

## 論文内容の要旨

### 論文題目

# Functional Analysis of ORF1 Protein of Telomere-Specific Non-LTR Retrotransposon, SART1

## テロメア特異的 non-LTR レトロトランスポゾン SART1 の ORF1 タンパク質の機能解析

氏名 松本 匠

### 序論

近年、様々な生物のゲノムプロジェクトが完了し、高等生物のゲノムには膨大な数の“利己的遺伝子”が蓄積されている実態が明らかになりつつある。遺伝子領域は2%程度であるのに対して、約40%は逆転写を介して転写コピーを増やすレトロエレメントである。レトロエレメントとは逆転写を介して自らのコピーを増幅させる転写因子で、2つのグループに大別される。一つは細胞質で逆転写を行う Long Terminal Repeat (LTR) エレメントであり、その構造、細胞内の生活環はレトロウイルスに類似している。もう一つはほとんどの真核生物ゲノムに存在し、核内で逆転写を行うと考えられる non-LTR レトロトランスポゾン (LINE とも呼ばれる) である。LINE 転移はゲノムの改変・再編成に大きく寄与していることが示唆されているが、その転移機構には不明な点が多い。ほとんどの non-LTR レトロトランスポゾンは2つの Open Reading Frame (ORF) を持ち、ORF2 には酵素ドメインをコードしているが、ORF1 タンパク質の機能はほとんど分かっていない。

通常、non-LTR レトロトランスポゾンはランダムな場所に転移するが、カイコには (TTAGG)<sub>n</sub> というテロメア反復配列に特異的に転移する SART1 (図1) という non-LTR レトロトランスポゾンが存在する。カイコではテロメア反復配列を維持するテロメラーゼ活性が検出されないため、SART1 が染色体末端に転移することによりテロメアの短小化を防いでいる可能性が考えられる。従来低頻度に起こる non-LTR レトロトランスポゾンのランダムな転移の検出は困難だったが、SART1 はテロメアにのみ転移するため、PCR による転移検出システムが確立されている。そこで私は、SART1 をモデルエレメントとして、これまでアプローチすることの難しかった ORF1 の機能を解析し、non-LTR レトロトランスポゾンの生活環の全容や、SART1 のテロメア特異的転移機構の解明を目指すことにした。

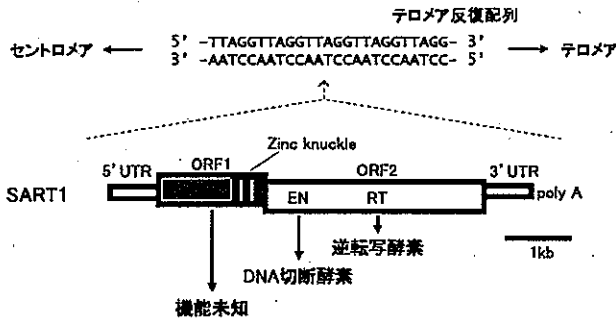


図 1. カイコテロメアと SART1 の構造

SART1 はカイコテロメア反復配列である (TTAGG)<sub>n</sub> のみに転移する。一般的に non-LTR レトロトランスポゾン は機能未知な ORF1 と、転移に直接関わる酵素ドメインをコードする ORF2 を持つ。多くの non-LTR レトロトランスポゾンの ORF1C 末には 3 つの Zinc knuckle が保存されている。

### 1. SART1 ORF1 タンパク質は核移行とテロメア結合を制御する

ORF1 の機能を類推する目的でまず、SART1ORF1 タンパク質 (ORF1p) が細胞内のどこに局在するかを GFP との融合タンパク質を作成して調べた。その結果、ORF1 タンパク質は核内にドット状に局在することが分かった。さらにこの核移行活性が ORF1 内のどの部位に存在するのかを調べたところ、N 末領域を含むもののみが核へ局在した。N 末領域には核移行シグナル様配列が確認できたため、この配列に変異を加えたところ核移行が起こらなくなった。

次に、この NLS が SART1 の転移にどのような影響を及ぼすかを解析した。SART1 を培養細胞に導入・発現させ、その転移を SART1 の 3' 側とテロメア反復配列をプライマーとする PCR により検出した。SART1 の wild type (WT) では転移が検出されるのに対し、NLS に変異を入れた SART1 ではほとんど転移しないことが分かった (図 2, NLS-less)。NLS の無い SART1 と WT の ORF1p のみを同時に発現させると、相補され転移が復活した (NLS-less + ORF1p)。以上の結果から、SART1 の転移には ORF1 の N 末に存在する NLS が必須であることが明らかになった。LINE において転移の活性に直接関わる NLS を同定したのは初めてのことである。他に ORF1p が核内への局在を示すと報告される non-LTR レトロトランスポゾンは現時点ではショウジョウバエのテロメア特異的 LINE である HeT-A と TART だけである。カイコやショウジョウバエではテロメラーゼ活性が検出されないことから、NLS によるテロメア特異的なエレメントの活発な転移が、“宿主のテロメア長維持機構”と“利己的遺伝子の増幅”を共存させている可能性がある。

核内で SART1ORF1p はなぜドット状に存在するのか？私は SART1 がテロメア反復配列のみに転移するという事実から、その ORF1p がテロメアへの局在を制御しているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、ゲルシフトアッセイ法を用いて精製 SART1ORF1p とテロメア反復配列との結合実験を行った。その結果、SART1ORF1p は二本鎖のテロメア反復配列に強力に結合することが分かった。また、競合剤として過剰に非テロメア反復配列、テロメア反復配列を加えたところ、テロメア反復配列を入れた場合のみ結合の阻害が確認された (図 3)。以上の結果から、SART1 ORF1p はカイコテロメア反復配列に特異的に結合することが示された。

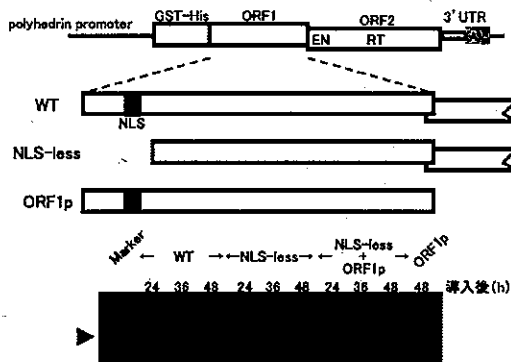


図 2. ORF1 の NLS が SART1 の転移に及ぼす影響

WT と NLS-less SART1 を細胞に導入し、SART1 の 3' 側とテロメア配列をプライマーとする PCR によって転移を観察した。WT では活発な転移が見られる (矢頭) のに対し、NLS-less ではほとんど転移が見られなかった。また、WT の ORF1 のみを発現するベクターと、NLS-less を共発現させるとその転移は復活した。

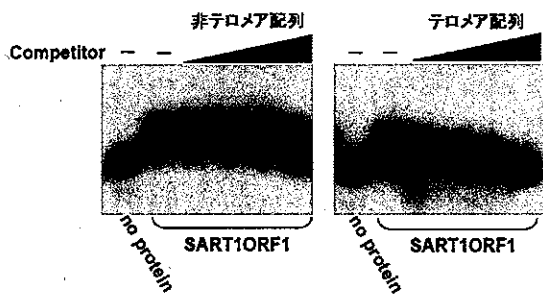


図 3. ゲルシフトによる SART1 ORF1p とテロメア配列の結合実験

精製した SART1 ORF1p とラベルしたカイコテロメア反復配列とを混ぜ、アガロースゲルで分離した。SART1 ORF1p はテロメア反復配列と結合した(左から 2 レーン目)。Competitor として過剰量の非テロメア配列を加えた時は、結合はほとんど阻害されなかった(左)が、テロメア配列を加えた時(右)は結合が阻害された。

## 2. ORF1 タンパク質は転移ユニットである RNP を構築する

non-LTR レトロトランスポソンの転移には ORF1p、ORF2p、自らの mRNA の3者が転移ユニットを構築すると推測されてきたが、ORF2p の発現が難しいなどの理由から、これまでその実体はほとんど分かっていなかった。そこで、タンパク質産生能力の高いバキュロウイルスを用いて、ORF1 (His or HA タグ付加)、ORF2 (HA タグ付加)、mRNA を細胞内で発現させ細胞内で複合体を再構成する実験を試みた。His-ORF1 のみを発現し、His タグを用いて精製し密度勾配遠心法でその大きさを検定したところ、多量体を形成していることが確認できた(図 4B ORF1pWT)。この ORF1 タンパク質同士の多量体化には ORF1C 末の 555-567a.a.が必須であった。次に、ORF1 (His タグ)と HA-ORF2+3' UTR (HA タグ)を共発現させ、His タグで精製し、各タンパク質を抗タグ抗体で、SART1 RNA を RT-PCR で検出したところ、SART1 ORF1p、ORF2p、RNA は結合して Ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成していることが明らかとなった。この RNP 複合体を、dNTP 存在下でカイコテロメア反復配列を含むターゲットプラスミドと反応させると、in vitro での転移が確認された。ORF1p と ORF2p 間の相互作用には ORF1p 同士の多量体化に必須な領域を含む 285-567a.a.が必要であった。SART1 ORF1 タンパク質の結合に必須な 555-567a.a.の二次構造は、レトロウイルスのカプシド多量体化ドメインである Major Homology Region (MHR) と類似していたため、同様の機構で結合している可能性がある。

SART1 ORF1 の C 末には Zinc finger motif の一種でレトロエレメントのみにしか見られない Zinc knuckle が 3 つ存在する。他の多くの non-LTR レトロトランスポソンの ORF1 にも存在するが、機能は全く不明であった。そこで 3 つの motif へそれぞれ変異を導入し、その転移活性を調べたところ、全ての Zinc knuckle が転移に必須であった。上述した細胞内の再構成系で解析したところ、これらの motif は ORF1p-ORF1p、ORF1p-ORF2p 相互作用のどちらにも関与していないことが分かった。RT-PCR により精製複合体中の SART1 RNA を確認してみると、Zinc knuckle 変異体は RNP 中に RNA を取り込んでいないことが明らかになった(図 4A H626P、H649A、H672A)。また WT の場合、SART1 RNA の複合体への取り込みは確認できるが、細胞中の ribosomal タンパク質の rPL3 mRNA は検出できなかった(図 4A WT)。従って、ORF1 の Zinc knuckle は SART1 RNA の特異的な取り込みに関与することが示唆された。これら ORF1 タンパク質、RNA との相互作用に必須な C 末領域を除去すると、密度勾配遠心法では WT よりも低分子の分画に局在した(図 4B ORF1p $\Delta$ C 末+ORF2/3')。以上の結果から、SART1 ORF1p は Zinc knuckle を含む C 末領域を用いて ORF2p、自身の RNA と RNP 複合体を形成することが non-LTR レトロトランスポソンで初めて示された。

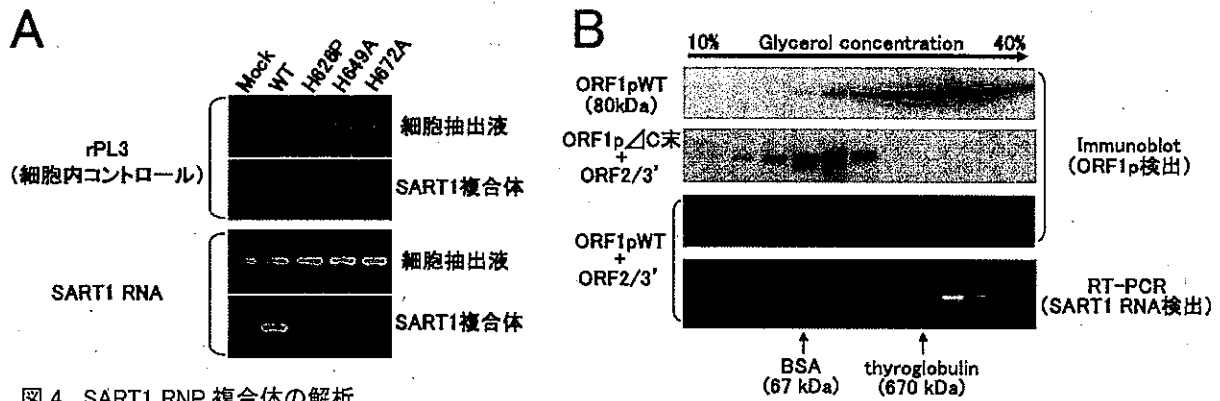


図 4. SART1 RNP 複合体の解析

A. RT-PCR による精製 SART1 複合体中の SART1 RNA の検出。WT では複合体に SART1 RNA が取り込まれるのに対し、Zinc knuckle 変異体 (H626P, H649A, H672A) では RNA の取り込みが起らなかった。B. グリセロール密度勾配遠心法を用いた SART1 RNP 複合体の解析。ORF1p だけでも多量体を形成する。RNP 複合体形成に必要な C 末を除去すると、低分子量の分画に局在する。

### 結論

SART1 をモデルとした本研究により、これまで不明だった ORF1 の機能と、細胞内における non-LTR レトロトランスポゾンの挙動が明確となった (図 5)。ORF1p 同士は多量体化し、その結合には C 末領域 555-567 a.a. が必須であった。また、ORF1p と ORF2p が結合することを non-LTR レトロトランスポゾンでは初めて示し、それには ORF1p 多量体化部位を含む中央領域 285-567 a.a. が必要であることを明らかにした。さらに、SART1 は ORF1p の Zinc knuckle を用いて SART1 mRNA を取り込み RNP complex を形成し、*in vitro* でも転移可能な転移ユニットとなることを示した。加えて、また、SART1 ORF1 の N 末領域には NLS が存在し、SART1 の活発な転移を制御している可能性が示された。SART1 ORF1p は特異的にカイコテロメア反復配列に結合する能力を持ち、酵素ユニットの ORF2p と鑄型となる mRNA を効率的に転移標的部位へ導いている可能性が示唆された。

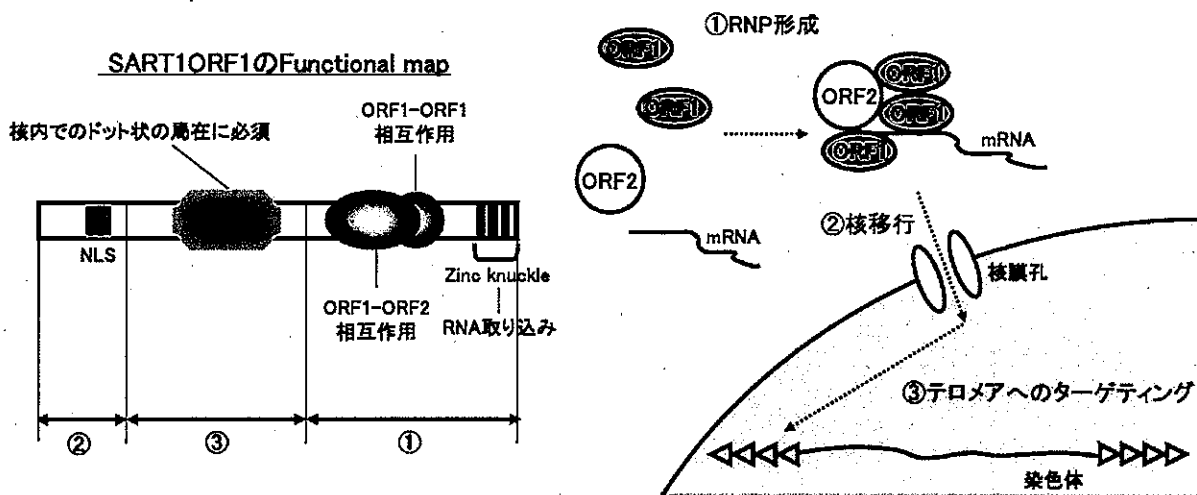


図 5. 想定される SART1 の挙動と ORF1 内の責任領域

左に SART1 ORF1 の Functional map、右に SART1 の細胞内の挙動を示した。①～③は責任領域と対応したステップを表している。