

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18471

研究課題名(和文) ヒト転移因子LINE-1のゲノム伝播機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of human LINE-1 retrotransposition

研究代表者

三好 知一郎 (Miyoshi, Tomoichiro)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60378841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの真核生物にはレトロトランスポゾンとよばれるゲノム上のある場所から別の場所へと転移する因子が存在し、これらはときにがんなどの疾患の変異原として作用することが分かっているが、その転移機構は依然として不明である。本研究ではこの中でも現生人類で自律的に転移するLINE-1レトロトランスポゾンの転移機構解明に主眼をあて研究を行った。その過程で、1) DNA損傷を認識しこれを修復する多くの因子がLINE-1と物理的に相互作用すること、2) その中でもPARP1、PARP2という因子が転移に重要な働きをしていることが分かり、それらが関与する新たなDNA修復機構のモデルを提唱するに至った。

研究成果の概要(英文)：Retrotransposons, mobile genetic elements, mobilize to other genomic loci. It can act as a mutagen inducing several diseases including cancer. However, it remains to be solved how these elements have spread out into the genome for a long evolutionary time scale. This study focused on the mechanisms of retrotransposition of LINE-1, which is actively and currently retrotransposed in the human genome. It has been so far demonstrated that diverse DNA repair factors form a complex with LINE-1 and that PARP1 and PARP2 among the interactors especially play a vital role in LINE-1 retrotransposition. These data also suggest a new model in which these DNA repair factors fix DNA breaks induced by LINE-1 by recruiting another DNA repair protein during the retrotransposition cycle.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ヒトゲノム 転移因子 LINE-1 DNA修復

1. 研究開始当初の背景

LINE-1 はヒトゲノムの約 17% を占める転移因子で、少なくとも新生児 20 人に 1 人の割合で新規の転移を引き起こし、さらに 250 分の 1 の確率で何らかの疾患を引き起こす変異を伴うと考えられている。このように LINE-1 は現生人類における多様なゲノムバリエーションを生み出す原動力となる一方で、破滅的な遺伝情報の破壊も引き起こす。

LINE-1 は ORF1 と ORF2 と呼ばれる 2 つのタンパク質をコードしており、ORF1 は RNA 結合能および核酸シャペロン活性を有するが、その転移における役割はよく分かっていない。ORF2 は転移に必須な 2 つの触媒活性-エンドヌクレアーゼと逆転写酵素-を持つ。転写された LINE-1 RNA から ORF1 と ORF2 が翻訳され、直ちに自身の RNA に結合し Ribonucleoprotein Particle (RNP) を形成する。核内に移行した LINE-1 RNP は、ORF2 のエンドヌクレアーゼ活性によってゲノム上にニックを導入し、逆転写酵素活性により、切断 DNA 端から自身の RNA と相補的な DNA を合成し、ゲノムに侵入すると考えられている。このゲノム侵入における初期反応は Target site-Primed Reverse Transcription (TPRT) と呼ばれる (Feng et al., *Cell*, 1996; Luan et al., *Cell*, 1993; Cost et al., *EMBO J*, 2002)。しかし、DNA を切断した後の分子機構に関しては、宿主 DNA 修復因子群を利用すると予想されるが、その作用機序は殆ど分かっていない。例えば、挿入部位に現れる一本鎖 DNA の安定化、合成された DNA 端の保護、LINE-1 配列挿入時の DNA 再結合といった役割は、LINE-1 にコードされていないため、宿主因子を利用する以外に方法が無い (図 1)。

2. 研究の目的

進化的に保存された逆転写酵素の代表例として染色体末端テロメア DNA の伸長を行うテロメラーゼがあるが、申請者はこれまでに、分裂酵母を用いてテロメラーゼの制御機構 (Miyoshi et al., *Science*, 2008)、および DNA 組換えを誘導する DNA ヌクレアーゼ複合体の機能解明 (Miyoshi et al., *Mol. Cell*, 2012) に関して成果を上げてきた。テロメラーゼやレトロトランスポゾンやグループ II イントロンを祖先とし、そこから分岐したのではないかと考えられている。前者の役割や制御機構はよく分かっているものの、後者のゲノムでの役割や伝播機構の研究は非常に遅れている。その理由の 1 つが LINE-1 の転移をモニターするアッセイ系が 1996 年に開発されて以降、遺伝学的研究を中心に行われてきたが、生化学的な解析が立ち遅れていることに起因する。そこでこれまでの手法と背景を生かし、将来的に LINE-1 が引き起こす多様な疾患発症の原理および分化等の細胞機能との関わりを明らかにすることを見据え、まずその基礎的知見として、LINE-1 のゲノム伝播機構を明らかにする。特に LINE-1 と

相互作用する宿主タンパク質群を質量分析によって網羅的に同定し、詳細な転移機構を明らかにすることで、転移を人為的に制御するシステムの開発へとつながり、疾患の発症率低下や病状の緩和措置の考案に貢献できると期待される。

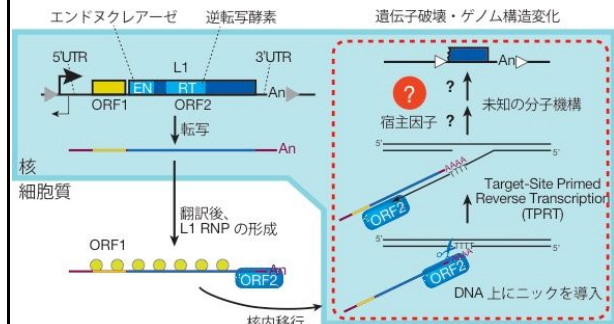


図2 LINE-1 の転移モデル 触媒サブユニットである ORF2 はゲノム上にニックを導入した後、逆転写反応を開始する(点線)。このプロセスは TPRT とよばれるが、LINE-1 のゲノム挿入の完了には宿主因子の関与が予想される。

3. 研究の方法

A. LINE-1 転移における PARP 1 及び PARP2 の制御機構の解明

PARP (Poly (ADP-Ribosyl) Polymerase) は名の由来の通り、DNA 損傷に反応して活性化された後、ポリ ADP リボースを自己および標的タンパク質に付加し、ポリ ADP リボース結合ドメインを有する種々の DNA 修復因子を損傷部位に集積させる (Kalisch et al., *Trends in Biochem Sci*, 2012 など)。既に PARP 阻害剤あるいは shRNA による PARP1 および PARP2 のノックダウン細胞を用いたところ、LINE-1 の転移頻度が顕著に低下することを見出していた。そこで、これらのノックダウン細胞を用いて PARP1/2 の LINE-1 転移における役割と分子機構について解析した。

ポリ ADP リボシル化は、DNA 修復因子のリクルートのみならず、その修飾を受けたタンパク質の活性を変化させることも知られている。申請者はこれまでに、ORF2 が直接ポリ ADP リボシル化されることを見出した。そこでこの翻訳後修飾の分子機構について試験内実験と細胞を用いた解析を行った。

B. LINE-1 転移を制御する新規因子のスクリーニングとその機能解明

ORF2 複合体の解析結果を踏まえ、LINE-1 の転移に関与する因子を網羅的に探索することにした。ORF2 複合体の中には、機能未知の因子も含まれるので、siRNA を用いて ORF2 複合体の各因子のノックダウンを作成し、LINE-1 の転移アッセイ (図 2) と組み合わせることで、転移に関わる重要なファクターの

選定を行った。

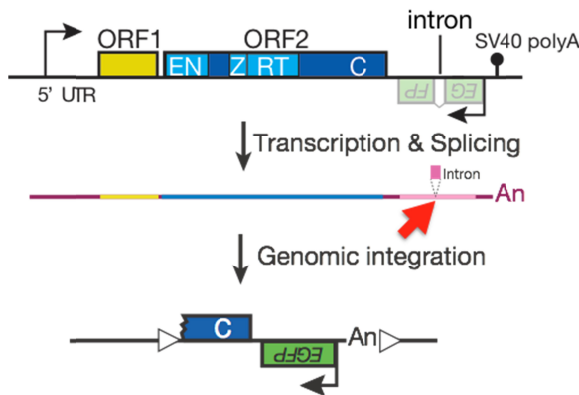


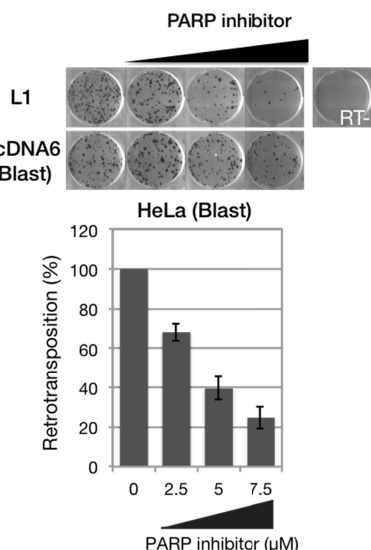
図2 LINE-1 retrotransposition assay

マーカーカセットを LINE-1 転写方向と逆向きに 3' UTR に挿入したコンストラクト。このカセットはイントロンによって分断されており、LINE-1 の転写が起こると初めて除去される。LINE-1 がゲノム内に転移した後、マーカー遺伝子の発現が検出される。

4. 研究成果

A. LINE-1 転移における PARP 1 及び PARP2 の制御機構の解明

LINE-1 がゲノム上を転移する分子機構を探る第一段階として、ゲノム DNA を切断し、かつ逆転写活性によって自身の RNA を cDNA に変換することができる ORF2、すなわち LINE-1 の触媒サブユニットと相互作用する核内タンパク質に着目し、その複合体解析をすすめた。その結果、多様な DNA 修復タンパク質が検出された。これはおそらく LINE-1 が単一ではなく複数の DNA 修復因子を利用して伝播することを示唆し、予想より複雑な分子機構で転移することをうかがわせた。転移の初期反応において DNA 一本鎖上にニックが導入されることから、LINE-1 の転移機構の全貌を明らかにする最初の手がかりとして、質量分析によって同定されたタンパク質のう



ち、特に一図3 PARP 阻害剤存在下での LINE-1 転移頻度

HeLa 細胞を図2のコンストラクト(ただしここではブラストサイジン耐性遺伝子をマーカーとして用いる)を利用して LINE-1 の転移頻度を測定した。このとき PARP 阻害剤を添加することで、その効果を検証した。

本鎖 DNA 損傷修復因子 PARP1 および PARP2 による LINE-1 の転移制御メカニズムに焦点を当て、研究を開始した。実際これまでに、PARP 活性を阻害することで LINE-1 の転移頻度が減少することを見出した(図3)

質量分析によって得られたタンパク質、特にここでは PARP1 と PARP2 が ORF2 と相互作用するか否かに加え、LINE-1 が作り出すもう一つのタンパク質 ORF1 とも相互作用するかを免疫沈降法とウェスタンブロットによって検証した。ORF1 は RNA 結合活性を有し、かつ LINE-1 の転移に必須であることが分かっているがその機能は不明である。その結果、PARP1 および PARP2 は ORF2 と相互作用するものの ORF1 との相互作用は見られなかった。このことは LINE-1 が2つの独立したサブコンプレックスを形成、すなわち ORF1 と ORF2 が形成する複合体は異なることを示唆する。上述のように ORF2 は LINE-1 のゲノム挿入を担う触媒酵素であることから、これが DNA 修復因子群と相互作用することは理解できるが、ORF1 複合体と異なることは予想外の結果であり、LINE-1 転移における ORF1 の役割は依然として不明のままである。この問題は今後の重要な課題であろう。

次に、PARP1 と PARP2 が単一の経路で LINE-1 転移に作用するのか、あるいは独立した経路であるのかを調べるために、各々単独のノックダウン細胞を作製するとともに、両者を同時にノックダウンした細胞も確立し、LINE-1 の転移頻度を測定した。その結果、各々単独では約半分程度まで減少した転移頻度が、ダブルノックダウン細胞ではさらに減少することを見出した(図4)。このことから、部分的には機能的な重複があると考えられている PARP1 と PARP2 だが、LINE-1 の転移においては各々異なる作用機序が存在することが示唆された。

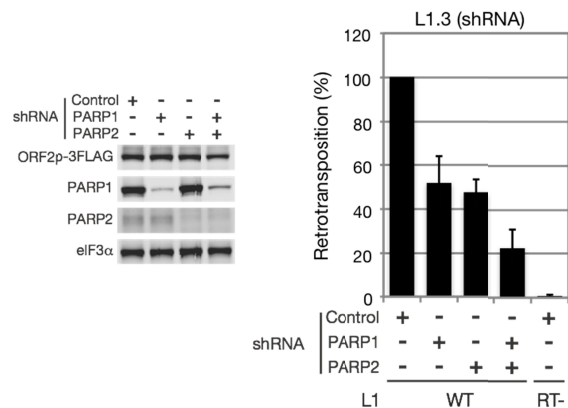


図4 PARP のノックダウンによりLINE-1 転移頻度の低下が観察された

PARP ファミリー遺伝子を shRNA によってノックダウン操作を行い、図2のコンストラクトを用いてLINE-1 転移頻度を測定した。

PARP1 および PARP2 は、DNA 損傷にตอบสนองして活性化され、ポリ ADP リボースを自己および標的タンパク質に付加し、ポリ ADP リボース結合ドメインを持つ他の DNA 損傷修復因子を損傷部位に集積させることで DNA 損傷修復を促進する。最初に ORF2 がポリ ADP リボシル化されるか否かを検証した。ORF2 を発現させた培養細胞から細胞抽出液を回収後、ポリ ADP リボシル化タンパク質のみを精製し、ここに ORF2 が含まれるか否かをウェスタンブロットにより調べた結果、ORF2 がポリ ADP リボシル化されていることを見出した。これは PARP 阻害剤で処理した細胞では全く見られなかったことから、PARP 活性に全く依存していることもわかった。次に PARP1 あるいは PARP2 のノックダウン細胞で同様の実験を行ったところ、ORF2 のポリ ADP リボシル化は PARP1 ノックダウン細胞でのみ顕著に低下していた。試験管内の反応系を用いて、リコンビナント PARP1 および PARP2 が ORF2 を直接 ADP リボシル化も検証したところ、両者ともに ORF2 を ADP リボシル化するが、特に PARP1 にその強い活性があることが分かった。このことから主に PARP1 が ORF2 の修飾を担うこと示唆された。今後は、この翻訳後修飾が ORF2 の活性に与える影響についてさらに解析を行う予定である。

次に、PARP 活性によって ORF2 複合体に呼び込まれる因子の探索を行った。その結果、一本鎖 DNA 結合タンパク質に結合する RPA が、PARP 阻害剤処理を施した場合のみ、特異的に ORF2 との相互作用が減弱した。そこで PARP1 あるいは PARP2 のノックダウン細胞における ORF2 と RPA の相互作用を調べたところ、PARP2 ノックダウン細胞でのみ、上記相互作用の減弱が観察された。すなわち PARP2 が ORF2 によって切断された DNA を認識して活性化しポリ ADP リボシル化を自身に付与することで RPA が呼び込まれるのではないかと予想された。そこで ORF2 が作り出す DNA 損傷（ニック）が本当に PARP2 を活性化するのかを *in vitro* 系で調べたところ、ORF2 が切断するコンセンサス配列上にニックを持った二本鎖 DNA が特異的に PARP2 のポリ ADP リボシル化活性を上昇させることが分かり、予想と一致した。

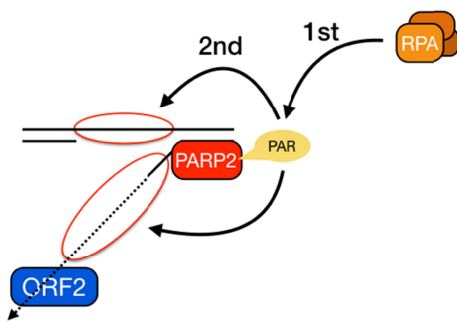
PARP2 が RPA を ORF2 複合体に呼び込むことが分かったが、PARP2 同様、RPA が LINE-1 の転移に関与するか否かは不明であったので、この可能性について調べた。RPA は DNA 複製や修復時に露出する一本鎖 DNA に結合しこれを安定化させ、不用意な分解や組換えから防ぐ役割を持つ。このため RPA の恒常的なノッ

クダウンは致死性であるため、siRNA を用いた一過的なノックダウン条件下で LINE-1 転移を測定した。その結果、LINE-1 転移が顕著に低下することが分かった。このことから、一本鎖 DNA を RPA が保護することで、おそらく転移の中間体（cDNA の合成時）を安定化させ、LINE-1 転移を促進しているのではないかと考えられた。

今回我々が同定した LINE-1 と相互作用する宿主因子群、特に PARP1、PARP2 は DNA の一本鎖損傷（ニック）を検知し、これを修復する因子として真核生物で広く保存された因子である。また近年、乳がんなど二本鎖 DNA 損傷修復経路に異常をきたす細胞において PARP 阻害剤を用いると高い合成致死効果が認められ、注目されている。この中でも比較的機能解析が進む PARP1 ですらその役割は未だ不明な点が多く、加えて PARP2 の役割などは DNA 損傷部位に呼び込まれる以外に広く受け入れられた知見は少ない。

本研究では PARP1 と PARP2 が LINE-1 の ORF2 と相互作用すること、また主に PARP1 が ORF2 の ADP リボシル化を、PARP2 が一本鎖結合タンパク質である RPA を呼び込むことが分かった。前者の機能はまだ不明であるが、ADP リボシル化の効果として、1) 標的因子の核酸結合能を変化、2) 酵素活性を変化、3) ポリ ADP リボシル化修飾を認識する別の修復因子のリクルート、などが提唱されているので、これらをもとにさらに研究を進めていきたい。一方で、PARP2 は ORF2 が作り出した損傷部位に RPA をリクルートさせることが分かったが、これは通常の DNA 修復を考慮するとさらに興味深い。すなわち、通常細胞内で起こる DNA 損傷、特に PARP2 が関与する修復経路では RPA が呼び込まれることが予想され、これにより一本鎖 DNA の保護機能が発揮されると予想される。反対に PARP 阻害剤で処理した細胞内では、一本鎖 DNA が不用意に分解や組換えの標的となることで異常が生じることを念頭におく必要がある。PARP 阻害剤が DNA 修復遺伝子の変異と合成致死を示すことを考え合わせると非常に興味深い。

また予備的知見ではあるものの、RPA が一本鎖 DNA 上に起こる脱アミノ化反応を抑制することを見出している。このような脱アミノ化反応が起こると、一本鎖 DNA は最終的に細胞内のエンドヌクレアーゼによって切断されることが知られている。LINE-1 の転移も一本鎖 DNA 脱アミノ化酵素を発現させると顕著に低下することが知られている。このように LINE-1 転移を抑制する分子機構は転写前、転写後、そして翻訳後にわたって広く存在する。それら乗り越えて未だ転移しつづける LINE-1 には、その転移活性を上昇させるメカニズムが存在すると予想されたが、今回発見した PARP1 および PARP2 そして、特に PARP2 が RPA を呼び込み一本鎖 DNA を保護する、というモデルはこれを支持する（図5）。



TPRT intermediate

図5 本研究から考えられるモデル

LINE-1 が作り出す DNA 損傷部位が PARP ファミリータンパク質を活性化し、これにより RPA がよびこまれ、一本鎖 DNA を保護するのではないかと考えられる

B. LINE-1 転移を制御する新規因子のスクリーニングとその機能解明

ORF2 と相互作用する因子を siRNA によるノックダウンを行い、LINE-1 転移が変化するものを探索している。これまでのところ機能のよく分かっていないユビキチンリガーゼやミ

トコンドリアの DNA 修復因子といったものが LINE-1 転移に関与するという示唆的な結果を得た。このユビキチンリガーゼは、これまでにアポトーシス制御因子や転写因子の分解に関与することが知られているが、網羅的なプロテオミクス解析において DNA 複製フォークに結合することが示唆されている。しかしそのゲノム維持機構は殆ど分かっていない。そこでユビキチン化活性が LINE-1 転移に重要なのかについてさらに検証を試みる予定である。

同定されたミトコンドリアタンパク質は、ミトコンドリアゲノムの複製に関与することが分かっているが、核ゲノム複製や修復との関連は不明である。予備的な質量分析解析から、これが種々の核内 DNA 修復因子と複合体形成することが分かった。現在さらにこれらの因子の機能解明を行っている。

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 2 件)

1. Takemata N., Oda A., Yamada T., Galipon J., Miyoshi T., Suzuki Y., Sugano S., Hoffman C.S., Hirota K., Ohta K. "Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription" *Nucleic Acids Res.*, 44: 5174-5189 (2016)

2. Kopera H.C., Flasch D.A., Nakamura M.,

Miyoshi T., Doucet A.J., Moran J.V. "LEAP: LINE-1 Element Amplification Protocol" *Methods Mol. Biol.*, 1400: 339-355 (2016)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Miyoshi T. and Moran J.V. "Identification and Characterization of Host Proteins that Interact with the Human LINE-1 ORF2-encoded Protein" 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜 (2016)

2. 三好 知一郎 "ヒトレトロトランスポソンの転移機構" 第 35 回染色体ワークショップ、第 16 回核ダイナミクス研究会、愛知 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 知一郎 (Miyoshi Tomoichiro)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：60378841

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()