

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20770085

研究課題名(和文)

配列特異的 LINE の配列認識機構の解明

研究課題名(英文)

Investigation of the DNA recognition mechanisms of sequence-specific LINE

研究代表者

真板 宣夫 (MAITA NOBUO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：00404046

研究成果の概要（和文）：LINE-EN と DNA の複合体結晶構造解析を目指して結晶化条件検討と機能解析を行った。その結果、結晶は得られなかったが、LINE-EN が二量体化することと、EN だけでは DNA との結合が弱く、EN の直後にある Myb 様ドメインが必要であることが示唆された。今後は Myb 様ドメインまでをターゲットにして結晶化及び機能解析を行う。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this project was to obtain the crystal structure of LINE-EN:DNA to reveal how LINE-EN to bind to DNA and cleave it, but it was not completed. During the optimization for crystallization, I found that LINE-EN would form a dimer in solution, and that EN alone is not enough to make the stable complex with DNA and necessary a Myb-like domain located just downstream of EN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：レトロトランスポゾン・X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

LINE の研究グループは世界に6つ、そのうち日本には2グループある。構造解析を行っているグループは我々を含めて3グループあり、残り2グループは哺乳動物でメジャーな LINE-1 に興味を持っている。LINE の研究はその発見の経緯から殆どがゲノム解析の手法によって行われており、機能解析は進んでいない。その理由として LINE の転移を試験管内で再現することが非常に困難であることと、細胞内でも元々転移は非常に稀な現象であることが挙げられる。細胞を用いた系では2004年にジョンズホプキンス大学のグ

ループが LINE の DNA 配列を最適化して、培養細胞を用いた高頻度転移系を確立している。

LINE はタンパク質の単離も困難なため、構造解析もあまり進んでいない。2008年初頭ではエンドヌクレアーゼドメイン(EN)の構造が3つ、ORF1p の C 末端(261-347)の構造が報告されているのみであった。そのうち EN 2つは我々が構造決定しており、構造解析にアドバンテージがある。

また予備的なデータであるが、Tras1-EN 二量体の間に DNA が結合した結晶が得られていたが、DNA の電子密度が極めて薄く、この条

件において DNA の占有率を上げることが課題であった。

2. 研究の目的

配列特異的LINEのENがどのようにDNAの配列を認識するかをEN:DNA複合体結晶構造解析により調べるのがこのプロジェクトの目的である。それを達成するために安定なEN-DNA複合体を作る条件を探索することが必要不可欠である。

3. 研究の方法

結晶化において安定な LINE-EN:DNA 複合体を得るため、以下の方法を用いた。

(1)既に得られている EN:DNA 結晶の条件改良

Tras1-EN:DNA の結晶が得られていたが、DNA の電子密度が非常に薄いため、解析不可能であった。これを改善するために①DNA 配列のスクリーニング②DNA とタンパク質を共有結合で連結③N 末の不確定領域を削除という方法を検討した。

(2)二量体化 EN の作製

様々な空間群の結晶が得られているが、結晶中でいつも決まった相互作用面の二量体のペアが存在している。二量体モデルだと LINE-EN の配列認識機構が非常に上手く説明できる。このことから、LINE-EN の機能単位は二量体であるという作業仮説を立て、S-S 結合を介した人工的な二量体を作製する。

二量体の場合、DNA との相互作用面積も倍になるので、より安定な EN:DNA 複合体が期待できるため、作製した二量体を用いて DNA と共結晶化を行う。

(3)二量体化 EN の活性測定

二量体化 EN が実際に切断活性の上昇が見られるかを、末端を蛍光ラベルした DNA を用いて検討した。

(4)EN-Myb 様ドメインの作製

これまでの結果から EN 単独で DNA との複合体を形成させるのは困難であると推定された。また、EN の直後に Myb 様ドメインが存在し、これが DNA との結合に関与しているというデータが得られたことから、Tras1 と R1Bm に関して EN-Myb のコンストラクトを作成する。

4. 研究成果

(1)既に得られている EN:DNA 結晶の条件改良

①DNA の結晶への取り込みの視覚化

蛍光ラベル DNA を用いて結晶化すると結晶中への DNA の取り込みがひと目で判るという論文(Cell, 132, 43-54, 2008)を基に、TAMRA でラベルした DNA を用いて Tras1-EN:DNA および R1Bm-EN:DNA の結晶化を行った。R1Bm-EN に関しては結晶が赤く染まらず、DNA が取り込まれていないことが解った。一方、Tras1-EN では結晶が赤く染まり、DNA が結晶

中に含まれることが確認できた(図1)。

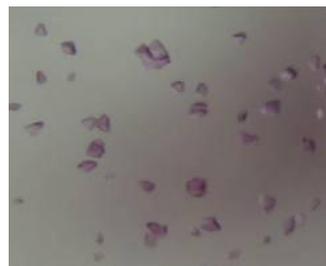


図1 Tras1-EN:DNA (TAMRA) 複合体結晶

この結晶の X 線データを収集して電子密度を計算したが、DNA の電子密度は全く見えなかった。

②Tras1-EN と DNA の連結の試み

Tras1-EN:DNA の結晶構造を基にして、T199C, E230C, D236C の 3 つの変異体を作製・精製した。同時に 3' に SH 基を付けた DNA を合成して混合し、反応させた。反応産物を還元剤の無い条件で電気泳動したが、バンド位置が変わらず、DNA と結合していなかった。架橋反応の濃度が参考文献 (Science, 282, 1669-1675, 1998) よりも薄かったため、反応効率が下がったと考えられるが、これ以上濃縮を行うと沈殿してしまったため、架橋させることは断念した。

③DNA 配列の最適化および Tras1-EN の N 末削除

Tras1-EN:DNA の結晶構造においては、DNA が収まる空間に丁度 Tras1-EN の見えていない N 末 18 残基が位置することが判った。このため、これを削った Tras1-EN (19-249) を Sumo タグを用いて作製した。Sumo タグは Senp2 を用いて余計な残基を残すことなくタグを除去することが出来る。これを使って DNA 配列をいろいろ変えたものを結晶化に用いた。

9A: 5' -CCCTAACCC-3'

9B: 5' -CAACCTAAC-3'

9C: 5' -AACCTAAC-3'

9D: 5' -CCCCTAAC-3'

9E: 5' -GTTAGGTTG-3'

ふらふらした領域を削ったためか、PEG3350 を含む多くの条件で結晶が見られた。しかしながら、Tras1-EN:DNA (9E) において、全く違う位置に薄い DNA の電子密度が見られた。このことは、この条件では特異的な結合が見られない可能性、つまり最初に得られていた LINE-EN:DNA 複合体が特異的でない可能性を示している。

(2)二量体化 EN の作製

Tras1-EN の様々な結晶系において、必ず一つの α ヘリックスが相互作用面となるペアが見られた(図2)。この α ヘリックスにはロインジッパー様の配列(L35/I42)を含むこと、二分子の活性部位間の距離が切断位置

の距離に等しいことなどから、二量体が機能単位であることが考えられた。

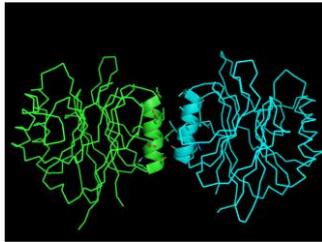


図2 結晶中で見られる Trasl-EN のペア

このことから、Trasl-ENのA38Cを作製し、ジスルフィド結合で架橋して安定な二量体を作製することを試みた。初め、弱アルカリ性条件で濃縮したのちゲル濾過で架橋を確認したが、殆ど架橋されていなかった。そこで、0.2%(w/v)APS を加えてみると架橋した Trasl-EN を得ることが出来た(図3)。

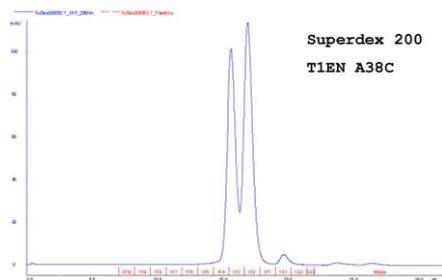


図3 二量体化 Trasl-EN(A38C)のゲル濾過
二量体は16mL, 単量体は17mLに出る

二量体化 Trasl-EN を用いて DNA との結晶化を試みた。大きな結晶が PEG3350 の条件で得られたが、これまでの空間群(P2₁)とは異なり、C2であった。この結晶はDNAが入る空間が無く、Trasl-EN 単体の結晶であったが、これまでディスオーダーにより見えていなかった領域(59-67)がきれいに見えた(図4)。また、構造から230-238のループ中心にMgが結合していることが新たに判った。

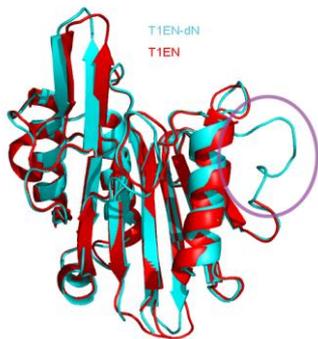


図4 Trasl-EN(19-249)A38Cの結晶構造
水色: Trasl-EN(19-249)A38C, 赤色: これまでの構造。新たに見えた領域を丸で示す。

(3) 二量体化 EN の活性測定

まず、溶液状態で二量体化しているかどうか

かクロスリンク法で調べた。Trasl-ENはCys残基が1つしかないため、R1Bm-ENで行ったところ、単量体、二量体、四量体のラダーを確認することが出来、三量体のバンドは見られなかった(図5)。この結果から、R1Bm-EN溶液中で特異的に二量体を作っている可能性が示された。

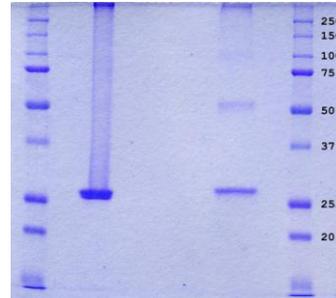


図5 R1Bm-ENのクロスリンク実験
左は反応前, 右は架橋反応させたもの

次に Trasl-EN の切断活性の測定を試みた。以前は RI ラベル化 DNA を用いていたが、現在 RI を使えないので蛍光ラベル化した DNA を用いて LAS3000 で検出する方法を試みた。Trasl-EN は DNA の Top 鎖と Bottom 鎖を時間差で切断するが、この系では Top 鎖を Cy5, Bottom 鎖を Cy3 でラベルすることで、同じ反応液中でのそれぞれの切断を確認することが出来る。

タンパク質 1μg を DNA とマグネシウム存在下で 25°C で 4 時間反応させ、反応液をエタノール沈殿で回収後、アクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後ゲルを LAS3000 でそれぞれの励起波長で検出した(図6)。その結果、単量体と二量体の切断活性の有意差は認められなかった。また、N 末を除去した Trasl-EN が Bottom 鎖の切断活性が最も高かった。

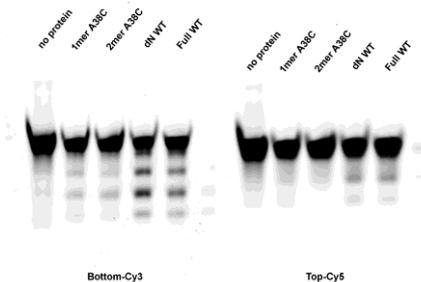


図6 Trasl-EN 二量体の切断活性

(4) EN-Myb 様ドメインの作製

異なる生物種の LINE を用いることで精製の壁を越えられることを期待して、幅広い生物種(カタユウレイボヤ, ワムシ, 蚊, ゼブラフィッシュ, ヒト, およびカイコ)の LINE のクローニングを試みた。ベクター作製の段階でトラブルが続いて時間がかかってしま

ったが、カタユウレイボヤの LINE 以外は GST タグを付けた発現ベクターを作ることが出来た。GST タグの発現ベクターを CodonPlus に入れて少量スケールで培養して IPTG を加えて発現させた。菌体を超音波破碎して上清と沈殿をウエスタンブロットで調べたところ、全てで発現は見られたものの、上清に発現しているものは Tras1 および R1 のみであった。しかしながら、量は少なく、また本来の長さより短い位置に多量のバンドが確認された。

また、LINE-EN の直後に Myb 様ドメインが存在し、EN-Myb が切断活性を顕著に上昇させるというデータが共同研究先から出された。これを受け、Tras1 および R1Bm の EN-Myb の発現コンストラクトを作製した。今後、これらのコンストラクトを用いて精製・結晶化・機能解析を行う予定である。

(5)総括

本研究では当初の目標に遠く及ばなかった。理由としては結晶中に DNA が入っていることを確認しているのにも拘らず、電子密度が見えないという状況からなかなか抜け出せなかったことにある。しかしながら、①蛍光ラベルを用いた非 RI 切断活性測定法の確立②ジスルフィド結合を効率よく行うための方法③Tras1-EN の高品質構造④LINE-EN の二量体化の可能性、などの新規知見を得ることが出来た。これは、今後の LINE 研究において役に立つものである。また、今後の課題として、このような事態に対処するために、予め生化学的裏づけを得てから構造解析を行うようにすることと、構造一本槍ではない研究スタイルで望むことが必要であると考えられる。

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6件)

1. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. (2011). Nat Struct Mol Biol, 18, 135-141.
2. Maita N, Nyirenda J, Igura M, Kamishikiryo J, Kohda D. (2010). J Biol Chem, 285, 4941-4950.
3. Fujiwara K, Maita N, Hosaka H, Ikeda OK, Nakagawa A, Taniguchi H. (2010). J Biol Chem, 285, 9971-9980.
4. Ikeda OK, Hosaka H, Maita N, Fujiwara K, Yoshizawa AC, Nakagawa A, Taniguchi H. (2010). J Biol Chem, 285, 18684-18692.
5. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y,

Maenaka K. (2008). J Virol Methods, 149, 171-174.

6. Igura M, Maita N, Kamishikiryo J, Yamada M, Obita T, Maenaka K, Kohda D. (2008). EMBO J, 27, 234-243.

[その他]

ホームページ等

<http://mms1.ier.tokushima-u.ac.jp/article/0017777.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

真板 宣夫 (MAITA NOBUO)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：00404046