

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08229

研究課題名(和文) 線虫ダイサー関連ヘリカーゼの生化学的研究と抗線虫薬創出への応用

研究課題名(英文) Biochemical study of the dicer-related helicases in *C. elegans* for anti-nematode drug discovery

研究代表者

浴 俊彦 (Eki, Toshihiko)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40192512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線虫の繁殖に必須なダイサー関連ヘリカーゼ DRH-3とパラログDRH-1の生化学的解析のため、両DRHタンパク質の調製法を確立するとともに、アッセイ系を構築し、DRH-3の二本鎖RNA依存性ATPase活性を検出した。また、同系を用いたDRH-3活性阻害剤の探索を試みた。さらに、DRH-3とその結合タンパク質E1との相互作用解析のため、GSTタグ融合変異型E1(14種)等を調製した。これらとタグ融合DRH-3とのプルダウンアッセイの結果、E1のTudorドメインから予想されるメチル基結合性は本相互作用には関わらず、E1との結合にDRH-3のN末領域が関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果として、線虫の繁殖に必須なDRH-3が二本鎖RNA依存性ATPase活性を持つことを明らかにした。未だ生化学的解析のなされていないDRH-1の精製法を確立したことや、DRH-3とE1との相互作用解析からTudorドメインやDRH-3のN末領域に関して新規な知見が得られたことは、線虫DRHの機能を分子レベルで解明するための重要な手がかりとなり、RNA干渉研究における学術的意義がある。本研究を基にDRH-3のATPase活性阻害剤を探索することで、神経系を標的とする既存薬とは作用機序の異なる新規抗線虫薬を開発できる可能性があり、今後、社会的意義のある成果に結びつくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study has aimed to clarify the biochemical properties of two RNAi factors DRH-3 (Dicer Related Helicase-3) and its paralog DRH-1 by purifying two DRH proteins. The fluorescence-based ATPase assay system was prepared and the double-stranded RNA-dependent ATPase activity of the purified DRH-3 was successfully found in this assay. I used this assay system to try the screening for potential DRH-3 inhibitors.

I prepared 14 GST-tagged mutated E1 proteins, four RNAi-related proteins and His- or His-SUMO-tagged DRH-3 to examine the protein-protein interaction between E1 (a novel protein with two Tudor domains) and DRH-3 by the pull-down method. The results suggested the Tudor domain/methylated residue-independent interaction between E1 and DRH-3 as well as the potential role of the N-terminal region of DRH-3 in the binding to E1.

研究分野：分子生物学

キーワード：線虫 ダイサー関連ヘリカーゼ タンパク質間相互作用 抗線虫薬 核酸依存性ATPase RNA干渉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体分配の異常は、ゲノムの不安定化により、不稔や遺伝病の発症リスクを上昇させることから、染色体動態制御の仕組みを分子レベルで明らかにすることは医学的に重要である。研究代表者は核酸やクロマチンの動的制御に中核的な働きを担うヘリカーゼファミリーに着目し、代表的な真核生物である出芽酵母や線虫 (*C. elegans*) をモデルに、遺伝子機能抑制表現型や遺伝子発現の網羅的解析を行ってきた() とくに多細胞生物である線虫のヘリカーゼファミリーについては、RNA 干渉を利用して、X 線照射に対して高感受性を示す遺伝子スクリーニングを実施し、過去に報告のなかった RNA ヘリカーゼ様遺伝子 *drh-3* を初めて発見した()。その後、*drh-3* 遺伝子機能抑制線虫の解析により、(1) *drh-3* 遺伝子は生殖細胞の染色体分離に必要であること、(2) 生殖細胞の形成過程に必須であること、(3) DNA 損傷応答機構や寿命への影響はないこと、(4) *drh-3* 発現は生殖腺成熟と高い相関性を示すことなどを明らかにし、論文発表を行った()。同時期に、線虫 RNA 干渉のプロテオーム解析を行っていた Mello らのグループから、*drh-3* 遺伝子産物 (DRH-3) が RNA 干渉複合体に含まれるという報告() がなされ、DRH-3 が RNA 干渉を介して染色体の動的制御に重要な機能を果たしていることが示された。さらに、DRH-3 は高等真核生物に保存されている RNA 干渉関連タンパク質群である Dicer Related Helicase (DRH) ファミリーに属すること、線虫には DRH-3 パラログの DRH-1 が存在し、抗ウイルス経路に働くことも明らかになった。

平成 20 年度以降は、研究代表者が独自に発見した DRH-3 の分子機構を生化学的に解明するための研究を進めた。その結果、ポリヒスチジン (His) タグ融合 DRH-3 の発現・精製法を確立するとともに、酵母 two-hybrid 解析により、DRH-3 と相互作用する線虫タンパク質として、新規 Tudor ドメインタンパク質 E1 を同定した。さらに、E1 遺伝子機能抑制線虫の解析を行い、2 つのタンパク質が同じ経路で機能することを明らかにできたため、DRH-3 と E1 の相互作用解析と生化学的性状解析を中心に線虫 DRH-3 の機能解明に向けた研究を推進してきた。

2. 研究の目的

本研究では、それまでの DRH-3 に関する研究成果を踏まえ、研究対象を線虫の 2 つの DRH (DRH-3 とパラログ DRH-1) に広げ、DRH-3 については新たに創薬標的としての可能性も追求した。具体的な目標として、(1) 線虫 DRH-3 と DRH-1 の発現・精製を行い、未だ生化学的解析がなされていない DRH-1 については核酸依存性 ATPase 活性など生化学的性状を解析すること、(2) 2 つの線虫 DRH の機能の違いを分子レベルで明らかにするため、DRH 相互作用候補タンパク質の調製および DRH との相互作用解析を行うこと、(3) 抗線虫薬の探索を視野に、線虫にユニークな繁殖に必須な DRH-3 の ATPase 活性阻害剤 (DRH-3 阻害薬候補) をスクリーニングするためのアッセイ系を確立することを目指した。

3. 研究の方法

本研究で実施した主な研究項目と方法の概要を以下に示した。

(1) 線虫 DRH-1、DRH-3、E1 タンパク質の発現と精製

これまでに大腸菌発現系を利用した His タグ融合 DRH-3 の調製法を確立していたが、回収量を向上させるとともに、N 末タグの切断・除去による native DRH-3 の調製を行うため、His-SUMO タグ融合 DRH-3 発現コンストラクトを新たに作製し、大腸菌でタンパク質を発現させた。イミダゾール直線濃度勾配溶出によるアフィニティ精製を行ったタンパク質標品を SUMO protease 処理後、ニッケルカラムにかけることで、native DRH-3 の調製を行った。DRH-1 については、DRH-3 の発現・精製法に従った野生型遺伝子からのタンパク質発現・精製が困難であったことから、コドンで大腸菌に最適化した *drh-1* 遺伝子を合成した。His タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ、Strep-SUMO タグ、His-SUMO タグの 4 種類のタグ融合 DRH-1 タンパク質発現コンストラクトを作製し、大腸菌での発現と各タグに対応したアフィニティカラム精製を行った。E1 タンパク質については、プルダウンアッセイ用に GST タグ融合タンパク質として大腸菌で発現、グルタチオンセファロースカラムによるステップ溶出でアフィニティ精製を行った。GST (負対照) N 末および C 末からの欠失変異型 E1 (12 種) および 2 箇所の各 Tudor ドメイン欠失変異型 E1 の発現コンストラクトを KOD mutagenesis kit (東洋紡) により作製し、同様に大腸菌発現系を利用し、変異型 E1 タンパク質を調製した。得られたタンパク質標品は、SDS-PAGE で分画、CBB 染色と抗タグ抗体によるウェスタンブロットにより、発現量と精製度の分析を行った。

(2) 核酸依存性 ATPase アッセイ系の確立と阻害剤スクリーニングの試行

上記 (1) で調製した DRH 標品の核酸依存性 ATPase 活性を検出するために、ATPase 反応から生じた ADP を酵素カップリング法で蛍光定量する方法を適用した。ADP の定量には、Fluorospark Kinase/ADP マルチアッセイキット (和光純薬) を使用した。核酸依存性 ATPase アッセイ系を確立するため、DNA 依存性 ATPase 活性を持つ大腸菌 RecA タンパク質を使用して反応系の最適化と検証を行った。確立したアッセイ系は、ATPase 反応を行う 1 段階目と、生じた ADP を定量する酵素反応の 2 段階目のステップからなり、50 mM EDTA 添加により 1 段階目の反応停止後、ADP の定量反応を行った。

同アッセイ系を用いて、精製した DRH 標品の核酸依存性 ATPase 活性測定を行った。添加する核酸には、27mer の合成二本鎖 RNA および同じ配列の二本鎖 DNA を用いた。また、抗線虫薬創出の観点から、DRH-3 の ATPase 活性阻害剤を探索するため、分子プロファイリング支援活動より阻害剤キットの提供を受け、同系を用いて一部の阻害剤添加による活性への影響調査を試みた。しかしながら、研究を進める過程で、本アッセイ系において、ATPase 反応なしで高いバックグラウンド活性が検出されるという問題が発生し、アッセイ法の再検討も含めて対策を進めている。

(3) 欠失変異型 E1 タンパク質を用いた DRH-3 との相互作用解析

上記(1)で調製した変異型 E1 タンパク質を用いて、His タグ融合 DRH-3 あるいは His-SUMO タグ融合 DRH-3 とのプルダウンアッセイによる相互作用解析を行った。等量のタグ融合タンパク質標品をグルタチオンセファロースビーズ (50 μ L) と混合し、3 回、遠心洗浄を行った後、ビーズに結合したタンパク質を溶出、SDS-PAGE 後、CBB 染色と抗 His および抗 GST 抗体によるウェスタンブロットにて分析を行った。

(4) DRH 結合候補タンパク質の調製と相互作用解析

4 種類の線虫 DRH 結合候補タンパク質 (CSR-1、RDE-4 など) について、cDNA より PCR 増幅した遺伝子を Gateway system (Invitrogen) を利用してクローニングし、塩基配列確認を行った。塩基の変異部位については部位特異的変異導入キット (Stratagene) による校正を行った。Gateway LR 反応にて、pDEST15 ヘクローニング後、(1)と同様に GST タグ融合タンパク質発現コンストラクトを作製し、大腸菌による発現・アフィニティ精製を行った。His-SUMO タグ融合 DRH-3 への結合性については上記(3)の方法に従い、調査を行った。

4. 研究成果

(1) 線虫 DRH-1、DRH-3、E1 タンパク質の調製

線虫 DRH-3 については、His タグ融合および His-SUMO タグ融合タンパク質の発現・精製を実施した。とくに His-SUMO タグ融合 DRH-3 に SUMO protease 処理を適用することで、native DRH-3 の調製に成功した。調製したタグ融合 DRH-3 はプルダウンアッセイや創薬スクリーニングのための ATPase アッセイに使用した。

DRH-1 については、野生型遺伝子では殆どタンパク質発現が確認できなかったが、コドン最適化を行い、宿主や発現条件を検討することで、His タグ融合 DRH-1 の調製が可能となった。しかしながら、発現量が非常に低かったために、さらに 3 種類のタグ融合 DRH-1 の発現・調製を検討した結果、His-SUMO タグが精製度などの点で適していることが判明した。GST タグ融合野生型 E1 タンパク質については、同様に発現、アフィニティ精製した標品をプルダウンアッセイに使用した。

(2) 核酸依存性 ATPase アッセイ系の確立と阻害剤スクリーニングの試行

精製した His タグ融合 DRH-3 標品について、酵素カップリングによる蛍光法で核酸依存性 ATPase 活性の検出を行い、二本鎖 RNA 依存性 ATPase 活性を検出した (図 1)。His タグ融合 DRH-1 についても ATPase 活性測定を行ない、同様の活性を検出したが、その後、本アッセイ系において、ATPase 反応に依存しない高いバックグラウンド活性が見られる問題が発生したため、アッセイ系の検証と改良を進めている。安定して ATPase アッセイができるようになった段階で、調製した His-SUMO タグ融合 DRH 標品を用いた再現性の確認、および阻害剤キットの試薬添加による DRH-3 の ATPase 活性への影響調査を実施する予定である。

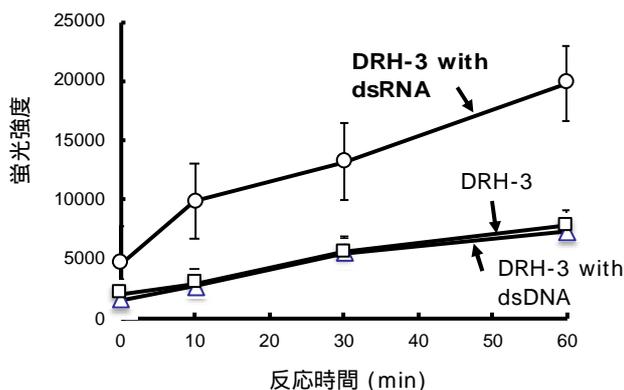


図1 Hisタグ融合DRH-3の二本鎖RNA依存性ATPase活性

(3) 欠失変異型 E1 タンパク質を用いた DRH-3 との相互作用解析

野生型 E1 および 2 種の Tudor ドメイン欠失変異型 E1 と His タグ融合 DRH-3 とのプルダウンアッセイを行った結果、Tudor ドメイン欠失変異型を含めた E1 と DRH-3 との結合が検出された。この結果は、E1 と DRH-3 に関して酵母 two-hybrid 解析から得られた結果と一致する。また片方のみの Tudor ドメインを有する E1 とも結合が見られたことから、相互作用には 2 つの Tudor ドメインが揃っている必要はないことが判明した。一般に Tudor ドメインはメチル化アルギニンあるいはリシン残基との結合に関与することが知られているが、実験に使用した DRH-3 は大腸菌より調製し、メチル化修飾されていないため、E1 の DRH-3 との相互作用は修飾メチル基を介したのではないことが示唆された。

一方、詳細な DRH-3 との相互作用部位を調査するため、12 種の GST タグ融合欠失変異型 E1 タ

ンパク質を大腸菌で発現させ、アフィニティ精製し、11 種の変異型 E1 を調製した (図 2A)。完全長 E1 および負対照の GST とあわせて、His-SUMO タグ融合 DRH-3 とプルダウンアッセイを行ったが、これらと DRH-3 との結合は検出されなかった (図 2B)。この結果は、DRH-3 の N 末端に融合したかさ高い SUMO タグにより E1 との相互作用が干渉された結果と解釈された。この仮説に基づくと、DRH-3 は N 末領域で E1 と相互作用している可能性が考えられるため、現在、この仮説を検証するために、His タグ融合 DRH-3 を用いたプルダウン実験を進めている。

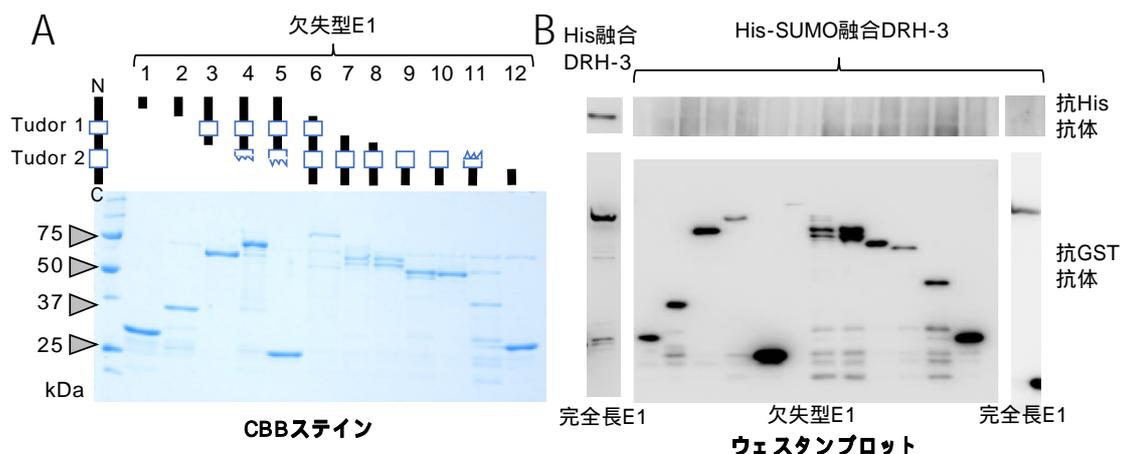


図2 欠失変異型E1の調製とタグ融合DRH-3との相互作用解析

(4) DRH 結合候補タンパク質の調製と相互作用解析

E1 以外に DRH と相互作用する可能性のある 4 種類の線虫 RNA 干渉タンパク質 (CSR-1 や RDE-4 など) の遺伝子をクローニング、塩基配列確認・校正を行い、GST タグ融合発現コンストラクトを調製後、これらの GST タグ融合タンパク質を精製した。(3)と同様に、プルダウンアッセイにより、これらと His-SUMO タグ融合 DRH-3 との相互作用を調査したが、明確な結合は認められなかった。現在、His タグ融合 DRH-3 による再実験を進めている。

< 引用文献 >

- Akiko Shiratori, Takehiko Shibata, Mikio Arisawa, Fumio Hanaoka, Yasufumi Murakami, and Toshihiko Eki, Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast*, 15, 219-253 (1999)
- Toshihiko Eki, Takeshi Ishihara, Isao Katsura, and Fumio Hanaoka, A genome-wide survey and systematic RNAi-based characterization of helicase-like genes in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Research*, 14, 183-199 (2007)
- Masaharu Nakamura, Rumi Ando, Taro Nakazawa, Takuro Yudazono, Naoko Tsutsumi, Naoki Hatanaka, Toshiyasu Ohgake, Fumio Hanaoka, and Toshihiko Eki, Dicer-related *drh-3* gene functions in germ line development by maintenance of chromosomal integrity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*, 12, 997-1010 (2007)
- Thomas F. Duchaine, James A. Wohlschlegel, Scott Kennedy, Yanxiaq Bei, Darryl Conte Jr., KaMing Pang, Daniel R. Brownell, Sandra Harding, Shohei Mitani, Gary Rivkun, John R. Yates III, and Craig C. Mello, Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell*, 124, 343-354 (2006)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Toshihiko Eki, Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress responses: a 40-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 2493-2507 (2018) (査読有)

Hajime Suzuki, Takahiro Sakabe, Yuu Hirose, and Toshihiko Eki, Development and evaluation of yeast-based GFP and luciferase reporter assays for chemical-induced genotoxicity and oxidative damage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 659-671 (2017) (査読有)

[学会発表](計 5件)

村上匠蔵、小林大士、木村康誠、広瀬 侑、浴 俊彦、線虫ダイサー関連ヘリカーゼ DRH の生化学的機能解析、第 83 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、P12、名古屋大学、2019 年 5 月 25 日

小林大士、村上匠蔵、木村康誠、白木 隼、広瀬 侑、浴 俊彦、線虫のダイサー関連ヘリカーゼ DRH-1 と DRH-3 の生化学的研究、第 41 回日本分子生物学会年会、2P-0798、パシフィコ横浜、2018 年 11 月 29 日

小林大士、木村康誠、白木 隼、広瀬 侑、浴 俊彦、線虫のダイサー関連ヘリカーゼ DRH-1 および DRH-3 の生化学的解析、第 82 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、P73、岐阜大学、2018 年 5 月 19 日

浴 俊彦、小林大士、木村康誠、白木 隼、杉野美里、広瀬 侑、2 つの線虫ダイサー関連ヘリカーゼ DRH の発現・精製と生化学的解析、日本薬学会第 138 年会、26PA-am115、金沢、2018 年 3 月 26 日

浴 俊彦、小林大士、木村康誠、白木 隼、杉野美里、飯田誠也、広瀬 侑、線虫ダイサー関連ヘリカーゼ DRH-1 および DRH-3 の生化学的解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、1P-0762、神戸国際会議場、2017 年 12 月 8 日

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：広瀬 侑

ローマ字氏名：(HIROSE, yuu)

研究協力者氏名：小林 大士

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, taishi)

研究協力者氏名：村上 匠蔵

ローマ字氏名：(MURAKAMI, takuro)

研究協力者氏名：木村 康誠

ローマ字氏名：(KIMURA, kosei)

研究協力者氏名：白木 隼

ローマ字氏名：(SHIRAKI, hayato)

研究協力者氏名：杉野 美里

ローマ字氏名：(SUGINO, misato)

研究協力者氏名：飯田 誠也

ローマ字氏名：(IIDA, seiya)