

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	馬場 美聡
論文題目	Studies on structure and function of ribonuclease H2 (リボヌクレアーゼ H2 の構造と機能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>リボヌクレアーゼ H2 (RNase H2) は、RNA/DNA 中の RNA 鎖を加水分解する。本酵素はさらに、1 個のリボヌクレオチド (R) が埋め込まれた二本鎖 DNA 中の R の 5' 側を切断する。ヒト RNase H2 は A、B、C サブユニットから成る三量体である。近年、R がヒトゲノム DNA に数千塩基対に 1 塩基の割合で存在し、RNase H2 がこれの除去に関与していることが明らかになった。また、ゲノム DNA 中に R が多く取り込まれた細胞では自然免疫応答が亢進することや、ヒト RNase H2 の遺伝性変異が神経疾患エカルディーグティエール症候群 (AGS) の原因であることが報告された。</p> <p>本論文は、ヒト RNase H2 の構造と機能に焦点を当て、(i) ヒト RNase H2 の活性と安定性に対する中性塩と pH の影響、(ii) AGS を引き起こす変異を有する 6 種類の組換えヒト RNase H2 の活性と安定性、(iii) ヒト RNase H2 の活性部位に存在し真核生物で保存されている Val143 の、触媒活性と基質特異性における役割、並びに (iv) RNase H2 をノックアウトしたマウス NIH3T3 細胞の性状を解析することで、RNase H2 の生理学的な機能を考察した基礎研究である。さらに、この細胞の、ゲノムプロファイリング法による変異原アッセイ法への応用についても検討した。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第一章では、ヒト野生型 RNase H2 の活性と安定性に対する中性塩と pH の影響を調べた。(His)₆ が N 末端に付加したヒト RNase H2 の A、B、C サブユニットの遺伝子を大腸菌でポリシストロニックに発現させ、菌体内可溶性画分から三量体を精製した。活性測定の基質には、3'-FITC 標識 18 塩基 RNA とこれに相補的な 5'-Dabcyl 標識 18 塩基 DNA から成るヘテロ二本鎖 (R18/D18)、あるいは 1 塩基の R を含む 3'-FITC 標識 18 塩基 DNA と上記 18 塩基 DNA から成る二本鎖 (R1/D18) を用いた。活性はナトリウム塩、カリウム塩、ルビジウム塩では活性化され、リチウム塩、セシウム塩では阻害された。熱失活は塩の添加によって抑制された。活性解離基のプロトン解離定数 pK_a および脱プロトン化におけるエンタルピー変化から、活性解離基は、酸性側が Asp または Glu、塩基性側が Lys と推定され、酸性側の活性解離基は DEDD モチーフとして保存されている Asp34, Glu35, Asp141 のいずれか 2 個、塩基性側の活性解離基は DSK モチーフとして保存されている Lys69 であると考えられた。</p> <p>第二章では、AGS 患者で同定された遺伝性変異を有する 6 種類の変異型酵素 (A-G37S (A サブユニットの Gly37 が Ser に置換された変異体)、A-N212I、A-R291H、B-A177T、B-V185G、C-R69W) の活性と安定性を解析した。A-G37S の活性は野生型酵素 (WT) の 1%以下、他の変異体の活性は WT の 51-120%であった。210-340 nm の円偏光二色性スペクトルは全変異体と WT で差がなく、変異導入による二次構造の変化はないと考えられた。222 nm の楕円率を指標とした変異体の融解温度は 50-53°C で、WT (56°C) よりも低かった。これらのことから、A-G37S は活性と安定性がとも</p>			

に WT よりも低く、他の変異体は安定性が WT よりも低いことが示唆された。

第三章では、ヒト RNase H2 の Val143 の役割を解析した。Val143 を他のアミノ酸残基に置換した 19 種類の変異体のうち、V143C と V143M を除く 17 種類で精製酵素が得られた。R1/D18 切断活性 (活性 A) は、野生型酵素 (WT) を 100% とすると、変異体は 0.05~130% であった。R18/D18 切断活性 (活性 B) は、WT を 100% とすると、変異体は 0.02~42% であった。活性 B に対する活性 A の割合は、WT を 1 とすると、変異体は 0.2~5.7 であった。V143Y と V143W の値 (それぞれ 5.6 と 5.5) が高かったことから、チロシンやトリプトファンのように大きな側鎖を有する残基は、切断されるホスホジエステル結合の 5'側のヌクレオチドの糖の 2'OH と立体障害を起こすことが示唆された。以上の結果から、ヒト RNase H2 の Val143 は触媒活性と基質特異性に必須ではないものの重要な役割を担うことが示された。

第四章では、CRISPR/Cas9 システムを用いて RNase H2 A サブユニットを欠損したマウス胎児由来 NIH3T3 細胞株 (KO 株) を樹立し、その性状を解析した。1 個のリボヌクレオチドを含む 12 塩基対の二本鎖 DNA を基質として細胞溶解液の RNase H2 活性を測定したところ、野生株では活性が検出されたが、KO 株では検出されなかった。ゲノム DNA のアルカリアガロースゲル電気泳動で、KO 株のゲノム DNA は野生株よりも低分子側にシフトした。ゲノム DNA を用いたニックトランスレーションアッセイで、KO 株のゲノム DNA は野生株よりも ³²P 標識 dCTP が多く取り込まれた。これらのことから、RNase H2 の欠損がゲノム DNA へのリボヌクレオチドの蓄積の直接の原因であることが示唆された。インターフェロン誘導性遺伝子群 (IFIT1、IFIT2、IFIT3、CXCL10)、インターフェロン制御因子 (IRF7) および cGAS/STING 遺伝子の mRNA の発現量は、KO 株と野生株で大きな差がなかった。このことから、RNase H2 の欠損が自然免疫応答亢進の直接の原因ではないことが示唆された。

第五章では、哺乳動物細胞を用いたゲノムプロファイリング法による変異原アッセイ (GPMA) 法を構築した。GPMA 法は、化学物質存在下で大腸菌を培養し、ゲノム DNA に生じた変異を、ランダム PCR 増幅産物の温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) のパターンの変化から検出する方法である。GPMA 法の感度は 10 ppb であり、現在広く行われている変異原アッセイ法である Ames テストよりも感度が 100 倍高い。Ames テストで変異原性が検出される化学物質 (ベンゼン、硫酸ジエチル、抱水クロラール、酸化プロピレン) または検出されない化学物質 (無水酢酸、メタンスルホン酸) 100 ppb 存在下で NIH3T3 細胞を 4 世代培養し、ゲノム DNA からランダム PCR を行い、増幅産物を TGGE にかけた。得られた TGGE のパターンの変化は大腸菌を用いた場合とよく相関し、GPMA 法に哺乳動物細胞が使用可能であることが示唆された。第四章で作製された KO 株のゲノム修復能は野生株より低い可能性があることから、以上の結果は、KO 株を GPMA 法に用いると感度がさらに向上する可能性を示唆する。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400~1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 500~2,000 字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ヒト RNase H2 の構造と機能については不明な点が多い。また、RNase H2 の遺伝性変異がゲノム DNA 中のリボヌクレオチドの蓄積および細胞の自然免疫応答亢進を引き起こすメカニズムもよく知られていない。これらを解明することはゲノム DNA の修復機構が明らかになるだけでなく、ゲノムの不安定化につながる化学物質、食品添加物および天然物のスクリーニング系の構築にもつながる。本論文は、ヒト RNase H2 の構造と機能を解析した一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下の五つに要約される。

1. ヒト RNase H2 の活性はカチオンの種類により異なる影響を受け、熱失活は塩の添加によって抑制されることを見出した。活性の pH プロフィールと熱力学的解析より、酸性側の活性解離基は Asp または Glu、塩基性側は Lys と推定した。
2. AGS の遺伝性変異をもつ 6 種類のヒト RNase H2 (A-G37S、A-N212I、A-R291H、B-A177T、B-V185G、C-R69W) のうち A-G37S で顕著な活性低下が、全変異体で安定性低下がみられることを見出した。
3. Val143 を他の 19 種類のアミノ酸に置換した変異型ヒト RNase H2 の活性と熱安定性の解析から、Val143 は触媒活性と基質特異性に必須ではないが重要な役割を担うことを見出した。
4. RNase H2 をノックアウトしたマウス NIH3T3 細胞 (KO 株) を樹立した。KO 株では、ゲノム DNA 中にリボヌクレオチドが蓄積するが、自然免疫応答関連遺伝子の mRNA の増加はみられないことを見出した。
5. マウス NIH3T3 細胞を用いた GPMA 法を構築した。本法での温度勾配ゲル電気泳動のパターンは、従来の大腸菌を用いた GPMA 法のものとはよく一致した。さらに KO 株の GPMA 法への応用の可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、RNase H2 の構造と機能に焦点を当て、活性と安定性に対する中性塩と pH の影響、AGS の遺伝性変異をもつ変異体の活性と安定性、活性部位に存在する Val143 の触媒活性と基質特異性における役割、RNase H2 をノックアウトしたマウス NIH3T3 細胞の性状と応用面を明らかにしたものであり、酵素化学、細胞生物学、生物機能変換学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 2 年 2 月 7 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)