

# 論文内容の要旨

## 論文題目

### Evolution of Target Sequence-Specificity and Domain Structure in Non-LTR Retrotransposons

(non-LTR レトロトランスポゾンにおける標的配列特異性とド  
メイン構造の進化)

氏名 小島 健司

転移因子の一種であり、真核生物の主要な反復配列でもある non-LTR レトロトランスポゾンは、標的 DNA をエンドヌクレアーゼによって切断し、その位置に逆転写酵素によって自身の RNA を逆転写して挿入する。この転移に必要なエンドヌクレアーゼと逆転写酵素は、レトロトランスポゾン自身がコードしている。non-LTR レトロトランスポゾンはエンドヌクレアーゼの種類によって2つのグループに分類できる。初期分岐群は、制限酵素と活性部位が類似したエンドヌクレアーゼ(restriction-like endonuclease, RLE)をコードし、後期分岐群は、DNA 修復系の酵素である AP エンドヌクレアーゼに似たエンドヌクレアーゼ(AP endonuclease-like endonuclease, APE)をコードしている。この2つのグループは他にも様々な点で異なっている。初期分岐群の多くは蛋白質を1つだけコードするが、後期分岐群の多くは2つの蛋白質をコードしている。また、一般に、初期分岐群はゲノム中の特定の配列にのみ転移するが、後期分岐群は様々な位置に転移する。系統解析の結果からは、RLE を持つ初期分岐群から APE を持つ後期分岐群が派生したことが示唆されている。

本研究では、後期分岐群の誕生の過程と、それに伴うレトロトランスポゾンの変化を解明することを目的とした。本論文は全5章から構成されている。第1章から第3章では、初期分岐群と後期分岐群の相違点の一つである配列特異性に着目し、その多様性、起源、進化を明らかにすることを試みた。第4章では、初期分岐群から後期分岐群が派生する中間形態のレトロトランスポゾン Dualen を同定し、進化的解析を行なった。第5章では、後期分岐群の特徴である、2つの蛋白質を1つの RNA から合成する機構について、カイコのレトロトランスポゾン SART1 を用いて分子生物学的に解析を行なった。

## 第1章 R1 クレードにおける標的配列特異性の進化

標的配列特異性は、元来“寄生”的な因子であるレトロトランスポゾンが反復配列のみに転移することで、一つしかない必須遺伝子を破壊することなく自身のコピーを増やすことができるという、“共生”的生存戦略として捉えることができる。R1 クレードは、後期分岐群に属しながら、数種類の配列特異的なレトロトランスポゾンを含むグループである。R1 クレードにおける標的配列はどのように選択されており、どのように配列特異性が進化してきたのかを明らかにするため、各種昆虫のゲノム DNA を用いた分子生物学的手法、及び、マリアアカのゲノム配列情報を用いたバイオインフォマティクス的手法を併用して新規のレトロトランスポゾンを探した。この結果、マイクロサテライトに転移する Waldo と Mino、28S rDNA に挿入される R6、18S rDNA に挿入される R7 を新規に発見した。系統解析から、マイクロサテライト特異的な Waldo から rDNA 特異的な R6、R7、RT が派生し、RT から再びマイクロサテライト特異的な Mino が分岐したことが明らかとなった(図 1 左)。RT と R7 の標的配列は非常によく似ており(図 1 右)、標的配列の認識がわずかに変化することで 18S rDNA と 28S rDNA という異なる配列への配列特異性が分化したことを示している。

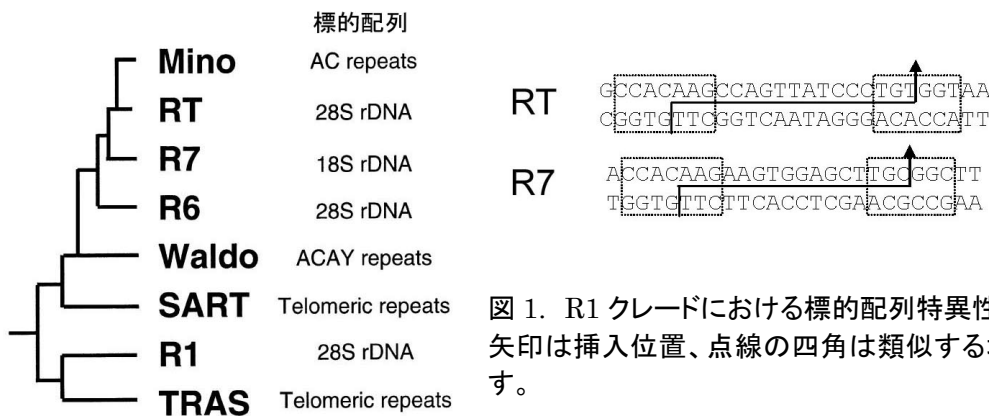


図 1. R1 クレードにおける標的配列特異性の進化  
矢印は挿入位置、点線の四角は類似する塩基配列を示す。

## 第2章 新規の配列特異的レトロトランスポゾンのゲノム横断的探索

第1章と同様の手法により様々な生物のゲノム情報から、初期分岐群と、後期分岐群に属しながら配列特異的な Tx グループのレトロトランスポゾンの探索を行なった。初期分岐群ではこれまで節足動物でしか見つかっていなかった 28S rDNA 特異的な R2 を、ユウレイボヤ、カタユウレイボヤ、ゼブラフィッシュで発見した。これまでは配列特異的なレトロトランスポゾンは近縁な生物種間でしか分布が確認されておらず、動物門を超えた広範な分布を示す配列特異的レトロトランスポゾンは初めての発見であった。Tx グループでは、TC リピート、TTC リピート、U2 snRNA 遺伝子、tRNA 遺伝子のタンデム反復配列のスペーサー領域、5S rDNA、にそれぞれ特異的なレトロトランスポゾンを硬骨魚類のゲノムから発見した。R1 クレードを含む3つの配列特異的なグループの標的配列を比較すると(表1)、標的配列は全て反復配列であり、どのグループにも共通して、普遍的でコピー数の多い rDNA やマイクロサテライトに挿入されるレトロトランスポゾンの種類が多く、コピー数の少ない snRNA や種ごとに配列の異なるトランスポゾンなどに挿入されるレトロトランスポゾンの種類は少ない傾向があり、配列特異的なレトロトランスポ

ゾンの標的配列を制限する主な要因は、標的配列の保存性と反復数であることが示唆された。

表1. 3つの配列特異的なグループのレトロトランスポソンの標的配列

標的配列	初期分岐群	Tx グループ	R1 クレード
リボソーム RNA 遺伝子	R2, R4, R5	<i>Mutsu</i>	R1, <i>R6, R7, RT</i>
他の RNA 遺伝子	CRE/SLACS/CZAR, NeSL	<i>Dewa, Keno</i>	
マイクロサテライト	Dong	<i>Kibi, Koshi</i>	<i>Waldo, Mino</i>
テロメア反復配列			TRAS, SART
サブテロメア反復配列	Genie1		
トランスポゾン		Tx1L, Tx2L	

斜体は第1章、第2章で同定したレトロトランスポソンを示す。

### 第3章 左右相称動物における 28S rDNA 特異的なレトロトランスポゾン R2 の長期にわたる垂直伝播

第2章において、R2 が節足動物門と脊索動物門とにまたがって分布することが明らかとなった。そこで、各種の脊索動物や節足動物などのゲノム DNA を用いて、PCR により R2 の分布を解析したところ、棘皮動物トリノアシヤ、脊索動物の内、メクラウナギ綱ヌタウナギと爬虫綱クサガメで R2 を発見した。また、扁形動物門に属するマンソン住血吸虫にも R2 が存在することをゲノム配列情報から明らかにした。系統解析とドメイン構造解析から、R2 は N 末のジンクフィンガーの数の異なる4つの大きな系統(クレード)に分類でき、更に、前口動物と後口動物の分岐以前に 10 以上の系統(サブクレード)に分かれて垂直伝播によって維持されてきたことが示された。以上のことは、R2 の配列特異性が動物の進化の初期に誕生し、現在まで維持されてきたことを示しており、標的配列特異的に転移するという生存戦略が常に有効に働いてきたことを表している。

### 第4章 2つのエンドヌクレアーゼを持つ特異なレトロトランスポゾン Dualen

第2章の解析の過程で RLE と APE の両方のエンドヌクレアーゼを持つ新規のレトロトランスポゾン Dualen を発見した。Dualen は約 3000 アミノ酸残基からなる巨大な蛋白質をコードしており、中に2種類のエンドヌクレアーゼと逆転写酵素、プロテアーゼ、RNaseH、及びジンクフィンガーを含んでいる。逆転写酵素ドメインを用いた系統解析では、Dualen は初期分岐群と後期分岐群の中間に位置し、初期分岐群と後期分岐群とをつなぐ“ミッシングリンク”であることが示された(図 2)。Dualen の構造から、初期分岐群から後期分岐群への進化は2つの過程からなり、最初の過程で APE が獲得され、次の過程で RLE が失われたことが明らかとなった。Dualen では、RLE、APE 双方の保存された残基に変異が入っており、弱いエンドヌクレアーゼ活性を互いに補うことで両者のエンドヌクレアーゼを持つ特殊な構造が維持されてきた可能性がある。

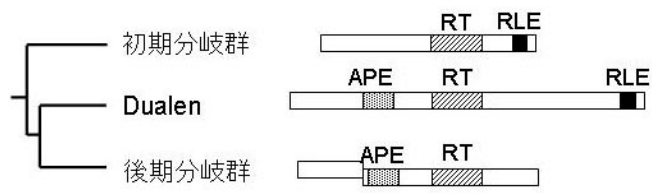


図 2. non-LTR レトロトランスポゾンのドメイン構造の進化  
 APE, AP 様エンドヌクレアーゼ; RT, 逆転写酵素; RLE, 制限酵素様エンドヌクレアーゼ

### 第5章 レトロトランスポゾン SART1 のバイシストロニック RNA 翻訳機構

後期分岐群に属する SART1 の mRNA は2つの蛋白質(ORF1p, ORF2p)をコードするバイシストロニック RNA である。真核生物の mRNA は基本的に1つの蛋白質のみをコードするモノシストロニック RNA であり、2つの蛋白質を1つの RNA から翻訳するには、特別な機構が必要となる。non-LTR レトロトランスポゾンの遠戚の LTR レトロトランスポゾンやレトロウイルスもバイシストロニック RNA をコードしており、リボソームのフレームシフトを誘発することで下流の蛋白質を合成している(図 3)。しかし、non-LTR レトロトランスポゾンでは、強制発現系を用いても十分な量の蛋白質が翻訳されず、ORF2p の翻訳機構は全くわかっていない。今回、SART1 のバイシストロニック RNA をバキュロウイルスで大量に発現させ、ウエスタンブロッティングによって ORF2p の翻訳を解析する系を構築した。SART1 の ORF2p は、LTR レトロトランスポゾンやレトロウイルスとは異なり、ORF1p とは独立した蛋白質として翻訳されていた。変異を導入して解析したところ、翻訳は ORF2 の最初の AUG から開始されていた。SART1 の ORF2 の最初の AUG は ORF1 の終止コドンと重なって UAAUG となっている。この UAAUG に変異を加えて、ORF2p の翻訳量を調べたところ、ORF2p の翻訳には、AUG が ORF1 の終止コドンの近傍にある必要があることが明らかとなった。この UAAUG の他に、下流の RNA 二次構造も重要であった。原核生物の“translational coupling”と呼ばれる機構においても、終止コドンと開始コドンが重なった UAAUG が重要な働きを担っている事が示されている。translational coupling では、上流の蛋白質を翻訳したリボソームが翻訳終了後、すぐそばの開始コドンから再び翻訳を開始する。SART1 の ORF2p も translational coupling によって翻訳されている可能性が高い(図 3)。これは、真核生物では初めての発見であり、開始コドンと終止コドンが重複した構造が他の non-LTR レトロトランスポゾンや細胞遺伝子でも見られることから、真核生物の普遍的なバイシストロニック RNA 翻訳機構としての translational coupling の存在を示唆するものである。

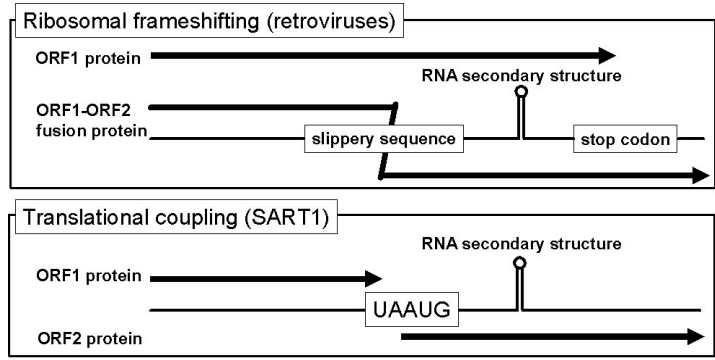


図 3. バイシストロニック RNA 翻訳機構の比較