

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590348

研究課題名(和文)複製フォークの進行、停止回復におけるBRCA1/HERC2の役割

研究課題名(英文)The role of BRCA1-HERC2 complex in DNA replication fork progression and stress response

研究代表者

呉 文文(WU, WENWEN)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10434408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HERC2はBRCA1依存的に複製フォークの安定化因子Claspinと複合体を形成する。HERC2はS期進行を抑制するが、ClaspinはS期進行を促進する。HERC2はClaspinとともに複製フォークに共同在し、Claspin機能不全で生じる複製フォークの進行停止および休眠複製開始点の異常発火がHERC2の削除によってレスキューされる。HERC2はClaspinとともに複製フォークの進行および安定性を制御する。HERC2はClaspin欠失時や、DNA傷害時にATRIPと複合体を形成し、ATRによるMCM2のリン酸化を促進し、BRCA1を介したS期チェックポイント機構に機能する。

研究成果の概要(英文)：HERC2 is an E3 ubiquitin ligase that targets breast cancer suppressor BRCA1 for degradation. Here we show that HERC2 is a component of the DNA replication fork complex that plays a critical role in DNA elongation and origin firing. In the presence of BRCA1, HERC2 interacts with Claspin, a protein essential for G2/M checkpoint activation and replication fork stability. Claspin depletion slowed S-phase progression and additional HERC2 depletion reduced the effect of Claspin depletion. HERC2 interacts with replication fork complex proteins. Depletion of HERC2 alleviated the slow replication fork progression in Claspin-deficient cells, suppressed enhanced origin firing. During replication stress response, the amount of HERC2 is increased in the ATRIP complex, to result in an increase of MCM2 phosphorylation by ATR. HERC2, Claspin, and BRCA1 possibly cooperate on activation of Chk1 and Plk1 to regulate DNA replication progression and origin firing by facilitating MCM2 phosphorylation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：HERC2 BRCA1 Claspin 複製フォーク ATRIP MCM2

1. 研究開始当初の背景

BRCA1については、機能多様なハブプロテインとしてゲノムの安定性を制御する癌抑制遺伝子であると認識されている。他の癌抑制遺伝子と同様に、細胞分裂とDNA修復をコントロールし、細胞を異常増殖しないように保つ。近年の研究により、その機能が細胞周期チェックポイントとDNA修復機構に絞られてつつある。

癌化の主な原因となるDNA二重鎖切断(DSB)は停止した複製フォークから生じるものが多い。BRCA1の欠損細胞では、二重鎖切断を修復する相同組換え修復が完了できず、細胞周期チェックポイントの異常を引き起こす。BRCA1はメディエーターとして細胞周期の制御とDNA修復に機能しているとの認識はある。BRCA1欠損によるチェックポイント経路の下流にあるエフェクター分子の活性低下との現象が報告されているが、BRCA1自体がチェックポイントシグナルの伝達にどのように関わっているかについては、その分子機構が不明である。

BRCA1は細胞周期S期で発現のピークが認められ、S期ドットを形成していて、DNA複製フォークの進行に密接に関わっていると考えられるが、BRCA1がDNA複製時に纏れないようにtopoisomerase と結合するとの報告はあるが、BRCA1の複製フォークに関わる分子機構についてはほとんど解明されていないため、BRCA1のDNA修復における分子機構は不明瞭な点が多い。

BRCA1の細胞周期チェックポイント制御とDNA損傷修復分子機構はさまざまな視点から研究を進められているが、この二つのイベントは複製フォークにおける分子機構とも密接に関連していて、それぞれ独立している分子機構とは考えがたい。BRCA1が複製フォーク複合体の形成、複製フォークの進行阻害及びその回復過程との関与を理解することは、その細胞周期チェックポイントとDNA修復分子機構の解明には重要だと考えられる。

申請者らは、各細胞周期におけるBRCA1の結合蛋白質を検索したところ、BRCA1のコピキチンリガーゼであるHERC2がS期特異的にBRCA1と結合し、BARD1から離脱したBRCA1を不安定させ、BRCA1のチェックポイント機構を機能停止状態にする役割を果たしていることを報告し、BRCA1が司っている細胞周期のチェックポイント制御機構に重要な役割を担い、BRCA1の細胞周期調節機構には必須因子であることを明らかにした。更に、HERC2を介して、BRCA1が複製フォークの進行及び

停止した複製フォークの回復に影響を及んでいる所見が得られ、BRCA1の結合タンパク質でもある複製フォーク構成因子が機能不全時に引き起こす細胞周期の停止はHERC2によって制御されるのを見出した。BRCA1/HERC2が停止した複製フォークの安定化に寄与し、複製回復の分子機構と関与している可能な分子機序を示した。

2. 研究の目的

本研究の目的としては、BRCA1は複製フォーク複合体との相関性を検討するという角度から、BRCA1の細胞周期制御の分子機構を解明し、BRCA1の癌抑制機構を含めた新規な生命現象を探り理解して、これらを標的とする新規抗癌剤開発のアプローチに理論的根拠を提供する。

3. 研究の方法

BRCA1/HERC2 複合体と DNA 複製関連タンパク質との相互作用及び細胞周期進行に与える影響について：

- (1) 蛍光免疫染色法を用いて、BRCA1/HERC2複合体が細胞周期における細胞核内局在を解析すると同時に、他の複製因子ATM,ATR,Chk1,TopoBP1,Claspin,PCNA,MCM7,MCM2との共有関係を検討した。
- (2) 免疫沈降技術にて、クロマチン結合タンパク質分画法を用いて、BRCA1/HERC2複合体が他のDNA複製関連タンパク質(TopBP1,53BP1,MDC1,Claspin,PCNA)との相互作用を検討した。
- (3) BrdUラベリング法を用いて、RNA干渉技術も取り入れ、HERC2とClaspinが細胞周期進行への影響をフローサイトメトリー(FACS)で検討した。
- (4) BrdU/IdU Dual-Color DNA ラベリング/DNAファイバー伸展分子コーミング法にて、RNA干渉技術も取り入れ、BRCA1/HERC2が複製フォークの進行速度、複製開始点への影響を解析した。

BRCA1/HERC2 複合体が複製フォーク進行を制御するメカニズムについて：

- (1) 免疫沈降技術にて、RNA干渉技術も取り入れ、Aphidicolin処理による複製フォーク進行を停止させ、BRCA1/HERC2複合体が複製フォーク進行を制御するタンパク質との相互作用を検討した。
- (2) BrdU/IdU Dual-Color DNA ラベリング/DNAファイバー伸展分子コーミング法にて、RNA干渉技術も取り入れ、Aphidicolin処理による複製フォーク進行を停止させ、複製スト

レスを与えてから、BRCA1/HERC2が停止した複製フォーク安定性及び複製回復への影響を評価した。

(3) プロテアソーム阻害剤を添加して、BrdU/IdU Dual-Color DNA ラベリング/ DNAファイバー伸展分子コーミング法にて、HERC2のE3リガーゼ活性が停止した複製フォーク安定性及び複製回復への影響を検討した。

(4) Aphidicolin処理による複製フォーク進行を停止させ、RNA干渉技術も取り入れて、MCM2のリン酸化をウェスタンブロットで検出し、BRCA1を介したATR-Chk1キナーゼカスケードを検討した。

(5) RPAの安定発現細胞を用いて、RNA干渉技術も取り入れて、MCMヘリカーゼによる一本鎖DNAの形成への影響を検討しHERC2とDNAポリメラーゼ複合体の分子間の相互作用も検討した。

4. 研究成果

免疫沈降技術を用いた検索により、HERC2はS期チェックポイントのメディエーターとして機能しているClaspinと複合体を形成し、BRCA1は複合体の安定性に機能を寄与していることを明らかにした。

HERC2はClaspinとともに複製フォークに共局在し、PCNA、TopBp1、MCM7など複数の複製因子とも複製フォーク上に共局在する。HERC2は複製に必要な因子の一つとして新たに同定した。

ClaspinはS期進行を促進する。Claspin機能不全時、複製フォークが不安定となり、複製も停止状態に陥り、細胞はS期停止が生じる。HERC2はS期進行を抑制する。HERC2のノックダウンでClaspin機能不全によるS期進行の停止を回復させることができ、HERC2/Claspin複合体はS期進行を制御し、複製フォークの進行や安定に機能していることを明らかにした。

Aphidicolin処理/BrdUラベリングにて停止した複製フォークを可視化し、HERC2は停止した複製フォークと共局在することを確認した上、DNAファイバー伸展技術を用いて、HERC2が複製フォークの進行速度、複製開始点への影響を検討した。HERC2のノックダウンは、単独で複製フォークの進行速度や複製開始点の発火へ影響が少ないが、Claspinのノックダウンによって生じた複製フォークの進行停止および休眠複製開始点の異常発火をレスキューする。プロテアソーム阻害剤を添加することでHERC2/Claspin複合体が複製フォーク進行や安定に対する制御への影響は見られないことから、HERC2の蛋白分解

活性は複製フォーク複合体の安定性制御に必要がないと考えられた。

複製時、MCMヘリカーゼによってほどかれた一本鎖DNA(ssDNA)に、Claspin欠失でDNAポリメラーゼ複合体がローディングできず、複製フォークに不安定性をもたらしている。HERC2はDNAポリメラーゼ複合体と直接的な分子間の相互作用が認められなく、HERC2のノックダウンでClaspin欠失によるssDNA異常も改善されないことから、HERC2は複製フォーク安定制御への直接的な関与はない。一方、HERC2はClaspin欠失時や、DNA傷害時にHERC2はATRIPと複合体を形成して、この相互作用によってATRがMCM2のリン酸化を促進して、BRCA1を介したATR-Chk1キナーゼカスケード細胞周期チェックポイント機構に機能することを示した。

HERC2は多数の複製因子と複合体を形成し、その中でも、Claspinとの結合はBRCA1の発現に依存して、複製フォーク複合体ダイナミクスに関与し、複製進行や複製開始点の発火に機能する。BRCA1が細胞周期制御のメカニズムに新しい知見を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K, Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Genes to Cells**. 2013 (in press) (査読あり)
2. Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T. HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. **Cancer Res**. 71:5621-5. 2011 (査読あり)
3. Ohta T, Sato K, Wu W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. **FEBS Lett**. 2011; 585:2836-2844(査読あり)

[学会発表](計2件)

1. 呉 文文 ヘテロクロマチン領域のDNA損傷応答におけるBRCA1-E3活性の役割
2013年1月29日 第1回 新学術領域「ユビキチン制御」領域会議 神戸

2. 吳 文文 BRCT ドメインと HP1 の結を
介した DNA 損傷局所への BARD1 の集積
2013年12月11日 第2回 新学術領域
「ユビキチン制御」領域会議 熱海

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/t-oncology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吳 文文 (WU WENWEN)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10434408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし