

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590074

研究課題名(和文) 高等真核生物の染色体安定化を司る新規RNA干渉複合体DRH-3・E1の機能研究

研究課題名(英文) The study on molecular functions of the novel RNAi factors DRH-3 and E1 which are required to maintain the chromosome integrity in higher eukaryote

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が初めて見いだした、線虫の染色体動態制御と生殖細胞形成に必須なダイサー関連ヘリカーゼ DRH-3、およびDRH-3と相互作用する新規Tudorドメインタンパク質E1の分子機能解明を目指した。両遺伝子の変異体作成(計10種類)を行い、野生型と各種変異型のHisおよびGSTタグ融合タンパク質を調製し、生化学的解析を進めた。精製タンパク質を用いたプルダウン法により、野生型DRH-3とE1が結合することを初めて実証した。さらに遺伝学的解析により、DRH-3とE1が同じ経路で機能することを、細胞生物学的解析により、DRH-3とE1が細胞核内に局在する可能性をそれぞれ示した。

研究成果の概要(英文)：This study has aimed to clarify the molecular function of two RNAi factors DRH-3 (Dicer Related Helicase-3) and E1 (a novel protein with two Tudor domains) that I originally found to be in dispensable for germ-line formation in *C. elegans*. In this study, I generated the DNA constructs for expression of 10 mutated proteins and successfully prepared His- and GST-tagged-native and some of mutated versions of DRH-3 and E1 proteins using the *E. coli* protein expression system, and showed the physical interaction between DRH-3 and E1 by pull-down method with differently tagged-native proteins. In addition, genetic and cytological observations on both genes have suggested that DRH-3 and E1 proteins act in the same pathway of RNAi in nucleus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ダイサー関連ヘリカーゼ RNA干渉 線虫 タンパク質機能解析

1. 研究開始当初の背景

DNA を複製・維持する際の染色体分配は、遺伝情報を安定に娘細胞へ伝える上で非常に重要な過程である。染色体不分離等の異常によりゲノムの不安定化を生じ、不稔や癌などの遺伝病発症リスクが上昇することが良く知られており、染色体動態制御は細胞増殖や生殖細胞形成において重要な機能を果たしている。

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 (*S. cerevisiae*) と線虫 (*C. elegans*) をモデルに網羅的に遺伝子機能抑制表現型解析や遺伝子発現解析を行ってきた (Shiratori *et al.*, *Yeast*, 1999, Eki *et al.*, *DNA Res.*, 2007)。特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 (RNAi) を利用して、紫外線照射や X 線照射に対して高感受性を示す遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、候補遺伝子の中にこれまでに報告のない新規な RNA ヘリカーゼをコードする遺伝子 *drh-3* (当時は D1 と命名) を初めて発見した (Eki *et al.*, *DNA Res.*, 2007)。

平成 17, 18 年度、*drh-3* 遺伝子の生理機能を明らかにすることを目的に、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」を実施し、(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の影響はないことなどを見出し、論文発表した (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 らのグループから、DRH-3 が RNAi に関与すると報告 (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判明した。遺伝子産物である DRH-3 は、高等真核生物に保存されている Dicer Related Helicase (DRH) ファミリーに属することも明らかになった。

RNAi 研究の進展に伴い、分裂酵母などで、ヘテロクロマチン形成を介した RNAi 経路による染色体制御について報告されたが、線虫など高等動物における分子機構については不明な点が多く、*drh-3* 遺伝子と遺伝子産物 (DRH-3) の機能解明を目的として、平成 20 年度～22 年度に基盤研究 (C) 「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」を実施した。その結果、(1) DRH-3 と相互作用する候補タンパク質として、機能未知の E1 を初めて同定し、(2) *drh-3* 遺伝子発現プロファイル解析により同遺伝子が生殖細胞形成と密接に関連することを明らかにした。以上の研究成果に基づき、独自に発見した DRH-3 と E1 との相互作用を手がかりとして、RNAi による染色体動態制御を分子レ

ベルで解明するための研究を推進してきた。

2. 研究の目的

本研究では、最終的に高等真核生物における RNA 干渉による染色体動態制御機構の解明を目指して、独自に発見した線虫のダイサー関連ヘリカーゼ DRH-3、および DRH-3 と相互作用することが示唆された、2 箇所の Tudor ドメインを持つ新規タンパク質 E1 に関する研究を行った。具体的には、(1) 変異型を含めた DRH-3 と E1 タンパク質の調製と生化学的性状解析、(2) DRH-3 と E1 との相互作用および相互作用ドメインの同定、(3) E1 タンパク質の Tudor ドメインを介したメチル化ヒストンへの結合性の検証、および E1 機能抑制表現型の遺伝学的解析、(4) DRH-3 と E1 の GFP タグ融合タンパク質の異種細胞内局在解析、(5) DRH-1 タンパク質の調製と解析 (追加項目) 以上の項目を中心に研究を実施することで、DRH-3 と E1 タンパク質の分子機能を明らかにすることを目指した。

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) 変異型を含めた DRH-3 と E1 タンパク質の調製と生化学的解析

野生型 DRH-3 および E1 タンパク質の調製のため、Gateway 法に準拠した cDNA クローニング (TOPO クローニング) と発現コンストラクトの調製を行った。精製用タグとして、N 末融合型のポリヒスチジン (His) タグとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグを用いた。変異型 DRH-3 として、ATPase 触媒予想残基を含む 5 種類のアラニン置換変異 (C1007A/C1010A など) および RNAi 欠損表現型を示す線虫変異体から同定された 3 種類の点変異 (G802E など) をコードする変異型遺伝子を合成 DNA による PCR 法により作製した。E1 タンパク質については、2 箇所の Tudor ドメインの機能解析のため、それぞれのドメインを欠失させた 2 種類の変異遺伝子を合成 DNA とインバース PCR を利用した方法により作製した。これらの野生型および欠失変異型遺伝子を LR 反応により発現ベクター (His タグ融合タンパク質の場合は pET300、GST 融合タンパク質の場合は pDEST15) に導入し発現コンストラクトを構築した。これら大腸菌 Rosetta2 株に導入、IPTG による発現誘導を行い、菌体破碎と抽出液調製を経て、産物の可溶性を評価した後、可溶化した場合は各アフィニティカラムにてタンパク質の精製を行った。

(2) DRH-3 と E1 タンパク質との相互作用と相互作用ドメインの同定

上記のように調製した His タグ融合 DRH-3 と GST タグ融合 E1 タンパク質とを用いて、プルダウン法による相互作用の解析を行っ

た。ニッケル固定化ビーズで沈降させたタンパク質に対して、SDS-PAGE を行い、パーオキシダーゼ標識抗 GST タグ抗体を用いた検出を行った。逆にグルタチオンセファロースビーズによる沈降と酵素標識抗 His タグ抗体による実験も行った。あわせて、DRH-3 との相互作用の有無を再検証するため、複数の線虫 RNAi 関連タンパク質を用いた酵母 two hybrid 法による実験も実施した。

(3) E1 タンパク質の機能解析

Feeding RNAi による線虫 E1 機能抑制表現型の解析を行った。胎性致死など *drh-3* 遺伝子機能解析と同様の指標について検証した。項目(1)で、メチル基結合に關与する可能性のある Tudor ドメインの欠失変異型 E1 を調製するなど、タグ融合 E1 タンパク質とメチル化ヒストンとのプルダウン実験の準備を行った。

(4) DRH-3 と E1 タンパク質のヒト細胞内局在解析

Gateway LR 反応により、真核生物用 GFP 融合タンパク質発現ベクター pcDNA-DEST53 に *drh-3* および *E1* cDNA を導入し、GFP 融合 DRH-3 と E1 タンパク質発現コンストラクトを作製し、ヒト 293T 細胞にトランスフェクション後、72 時間目の GFP 発現を蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) DRH-1 タンパク質の調製と解析

研究計画の変更に伴い追加した項目である。新たに DRH-3 のパラログである DRH-1 の発現・調製を実施した。*drh-1* cDNA を PCR によりクローニングした後の詳細は、項目(1)の DRH-3 タンパク質調製に準じて行った。

4. 研究成果

本研究で得られた成果を項目ごとに記載した。

(1) 変異型を含めた DRH-3 と E1 タンパク質の調製と生化学的解析

野生型の His タグ融合および GST タグ融合 DRH-3 タンパク質の精製を完了した。野生型 E1 タンパク質についても両タグ融合タンパク質の発現・精製に成功した(図 1)。8 種類の変異型 *drh-3* 遺伝子および 2 種類の Tudor ドメイン欠失変異型 *E1* 遺伝子の作製を行い、それぞれの His タグと GST タグ融合発現コンストラクトを作製したが、欠失変異型 E1 と 1 種類の変異型 DRH-3 (図 1)を除き、野生型タンパク質と同様の条件では、大部分が発現後に不溶化してしまうことが判明した。これらについては、培養・発現条件を詳細に検討中であり、一部は調製可能とのデータを得ている。DRH-3 の生化学的解析については現在、野生型タンパク質を用いて核酸依存性 ATPase 活性について詳細な解析を行っている。今後、変異型 DRH-3 の調製が進み次第、

体系的な解析を進める(E1 の生化学的解析については項目(3)に記載)。

(2) DRH-3 と E1 タンパク質との相互作用と相互作用ドメインの同定

野生型 DRH-3 と E1 タンパク質との相互作用をプルダウン法にて確認した。図 1 で調製した GST タグ融合 DRH-3 と His タグ融合 E1 を用いたプルダウン実験を行った結果、GST 融合野生型 DRH-3 および点変異型 DRH-3 を含む反応液のグルタチオンセファロース結合画分に His タグ融合 E1 タンパク質を検出したが、GST のみを含む負対照の反応液では検出されず、DRH-3 と E1 との結合が示された。現在、欠失変異型 E1 を用いて、両者の相互作用に 2 つの Tudor ドメインが關与するか検証を進めている。

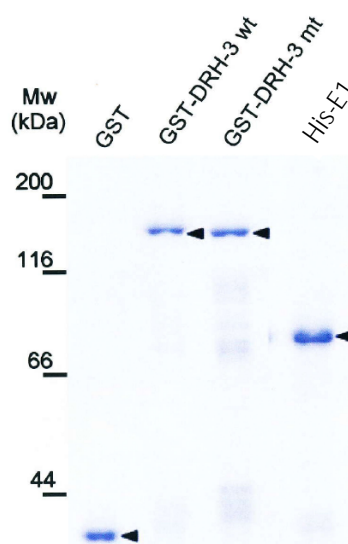


図 1 タグ融合 DRH-3 と E1 の精製標品
各タグ融合タンパク質の 10% SDS-PAGE ゲルを CBB 染色した結果を示す。DRH-3wt、DRH-3mut はそれぞれ野生型、点変異型 DRH-3 を示す。

(3) E1 タンパク質の機能解析

E1 遺伝子機能抑制線虫の表現型解析の結果、*drh-3* 遺伝子機能抑制個体と類似した胎性致死などの表現型が観察され、両遺伝子が同一経路にて機能することが示唆された。*E1* タンパク質のメチル化ヒストン結合実験については、野生型と欠失変異型 *E1* が調製できたので、メチル化ヒストン標品を入手し、プルダウン実験を開始した。

(4) DRH-3 と E1 タンパク質のヒト細胞内局在解析

GFP 融合 DRH-3 と E1 タンパク質をヒト 293T 細胞内で一過性発現させた結果、72 時間後に GFP 蛍光シグナルが細胞全体に観察されたのに対して、GFP 融合 DRH-3 と GFP 融合 E1 は核内に局在することが判明した(ヘキスト 333423 による DNA 染色と対比)。異種細胞に

よる結果ではあるが、両者が核内でクロマチンサイレンシングに關与する可能性も考えられることから、今後、変異型タンパク質を用いるなどして結果を詳細に検証する必要がある。

(5) DRH-1 タンパク質の調製

研究計画に新たに追加した項目である。線虫 DRH-3 のパラログであり、抗ウイルス応答に關与することが示唆されている DRH-1 タンパク質を調製し、DRH-3 と分子機能について生化学的に比較検討することを目指した。DRH-3 と同様の手法により、クローニングと発現コンストラクトの作製を行い、DRH-1 タンパク質の調製を目指したが、DRH-3 とは異なり、His タグ、GST タグともに発現タンパク質が不溶化したため、DRH-1 の精製はできなかった。現在、別種の発現ベクターによる調製を試みている。

以上の結果より、目的とした野生型 DRH-3 と野生型および変異型 E1 タンパク質の調製を完了し、両者の相互作用を初めて実証した。変異型 DRH-3 タンパク質の調製が予定より遅れたことから、生化学的解析や詳細な相互作用ドメインの同定は現在進行中である。本研究におけるタンパク質間相互作用解析と E1 機能抑制表現型解析の結果から、両者が同じ分子経路で機能すること、さらに DRH-3 と E1 の異種細胞発現解析の結果から、両タンパク質が核内で働く可能性がそれぞれ示された。なお、新たに DRH-1 タンパク質の調製などを追加するなど、タンパク質解析に重点を絞った研究計画の一部変更を行い、当初計画に盛り込んだ試験管内 RNAi 反応系の解析は実施しなかった。

DRH-3 については、近年、米国グループにより、野生型 DRH-3 の ATPase 活性が報告 (Matranga and Pyle, J. Biol. Chem., 2010) されているが、変異型タンパク質を用いた DRH-3 の詳細な機能ドメインについては解明されていない。また、DRH-3 の分子複合体とその機能については、遺伝学的解析からのモデル (ダイサーや RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとの仮想的複合体) は提唱されているものの、依然その実体は不明なままであり、本研究で DRH-3 と E1 との相互作用を明らかにできたことは DRH-3 複合体の構造・機能の解明に貢献すると考えられる。現時点で、変異型 DRH-3 および E1 タンパク質の生化学的解析については国内外で報告はなく、今後、本研究をさらに推進することにより、高等真核生物における RNAi 分子機構に関して新たな知見が得られるものと期待される。

DRH-3 は、高等真核生物に保存されている DRH ファミリーに属するタンパク質である。哺乳類には DRH-1 と DRH-3 のパラログとして各種ウイルス感染防御に働く RIG-I, MDA5 などが存在することから、本研究は高等真核生物の DRH ファミリーの機能と構造の理解、お

よびそれらを標的とした創薬研究につながることを期待される。

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 4 件)

Toshihiko Eki, Yasufumi Murakami and Fumio Hanaoka: Trapping DNA replication origins from the human genome. *Genes(Basel)*, 4(2), 198-225 (2013) (査読有)

DOI: 10.3390/genes4020198

Hisashi Morise, Erika Miyazaki, Shoko Yoshimitsu, and Toshihiko Eki: Profiling nematode communities in unmanaged flowerbed and agricultural field soils in Japan by DNA barcode sequencing. *PLoS One*, 7(12), e51785 (12 pages)(2012) (査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0051785

Hiroki Yamaguchi, Hachiro Yasuda, Toshihiko Eki, Hirofumi Kurita, Kazunori Takashima, and Akira Mizuno: Detection of DNA damages in *Saccharomyces cerevisiae* caused by non-thermal atmospheric pressure plasmas. *J. Inst. Electrostat. Jpn.*, 35(1), 8-13 (2011) (査読有)

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(4), 265-278 (2011) (査読有)

[学会発表](計 11 件)

洲崎和真、線虫の染色体動態制御に關与する新規 Tudor ドメインタンパク質の調製と解析、日本薬学会第 134 回年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本市)

渡部周二、染色体動態制御に必須な線虫 RNA 干渉タンパク質 DRH-3 の分子機能解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(神戸市)
渡部周二、染色体動態制御に必須な線虫 RNA 干渉タンパク質 DRH-3 の機能解析、第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日、名古屋大学(名古屋市)

堀岡敬太、線虫 *C. elegans* の染色体安定化に關わる DRH-3 タンパク質の機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、マリンメッセ福岡(福岡市)

Keita Horioka, Systematic screening for RNAi-related proteins that interact with a novel Dicer-like RNA helicase DRH-3 in *C. elegans*, The Irago conference (The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference (AP-IRC2012)), November 15, 2012, Tahara (Aichi, Japan)

堀岡敬太, Further characterization of a novel Dicer-like RNA helicase DRH-3 in *C. elegans*, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(横浜市)

Keita Horioka, Systematic screening for RNAi-related proteins that interact with a novel Dicer-like RNA helicase DRH-3 in *C. elegans*, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), November 17, 2011, Toyohashi (Aichi, Japan)

Toshihiko Eki, Further characterization of *drh-3* RNAi-treated nematode *C. elegans*, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), November 17, 2011, Toyohashi (Aichi, Japan)

〔図書〕(計 6件)

浴 俊彦, 他, 技術情報協会, バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発, 2014, 印刷中

浴 俊彦, 他, みみずく舎(医事評論社), 分子細胞生物学事典, 2013, pp. 330-339, pp.391-425, pp.442-456

浴 俊彦, 他, 羊土社, キーワードで理解するシグナル伝達キーワード事典, 2012, pp.126-141

浴 俊彦, 他, 東京化学同人, 理工系学生のための生命科学・環境科学, 2011, pp.34-59

Toshihiko Eki, 他, Nova Science Publishers, Ecotoxicology Around the Globe, 2011, pp.1-52

Toshihiko Eki, 他, Nova Science Publishers, Advances in Genetics Research. Volume 3, 2011, pp.167-203

〔その他〕

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/molgenetics/>

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