

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06180

研究課題名(和文) ヒトLINE-1レトロトランスポゾン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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトレトロトランスポゾンLINE-1は、宿主のゲノム上を移動する転移因子である。転移によるゲノム不安定化により、疾患の変異原として作用することが分かっているが、その転移機構はよくわかっていない。LINE-1の転移機構を明らかにする過程で、1) 様々な宿主DNA修復因子がLINE-1タンパク質と相互作用し転移を制御していること、2) LINE-1タンパク質がこれらの相互作用因子から翻訳後修飾を受けていること、そして3) PARP2がLINE-1の転移場所を感知するセンサータンパク質として機能することを明らかにした。これにより、LINE-1の転移を人為的に抑制する阻害剤の利用も有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LINE-1による転移は、生殖細胞、初期発生、神経前駆細胞や多くのがん細胞など、様々な場所・タイミングでおこる。疾患につながる変異につながることを除けば、LINE-1の生物学的な意味はまだ理解されていない。本研究では、宿主細胞とLINE-1との相互作用からその転移機構の一端を明らかにした。これによりLINE-1の人為的な操作を行えるだけでなく、LINE-1が宿主にどのような影響をもたらすのか、その本質に迫る研究へと発展することができるだろう。将来的には、我々のゲノムがどのように形成されてきたのかを検証し、また今後どのように変化していくのかを予測することにもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Human LINE-1 retrotransposons still continue to generate inter- or intra-genetic diversity by mobilizing their own sequences into other genomic loci termed retrotransposition. Although more than one hundred disease-causing mutations by LINE-1 retrotransposition have been reported., the mechanisms of LINE-1 retrotransposition require elucidation. In this study, we demonstrated that 1) multiple DNA repair factors interact with the LINE-1 encoded proteins, 2) LINE1 proteins are posttranslationally modified by these DNA repair factors identified, and 3) PARP2 acts as a sensor protein that detect the sites of LINE-1 retrotransposition and plays a role in LINE-1 retrotransposition. These data suggest that LINE-1 retrotransposition can be effectively suppressed by an inhibitor that modulate activities of these DNA repair factors.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム DNA損傷 レトロトランスポゾン 転移因子 LINE-1

1. 研究開始当初の背景

(1) L1 転移とゲノム変化

トランスポゾンとはゲノム上に散在する可動性の DNA 配列であり、カット&ペーストによって転移する DNA 型トランスポゾンと、RNA 中間体を経て転移するコピー&ペースト型のレトロトランスポゾンの2種が存在するが、ヒトでは、DNA トランスポゾンは既に変異により転移能を失っている。しかし、Long INterspersed Element-1 (L1) は現生人類でも転移すること、疾患を伴う遺伝子破壊を引き起こすことが発見された (Kazazian, *Nature* 1988; Miki, *Cancer Res* 1992)。また L1 の転移は遺伝子破壊をもたらすだけでなく、ゲノムの大規模欠失・転座などのゲノム構造変化を引き起こすことも明らかになった。一方で、新たなエクソンの構築や遺伝子の発現制御に関与することも分かってきており、負の側面だけでなく、生命の適応戦略にも影響する正の役割も示唆されている。

(2) 宿主因子による L1 転移制御機構 (図 1)

L1 は一つの mRNA から ORF1 と ORF2 と呼ばれる 2 つのタンパク質を作り出す独特なコーディング配列を有する。ORF1 は複合体形成に関わる RNA 結合タンパク質であり、ORF2 は転移に必要な 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 L1 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 L1 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って切断 DNA 端から自身の RNA と相補的な cDNA 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過程は Target site-Primed Reverse Transcription (TPRT) と呼ばれる。

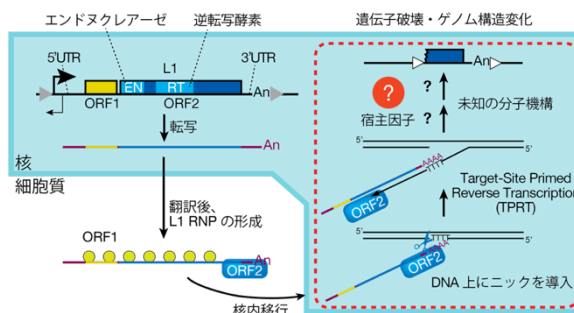


図1. L1の転移モデル 触媒サブユニットであるORF2はゲノム上にニックを導入した後、逆転写反応を開始する(点線の枠内)。このプロセスはTPRTとよばれるが、L1のゲノム挿入の完了には宿主因子の関与が予想される。

(3) 明らかとなっていない点

しかし、DNA を切断した後の分子機構に関しては、宿主 DNA 修復因子群が関与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 (図 1、点線で囲った部分)。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、L1 cDNA 挿入時の DNA 連結反応といった DNA 代謝の諸反応は、L1 のコーディングポテンシャルでは説明できず、宿主因子を利用する以外に方法が無い。ヒトゲノムの大きな割合を占め、現生人類でも転移し続ける L1 が、ゲノム構造変化に大きなインパクトを与えることは進化的・実験的にも明らかだが、どのようにゲノム上を伝播するのか、その根源的な疑問の解明は進んでいない。

2. 研究の目的

これまでに培ったタンパク質複合体技術とゲノム研究の背景を活用して、L1 RNP と相互作用する宿主タンパク質の同定とその機能解析によって転移プロセスの一部を明らかにしてきたが、全貌解明にはほど遠い。そこで本研究は特に、L1 と相互作用する DNA 修復・クロマチン制御因子の中から L1 転移に重要な因子を siRNA スクリーニングによって絞り込み、そのゲノム侵入過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PARP ファミリーによる転移制御機構の解析

これまでに、PARP ファミリーの転移における役割として下記のことを明らかにしてきた。

- ①ポリ ADP リボシル化酵素である PARP1 と PARP2 が L1 転移に重要であること
- ②PARP1 は ORF2 の ADP リボシル化を行うこと
- ③PARP2 は ADP リボシル化活性を利用して DNA タンパク質である RPA を L1 の転移部位にリクルートすること

L1 転移におけるこれらの役割をさらに詳細に明らかにするために、次のアプローチによってその分子機構を調べた。

- ①ポリ ADP リボシル化活性によってリクルートされる因子を質量分析によって探索
- ②PARP1 による ORF2 の ADP リボシル化部位の同定
- ③L1 の転移部位に結合する RPA の役割を試験管内 L1 酵素活性測定系によって解析

(2) siRNA スクリーニングを介した L1 転移制御因子の同定

L1 転移、特に TPRT 中間体の制御に深く関与するものを機能的に探索するために、エンドヌクレアーゼと逆転写酵素活性を担う ORF2 と相互作用する因子を標的として、siRNA を用いたスクリーニングを実施した。具体的には、各遺伝子に対する siRNA 処理を施した HEK293T 細胞（転移頻度が他細胞に比べ非常に高い）において、レポーター遺伝子を利用した L1 転移頻度を測定するアッセイ系を行った（図 2）。

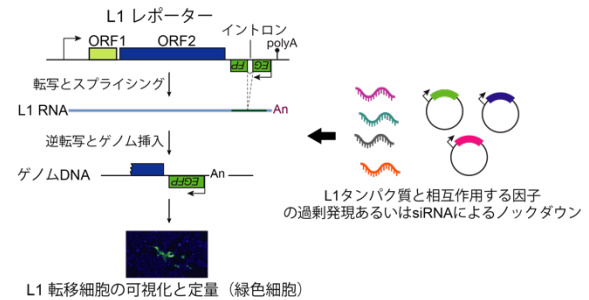


図2. L1の転移アッセイ系を利用した候補因子の絞り込み
L1の転移を可視化するために転移した細胞のみGFPが発現するレポーターを細胞に導入し、あわせてL1と相互作用する因子に対するsiRNAや過剰発現を行い、L1の転移頻度の定量化を実施。

(3) ORF2 相互作用因子による L1 制御メカニズム

解析途中ではあるものの、(2) の解析から先行して得られた候補因子を個別対象として、その転移における役割と分子機構について解析を進めた。ノックダウンにおける転移頻度の低下が最も著しい HUWE1、ミトコンドリア DNA の複製に関わる SSBP1 に着目して個別の機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) PARP ファミリーによる転移制御機構の解析

- ①ポリ ADP リボシル化活性によってリクルートされる因子を質量分析によって探索

Olaparib はポリ ADP リボシル化酵素の特異的な阻害剤であることが知られている。これを細胞培養液に添加すると、細胞内中の PARP 活性は阻害され、実際 PARP2 と RPA の相互作用が减弱することを見出している (Miyoshi, *Molecular Cell* 2019)。これを利用して HEK293T 細胞内で発現させた ORF2 複合体を Olaparib 処理の有無によって単離・精製して質量分析解析を行った。その結果、従来見逃されていた DNA ヘリケースの他に DNA リガーゼの一種が PARP 活性依存的に ORF2 と相互作用することを見出した。今後これらのノックダウン細胞の作成を通して、PARP ファミリーによる L1 転移制御の下流因子の探索を進める。

- ②PARP1 による ORF2 の ADP リボシル化部位の同定

ポリ ADP リボシル化は核酸と似た挙動を示すと考えられているが、同時に自身もつ負の電荷によって修飾を受けたタンパク質の核酸結合能が変化（低下）するとも予想されている。そこで ORF2 上に生じたポリ ADP リボシル化の役割を調べるために、まず修飾部位の特定を試みた。そのために様々な ORF2 断片を細胞内で発現させ、ポリ ADP リボシル化の有無を解析したところ、ORF2 の中央に位置する逆転写酵素ドメインが、主にポリ ADP リボシル化されていた。この逆転写酵素ドメインは PARP1 の相互作用ドメインと一致することから、PARP1 との相互作用により、迅速に結合部位周辺が修飾を受けると考えられる。これは、ドメイン全体が修飾を受けることで、逆転写酵素活性あるいは DNA 結合能が変化するのではないかと予想される。今後、

試験管内反応を用いて ORF2 の酵素活性を定量するなどが、検証すべき課題として残されている。

③L1 の転移部位に結合する RPA の役割を試験管内 L1 酵素活性測定系によって解析

L1 複合体を細胞内から精製した後、試験管内で逆転写反応を検出する LEAP アッセイが報告されている (Kulpa & Moran, *Nat. Struct & Mol Biol* 2006)。 これを利用して次の実験系を構築した。まず、精製した L1 複合体と、逆転写された一本鎖 cDNA を標的とする L1 阻害因子である A3A タンパク質、また本研究で示唆された L1 の一本鎖 cDNA 保護因子と予想される RPA の三者を試験管内で混合して逆転写反応を試みた。L1 によって合成された一本鎖 cDNA は、A3A によってシチジンの脱アミノ化が起こり、その結果シトシンがウラシルに変換されてしまう。細胞内ではこのウラシルの除去とリン酸ジエステル結合の切断によって L1 の一本鎖 cDNA がゲノムから除去され転移が阻害されると考えられている。実際試験管内でも A3A によって L1 の一本鎖 cDNA 上のシトシンがウラシルへと変換されることを確認しているが、RPA を加えることで、変換の頻度が劇的に低下することがわかった。すなわち、RPA は L1 の一本鎖 cDNA を保護し、例えば L1 を阻害する A3A のような因子の働きから転移中間体を保護するというモデルが考えられた (図 3)。

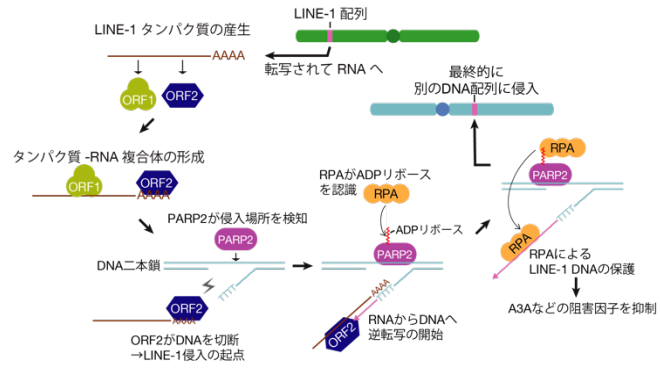


図3. L1転移因子が宿主因子を利用して転移するモデル

(2) siRNA スクリーニングを介した L1 転移制御因子の同定

多くの DNA 修復因子が ORF2 相互作用因子として同定されているが、それらの中から真に L1 転移に重要な因子を siRNA によっての絞り込む解析を実施している。現時点でわかったことは、それらのノックダウンによって L1 転移頻度が殆ど変化しない因子もあれば、機能が不明ながら転移頻度が顕著に変化するものなど、当初の予想より複雑な制御機構の上に L1 転移が成り立っていると考えられた。その中でも DNA 二本鎖切断修復に関わる NHEJ (非相同末端結合) 因子のノックダウンの表現型は興味深い。DNA 末端を保護する KU のノックダウンでは L1 転移頻度が低下するものの、同じく NHEJ に必須である XRCC4 や DNA-PKcs ノックダウン細胞では殆ど変化が見られなかった。これは染色体末端テロメアにおいて報告されている KU の NHEJ 非依存的な末端保護機能を想起するものであり、テロメア DNA を付加する酵素テロメラーゼと L1 が共通の祖先から派生した逆転写酵素であることを考慮すると、両者の DNA 合成経路には共通の分子メカニズムが働いている可能性が考えられる。L1 転移機構の全体像を明らかにするためには、今後も転移頻度が顕著に変化する因子の探索を継続すること、そしてこれらの転移制御因子に研究の重点を置き、その個別解析を進めることが重要だと考えられる。下記 (3) のようにノックダウンにおける転移頻度の低下が最も著しい HUWE1、ミトコンドリア DNA の複製に関わるがその核内機能が不明である SSBP1 を個別解析対象とし、その機序を解析中である。

(3) ORF2 相互作用因子による L1 制御メカニズム

ユビキチン E3 リガーゼである HUWE1 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、そのゲノム維持機構は殆ど分かっていない。本研究ではまず野生型とユビキチンリガーゼ活性を喪失した変異型 HUWE1 を、HUWE1 ノックダウン HEK293T 細胞で発現させ、L1 転移頻度が回復するか否かを検証した。その結果、野生型と異なり、ユビキチンリガーゼ活性を持たない変異型では転移頻度の回復が観察されなかったため、HUWE1 によるユビキチン化制御が L1 転移を支える重要な基盤となっていることが示唆された。

そこでさらに HUWE1 の基質を同定するために、SILAC 法を実施し、HUWE1 ノックダウン細胞において特異的に増加するタンパク質の探索を継続している。これまでに既知の HUWE1 の基質の他に、未同定の DNA 修復因子などが多数同定された。現在、既知の因子を含め HUWE1 の基質タンパク質の機能解析を進めている。HUWE1 の機能を調べることで、L1 転移とゲノム維持に共通するメカニズムの発見につながると期待される。

ミトコンドリア内 DNA 結合タンパク質である SSBP1 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。そこで SSBP1 複合体をプロテオミクス解析により調べたところ、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。その中でもとりわけ注目すべきは、核内 DNA 結合タンパク質と SSBP1 が共局在することを発見した点にある。これらの因子と SSBP1 の両方を機能低下させると、L1 転移頻度が顕著に低下することもわかった。一見すると SSBP1 ノックダウン細胞の表現型は、ミトコンドリアの機能低下によって何らかの異常（代謝など）が引き起こされ、これが間接的に L1 転移に影響することで説明されることも十分予測された。この可能性を検証するために、他のミトコンドリア因子のノックダウンによってミトコンドリアの機能低下を誘導させたところ、L1 転移には殆ど影響が見られなかった。このことから、SSBP1 はミトコンドリア機能維持とは独立に L1 転移、ひいては核内ゲノムの制御に関与していることが想定される。今後はミトコンドリアタンパク質によって核内ゲノムがどのような制御されるのか、L1 転移の枠を越えて一般化した原理の解明が待たれる。

【文献】

1. *[Miyoshi T.](#), Makino T., and *[Moran J.V.](#) Poly(ADP-ribose) polymerase 2 recruits replication protein A to sites of LINE-1 integration to facilitate retrotransposition. *Molecular Cell* 75: 1286-1298 (2019). *co-corresponding authors
2. [三好 知一郎](#) 「ヒトレトロトランスポゾンと宿主因子との間で繰り広げられる攻防と連携」*生化学* 92, 726-730 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三好 知一郎	4. 巻 92
2. 論文標題 ヒトレトロトランスポゾンと宿主因子との間で繰り広げられる攻防と連携	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 726-730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920726	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi T, Makino T, Moran JV.	4. 巻 75
2. 論文標題 Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Recruits Replication Protein A to Sites of LINE-1 Integration to Facilitate Retrotransposition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1286-1298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2019.07.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 三好 知一郎
2. 発表標題 ヒト転移因子LINE-1 の転移機構の解析
3. 学会等名 研究会・染色体研究の最前線2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Mechanisms of human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoichiro Miyoshi, Takeshi Makino, John V. Moran
2. 発表標題 Poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP2) recruits replication protein A to sites of LINE-1 integration to facilitate retrotransposon
3. 学会等名 Transposable Elements, CSHL Meetings & Courses Program (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ahmad Luqman Abdul Fatah, Yuzo Watanabe, Fuyuki Ishikawa, and Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 2020 NTU-KU-UT Virtual-Physical students mini-symposium on Cancer Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ahmad Luqman Abdul Fatah, Yuzo Watanabe, Fuyuki Ishikawa, and Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Interferon-stimulated genes regulates human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 Transposable Elements, CSHL Meetings & Courses Program (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaito Sugino, Takeshi Makino, Yuzo Watanabe, Fuyuki Ishikawa, John V. Moran, and Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Mitochondrial and nuclear single-stranded DNA-binding proteins facilitate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 Transposable Elements, CSHL Meetings & Courses Program (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaito Sugino, Yuzo Watanabe, Takeshi Makino, Ahmad Luqman Abdul Fatah, Fuyuki Ishikawa, an Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Mitochondrial protein, SSBP1, facilitates human L1 retrotransposition
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoichiro Miyoshi, Kaito Sugino, Takeshi Makino, Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 Identification and characterization of host factors that regulate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好 知一郎
2. 発表標題 ヒト転移因子LINE-1の転移機構の解析
3. 学会等名 染色体研究の最前線
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Makino, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 HUWE1, an E3 ubiquitin ligase, facilitates human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ahmad Luqman Abdul Fatah, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Antiviral Protein Interferon-Induced Tetratricopeptide Repeats 1-3 Increase Long Interspersed Element-1 (LINE-1) Retrotransposition
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoichiro Miyoshi, Takeshi Makino, Fuyuki Ishikawa, John V. Moran
2. 発表標題 Identification and characterization of host factors that regulate human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The Mobile DNA Conference: 25 Years of Discussion and Research, FASEB Science Research Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Makino, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 HUWE1, an E3 ubiquitin ligase, promotes LINE-1 retrotransposition in the human genome
3. 学会等名 The 17th International Student Seminar
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaito Sugino, Takeshi Makino, Yuzo Watanabe, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Mitochondrial protein SSBP1 regulates human LINE-1 retrotransposition
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ahmad Luqman Abdul Fatah, Yuzo Watanabe, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Interferon-stimulated genes regulate human LINE-1 Retrotransposition
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好 知一郎、John V. Moran
2. 発表標題 宿主DNA修復因子を介したヒトL1レトロトランスポソンの転移機構
3. 学会等名 第90回 日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Kariyazono, Masaru Ito, Tomoichiro Miyoshi, Shintaro Yamada, Takatomi Yamada, and Kunihiro Ohta
2. 発表標題 Control of meiotic recombination initiation via high-order chromosomal architecture
3. 学会等名 第90回 日本遺伝学会 奈良
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoichiro Miyoshi, Takeshi Makino, Ian R. Adams, Jose Luis Garcia-Perez, John V. Moran, Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 Human Testis Expressed 19 (TEX19) maintains genome integrity through destabilizing L1 retrotransposon
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ahmad Luqman Abdul Fatah, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 Long Interspersed Element 1 (LINE-1) ORF1 protein RNA binding ability is essential for accumulation in stress granules
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Makino, Fuyuki Ishikawa, Tomoichiro Miyoshi
2. 発表標題 HUWE1, an E3 ubiquitin ligase, promotes LINE-1 retrotransposition in human genome
3. 学会等名 The 17th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「がらくたDNA」がDNA上を移動する仕組みを解明 - 宿主因子を巧妙に利用した移動戦略 - http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190829_1.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------