

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 槌田 謙
指導教官名 大坪 栄一

論文題目 挿入因子 IS3 の転移経路の解明

挿入配列 IS(insertion sequence) とは、DNA 上のある部位から異なる部位へ転移することが可能な固有の DNA 塩基配列である。IS はその転移する能力により逆位、欠失、レプリコン融合などの様々な DNA 組換え反応を引き起こすことから、ゲノムの大規模な再編成の原動力の一つと考えられている。細菌には多種類の IS が存在するが、その一般的特徴は、両末端に数十塩基対の逆向き反復配列 (inverted repeat: IR) を持ち、内部に自らの転移に必須の蛋白質トランスポゼースをコードしていることである。IS の転移は IS の複製を伴わない場合と複製を伴う場合に分けられる。複製を伴わない転移の結果、IS が標的部位に単純挿入された産物が生じる。複製を伴う転移の結果、IS が存在するレプリコンと標的レプリコンとの融合体が形成される。このとき IS は倍加し、両レプリコンの境界に位置する。

IS はその塩基配列やトランスポゼースのアミノ酸配列によりいくつかのファミリーに分類される。IS3 ファミリーの代表格である IS3 の両端には、39 塩基対の IR が存在し、内部には互いに out-of-frame の二つの ORF (*orfA*, *orfB*) を有する。この二つの ORF が重なる領域の A₄G 配列中で翻訳レベルの -1 方向のフレームシフトが起こり、トランスポゼース (Tnp) が産生される。OrfA は IR に結合し、転移を抑制する働きがある。Tnp の作用により IS3 の片側の IR の 3'末端に切れ目を入れ、反対側の IR の 5'末端から 3 塩基離れた部位に繋ぎ換え、一本鎖のみ環状化した 8 の字形分子が生じる。IS3 はこの分子から IS3 がその両端で 3 塩基対を挟み込み繋がった形 (サークルジャンクション) で環状化した環状 IS3 分子として切り出され、標的部位に単純挿入する形、いわゆる複製を伴わない転移で進行すると考えられてきた。

トランスポゾンの単純挿入体あるいは融合体をつくる反応初期において、トランスポゼースがトランスポゾンの両端の IR に結合し、トランスポゼースのタンパク質間相互作用により両 IR を近接させた複合体 (トランスポソゾーム) を形成し、そこでストランドトランスファー反応が進むと考えられている。IS3 の IR には機能的に異なる二つのドメイン (末端近くの A ドメインと内側の B ドメイン) が存在するが、一方の IR 内

の A ドメインと他方の IR 内の B ドメインが A ドメインに接する IR の端から他端から 3 塩基対離れた部位との組換えを起こし、8 の字形分子が生じることが示唆されている。この反応は 2 分子のトランスポゼースそれぞれが一方の IR の A ドメインともう一方の IR の B ドメインを認識し、安定した複合体内で起こるというモデルが考えられている。しかしながら、IS3 の実際の Tnp-IR 複合体の構造は明らかにされていない。

本研究は、まず IS3 が単純挿入体のみならず IS3 を運ぶプラスミドと標的プラスミドとの融合体を形成する能力を持つことを示す。次に、単純挿入体、融合体に関わる Tnp-IR 複合体の構造を解析し、IS3 の転移初期過程の一部を明らかにした。得られた成果は次のように要約することができる。

1. IS3 による融合体形成反応の解析

(1) IS3 トランスポゼースの融合体形成能

野生型 IS3 の翻訳フレームシフトが起こる A₄G 配列に 1 塩基 G を挿入し、フレームシフトを介さなくてもトランスポゼース (Tnp) を過剰産生できるようにした IS3 変異体、IS3-1、を運ぶプラスミドと標的プラスミドを大腸菌保持させた。その結果、IS3-1 を運ぶプラスミドと標的プラスミドとが融合したような構造の転移産物が生じることが分かった。この融合体形成は Tnp に依存しているが、大腸菌が持っている相同組換え機構には依存していなかった。しかし、非相同組換えを抑制するヘリカーゼ遺伝子 *recQ* の欠損変異株内では、その形成頻度は上昇することが分かった。また、この融合体は、Tnp をコードする遺伝子の代わりにクロラムフェニコール耐性遺伝子を両 IR の間に持つ変異体 IS3 (ミニ IS3) を運ぶプラスミドと標的プラスミドを保持する大腸菌でトランスポゼースを誘導産生させた場合でも生じることが分かった。以上の結果は、IS3 が複製を伴わずに単純挿入体を与える転移の他に、複製を伴い融合体を与える能力を持つことを示唆する。

(2) 融合体の構造

得られた融合体の構造を、制限酵素による切断および DNA シークエンシングにより解析した。その結果、IS3-1 を運ぶプラスミドと標的プラスミドとの融合体には 2 種あることが分かった。その一つは二つのプラスミドの境界に IS3-1 を 1 コピーずつ持つ完全な構造の融合体であり、もう一つは 2 つの IS3-1 の一方が欠失しているものであった。欠失を有するタイプの融合体は次の二つの特徴を持つことが分かった。1) 二つのプラスミドの境界領域の一方に存在する完全長の IS3-1 の左側の IR (IRL) 末端が標的プラスミドと繋がっている。2) 他方の境界領域の存在する IS3-1 の一部は欠失しているが、同時に標的プラスミド配列の一部も欠失した形で繋がっている。この欠失を持つ融合体は、完全な構造の融合体上の短い (4~9bp) 相同配列間での非相同組換えにより欠失した構造をしているものと考えられた。一方、ミニ IS3 を運ぶプラスミドと標的プラスミドとの融合体は全て上記のような欠失を有するタイプの融合体であった。

(3) 融合体の欠失に関与する IS3 内部配列の特定

IS3 の IR 内部をほぼ完全に除いた変異体 IS3 を運ぶプラスミドを保持する大腸菌内でトランスポゼースを誘導産生したところ、欠失を持たない完全な融合体のみが高頻度

で生じることが分かった。この結果は、欠失を持つ融合体の生成に IS3 の内部配列が関与していることを示唆する。そこで、IS3 内部の様々な領域を欠失した変異体 IS3 を構築し、その融合体の構造の解析を行った結果、複数の配列が欠失を持つ融合体の生成に関与していることが分かった。

以上の結果から、IS3 は単純挿入体のみならず融合体を形成する能力をも持つことが明らかになった。しかし、IS3 の内部配列は完全な融合体の形成を阻害しているためその形成頻度が低く押さえられている。この内部配列は、融合体形成時のストランドトランスファー反応後、IS3 DNA の複製を停止させ、その結果複製フォークの切断を促すと思われる。もし生じた DNA 末端が、切断されなかった方の IS3 配列と組換えを起こし、IS3 を運ぶプラスミド中の IS3 以外の配列を除外すれば、融合体ではなく単純挿入体が形成されるという機構が考えられる。複製される IS3 の一方に欠失を持つ不完全な融合体は、切断により生じた DNA 末端が標的プラスミド上の他の短い相同領域の部位での組み換えによりたまたま生じたもので、IS3 を運ぶプラスミド及び標的プラスミド上の双方のマーカーを強制的に選択した結果得られたものと考えられる。

2. Tnp 及び OrfA タンパク質による IR との複合体の解析

(1) Tnp 及び OrfA の IR への特異的結合

Tnp、OrfA タンパク質による IS3 末端逆向き反復配列 IR への特異的結合を調べるために、それぞれをマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質の形で産生させ、精製した。この精製標品を用いて IR を含む DNA 断片に結合するかどうかゲルシフト法で解析したところ、標識した IR を含む断片は Tnp に依存してシフトすることが分かった。この結果は Tnp-DNA 複合体を形成していることを示す。この複合体の形成は標識していない IR を含む DNA 断片によって阻害されるが、IR を含まない DNA 断片によっては阻害されないことが分かった。このことは Tnp が IR 配列特異的に結合することを示す。低濃度の Tnp では比較的移動度の早い Tnp-DNA 複合体 (複合体 I) が形成されるが、Tnp 量を増加させるとそれよりも移動度の遅い複合体 (複合体 II) が形成されることが分かった。

OrfA においても OrfA に依存して OrfA-IR-DNA 複合体が形成されることが分かった。しかし、この OrfA-DNA 複合体の形成には Tnp-DNA 複合体形成と比べ高濃度の OrfA が必要であった。

(2) Tnp 及び OrfA タンパク質の変異 IR との結合

IS3 の IR にはストランドトランスファー反応に必須の機能的に異なる二つのドメイン (端に位置する A と内側の B) が存在する。IR の各ドメインの様々な部位に変異を導入した DNA 断片を用いてゲルシフト法で調べた結果、末端から 15-23 番目の B ドメイン内の塩基対が Tnp-DNA 複合体 I, II のどちらの形成にも重要であることが分かった。また、末端から 7-10 番目の部位、B ドメインの外側の 32-39 番目の部位は複合体 I の形成には影響を与えないが、複合体 II を形成するのに重要であることが分かった。末端から 7-10 番目の部位は A、B ドメインの境界に位置し、その変異によって組換え活性を著しく低下させることが明らかになっている。このことからこの部位の変異によ

る組換え活性の低下は複合体 II の形成が阻害されたことが原因であると考えられる。

OrfA については、末端 1、2 番目の部位、3-6 番目の部位に変異を導入した IR を含む DNA 断片では OrfA-DNA 複合体は形成されないことが分かった。このことは OrfA は A ドメイン内の IR 末端 1-6 番目の部位を認識して結合していることを示唆する。OrfA の IR 結合認識配列が Tnp とは異なることから OrfA による転移阻害活性は、OrfA が Tnp の IR への結合を競合的に阻害するのではなく、IR 末端に結合し、組換え反応を阻害することに因るということが示唆される。

(3) Tnp 及び OrfA タンパク質により認識される IR 配列の特定

Tnp により認識される IR 内の配列を知るために Tnp-IR 複合体を DNaseI フットプリント法により解析した。その結果、Tnp は IR 内の全域に結合していること、特に末端から 4-17、21-34 塩基対に強く結合することが明らかになった。また、Tnp は IR 末端 3'側では IR に隣接する 3 塩基にも結合しているが、IR 末端 5'側では末端よりも 2 塩基内側まで結合することが明らかになった。IR 末端 3'側は実際にストランドトランスファー反応が起こる鎖上にあることから、IR 末端 3'側では隣接する配列まで Tnp が結合する必要があると考えることができる。

IRL の A ドメイン、IRR の B ドメインに変異を導入したサークルジャンクション DNA 断片を構築し、Tnp との結合をゲルシフト法で調べたところ、この基質では複合体 I を形成するが複合体 II は形成しないことが分かった。Tnp によるこの断片への結合をフットプリント法で調べたところ、IRL の B ドメイン、IRR の A ドメイン両方に Tnp が結合していることが明らかになった。このことは、1 分子の Tnp が一方の IR の A ドメインともう一方の IR の B ドメインに結合しているというモデルを支持する。

これまで IS3 の実際の Tnp-IR 複合体の形成過程は明らかにされてはいなかったが、以上の *in vitro* の解析から、Tnp はまず片方の IR の B ドメインに結合した後、おそらく Tnp タンパク質の相互作用を介してもう片方の IR の A ドメインにも結合し、その結果高次の Tnp-IR 複合体（トランスポソーム）を形成することが明らかになった。また、OrfA は IR 末端に結合し、Tnp による組換えを阻害することが示唆された。