

## 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 峰松 寛  
指導教官名 大坪 栄一

### 論文題目 挿入因子 IS3 の転移中間体形成の分子機構

転移性遺伝因子は DNA 上のある部位から別の新たな部位へと転移する能力を持ち、全ての生物のゲノム上に存在する。転移性遺伝因子は挿入変異だけでなく、欠失や逆位、融合等の非相同領域間での組換えを引き起こす。このような能力により転移性遺伝因子は、生物のゲノムの再編成を促す中心的な役割を果たし、生物の進化の原動力となってきたと考えられる。

挿入配列 (Insertion Sequence, IS) は様々な原核生物のゲノムに存在する小型の転移性遺伝因子である。IS はいくつかのファミリーに分類されるが、IS3 は最大規模のファミリーの 1 つの代表である。IS3 は全長 1258 bp で両端に 39 bp の不完全な逆向き配列 (Inverted Repeat; IR) を持つ。IR は組換えに必須の *cis* エlement であり、IS3 の内部にコードされる転移を司る酵素、トランスポゼース、の結合部位と考えられている。IS3 はトランスポゼースの作用により IS3 の両端が 3 bp の介在配列を挟み込んだ形の環状 IS3 分子を生じ、それが直鎖状 IS3 分子に変換された後、標的 DNA に挿入することが示されている。環状 IS3 分子は、IS3 を運ぶレプリコンから直接切り出されるのではなく、IS3 を運ぶレプリコンにおいて IS3 の片側の IR の 3' 末端に切れ目が入り反対側の IR の 5' 末端から 3 塩基離れた部位に繋ぎ換わり一本鎖のみ環状化した「8 の字形分子」を中間体として形成されると考えられている (図 1)。8 の字形分子は左右どちらの 3' 末端からの組換えでも生じるため、2 種類存在すると考えられる。環状 IS3 分子は、8 の字形分子を前駆体として宿主因子の複製、または修復系により形成されると考えられる (図 1)。

一般にトランスポゼースが行う反応は、トランスポゼースが転移性遺伝因子の両方の IR に結合した後にタンパク質同士の相互作用により両 IR が近接したようなタンパク質-DNA 複合体 (トランスポソゾーム) が形成され、その中で進行すると考えられている。トランスポゾン Tn5 (IS50) は、IS3 とは異なりそれが存在する部位から 2 本鎖切断により直接切り出された後、単純挿入体を生じるが、この Tn5 (IS50) のトランスポソゾームの結晶構造が明らかにされた。この構造において、1 つのトランスポゼースが両方の IR に結合した形で存在すると報告されている。しかし、IS3 を含む他の IS によるトランスポソゾームの構造と機能についての詳細は不明である。

本研究は *in vitro* において IS3 の転移中間体形成の分子機構をトランスポソゾームの形成に焦点を当て解明することを目的として行ったものであり、次のように要約される。

## 1. トランスポゼースの精製

トランスポゼースをマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として大腸菌内で誘導産生できる系を構築した。この MBP 融合トランスポゼースは大腸菌内で発現させると IS3 による組換えを促すことが分かった。そこで、MBP 融合トランスポゼースを大腸菌破碎液の可溶性画分から MBP 部分の親和性によってアフィニティー精製した。このタンパク質標品は完全長の MBP 融合トランスポゼースを高純度で含んでいることがわかったので、以降、この標品をトランスポゼースとして *in vitro* 解析に用いた。

## 2. 8 の字形分子の *in vitro* での形成

IS3 を運ぶプラスミドに精製したトランスポゼースを作用させた後、反応産物を制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動することによって 8 の字形分子の形成を調べた。その結果、移動度の遅い特異的な分子が生じていることが分かった。そこで 8 の字形分子内のサークルジャンクションに特異的にハイブリダイズするプローブを用いてサザン解析を行ったところ、生じた特異的な分子にハイブリダイズしたことから、この反応産物は 8 の字形分子であると推定された。このことをさらに確認するために、反応産物内のサークルジャンクションを含む配列を増幅するために IS3 内部から外向きに伸長するプライマー対を用い PCR を行ない (図 2)、生じた PCR 産物をシーケンシングして調べたところ、左右両末端のどちらかから組換わって生じたと考えられる配列がそれぞれほぼ半量ずつ生じていることが分かった。このことから一本鎖での組換えにより 8 の字形分子が形成されていることが確認された。

### 3. 8の字形分子の形成とトランスポソーム

8の字形分子の形成におけるトランスポソームの関与を知るために、IR内部の色々な領域に変異を持つIS3を運ぶプラスミドを作成し、それぞれを基質として8の字形分子の形成を調べた。その結果、IR内には組換えに必要な機能的に異なる2つの領域(末端に近い領域Aとその内側の領域B)が存在することが分かった。左のIRの末端からの組換えには左のIRの領域Aと右のIRの領域Bが必要であり、右の末端からの組換えにはそれとは左右対称の領域が必要であることが分かった。この結果から、2分子のIS3のトランスポゼースがそれぞれ一方のIRの領域Aと他のIRの領域Bに結合する形で安定したトランスポソームが形成されると考えられた(図3)。

### 4. 環状IS3分子の *in vitro* での直鎖化

これまでに、環状IS3分子を保持する大腸菌内でトランスポゼースを誘導產生させるとサークルジャンクション部分で2本鎖切断がおき、直鎖状IS3分子が生じることが分かっている。このトランスポゼースによる2本鎖切断反応を *in vitro* で調べる目的で以下の実験を行った。サークルジャンクションをクローニングしたプラスミドに精製トランスポゼースを作用させ、反応産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。その結果、直鎖状分子と一致する移動度のバンドが生じた。2本鎖切断がサークルジャンクション部分で起きているかどうかを調べるために反応産物を制限酵素で1ヶ所切断しアガロースゲル電気泳動したところ、特異的なサイズの2本のDNA断片が生じた。これにより、直鎖状IS3分子は環状IS3分子がトランスポゼースの作用によりサークルジャンクション部位で切断されて生じたものであることが明らかとなった。

以上、本研究においてIS3による *in vitro* での組換え反応系を確立し、IS3の転移過程の2つの反応、即ち環状IS3分子の前駆体である8の字形分子の形成反応、環状分子から直鎖状分子への変換反応を明らかにした。IS3は環状分子を転移中間体として転移する特徴的な転移性遺伝因子であるが、本研究で示したIS3のトランスポソームの構造は一見全く異なる転移機構を持つ転移性遺伝因子Tn5(IS50)とも共通するものだった。本研究で示したトランスポゼースが両IRの架け橋となりトランスポソームを形成し転移を促すという機構は、他の様々な転移過程を持つ広範な転移性遺伝因子にも共通するものと考えられる。

