共役することが示唆された。

(5) Clonogenic survival assay にて、Dox 誘導性 shHERC2 発現 HeLa および HCT116-HERC2^{E3/ E3}細胞を用いて MMC、CPT11、HU および G4 安定化剤である pyridostatin および telomestatin に対する感受性を検討した。その結果、HERC2 のノックダウン、あるいは E3 活性の抑制によって、細胞は G4 安定化剤に特異的な有意な感受性の増加を示した。Big data 解析にて、多くのがんでは HERC2 の発現低下が認めら得ることから、HERC2 の低下はがんにおける G4 安定化剤の感受性亢進のバイオマーカーとなることが示唆された。

(6) HERC2 による RPA2 リン酸化およびユビキチン化の制御: *in vivo* において HERC2 は E3 活性を有する C 末端の HECT ドメインを介して RPA 複合体と結合していた。この結合はプロテアソーム阻害剤である MG132 存在下においてのみ検出可能であった。内因性 RPA2 のユビキチン化は HERC2 のノックダウンによって顕著に抑制された。また、HERC2 をノックダウンした細胞に HERC2 の HECT ドメインを add-back することによって RPA2 のユビキチン化は回復した。HERC2 の抑制は低濃度の HU あるいは aphidicolin による軽度の複製ストレス存在下における ATR による RPA2 の Ser33 残基のリン酸化を著明に抑制した。一方、高度なストレス下における DNA-PK あるいは ATM による RPA2 の Ser4/8 残基のリン酸化には影響を与えなかった。HCT116-HERC2^{E3/ E3}細胞を用いた解析にて、HERC2 の E3 活性依存的に検出される内因性 RPA2 のユビキチン化は ATR 阻害剤で抑制された。これらの結果から、RPA2 が高度な複製ストレスの際に RFWD3 や PRP19 によってユビキチン化されるのに対して、HERC2 は通常の細胞増殖における軽微な複製ストレス時におい

て、ATR による RPA2 のリン酸化およびリン酸化された RPA2 のユビキチン依存的分解において重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lai Y, Zhu M, Wu W, Rokutanda N, Togashi Y, Liang W, Ohta T.	4. 巻 9
2. 論文標題 HERC2 regulates RPA2 by mediating ATR-induced Ser33 phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50812-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wu W, Rokutanda N, Takeuchi J, Lai Y, Maruyama R, Togashi Y, Nishikawa H, Arai N, Miyoshi Y, Suzuki N, Saeki Y, Tanaka K, Ohta T.	4. 巻 78
2. 論文標題 HERC2 facilitates BLM and WRN helicase complex interaction with RPA to suppress G-quadruplex DNA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 6371-6385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-1877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Johmura Y, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, Maruyama R, Inoue JI, Fukukawa Y, Ohta T, Nkanishi M.	4. 巻 128
2. 論文標題 Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 5603-5619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI121679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 太田智彦, 朱明章, 吳文文.
2. 発表標題 PARP 阻害剤耐性獲得に対する治療戦略
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu Wenwen.
2. 発表標題 HERC2 regulates the status of Ser33-phosphorylated RPA2 through both induction and ubiquitin-dependent degradation.
3. 学会等名 The ubiquitin system: Biology, mechanisms and roles in disease(EMBO Workshop) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 呉文文, 竹内淳, 頼勇強, 三好康雄, 鈴木直, 佐伯泰, 田中啓二, 朱明章, 太田智彦.
2. 発表標題 HERC2はグアニン四重鎖 (G4) の主要な制御因子としてG4安定化剤の感受性を左右する.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yongqiang Lai, Mingzhang Zhu, Wenwen Wu, Yukiko Togashi, Tomohiko Ohta.
2. 発表標題 HERC2 ubiquitinates RPA2 in ATR dependent manner and promotes RPA to suppress G-quadruplex DNA.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 頼勇強, 呉文文, 梁偉新, 太田智彦.
2. 発表標題 Resistance of Fbxo22 knockout cancer cells to poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)inhibitor
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

聖マリアンナ医科大学大学院 医学研究科 応用分子腫瘍学
<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----