

論文審査の結果の要旨

氏名 松本 匠

本論文は2章からなり、第1章はテロメア特異的 non-LTR 型レトロトランスポゾン SART1 がどのようにして転移部位へ向かうのかについて、第2章は SART1 がどのような複合体を形成して転移を行っているのかについて述べられている。

論文提出者は、第1章において、SART1 の機能未知タンパク質 ORF1 がテロメアという特異的な標的への移動を担っていると考え、ORF1 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質を発現させ、細胞内での局在を解析した。この融合タンパク質が核に局在したことから、ORF1 には核への移行を制御する核移行シグナル (NLS) が存在することを想定した。さらに、ORF1 タンパク質は核内にて特徴的なドット状となることから、このシグナルが SART1 転移標的のテロメアであるという仮説も立てている。これを裏付けるように、細胞分裂期にこのドット状シグナルが染色体像と挙動を共にしていることを示している。提出者はまず、ORF1 タンパク質の核移行がどの領域に担われているのかを様々な変異体を用いて調べている。その結果、ORF1 の N 末領域が核移行に必須であり、さらにこの領域に機能的な NLS を発見している。また発見された NLS が SART1 の転移に必須であることも示している。non-LTR レトロトランスポゾンにおいて初めて NLS を同定し、転移における影響を示し

た点は評価に値する。次に、ORF1 タンパク質とテロメアとの相互作用を生化学的な実験により解析している。その結果、サウスウエスタンブロット、ゲルシフト法により、ORF1 タンパク質はテロメア反復配列に特異的に結合することを示している。以前まで non-LTR レトロトランスポゾンの標的特異性は DNA 切断酵素が担っていると考えられてきたが、この研究により他のドメインもそれに寄与しているという新たな知見が得られた点はこの分野の研究発展において大きな意義がある。

第2章では、SART1 がどのような複合体を形成して転移をするのかについて解析した。SART1 の ORF1、ORF2、3' UTR を含む全長を細胞内で発現させ、ORF1 タンパク質で精製した画分は *in vitro* で転移可能であることが確認されている。提出者はこの画分に酵素ドメインをコードする ORF2 タンパク質や逆転写の鋳型である RNA が含まれると考え、それぞれウエスタンブロットや RT-PCR で検出に成功している。また、ORF1 タンパク質同士は多量体を形成することも証明している。さらに ORF1-ORF1、ORF1-ORF2 の相互作用には ORF1C 末に存在するヘリックス-ターン-ヘリックス構造が関与する可能性を示唆している。ORF1 には zinc finger motif の一種である Zinc Knuckle が 3 つ存在するが、本研究でそれらが全て転移に必須であることを示している。同時にこの構造は SART1 の mRNA を特異的に転移複合体に取り込む際に必須であることを示しているが、SART1 には *trans* に発現させた ORF タンパク質、鋳型 mRNA が互いに認識し合い転移するという特徴的な性質があり、この現象の解明に大きく寄与したことは間違いない。これら SART1 複合体形成に必

要なドメインを除去すると複合体は全く形成されなくなることを密度勾配遠心法でも確認している。さらに、SART1 複合体の形成は細胞内においてのみ形成され、独立に精製した ORF タンパク質を混ぜ合わせただけでは形成されないことを示している。この結果は複合体形成に宿主因子が関与している可能性を示しており、大変興味深いものである。

non-LTR レトロトランスポゾン は高等真核生物ゲノムの大部分を占め、ゲノムの改変に寄与するなど生物学的に重要なエレメントにもかかわらず、レトロウイルスなどと比較して転移機構や生活環の解明が大きく遅れていたが、本論文は細胞内でどのような複合体が形成されるかを明らかにした点と、形成された複合体がどのように転移部位へ向かうのかについて新たな知見を与えた点が高く評価される。また、同時に未知であった non-LTR レトロトランスポゾンの ORF1 の機能の多くが明らかとなった。予備的なデータとして、SART1 の ORF1 タンパク質は DNA 鎖のアニーリングを促進する核酸シャペロン活性が存在することを確認している。本論文の結果から、non-LTR レトロトランスポゾン独自の転移機構とそれに付随するゲノム進化の全容解明につながることを期待される。

なお、本論文の内容は藤原晴彦氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験・解析を行ったもので、論文提出者の貢献が充分であったと判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。