

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770004

研究課題名（和文） 転移因子 LINE の転移・増幅における宿主タンパク質の機能

研究課題名（英文） The role of host factors in LINE retrotransposition

研究代表者

梶川 正樹 (Kajikawa Masaki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・講師

研究者番号：90361766

研究成果の概要（和文）：

転移因子 LINE は、ほぼすべての真核生物のゲノム DNA 中に存在し、自身の RNA を逆転写反応することで増幅する。LINE の転移増幅には LINE のコードするタンパク質が必須だが、それ以外に宿主のコードするタンパク質が関与すると考えられている。しかし、LINE 転移における宿主タンパク質の関与およびその機能は解明されていない。私は、LINE 転移中間体に複数の宿主タンパク質が含まれることを明らかにし、これらの宿主タンパク質が、LINE 転移に関与する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Transposable elements, including LINEs, are major components of eukaryotic genomes. They mobilize and amplify their own copies via the reverse transcription of their own RNA. This mobilization mechanism is called retrotransposition, and it requires proteins encoded by transposable elements. However, retrotransposition is not completed by the proteins only, and host encoded proteins are most likely required for retrotransposition. This study found that a retrotransposition intermediate of LINEs contains a large amount of host encoded proteins, which probably participate in retrotransposition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・再編・維持・転移因子

## 1. 研究開始当初の背景

LINE は真核生物の出現間もない頃から現在まで、真核生物のゲノム DNA 中に存在してきた。LINE は自身配列の mRNA を逆転写反応でコピーし、そのコピーを宿主ゲノムの別の位置に挿入することで転移・増幅する。すなわち LINE の転移・増幅は、宿主生物ゲノムに挿入変異をもたらす。加えて LINE の転移・増幅は、ゲノム DNA の重複や欠失、遺伝子の発現量変化など、宿主ゲノムに様々な変化をもたらす。これらのゲノム変化は、宿主生物の生存にとってしばしば有害である。事実、

LINE 転移による遺伝子破壊が遺伝病やがんを引き起こした事例が多数報告されている。しかし、LINE 配列は有害な変異を引き起こすにも関わらず、少なくとも 1.5 億年前から現在まで、ヒト（祖先）のゲノム DNA 中で絶えず転移・増幅を繰り返してきた (Nature 409:860-921, 2001)。その結果、90 万にも及ぶコピー数を獲得し、ヒトゲノムの 20% もの領域を構成するにいたった。転移活性を持つ LINE 配列が、これ程の長期間宿主生物のゲノム DNA 中に存在するという事実は、LINE が単なる有害因子ではないことを強く示唆する。

事実、LINE の引き起こす DNA 変化が真核生物ゲノムの多様度を増加させ、ゲノム進化の原動力となってきたことが様々な研究で示されている (Cell 135:23-35, 2008 for review)。その一例として、LINE は、ヒトゲノム中のレトロ偽遺伝子 (~8,000 コピー存在) を生み出したことが明らかにされており (Nat. Genet. 24:363-367, 2000)、このレトロ偽遺伝子の一部は機能タンパク質をコードする新規遺伝子に進化している (Nat. Genet. 36:872-876, 2004)。また近年の研究から、LINE が進化レベルのみならず、生物個体においても様々な影響 (機能) を持つことが示唆されている。その一例として、マウスの神経細胞分化の過程で、LINE 転移が誘発されるとの報告がなされている (Nature 435:903-910, 2005)。この報告では、LINE 転移がマウスの神経細胞の遺伝情報を変化させ、この遺伝情報変化が細胞分化の方向性を定める、というデータが示されている。つまりこの報告は、LINE 転移が生物個体の発生に直接かつ重要な役割を担う可能性を示す。

以上のように LINE は、宿主ゲノムの構成要素であるとともに、その転移・増幅が、遺伝性疾患、ゲノム進化、個体発生といった様々な側面で宿主生物に大きな影響を及ぼす。しかし、LINE の転移・増幅が宿主生物に大きな影響を及ぼすにも関わらず、その転移・増幅の分子メカニズム解明は進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、LINE の転移・増幅機構の完全理解を最終目的とし、LINE の転移・増幅に関与する宿主タンパク質の同定およびその機能解明を目指す。以下に、LINE の転移・増幅機構研究の現状と本研究計画の概要を示す。

LINE は、内部にタンパク質 (LINE タンパク質) をコードしている。LINE の転移・増幅機構に関する研究は、この LINE タンパク質の機能解明に主眼が置かれてきた。その結果、LINE タンパク質がエンドヌクレアーゼ (EN) 活性と逆転写酵素 (RT) 活性を持ち、LINE 転移に必須のタンパク質であることが示されている。これまでの研究報告に基づく LINE の転移・増幅機構モデルを図 1 に示す。LINE 転移は、自身配列の転写からはじまる。次に LINE タンパク質が翻訳され、この LINE タンパク質と LINE RNA が複合体 (=LINE 転移中間体) を形成する。この転移中間体は、宿主ゲノム DNA 上の LINE 挿入位置に移動し、そこで LINE タンパク質 (EN) がゲノム DNA の

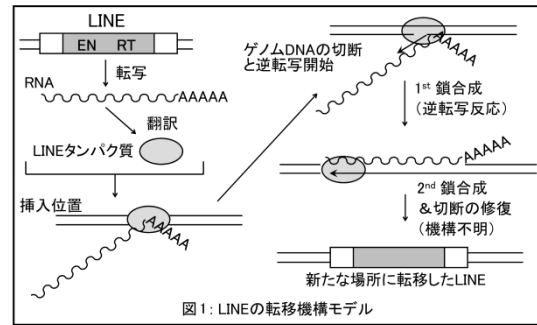


図 1: LINE の転移機構モデル

切断を行う。次に、この切断位置から LINE タンパク質 (RT) が LINE RNA の逆転写反応を開始する (1st 鎖合成)。その後、2nd 鎖合成と切断配列の修復が起こり、LINE 転移が完了すると考えられている。しかし、この 2nd 鎖合成と切断配列の修復がどのように行われるのか明らかにされていない (申請者は先行研究で本反応に関与する宿主タンパク質を同定した; 下記参照)。以上のように、LINE 転移における LINE タンパク質の役割は解明されている。しかし LINE 転移は、LINE タンパク質の酵素活性のみでは完了しない。そのため、宿主のコードするタンパク質 (宿主タンパク質) が LINE 転移に必須であると考えられている。加えて宿主タンパク質は、LINE 転移の促進や抑制といった調節にも重要な役割を持つと考えられている。しかし、LINE 転移に関わる宿主タンパク質の研究はこれまでほとんどなされておらず、どのような宿主タンパク質が LINE 転移に関与するのか、宿主タンパク質が LINE 転移でどのような役割を担うのか、明らかにされていない。

申請者は、科研費 [若手 B (平成 18-19 年度)、若手 B (平成 21-22 年度)] の助成を受け、LINE 転移に関与する宿主タンパク質の機能解明を目的に研究を行ってきた。まず、宿主タンパク質の関与が予測されていた LINE 転移時の DNA 切断修復に着目し、この DNA 切断修復に関与する宿主タンパク質群を明らかにした (Gene 395:116-124, 2007; PLoS Genet. 5:e1000461, 2009)。その後、LINE 転移に関与する未知の宿主タンパク質の単離・同定を目指し、LINE 転移中間体の解析を開始した。その結果、LINE 転移中間体が、分子量 40MDa を超える巨大複合体であることを見出した (リボソームの約 10 倍; 研究計画の欄参照)。この発見は、LINE 転移中間体が多数の宿主タンパク質を含むことを示唆する。本研究は、この LINE 転移中間体に含まれる宿主タンパク質の同定、およびその転移における機能解明を目指す。

### 3. 研究の方法

先行研究で申請者は、FLAG-HA タグ付き LINE タンパク質を発現するヒト LINE およびゼブラフィッシュ LINE を作製した。作製後、これらのタグ付き LINE が HeLa 細胞内で転移活性を保持していることを確認した。これらタグ付き LINE を HeLa 細胞内で強制発現させ、この細胞から粗抽出液を調製し、Superose 6 ゲル濾過カラムで分離後、タグに対する抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、タグ付き LINE タンパク質は、ゲル濾過カラムの排除限界位置（排除限界 40MDa）に溶出されることが示された。LINE タンパク質が可溶画分に存在することは確認済みである。したがって、タグ付き LINE タンパク質を含む転移中間体は、分子量 40MDa を超える可溶性の巨大複合体であることが示された（ホ乳類リボソームのおよそ 10 倍）。LINE RNA 1 分子（～6kbp）がおよそ 2MDa、LINE タンパク質 1 分子がおよそ 100KDa であることから、LINE 転移中間体には多数の宿主タンパク質が結合していると推測される。

(1)：[LINE 転移中間体に結合する宿主タンパク質の単離・同定]

先行研究で作製したタグ付き LINE には、2 種類のタグ (FLAG と HA) が付加されている。まず、タグ付き LINE を HeLa 細胞内で強制発現させ、続いて LINE 転移中間体を抗 FLAG 抗体-アガロースを用いてアフィニティ精製した。通常、抗タグ抗体に結合しないタンパク質を 1 段階のアフィニティ精製で完全に排除することはできない。そこで、転移中間体に含まれない宿主タンパク質が相当量残存している場合、抗 HA 抗体-アガロースを用いて 2 段階目のアフィニティ精製を行った。上記の方法で LINE 転移中間体を精製後、1 次元、および、2 次元 SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動により各宿主タンパク質を分離後、それぞれの宿主タンパク質をゲルから切り出し、ゲル内トリプシン処理後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析装置で質量分析を行った。この質量分析データを用いてペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法によるデータベース検索を行い、各タンパク質を同定した。

(2)：[同定した宿主タンパク質と LINE タンパク質あるいは LINE RNA との結合確認]

同定した宿主タンパク質が真に LINE タンパク質あるいは LINE RNA と結合できるか検証した。LINE タンパク質との結合は、酵母 two hybrid 法、または、細胞内免疫沈降法を用いて検証した。

(3)：[細胞内 LINE 転移検出系を用いた宿主タンパク質解析]

LINE タンパク質あるいは LINE RNA との結合が確認できた宿主タンパク質について、LINE 転移における機能解析を行った。申請者らは先行研究で、ヒト HeLa 細胞 (Cell 111:433-444 2002) およびニワトリ DT40 細胞 (Gene 395:116-124 2007)での LINE 転移検出系を構築している。これらの LINE 転移検出系を用いて、以下①～②の解析を行った。

- ① [強制発現解析]：同定した宿主タンパク質を HeLa 細胞内で強制発現させ、強制発現による LINE の転移頻度変化を測定した。強制発現により LINE の転移頻度が上昇した場合、宿主タンパク質は LINE 転移を促進する機能を持つことが示唆され、一方、転移頻度が低下した場合、LINE 転移を抑制する機能を持つことが示唆された。
- ② [発現抑制解析]：各宿主タンパク質の発現を RNAi 法で抑制し、発現抑制による LINE の転移頻度変化を測定した。抑制により LINE 転移頻度が上昇した場合、宿主タンパク質は LINE 転移を抑制する機能を持つことが示唆され、一方、転移頻度が低下した場合、LINE 転移を促進する機能を持つことが示唆された。

### 4. 研究成果

FLAG タグを付加したヒト転移因子 (L1) とゼブラフィッシュ転移因子 (Zfl2-1) 転移因子を HeLa 培養細胞で発現させ、それぞれの転移因子の転移中間体 (転移因子タンパク質 RNA 複合体) を精製した。その後、SDS-PAGE 電気泳動で、この中間体に含まれるタンパク質を分離し、この中間体に宿主タンパク質が含まれていることを確認した。これらの宿主タンパク質を質量分析法で同定した結果、複数の RNA 結合タンパク質が同定できた。これらのタンパク質は転移因子 RNA を介して、転移中間体に含まれると考えられる (複数の heterogeneous nuclear ribonucleic protein (hnRNP) が多量に含まれていた)。これらのタンパク質が転移因子の RNA と結合することで、転移因子の RNA が宿主細胞内で分解から保護されているのかもしれない。上記研究と並行して、転移中間体の形成に必要な転移因子タンパク質のドメインを決定した。この結果、上記で同定できた宿主タンパク質は、転移因子タンパク質と直接結合しているのではなく、RNA を介して結合していることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Kajikawa M, Yamaguchi K, Okada N. (2012). A new mechanism to ensure integration during LINE retrotransposition: A suggestion from analyses of the 5' extra nucleotides. *Gene* 505: 345-351. 10.1016/j.gene.2012.02.047 査読有

(2) Kajikawa M, Sugano T, Sakurai R, Okada N. (2012). Low dependency of retrotransposition on the ORF1 protein of the zebrafish LINE, ZfL2-1. *Gene* 499: 41-47. 10.1016/j.gene.2012.02.048 査読有

(3) Nakamura M, Okada N, Kajikawa M. (2011). Self-interaction, nucleic acid

binding, and nucleic acid chaperone activities are unexpectedly retained in the unique ORF1p of zebrafish LINE. *Mol. Cell. Biol.* 32: 458-469. 10.1128/MCB.06162-11 査読有

[学会発表] (計 1 件)

(1) Masaki Kajikawa. The zebrafish LINE, ZfL2-1, has a potential to obtain a novel coding sequence in its ORF1p coding region. *Mobile DNA in Mammalian Genomes*. August 10, 2011. Snowmass Village, Colorado, USA.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 正樹 (Kajikawa Masaki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
講師

研究者番号 : 90361766