

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23733

研究課題名（和文）RNA/DNAハイブリッドを形成するDNA修復機構の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis for DNA repair machinery including RNA/DNA heteroduplex

研究代表者

上原 了 (Uehara, Ryo)

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） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RNase H2がRNA/DNAハイブリッドの分解を介してDNA修復を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、DNA修復タンパク質BRCA2のリピートペプチドとRNase H2の複合体の生化学的特性解析を行った。また、ヒト由来RNase H2と異なる基質特異性を示す大腸菌由来RNase H2（Ec-RNase H2）との構造比較を行うため、Ec-RNase H2の精製と結晶構造解析に向けた結晶化シャペロンとなるタンパク質の探索を行い、構造機能解析の基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNase H2とBRCA2リピートペプチドの組み換えタンパク質を用いた相互作用解析によって、二者間の結合は極めて弱く、RNase H2がDNA損傷部位へ誘導されるためには他のタンパク質が関与する可能性が示唆された。RNase H2の遺伝子への変異は先天性自己免疫疾患やがんと深く関与しており、その生理機能について詳細な分子機構の解明は、疾患発症メカニズムの理解や新規治療標的の発見という点において意義深い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we biochemically analyzed the complex between RNase H2 and BRCA2 repeat peptides to reveal how RNase H2 is recruited to the site of DNA double strand breaks where an RNA/DNA heteroduplex is formed. For a comparative study, we purified and crystallized a recombinant protein of RNase H2 from *E. coli* (Ec-RNase H2), which exhibits the distinct RNA/DNA hydrolysis activity from that of the human enzyme. Furthermore, we generated the synthetic binding proteins that may act as a crystallization chaperone for Ec-RNase H2.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNase H2 DNA修復 BRCA2 RNA/DNAハイブリッド X線結晶構造解析

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。R/D は転写された RNA 鎖が DNA 鎖と再会合することで形成し、しばしば孤立した一本鎖 DNA を含む三本鎖構造 (R-loop) として存在する。rNMP は DNA ポリメラーゼによって数千塩基に一度の頻度で伸長中の DNA 鎖へと取り込まれる。R/D と rNMP の過剰な蓄積は深刻な DNA 損傷に繋がるため、RNase H2 の機能欠損変異は DNA 損傷によって生じた DNA 断片に対する炎症反応を惹起し (*Nature* **548**:461 (2017))、先天性自己免疫疾患 Aicardi-Goutieres syndrome (AGS) を引き起こす (*Am. J. Med. Genet. A* **167A**:296 (2015))。RNase H2 は全生物に存在するが、rNMP に対しては活性中心のチロシンによる認識機構が保存されている。一方で、R/D 活性は真核生物・アーキアの酵素の特徴であり、細菌由来の酵素は rNMP に特異性を示す。これらの酵素の R/D に対する活性の違いは立体構造情報の不足から明らかとなっていない。また、*in vitro* の実験で R/D を塩基配列非特異的に切断することから、RNase H2 は特定の R/D を標的としないと考えられていたが、最近、二本鎖 DNA 切断部位に形成する R/D が BRCA2 と結合した RNase H2 によって分解を受ける (*Cell* **167**:1001 (2016)) ことが分かり、RNase H2 には R/D 分解を通して DNA 修復に寄与する新たな役割を持つことが示唆された。上述したように、RNase H2 は R/D と rNMP に対する二種類の活性 (機能 および) を持ち、さらに R/D には DNA 修復機構の制御のため RNase H2 によって特異的な分解 (機能) を受けるものが存在する。RNase H2 の 3 つの機能それぞれの生理的意義を理解するためには遺伝子ノックアウトやノックダウンによる全機能を同時に欠損させる実験では不十分で、互いの機能が与える影響を排除することができない。そのため特定の機能のみを狙って消失させた変異体が必要で、その理論設計には各機能に重要なアミノ酸を同定することが不可欠である。申請者は rNMP 基質 - RNase H2 の複合体の立体構造情報から機能 のみを欠損した RNase H2 変異体を設計し、この変異を発現するマウスを用いて rNMP が単独でゲノム安定性へ及ぼす影響を評価した (*Cell Rep.* **25**:1135 (2018))。同様に、機能 において R/D を基質として認識するアミノ酸、機能 においては BRCA2 と結合するアミノ酸を知る必要がある。しかしながら、R/D 基質 - RNase H2 複合体や BRCA2 - RNase H2 複合体の立体構造情報は無く、機能 および の分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、RNase H2 が BRCA2 によって DNA 損傷部位にリクルートされる分子機構、および RNase H2 が R/D を認識する分子機構の解明を目的とする。RNase H2 のように生命維持に必須の機能を複数持つタンパク質について、特定の機能について調査するためには「その機能のみ」を改変した変異体が必要である。各標的分子と RNase H2 が結合する分子機構を X 線結晶構造解析によって明らかにすることで、その生理的意義の追求に必要な変異体設計の基盤情報を得る。

3. 研究の方法

BRCA2 には分子中央に 8 つのリピートペプチド (BRC ペプチド) が存在し、1 番目 (BRC-R1) と 3 番目 (BRC-R3) の配列が RNase H2 と結合することが報告されている (*Nat. Commun.* **9**:5376 (2018))。これらのペプチド配列を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現し、グルタチオンセファロース・ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。同様に、ヒト RNase H2 の 3 つのサブユニット遺伝子 (RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C) を 2 種類の pET ベクターへとクローニングし、その両方を用いて大腸菌を形質転換することで、活性型のヘテロ三量体 RNase H2 を発現する大腸菌株を取得した。RNase H2 は N 末端 His タグを付加した状態で発現し、Ni-NTA アフィニティーカラム・ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。様々な条件下でこれらのタンパク質の相互作用をブルダウン・ゲルろ過クロマトグラフィーで解析した (1)。

また、真核生物の RNase H2 が R/D をどのように認識するのかを調べるため、大腸菌 RNase H2 をクローニングし、発現・精製を行った。大腸菌 RNase H2 は単量体酵素で、ヒト RNase H2 の触媒サブユニットに約 20% の低いホモロジーを示す。大腸菌 RNase H2 の活性は rNMP に対して高いものの R/D に対しては非常に低く、機能を失った RNase H2 変異体のモデルとして適している。精製した大腸菌 RNase H2 を用いて結晶化スクリーニングと最適化を行い、得られた結晶の X 線結晶構造解析を行った (2)。また、結晶の品質を向上させるため、大腸菌 RNase H2 に結合する結晶化シャペロンタンパク質の探索を行った。ビオチン化タグ (Avi-Tag) を付加した大腸菌 RNase H2 を発現・ビオチン化した状態で精製した。その後、磁気ビーズに固定された大腸菌 RNase H2 を標的としてファージディスプレイライブラリーの選別を行い、結合能力を持つクローンを ELISA 法により同定した。

4. 研究成果

(1) BRC リピートペプチドと RNase H2 複合体の生化学特性解析

X 線結晶構造解析に向けて、BRC リピートペプチドと RNase H2 が複合体を形成する条件を検討した。ブルダウンでは、グルタチオンセファロース・Ni-NTA セファロースのどちらを用いて実験した場合も BRC-R1、BRC-3 と RNase H2 の共沈は見られなかった。タンパク質濃度・塩濃度を変更し、R/D 基質の添加も行ったが、同じく共沈は起こらなかった。今回は CBB 染色による検出を試みたが、他グループによる同様の実験では抗体を用いたプロットティングで検出されており、BRC-R1 および BRC-R3 と RNase H2 の相互作用の検出には本手法では感度が低いと考えられる。次に結晶化に用いるために安定な複合体の形成が可能かどうかを調べるため、BRC ペプチド: RNase H2 の割合を変化させながらゲルろ過クロマトグラフィーによって複合体の形成を調べたところ、BRC ペプチドを過剰に添加しても複合体形成が全く見られなかった。以上から、BRC ペプチドと RNase H2 の相互作用は弱く、二者複合体の X 線結晶構造解析は困難であることが分かった。RNase H2 の DNA 損傷部位へのリクルートは RNase H2 自身の R/D 基質への親和性によるものか、他の結合タンパク質の存在が示唆される。

(2) 大腸菌 RNase H2 の X 線結晶構造解析

大腸菌 RNase H2 を pCold ベクターで大腸菌発現して精製を行ったところ、NaCl 濃度を 500mM 以下に下げると凝集することが分かった。触媒残基のアスパラギン酸をアラニンに置換した不活性変異体では NaCl 濃度 150mM までの凝集に耐えた。結晶化条件スクリーニングでは複数の条件から比較的大きな結晶が得られたが、X 線回折実験で十分な回折点を得られず構造決定に必要な分解能には至らなかった。結晶の質を改善するため、大腸菌 RNase H2 に結合する結晶化シャペロンとして働くタンパク質の探索を行った。ファージディスプレイライブラリーの選別の結果、大腸菌 RNase H2 に結合するタンパク質を 3 種類取得した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

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 Hamamotoa 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 Deasy Sarah K., Uehara Ryo, Vodnala Suman K., Yang Howard H., Dass Randall A., Hu Ying, Lee Maxwell P., Crouch Robert J., Hunter Kent W.	4. 巻 15
2. 論文標題 Aicardi-Goutieres syndrome gene Rnaseh2c is a metastasis susceptibility gene in breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008020	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 該当する

1. 著者名 Malfatti Matilde Clarissa, Henneke Ghislaine, Balachander Sathya, Koh Kyung Duk, Newnam Gary, Uehara Ryo, Crouch Robert J., Storici Francesca, Tell Gianluca	4. 巻 294
2. 論文標題 Unlike the Escherichia coli counterpart, archaeal RNase HII cannot process ribose monophosphate abasic sites and oxidized ribonucleotides embedded in DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13061 ~ 13072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009493	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 該当する

1. 著者名 Yoshizawa Takuya, Fujita Junso, Terakado Haruna, Ozawa Mayuki, Kuroda Natsuko, Tanaka Shun-ichi, Uehara Ryo, Matsumura Hiroyoshi	4. 巻 76
2. 論文標題 Crystal structures of the cell-division protein FtsZ from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X2000076X	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 Baba Misato, Kojima Kenji, Nishimura Takuto, Sugiura Takuya, Takita Teisuke, Uehara Ryo, Crouch Robert J., Yasukawa Kiyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Val143 of human ribonuclease H2 is not critical for, but plays a role in determining catalytic activity and substrate specificity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0228774	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 上原了, Emily Herm, Kiran Sakhuja, Susana M Cerritelli, Robert J Crouch
2. 発表標題 RNA/DNAハイブリッドの蓄積によるゲノム不安定性
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第508回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Uehara, Emily Herm, Kiran Sakhuja, Susana M Cerritelli, Robert J Crouch
2. 発表標題 Separation of two RNase H2 activities in mammalian cells
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原了、Emily Herm、Naushaba Hasin、Kiran Sakhuja、Susana M Cerritelli、Robert J Crouch
2. 発表標題 RNA/DNAハイブリッド加水分解酵素RNase H2の機能分割
3. 学会等名 酵素・補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Uehara, Naushaba Hasin, Sakhuja Kiran, Susana M Cerritelli, Robert J Crouch
2. 発表標題 A threshold of ribonucleotide tolerance in genomic DNA for embryonic development
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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			
米国	National Institutes of Health			
イタリア	University of Udine			