

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15721

研究課題名(和文) 普遍的に存在する三本鎖核酸構造が起こすゲノム不安定性

研究課題名(英文) Physiological function of RNase H resolving R-loop structures formed on chromosome

研究代表者

上原 了 (Ryo, Uehara)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍制御学分野・研究員

研究者番号：70842590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内で形成されるRNA/DNAハイブリッド(ヘテロ二本鎖)を含む構造であるR-loopをRNase H2が分解することの生理的意義を解明することを目的とし、R-loop分解活性を失った変異体を発現するHEK293細胞をCRISPR-Cas9を用いて作製し、その表現型を解析した。また、RNase H2がRNA/DNAハイブリッドを認識する詳細な分子機構を解明するため、超好熱性アーキア由来のRNase H2の活性を阻害する人工タンパク質を作製し、阻害複合体の立体構造をX線結晶構造解析によって決定することに成功し、活性に重要なループ構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNase H2は原核生物からヒトに至るまでほぼ全ての生物に存在するが、R-loopを分解する活性はアーキアと真核生物のみが獲得しており、詳細な分子機構や生理的意義が明らかではない。本研究では、アーキア由来の酵素と人工阻害タンパク質の複合体の立体構造からそのメカニズムに迫った。また、RNase H2のサブユニットへの変異は神経変性疾患エカルディ・グティエール症候群(AGS)の原因であるため、R-loopの蓄積に伴う生体応答はAGS発症メカニズムに深く関与することが予想される。RNase H2のR-loop分解機構の解明は、学術・医療の両面において意義深い。

研究成果の概要(英文)：R-loop is a three-stranded structure composed of RNA/DNA heteroduplex and isolated single stranded DNA. RNase H2 is a major enzyme that hydrolyses RNA/DNA hybrids in R-loops and prevents DNA damage events caused by persistent R-loops. To investigate the effects on R-loop accumulation, we generated HEK293 cells carrying the mutation that makes RNase H2 inactive on R-loop. Using these cells defective in R-loop resolution, we revealed that R-loop accumulation in HEK293 did not seriously disturb the genome stability. In addition, we developed a synthetic binding protein (SBP), which binds to archaeal RNase H2 and inhibits its RNA/DNA hydrolysis, and determined the crystal structure of RNase H2 and SBP complex. This structure revealed the two loops in active site seemed to be important for hydrolysis activity of RNA/DNA hybrids among archaeal and eukaryotic enzymes.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNase H2 R-loop 自己免疫疾患 ゲノム不安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNase H2 は二種類の活性を持つ酵素で、RNA/DNA ヘテロ二本鎖 (R/D) の RNA 鎖を分解する活性と二本鎖 DNA に含まれる単一リボヌクレオチド (rNMP) を除去する活性を持つ。rNMP に対する活性は全生物間で保存されているが、R/D 活性はアーキアと真核生物のみが獲得した機能である。RNase H2 の R/D 活性は転写時に形成する三本鎖構造である R-loop の分解に必要であり、同じ活性を有する RNase H1 に対して、核内では 90%以上の R/D 活性を RNase H2 が占める。RNase H2 は 3 つのサブユニットで形成されるヘテロ三量体酵素であり、どのサブユニットへの変異も先天性自己免疫疾患 Aicardi-Goutieres syndrome (AGS) を引き起こす。従って、rNMP および R-loop はどちらも AGS の原因物質であると考えられてきた。RNase H2 の各サブユニットをノックアウトするとマウスは両方の活性を失い、胎生 10 日前後で死亡する (Cell (2012) **149**:1008; J Exp Med (2012) **209**:1419)。ノックアウトマウスの染色体には大量の rNMP が蓄積しており、DNA 損傷から p53 活性化を通じてアポトーシスが誘導される。研究代表者は、R/D 活性を維持しながら rNMP 活性を失った RNase H2 変異のノックインマウスをゲノム編集により作製したが、ノックアウトマウスとほとんど同じ表現型を示した (Cell Rep (2018) **25**:1135)。このことから、生命維持のための rNMP 活性の重要性を示すと同時に、「R-loop 除去活性 (R/D 活性) の生理的意義は何か?」という疑問が生じた。RNase H2 の各サブユニットのノックアウトマウスでは、rNMP 蓄積による DNA 損傷応答が強く現れるため、R-loop が細胞に与える影響を評価できず、R-loop のみが単独で蓄積する状況を作り出すことが必要だと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、R-loop の蓄積がゲノム安定性や AGS 発症に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、rNMP を除去しながら R-loop を蓄積させる RNase H2 変異体を発現する細胞を作製し、その細胞表現型を解析する。さらに、RNase H2 が R/D 活性を獲得した分子機構を明らかにするため、R/D 活性を持たない大腸菌由来酵素と R/D 活性を有するアーキア由来酵素をそれぞれ精製し、X 線結晶構造解析によって立体構造の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アーキア及び大腸菌由来 RNase H2 の X 線結晶構造解析

RNase H2 は 2 つの活性を持つため、ノックアウトでは rNMP の蓄積の影響によって、R-loop 蓄積がもたらす効果を評価できない。そこで、ヒト由来酵素と同様に R-loop 分解に必要な R/D 活性を持つアーキア *Pyrococcus abyssi* 由来の RNase H2 (PaH2) と、R/D 活性を持たない大腸菌由来 RNase H2 (EcH2) の立体構造を決定することで、活性部位の構造比較を行い、R/D 活性に重要なアミノ酸の同定を試みる。

(2) Hybrid defective (HD) 変異体の作製

ヒト RNase H2 の活性部位に変異を導入し、変異体を大腸菌で大量発現・精製し、蛍光標識した二本鎖核酸基質を用いて R/D 活性および rNMP 活性を測定する。また、酵素キネティクス解析を行い、基質親和性と代謝回転数の変化を調べ、変異による酵素活性の変化を詳細に検証する。

(3) CRISPR-Cas9 による HD 変異細胞の作製

ヒト胎児腎細胞 HEK293 の細胞株において、CRISPR-Cas9 を用いてゲノム編集を行い、HD 変異ノックイン細胞のホモ接合体の細胞を取得する。同時に、触媒サブユニット RNASEH2A のノックアウト細胞も作製する。また、RNASEH2A の各種変異体の遺伝子を含んだウイルスベクターをノックアウト細胞に感染させ、RNase H2 の活性・機能がレスキューされるかを検証する。

(4) 活性測定

HEK293 細胞のタンパク質抽出液を調整し、蛍光標識した二本鎖核酸基質を用いて R/D 活性および rNMP 活性を測定する。

(5) DNA 損傷の解析

HD 細胞、ノックアウト細胞における DNA 損傷をシングルセル電気泳動 (コメットアッセイ)、DNA 損傷マーカーの γ H2AX の免疫蛍光染色法によって解析する。

(6) 遺伝子発現量の解析

R-loop あるいは rNMP の蓄積は I 型インターフェロン誘導性の免疫応答や p53 を介した DNA 損傷応答に繋がる (J Exp Med (2016) **213**:329)。インターフェロン刺激性遺伝子、DNA 損傷応答経路の遺伝子の発現量を逆転写リアルタイム PCR によって解析する。

(7) 細胞増殖速度の解析

一定数の細胞を播種し、数日培養した後に WAT-1 試薬を用いて生細胞数を定量し、細胞増殖速度を各細胞で比較する。

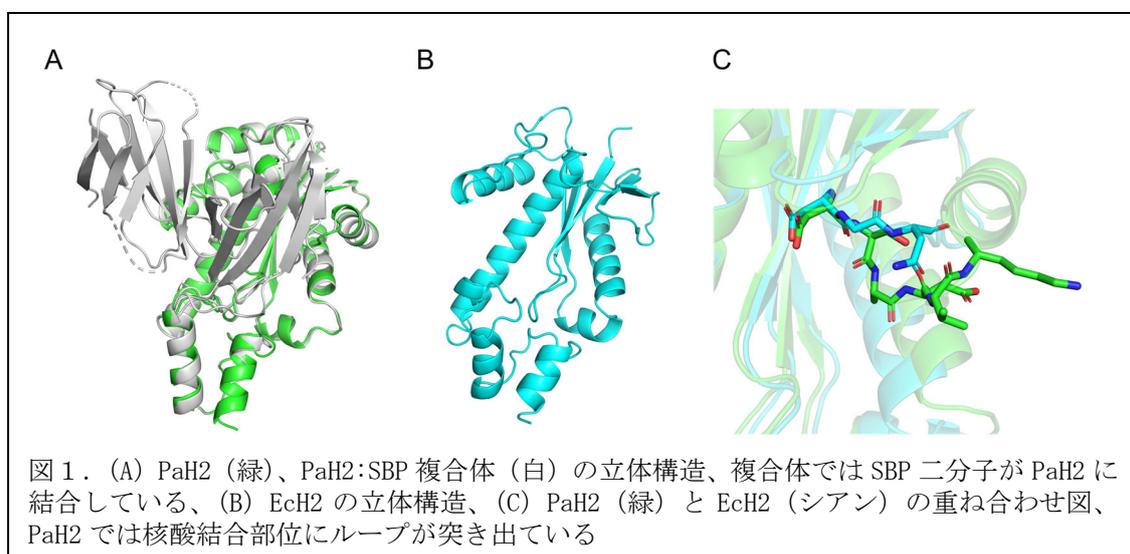
(8) 細胞外小胞の解析

超遠心法により培養上清中の細胞外小胞を回収し、ナノ粒子トラッキング解析により粒子数を測定する。また、RNase H2 変異を持つ細胞の小胞を HEK293 親細胞株の培養上清中に加えて取り込ませることで、遺伝子発現に影響を与えるかを解析する。

4. 研究成果

(1) Ech2、PaH2 の X 線結晶構造解析

RNase H2 の R/D 活性の分子メカニズムを解明することを目的として、R/D 活性を有する PaH2 と R/D 活性を持たない Ech2 をそれぞれ大腸菌で大量発現し、精製を行った。PaH2 は結晶化を促進する目的で添加した人工結合タンパク質 (SBP) との複合体構造および単独構造をそれぞれ分解能 2.7 Å、1.7 Å で、Ech2 は分解能 2.4 Å で構造決定に成功した (図 1 AB)。SBP は PaH2 の活性部位のループ構造に二本鎖核酸基質を模した様式で結合していた。PaH2 と Ech2 の活性部位の構造を重ね合わせると、PaH2 は R/D 基質に近接するようにループが突き出していることが分かり、基質認識に重要な構造であることが示唆された。



(2) HD 変異体の設計

1 の結果から、PaH2 において R/D 基質認識に重要なループ構造が明らかとなった。ヒト RNase H2 にも同様の構造が存在することから (PDB ID:3PUF)、ループを形成する Thr142 を置換した変異体を大腸菌で大量発現および精製し、rNMP 活性と R/D 活性を測定した。作製した複数の変異体の中で、チロシンへの変異が最も顕著に R/D 活性を低下させ ($\leq 2\%$)、その一方で rNMP 活性を維持させる ($\geq 50\%$) ことが分かった。そこで、本変異体を R/D 活性を特異的に失った Hybrid defective (HD) 変異体と名付け、HD 変異を持つ RNase H2 を発現する細胞で R-loop 蓄積による影響を以下の実験で検証した。

(3) HD 細胞における RNase H2 の機能

CRISPR-Cas9 を用いて HEK293 細胞の RNASEH2A 遺伝子に HD 変異を導入した。トランスフェクション後の細胞を希釈してプレートに撒き、形成したコロニーから単一クローンの細胞を取得した。約 150 クローンの細胞から DNA を回収し、シーケンス解析を行った結果、HD ホモ接合体が 1 クローン、HD ヘテロ接合体が 50 クローン、Null 変異体が 2 クローン得られた。これらの細胞から核内タンパク質を抽出し、RNase H2 活性を測定したところ、HD ホモ細胞は Null 細胞と同程度の H/D 活性が検出され、かつ野生型の 30-40% の rNMP 活性を有していた。HD ホモ細胞と Null 細胞にわずかな R/D 活性が検出されたのは、核内の他のヌクレアーゼや RNase H1 によるものだと考えられ、HD ホモ細胞は Null 細胞同様に R-loop を分解する活性をほとんど持たないことが明らかとなった。他方、Null 細胞にウイルスベクターを用いて、野生型および HD を含む様々な変異体の RNASEH2A を発現させたところ (図 2 A)、野生型では rNMP・R/D の両活性が HEK293 親細胞と同じ程度 ($\geq 100\%$) まで回復し、HD 変異体では rNMP 活性のみが約 40% まで回復した。また、

シングルセル電気泳動による DNA 損傷度解析では、HD ホモ細胞は親細胞株と比較して有意な損傷は見られなかった (図 2B)。今回の研究では HD ホモ細胞が 1 クローンしか得られなかったため、偶発的な DNA 修復機構の変化が起こった可能性を排除するために、RNase H2 を失った Nu11 変異細胞で HD を含む複数の変異体を発現させて、RNase H2 の DNA 修復機能がレスキューされるかを確認した。その結果、触媒残基に変異を持つ CD 変異体と、rNMP 活性を失った RD 変異体はコメットアッセイで DNA 損傷レベルが Nu11 変異体と同程度で見られ (図 2B)、 γ H2AX のシグナルも強く観察された (図 2C)。一方、野生型 (WT) と R/D 不活性型 (RD) 変異体は Nu11 細胞の DNA 損傷を親細胞株と同程度まで抑制しており、RNase H2 の rNMP 活性がレスキューされると DNA 損傷応答はほとんど沈静化されることが分かった。この結果と一致して、WT と HD 変異体を発現した Nu11 細胞は親細胞株と同程度の増殖速度を示し、RED、CD を発現する細胞では増殖速度が低下していた。以上のことから、R-loop 単独で蓄積が起こった場合、DNA 損傷応答は軽微であり、細胞増殖に影響を及ぼす DNA 損傷応答はほとんどが rNMP によるものであることが明らかとなった。

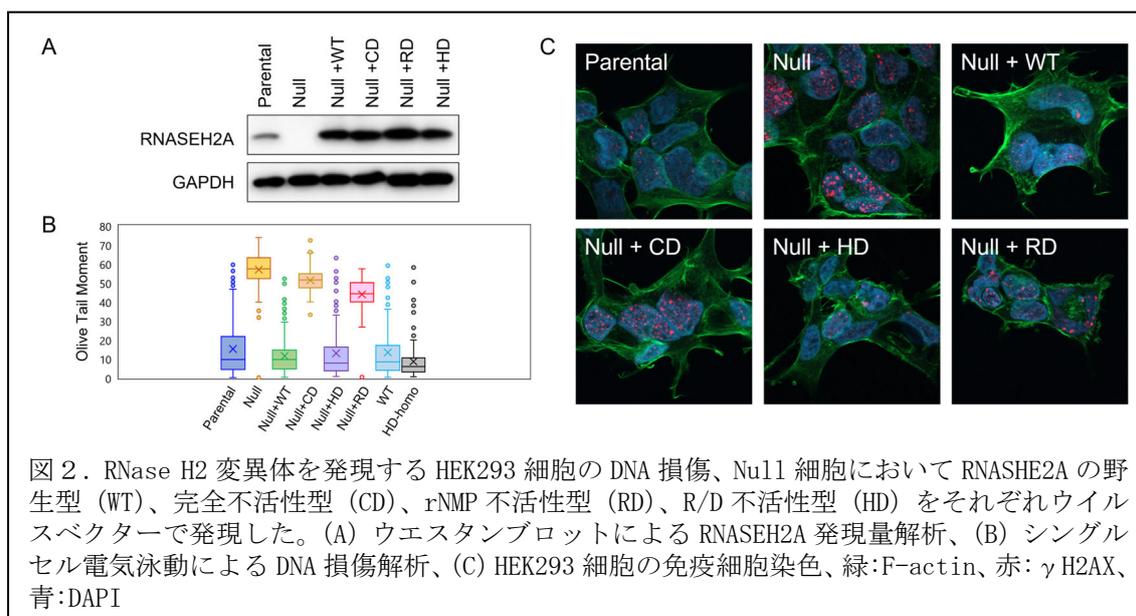


図 2. RNase H2 変異体を発現する HEK293 細胞の DNA 損傷、Nu11 細胞において RNASEH2A の野生型 (WT)、完全不活性型 (CD)、rNMP 不活性型 (RD)、R/D 不活性型 (HD) をそれぞれウイルスベクターで発現した。(A) ウェスタンブロットによる RNASEH2A 発現量解析、(B) シングルセル電気泳動による DNA 損傷解析、(C) HEK293 細胞の免疫細胞染色、緑:F-actin、赤: γ H2AX、青:DAPI

(4) 免疫応答遺伝子の発現解析

RNase H2 のサブユニットに変異を持つ AGS 患者では重篤な炎症反応が見られる。親細胞株と HD ホモ細胞、Nu11 細胞でインターフェロン刺激性遺伝子 (ISG) である IFIT1、IFIT3、CXCL10 の発現量を解析したところ、これらの遺伝子の顕著な発現量の違いは見られなかった。このことは RNase H2 の機能低下による免疫応答反応は細胞種によってかなり異なることが示唆しており、HEK293 細胞では rNMP と R-loop のどちらも免疫経路の亢進を起こさないことが分かった。これまでの報告 (EMBO J (2016) 35:831) から RNase H2 の機能低下に伴い細胞質で断片化 DNA が増加すると、cGAS-STING 経路の活性を通して炎症が起こることが予想された。一方、HD ホモ細胞が分泌する細胞外小胞は親細胞株の 2 倍程度に増加しており、免疫刺激性の核酸分子を細胞外小胞で廃棄しているのではないかと考えられた。これを検証するため、HD ホモ細胞の培養上清から超遠心法によって回収した細胞外小胞を、血清中の細胞外小胞が除かれた培地で培養した HEK293 に添加し、細胞外小胞の取り込みによって ISG の発現が誘導されるかを調査した。しかしながら、添加 48 時間後までに ISG 遺伝子の顕著な発現量の変動は認められなかった。以上のことから、HD ホモ細胞における R-loop 蓄積による DNA 損傷は軽微であるため、HEK293 では DNA 損傷応答や免疫応答をほとんど亢進しないことが分かり、特定の細胞では R-loop または rNMP に対する感受性が高く、これらが蓄積することで AGS 発症に繋がる免疫応答を起こすのではないかと予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 上原了、田中俊一	4. 巻 59
2. 論文標題 超好熱性サチライシンをモデルにみるタンパク質フォールディングの高温環境適応戦略 Tk-subtilisinと3つの挿入配列	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 272-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hikita Tomoya, Uehara Ryo, Itoh Reina E., Mitani Fumie, Miyata Mamiko, Yoshida Takuya, Yamaguchi Rui, Oneyama Chitose	4. 巻 113
2. 論文標題 MEK/ERK mediated oncogenic signals promote secretion of extracellular vesicles by controlling lysosome function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15288	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 Uehara Ryo, Iwamoto Riki, Aoki Sayaka, Yoshizawa Takuya, Takano Kazufumi, Matsumura Hiroyoshi, Tanaka Shun ichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Crystal structure of a GH1 glucosidase from Hamamotococcus singularis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 2000 ~ 2008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uehara Ryo, Dan Nanako, Amesaka Hiroshi, Yoshizawa Takuya, Koga Yuichi, Kanaya Shigenori, Takano Kazufumi, Matsumura Hiroyoshi, Tanaka Shun ichi	4. 巻 595
2. 論文標題 Insertion loop mediated folding propagation governs efficient maturation of hyperthermophilic Tk subtilisin at high temperatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 452 ~ 461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上原 了	4. 巻 92
2. 論文標題 染色体DNAにおけるリボヌクレオチドの許容限界	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 744 ~ 747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitani Fumie, Lin Jianyu, Sakamoto Tatsuya, Uehara Ryo, Hikita Tomoya, Yoshida Takuya, Setiawan Andi, Arai Masayoshi, Oneyama Chitose	4. 巻 12
2. 論文標題 Asteltoxin inhibits extracellular vesicle production through AMPK/mTOR-mediated activation of lysosome function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10692-0	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 1件)

1. 発表者名 上原了
2. 発表標題 A threshold of tolerance to ribonucleotides embedded in DNA during mouse embryogenesis
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原了
2. 発表標題 RAB27A発現を制御する新規EV分泌阻害剤の同定
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原了
2. 発表標題 がん細胞由来細胞外小胞を標的とした新規阻害剤の探索
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Elena Cabona, Lea Viallea, Yuki Ishizuka, Shun-ichi Tanaka, Takuya Yoshizawa, Hiroyoshi Matsumura, Ryo Uehara, Etienne Henrya, Ghislaine Henneke
2. 発表標題 Differential Cleavage Activity of Archaeal and Bacterial RNases HII on Matched and Mismatched ribonucleotides embedded in DNA
3. 学会等名 RBPG09 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田奈津子、吉澤拓也、藤田純三、上村菜月、雨坂心人、田中俊一、上原了、松村浩由
2. 発表標題 肺炎桿菌および大腸菌由来FtsZの構造機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第515回例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------