

論文審査の結果の要旨

氏名 安西 智宏

本論文は3章からなり、第1章はテロメア特異的レトロトランスポゾン TRAS1 がコードするエンドヌクレアーゼ(EN)の機能解析、第2章は TRAS1-EN の結晶構造解析とその知見に基づいたテロメア認識機構の解析、第3章は 28S rDNA 特異的なレトロトランスポゾン R1 の転移機構とレトロポゾンの挿入配列の操作について述べられている。

論文提出者は non-LTR 型レトロトランスポゾンの転移におけるエンドヌクレアーゼの機能を明らかにするために、まず第1章においてカイコのテロメア特異的レトロポゾンである TRAS1 のエンドヌクレアーゼを大腸菌で発現、精製して、そのタンパク質の生化学的な解析を行った。TRAS1-EN はカイコのテロメア 2 本鎖 DNA (TTAGG/CCTAA)_n の特定の位置を切断しており、(TTAGG)_n 鎖を(CCTAA)_n 鎖より先行して切断する活性を有していた。次に基質であるテロメア DNA に塩基置換を導入することで、TRAS1-EN が切断配列の周辺の 10bp と相互作用しており、特に GTTAG という 5 塩基が TRAS1-EN 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。また、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ない、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すことを明らかにした。これら TRAS1-EN のテロメア特異的な切断活性は、あらゆる生物種を通して、全く新規の酵素活性であり、研究テーマの設定に非常に高い独自性が認められる。TPRT と呼ばれる non-LTR 型レトロトランスポゾンに特有の機能に関して、更に詳細な解析が加われば、TRAS1 の転移メカニズムに対して深い理解が得られるであろう、という指摘があった。

第二章ではテロメアと TRAS1-EN の相互作用を詳細に検討するため、TRAS1-EN の X 線結晶構造解析を行なった。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 ループ構造が存在していた。論文提出者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、それぞれのタンパク質に関して切断活性を検定した。更にテロメア DNA を基質としたアッセイにより、テロメアの切断特異性が失われる変異を見出した。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結論付けた。この研究は、non-LTR 型レトロトランスポゾンの EN としては初めてその立体構造を明らかにしたもので、レトロポゾンの転移メカニズム、特に標的 DNA と EN との相互作用に関して新規の知見をもたらした。また進化の上でレトロポゾンがどのようにエンドヌクレアーゼ活性を獲得したかに関して、構造生物学の視点からアプローチしている点が高く評価された。

第三章では「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 の転移機構を解析している。クローニングした R1 は 28S rDNA の特定の塩基間に転移し、R1 は EN が切断した位置をプライマーにして逆転写を開始していた。また R1 は転移の際、EN によって特異的な位置を切断するだけでなく、その切断面に鋳型の 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明らかにした。これは既に明らかになっているテロメア特異的な LINE である SART1 の転移系では見出されなかった特徴であった。更に論文提出者は、レトロポゾンをトランスジェニックベクター系へ応用する可能性も探索し、テロメア特異的な SART1 の標的配列を変更するための新たな系を構築した。この系を用いることで、SART1 の転移配列をテロメアの別の位置に変更させることに成功したが、SART1 に改変を加えてリボソーム DNA に転移させることはできなかった。ただ、挿入配列を変更するという発想は非常に独創的で、またレトロトランスポゾンによる応用研究に先鞭を付けた点は評価に値する。

なお、本論文の第1章は藤原晴彦、高橋秀和、第2章は藤原晴彦、真板宣夫、水野洋、第3章は藤原晴彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であったと判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。