

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 太田 信哉

トランスポゾンとは、ゲノム上のある部位から他の部位に転移挿入する遺伝因子である。トランスポゾンの転移は、トランスポゼース (Tnp) による自身の末端逆向き配列 IR への結合、2 つの Tnp 分子と両末端 IR を含む複合体 (トランスポソゾーム) 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。本研究の目的は、大腸菌の挿入因子 IS1 にコードされている 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。

本研究において、IS1 Tnp の N 末、及び C 末領域で見出されたいくつかのアミノ酸モチーフが IR 配列への結合、及び、転移組み換え活性に関わるドメインを形成していることを明らかにした。また、IS1 Tnp 内の 2 つのドメインによりホリデー構造を持つ DNA に結合することを見出し、この活性がトランスポソゾームの安定化に関わっていることを明らかにした。Tnp は、IS1 内部の 2 つのコード領域において翻訳フレームシフトを介して産生されるが、翻訳フレームシフトが起こらないときに生じるタンパク質 InsA が Tnp の N 末領域にあるドメインを共有し、これらが IS1 の転移の制御に関わっていることを指摘したものである。

1. IS1 Tnp 内のアミノ酸モチーフの存在。 これまでに見出されていた IS1 ファミリーメンバーの多くは大腸菌の IS1 の配列とほぼ同じであったが、さらに IS1 ファミリーメンバーを検索した結果、らん藻を含む真正細菌のみならず古細菌まで IS1 とは遠縁のメンバーが分布していること、それらがコードする Tnp の N 末領域にはジンクフィンガー (ZF) とヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) モチーフが、さらに C 末領域には転移組換え反応の活性中心の DDE モチーフを成すと思われる酸性アミノ酸残基が保存されていることを見出した。

2. Tnp の触媒活性中心 DDE モチーフの同定。 推定された IS1 Tnp の高次構造と、すでに構造が解明された他のいくつか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の高次構造を比較したところ、DDE モチーフを含む領域が非常に類似していることが分かった。そこで、全ての酸性アミノ酸に変異を導入した Tnp 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) の Tnp 変異体は IS1 の転移を促さないことが分かった。この結果は、特定の 3 つの酸性アミノ酸が DDE モチーフを成していることを示す。ここで見出された DDE モチーフは、D と E の間が他の転移性因子のものに比べ非常に短く、それゆえ IS1 において DDE モチーフの存在が指摘されてこなかったと考えられる。

3. IS1 Tnp における IR 配列への結合に関わるモチーフの同定。 IS1 Tnp、及び、InsA タンパク質の N 末領域には、HTH モチーフと共に、明らかに ZF モチーフを成す 4 つのシステイン残基が保存されている。本研究において、各モチーフの Tnp 変異体が IS1 の転移能を喪失すると共に、精製した InsA 変異体タンパク質が IR 配列を含む DNA 断片への結合能を喪失していることを示した。これらの結果は、IS1 Tnp が、他のトランスポゾンの Tnp とは異なり、HTH と ZF モチーフを含む 2 つのドメインの関わりにより自身の末端に結合し転移を促すこと、InsA が両ドメインを持つため IS1 の転移を抑制することを示唆する。

4. IS1 Tnp におけるホリデー構造特異的 DNA 結合活性とその活性に関わるドメインの同定。 トランスポゾンは、両 IR に結合した Tnp の 2 量体形成により生じる両 IR が近接した形のトランスポソゾーム内で転移組換え反応を起こすと考えられている。そこで、4 本の DNA 鎖が交叉したホリデー構造をとる X 字形 DNA に Tnp の N 及び C 末領域が結合するかどうか調べた結果、それぞれの領域が X 字型 DNA に 2 分子で結合した形の複合体を形成することが分かった。このホリデー構造の認識に、N 末領域においては ZF モチーフとそのすぐ下流のヘリックス領域が、C 末領域においては DDE モチーフ領域が関わっていることを示した。IR DNA に特異的

に結合するTnpが、構造特異的 DNA 結合活性をも保持していることは、安定で活性のあるトランスポソームの形成に関わっていることを示唆する。

5. 大腸菌における環状 IS1 の高頻度転移。大腸菌K-12 株細胞内でTnpを過剰産生すると IS1 は高頻度で転移するが、その時に IS1 が環状化した分子が生じる。本研究において、この分子は高頻度で転移する能力を持つため、Tnpを過剰産生しなくてもK-12 株染色体上に存在する IS1 から生ずるわずかなTnpの作用によって転移することを見出した。さらに、この環状 IS1 の転移は、DDE モチーフの Tnp 変異体の存在下では阻害されることを見出した。このようなドミナントネガティブ効果は、他の転移性因子の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であるという本研究での結果を支持するものである。

以上本論文は、大腸菌の挿入因子 IS1 と近縁の、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トランスポゼース (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明し、IS1 の転移と制御機構を明らかにしたもので、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。