

平成30年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07388

研究課題名(和文) 耐熱型逆転写酵素の耐熱化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of thermostabilization of thermostable reverse transcriptase

研究代表者

保川 清 (YASUKAWA, KIYOSHI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30397559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNase H は、RNA/DNAハイブリッドのRNAを塩基配列非特異的に加水分解する酵素である。RNase HはRNase H1 とRNase H2に大別される。レトロウイルスの逆転写酵素(RT)はDNA合成活性とRNase H活性をもつ。本研究では、RNase Hの機能の解明を目的として、MMLV RTのRNase Hドメインを調製し、性状解析を行った。ヒトRNase H2の活性と安定性に与える中性塩とpHの影響を解析した。大腸菌の代わりにマウス NIH 3T3細胞株を用いたGPMA法を構築した。RNase H2を欠損したNIH3T3細胞株を樹立し、その性質を検討した。

研究成果の概要(英文)：Ribonuclease H (RNase H) is an enzyme that specifically degrades RNA from RNA/DNA hybrids. RNase H has been classified into two major families, type 1 and type 2. Retroviral reverse transcriptase (RT) has DNA polymerase and RNase H activities. In this study, we aimed to elucidate the RNase H and engaged in the following four subjects. (i) The RNase H domain of MMLV RT was prepared and characterized. (ii) The effects of neutral salts and pH on the activity and stability of human RNase H2 were analyzed. (iii) The GPMA method using mouse NIH3T3 cell line instead of E. coli was established. (iv) The RNase H2 knock-out NIH3T3 cell line was established and characterized.

研究分野：酵素化学

キーワード：リボヌクレアーゼH RNase H RNase H2 逆転写酵素 GPMA method

1. 研究開始当初の背景

RNase H は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA を塩基配列非特異的に加水分解する酵素である。RNase H は全ての生物に存在し、RNase H1 と RNase H2 に大別される。RNase H2 は、二本鎖 DNA に 1 塩基だけ埋め込まれたりボヌクレオチドの 5'側のホスホジエステル結合を切断するが、RNase H1 はこれを切断しない。近年、細胞内で DNA にリボヌクレオチドが最大で 1000 塩基に 1 塩基の割合で取り込まれており、RNase H2 がこれの除去に関与し、ゲノム DNA の安定化に寄与していることが明らかになった。しかし、RNase H2 の酵素化学的性質は不明である。

逆転写酵素 (RT) は DNA 合成活性と RNase H 活性をもつ。モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) RT は分子量 75,000 のモノマーで、5 個のドメイン (Fingers、Palm、Thumb、Connection、RNase H) から成る。DNA 合成活性と RNase H 活性の活性部位はそれぞれ Palm および RNase H ドメインに存在する。MMLV RT は全体の立体構造が得られておらず、さらに RNase H ドメインはその性状について不明な点が多い。我々は、RT の耐熱性は鋳型プライマー (T/P) との親和性が高くなれば向上すると仮説をたて、モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) RT の T/P との接触部位に部位特異的変異導入により正電荷を導入し、耐熱型 MMLV RT を作製した。RNase H 活性消失と耐熱性向上の因果関係は不明である。

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 増幅産物の二本鎖 DNA 融解温度の変化に基づく温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) の泳動パターンの変化から検出する方法である。本法は広範囲の遺伝子変異を直接検出し、10 ppb の変異原物質を検出することができる。これは、DNA 損傷に由来する表現型の変化から遺伝子変異を推定する Ames テストよりも約 100 倍感度が高い。近年、哺乳動物細胞を用いた変異原物質の高感度な検出方法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子工学および溶媒工学的手法を用いることにより、MMLV の RNase H ドメインおよびヒト RNase H2 の酵素化学的解析を行うこと、および、ゲノム編集技術を用いることにより、ヒト RNase H2 のゲノム安定化に与える影響を解析することを目的とした。また、熱力学的解析により、活性解離基を推定した。

3. 研究の方法

「MMLV RT の RNase H ドメインの性状解析」では、本ドメインを大腸菌で生産し、精製標品を取得し、その性質を全長の MMLV RT と比較した。

「溶媒工学的手法によるヒト RNase H2 の

性状解析」では、本酵素を大腸菌で生産し、精製標品を取得して、酵素活性と安定性に与える中性塩と pH の影響を解析した。

「哺乳動物細胞を用いた GPMA (genome profiling-based mutation assay) 法の検討」では、従来、大腸菌で行われていた GPMA 法に動物細胞の適用を試みた。

「ゲノム編集技術を用いたヒト RNase H2 のゲノム安定化機構の解析」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、その性質を検討した。

4. 研究成果

(1) MMLV RT の RNase H ドメインの性状解析

【概要】MMLV RT の RNase H ドメインを調製し、性状解析を行った。

【方法】RNase H ドメイン (1498 - L671) の調製：完全長のもの (WT) および基質結合部位を含む 1593 - L603 あるいは G595 - T605 が欠失したもの (それぞれ C1、C2) に、Strep-tag (WSHPQFEK) と (His)₁₀ をそれぞれ N および C 末端に付加させたものを大腸菌で発現させ、菌体から精製した。蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：3'-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA (5'-GAUCUGAGCCUGG GAGCU-3') と 5'-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA (5'-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3') から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として、37 で 45 分間反応を行い、反応停止後、490 nm で励起したときの 515 nm の蛍光強度を解析した。放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：5'末端が ³²P で標識された 25 塩基の RNA (5'-AUGUAUAGCCCUACCAGCAUCCCTGG-3') と未標識 25 塩基の相補的 DNA から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として 37 で反応を行い、経時的にサンプルを採取し、反応停止後、変性ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、切断された RNA 鎖のパターンを解析した。

【結果・考察】蛍光基質を用いた RNase H 活性の測定：WT は活性を示したが、C1 と

C2 は活性を示さなかった。蛍光増加量から、RNase H ドメイン単独の本活性は RT のそれよりも著しく低いことが示された。放射性基質を用いた RNase H 活性の測定：WT、C1 および C2 では鎖長が異なる 7 - 16 塩基のバンドが同程度の強度で検出された。これは、本基質に MMLV RT (全長) を作用させたとき、14 - 20 塩基のバンドが強く検出されたことと異なった。また C1 と C2 は活性を有したが、WT よりも著しく低かった。単独発現させた RNase H 領域は DNA 合成活性の活性部位をもたないために、基質との親和性が低く、切断部位が不特定になったと考えられた。

(2) 溶媒工学的手法によるヒト RNase H2 の性状解析

【概要】ヒト RNase H2 の活性と安定性に与える中性塩と pH の影響を解析した。

【方法】6 残基のヒスチジンをそれぞれの N

末端に付加したヒト RNase H2 のサブユニット A (33 kDa)、B (35 kDa)、C (18 kDa) 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精製した。酵素活性の測定は、5 mM MgCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて、25 で行った。基質には 1 塩基のリボヌクレオチド (a と表記) を含む 3'-fluorescein 修飾 DNA (5'-GATCTGAGCCTGGGAGCT-3') とそれに相補的な 5'-Dabcyl 修飾 DNA から成る二本鎖と 3-fluorescein 修飾 RNA (5'-gaucugagccugggagcu-3') とそれに相補的な 5'-Dabcyl 修飾 DNA から成る二本鎖を用い、加水分解に伴う蛍光強度 (励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm) の増加を連続的に測定した。酵素活性の塩濃度依存性は、種々の塩を 0-200 mM 添加して検討した。酵素活性の pH 依存性の測定は、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0-8.8) と 50 mM AMPSO-NaOH 緩衝液 (pH 8.6-10.4) を用い、25、30、35 で行った。

【結果】ヒト RNase H2 の酵素活性は、NaCl、KCl、RbCl、NaBr 濃度が 10-60 mM で塩非存在下の活性の 170-390% となり、それ以上の濃度では減少した。また、酵素活性は、LiCl、LiBr、CsCl 濃度の上昇に伴い減少した。ヒト RNase H2 の熱失活の一次速度定数は、NaCl、KCl 濃度が 60-80 mM で塩非存在下でのそれを 50-60% まで減少させた。ヒト RNase H2 の酵素活性の pH プロフィールは、活性解離基が酸性側で 2 つ、塩基性側で 1 つとしたとき、理論式によく一致した。酸性側、塩基性側の活性解離基のプロトン解離定数 pK_a (pK_{a1} 、 pK_{a2}) はそれぞれ 7.3-7.6、8.1-8.8 となり、脱プロトン化におけるエンタルピー変化は、 pK_{a1} で 5 ± 21 kJ/mol、 pK_{a2} で 68 ± 25 kJ/mol となった。熱力学的解析により活性解離基は、酸性側が Asp または Glu、塩基性側が Lys と推定された。

【考察】酵素活性の塩濃度依存性の結果から、ナトリウム、カリウム、ルビジウムでは活性化され、リチウム、セシウムでは阻害されことから、カチオンの種類によりヒト RNase H2 の酵素活性に対する影響が異なることが明らかとなった。また、塩の添加によって、ヒト RNase H2 の熱失活が抑制され、安定性が高まること示された。酵素活性の pH 依存性の結果から、ヒト RNase H2 の活性解離基は、酸性側が DEDD モチーフとして保存されている Asp34、Glu35、Asp141 のいずれか 2 つ、塩基性側が DSK モチーフとして保存されている Lys69 である可能性が考えられた。

(3) 哺乳動物細胞を用いた GPMA (genome profiling-based mutation assay) 法の検討

【概要】大腸菌の代わりにマウス NIH3T3 細胞株を用いた GPMA 法を検討した。

【方法・結果】化学物質として、Ames テストで変異原性が検出されるベンゼン、硫酸ジエチル、抱水クロラール、酸化プロピレンと、検出されない無水酢酸、メタンスルホン酸を

用いた。100 ppb の各化学物質存在下で NIH 3T3 細胞を 4 世代培養した。培養細胞からゲノム DNA を抽出し、ランダム PCR を行い、増幅産物を TGGE に供した。TGGE の泳動パターンから二本鎖 DNA 融解開始点座標に関して規格化処理を行い、種同定 (spiddos) を得た。培養前後のゲノム DNA の spiddos を比較することで、各化学物質添加による TGGE の特徴点の変化 (PaSS) を求めた。その結果、大腸菌を用いた場合とよく相関した (相関係数は 0.77)。このことから、GPMA 法に任意の哺乳動物細胞が使用可能であると示唆された。

(4) ゲノム編集技術を用いたヒト RNase H2 のゲノム安定化機構の解析

【概要】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、その性質を検討した。

【方法・結果】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 を標的としたガイド RNA を設計し、それを発現させるためのオリゴ DNA を pGuide-it-ZsGreen1 ベクター (Clontech) に導入した。得られたベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、限界希釈法により単クローンを得た。4 個のクローンについて標的配列を PCR により増幅し、増幅産物の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ると考えられる 1 クローン (KO 株) が得られた。野生株および KO 株の細胞溶解液について、RNase H2 の A サブユニットに対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、KO 株では A サブユニットが発現していないことを確認した。また、1 個の R を含む 12 bp の二本鎖 DNA を基質として、細胞溶解液における RNase H2 の酵素活性を測定したところ、KO 株では活性が検出されなかったことから RNase H2 が発現していないことを確認した。次に、野生株および KO 株のゲノム中の R の含量を比較するため、両株から抽出したゲノム DNA をアルカリアガロースゲル電気泳動に供した。野生株に比べて、KO 株のゲノム DNA はより低分子側に移動したことから、RNase H2 の欠損によりゲノムに R が蓄積されていることが示唆された。MTT 法により両株の細胞増殖速度を比較したところ、対数増殖期における倍加時間は野生株が 18 時間、KO 株が 29 時間であり、RNase H2 の欠損により細胞増殖速度が低下した。

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 6 件)

Nishimura, K., Yokokawa, K., Hisayoshi, T., Fukatsu, K., Kuze, I., Konishi, A., Mikami, B., Kojima, K., and Yasukawa,

K.: Preparation and characterization of the RNase H domain of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Protein Expr. Purif.* 113: 44-50 (2015) (査読有)

Katano, Y., Hisayoshi, T., Kuze, I., Okano, H., Ito, M., Nishigaki, K., Takita, T., and Yasukawa, K.: Expression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a cell-free protein expression system. *Biotechnol. Lett.* 38: 1203-1211 (2016)

Baba, M., Kojima, K., Nakase, R., Imai, S., Yamasaki, T., Takita, T., Crouch, R.J., and Yasukawa, K.: Effects of neutral salts and pH on the activity and stability of human RNase H2. *J. Biochem.* 162: 211-219 (2017) (査読有)

Kumari, P., Gautam, S.G., Baba, M., Tsukiashi, M., Matsuo, K., Yasukawa, K., and Nishigaki, K.: DNA-based mutation assay (GPMA) can be of ppb-order sensitivity for both bacterial and mammalian testers. *J. Biochem.* 162: 395-401 (2017) (査読有)

Baba, M., Kakue, R., Leucht, C., Rasor, P., Walch, H., Ladiges, D., Bell, C., Kojima, K., Takita, T., and Yasukawa, K.: Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination. *Protein Eng. Des. Sel.* 30: 551-557 (2017) (査読有)

Katano, Y., Li, T., Baba, M., Nakamura, M., Ito, M., Kojima, K., Takita, T., and Yasukawa, K.: Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81:2339-2345 (2017) (査読有)

[学会発表](計 20 件)

保川清、篠村まゆ、井上國世 組換え HIV-1 逆転写酵素の調製と性状解析 . 2012 年度日本農芸化学会大会 2012 年 3 月 23 日 . 京都女子大学

小西篤、保川清、井上國世 . 部位特異的変異導入による AMV 逆転写酵素サブユニットの熱安定性の向上 . 2012 年度日本農芸化学会大会 . 2012 年 3 月 23 日 . 京都女子大学

横川貴太、西村耕作、深津浩佑、久世郁実、久好哲郎、小西篤、三上文三、兒島憲二、保川清 . MMLV 逆転写酵素の RNase H ドメインの性状解析 . 第 62 回日本生化学近畿支部例会 . 2015 年 5 月 16 日 . 立命館大学びわこ草津キャンパス

Kenji Kojima, Misato Baba, Rihoko

Nakase, Shota Imai, Tomomi Yamasaki, Robert J. Crouch, Teisuke Takita, and Kiyoshi Yasukawa . Effects of Neutral Salts on Catalytic Activity and Stability of Human RNase H2. RNaseH2016. 2016 年 9 月 7 日 . 京都大学楽友会館

兒島憲二、馬場美聡、中瀬理保子、今井翔太、山崎朋美、Robert J. Crouch、滝田禎亮、保川清 . ヒト RNase H2 の活性と安定性に対する塩の影響 . 日本農芸化学会関西支部第 496 回講演会 . 2016 年 7 月 9 日 . 大阪府立大学

馬場美聡、兒島憲二、中瀬理保子、今井翔太、山崎朋美、Robert J. Crouch、滝田禎亮、保川清 . ヒト RNase H2 の酵素化学的性質の解析 . 日本農芸化学会関西支部第 497 回講演会 . 2016 年 9 月 17 日 . 滋賀県立大学

Baba, M., Kojima, K., Nakase, R., Imai, S., Yamasaki, T., Takita, T., Crouch, R.J., and Yasukawa, K. Effects of neutral salts and pH on the activity and stability of human RNase H2. The 37th Midwest Enzyme Chemistry Conference, 2017 年 10 月 14 日 . Loyola University of Chicago, USA

Misato Baba, Kenji Kojima, Rihoko Nakase, Shota Imai, Tomomi Yamasaki, Robert J. Crouch, Teisuke Takita, and Kiyoshi Yasukawa . Effects of neutral salts and pH on catalytic activity of human RNase H2. JSBBA Student Forum. 2016 年 11 月 5 日 . 神戸大学

李瞳陽、片野裕太、中村実世、馬場美聡、伊東昌章、滝田禎亮、保川清 . 全アミノ酸スクリーニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いた耐熱化 MMLV 逆転写酵素スクリーニング系の構築 . 日本農芸化学会 2017 年度大会 . 2017 年 3 月 19 日 . 京都女子大学

馬場美聡、兒島憲二、中瀬理保子、今井翔太、山崎朋美、Robert J. Crouch、滝田禎亮、保川清 . ヒト RNase H2 の酵素活性と安定性に与える中性塩と pH の影響 . 第 62 回日本生化学近畿支部例会 . 2017 年 5 月 27 日 . 大阪大学吹田キャンパス

馬場美聡、Parmila Kumari、Sunita Ghimire Gautam、月足元希、松岡浩司、西垣功一、保川清 . 哺乳動物細胞を用いた GPMA (genome profiling-based mutation assay) 法の検討 . 第 46 回日本環境変異原学会大会 2017 年 11 月 7 日 . 一橋大学

兒島憲二、馬場美聡、杉浦拓也、西村拓人、滝田禎亮、Robert J. Crouch、保川清 . ヒトリボヌクレアーゼ H2 の基質特異性の改変 . 日本農芸化学会関西支部第 500 回講演会 . 2017 年 9 月 22 日 . 大阪府立大学。

馬場美聡、Parmila Kumari、Sunita Ghimire Gautam、月足元希、松岡浩司、西垣功一、保川清。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法の検討。日本農芸化学会関西支部第500回講演会 2017年9月22日。大阪府立大学

Misato Baba, Parmila Kumari, Sunita Ghimire Gautam, Motoki Tsukiashi1, Koji Matsuoka, Koichi Nishigaki, and Kiyoshi Yasukawa. Investigation of genome profiling- based mutation assay using mammalian cells. JSBBA Student Forum. 2017年11月4日。神戸大学

Motoki Tsukiashi, Kenji Kojima, Misato Baba, Teisuke Takita, Kiyoshi Yasukawa. Establishment of an RNase H2-deficient mouse fibroblast cell line NIH3T3. JSBBA Student Forum. 2017年11月4日。神戸大学

兒島憲二，馬場美聡，杉浦拓也，西村拓人，滝田禎亮，Robert J. Crouch，保川清。ヒトリボスクレアーゼ H2 の基質特異性の改変。2017年度生命科学系合同年次大会。2017年12月6日。神戸ポートアイランド

馬場美聡、Parmila Kumari、Sunita Ghimire Gautam、月足元希、松岡浩司、西垣功一、保川清。哺乳動物細胞を用いた GPMA (genome profiling-based mutation assay)法の検討。2017年度生命科学系合同年次大会。2017年12月7日。神戸ポートアイランド

月足元希、馬場美聡、兒島憲二、滝田禎亮、保川清。マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 RNase H2 遺伝子欠損株の作製。2017年度生命科学系合同年次大会。2017年12月6日。神戸ポートアイランド

兒島憲二，馬場美聡，西村拓人，杉浦拓也，滝田禎亮，上原了，Robert J. Crouch，保川清。部位特異的変異導入によるヒト RNase H2 の基質特異性の改変。日本農芸化学会 2018年度大会。2018年3月17日。名城大学天白キャンパス

馬場美聡，角江亮太，Christoph Leucht，Peter Rasor，Heiko Walch，Daniel Ladiges，Christian Bell，兒島憲二，滝田禎亮，保川清。変異の組み合わせによるモロニ マウス白血病ウイルス逆転写酵素のさらなる耐熱化。日本農芸化学会 2018年度大会。2018年3月17日。名城大学天白キャンパス

〔図書〕(計1件)

老川典夫、大島敏久、保川清、三原久明、宮原郁子。エッセンシャルタンパク質工学。講談社。2018年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.enzchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保川 清 (YASUKAWA KIYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：30397559

(2) 研究分担者

兒島 憲二 (KOJIMA KENJI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40542759

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし