

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） 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

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学

キーワード：LINE 転移因子 転移機構 部位特異性 利己的遺伝子

1. 研究計画の概要

昆虫のテロメア反復配列やリボソームDNAにだけ転移するLINE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枚挙し、部位特異的転移メカニズムを探ることが可能となった。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 (target primed reverse transcription)メカニズムの全体像を明確にすることを旨とする。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昆虫のLINE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。これらの目的を達成するために、申請期間内に（1）ORF1内部にある4箇所の転移必須領域の機能の解明（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）の解明（3）ORF1とORF2の間にある翻訳制御領域の機能ドメイン構造の詳細（4）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（5）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の同定（6）in vitro転移システムの完成とRNP構造の解明、を重点的に目指す。これらの解明は、「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」という未知のLINE特有な機構の解明につながる。

2. 研究の進捗状況

（1）ORF1内部にある4箇所の転移必須領域の機能の解明：SART1に関しては、中央領域のテロメア結合領域やN末領域の核移行シ

グナルが解明された。

（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）の解明：in vivo 転移システムとin vitro 転移システムを駆使して、SART1のZnフィンガードメインがRNAのパッケージングに機能し、さらにRNPの構築にも関与していることが示された。

（3）ORF1とORF2の間にある翻訳制御領域の機能ドメイン構造の詳細：SART1のORF1とORF2は-1フレームシフトにより翻訳が遂行されるが、バクテリアなどで使われるtranslational couplingに似た機構が使われていることが明らかとなった。

（4）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：SART1の5' UTR内部にある7つのAUGのうち少なくとも後半の4つが翻訳抑制に関与し、その中の一つはupper ORFを形成することで非常に強く翻訳を抑制することが判明した。

（5）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の同定：SART1、rDNA特異的LINEのR20Iのいずれも効率的にtrans-complementationを行うことから、L1などに比べ3' UTRとの相互作用が強いことが明らかとなった。

（6）in vitro 転移システムの完成とRNP構造の解明：Sf9細胞にバキュロウィルスを感染させて大量にSART1のRNPを精製し、in vitroで転移させるシステムを構築した。その結果、RNPの大きな構造を解析することに成功した。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の計画の半分はほぼ終了し、多くの新規成果が得られた。また、残り半分についても計画期間内に達成可能と考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

(1) ORF1 内部にある 4 箇所の転移必須領域の機能の解明: R1 などのリボソーム特異的 LINE での研究を進める。

(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) の解明: in vitro での検証を進める。

(3) ORF1 と ORF2 の間にある翻訳制御領域の機能ドメイン構造の詳細: ほぼ終了した。

(4) 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: ほぼ終了した。

(5) 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の同定: R2 などの LINE を用いた実験を進める。

(6) in vitro 転移システムの完成と RNP 構造の解明: R2 などの in vitro 転移システムを構築する。

5. 代表的な研究成果

(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 22 件)

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

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

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

Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R et al. The genome of the developmental model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949-955 (2008) 査読有

Osanai, 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

[学会発表](計 29 件)

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

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

宮下雄士、志水栄実、近藤真理子、松本匠、長内美瑞子、藤原晴彦: テロメア特異的 LINE・SART1 の 5' UTR による自己翻訳抑制、第 30 回日本分子生物学会 (第 80 回日本生化学会合同大会) 2007 年 12 月 11 日 ~ 15 日、横浜

Fujiwara, H., Yatabe, H., Tamefusa, J., Kojima, K. K., Fujimoto, H. and Kawashima, T. Ability of sequence-specific retrotransposition of medaka R2 (R201) in widespread animals from insect to human cells. *International Congress of Transposable Element 2008*. Saint-Malo, France, April 20-23, 2008.

Fujiwara, H., Yatabe, H., Kawashima, T., Kojima, K. and Tamefusa, J. Sequence-specific retrotransposition of non-LTR element R201 in human cells and fishes. *Sixth Annual International Conference on Transposition and Animal Biotechnology*, Berlin, Germany, June 19-21, 2008.

[図書](計 2 件)

園部治之、藤原晴彦 (2007) エクダイソンとエクダイソン受容体 ホルモンハンドブック 新訂 eBook 版、南江堂
藤原晴彦 (2007) 似せてだます 擬態の不思議な世界、Dojin 選書 02、化学同人、206 page

[その他]

Homepage

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