

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)

馬場 美聡

リボヌクレアーゼ H2 (RNase H2) は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖を加水分解する活性 (RNA 鎖分解活性) を有する酵素である。本酵素はさらに、1 塩基のリボヌクレオチドが埋め込まれた二本鎖 DNA 中のリボヌクレオチドの 5' 側を切断する活性 (シングルリボヌクレオチド除去活性) も有する。近年、リボヌクレオチドがゲノム DNA に数千塩基対に 1 塩基の割合で取り込まれていることや、RNase H2 がゲノム DNA 中のリボヌクレオチドの除去に関与していることが明らかになった。また、ヒト RNase H2 の遺伝性変異が神経疾患エカルディーングティエール症候群 (AGS) の一因であり、患者の細胞では自然免疫応答が亢進していることが報告された。

ヒト RNase H2 の構造と機能については不明な点が多い。本学位論文では、ヒト RNase H2 の構造と機能について、酵素化学的手法および細胞生物学手法を用いて解析した。

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。RNase H2 の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。このことから、カチオンの種類により活性に対する影響が異なることが示された。RNase H2 の熱失活は塩の添加によって抑制された。

RNase H2 の活性の pH プロフィールは、活性解離基が酸性側で 2 個、塩基性側で 1 個としたとき、理論式によく一致した。活性解離基のプロトン解離定数 pK_e (pK_{e1} , pK_{e2}) およびは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 と推定された。このことから、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。

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。野生型酵素 (WT) と比較して、A-G37S の活性は顕著に低下した一方で、他の変異型酵素の活性は WT と同程度であった。CD スペクトルは全変異型酵素と 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 $[\theta]$ を指標とした変異型酵素の融解温度は、WT よりも低く、変異導入によって酵素の安定性が低下していることが考えられた。これらのことから、A-G37S は活性と安定性がともに WT よりも低く、他の変異型酵素は安定性のみが WT よりも低いことが示唆された。

ゲルろ過の溶出パターンは、A-R291H では 2 つのピークが得られ、フラクションの

SDS-PAGE より最初のピークは三量体と BC サブユニット複合体の混合物、後のピークは A サブユニットと考えられた。WT と他の変異型酵素では 1 つのピークが得られ、三量体と考えられた。これらのことから、遺伝性変異 A-G37S による AGS 発症は酵素活性の低下によるものであることが示唆された。他の 5 種類の遺伝性変異については、AGS 発症が酵素の安定性低下によるものか、他のタンパク質との相互作用の低下によるものかは不明であり、今後の課題である。

第三章では、ヒト RNase H2 活性部位に存在する Val143 の活性における役割を解析した。ヒト RNase H2 と 1 塩基のリボヌクレオチドを含む二本鎖 DNA の複合体、あるいはヒト RNase H2 と RNA/DNA ハイブリッドとの複合体の立体構造を予測したところ、Val143 が、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と近接していることが認められた。この Val143 は真核生物の RNase H2 で保存されている。

Val143 を他のアミノ酸残基に置換した 19 種類の変異型酵素を調製したところ、V143C と V143M を除く 17 種類で精製酵素が得られた。Val143 をかさ高い、疎水性アミノ酸 (F、I、L、W) または極性アミノ酸 (Y) に置換したとき、変異型酵素は野生型酵素 (WT) の中程度の活性を有していた。一方、Val143 を荷電性アミノ酸 (D、E、K、H、R)、疎水性または極性アミノ酸 (A、G、N、Q、S、T、P) に置換したとき、変異型酵素の活性は顕著に低下した。このことから、高い活性を有するためには 143 位はバリンが最適であることが示された。RNA 鎖分解活性に対するシングルリボヌクレオチド除去活性の割合は、WT を 1 とすると、V143Y と V143W は WT の 5 倍高い値を示した。このことから、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。

WT と 6 種類の変異型酵素 (V143D、V143K、V143I、V143Y、V143G、V143N) について、活性の KCl 濃度依存性を解析した。WT と変異型酵素はともに、低濃度の KCl 存在下では活性化され、高濃度の KCl 存在下では阻害された。また、WT より変異型酵素の方が KCl により大きく活性化されたことから、Val143 への変異による活性低下に、酵素と基質との静電反発が関与していることを示唆する。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絶対不可欠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 を欠損したマウス胎児由来 NIH3T3 細胞株を樹立し、その性状を解析した。pGuide-it-ZsGreen1 ベクターを用いて、マウス RNase H2 の A サブユニットをコードする遺伝子 *Rnaseh2a* のエキソン 2 を標的とするガイド RNA および Cas9 タンパク質を NIH3T3 細胞に導入した。限界希釈法により得られた単一クローンの標的配列を PCR により増幅して塩基配列を解析したところ、16 塩基が欠失しフレームシフト変異を起こしていた (KO 株)。野生株 (WT 株) および KO 株の細胞溶解液に対し A サブユニットに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析を行ったとこ

ろ、WT 株ではバンドが検出されたが、KO 株で検出されなかった。細胞溶解液の RNase H2 活性を測定したところ、シングルリボヌクレオチド除去活性が WT 株では検出されたが、KO 株では活性が検出されなかった。これらのことから、KO 株では RNase H2 がタンパク質として発現されていないことが示された。

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 WT 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、インターフェロン制御因子および cGAS/STING 遺伝子の mRNA の発現量を qRT-PCR 法により測定したところ、KO 株と WT 株で大きな差はみられなかった。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。ゲノム DNA へのリボヌクレオチドの蓄積と自然免疫応答の亢進をつなぐシグナル経路の解明が今後の課題である。

ゲノムプロファイリング法による変異原アッセイ (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、PCR 増幅産物の DNA 融解温度の変化に基づく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。現在広く行われている変異原アッセイ法である Ames テストは、復帰突然変異を計測する方法であり、感度は 1 ppm である。これに対し、GPMA 法は感度が 10 ppb であり、Ames テストよりも感度が高い。GPMA 法を食品の変異原性の測定に使用する場合、ヒトの遠縁種である大腸菌よりも哺乳動物細胞を用いる方が好ましいと考えられる。第五章では、大腸菌の代わりにマウス NIH3T3 細胞を用いた GPMA 法の構築を試みた。

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) あるい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 細胞を培養した。ゲノム DNA を鋳型とし、ランダム PCR を行い、増幅産物を TGGE にかけた。化学物質添加による TGGE の特徴点の変化を求めたところ、大腸菌を用いた場合とよく相関した。このことから、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。第四章で作製した RNase H2 をノックアウトした NIH3T3 細胞のゲノム修復機能が野生型 NIH3T3 細胞よりも低く、本細胞を GPMA 法に用いると感度がさらに向上する可能性が考えられる。これらの検討は今後の課題である。