

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590056

研究課題名（和文）：高等生物染色体の動態制御に必須な新規 RNA 干渉分子複合体の解析

研究課題名（英文）：Analysis of a novel protein complex involved in RNAi and maintenance of chromosome integrity in higher eukaryote

研究代表者

浴 俊彦 (EKI TOSHIHIKO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40192512

研究成果の概要（和文）：本研究では独自に発見した線虫 DRH-3 タンパク質の分子機能解析を目指した。DRH-3 と線虫 RNA 干渉因子とのタンパク質間相互作用解析から、新規タンパク質 E1 を同定することに成功した。これは、DRH-3 が当該タンパク質と相互作用して機能することを強く示唆しており、今後、DRH-3 タンパク質複合体の分子機能を解明する上で重要な手がかりになると考えられる。また一連の発現解析から、DRH-3 が細胞内に局在し、生殖腺の形成に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed to clarify the molecular function of a novel nematode RNAi factor DRH-3 that was originally found in my previous work. In this study, I successfully identified a novel E1 protein that interacts with DRH-3 by comprehensive yeast two-hybrid analyses, suggesting that DRH-3 likely functions in the RNAi pathway by interacting with E1 protein in *C. elegans*. Thus, E1 protein could be an important clue to clarify the molecular mechanism of the DRH-3-containing protein complex. In addition, the expression profile analyses suggested that DRH-3 localizes in particular cellular domains and plays a role in germ-line formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：RNA 干渉、線虫、染色体、ヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

複製された DNA が凝縮してできた染色体は、細胞が分裂する際に均等に娘細胞へと分配されなくてはならない。これまでに染色体の動態制御が異常になると、染色体の不分離等によりゲノムの不安定化を招き、不妊や遺伝病、癌の原因となることが知られている。そのため、染色体の動態制御は、細胞増殖や

生殖細胞の形成の際に遺伝情報を正確に伝達するための非常に重要な細胞機能と考えられる。

研究代表者はこれまでに、核酸やクロマチンの動的制御に必須なヘリカーゼファミリーについて、酵母と線虫をモデルにしたゲノムワイドな遺伝子機能研究を進めてきた。1999 年には、出芽酵母ゲノムから同定した

約 100 個のヘリカーゼ様遺伝子を同定し、20 個あまりの新規遺伝子の遺伝子破壊やヘリカーゼ様遺伝子の発現解析を行った (Shiratori *et al.*, *Yeast* [1999])。その後、多細胞生物である線虫をモデルに研究を展開し、線虫ゲノム情報の解析から同定した約 140 種類のヘリカーゼファミリーについて RNA 干渉(RNAi)を利用した機能抑制表現型の網羅的解析を実施し、多くの新たな知見を得た。特に RNAi によって X 線照射に高感受性を示すヘリカーゼ様遺伝子を複数同定することに成功し、その中でこれまでに報告のない新しい *drh-3* 遺伝子 (当時の呼称は D1 遺伝子) を発見するに至った (Eki *et al.*, *DNA Research* [2007])。 *drh-3* 遺伝子は、RNA ヘリカーゼに類似した機能未知タンパク質をコードしており、他種を含め DNA の修復や安定化に関与するタンパク質と有意な相同性のないものであった。

その後、当該遺伝子の生理機能を明らかにすることを目的に、平成 17,18 年度に実施した基盤研究 (C)「新規 RNA ヘリカーゼ D1 の研究を通じた高等真核生物のゲノム安定性維持機構の解明」において、(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)損傷チェックポイント機構や寿命へ関与しないことなどを見出し、論文として発表した (Nakamura *et al.*, *Genes Cells* [2007])。同時期に、RNAi 関連因子のプロテオーム解析を行っていた Mello 博士のグループから、DRH-3 が RNAi に関与するとの報告 (Duchaine *et al.*, *Cell* [2006])がなされ、DRH-3 が RNAi 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明らかになった。

当時、ゲノム安定化に関連した研究は、DNA 修復や細胞周期制御などの関連遺伝子についてのものが大半であり、RNAi 関連遺伝子についての研究報告は殆ど存在しなかった。また、RNAi に関しては、国内外で数多くの研究がなされていたにもかかわらず、分裂酵母のセントロメア構築に RNAi 関連タンパク質が関与していることを示す報告、あるいは RNAi に必須な Dicer が染色体動態に関与することを間接的に示唆した報告などを除き、高等生物における染色体安定化に関する具体的な分子機構については殆ど知られていなかった。

研究代表者が見出した DRH-3 は分裂酵母の RNAi 関連タンパク質や Dicer とは全く異なっており、新規な染色体制御に関与する RNAi 関連タンパク質であった。これまでの RNAi の研究から、DRH-3 は、単独で機能するのではなく、他のタンパク質と相互作用し複合体として機能する可能性が高いことが予想された。したがって、DRH-3 を含む機

能分子複合体あるいは相互作用タンパク質を解明することで、RNAi 関連タンパク質がどのような分子機構で染色体の動的制御に関与しているかを明らかにできると考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて研究代表者は、(1)タンパク質間相互作用解析によって、DRH-3 と同じ染色体機能に関与する線虫 RNAi 関連タンパク質を探索し、DRH-3 が関与する反応経路を明らかにすること、(2)DRH-3 機能分子複合体の分子構成を明らかにすること、(3)項目(1)で発見された DRH-3 相互作用タンパク質の哺乳類ホモログを同定し、染色体動態制御への関与について研究すること、以上の三点を通して、高等生物における RNAi を介した染色体安定化機構を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究で実施した研究項目と方法の概要を以下に示した。

(1) DRH-3 タンパク質複合体構成タンパク質候補の探索

酵母 two-hybrid 法とプルダウン法により、線虫の RNAi 関連タンパク質と DRH-3 との相互作用の有無を検討した。解析対象として選択した約 20 種類の線虫 RNAi 関連タンパク質をコードする cDNA を Gateway 法が適用可能なエンターベクターに PCR でクローニングした。cDNA の未クローン部分は線虫集団から作成した cDNA プールから RT-PCR により増幅した。タンパク質間相互作用解析については、酵母 two-hybrid 解析用組換えプラスミドを Gateway 法により構築、形質転換体を作成した。実験は酵母 two-hybrid 解析を最初に行い、相互作用が検出されたタンパク質同士をプルダウン法で検証する順で行った。酵母 two-hybrid 解析では、栄養要求性の回復と β -ガラクトシダーゼのレポーター活性誘導を指標に DRH-3(bait)と対象タンパク質(pre)について個別に相互作用解析を行った。

(2) DRH-3 タンパク質の調製と生化学的解析

DRH-3 タンパク質の生化学的解析のため、大腸菌発現系を利用したタンパク質調製法について検討した。通常、汎用される BL21[DE3]株と pET 系ベクターとの組み合わせでは発現タンパク質が不溶化することが既に判明していたので、複数の大腸菌種とベクター系を試し、最終的に Rosetta2[DE3]株と pET300/NT-DEST ベクターとの組み合わせで実験を行った。ヒスチジンタグ融合タンパク質の発現と部分精製については、定法

に従った。また、予測 ATP 結合部位などに対する DRH-3 の変異体タンパク質発現用組換えプラスミドは、合成 DNA と PCR を用いた部位特異的変異導入法により作成した。

(3) 抗体作成と *drh-3* 発現様式の解析

実験開始時、精製 DRH-3 タンパク質が入手できなかったため、外部企業に委託して、DRH-3 の N 末と C 末のアミノ酸配列からペプチドを合成し、それぞれを抗原にウサギを免疫し、抗血清を得た。

drh-3 遺伝子の発現については、各発生ステージの線虫から調製した cDNA プールを用いた半定量 RT-PCR を行うとともに、ジゴキシン標識 *drh-3* cDNA プロブを用いたホルマウント *in situ* hybridization 法により、線虫の発生過程における *drh-3* mRNA の空間的・継時的な発現パターンを解析した。

(4) DRH-3 の細胞内局在部位の解析

Gateway 法により GFP 融合 DRH-3 タンパク質を発現する pcDNA-DEST53-*drh3* を作成し、Lipofectamine2000 によりヒト 293T 細胞へトランスフェクションし、蛍光顕微鏡下、細胞内で発現した融合タンパク質の細胞内局在解析を行った。

(5) DRH-3 相互作用因子のヒトホモログの同定と解析

項目(1)で同定された E1 タンパク質のアミノ酸配列をクエリー配列として、データベース(NCBI)において BLAST による相同性検索を行い、各生物種の類似タンパク質を探索した。

4. 研究成果

本研究から得られた主な成果を以下の項目ごとに纏めた。

(1) DRH-3 タンパク質複合体構成タンパク質候補の探索

線虫 RNA 干渉因子 (22 種) について、それらの cDNA クローニングを行い、酵母 two-hybrid 解析用組換えプラスミドを構築して、タンパク質間相互作用解析を行った結果、DRH-3 と相互作用する新規タンパク質 (以下、E1 と略称) を初めて同定した (図 1)。E1 タンパク質と DRH-3 との相互作用については、タグ融合 E1 タンパク質の大腸菌発現組換えプラスミドを作成し、プルダウン法を行うことで結果を検証中である。このほか、トランスポゾン転移抑制に関与する RDE-2 と MUT-7 との相互作用等も同定できた。

cDNA サイズが大きいため、完全長 cDNA のクローニングができていなかった 3 遺伝子 (*der-1*, *rrf-3*, *ego-1*) についても RT-PCR による欠失断片の回収と完全長 cDNA の構築

に成功しクローニングの最終段階に至っている。

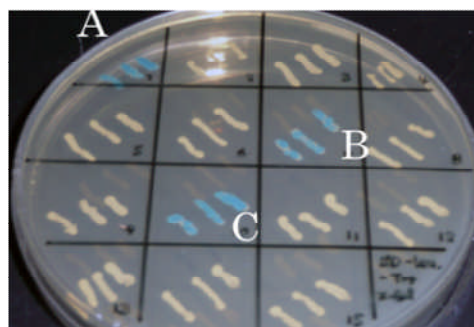


図 1 酵母 two-hybrid 解析の結果

(形質転換コロニーの呈色分析の結果を示す。相互作用する場合、コロニーが青色を呈する。A: ポジティブコントロール、B: DRH-3 と E1、C: RDE-2 と MUT-7)

(2) DRH-3 タンパク質の調製と生化学的解析

DRH-3 発現用組換えプラスミドを導入した Rosetta2[DE3] 株を低温培養することで可溶性ヒスチジンタグ融合 DRH-3 タンパク質を発現させ、メタルアフィニティカラムで部分精製することに成功した (図 2)。ATP 結合部位や RNA 結合部位などヘリカーゼ活性に関連すると予測されるアミノ酸残基をそれぞれ変異させた 3 種類の DRH-3 変異体タンパク質を発現する組換えプラスミドを作成した。

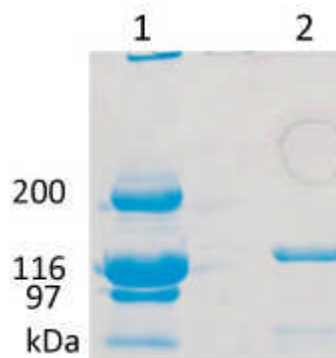


図 2 タグ融合 DRH-3 タンパク質の部分精製

(SDS-PAGE ゲルの CBB 染色像を示す。レーン 1: 分子量マーカー、レーン 2: 部分精製されたヒスチジンタグ融合 DRH-3 タンパク質標品)

(3) 抗体作成と *drh-3* 発現様式の解析

DRH-3 ペプチドで免疫したウサギ血清から粗抽出した抗体画分や部分精製抗体の検出特性について評価を行ったが、ウエスタンブロットや免疫沈降に用いる十分な特異性を確認できなかった。

半定量 RT-PCR とホルマウント *in situ* hybridization 法により、*drh-3* mRNA の発現解析を行った結果、線虫の発生・成長過程

に伴って、主に生殖腺において発現量が上昇することを明らかにした(図3)。細胞増殖阻害剤(FUdR)を用いた実験からも、*drh-3* 遺伝子発現と卵巣形成を伴う成長との関連性が強く示唆された。

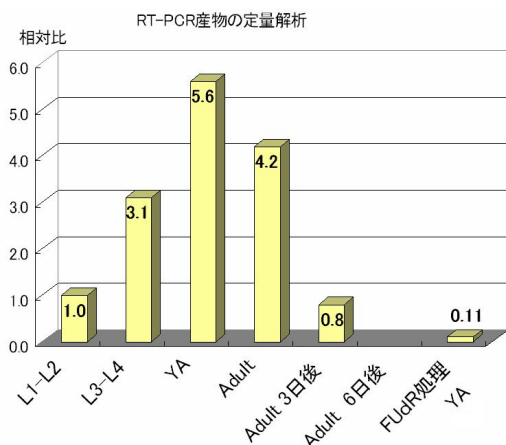


図3 発生・成長に伴う *drh-3* 遺伝子発現変化 (縦軸とバーの数字は各発生ステージにおける、L1-L2 幼虫期の値を 1.0 とした場合の *drh-3* mRNA レベルの相対値を示す。L1-L4: 幼虫期、YA: 成虫初期、Adult: 成虫期、日数は成虫期以降の飼育日数を示す)

(4) DRH-3 の細胞内局在部位の解析

GFP 融合 DRH-3 タンパク質を発現する培養細胞用発現組換えプラスミドをヒト 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞内局在部位の解析を行った。GFP のみ発現させた細胞では細胞全体に GFP シグナルが観察されたのに対して、トランスフェクション効率が数%と低かったものの、GFP 融合 DRH-3 タンパク質発現細胞では、細胞内の一部に限局された GFP シグナルが観察された。以上の結果から、DRH-3 は細胞内の限られた領域で機能することが示唆された。

(5) DRH-3 相互作用因子のヒトホモログの同定と解析

E1 タンパク質のアミノ酸配列を相同性検索した結果、哺乳類の E1 ホモログと考えられる配列は同定できなかった。その他の高等生物ホモログについても同様であった。しかし、他種の線虫には E1 ホモログ候補が複数見いだされたことから、E1 タンパク質は線虫に特異的なタンパク質と考えられた。

以上の結果から、DRH-3 タンパク質と相互作用して機能する可能性が高い新規タンパク質(E1)を初めて同定することに成功した(論文作成中)。DRH-3 については、これまでのプロテオーム解析等から DCR-1 複合体(Duchaine *et al. Cell* 2006)や RRF-1 複合体(Aoki *et al., EMBO J.* 2007)として存在する

可能性が示唆されているが、直接、DRH-3 と相互作用する線虫タンパク質を同定したのは本研究が初めてである。本研究で同定された E1 タンパク質の機能は未だ不明であるが、今後、E1 タンパク質を手がかりに、新たな相互作用タンパク質を探索することで、詳細な分子機構の解明が期待される。

DRH-3 タンパク質の機能解析に関連して、本研究で DRH-3 タンパク質や変異体タンパク質の調製が可能となったことから、今後、精製 DRH-3 タンパク質の生化学的解析ならびに E1 タンパク質との相互作用ドメインや機能部位の同定などを進める予定である。

また、本研究における一連の発現解析の結果から、DRH-3 が細胞内の限定された領域に局在し、生殖細胞形成に関与することが示唆された。DRH-3 の細胞内局在部位については、より詳細な検討が必要ではあるが、細胞質で機能することが一般的な多くの RNAi 関連因子とは異なる細胞内挙動をとる可能性があり非常に興味深い。

一方、DRH-3 相互作用タンパク質 E1 について、他の線虫ホモログは同定されたが、哺乳類の E1 ホモログは見いだされなかった。この結果と分裂酵母などでは Dicer 等の RNAi 関連タンパク質の機能欠損により染色体不安定化が誘起されるという報告を踏まえると、哺乳類では異なる RNAi 関連タンパク質が染色体動態制御に関わっている可能性も考えられる。今後、哺乳類細胞を用いた siRNA 法により、染色体安定化に関与する RNAi 関連遺伝子を探索することも考えられよう。

さらに今後、本研究で構築した 20 種以上の RNAi 関連因子の発現用組換えプラスミドを用いた総当たりでの相互作用解析により新たな相互作用を発見することで、線虫における RNA 干渉因子間の分子ネットワークの実体解明に迫ることも可能となろう。

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 3 件)

- ① Yukari Ochi, Harumi Sugawara, Mio Iwami, Megumi Tanaka and Toshihiko Eki: Sensitive detection of chemical-induced genotoxicity by the *Cypridina* secretory luciferase reporter assay using DNA repair-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **28**, *in press* (2011) (査読有)
- ② Masaru Kurauchi, Hisashi Morise, and Toshihiko Eki: Using the nematode *Caenorhabditis elegans*

daf-16 mutant to assess the lifespan toxicity of prolonged exposure to ecotoxic agents. *Journal of Health Science*, **55(5)** 796-804 (2009) (査読有)

- ③ Toshihiko Eki: Assessment of exposure to detergents in *Caenorhabditis elegans*. *Household and Personal Care Today*, **3(4)**, 34-36 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 浴 俊彦, 染色体安定化を司る線虫 RNA 干渉因子 DRH-3 のタンパク質間相互作用解析, 日本薬学会第 131 回年会, 2011 年 3 月 30 日, 静岡
- ② 堀岡敬太、線虫 Dicer 様 RNA ヘリカーゼ DRH-3 のタンパク質機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸
- ③ 浴 俊彦, Systematic survey and sequence analysis of helicase-like proteins in the sequenced organisms, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
- ④ Toshihiko Eki, A lifespan-based assay to assess the long-term toxicity of prolonged exposure to ecotoxic agents using *C. elegans*, The 17th International *C. elegans* Meeting, 2009 年 6 月 25 日, Los Angeles (USA)
- ⑤ 浴 俊彦, 線虫ゲノム安定化に必要な新規 RNA 干渉遺伝子 *drh-3* の発現解析, 日本薬学会第 129 回年会, 2009 年 3 月 26 日, 京都
- ⑥ 浴 俊彦, 線虫 Dicer 様 RNA ヘリカーゼ *drh-3* の発現解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸
- ⑦ Toshihiko Eki, Dicer-like *drh-3* gene functions in germ line development and maintenance of chromosomal integrity in *Caenorhabditis elegans*, The 6th 3R symposium, 2008 年 10 月 29 日, Kakegawa (Japan)
- ⑧ 堀岡敬太、染色体動態制御に必須な線虫 RNA 干渉因子 *drh-3* の機能解析, 第 72 回日本生化学会中部支部例会, 2008 年 5 月 24 日, 岐阜

[図書] (計 8 件)

- ① Toshihiko Eki, 他, *Advances in Genetics Research. Volume 3*, (Kevin V. Urbano Ed.), Nova Science Publishers, 2011 年, 印刷中
- ② Toshihiko Eki, 他, *Ecotoxicology Around the Globe*, (Julia E. Visser

Ed.), Nova Science Publishers, 2011 年, 印刷中

- ③ 浴 俊彦, 他, 理工系のための生命と環境の科学入門 (平石明編), 東京化学同人, 2011 年, 印刷中
- ④ 浴 俊彦, 他, 分子細胞生物学事典 (村上康文編), 医事評論社, 2011 年, 印刷中
- ⑤ Toshihiko Eki and Fumio Hanaoka, 他, *Bacterial DNA, DNA polymerase and DNA Helicases* (Walter D. Knudsen and Sam S. Bruns Eds.), Nova Science Publishers, 2010 年, pp.411-432.
- ⑥ 浴 俊彦, 他, ノーベル賞の生命科学入門 RNA の新世界 (菊池洋編), 講談社サイエンティフィク, 2009 年, pp.148-170.
- ⑦ Tsuyoshi Ohkumo, Chikahide Masutani, Toshihiko Eki, and Fumio Hanaoka, 他, *Methods Molecular Biology*, 442, RNAi (Barik, S. Ed), Humana Press, 2008 年, pp.129-137.
- ⑧ 浴 俊彦, 他, 生態恒常性工学 (藤江幸一編), コロナ社, 2008 年, pp.166-170.

[その他]

ホームページ等

<http://www.eco.tut.ac.jp/~ekilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浴 俊彦 (EKI TOSHIHIKO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 40192512