

論文の内容の要旨

論文題目 **Structure and Function of Open Reading Frame 2 (ORF2) of
Telomere-Specific Retrotransposon**

(テロメア特異的レトロトランスポゾンの ORF2 の構造と機能)

氏 名 久保 葉子

多くの真核生物のテロメア（染色体末端）は、テロメア反復配列と呼ばれる繰返し配列から成る。線状 DNA は、複製の度に末端が短縮してしまうが、テロメラーゼと呼ばれる酵素が、染色体の末端にテロメア反復配列を付加することで、テロメア長は維持される。しかしショウジョウバエではテロメア反復配列が存在せず、染色体が短くなると特定の non-LTR 型レトロトランスポゾン（別名 LINE）が染色体の末端に転移して、テロメアを伸長するといわれる。レトロトランスポゾン（以下レトロポゾンと略）は転移因子の一つで、いったん RNA に転写されたのち、核内での逆転写を経てホストゲノム中に挿入される。ショウジョウバエでは、ある種のレトロポゾンがテロメラーゼの代わりをしているといえる。

一方これまでの研究から、カイコはショウジョウバエと異なり、テロメア反復配列 (TTAGG)_n は存在するものの、その間に数千コピーもの non-LTR 型レトロポゾンが挿入されていることを明らかにした。これらのレトロポゾンは、(TTAGG)_n に挿入されている場所と方向性から、TRAS と SART の 2 種類のファミリーに分類されたが、これまで完全な転移ユニット構造が判明していたのは、TRAS1 と SART1 の 2 配列のみであった。non-LTR 型レトロポゾンは、殆どの真核細胞に存在する、最も主要な転移因子であるにも関わらず、その転移機構は殆ど判っていない。なぜ TRAS や SART がテロメアを標的に転移できるのかを解明することで、カイコのテロメア維持機構に迫ることができるのではないかと考えた。同時にその成果は、未解明な LINE の転移機構に新たな知見を与えることも期待された。

そこで、TRAS ファミリーをカイコゲノム及び他種の昆虫から枚挙し、それらの構造比較解析を行い、転移に重要な役割を果たしている ORF2 (open reading frame 2) 前半部の機能ドメインの予測を行った (第一部)。更に、*In vivo* 転移系を利用して、転移に必須な ORF2 の機能ドメインを (特に逆転写酵素領域近辺に着目して) 限定化するとともに、逆転写酵素の *in vitro* アッセイ系の構築を試みた (第二部)。

(第一部)

網羅的検索の初段階として、カイコゲノムから TRAS1 以外の 5 つの TRAS ファミリーの 5' 端、3' 端配列を決定した。また TRAS1 以外に、新たに TRAS3 の完全長配列を決定した。TRAS ファミリーは全て (TTAGG)_n 配列の TT と GG の間に挿入されていた。また、同じ TRAS ファミリー同士の 5' 端及び 3' 端構造は保存性が高いが、異なる TRAS ファミリー間ではそれほど保存性は高くなかった。Non-LTR 型レトロポゾンでは、逆転写の鋳型となる自身の RNA の 3' 端配列を認識し、逆転写が進むと考えられている。異なる TRAS ファミリー同士の 3' 端構造が似ていないという事実から、TRAS の酵素タンパク質は、自身の RNA を認識し転移させるが、他の TRAS ファミリーの転移には有効に作用しない可能性が考えられる。また、non-LTR 型レトロポゾンでは、5' 端が欠損したレトロポゾンが多数見つかっているが、TRAS ファミリーでは完全長の配列が (TTAGG)_n 内に挿入されていた。テロメアでは遺伝子変換や組換えが頻繁に起こっているため、完全長の TRAS が維持されるのかもしれない。

ところで、殆どのレトロポゾンはゲノム中にランダムに挿入されるのに対し、転移先の標的配列が定まっているものも知られている。TRAS も後者に属し、テロメア反復配列 (TTAGG)_n だけに転移する。TRAS には ORF が 2 つ存在し、ORF2 には EN (エンドヌクレアーゼ) ドメイン、RT (逆転写酵素) ドメインなどが存在する。一般にエンドヌクレアーゼは標的配列を認識し、そこを切断する活性 (切断箇所が転移箇所となる) を持つので、TRAS の標的配列特異性には EN ドメインが関与すると予想された。

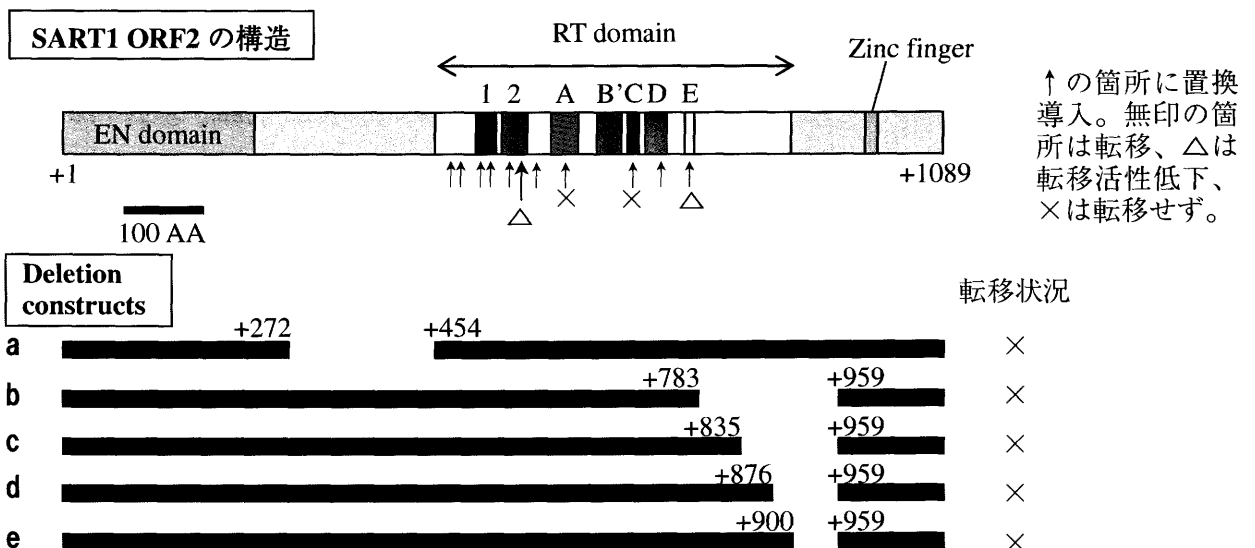
そこで TRAS の標的配列特異性を決定する構造を探索する目的で、EN ドメインから RT ドメインまでの領域を PCR で増幅し、カイコを含む鱗翅目昆虫 3 種から、新たに 7 つの TRAS 類似配列を決定した。系統樹を作成したところ、今回同定した TRAS 類似配列は全てカイコの TRAS1 と単系統群を形成し、TRAS ファミリーの配列であることが明らかとなった。

これら 7 種の TRAS 配列と他のレトロポゾンを比較し、TRAS ファミリーだけに特徴的な配列を探索した結果、保存性の高い領域が 4 箇所見つけた。そのうち EN ドメインと RT ドメインの間に見つけた 1 箇所は Myb-DNA 結合モチーフに類似していた。EN ドメインと RT ドメインは約 0.6kb 離れているが、この領域に機能ドメインが見つかったのは、今回が初めての報告である。Myb モチーフは酵母やヒトのテロメア結合タンパク質にも存在し、このドメインがテロメア反復配列に特異的に結合することが報告されている。TRAS がテロメア反復配列に挿入される機構にも、今回同定した Myb ドメインが関与している可能性が考えられる。

(第二部)

Non-LTR 型レトロポゾンの転移機構の解析が進んでいない理由の一つに、転移アッセイ系がこれまでヒトの L1 因子以外に構築されていなかったことがある。当研究室ではこの欠点を解消するため、テロメア特異的レトロポゾンの転移を *in vivo* で解析する系を確立した (高橋, 藤原 2002)。この系ではカイコと同じ鱗翅目昆虫であるヨトウガの培養細胞 (Sf9) と、バキュロウイルスを利用する。まず強力なポリヘドリンプロモーターの直下に TRAS や SART を組み込んだ組換えバキュロウイルスを作成する。このウイルスを Sf9 に感染させると、細胞内で TRAS や SART の RNA とタンパク質が合成され、Sf9 のテロメア反復配列への転移が起こる。転移した TRAS や SART はカイコ由来の配列であり、ヨトウガの配列とは区別できるので、これを利用して TRAS や SART の内部の配列とテロメア反復配列に相補的なプライマーで PCR を行う。転移が起こっていれば、目的のサイズのバンドが検出されるという手法である。

そこで、第一部で示した EN ドメインから RT ドメインの間の領域や RT ドメインとその近傍領域が転移に必須であるか、上記の *in vivo* 転移系を利用して調べた。まず TRAS1 の ORF2 内のドメインに一アミノ酸置換を入れ、実験を行った。TRAS1 の EN、RT、RNase H ドメインの重要なアミノ酸に変異を入れたときは全く転移がおこらなくなった。しかし TRAS1 は転移頻度が低く、転移の判定が困難であった。一方 SART1 では、発現すれば確実に (TTAGG)_n への転移が確認できたので、SART1 について解析を進めることにした。TRAS と SART の全体的な構造 (二つの ORF 構造、長さ、ドメインやその配置など) はよく似ている。ただし、TRAS ファミリーでは Myb ドメイン類似配列が見つかったが、SART1 では Myb ドメインの明確な同定はできなかった。RT ドメインの上流配列を欠損した SART1 (下図 a) や、RT の C 末側を欠損した SART1 (b-e) を作成し、転移実験を行った。また、RT ドメイン内で保存性の高いアミノ酸 11 箇所 (下図の ↑ 部分) を、それぞれ一アミノ酸置換した SART1 の転移状況についても調べた。



一アミノ酸置換の実験では、D609A (ORF2 の 609 番目のアミノ酸 D を A に置換)、D699V の SART1 は、転移できなくなった。これらの D (アスパラギン酸) は活性中心を構成しており、予想と矛盾しない結果となった。また K548A、G775A では転移頻度が低下したことから、逆転写酵素活性に何らかの役割を果たしていると考えられた。しかし興味深いことに、他の 7 つのアミノ酸置換変異体では、変異の入っていない intact SART1 と同程度の転移を示した。この結果から、保存性の高いアミノ酸のうち、機能に関与するアミノ酸は限られていることがわかった。

一方、領域欠失実験において、RT の上流あるいは C 末領域を欠損した SART1 の全て (**a-e**) は転移できなくなった。これらの変異 SART1 を 2 種類同時に発現させる「トランス相補実験」を行ったところ、図中の **b** と D699V、**a** と **b** の組み合わせでは転移が検出できたが、**a** と D699V の組み合わせでは転移が検出されなかった。テロメラーゼでは、逆転写酵素タンパク質はオリゴマー化するために、RT ドメインの N 末側領域と C 末側領域で結合しているという報告がある。今回の実験から、non-LTR レトロポゾンの逆転写酵素タンパク質においても、RT ドメインの N 末側領域と C 末側領域間で何らかの相互作用をしていることが示された。

更に、*in vivo* 転移系の結果を検証するため、SART1 の逆転写酵素活性を測定する系の構築を試みた。まず、変異 SART1 を発現させた Sf9 から細胞粗抽出物を回収し、ここに合成した鋳型 RNA と DNA プライマー、dNTP を加え、人為的に逆転写反応を起こさせた。その後、合成された cDNA を PCR で増幅して検出するという方法を考案した。逆転写酵素活性を測定したところ、intact SART1 では濃い PCR バンドが検出され、転移できない変異体である D699V では、ネガティブコントロール (ORF1、酵素タンパク質をコードしない) 程度の薄さのバンドしか出現しなかった。この結果は、D699V では逆転写酵素活性が確かに消失したことを示す。この *in vitro* アッセイ系の構築により、*in vivo* 転移系と組み合わせることで、逆転写酵素ドメインの詳細な機能解析が可能となった。