

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370001

研究課題名(和文) LINEの機能的ユニットの構築と移行の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the formation and transfer of functional unit of LINE

研究代表者

藤原 晴彦 (Fujiwara, Haruhiko)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40183933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：LINE(別名non-LTR型レトロトランスポゾン)はほとんどの真核細胞に存在し、最も活動的な転移因子にも関わらず、その特有な転移過程の多くは解明されていない。本研究では、ヒトL1のLINEのタンパク質ORF1pとORF2pの翻訳制御機構を解析した。さらに、ORF1p、ORF2p複合体が細胞内でどのように形成され、核内の核小体に移行するかを、rDNA特異的LINE・R1、R2、R7などを用いて解明した。さらに、どのようにして標的DNAと相互作用をして標的を切断するのか、また切断された箇所から自らのmRNAを結合させ、正確な場所から逆転写させるかを、R7を用いて解明した。

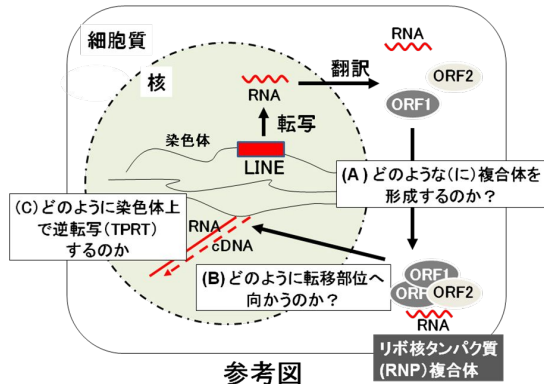
研究成果の概要(英文)：Non-LTR retrotransposon, so called Long Interspersed Nuclear Elements (LINE), is moved actively in most eukaryotic cells, but many processes involved in its transposition is largely unknown. In this study, we analyzed the regulation mechanisms of translation of open reading frame 1 protein (ORF1p) and open reading frame 2 protein (ORF2p) using human L1 element. In addition, we here revealed how ORF1p and ORF2p form the functional ribonucleoprotein (RNP) complex, and moves into the nucleoli, using rDNA specific LINE (R elements), R1, R2 and R7. Furthermore, we have clarified molecular mechanisms underlying how the LINE unit interacts and digests the target sequence correctly, and how the LINE mRNA binds to the target site, and reverse transcribe occurs from the correct site, using the R7 element.

研究分野：分子生物学

キーワード：レトロトランスポゾン 転移機構 LINE 核移行 リボヌクレオタンパク質 核小体 rDNA テロメア

1. 研究開始当初の背景

LINE (別名 non-LTR 型レトロトランスポゾン) はほとんどの真核細胞に存在し、最も活動的な転移因子にも関わらず、核内で標的配列を切断して逆転写する (Target Primed Reverse Transcription, TPRT と呼ぶ) 他の転移因子には見られない特有な転移様式をとることも一因となり、その転移メカニズムの全貌は解明されていない。大半の LINE には通常 2 個の ORF がコードされ、LINE の mRNA が転写・翻訳された後に、細胞質で ORF1, ORF2 タンパク質 (ORF1p, ORF2p) と mRNA がリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成する。この RNP 複合体が核内へ移行し、ORF2 中のエンドヌクレアーゼドメイン (EN) と逆転写酵素ドメイン (RT) が標的 DNA 上で TPRT を実行する。現在、LINE の転移に関しては、どのような (に) LINE の RNP 複合体が形成されるのか、RNP はどのようにして核内を移行して標的 DNA へアクセスするのか、RNP はどのようにして TPRT を実行するのかの 3 点が大きな謎として残されていた (下図参照)。



2. 研究の目的

LINE の mRNA は転写・翻訳されると、コードした ORF1p, ORF2p とリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成し、核内の標的サイトへ移行し、標的 DNA 上で逆転写される。LINE の RNP の形成、核内移行、標的との相互作用の詳細はいずれも不明である。一方、我々はこれまでに染色体上の特定の標的配列へ転移する標的的特異的 LINE を複数同定し、*in vivo* と *in vitro* の転移アッセイ系を構築した。そこで、この解析系を用いて、LINE・RNP の形成過程、核内移行、標的 DNA との相互作用に関わる LINE 内部の機能的な構造を解明し、LINE の転移機構の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト L1 の RNP 形成過程：
ヒト細胞内で転移する LINE・L1 において RNP 複合体の ORF1, ORF2 タンパク質がどのように制御されているのかを、想定される制御領域に変異を入れたコンストラクトを作成した後に、細胞に形質転換してタンパク質量を測定するとともに、薬剤選択を利用して転移効率を算定した。

(2) LINE の 5'UTR リボザイムの機能：
28SrDNA 特異的 LINE・R20I の 5'UTR 内部にあるリボザイムの機能を調べるために、活性部位に変異を入れたコンストラクトを作成し、リボソームからの共転写がおこらなかった場合にどのような影響が見られるかを、ゼブラフィッシュ胚を用いて解析した。

(3) 標的的特異的 LINE・R7 の転移機構：
18SrDNA 特異的 LINE・R7 が標的的特異的に転移するメカニズムを調べるために、昆虫細胞 sf9 細胞でのバキュロウイルスによる *in vivo* 転移システムを用いて、3'末端の polyA の機能、標的配列近傍に変異を入れた場合の転移への影響を解析した。

(4) 細胞内での LINE ユニットの挙動：
rDNA 特異的 LINE (R 因子) が細胞内でどのように挙動して標的部である核小体にアクセスするかを調べるために、R1, R7, R2 などの各タンパク質をタグで標識し、sf9 細胞での動態を免疫組織化学により解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト L1 の RNP 形成過程：
L1 の ORF1p と ORF2p の間にある Intergenic Region (IG) が ORF2p の翻訳を抑制する一方で、ORF2p の翻訳に必要な領域も IG に含まれていることが判明した。また、LINE の 2 個の ORF は通常オーバーラップしていることが多いが、L1 では 2 個の ORF は分離して存在するため、Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) の対象となることが予想された。しかし、解析の結果 L1 は NMD の影響を受けず、NMD を回避する仕組みを持っている可能性が示唆された。

(2) LINE の 5'UTR リボザイムの機能：
R20I の転移機構を調べる過程で、5'UTR 内部にあるリボザイム活性が R20I の上流 28b で 28SrRNA からの共転写産物を切断することが確認された。このリボザイム活性を失わせることで R20I の転移活性が低下し、このとき切断されない上流の 28SrRNA 配列が長くなるほど転移活性の低下が顕著になることが示された。転移活性が低下した原因は、RNA の安定性や翻訳効率の低下によるものではなく、LINE の RNP 形成が適切に行われないことによる可能性が示唆された。このことは 5'UTR が適切な長さであることが RNP の形成に重要であることを示したはじめての報告である。

(3) 標的的特異的 LINE・R7 の転移機構：
18SrDNA に特異的に転移する R7 は Anopheles 蚊から同定された。R7 は 28SrDNA 特異的 LINE の R1、テロメア特異的 LINE の SART1 に近縁な R1 クレードに属する因子であるが、その転移機構について詳細はこれまで示されていなかった。R1 クレード因子間で、

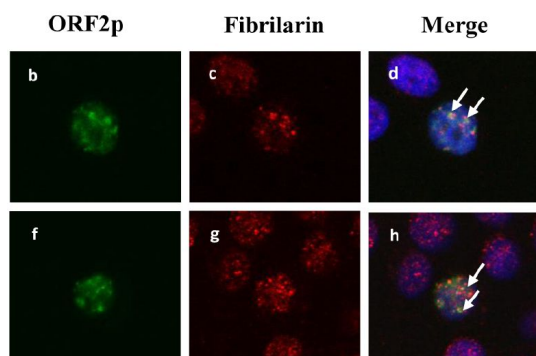
どのように標的配列が変遷したのか、そのメカニズムを探るために、各種変異コンストラクトを作成し、Sf9 細胞での転移効率や転移の正確性を解析した。

R7の標的サイト付近の塩基配列はSf9細胞と本来の宿主である *Anopheles* では3塩基ことなるが、前者には正確に転移しないことが判明した。詳細な解析の結果、R7が転移サイトに正確に転移するためには、標的とする部位の15塩基のTSD(Target Site Duplication)が *Anopheles* タイプでなければならないことが判明した。このことは、*Anopheles* 中のR7が進化的に転移効率を最適化する戦略をとってきたことを示唆する。

一方、R7の下流にあるpolyAの長さをゲノム中のR7の平均値よりも短くすると逆転写が正確に起こらないが、長くすると逆転写が正確に起こるようになった。この結果は、正確な逆転写が起こるには、R7mRNAの3'末端のpolyAの長さがある程度長いことが必要であることを示す。他のR1クレード因子の28SrDNA特異的R1にはpolyAが存在しないことから、同じクレードの因子でも転移機構を多様化させている可能性が示された。

(4)細胞内でのLINEユニットの挙動：

R7とR1のRNPのSf9細胞内での動態を調べたところ、いずれにおいてもORF1pは主に細胞質に存在するのに対し、ORF2pは一部のシグナルが核内にドット状に局在していた。一方、ORF1pとORF2pの両者を共発現させるといずれの因子においても核の辺縁部に共局在のシグナルが観察された。さらにORF2pのシグナルを核小体マーカーのFibrilarinの位置と比較すると両者は一部共局在することが示された(下図参照:Nichuguti et al (2015) *Mol. Cell. Biol.*, in press を一部改変。上段がR7、下段がR1。矢印部分にORF2pとFibrilarinが共局在しているシグナルが見られる)。



以上の結果は、R1やR7においては、ORF2pが核内への移行を主導していることを示唆する。

一方、28SrDNA特異的に転移するR2BmのORFpについても同様に核小体での局在が観察された。これらの結果はrDNAに特異的に転移する因子(R因子)では細胞内での移行

過程に共通性が見られ、標的であるrDNAが存在する核小体に一旦アクセスし、そこでそれぞれの因子の標的部位を認識、切断、転移を起こす可能性が示唆される。

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15件)

Nichuguti, N., Hayase, M. and Fujiwara, H.: Both exact target site sequence and long poly(A) tail are required for precise insertion of the 18S rDNA-specific non-long terminal repeat retrotransposon R7Ag. *Mol. Cell. Biol.* in press. (2016) 査読有

Fujiwara, H.: Site-specific non-LTR retrotransposons. *Microbiology Spectrum* 3(2). (2015) doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0001-2014. 査読有

Yoda S., Yamaguchi J., Mita K., Yamamoto K., Banno Y., Ando T., Daimon T. and Fujiwara H.: The transcription factor apontic-like controls diverse coloration pattern in caterpillars. *Nat. Commun.* 5, 4936. (2014) doi: 10.1038/ncomms5936. 査読有

Yamaguchi, J. Yamamoto, K. Mita, K. Bannno, Y., Ando, T. and Fujiwara, H.: Periodic Wnt expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. *Nat. Commun.* 4, e1857 (2013) doi: 10.1038/ncomms2778. 査読有

Ando, T. and Fujiwara, H.: Electroporation mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development*, 140, 454-458 (2013) doi: 10.1242/dev.085241. 査読有

(学会発表)(計45件)

ナリス(発表者)、渡邊裕之、石塚明、藤原晴彦：標的特異性を持つLINEの細胞内局在を担うメカニズムの解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、横浜国際会議場(神奈川県横浜市)

Ishizuka, A. (発表者)、Kudo, M. and Fujiwara, H.: Translational regulation and retrotransposition of human retrotransposon LINE1、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、横浜国際会議場(神奈川県横浜市)

芝典江(発表者)、石塚明、黒木あづさ、藤原晴彦：レトロトランスポゾンR20Iに存在するリボザイム配列の機能解明、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25-27日、横浜国際会議場(神奈川県横浜

市)

安藤俊哉(発表者)、藤原晴彦: *In vivo* Electroporationと体細胞 transgenesis を利用した昆虫での簡便な遺伝子導入法、新学術領域「複合適応形質の遺伝子基盤」平成24年度公開シンポジウム、2012年9月26日、東京大学農学部弥生講堂(東京都文京区)

Fujiwara, H. et al.: Retrotransposition mechanisms and application of sequence-specific non-LTR retrotransposon R2OI in vertebrate. Fujihara seminar 2012, A new horizon of retroposon research, 2012年8月2日, 京都大学(京都府京都市)

Narisu(発表者), Suzuki, K., Futahasi, O. M., Matsumoto, T. and Fujiwara, H.: Molecular mechanism of ribonucleoprotein (RNP) complex formation of sequence specific non-LTR retrotransposon. Fujihara seminar 2012, A new horizon of retroposon research, 2012年8月2日, 京都大学(京都府京都市)

〔図書〕(計7件)

Fujiwara, H.: Site-specific non-LTR retrotransposons. Chapter 50 in “Mobile DNA III” eds by Craig, N. et al., pp.1147-1163. (2015) doi: 10.1128/9781555819217. ASM Press.

Fujiwara, H.: Accumulation of Telomeric-Repeat-Specific Retrotransposons in Subtelomere of *Bombyx mori* and *Tribolium castaneum*. Chapter 13 in “Subtelomeres” eds. by Louis, E.J. and Becker, M.M. pp227-241 (2014) Springer.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.idensystem.k.u-tokyo.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 晴彦 (FUJIWARA, Haruhiko)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 40183933