

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程 進学
氏 名 浦崎 明宏
指導教官名 大坪 栄一

論文題目

シアノバクテリアの転移性遺伝因子 ISY100 の転移機構の解析

転移性遺伝因子とは、DNA 上のある部位から他の部位に動くことのできる遺伝因子である。これまで、多くの生物のゲノムにおいて見つかり、あらゆる生物に普遍的に存在すると思われる。転移性遺伝因子は他の部位に挿入するだけでなく、因子に隣接する領域に欠失や逆位を起こしたり、因子を運ぶレプリコンと標的レプリコンとで融合を引き起こしたりする。このように転移性遺伝因子は非相同的 DNA 組換え反応によるゲノムの再編成を引き起こし、ゲノムの進化に極めて重要な役割を果たしてきたと考えられる。

真性細菌や古細菌には挿入配列 (insertion sequence: IS) と呼ばれる小型の様々な転移性遺伝因子が存在するが、それらはいくつかのファミリーに分けられている。光合成を行う単細胞性の細菌であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 においても、その全ゲノム配列が決定され、そのゲノム中に 9 種類の転移性遺伝因子が見出された。その中で、ISY100 は 22 コピー存在し、最も多コピー存在する IS である。ISY100 は、原核生物のゲノム中に広く存在する IS630 ファミリーに属する因子の特徴、即ち、アミノ酸配列に相同性のあるトランスポゼースをコードし、転移の標的とされる 2 塩基配列 TA が因子の両側に存在するという特徴、を持つ。しかし、ISY100 が実際 IS630 ファミリーに属する因子なのかは実証されていない。また、IS630 ファミリーの因子の転移機構に他のファミリーの因子と比べてどのような特異な点があるか興味を持たれるが、これについて明らかにされていない。

本研究は、シアノバクテリアの IS である ISY100 が実際 IS630 ファミリーに属す

る因子であるかどうかを示すこと、その転移機構を明らかにすることを目的として行ったものであり、その結果は、以下のように要約できる。

1. ISY100 の *in vivo* での転移の解析

(1) ISY100 の大腸菌における転移

ISY100 (947 bp) は両端に 24 bp の不完全な逆向き反復配列(inverted repeat: IR) と 282 アミノ酸のタンパク質(トランスポゼース)をコードするオープンリーディングフレームを持つ。この ISY100 の転移能と転移機構を、遺伝学的に扱いやすい大腸菌を宿主として次のように調べた。まず、ISY100 のトランスポゼース遺伝子とミニ ISY100 (ISY100 のトランスポゼース遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置き換えたもの)を別々の位置にもつプラスミドを構築した。次に、標的プラスミドを保持する大腸菌中にこのプラスミドを導入し、トランスポゼースの発現下でミニ ISY100 が標的プラスミドに転移するかどうか調べた。その結果、ミニ ISY100 は標的プラスミドに高頻度で転移することが示唆された。

実際、生じた転移産物はすべてミニ ISY100 の標的プラスミドへの単純挿入体であり、挿入部位を解析したところ、ミニ ISY100 は特異的に TA 配列を標的として転移し、TA 配列を因子の両側に重複して現れることが分かった。この結果は、ISY100 が IS630 ファミリーに属する因子であることを確認するものである。また、シアノバクテリアの ISY100 が大腸菌の細胞中で転移したことより、ISY100 の転移にはシアノバクテリア細胞中に存在する種特異的な宿主因子は必要でないことが示唆された。

(2) ISY100 の直鎖状分子の生成

ミニ ISY100 を運ぶプラスミドを保持する大腸菌で、トランスポゼースの産生に依存してミニ ISY100 の直鎖状分子が生じることを見出した。この直鎖状分子を単離し、末端構造を解析したところ、3' 端は丁度因子の末端と一致するが、5' 端は因子の末端から 2 塩基分内側であることが分かった。以上の結果より、*in vivo* で ISY100 はトランスポゼースの作用により両端での DNA 2 重鎖切断をうけ、3' 側が 2 塩基突出した構造をもつ直鎖状分子として切り出されることが示唆された。おそらく、この直鎖状分子が転移中間体として標的分子に挿入すると考えられた。

2. ISY100 の *in vitro* での転移機構の解析

(1) 精製タンパク質を用いた転移系の構築

ISY100 の *in vitro* での転移系を構築するために、ISY100 トランスポゼースをヒスチジンタグ融合タンパク質としてアフィニティー精製をした。この精製標品をミニ ISY100 を運ぶ供与体プラスミドと標的プラスミドを含む反応液に加え、ミニ ISY100 が標的プラスミドへ転移するかどうか調べた。その結果、ISY100 が、*in vivo* の場合と同様、TA を標的に転移し、TA を両端に重複することが分かった。このことは、ISY100 の転移が *in vitro* で再現されたことを示す。また、ISY100 は精製したトランスポゼ

ースのみで転移するという結果は、ISY100 の転移にはトランスポゼース以外の宿主因子を必要としないという上記の示唆を支持する。

(2) 切り出し反応の解析

ミニ ISY100 を持つスーパーコイル状のプラスミド分子にトランスポゼースを加えた場合、*in vivo* の時と同様に直鎖状のミニ ISY100 分子が生じることが分かった。このことは、ISY100 の切り出し反応も *in vitro* で再現できたことを示唆する。

また、直鎖状 ISY100 分子の生成に先立って、開環状プラスミド分子が生じることが分かった。この開環状プラスミド分子を単離しニックの位置を調べたところ、因子両端の 5' 端側に切断が入っていることが分かった。この結果は、ISY100 はまず因子両端の 5' 端を持つ方の鎖(nontransferred strand: NTS)にニックを入れ、次に因子両端の 3' 端をもつ方の鎖(transferred strand: TS) を切断することにより直鎖状分子を作り出すことを示唆する。

この切断反応の詳細を片方の IR を含む短い 2 本鎖 DNA 断片 (図 1 参照) を合成し次のように調べた。まず、2 本鎖 DNA 断片内の因子 5' 端をもつ方の鎖 NTS、あるいは因子 3' 端をもつ方の鎖 TS、のそれぞれ末端標識したものを基質として用いて、NTS および TS の切断反応を解析した。その結果、TS は丁度因子の 3' 末端で切断されているが、NTS は因子の 5' 末端から 2 塩基分内側あるいは数塩基分外側で切断されていることが分かった。

次に、NTS あるいは TS のトランスポゼースによって切断すると考えられる部位にあらかじめニックあるいはギャップの入った基質を用いて、TS あるいは NTS の切断効率を解析した。その結果、NTS 側にニックあるいはギャップの入った基質はそれらの入っていない基質に比べ効率よく TS が切断されるのに対して、逆に TS 側にニックあるいはギャップの入った基質ではほとんど NTS は切断されなかった。この結果は、ISY100 は、NTS が切断された後に TS が切断されるという上記の示唆を支持する (図 1)。

(3) 挿入反応の解析

片方の IR とその隣接配列を含む短い 2 本鎖 DNA 断片を基質として、その IR の部分がトランスポゼースの存在下で標的プラスミドに挿入するかどうか解析したところ、挿入はほとんど検出できなかった。一方、トランスポゼースによる 2 本鎖切断で生じる直鎖状分子と同じく、3' 側が 2 塩基突出した構造を持つ IR 断片を基質とした場合、隣接配列を持つ IR 断片に比べ効率よく挿入されることが分かった。この結果は、3' 側が 2 塩基突出した構造をもつ直鎖状分子が転移の中間体であるという上記の示唆を支持する (図 1)。

(4) トランスポゼース-DNA 複合体形成反応の解析

トランスポゼースは IR に結合した後、2 つの因子末端が近接したような形で IR

断片とトランスポゼースをそれぞれ 2 つもつ複合体（トランスポソゾーム）を形成することによって転移を促すと考えられている。そこでこのようなトランスポゼース-IR 複合体の存在を確かめるため、IR を含む DNA 断片を用い、ゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、標識した IR 断片はトランスポゼースに依存して、分子量の大きい方にシフトすることが分かった。この結果はトランスポゼース-IR 複合体が形成されたことを示す。また、この複合体の分子量は、2 つの IR 断片と 2 つのトランスポゼースの合計に相当する大きさのものであることが分かった。このことは、トランスポゼースが IR との結合を通してトランスポソゾームを形成していることを示唆する（図 2）。

以上、本研究において ISY100 は TA 配列を標的として転移し、TA 配列を両端に重複させる IS630 ファミリーに属する因子であり、その転移にトランスポゼース以外の宿主因子を必要としないことを示した。また、ISY100 の *in vitro* の転移反応系を確立し、トランスポゼースは因子両端の 5' 端側を、次に 3' 端側を切断して 3' 端側が突出した構造をもつ直鎖状分子を切り出すというを示した。おそらくトランスポゼースによるこの反応は IR との複合体であるトランスポソゾーム内部で起こると考えられる。因子の転移は、このトランスポソゾームが標的 DNA を捕捉した後 DNA 鎖連結（ストランドトランスファー）反応により起こると考えられる（図 2）。ここで明らかにした ISY100 末端の切断による 3' 側が突出した構造をもつ直鎖状分子の作出機構は、原核生物の他のファミリーに属する因子には見られないものである。

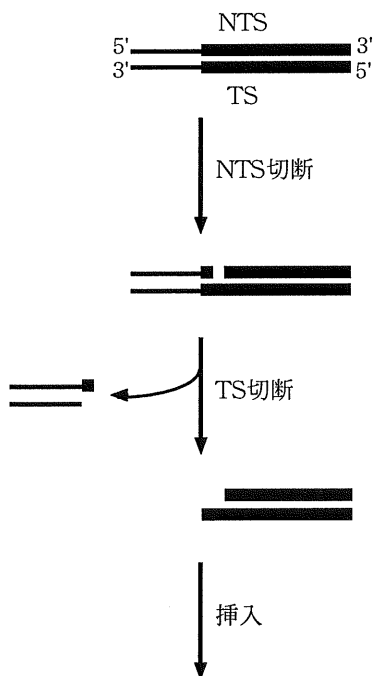


図1. ISY100 末端の切断反応と挿入反応

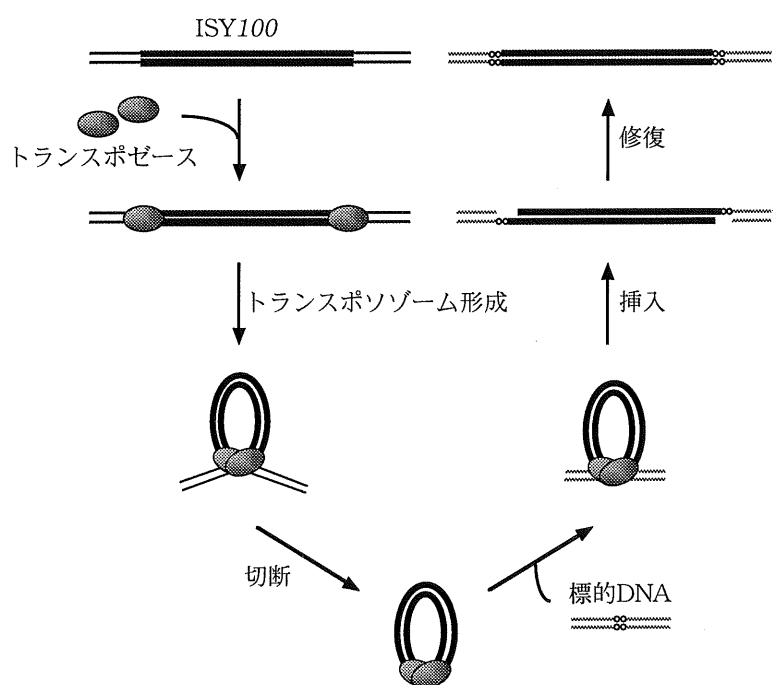


図2. ISY100の転移のモデル