

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18207001
 研究課題名（和文）部位特異的LINEの転移機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of retrotransposition mechanisms of target-specific LINE

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

研究成果の概要（和文）：

ヒトなどの高等な生物の染色体で最もメジャーな転移因子の一種 LINE（非 LTR 型レトロトランスポゾン）の転移機構を、特定の位置にのみ転移する因子（部位特異的 LINE）を用いて詳細に調べた。その結果、「LINE の蛋白質の翻訳がどのように制御されるのか」、「LINE の蛋白質と mRNA の複合体がどのように組み立てられるのか」、「その複合体がどのようにして核内の標的に近づくのか」という LINE に特有な未知の機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：

We have studied molecular mechanisms of retrotransposition of non-LTR retrotransposon, so called LINE, which is the most major elements in chromosomes of higher organisms such as human, using target specific LINEs. In this project, we have succeeded in clarifying the mechanisms of how the translation of LINE proteins is regulated, how ribonucleoprotein (RNP) complex of proteins and mRNA of LINEs are constructed, and how the complex approach to the target sequences in chromosomes, which are novel mechanisms peculiar to LINE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
年度			
総計	34,600,000	10,380,000	44,980,000

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：レトロトランスポゾン、標的特異的 LINE、転移機構、

1. 研究開始当初の背景

各種生物のゲノムプロジェクトの進行に従い、ゲノムは従来考えられていたよりもはるかにダイナミックで、多数の転移因子によって侵食されている事実が明らかとなりつ

つある。例えば、ヒトゲノムの約 20%をしめる L1 は、非 LTR 型レトロトランスポゾン（以下 LINE と呼ぶ）と呼ばれる転移因子に属するが、ある種の筋ジストロフィー症やガンの原因となる一方、進化的にはトランスダクシ

オンやエクソンシャフリングによって新たな遺伝子創出の原動力となったと考えられる。LINE はほぼすべての真核細胞に存在し、さらに転移因子の中でも最も活動的であるにも関わらず、完全長因子の同定が困難であったことなどから、その転移メカニズムはよくわかっていない。特にレトロウイルスに似た LTR 型レトロトランスポゾンが細胞質で逆転写するのに対し、LINE は核内の標的 DNA 上で逆転写 (Target Primed Reverse Transcription, TPRT と呼ぶ) を起こすという際立った違いがあり、LINE に特有な TPRT のメカニズム解明に向けて世界中の研究者がしのぎを削っている。我々は、ヒトの L1 とほぼ同じ構造を持ちながら、昆虫のテロメア反復配列にだけ転移する LINE (SART 及び TRAS) を発見し、さらに細胞内でこれらの因子をテロメアに転移させ効率的に検出する系を完成させた。この *in vivo* 転移系を用いて、これまで解析の困難だった LINE の転移に必要な領域をほぼ枚挙することが可能になった。また、リボソーム DNA 特異的に転移する R1,R2 の *in vivo* 転移系の構築も確立し、4つの異なるゲノム上の標的に転移するこれらの LINE を用いて、部位特異的転移メカニズムを探ることが可能となり、LINE の転移機構の詳細に迫ることができる。

2. 研究の目的

本申請では、枚挙した機能未知の転移必須領域がどのような機能を果たしているかを完全に解明し、LINE の TPRT メカニズムの全体像を明確にすることを目指した。さらに、L1 など多くの LINE がゲノム上にランダムに転移するのに対し、ほぼ同様の構造を持つ SART や R1 がなぜ特定のゲノム配列だけに転移できるのかを解明することを研究の目的とした。これらの目的を達成するために以下のことを明らかにしようと考えた。

(1) ORF1 内部にある 4 箇所の転移必須領域の機能を解明する。

(2) ORF1C 末にある 3 個の Zn フィンガーの想定機能 (RNA 結合・核酸シャペロン機能) を解明する。

(3) 5'UTR 領域の多数の AUG 配列が翻訳開始制御に働くメカニズムを解明する。

(4) TPRT 開始時に mRNA の 3'UTR 領域と相互作用するタンパク質領域を同定する。

(5) *in vitro* 転移システムの完成と Ribonucleoprotein (RNP) 複合体構造を解明する。

これらの構造や機能の解明は、「LINE の

翻訳、RNP 構造の形成、核移行と標的 DNA へのアクセス、TPRT の開始」という LINE 特有な未知の機構の解明につながる。

3. 研究の方法

(1) レトロトランスポゾン RNP 構造ユニットの同定:

LINE の転移ユニットがどのような複合体ユニットで成り立っているかこれまで詳細はわかっていない。そこで、バキュロウイルスに組み込んだ His タグ付き LINE を精製し、その RNP の ORF1, ORF2, mRNA などの構成比を調べて、LINE の RNP 形成過程の全体像を把握する。

(2) ORF1 内部にあるテロメア結合ドメインの解析:

テロメア特異的 SART1 の中央部に存在するテロメア移行シグナルの詳細を調べるために、領域内に変異、欠失を入れた変異 LINE を作成し、GFP と融合させたコンストラクトの細胞内での局在性を確認する。

(3) ORF1 内部にある ORF1-ORF1, ORF1-ORF2 相互作用領域の解析:

ORF1 のタンパク質相互作用 (ORF1-ORF1 と ORF1-ORF2) 領域に変異を入れた His タグ付タンパク質を精製し、相互作用の検定を行って機能ドメインを確定する。

(4) ORF1 内部にある 3x Zn フィンガーの解析:

ほぼすべての LINE の ORF1 に存在する 3 個の Zn フィンガーが mRNA と相互作用するのかを調べるために、Zn フィンガー変異コンストラクトから RNP を調製し、RNA の有無を検定する。

(5) 3'UTR mRNA と相互作用する ORF 内部領域の同定:

転移に必要な 3'UTR 領域に対して、ORF 内部のどの領域が相互作用しているかを変異体解析、ゲルシフト解析、*in vitro* 転移/TPRT 解析により同定する。

(6) 5'UTR 領域の AUG 配列が翻訳開始制御に働くメカニズム:

LINE は宿主への影響を少なくするため翻訳を抑制しているが、5'UTR に多数の AUG 開始コドンが存在し翻訳に影響を与えていると予想され、SART1 の 5'UTR の AUG に変異を入れてルシフェラーゼ発現比較やノーザンハイブリダイゼーション法で、LINE の翻訳開始制御機構を解明する。

(7) 他の部位特異的 LINE の転移機構の比較:

テロメア特異的 LINE の SART1 以外の複数の部位特異的 LINE の転移システムを構築し、

個々のLINEのドメイン構造と機能を明らかにする。これらのLINEの部位特異性決定のメカニズム、さらにはヒトL1の転移機構と比較し、部位特異的転移機構の全体像を明確にする。

4. 研究成果

(1) レトロトランスポゾン RNP 構造ユニットの同定:

LINE の転移には ORF1p、ORF2p、自らの mRNA の3者が転移ユニットを構築すると推測されてきたが、ORF2p の発現が難しいなどの理由から、これまでその実体はほとんど分かっていなかった。そこで、タンパク質産生能力の高いバキュロウイルスを用いて、ORF1 (His or HA タグ付加)、ORF2 (HA タグ付加)、mRNA を細胞内で発現させ細胞内で複合体を再構成する実験を行った。His-ORF1 のみを発現し、His タグを用いて精製し密度勾配遠心法でその大きさを検定したところ、多量体を形成していることが確認できた。分子量から 7-10 量体以上の複合体を形成していると推測される。LINE では、ORF2 蛋白質、LINE・mRNA に対して ORF1 蛋白質が 7-10 個結合して RNP が形成されることが明らかとなった。

(2) ORF1 内部にあるテロメア結合ドメインの解析:

SART1 は RNP 複合体をつくることが示されたが、ORF1p は ORF2p より格段に翻訳量が多いことから複合体の表面を構成するのは ORF1p と考えられ、それが酵素活性を有する ORF2p と鋳型となる mRNA をテロメアまで誘導する可能性がある。この仮説を検証するため、ゲルシフトアッセイ法を用いて精製 SART1ORF1p とテロメア反復配列との結合実験を行った結果、SART1ORF1p は二本鎖のテロメア反復配列に強力に結合することが分かった。また、competitor として過剰に非テロメア反復配列、テロメア反復配列を加えたところ、テロメア反復配列を入れた場合のみ結合の阻害が確認された。以上の結果から、SART1 ORF1p はカイコテロメア反復配列に特異的に結合することが示された。ORF1p のテロメア反復配列結合活性は、SART1 RNP 複合体が広大なゲノム領域から転移部位であるテロメアをターゲティングするのに重要な役割を果たしていると考えられる。

さらに、HA タグを付けた ORF1-HA を作成し、HA 抗体による免疫抗体染色を行うと、ORF1p は核内でドット状の局在パターンを示した。このシグナルがテロメアと共局在した割合は 23.3 %で、SART1 の ORF1 の一部はテロメアへ積極的に移行する可能性が示唆された。

ORF1 のドット形成に関与するドメインを探索する目的で、ORF1 の欠損タンパク質を作成し、Sf9 細胞での局在を解析した結果、ORF1 の 353a. a より C 末端側を欠損した場合には、大部分の細胞において核内におけるドット状のシグナルが検出されたが、ORF1 の 318a. a より N 末端側を欠損した場合には核内におけるドットパターンが消失、全ての細胞で核内における一様のシグナルが検出された。このことから、ORF1 の核内のドット状局在に関与する領域は塩基性アミノ酸に富んだ 318-353a. a である事が強く示唆された。

(3) ORF1 内部にある ORF1-ORF1, ORF1-ORF2 相互作用領域の解析:

相互作用の検定を行って機能ドメインを同定した結果、テロメア特異的 LINE・SART1 の ORF1 タンパク質同士の多量体化には ORF1C 末の 555-567a. a. が必須であった。次に、ORF1 (His タグ) と ORF2+3' UTR を共発現させ、His タグで精製し、各タンパク質を抗タグ抗体で、SART1 RNA を RT-PCR で検出したところ、SART1 ORF1p、ORF2p、RNA は結合して Ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成していることが明らかとなった。この RNP 複合体を、dNTP 存在下でカイコテロメア反復配列を含むターゲットプラスミドと反応させると、In vitro での転移が確認された。ORF1p と ORF2p 間の相互作用には ORF1p 同士の多量体化に必須な領域を含む 285-567a. a. が必要であった。SART1 ORF1 タンパク質の結合に必須な 555-567a. a. の二次構造は、レトロウイルスのカプシド多量体化ドメインである Major Homology Region (MHR) と類似していたため、同様の機構で結合している可能性がある。

(4・5) ORF1 内部にある 3x Znフィンガー構造の解析及び 3'UTR mRNA と相互作用する ORF 内部領域の同定:

SART1 ORF1 タンパク質のどこが SART1 3' UTR の RNA を認識するのかを確かめるために、まず ORF2 の介在無しで ORF1 タンパク質が 3' UTR の RNA と結合するのかを確かめた。His タグを付加した SART1 ORF1 のタンパク質と、SART1 3' UTR を融合した GFP の RNA もしくは GFP のみの RNA を、バキュロウイルスを用いて Sf9 細胞内で共発現させ、ORF1 タンパク質を His タグにより精製し、タンパク質中の RNA を抽出して RT-PCR を行い、ORF1 タンパク質が RNA と結合しているかを確認した。その結果、ORF1 タンパク質から GFP のみの RNA は検出されなかったが、GFP と SART1 3' UTR が融合した RNA は検出され、SART1 ORF1 タンパク質は ORF2 タンパク質の介在無

しで SART1 3' UTR の RNA と結合することが解った。次に、SART1 ORF1 zinc フィンガーが 3' UTR の RNA を認識しているのかを確かめるために、zinc フィンガードメインの各モチーフに変異を入れた SART1 ORF1 タンパク質を用いた結果、zinc フィンガーとしての機能を失わせる変異を入れた SART1 ORF1 タンパク質からは SART1 3' UTR の RNA が検出されなかった。この結果から SART1 ORF1 の zinc フィンガードメインが SART1 3' UTR の RNA を認識している事が示された。

ORF1 の zinc フィンガードメインが SART1 3' UTR に実際に結合するのかを調べるために、ゲルシフトアッセイを行った。His-タグ付きの ORF1 タンパク質は 3' UTR の 73-279 の RNA に結合し、さらに His 抗体でスーパーシフトが見られたが、zinc フィンガーに変異を入れた ORF1 タンパク質では結合もスーパーシフトも見られなかった。さらに同時に His 抗体で Western blot を行うと ORF1 タンパク質はウェルに近い場所に局在し、巨大なタンパク質複合体となっていることが示された。ORF1 zinc フィンガー変異体も巨大タンパク質複合体は形成するが、その中に RNA を取り込まないのは興味深い。さらに 3' UTR の他の領域の RNA との結合を調べたところ、ORF1 の zinc フィンガードメインは 3' UTR 内のいくつかの Stem-loop 構造を認識することが示唆された。これらの結果は、LINE の RNP 形成に関しては現段階では最も詳細な構造としくみを明らかにしたもので、今後は LINE 全般に拡張できるかどうかに興味を持たれる。

(6) 5' UTR 領域の AUG 配列が翻訳開始制御に働くメカニズム：

SART1-5' UTR のどの領域が発現抑制に影響するのかを調べるため、様々な長さの 5' UTR 領域を Luciferase 遺伝子につないだプラスミドを作製し発現を解析した結果、コントロールに対して、SART1-5' UTR 全長では 0.0155% しか発現せず、強く発現が抑制された。SART1-5' UTR の 1~798bp には強い発現抑制領域が存在し、さらに上流 60bp の配列を組み込んだコンストラクトで 0.108% と強い発現抑制が見られた。この 60bp は GC 含量が 86.7% であり、RNA が強い二次構造をとると予想され、この構造が発現抑制に関わっていると可能性がある。翻訳抑制のみの影響を調べた結果、コントロールに比べ 5' UTR 全長をつないだ RNA では 0.882% しか活性がなかった。このことから SART1-5' UTR が翻訳抑制に関わっていることが明らかとなった。また、上流 60bp の配列をつないだ RNA でも

5.26% しか活性がなく、この領域には uAUG 以外の翻訳抑制領域が存在することが明らかになった。

5' UTR に uAUG が存在すると、リボソームが本来の ORF の開始コドン認識する前に uAUG を先に誤って認識し、翻訳効率が下がると考えられている。そこで SART1-5' UTR の 661~879bp の下流 5 つの uAUG を ACG に変異させたコンストラクトでは約 90 倍発現抑制が解除されたことから下流 5 つの uAUG が強く発現抑制に関わっている。一方、uAUG I~VII の下流には in-frame でストップコドンが存在しているため 5' UTR 内に短い ORF (upstream ORF) が生じる。この存在が発現抑制に関わっているのではないかと考え、レポーターと同じ frame を持つ uAUGVI・ORF のストップコドンに変異を入れたコンストラクトで発現量を調べたところ 11.5% と極めて大きな発現抑制の解除が見られた。これより 5' UTR 内の upstream ORF の翻訳が発現抑制に強く関わることを示唆された。

LINE 全般で 5' UTR には SART1 と同様な特徴が見られることから、このような発現抑制は一般的な機構である可能性が高い。また、upstream ORF や転写抑制の影響を明確に示したものは本研究がはじめてであり、LINE の転移制御機構に新たな知見を与えるものと考えられる。

(7) 他の部位特異的 LINE の転移機構の比較：

18SrDNA に特異的に転移する R7 (ハマダラカ由来) をバキュロウイルスに組み込み、Sf9 細胞に導入して標的配列を持つプラスミドへの転移を調べた結果、R7 の 3' 末端の配列を (A)₈ から (A)₂₀ に変更したところ正確に標的配列に挿入された。この結果は、R7 に近縁だが 28SrDNA に特異的に転移する R1 と比較的類似しており、これらの因子の 3' 末端構造が転移の正確性に大きな影響を及ぼしていることが示された。R1 や R7 は構造的にはヒトの L1 と比較的似ていることから、転移の際に末端構造が重要であることは、LINE 全般にとって共通した仕組みである可能性が高い。

一方、ORF が一つしかない 28SrDNA 特異的 LINE・R2 とそれに近縁な 18SrDNA 特異的な LINE の転移メカニズムを調べたところ、両者の N 末側に存在する 3 つの Zinc フィンガー構造(特に 3 番目のもの)が標的配列への結合に関与していることが、変異解析とゲルシフト解析から明らかになった。

テロメア配列特異的 LINE については、トリポリウムの TCAGG 特異的 LINE・SARTTc1 と、

カイコの TTAGG 特異的 LINE・SARTBm1 の間で、DNA 切断酵素ドメインを交換したところ、標的特異性の交換に成功した。この結果より、この 2 種の LINE の標的配列特異性の違いには DNA 切断酵素ドメインが関与していることが明らかになった。SARTTc1 と同じく TCAGG に挿入する LINE と、SARTBm1 と同じく TTAGG に挿入する LINE の間で、DNA 切断酵素ドメインの配列を比較した結果、TCAGG グループで保存されているアミノ酸、TTAGG グループで保存されているアミノ酸が存在することが判明している。これらのアミノ酸の一部は DNA 結合表面に存在し、TCAGG と TTAGG の違いを認識するために関与していることが考えられる。

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 34 件中 13 件を下記に記載)

- 1) Schumann, G. G., Elena V. Gogvadze E. V., Osanai-Futahashi, M., Kuroki, A., Münk, C., Fujiwara, H., Ivics, Z. and Buzdin, A.: Unique functions of the repetitive transcriptome. *International Review of Cell and Molecular Biology (Former International Review of Cytology)*, (2012) in press (掲載確定) 査読有
 - 2) Mitchell, M., Gillis, A., Futahashi, M., Fujiwara, H. and Skordalakes, E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17: 513-518 (2010) 査読有
 - 3) Yoshitake, K., Aoyagi, H. and Fujiwara, H. Creation of a novel telomere-cutting endonuclease based on the EN domain of telomere-specific non-LTR retrotransposon, TRAS1. *Mobile DNA*, 1, 13 (Online journal) (2010) 査読有
 - 4) 藤原晴彦 (2010) カイコ及び昆虫のテロメアの構造と進化、蚕糸・昆虫バイオテク Vol 79, 3-11 (2010) 査読無
 - 5) 長内美瑞子、藤原晴彦 (2009) 転移因子によるゲノム言語の構築と進化、実験医学増刊号「バイオデータベースとソフトウェア最前線」羊土社、1173-1175. 査読無
 - 6) *Tribolium* genome sequencing consortium (including Fujiwara, H. and Osanai, M.): The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949-955 (2008) 査読有
 - 7) Osanai-Futahashi, M., Suetsugu, Y., Mita, K. and Fujiwara, H. Genome-wide screening and characterization of transposable elements and their distribution analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 1046-1146 (2008) 査読有
 - 8) Kawashima, T., Osanai, M., Futahashi, R., Kojima, T. and Fujiwara, H. A novel target-specific gene delivery system combining baculovirus and sequence-specific LINES. *Virus Research*. 127, 49-60 (2007) 査読有
 - 9) Maita, N., Aoyagi, H., Osanai, M., Shirakawa, M. and Fujiwara, H. Characterization of the sequence specificity of the R1Bm endonuclease domain by structural and biochemical studies. *Nucleic Acids Research*, 35, 3918-3927 (2007) 査読有
 - 10) 藤原晴彦 (2007) 染色体の端を守る“動く遺伝子”、日経サイエンス、37、64-73 査読無
 - 11) Osanai, M., Kojima, K. K., Futahashi, R., Yaguchi, S. and Fujiwara, H.: Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). *Gene* 376, 281-289 (2006) 査読有
 - 12) Matsumoto, T., Hamada, M., Osanai, M. and Fujiwara, H.: Essential domains for Ribonucleoprotein complex formation required for retrotransposition of a telomere specific non-LTR retrotransposon SART1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5168-5179 (2006) 査読有
 - 13) Kojima KK. Kuma, K., Toh, H. and Fujiwara H. Identification of rDNA-specific non-LTR retrotransposons in Cnidaria. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 1984-1994 (2006) 査読有
- [学会発表] (計 52 件中 8 件を下記に記載)
- 1) Fujiwara, H. Osanai-Futahashi, M., Kuroki, A., Kawashima, T. and Yoshitake, K.: Mechanisms and applications of sequence-specific non-LTR retrotransposon identified from the insect genome. International symposium, New silk road: Silkworm genome to sustainable agriculture, Tuskuba Center for Instiutes, Tsukuba, Japan. Nov. 9-10, 2010.
 - 2) Fujiwara, H. Mechanisms and applications of sequence-specificity of target-specific non-LTR retrtrsnposons. International Symposium on Development of Food and Medical Materials using Agro-materials, Seoul, Korea, August 31, 2010.
 - 3) Fujiwara, H. and Futahashi, M. Co-evolution of telomerase and telomere-specific LINES in higher insects. The 2nd ASM meeting “Mobile DNA”. Fairmont

Queen Elizabeth Hotel, Montreal, Canada,
April 24-28, 2010.

- 4) 藤原晴彦、二橋美瑞子：昆虫のテロメアに共存するレトロトランスポゾンの機能と進化、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸ポートアイランド
- 5) 藤原晴彦、黒木あづさ、二橋美瑞子、谷田部春香、川島朋子：LINE を利用した配列特異的遺伝子導入システムの開発、第 81 回日本遺伝学会大会ワークショップ、2009 年 9 月 16 日、松本、信州大学
- 6) Fujiwara, H., Yatabe, H., Kawashima, T. Kojima, K. and Tamefusa, J. Sequence-specific retrotransposition of non-LTR element R2OI in human cells and fishes. Sixth Annual International Conference on Transposition and Animal Biotechnology, Berlin, Germany, June 19-21, 2008.
- 7) 藤原晴彦、真板宣夫、青柳博之、松本匠、長内美瑞子：標的特異的 LINE の配列特異性を決定するエンドヌクレアーゼの構造と機能：2006 年組換え・ゲノム再編ワークショップ、2006 年 11 月 27-29 日、淡路
- 8) 藤原晴彦：テロメア進化と LINE (企画シンポジウム：反復配列の進化)、第 8 回日本進化学会、2006 年 8 月 29-31 日、東京

[図書] (計 2 件)

- 1) 藤原晴彦 (監訳)、遠藤圭子 (訳) (2010) せめぎあう遺伝子—利己的な遺伝因子の生物学 (Austin Burt & Robert Trivers 著) 645 ページ、共立出版.
- 2) 藤原晴彦 (2007) 似せてだます擬態の不思議な世界、Dojin 選書 0 2、化学同人、206 ページ

[その他]

ホームページ等

<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