

平成 2 7 年 6 月 2 3 日現在

機関番号： 1 2 1 0 2

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2013 ~ 2014

課題番号： 2 5 6 5 0 0 2 8

研究課題名 ( 和文 ) リボヌクレオチド除去修復におけるRNase H2の機能

研究課題名 ( 英文 ) RNase H2 is essential for ribonucleotide excision repair during DNA replication

研究代表者

柏原 真一 ( KASHIWABARA, Shin-ichi )

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号： 0 0 2 5 4 3 1 8

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 2,900,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : リボヌクレアーゼH2(RNase H2)は、二本鎖DNA中に存在するモノリボヌクレオチド (rNMP) を認識・切断するRNA分解酵素である。RNase H2を欠損したマウスの胚ゲノム中には多数のrNMPが存在し、また、Cyclin G1やp21などのDNA損傷応答遺伝子群の発現が上昇していた。さらに、本酵素は正常な染色体DNA複製を介した細胞増殖には不可欠ではあるが、細胞の生存そのものには必須でないことが示された。以上の結果より、RNase H2複合体は複製に際して誤って取り込まれたrNMPの除去修復というゲノム監視機構を介して、正常なDNA複製と細胞増殖に必須であることが判明した。

研究成果の概要 ( 英文 ) : RNase H2 is an enzyme capable of cleaving the 5' -phosphodiester bond of single ribonucleotides (rNMPs) embedded in RNA/DNA heteroduplexes. Embryos homozygous for the targeted mutation of Rnaseh2a gene exhibited gross apoptosis and failed to develop beyond E10.5. Chromosomal DNA from mutant embryos contained numerous rNMPs. Expression of DNA damage response genes, including cyclin G1 and p21, was up-regulated by the absence of RNase H2. It was also found that the enzyme is essential for normal cell proliferation via correct chromosomal DNA replication but is dispensable for cell survival. These results indicate that RNase H2 is a key enzyme responsible for eliminating rNMPs misincorporated during DNA replication, thereby ensuring genome stability and normal cell proliferation.

研究分野： 分子細胞生物学

キーワード： リボヌクレオチド除去修復 ゲノム安定性 RNase H2

## 1. 研究開始当初の背景

DNA は遺伝情報のより安定な担い手として、RNA ワールドから進化したと信じられている。リボヌクレオチドは、リボース環 2' 位に反応性に富む水酸基が存在するという点でデオキシリボヌクレオチドとは異なる。このことが生理的条件下における RNA の加水分解に対する感受性をきわめて高いものにしている。したがって、染色体ゲノム DNA 中のリボヌクレオチドの存在はゲノム不安定化や変異の脅威となりうる。このようなリボヌクレオチドの誤った取り込みは、複製型 DNA ポリメラーゼの dNTP に対する厳密な選択性により防御されていると考えられてきた。しかしながら、近年の酵母を用いた *in vitro* の研究により、生理的条件下における rNTP の細胞内濃度は dNTP 濃度を上回ること、またそのような条件下ではそれぞれ頻度は異なるものの DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\delta$ , および  $\epsilon$  のいずれも、数百から数千ヌクレオチド毎にリボヌクレオチドを取り込みうることが示された (Nick McElhinny *et al.*, *PNAS*, 2010)。したがって、ゲノム安定性維持のためにはリボヌクレオチドを除去する機構が存在しなければならない。

リボヌクレアーゼ H (RNase H) は、RNA/DNA ハイブリッド中の RNA 鎖を特異的に切断する酵素である。ほとんどすべての生物は、RNase H1 と RNase H2 という少なくとも 2 つのタイプの RNase H を有する。RNase H1 は基質の切断に最低 4 つの連続したリボヌクレオチドを必要とするモノマー酵素であり、その欠損マウスはミトコンドリア DNA 複製不全のため E9.5 前後で胚性致死となる (Crouch *et al.*, *Mol. Cell*, 2003)。一方、RNase H2 は RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖に加え、さらに合成二本鎖 DNA 中の単ーリボヌクレオチドを認識し、その 5' 側を切断することができる。真核生物の RNase H2 が酵素活性を発現するためには、活性残基を含む A サブユ

ニットが B および C サブユニットと 3 量体を形成することが必須である。また、異種核酸や核酸代謝異常はインターフェロン応答を惹起することが知られているが、ヒトにおいて RNase H2A, B, C いずれのサブユニットをコードする遺伝子の変異は、自己免疫疾患である Aicardi-Goutieres 症候群 (AGS) を引き起こす。

申請者らは以前に、E10.5 前後で胚性致死となる RNase H2A サブユニットの遺伝子欠損マウスを作製した。上述のような近年の知見から、RNase H2 が染色体 DNA の複製に際し誤って取り込まれたリボヌクレオチドの除去修復にかかわっているのではないかと考え、欠損マウス胚の染色体 DNA をアルカリ処理したところ、野生型と比べて明らかな切断が認められた。このことは、*Rnaseh2a* 欠損胚の染色体 DNA 中にリボヌクレオチドが多数存在することを意味している。本研究課題は、このような背景をもとに立案されたものである。

## 2. 研究の目的

これまでの修復研究は、塩基除去修復 (BER) やヌクレオチド除去修復 (NER) および校正修復等のデオキシリボヌクレオチドに関するものがほとんどであったように思われる。もしリボヌクレオチドが除去されなかった場合、DNA double-strand break (DSB) や DNA 損傷応答 (DNA damage response) が起こるか、また細胞増殖・生存にどのような影響をおよぼすかを調べ、染色体 DNA の複製において誤って取り込まれたリボヌクレオチドの除去修復 (ribonucleotide excision repair: RER) という新規の「ゲノム監視機構」の存在を明らかにすることを目的とした。またこれにより、生体内における主要な RNase H 活性でありながら長い間不明であった RNase H2 の機能が解明されることが期待される。

さらに、相互作用因子の解析を通じて、

RNase H2 変異に起因する Aicardi-Goutieres 症候群の発症メカニズムの解明につなげることも視野にいたした。

### 3. 研究の方法

(1) 組換え RNase H2 複合体を用いた *Rnaseh2a* 欠損マウス胚ゲノムの切断

*Rnaseh2a* 欠損マウス胚由来のゲノム DNA をアルカリ処理すると、野生型と比較して顕著な切断が認められたことが、本研究計画の発端となっている。この点をさらに明確にするために、培養細胞にて RNase H2 の各サブユニットを FLAG タグを有するような形で発現させ、FLAG M2 アガロースを用いて RNase H2 複合体を精製した。精製複合体を用いて、欠損マウス胚ゲノムの切断の有無を調べた。

(2) DNA 損傷および損傷応答の検証

*Rnaseh2a* 欠損マウス胚ゲノムにリボヌクレオチドが取り込まれることにより、DNA double-strand break (DSB)ならびに複製停止がおこっているとすれば、ATM/ATR シグナルを介した DNA 損傷応答遺伝子群の発現が上昇していることが期待される。これらの点について、抗 $\gamma$ H2AX 抗体を用いた免疫染色と RT-PCR により検討した。

(3) 細胞増殖・生存への影響評価

欠損マウス胚では、E7.5 以降で分化異常というよりむしろ増殖遅延が認められたことから、DNA 複製および細胞増殖能が低下していることが推測された。そこで、DNA 複製が行われない心筋細胞を調製・培養し、拍動の継続を指標として RNase H2 の欠損が細胞の生存そのものに必須であるかについて評価した。

(4) RNase H2 各サブユニット間の相互作用解析

これまでの報告により、RNase H2A, B, C 各サブユニットからなる 3 量体構造の形成が活性発現に必須であること、また各サブユニットの *in vivo* における安定性には相互依存関係があることが示唆されている。そこで、*Rnaseh2a* 欠損マウス胚における B および C サブユニットの存在について、ウェスタンブロット法により検証した。また、各サブユニットがどのような相互作用を介して 3 量体構造を形成するのかについて、GST プルダウン法を用いて検討した。

(5) 修復・複製関連タンパク質との相互作用解析

*Rnaseh2a* 欠損による胚発生停止が DNA 修復・複製不全によるものであった場合、PCNA や FEN1 および DNA polymerase  $\delta$  などの修復・複製関連タンパク質の減少を伴う可能性が考えられた。そこでこれらの存在量をウェスタンブロット法により調べた。また、RNase H2 は合成二本鎖 DNA 中のモノリボヌクレオチドの 5' ホスホジエステル結合を切断するのみであり、除去することはできない。さらに、いずれのサブユニットにも明確な核移行シグナルは存在しないことから、複製フォークスにおいて機能するためにはなんらかの修復・複製関連因子と相互作用する必要があることが推測された。そこで、免疫沈降法と PMF 解析により協働因子の同定を試みた。

(6) ミトコンドリア DNA 複製への関与

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は DNA polymerase  $\gamma$  により複製されるが、リボヌクレオチドの除去が行われないため、多くのリボヌクレオチドが存在することが知られている。したがって、RNase H2 の欠損は mtDNA の複製には影響しないことが予想された。このことを証明するために、mtDNA にコードされる COX Iなどを指標にして、ゲノム PCR, RT-PCR, およびウェスタンブロット解析を

行った。また、MitoTracker を用いたミトコンドリア染色や電子顕微鏡観察等、形態学的な解析も行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 組換え RNase H2 複合体を用いた *Rnaseh2a* 欠損マウス胚ゲノムの切断

FLAG タグを有する RNase H2A, B, C のいずれかのサブユニットを HEK293T 細胞で発現させ、FLAG M2 アガロースを用いて複合体を精製した。精製複合体を用いて、欠損胚ゲノムの切断を試みたが、量的な問題のため明確な結果は得られなかった。

##### ( 2 ) DNA 損傷および損傷応答の検証

抗 $\gamma$ H2AX抗体を用いた免疫染色により、*Rnaseh2a*欠損胚ゲノムではDNA double-strand breakがおこっていることが示された。また、その欠損マウス胚では、*Cyclin G1*, *p21*, *Phlda3* および *Trp53inp1* などのDNA損傷応答遺伝子群の発現が上昇していることがRT-PCRにより明らかとなった。したがって、染色体ゲノムにおけるリボヌクレオチドの存在はゲノム不安定化につながることを示唆された。

##### ( 3 ) 細胞増殖・生存への影響評価

DNA複製が行われない心筋細胞を*Rnaseh2a* 欠損胚より調製・培養した結果、4週間以上拍動が継続した。したがって、RNase H2AはDNA複製・細胞増殖には不可欠ではあるが、生存そのものには必須でないことが示唆された。

##### ( 4 ) RNase H2 各サブユニット間の相互作用解析

各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により、*Rnaseh2a*欠損マウス胚では、BおよびCサブユニットが著しく減少していることが判明した。したがって、3量体構造の形成は活性発現のみならず安定性維持にも不可欠であることが明らかとなった。

また、それぞれのサブユニットをGST融合あるいはHisタグタンパク質として大腸菌で発現させ、精製した。これらのタンパク質を用いて、GSTプルダウンアッセイを行った結果、AとBサブユニット間での直接相互作用は認められなかった。しかし、CサブユニットがAおよびBサブユニットと結合することが明らかとなり、したがってCサブユニットが複合体形成の中心的役割を担っていることが判明した。

##### ( 5 ) 修復・複製関連タンパク質との相互作用解析

ウェスタンブロット解析の結果、*Rnaseh2a* 欠損胚におけるPCNAやFEN1およびDNA polymerase  $\delta$ などの修復・複製関連因子の存在量に減少は認められなかった。RNase H2複合体の核移行メカニズムの解明のために、作製したそれぞれの抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、いくつかのバンドを検出することができた。これら分子の同定をPMF解析により引き続き試みている。一方、Bサブユニット中にPCNA結合配列が存在することから、GSTプルダウンアッセイを試みたところ、両者間の相互作用が検出された。したがって、PCNAが本複合体の核移行に関わっていることが示唆された。

##### ( 6 ) ミトコンドリア DNA 複製への関与

ミトコンドリアDNA (mtDNA) 中には、多数のリボヌクレオチドが存在することが知られている。したがって、RNase H2の欠損はmtDNAの複製には影響しないことが予想された。実際、mtDNAにコードされるCOX IやCOX IIを指標にして、ゲノムPCR, RT-PCR, およびウェスタンブロット解析を行った結果、欠損マウス胚においても野生型と同レベルの存在が確認された。さらに、MitoTrackerを用いた染色や電子顕微鏡観察でも、ミトコンドリアの形態や数に明確な異常は認められな

った。

以上の結果より、RNase H2 複合体は複製に際して誤って取り込まれたりボヌクレオチドの除去修復というゲノム監視機構を介して、正常な染色体 DNA 複製と細胞増殖に必須であることが判明した。

#### 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 1 件)

Kanemori, Y., Ryu, J.-H., Sudo, M., Niida-Araida, Y., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Sugiura, S., Kashiwabara, S., and Baba, T.

Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse

*Biology of Reproduction*, 88, 1-8 (2013) (査読有)

DOI: 10.1095/biolreprod.112.107425

〔学会発表〕(計 7 件)

鶴田皐月、柏原真一、岡田溪太郎、山岡悠太郎、馬場 忠

Polyadenylation activity of testis-specific poly(A) polymerase, TPAP/PAPOLB, is essential for spermatogenesis

第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜)

三枝彩佳、柏原真一、岡田溪太郎、馬場 忠

Mechanism of translational repression by germ cell-specific Y-box RNA-binding proteins, MSY2 and MSY4

第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜)

岡田溪太郎、柏原真一、三枝彩佳、鶴田皐月、馬場 忠

Characterization of translation- and PABPC-dependent deadenylation intermediates

第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜)

三枝彩佳、柏原真一、馬場 忠

Functional analysis of germ cell-specific Y-box RNA-binding proteins, MSY2 and MSY4

Joint Australian and Japan RNA meeting 2014

2014 年 11 月 4 日、Univ. of Technology Sydney (Sydney, Australia)

岡田溪太郎、柏原真一、三枝彩佳、鶴田皐月、馬場 忠

翻訳に伴い生成される mRNA 脱アデニル化中間体の解析

第 16 回日本 RNA 学会年会

2014 年 7 月 23 日、ウイנקあいち (名古屋)

三枝彩佳、柏原真一、馬場 忠

マウス生殖細胞特異的 Y-box RNA 結合タンパク質の機能解析

第 16 回日本 RNA 学会年会

2014 年 7 月 23 日、ウイנקあいち (名古屋)

岡田溪太郎、柏原真一、三枝彩佳、馬場 忠

半数体特異的 mRNA の翻訳と脱アデニル化との関連

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場 (神戸)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.acroman.org/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏原 真一 (KASHIWABARA, SHIN-ICHI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 00254318