

論文内容の要旨

論文題目

Function and evolution of the telomerase reverse transcriptase gene and telomeric repeat-specific LINEs in insects

(昆虫のテロメラーゼ遺伝子とテロメア配列特異的 LINE の機能と進化)

氏名 二橋美瑞子

序論

ほとんどの真核生物の染色体末端(テロメア)は、テロメア反復配列と呼ばれる単純な繰り返し配列からなっている。テロメア反復配列(ヒトではTTAGGGの繰り返し)はテロメラーゼという酵素によって維持されている(図1)。ところが、昆虫の中にはキョウジョウバエなどテロメア反復配列やテロメラーゼが存在せず、代わりに non-LTR 型レトロトランスポゾン(LINE)が染色体末端に転移することで、テロメアを伸長している種も存在する(図1)。当研究室の先行研究から、昆虫にはテロメア反復配列(TTAGG)のある種とない種が混在し、さらにカイコのようにテロメア反復配列(TTAGG)の中に大量の LINE が存在する種も確認された(図1)。興味深いことに、カイコはテロメア反復配列が存在するにも関わらずテロメラーゼ活性が検出できないことから、テロメア配列特異的 LINE がテロメラーゼに代わってテロメアの維持に関わっている可能性が考えられた。しかしながら、これまで昆虫ではテロメラーゼ遺伝子が同定されておらず、テロメア配列特異的 LINE の転移機構についても不明な点が多かった。

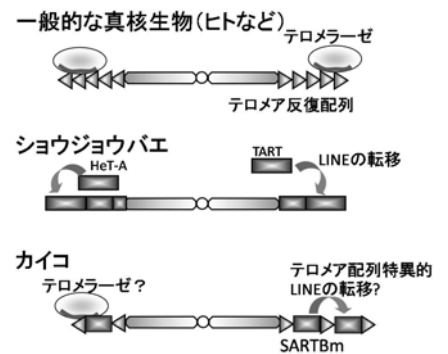


図1 昆虫の多様なテロメア構造

多くの真核生物ではテロメラーゼがテロメア反復配列を付加するが(上)、ショウジョウバエでは HeT-A、TART という LINE がテロメアを構成している(中)。カイコのテロメアは、テロメア反復配列の中に SARTBm などの LINE が大量に蓄積しているという両者の中間的な性質を持つ(下)。

そこで、本研究では、ゲノムが解読されたカイコとトリボリウム(コクヌストモドキ)を用いて、テロメラーゼ遺伝子と、テロメア配列特異的 LINE を解析することで、昆虫のテロメア維持のメカニズムの解明および、その多様化の原因を探ることを目的に研究を行った。

1. 昆虫におけるテロメラーゼ遺伝子およびトリボリウムにおける新たなテロメア配列の発見

カイコとトリボリウムのゲノム情報を調べた結果、テロメラーゼ遺伝子の断片的な配列が見つかり、その情報を元に RACE 法を行うことでテロメラーゼ遺伝子の全長を得ることに成功した。これは、節足動物のテロメラーゼ遺伝子としては初めての報告である。

カイコとトリボリウムのテロメラーゼ遺伝子の構造上の最も大きな特徴は、他の生物種のテロメラーゼ遺伝子と比べて N 末端領域が短く、GQ モチーフが存在しないことであった(図 2)。GQ モチーフは、テロメア DNA との相互作用に重要であり、この部位の欠損はテロメラーゼ活性を減少させることが知られている。トリボリウムにおいても、テロメラーゼ活性を調べたところ、その活性は微弱であった。さらに、カイコのテロメラーゼ遺伝子は転写量が低いことが確認された。以上の結果は、カイコとトリボリウムのテロメラーゼ活性が弱いことを遺伝子レベルで裏付けるものである。

次に、トリボリウムにもテロメア配列特異的 LINE が存在するか、ゲノムデータベースを探索した。その結果、SARTBm と系統的に近縁で、反復配列に挿入している LINE SARTTc が見つかった。しかし、SARTTc は、TTAGG ではなく、TCAGG 反復配列に挿入していた。昆虫で報告されているテロメア反復配列はこれまで TTAGG のみであるが、甲虫類では TTAGG が検出されていない種も報告されている。そこで、サザンハイブリダイゼーションにより解析を行ったところ、TCAGG はトリボリウムのテロメア配列であることが判明した(図 3)。TTAGG テロメア反復配列は甲殻類など昆虫以外の節足動物からも検出されており、昆虫のテロメア配列の祖先型は TTAGG と考えられる。このことから、トリボリウムは進化の過程でテロメア反復配列が TTAGG から TCAGG へ変化したことが考えられた。

2. カイコテロメア配列特異的 LINE の転移における 3' UTR の必須領域の解析

前述のように、カイコではテロメア反復配列特異的な LINE が大量に存在しており、テロメアの維持に関わっている可能性が考えられている。LINE は幅広い真核生物のゲノムに存在する転移因子である。転移因子は、ゲノム中に複数のコピーが存在するが、全長ではなく一部のみが存在する場合もある。今回、カイコのゲ

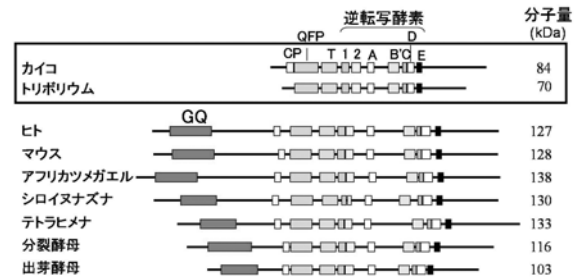


図 2 テロメラーゼ遺伝子の構造

四角で示した GQ、CP、QFP はテロメラーゼ遺伝子で保存されているモチーフ。

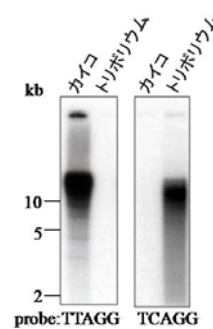


図 3 トリボリウムゲノムにおける TCAGG 反復配列の検出

サザンハイブリダイゼーション法によりカイコとトリボリウムのゲノムにおける TCAGG 反復配列と TTAGG 反復配列の有無を調べた。HindIII 処理したゲノム DNA に、それぞれのプローブをハイブリダイズさせた。テロメアは高分子量に検出される。

ノム中の

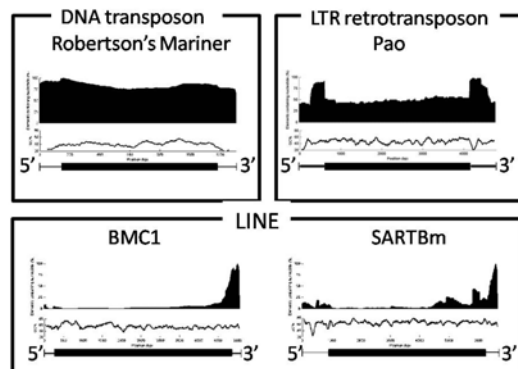


図 4 カイコゲノム中の転移因子のコピー数分布

各転移因子の典型的なコピー数分布のグラフ。横軸は転移因子の領域(グラフの下の黒い四角は ORF の領域)、縦軸はゲノム中の頻度を表す。BMC1 はランダムに転移するカイコの LINE。LINE のコピーは 3' 側(3' UTR)が保存されている。

ノム情報を用いて、それぞれの転移因子について、どの部分がゲノム中にどのくらい存在するかを解析した(図 4)。その結果、DNA トランスポゾンや LTR 型レトロトランスポゾンとは異なり、カイコテロメア配列特異的 LINE SARTBm を含む LINE は、コピー数の分布が 3' 末端に偏っていることが判明した(図 4)。

SARTBm の 3' 側の配列がゲノム中で保存されていたため、一つの可能性として、3' 側の配列が転移に重要な役割を担っていることが考えられた。これを明らかにするために、まず SARTBm 3' UTR の様々な部分欠失変異体を発現するバキュロウイルスを複製し、カイコと同じ鱗翅目昆虫であるヨトウガの培養細胞 Sf9 において転移実験を行った。転移はすべて、SARTBm の ORF2 の 3' 側にあるプライマーと、テロメア反復配列に設計したプライマーによる PCR により検出した。その結果、3' UTR の 73nt から 295nt の領域を欠失すると、SARTBm は全く転移しなくなった(図 5AB)。一方、この領域を含む限りは転移を示すバンドが観察された。そこで、RNase footprinting 法により 3' UTR の転移に必要な領域の高次構造を調べたところ、ステムループ構造が存在することが判明した(図 5C)。

次に、EGFP の下流に SARTBm 3' UTR の配列を持つ融合遺伝子(図 5D、EGFP-3' UTR)が、3' UTR を欠く SARTBm Δ3' UTR(単体では転移できない)により相補されるかどうかを解析した。その結果、EGFP-3' UTR は単独では転移不能であるが、SARTBm タンパク質の供給を受けることにより転移することが判明した(図 5E)。以上の結果から、SARTBm のタンパク質が 3' UTR をもとに自身の mRNA を認識して転移していることが示唆され、その際にはステムループ構造が関与している可能性が考えられた。

3. 異なるテロメア配列に転移するカイコとトリボリウムのテロメア配列特異的LINEの比較解析

1 章において、トリボリウムではテロメア反復配列が TTAGG から TCAGG へ変化していること、トリボリウムにもテロメア配列特異的 LINE SARTTc が存在することを発見した。SARTTc が TCAGG に、SARTBm が TTAGG に転移しやすいかを調べるために、2 章で SARTBm の転移実験に用いた Sf9 細胞に、カイコ、トリボリウムそれぞれのテロメア配列を持つプラスミド TTAGG₂₅-pBSK, TCAGG₂₉-pBSK をトランスフェクションにより導入して、SARTTc と SARTBm の転移の配列特異性を比較した(図 6A)。その結果、SARTTc は TCAGG に、SARTBm は TTAGG に特異性を持つという結果となった(図 6BC,1-2)。次に標的特異性を担うドメインを探索するため、ORF1 と ORF2 の交換実験を行った。しかし転移を検出することは出来ず、ORF1 と ORF2 の間の認識は、SARTBm と SARTTc の間では成立しないことが考えられた。そこで、次に DNA を切断するエンドヌクレアーゼ(EN)ドメインの交換実験を行った。EN の交換実験は、EN ドメインを欠損した変異体を作成し、SARTTc または SARTBm 由来の EN と共に発現させて転移実験を行った。その結果、EN の交換により標的特異性が逆転したことから、SARTBm と SARTTc の標的特異性の違いには EN ドメインが強く関与していると考えられた(図

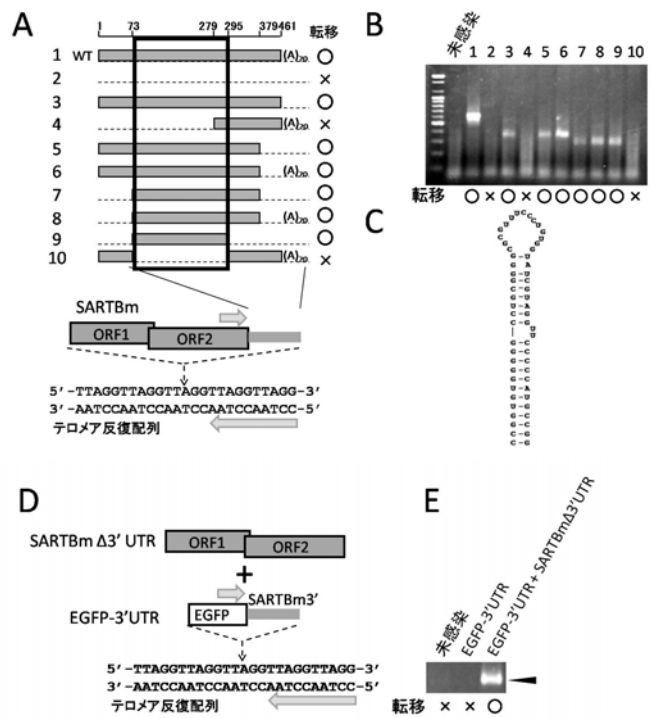


図 5 SARTBmのタンパク質は自身のmRNAの3' UTRを認識して転移する A: SARTBm 3' UTRに部分欠失を入れた変異体のコンストラクトと、その転移実験の模式図。黒枠は転移に必要な 3' UTR の領域を示す。矢印は転移検出に用いたプライマー。B: Aのコンストラクトの転移検出PCRの結果。C: RNase footprinting法により確認された 3' UTRの転移に必要な領域の中に存在するステムループ構造。D: EGFP-3' UTRの転移実験に用いたコンストラクトと、その転移実験の模式図。EGFP-3' UTR: EGFPの下流にSARTBmの 3' UTRを融合したコンストラクト。E: EGFP-3' UTRの転移検出PCRの結果。EGFP-3' UTRは、SARTBm Δ3' UTRと共発現させると転移した。

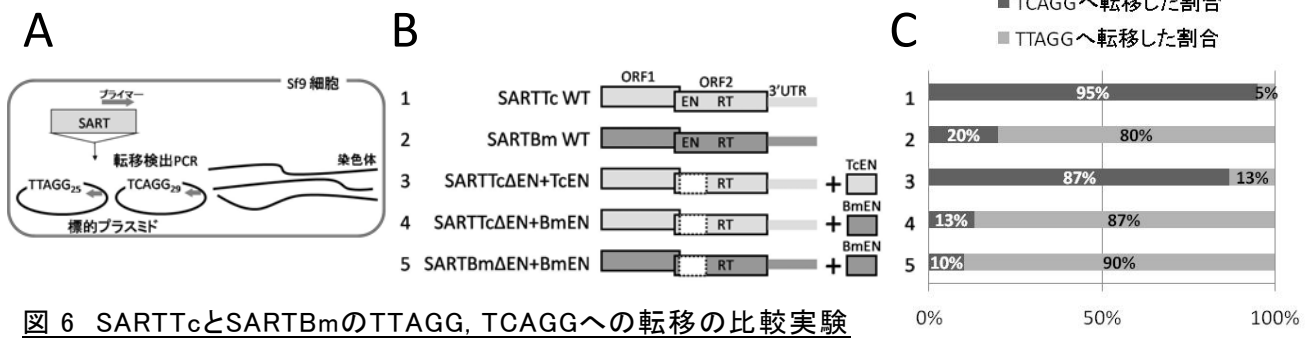


図 6 SARTTcとSARTBmのTTAGG, TCAGGへの転移の比較実験

A: TTAGG, TCAGG への転移検出系。標的配列を持つプラスミド TTAGG₂₅-pBSK, TCAGG₂₉-pBSK を Sf9 細胞に導入し、SARTTc、SARTBm をバキエロウイルスに組み込んで感染させ、プラスミドへの転移を PCR により検出した。PCR には、SART 側のプライマーと、両方のプラスミドに共通するプライマーを用いた。B: SARTBm, SARTTc のコンストラクトの模式図。EN: エンドヌクレアーゼドメイン、RT: 逆転写酵素ドメイン。SARTTc Δ EN, SARTBm Δ EN は EN ドメインが欠損して転移できない変異体。TcEN, BmEN: SARTTc 又は SARTBm の EN ドメインのみのコンストラクト。C: 標的プラスミドを 2 種類同時に細胞へ導入した際に、TTAGG, TCAGG へ転移していた SARTTc、SARTBm のクローンの数の割合のグラフ。

6BC,3-5)。

さらに、SARTTc において、転移に必要な 3' UTR の領域を決定したところ、1nt から 180nt の部分が必要であった。また、SARTTc は SARTBm の 3' UTR を認識して転移させることはできなかったが、興味深いことに、SARTBm のタンパク質は SARTTc 3' UTR も認識して転移させた。高次構造予測では、SARTTc の 3' UTR の転移に必要な領域にもステムループが存在したことから、SARTTc の蛋白質にとっても、ステムループ構造が mRNA の認識に関わっている可能性が考えられた。

結論

今回、カイコとトリボリウムから昆虫でははじめてテロメラーゼ遺伝子を同定することに成功した。どちらの場合も、他の真核生物でテロメア伸長に重要な GQ モチーフが欠損しており、さらに発現量も低いことが示唆され、代わりにテロメア配列特異的 LINE が存在していた。これらの結果は、昆虫のテロメラーゼ遺伝子の機能の低下がテロメア配列特異的 LINE の出現と関連している可能性を示唆する(図 7)。

さらに、今回、甲虫類のトリボリウムではテロメア反復配列自体が TCAGG に変化していた事を発見し、テロメア配列特異的 LINE も TCAGG に転移しやすいように対応していることが確認された。カイコとトリボリウムの SART の比較から、配列特異性には EN が関与していることが示唆された。また、SARTBm と SARTTc の両方において 3' UTR が転移には必須であり、RNA の高次構造の解析からステムループ構造が自身の mRNA の認識に関わっている可能性が考えられた。本研究のこれらの結果は、昆虫のテロメア構造の多様性と維持のメカニズムに関して遺伝子レベルで新たな知見を加えるものである。

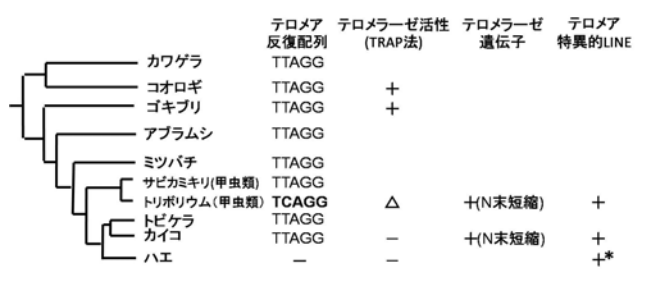


図 7 昆虫のテロメア構造のまとめ

昆虫の系統関係とテロメア配列、テロメラーゼ活性、テロメラーゼ遺伝子、テロメア特異的 LINE の関係。*ハエのテロメア特異的 LINE はテロメア反復配列ではなく、染色体末端の構造を認識して転移する。