

論文内容の要旨

論文題目: Functional Studies of Endonuclease Encoded by Site-Specific Retrotransposons
(部位特異的レトロトランスポゾンがコードするエンドヌクレアーゼの機能解析)

氏名: 安西 智宏

レトロトランスポゾンは自身の RNA を逆転写してゲノムに挿入される転移因子であり、そのうち自律性の因子は LINE (Long Interspersed Nuclear Element) と呼ばれる。LINE は構造的に大きく二つのグループに分けられる。1つは進化的に古い起源を持つタイプで、open reading frame(ORF)を1つだけ持ち、その中央に逆転写酵素を、その下流に制限酵素に近縁なエンドヌクレアーゼ(EN)をコードしている。もう一方は真核生物一般に広く分布するグループで、2つの ORF を持ち、その ORF2 の N 末端領域に apurinic/aprimidinic (AP) エンドヌクレアーゼに近縁な EN をコードしている。LINE は一般に、EN の活性によって標的となる DNA にニックを入れ、逆転写酵素がその切断末端をプライマーとして逆転写を開始すると考えられており、その転移機構は TPRT(target-primed reverse transcription)と呼ばれている。

ヒトゲノム全体の 20% を占める L1 のように、LINE の多くはゲノム中のランダムな位置に転移する。その一方で、ゲノムの特定の位置だけに転移する LINE も見つかっている。特にカイコでは、テロメ

ア反復配列に特異的な TRAS1 や SART1、28S リボソーム DNA に特異的な R1 といった標的配列特異的な LINE が複数知られている(図1)。カイコゲノムに存在するこれらの LINE は、系統解析から「R1 clade」というグループに分類され、進化的に非常に近縁であるにも関わらず、テロメアと rDNA というゲノムの全く異なる部位に存在している。しかし、これらの LINE がどのようにしてゲノムから特定の部位だけを選択し、そこに転移するかについてはほとんど知見がない。

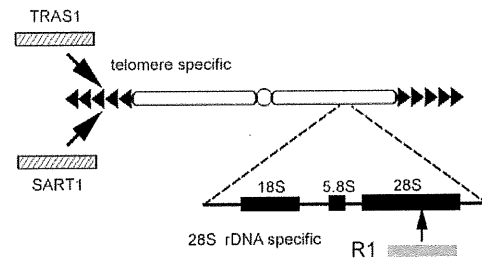


図1. 「R1 clade」に属する、カイコの部位特異的な LINE

TRAS1 や SART1 はテロメア特異的、R1 は 28S rDNA 特異的な LINE である。

私は EN ドメインが標的となる DNA 配列をゲノムから選択し、切断することによって LINE の挿入配列の決定に関与しているのではないかと考えた。この仮説を立証するために、まず大腸菌によるタンパク質発現系を用いてテロメア特異的な LINE である TRAS1 の EN 領域のみを発現、精製し、その酵素活性を解析した。TRAS1-EN はカイコのテロメア 2 本鎖 DNA $(TTAGG/CCTAA)_n$ に対して切断活性を示し、 $(TTAGG)_n$ 鎖の T-A 間を、 $(CCTAA)_n$ 鎖の C-T 間をそれぞれ特異的に切断した。これらの切断位置はゲノム中での TRAS1 とテロメア配列との境界の配列と一致しており、TRAS1 の転移において EN が実際に機能していることを強く示唆する。TRAS1-EN は $(TTAGG)_n$ 鎖を $(CCTAA)_n$ 鎖より先行して切断しており(図2)、TRAS1 は $(TTAGG)_n$ 鎖のニックをプライマーにして逆転写を開始した後、もう一方の $(CCTAA)_n$ 鎖を切断していると考えられる。また TRAS1-EN はテロメア配列と非テロメア配列の両方を持つような 75bp の基質に対しても、15bp のテロメア部分のみを選択的に切断する特異性を持っていた。次に基質であるテロメア DNA に塩基置換を導入し、それぞれの基質に対する切断活性を定量した。その結果、TRAS1-EN が切断配列の周辺の 10bp (上流 7bp、下流 3bp) と相互作用しており、特に GTTAG という 5 塩基が TRAS1-EN タンパク質によるテロメア DNA の認識に重要であることを明らかにした(5'-TTAGGTT ↓ AGG-3'; 下線部)。この TRAS1-EN の認識モチーフ(GTTAG)はヒトやマウスのテロメア反復配列 $(TTAGGG)_n$ においても保存されていることから、さまざまな生物種のテロメア配列を基質にして同様のアッセイを行った。すると TRAS1-EN はカイコだけでなく、ヒトや線虫のテロメア配列に対しても特異的な位置での切断活性を示した。(以上、第一章)

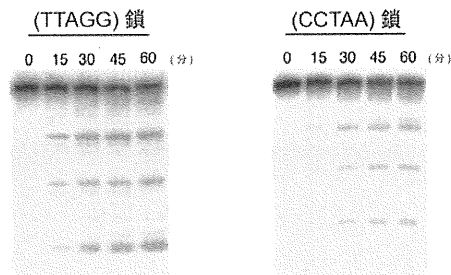


図2. テロメア反復配列(TTAGG/CCTAA)5 に対する切断活性

一方の鎖をラベルした二本鎖 DNA に TRAS1-EN を 0.2 μ g 作用させた。反応時間を上に示す。

次にテロメア DNA と TRAS1-EN タンパク質が転移のプロセスにおいてどのように相互作用しているかを詳細に検討するため、横浜市立大学の真板宣夫博士らとの共同研究によって TRAS1-EN の X 線結晶構造解析を行い、LINE がコードする EN としては初めて TRAS1-EN の立体構造を明らかにした(図3)。TRAS1-EN は α - β サンドイッチ構造をとっており、その大まかなトポロジーは大腸菌やヒトの AP エンドヌクレアーゼである ExoIII や ApeI に類似していた。しかし C 末端領域に TRAS1-EN のみに特徴的な β ループ構造 (β 10- β 11) が存在していた。私は結晶構造モデルからテロメア DNA と相互作用していると予想されるアミノ酸に変異を導入し、新たに 13 種の組み換え

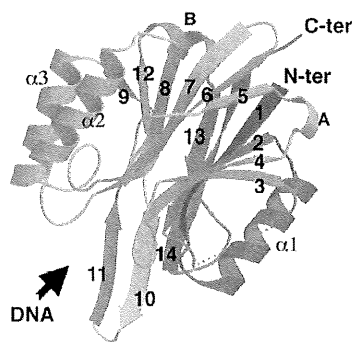


図3. TRAS1-EN の結晶構造

β ストランド(1-14)、3つの α ヘリックスと2つの 3_{10} ヘリックス(A,B)が示されている。予想される DNA 結合サイトが矢印で示されている。

タンパク質を精製した。それぞれのタンパク質に関して、テロメア反復配列を含むプラスミドを基質として切断活性を検定したところ、多くの変異体では切断活性そのものが失われていた。次にラベルしたテロメア DNA を基質としたアッセイにより、組み換えタンパク質によるテロメア DNA の切断部位を同定した。いくつかの変異体では切断活性は維持されていたものの、5bp ごとのテロメア DNA 切断特異性が失われていた。そのような変異の一つは、TRAS1-EN に特徴的なループ構造にマッピングされたことから、この構造がテロメアの繰り返し配列の認識に関わっていると考えられる。(以上、第二章)

カイコのテロメア配列に特異的な LINE である SART1 は、バキュロウイルス系で強制発現させることにより *in vivo* でテロメア配列に転移する。私は、「R1 clade」に属する近縁な LINE がどのようにし

て標的配列を多様化していったのかを明らかにするため、28S rDNA に特異的な LINE である R1 に関して、その配列特異的な転移機構を解析した。まずカイコゲノムから新たに R1 をクローニングし、バキュロウィルス発現系による転移実験を行った。すると R1 はカイコゲノム中に見られるのと全く同一の位置である、28S rDNA の特定の塩基間に転移した。転移クローンの解析から、R1 の逆転写酵素は、EN が切断した位置から逆転写を開始していることが示唆され、TPRT model を支持する結果となった。また R1 のコンストラクトの下流に 28S の配列を加えると、逆転写開始位置の正確性と転移効率が上昇した。下流の 28S の配列はリードスルーにより RNA へと転写され、EN によって切断された DNA の断面と DNA-RNA 間の相互作用を行っていると考えられる(図4)。この結果は、28S rDNA に特異的に転移するために、R1 はその EN によって特異的な位置を切断するだけでなく、その切断面に標的部分の RNA 配列をハイブリダイズさせることで、逆転写を効率よく開始させるメカニズムを持っている事を示唆する。

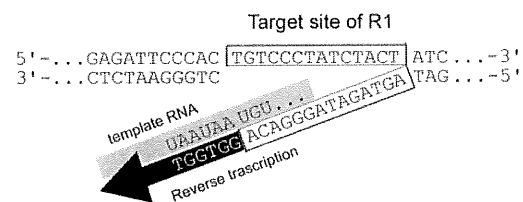


図4. 新たな配列特異的な転移メカニズム

EN が切断した位置した DNA 配列と鋳型 RNA とがハイブリダイズしてから、逆転写酵素によって逆転写が開始される。上に R1 の標的配列を示してある。

次に、配列特異的な LINE の in vivo 転移系を用いて、テロメア特異的な LINE である SART1 の標的配列を変更することを試みた。そのために EN 領域を欠損した SART1 を作成し、それとさまざまな配列特異性を持つ LINE がコードする EN とを細胞内で同時に発現させた。まず、SART1 とはテロメアにおいて挿入される DNA 鎖が異なる LINE である、TRAS1 の EN を共発現させたところ、SART1 の EN 活性が TRAS1-EN によってトランスに相補され、TRAS1-EN が切断した位置に SART1 配列を挿入させることに成功した。すなわちテロメア配列特異的な LINE の間では、その EN 活性を変更するだけで、標的配列を自由に変更することができる。次に、SART1 とはゲノム上の挿入部位が異なる R1 の EN 領域を、EN を欠損した SART1 もしくは TRAS1 と同時に発現させた。しかし、いずれの解析においても 28S rDNA に転移していることを示すクローンは得られなかった。この原因としては、EN 以外の領域がテロメアに強く局在しているために SART1 が rDNA に近づくことができなかつた可能性や、R1-EN によって切断された 28S rDNA の DNA 末端に、鋳型 RNA がうまく結合できず、逆転写が開始されなかつた可能性が考えられる。(以上、第三章)