

## RNase H2 のゲノム修復効果に対する塩の影響

保川 清, 兒島 憲二

京都大学大学院農学研究科

**概要 【目的】** リボヌクレアーゼ H (RNase H) は, DNA と RNA からなるヘテロ 2 本鎖を分解する酵素である。細菌から高等生物に至る, 全ての生物細胞に存在する。近年, 細胞内で DNA に, RNA の構成成分であるリボヌクレオチドが, 多い場合は 1,000 塩基に 1 塩基, 誤って取り込まれていることや, RNase H がこれを除去してゲノムの安定化に寄与していることが明らかになった。ヒトにおいては, RNase H の活性低下と疾患, 特に重篤な神経疾患である Aicardi-Goutières 症候群との関連が注目を集めている。本研究では, ヒト RNase H2 の活性および安定性に対する塩の効果を解析した。

**【方法】** ヒト RNase H2 は大腸菌で発現させ, 菌体から精製した。活性測定は, 3-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA (5'-gaucugagccugggagcu-3') と 5'-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA (5'-AGCTCCCA GGCTCAGATC -3') から成る二本鎖を基質とし, 反応液の蛍光(励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm)を連続測定した。

**【結果】** 活性は, NaCl あるいは KCl 濃度が 0–60 mM では塩濃度の増加に伴い増加したが, 60–200 mM では塩濃度の増加に伴い減少した。60 mM NaCl あるいは KCl 存在下での活性は, 塩非存在下での活性のそれぞれ 390%, 310%であった。10 mM NaCl 存在下で 30°C, 35°C あるいは 40°C で熱処理を行ったときの一次の熱失活定数 ( $k_{obs}$ ) は, 塩非存在下で熱処理を行ったときのそれぞれ 92%, 63%, 67% であり, 10 mM NaCl により熱失活が抑制された。

**【考察】** 細胞内では NaCl および KCl はヒト RNase H の活性および安定性を向上させていると考えられる。

### 1. はじめに

リボヌクレアーゼ H (RNase H) は, DNA と RNA からなるヘテロ 2 本鎖を分解する酵素である。細菌から高等生物に至る, 全ての生物細胞に存在する<sup>(1)</sup>。RNase H は, RNase H1 と RNase H2 の 2 種類に大別され, 一部の古細菌を除くほとんどの生物細胞内に両方の種類が存在する。RNase H1 は RNA 鎖と DNA 鎖がハイブリッドした RNA/DNA 鎖の RNA 鎖を分解するが, DNA 2 本鎖内に 1 塩基のみ取り込まれたリボヌクレオチドを分解できない。これは, RNase H1 が分解のために少なくとも 4 つ以上のリボヌクレオチドを要するからである<sup>(2)</sup>。一方 RNase H2 は, リボヌクレオチドを 1 個だけ取り込まれた 2 本鎖 DNA を基質とすることができ, そのリボヌクレオチドの 5' 末端を切断する。

近年, 細胞内で DNA に RNA の構成成分であるリボヌクレオチドが最大で 1,000 塩基に 1 塩基誤って取り込まれ

ていること, そして細胞内の酵素である RNase H2 がこれを除去していることが明らかになった<sup>(3)</sup>。ヒトでは, 変異により RNase H2 の活性が低下すると, リボヌクレオチドが DNA に残りゲノムが不安定になる。さらに, これが原因である深刻な自己免疫性の疾患エカルディグティエール症候群 (Aicardi-Goutières Syndrome) が明らかになり, 注目を集めている<sup>(4, 5)</sup>。RNase H2 のゲノム修復効果を詳細に解析するためには, まず, RNase H2 の酵素化学的諸性質についての知見が重要である。本研究では, ヒト RNase H2 を大腸菌で発現させ, その活性および安定性に対する塩の影響を解析した。

### 2. 研究方法

#### 2.1 ヒト RNase H2 の調製

pET15b の *NdeI/XhoI* サイトに, (His)<sub>6</sub> がそれぞれ C 末端に付加したサブユニット A (分子量 33,400), B (34,800),

C(17,800)の遺伝子をタンデムにつないだ DNA を挿入し、pET-hH2ABC を構築し、大腸菌 MIC1066 に導入した。形質転換菌を 37°C で培養し、IPTG で誘導後さらに 30°C で 3 時間培養した。菌体を超音波で破碎し、Toyopearl DEAE-650M (東ソー) による陰イオンカラムクロマトグラフィーおよび HisTrap™ HP 1 ml (GE Healthcare) によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製酵素を得た。

## 2. 2 活性測定

3'-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA (5'-gaucugagccugggagcu-3') と 5'-Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA (5'-AGCTCCCAGGCTCAGATC -3') から成る二本鎖 (RpR/DNA) を基質とした。反応液の組成は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.8 nM RpR/DNA, 30 pM RNase H2, 反応温度は 25°C である。反応は蛍光プレートリーダー EnSight (PerkinElmer) 中で、25°C で行い、20 秒間隔で 10 分間蛍光 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm) を連続測定した。

## 2. 3 安定性の評価

熱処理条件は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.3 nM RNase H, 30°C, 35°C または 40°C である。熱処理後、経時的に熱処理液を採取し、上記方法で活性を測定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 ヒト RNase H2 の調製

培養液 1.5 L から 1.2 mg の精製酵素を得た。精製酵素の SDS-PAGE のパターンを Fig. 1 に示す。サブユニット A, B, C の均一なバンドが確認された。

### 3. 2 活性に対する塩の影響

ヒト RNase H2 の活性に対する NaCl, NaBr, KCl 濃度の影響を調べた (Fig. 2)。NaCl と KCl の場合、活性は 0-60 mM では塩濃度の増加に伴い増加したが、60-200 mM で

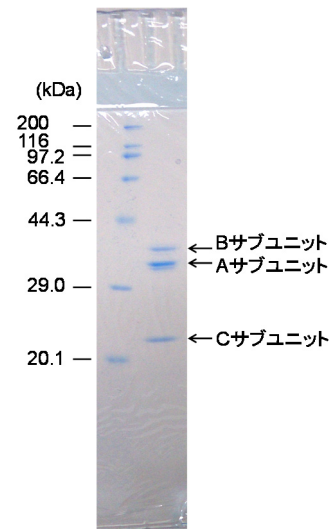


Fig. 1. ヒト RNase H2 精製酵素の 12.5%SDS-PAGE

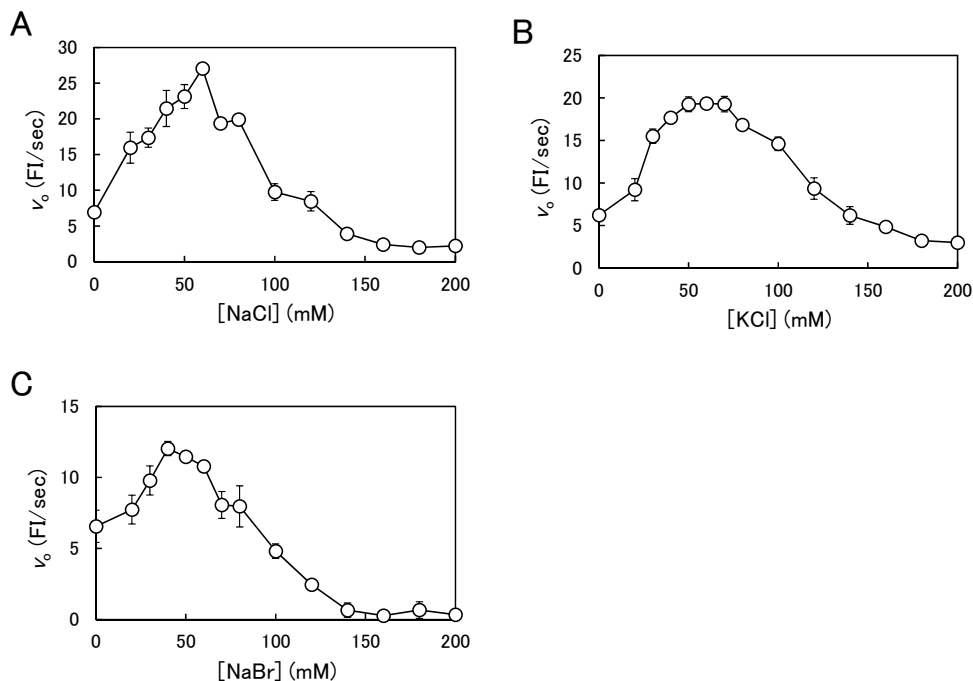


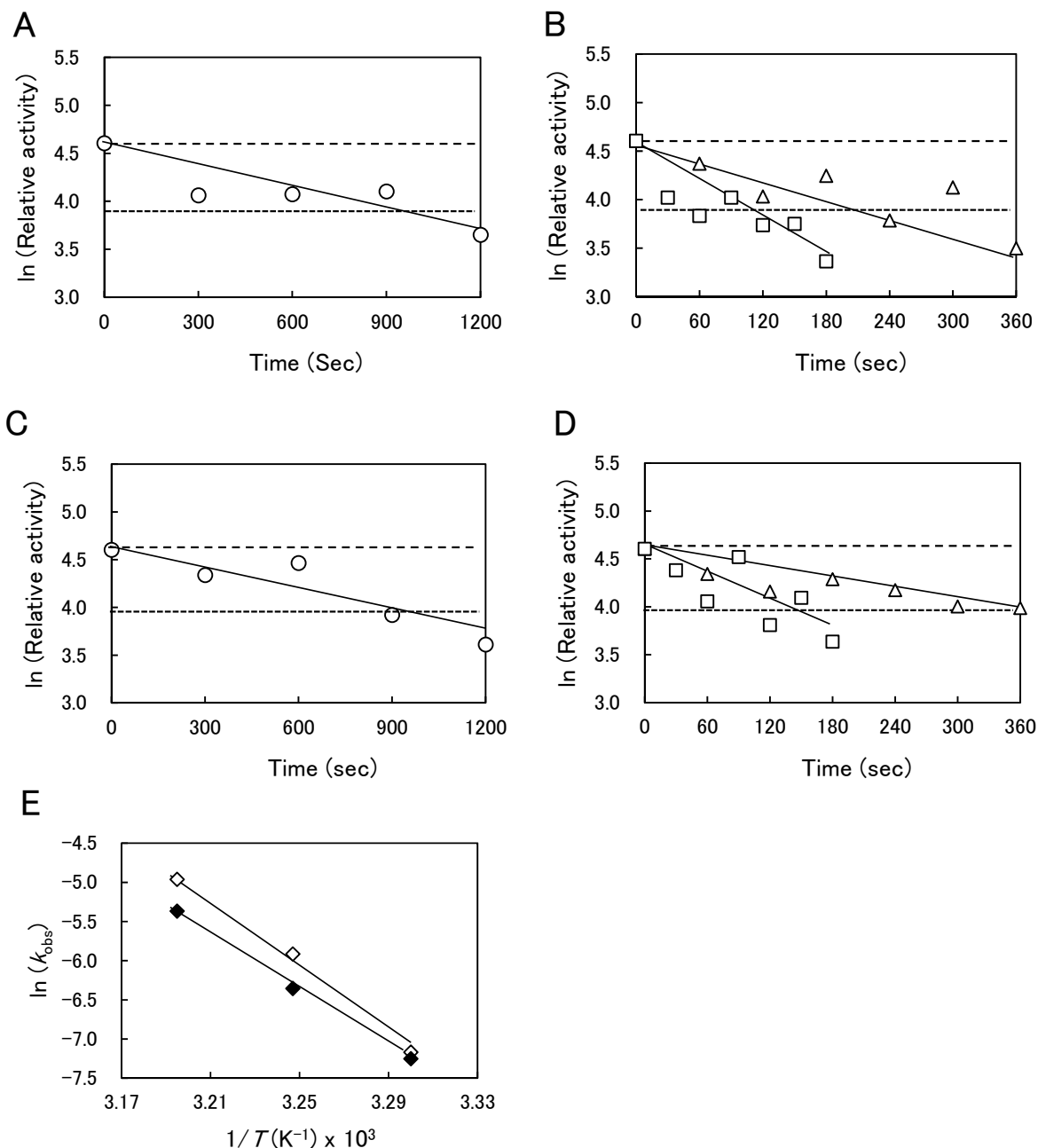
Fig. 2. ヒト RNase H2 の活性に対する塩の影響。ヒト RNase H2 を各種濃度の NaCl (A), KCl (B) あるいは NaBr (C) 存在下、25°C で RNase H 活性を測定した。

は減少した。NaBr の場合、活性は 0–40 mM では塩濃度の増加に伴い増加したが、40–200 mM では減少した。60 mM NaCl, 60 mM KCl あるいは 40 mM NaBr 存在下での活性は塩非存在下での活性のそれぞれ 390%, 310%, 180%であった。また、200 mM NaCl, 200 mM KCl あるいは

は 200 mM NaBr 存在下での活性は塩非存在下での活性のそれぞれ 32%, 48%, 5.1%であった。

### 3. 3 安定性に対する塩の影響

ヒト RNase H2 の安定性に対する NaCl 濃度の影響を調べた (Fig. 3)。ヒト RNase H2 を 30°C, 35°C あるいは 40°C で



**Fig. 3.** ヒト RNase H2 の安定性に対する塩の影響(A–E)ヒト RNase H2 の熱失活曲線。ヒト RNase H2 を塩非存在下(A, B), 10 mM NaCl 存在下(C, D)で 30°C(○), 35°C(△), 40°C(□)で一定時間熱処理した後、25°Cで活性を測定した。相対活性は、熱処理前の活性を 100%としたときの熱処理後の活性を表す。破線と点線は相対活性が 100%と 50%をそれぞれ示す。(E)アレニウスプロット。塩非存在下(◇)および 10 mM NaCl 存在下(◆)でのヒト RNase H2 の一次の熱失活速度定数( $k_{\text{obs}}$ )の対数値を絶対温度( $T$ )の逆数に対してプロットした。

処理すると一次の熱失活を示した。塩非存在下で 30°C, 35°Cあるいは 40°Cで熱処理を行ったときの一次の熱失活速度定数( $k_{\text{obs}}$ )はそれぞれ,  $7.7 \times 10^{-4}$ ,  $2.7 \times 10^{-3}$ ,  $7.0 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ であった。一方, 10 mM 存在下で 30°C, 35°Cあるいは 40°Cで熱処理を行ったときの  $k_{\text{obs}}$  はそれぞれ,  $7.1 \times 10^{-4}$ ,  $1.7 \times 10^{-3}$ ,  $4.7 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$  であった。すなわち, 30°C, 35°Cあるいは 40°Cで熱処理を行ったときの  $k_{\text{obs}}$  は, 塩非存在下で熱処理を行ったときのそれぞれ 92%, 63%, 67%であり, 10 mM NaCl により 35°C, 40°Cでの熱失活が抑制されたことが示された。アレニウスプロットの結果, 熱失活の活性化エネルギーは, 塩非存在下では 174 kJ mol<sup>-1</sup>, 10 mM NaCl 存在下では 148 kJ mol<sup>-1</sup>であった。

#### 4. 考察

今回, NaCl, KCl および NaBr がヒト RNase H の活性を向上させ, 60 mM NaCl あるいは 60 mM KCl 存在下での活性は塩非存在下での活性のそれぞれ 390%, 310%であった。また, NaCl がヒト RNase H の安定性を向上させた (KCl および NaBr の安定性への効果は未検討)。一般的な哺乳類細胞の細胞内の Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>濃度はそれぞれ, 約 10 mM, 10 mM, 140 mM であることが知られている。これらのことから, 細胞内では NaCl および KCl はヒト RNase H の活性および安定性を向上させていると考えられる。

レトロウイルスの逆転写酵素は DNA 合成活性と RNase H 活性を有し, 両活性の活性部位は異なる。我々は cDNA 合成酵素として実用化されているモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV RT) とトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV RT) の熱安定性を調べたところ, 10 分間の熱処理で活性が 50%に低下する温度 ( $T_{50}$ ) はそれぞれ 44°C, 47°Cであった<sup>6)</sup>。今回, ヒト RNase H2 の  $T_{50}$  は, アレニウスプロット (Fig. 3E) より, 塩非存在下では 32°C, 10 mM NaCl では 33°Cであった。このように, RNase H2 の安定性は低く, 生理的条件下でも急速に失活することが示された。

#### 5. 今後の課題

ヒト RNase H2 は RNA 鎖と DNA 鎖がハイブリッドした RNA/DNA 鎖の RNA を分解するだけでなく, DNA2 本鎖内に 1 塩基のみ取り込まれたリボヌクレオチドも分解する。本研究では, 前者の活性を指標として活性と安定性に対

する塩の影響を検討した。今後, 後者の活性を指標として活性と安定性に対する塩の影響を検討することが必要である。

#### 謝辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団の支援を受けて行われました。ここに深く感謝の意を表します。

#### 文献

1. Chon, H., Vassilev, A., DePamphilis, M. L., Zhao, Y., Zhang, J., Burgers, P. M., Crouch, R. J., and Cerritelli, S. M. Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res.* **37**, 96–100 (2009).
2. Rychlik, M. P., Chon, H., Cerritelli, S. M., Klimek, P., Crouch, R. J., and Nowotny, M. Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Mol. Cell.* **40**, 658–670 (2010).
3. Reijns, M. A. M., Rabe, B., Rigby, R. E., Mill, P., Astell, K. R., Lettice, L. A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., Devenney, P. S., Sexton, D., Grimes, G., Holt, I. J., Hill, R. E., Taylor, M. S., Lawson, K. A., Dorin, J. R., and Jackson, A. P. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* **149**, 1008–1022 (2012).
4. Coffin, S. R., Hollis, T., and Perrino, F. W. Functional consequences of the RNase H2A subunit mutations that cause Aicardi-Goutières Syndrome. *J. Biol. Chem.* **286**, 16984–16991 (2011).
5. Figiel, M., Chon, H., Cerritelli, S. M., Cybulska, M., Crouch, R. J., and Nowotny, M. The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutières syndrome defects. *J. Biol. Chem.* **286**, 10540–10550 (2011).
6. Yasukawa, K., Nemoto, D., and Inouye, K.

Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and

Moloney murine leukemia virus. *J. Biochem.* **143**, 261–268 (2008).

## Effects of Salts on the Genome Repairing Activity of RNase H2

Kiyoshi Yasukawa, Kenji Kojima

Kyoto University

### Summary

Ribonuclease H (RNase H) is an enzyme that specifically degrades RNA of RNA/DNA hybrids. RNase H is present ubiquitously in sources ranging from bacteria to human. It has recently been shown that, under physiological conditions, DNA polymerases incorporate a ribonucleotide every few thousand base pairs, and that mutations in human RNase H2 genes lead to a severe neuroinflammatory disorder, Aicardi-Goutières syndrome.

In this study, we examined the effects of salts on the activity and stability of human RNase H2. Human RNase H2 was expressed in *Escherichia coli* and purified from the cells. The activity increased with increasing NaCl or KCl concentrations at 0–60 mM and decreased with increasing them at 60–200 mM. The activities at 60 mM NaCl or 60 mM KCl were 390 and 310%, respectively, of that salts. In the thermal incubation at 30, 35, or 40°C, the first-order rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , were 92, 63, and 67%, respectively, of that without salts. These results suggest that under physiological conditions, NaCl and KCl increase activity and stability of human RNase H2.