

# 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 15 年度 博士課程 進学

氏 名 太田 信哉

指導教員名 渡邊 嘉典

## 論文題目

大腸菌の挿入因子 *IS1* の転移と制御機構に関する分子遺伝学的研究

トランスポゾン、原核生物から哺乳動物まで幅広く、それらのゲノム上に存在する転移性遺伝因子であり、ゲノム上のある部位から他の部位に転移挿入する。この転移反応により逆位、欠失などの様々な DNA 組み換えをも引き起こすため、ゲノム再編成の主要な原因であることが分かっている。原核生物においては、挿入配列 (IS) として大腸菌で最初に見いだされたが、*IS1* はその 1 つであり、多薬剤耐性、エントロトキシン遺伝子の転移による伝播に関わっている重要な因子である。*IS1* (768 bp) は、両端に約 30 bp の逆向き反復配列 (IR) を、内部には互いにオーバーラップする 2 つのオープンリーディングフレーム (orf; *insA*, *B'-insB*) をこの順で持つ。*IS1* の転移反応を司る酵素トランスポゼース (Tnp) は、*insA* の下流域にあるアデニンクラスターにおいて翻訳時に -1 方向にフレームシフトすることにより InsA-B'-B 融合タンパク質の形で産生される。フレームシフトが起きない場合は、*IS1* の転移抑制タンパク質である InsA が産生される。本研究の目的は、らん藻、古細菌をも含む細菌群に存在する *IS1* とは近縁であるが、構造的に多様なファミリーメンバーにコードされている Tnp 内の保存領域の情報に基づいて、Tnp のドメイン構造とその機能を解析し、*IS1* の転移と制御機構を解明することである。

トランスポゾンの転移反応は、Tnp による自身の末端逆向き配列 IR への認識結合、2 つの Tnp 分子と両末端 IR を含む複合体 (トランスポソーム) の形成、各 IR 末端と転移の標的 DNA 間での DNA 鎖連結反応、に大別される。本論文ではまず、*IS1* ファミリーのメンバーにコードされる Tnp の N 末領域にはジंकフィンガー (ZF) とヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) モチーフが、C 末領域には組み換え反応の活性中心の DDE モチーフを成す可能性のある酸性アミノ酸残基が、さらにその他いくつかの領域にヘリックス構造が保存されていることを述べる。次に、末端逆向き配列 IR への結合には、ZF と HTH モチーフをそれぞれ持つ 2 つのドメインが関わり、組み換え活性には、DDE モチーフを持つドメインが関わっていることを述べる。さらに、N 及び C 末両領域にトランスポソーム内で形成されると考えられるホリデー構造を持つ DNA に結合

し、特異的な複合体を形成する活性があること、この活性に ZF モチーフを含むドメインとそのすぐ下流のヘリックス領域が関わっていることを述べる。そして、翻訳フレームシフトが起こらないときに生じる転移抑制タンパク質 InsA は Tnp の N 末領域にあるドメインを共有し、これらが IS<sub>I</sub> の転移の制御に深く関わっていることを述べる。

#### 1. 新規 IS<sub>I</sub> ファミリーメンバーの同定と、それらにコードされる Tnp のアミノ酸配列の比較による機能的ドメインの推定

これまでにグラム陰性菌において、大腸菌の IS<sub>I</sub> と相同性のある数多くの因子が見いだされており、1つのファミリーを成していることが明らかにされている。しかし、それらの配列の殆どは IS<sub>I</sub> のそれとほぼ同じであり、それゆえ IS<sub>I</sub> Tnp の機能的部位を推定することを非常に困難にしてきた。そこで、IS<sub>I</sub> とは遠縁の IS<sub>I</sub> ファミリーメンバーを同定することを試みた結果、らん藻を含む真正細菌のみならず古細菌まで IS<sub>I</sub> ファミリーのメンバーが広く分布していることが分かった。全てのメンバーにおいて、IS<sub>I</sub> と同様の構造的特徴が見いだされたが、超好熱性古細菌より見いだしたメンバーには、IR が非常に長いこと、および orf を1つしか持たないこと、といった違いが見られた。全てのメンバーの Tnp のアミノ酸配列に基づいて系統樹を描いたところ、真正細菌、らん藻・メタン細菌、そして、超好熱性古細菌、由来のメンバーがそれぞれクラスターを形成することが分かった。それらがコードする Tnp は多様であり、中にはアミノ酸配列レベルで 20 % 程度しか類似性を示さないものもあったが、これらの Tnp の N 末領域には ZF と HTH モチーフが、さらに C 末領域には触媒活性中心を成す DDE モチーフを構成する可能性のある酸性アミノ酸残基が、その他いくつかの領域にヘリックス構造が保存されていることが分かった。

#### 2. IS<sub>I</sub> Tnpにおける活性中心の同定：DDE モチーフの存在

多くのトランスポゾンの Tnp やレトロウイルスのインテグラーゼ (Int) などの活性中心は、RNase H で見いだされたそれに類似し、3つの酸性アミノ酸を含む DDE モチーフと呼ばれている。IS<sub>I</sub> はトランスポゾンの中で最も小さなものであり、その Tnp は DDE モチーフを持たず、λ ファージの組み換え酵素の活性中心である HRY モチーフを持つとされてきた。本研究で見出した IS<sub>I</sub> ファミリーメンバーの Tnp のアミノ酸配列をアライメントしたところ DDE モチーフを成す可能性のあるいくつかの酸性アミノ酸残基が保存されているが、HRY モチーフを成すと考えられているアミノ酸残基は、保存されていないことが分かった。また、IS<sub>I</sub> ファミリーメンバーの Tnp の 2 次構造を予測し、すでに高次構造が明らかにされている転移性ファージ Mu とトランスポゾン Tn5 の Tnp、および、レトロウイルス HIV-1 の Int タンパク質の 2 次構造と比較したところ、非常に類似している領域が存在することが分かった。このことは、IS<sub>I</sub> Tnp が DDE モチーフを持つ可能性を強く示唆する。そこで、IS<sub>I</sub> Tnp の全ての酸性アミノ酸に変異を導入した Tnp を作成し、それらの転移活性を調べたところ、特定の3つの酸性アミノ酸 (D, D, E) に変異を導入した Tnp は IS<sub>I</sub> の転移を促さないことが明らかになった。この結果は、見出された3つの酸性アミノ酸が IS<sub>I</sub> の転移に重要な役割を担っており、DDE モチーフを成していることを示唆する。実際、コンピュータープログラムによって推定される DDE モチーフを含む領域の 3 次構造は、高次構造が明らかにされている Tnp や Int タンパク質のものと非常に良く似ていることが分かった。ここで明らかにした IS<sub>I</sub> の DDE モチーフは、2 番目の D と 3 番目の E の間が 25 アミノ酸残基と、他の転移性因子

のものとは非常に短い点で異なっている。それゆえ、長い間 IS1 においては転移反応の活性中心としての DDE モチーフの存在が指摘されなかったと考えられる。

### 3. IS1 Tnp による末端逆向き配列 IR 特異的結合に関わる 2 つのモチーフ (ZFとHTH) の同定

多くのトランスポゾンの Tnp による自身の末端の認識に HTH モチーフが関わっていることが分かっている。IS1 ファミリーのメンバーがコードする Tnp、及び、転移抑制タンパク質 InsA (TnpのN末に相当)、には自身の末端の認識に関わっている可能性のある HTH モチーフが存在することが分かった。加えて、IS1 ファミリーメンバーがコードする Tnp の N 末端領域には ZF モチーフを構成すると考えられる 4 つのシステイン残基 (C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) が保存されていることを見出したが、このモチーフも自身の末端の認識に関与している可能性が考えられた。そこで、HTH または ZF のいくつかのアミノ酸残基のそれぞれに変異を導入した Tnp を作成し、転移頻度を調べたところ、これらの Tnp 変異体は IS1 の転移能を喪失していることが分かった。また、これらの Tnp 変異体、あるいは、同じ変異を持つ InsA が、IR 内にあるプロモーターからの *insA*、*B'-insB* の発現抑制能を喪失すること、さらに、精製した InsA 変異体タンパク質は、*in vitro* で IR 配列を含む DNA 断片に結合しないことを示した。また、プラズマ発光法で InsA に亜鉛原子が 4 つのシステイン残基を介して配位結合していることを、キレート剤で亜鉛イオンを除くと InsA は IR 配列に結合しなくなることを示した。これらの結果は、IS1 Tnp が HTH と ZF モチーフをそれぞれ含む 2 つのドメインの関わりによって自身の末端を認識・結合し、転移を促すこと、InsA が両ドメインを持つため IS1 の転移を抑制するタンパク質として機能すること、を示唆する。2 つのドメイン構造は IS1 Tnp が IR に方向性を持った結合により DDE モチーフを含む領域を IR の末端に位置させるのに必要なものと考えられる。他のトランスポゾンの Tnp の自己末端の認識に HTH モチーフのみが必要とされているが、これらも実際には IS1 Tnp と同様、IR に方向性を持った結合するために必要な 2 つのドメインが関与している可能性が考えられる。

### 4. IS1 Tnp における転移中間体構造特異的な DNA 結合活性とその活性に関わるドメインの同定

トランスポゾンの転移は、Tnp が両 IR に結合した後、Tnp の 2 量体形成により、両 IR が近接した形の安定な複合体であるトランスポソゾームを形成することによって起こると考えられている。このような複合体において Tnp は、IR 特異的 DNA 結合活性に加え、転移中間体中の少なくとも 4 本の DNA 鎖が交叉した、ホリデー様構造に特異的な DNA 結合活性を持つことにより、安定な複合体であるトランスポソゾームを形成しているのではないかと考えた。そこで、IR を含まないホリデー構造をとる X 字形の基質を作成し、これを用いて Tnp が結合するかどうか調べた。その結果、Tnp は X 字型 DNA に結合し、2 つの Tnp 分子が結合した複合体を形成することを見出した。また、Tnp は X 字型のみならず、Y 字型 DNA にも結合すること、この場合には 1 つの Tnp 分子が結合した複合体を形成すること、さらに、IR 配列を持たない 2 本鎖 DNA には結合しないが、バルジ構造を持つ 2 本鎖 DNA には結合することが分かった。これらの結果は、Tnp が折れ曲がった 2 本の DNA を認識するという構造特異的 DNA 結合活性を保持していることを示唆する。このことは、Tnp が IR 特異的 DNA 結合活性に加え、構造特異的 DNA 結合活性を保持することにより、安定な複合体であるトランスポソゾームを形成するという上記の仮説を支持する。

次に、Tnp のどの領域が上記の活性に関わっているか、いくつかの Tnp 欠失変異体を用いて X 字型あるいは Y 字型 DNA への結合を調べた。その結果、Tnp の N 及び C 末領域が、両基質への結合に関わっていることが分かった。また、N 末領域においては ZF モチーフ、および、ZF と HTH モチーフの間に存在するヘリックス領域が、C 末領域においては DDE モチーフの存在する領域が、この活性に関わることが分かった。

## 5. 大腸菌における環状 IS1 の高頻度転移の機構

これまでに IS1 は、大腸菌 K-12 株細胞内で Tnp を過剰産生すると高頻度に転移するが、同時に環状 IS1 分子を生じることが示されている。この環状 IS1 分子は、もともとの IS1 に接していたどちらかの 5~9 bp の配列を両 IR で挟み込んだ構造のサークルジャンクションを持つが、このサークルジャンクションを含む領域を運ぶプラスミドは Tnp を過剰産生すると IS1 の場合より遥かに高頻度で転移することが示されている。本研究において、環状 IS1 が K-12 株中では Tnp を過剰産生しなくとも転移すること、また、環状 IS1 は染色体上に IS1 が存在しない K-12 株以外の大腸菌 EcoR46 株中においては転移しないが、この株に IS1 を導入すると転移することを見出した。これらの結果は、環状 IS1 が大腸菌 K-12 株染色体上に数コピー存在する IS1 から産生される Tnp の作用によって転移することを示している。この環状 IS1 の転移は、IS1 の転移抑制タンパク質である InsA によって強くは阻害されない。このことは、環状 IS1 が染色体上の IS1 由来の InsA の存在下で、わずかに産生される Tnp の作用によって転移することを示唆している。環状 IS1 が K-12 株中で少量の Tnp の作用で転移することができるのは、環状 IS1 分子が効率的にトランスポゾームを形成できる構造をとっているためと考えられる。

また、環状 IS1 は、N 末の IR への結合に関わるドメイン内の重要なアミノ酸に変異を導入した Tnp を過剰産生した場合、Tnp を過剰産生しなかった場合と同程度の頻度で転移するが、C 末の DDE モチーフを構成するアミノ酸に変異を導入した Tnp を過剰産生した場合、Tnp を過剰産生しなかった場合より低い頻度で転移することが分かった。このことは、DDE モチーフの Tnp 変異体が環状 IS1 の転移を阻害することを示している。このようなドミナントネガティブ効果は、他のトランスポゾンの Tnp やレトロウイルスの Int タンパク質の DDE モチーフ変異体でも観察されており、IS1 Tnp 中の DDE モチーフが触媒活性中心を成すという本研究で得られた結果をさらに支持するものである。