

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

2022年 3月 6日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 大学院農学研究科

職 名 教授

氏 名 保川 清

助 成 の 種 類	令和3年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	RNaseH2の変異によるゲノム中のリボヌクレオチド蓄積と自然免疫応答亢進の機構			
上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) <input type="checkbox"/> 本農芸化学会関口部第519回講演会 1件 日本農芸化学会2022年度大会 1件			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		その他(ゲノム編集の外注)	407,000	
		その他(配列解析の外注)	34,188	
		その他(英文校閲の外注)	3,113	
消耗品	555,699			
当財団の助成に つ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 本助成のお陰で科研費基盤Bの採択につながりました。謹んでお礼申し上げます。			

2022年3月6日

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻

教授 保川清

【目的】

リボヌクレアーゼ H2 (RNase H2) は、RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖を加水分解する酵素である。真核生物の RNase H2 は A、B、C の 3 つのサブユニットから成るヘテロ 3 量体で、活性部位は A に存在する。近年、リボヌクレオチド (R) がヒトゲノム DNA に数千塩基対に 1 塩基の割合で取り込まれていることや、RNase H2 が R の除去に関与していることが明らかになった。RNase H2 の遺伝性変異は神経疾患エカルディーグティエール症候群 (AGS) を引き起こす。我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス線維芽細胞株 NIH3T3(1)およびヒト胎児腎細胞 HEK2932(2)の RNase H2 A サブユニット (RH2A) 欠損株 (KO 株) を作製し、これらは野生株よりもゲノム DNA に R が多く蓄積していることを報告した。本研究では、RNase H2 の細胞内での作用を詳細に解析する一環として、KO 株に野生型 RH2A 遺伝子を一過性に発現させ、ゲノム DNA 中の R 量の経時変化を調べた。さらに、NIH3T3 KO 株にヒトで AGS を引き起こす変異に相当する変異 (G37S, N213I, R293H) を有するマウス RH2A 遺伝子を一過性に発現させ、ゲノム DNA 中の R 量を調べた。

【方法】

1. RH2A 遺伝子の一過性発現: マウスまたはヒト野生型 RH2A 発現プラスミドを NIH3T3 KO 株または HEK293 KO 株に導入し、1-10 日目の細胞抽出液およびゲノム DNA を回収した。また、G37S, N213I, R293H 発現プラスミドを NIH3T3 KO 株に導入し、2 日目の細胞抽出液およびゲノム DNA を回収した。2. タンパク質発現: 細胞抽出液に対し、RNase H2 A サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。3. 活性測定: 1 塩基の R を含む 12 bp の二本鎖 DNA を基質として、細胞抽出液の RNase H2 活性を測定した。4. R 量測定: ゲノム DNA をアルカリ処理し、アルカリアガロースゲル電気泳動 (AGE) に供した。

【結果】

KO 株に野生型 RH2A 発現させると 1-10 日目で RNase H2 タンパク質が発現しており、RNase H2 活性は NIH3T3 では 1-3 日目が、HEK293 では 2-5 日目が最も高かった。また、アルカリ AGE では、もとの KO 株と比較してバンドが高分子側にシフトしており、ゲノム DNA 中の R が除去されていることが示唆された。KO 株に G37S を発現させると、活性の増加や R 量の減少は見られなかった。一方、N213I あるいは R293H を発現させると、活性や R 量は野生株と同レベルになった。現在、HEK293 においても同様の解析を進めている。

以上