

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770002

研究課題名（和文） 転移因子LINEの転移・増幅メカニズム解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mobilization mechanism of transposable elements

研究代表者

梶川 正樹 (KAJIKAWA MASAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・講師

研究者番号：90361766

研究成果の概要（和文）：

Long interspersed element (LINE) は、真核生物のゲノム DNA 中に存在する転移因子の一種である。LINE 転移には LINE のコードするタンパク質が必要でありその役割に関する研究は進んでいる。しかし、LINE 転移は LINE タンパク質のみでは完了できない。そのため、宿主のコードするタンパク質も LINE 転移に関与すると考えられているがその詳細は不明である。本研究では、宿主のコードする DNA 損傷修復系タンパク質群が LINE 転移に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Long interspersed elements (LINEs) are transposable elements that mobilize and amplify their own copies within eukaryotic genomes. LINEs mobilize via a mechanism called retrotransposition, in which transcribed LINE RNA is reverse transcribed into DNA that is then integrated into the host chromosome. Although the role of LINE-encoded proteins in retrotransposition has been revealed, the participation of host-encoded proteins has not been well investigated. Here, we present genetic evidence that the host-encoded proteins involved in repair of DNA double-strand breaks participate in LINE retrotransposition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：転移因子、レトロトランスポゾン、反復配列

1. 研究開始当初の背景

2001年、ヒトゲノムの概要配列が解読され、とりわけ我々に大きな衝撃を与えた発見は、ヒトゲノム DNA の約半分もの領域が転移因子で構成されているという事実であった (Nature 409:860-921, 2001)。なかでも、Long Interspersed

Element (LINE) と呼ばれる転移因子は、ヒトのゲノム DNA 中に約90万と膨大なコピー数で存在している (ゲノム全体の約20%を占める)。LINE 配列は、真核生物ゲノムの大きな構成要素であるとともに、真核生物のゲノム進化に深くかかわってきたことが示されている。しかし、LINE

がいかにしてこのように莫大なコピー数を獲得することができたのか、その転移・増幅機構にはいまだ数多くの謎が残されている。申請者は、この LINE の転移・増幅機構の解明を研究目的とする。

LINE は真核生物の出現間もない頃から現在まで、真核生物のゲノム DNA 中に存在してきた。LINE は自身配列の mRNA を逆転写反応でコピーし、そのコピーを宿主ゲノム DNA の別の位置に挿入することで転移・増幅する。すなわち LINE の転移・増幅は、宿主ゲノムに挿入変異をもたらす。加えて LINE の転移・増幅は、ゲノム DNA の重複や欠失、遺伝子の発現量変化など、宿主ゲノムに様々な変化をもたらす。これらのゲノム変化は、宿主生物の生存にとってしばしば有害である。事実、LINE による宿主遺伝子破壊が遺伝病やがんを引き起こした事例が多数報告されている。しかし、LINE 配列は有害変異を引き起こすにも関わらず、少なくとも 1.5 億年前から現在まで、ヒト（祖先）のゲノム DNA 中で絶えず転移・増幅を繰り返してきた（Nature 409:860-921, 2001）。その結果、90 万にも及ぶコピー数を獲得し、ヒトゲノムの 20% の領域を構成するにいたった。転移活性を持つ LINE 配列が、これ程の長期間宿主生物のゲノム DNA 中に存在するという事実は、LINE が単なる有害因子ではないことを強く示唆する。事実、LINE の引き起こす DNA 変化が真核生物ゲノムの多様度を増加させ、ゲノム進化の原動力となってきたことが様々な研究で示されている（Cell 135:23-35, 2008 for review）。その一例として、LINE は、ヒトゲノム DNA 中のレトロ偽遺伝子（～8 千コピー存在）を生み出したことが明らかにされており（Nat. Genet. 24:363-367, 2000）、このレトロ偽遺伝子の一部は機能タンパク質をコードする新規遺伝子に進化している（Nat. Genet. 36:872-876, 2004）。また近年の研究から、LINE が進化レベルのみならず、生物個体においても様々な影響（機能）を持つことが示唆されている。その一例として、マウスの神経細胞分化の過程で、LINE 転移が誘発されるとの報告がなされている（Nature 435:903-910, 2005）。この報告では、LINE 転移がマウス神経細胞の遺伝情報を変化させ、この遺伝情報変化が、神経細胞分化の方向性を定めるというデータが示されている。つまりこの報告は、LINE 転移が生物個体の発生に直接かつ重要な役割を担う可能性を示す。

2. 研究の目的

LINE は、内部にタンパク質（LINE タン

パク質）をコードしている。LINE の転移・増幅機構に関する研究は、この LINE タンパク質の機能解明に主眼が置かれてきた。その結果、LINE タンパク質がエンドヌクレアーゼ（EN）活性と逆転写酵素（RT）活性を持ち、LINE 転移に必須のタンパク質であることが示されている。これまでの研究報告に基づく LINE の転移・増幅機構モデルを図 2 に示す。LINE 転移は、自身配列の転写からはじまる。次に LINE タンパク質が翻訳され、この LINE タンパク質と LINE RNA とが複合体（=LINE 転移中間体）を形成する。この転移中間体は、宿主ゲノム DNA 上の LINE 挿入位置に移動し、そこで LINE タンパク質（EN）がゲノム DNA の切断を行う。次に、この切断位置から LINE タンパク質（RT）が LINE RNA の逆転写反応を開始する（1st 鎖合成）。その後、2nd 鎖合成と切断配列の修復が起こり、LINE 転移が完了すると考えられている。しかし、この 2nd 鎖合成と切断配列の修復がどのように行われるのか明らかにされていない（申請者は先行研究で本反応に関与する宿主タンパク質を同定した；下記参照）。以上のように、LINE 転移における LINE タンパク質の役割は解明されている。しかし LINE 転移は、LINE タンパク質の酵素活性のみでは完了しない。そのため、宿主のコードするタンパク質（宿主タンパク質）が LINE 転移に必須であると考えられている。加えて宿主タンパク質は、LINE 転移反応の促進や抑制といった調節機構にも重要な役割を持つと考えられている。しかし、LINE 転移に関わる宿主タンパク質の研究はこれまでほとんどなされておらず、どのような宿主タンパク質が LINE 転移に関与するのか、宿主タンパク質が LINE 転移でどのような役割を担うのか、明らかにされていない。

申請者は、科研費[若手 B、2005-2006 年度]の助成を受け、LINE 転移に関与する宿主タンパク質の機能解明を目的に研究を行ってきた。まず、宿主タンパク質の関与が予測されていた LINE 転移時の DNA 切断修復に着目し、この DNA 切断修復に関与する宿主タンパク質群を明らかにした（Gene 395:116-124, 2007 で報告 & 論文投稿中, 2008）。その後、LINE 転移に関与する未知の宿主タンパク質の単離・同定を目指し、LINE 転移中間体の解析を開始した。その結果、LINE 転移中間体が、分子量 40MDa を超える複合体であることを見出した（リボソームの約 10 倍；研究計画の欄参照）。この発見は、LINE 転移中間体が多数の宿主タンパク質を含むことを示唆する。本研究は、この LINE

転移中間体に含まれる宿主タンパク質の同定（2009年度）、およびその転移における機能解明（2010年度）を目指す。

3. 研究の方法

先行研究で作製したタグ付き LINE には、2種類のタグ（FLAG と HA）が付加されている。まず、タグ付き LINE を HeLa 細胞内で強制発現させる。続いて LINE 転移中間体を、抗 FLAG 抗体-アガロースを用いてアフィニティ精製する。通常、タグ付加タンパク質に結合しないタンパク質を1段階のアフィニティ精製で完全に排除することはできない。そこで、転移中間体に含まれない宿主タンパク質が相当量残存している場合、抗 HA 抗体-アガロースを用いて2段階目のアフィニティ精製を行う。この精製で不十分な場合、転移中間体が巨大複合体であることを利用し、Superose 6 ゲル濾過カラムでさらに精製する。加えて、途中段階でイオン交換カラム精製を追加することも検討する。上記の方法で LINE 転移中間体を精製後、1次元 SDS-PAGE 電気泳動で複合体に含まれる各宿主タンパク質を分離する。宿主タンパク質の種類が多く分離が不十分な場合、2次元 SDS-PAGE 電気泳動を行う。電気泳動により各宿主タンパク質を分離後、それぞれの宿主タンパク質をゲルから切り出し、ゲル内トリプシン処理後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析装置（本学分析支援センター）で質量分析を行う。

LINE タンパク質あるいは LINE RNA との結合が確認できた宿主タンパク質について、LINE 転移における機能解析を行う。申請者らは先行研究で、ヒト HeLa 細胞（Cell 111:433-444 2002）およびニワトリ DT40 細胞（Gene 395:116-124 2007）での LINE 転移検出系を構築している。これらの LINE 転移検出系を用いて、以下①～③の解析を行う。①[強制発現]：同定した宿主タンパク質を HeLa 細胞内で強制発現させ、強制発現による LINE の転移頻度変化を測定する。強制発現により LINE の転移頻度が上昇した場合、宿主タンパク質は LINE 転移を促進する機能を持つことが示唆される。一方、転移頻度が低下した場合、LINE 転移を抑制する機能を持つことが示唆される。②[発現抑制]：各宿主タンパク質の発現を RNAi 法で抑制し、発現抑制による LINE の転移頻度変化を測定する。抑制により LINE 転移頻度が上昇した場合、宿主タンパク質は LINE 転移を抑制する機能を持つことが示唆される。一方、転移頻度が低下した場

合、LINE 転移を促進する機能を持つことが示唆される。RNAi 法は一般にタンパク質発現を完全に抑制できない。そこで、②で転移頻度変化が観察されない場合、③の解析を試みる。③[遺伝子欠損]：ニワトリ DT40 細胞は、任意の遺伝子欠損細胞の作製方法が確立されている。そこで、同定したヒトタンパク質のニワトリ相同遺伝子欠損細胞を作製する。この遺伝子欠損細胞を用いて、遺伝子欠損（完全なタンパク質発現抑制）による LINE 転移頻度変化を測定する。（本方法は、タンパク質発現を完全に抑制できるが、必須タンパク質の欠損細胞株を作製できないという欠点もある）。遺伝子欠損により LINE 転移頻度が上昇した場合、宿主タンパク質は LINE 転移を抑制する機能を持つことが示唆される。一方、転移頻度が低下した場合（あるいは完全に抑制された場合）、LINE 転移を促進する機能（あるいは LINE 転移に必須の機能）を持つことが示唆される。

4. 研究成果

2009年度は、LINE 転移に関与する宿主タンパク質の同定・機能解明を目指し、LINE 転移中間体（LINE タンパク質-RNA 複合体）の精製を行った。その後、この転移中間体の解析を行い、LINE 転移中間体が分子量 40MDa を超える巨大複合体であり複数の宿主タンパク質を含むことを明らかにした。さらに、これらの転移中間体に含まれる宿主タンパク質は、LINE RNA を介して転移中間体と相互作用することを示した。その後、質量分析を行い、LINE 転移中間体と相互作用するであろう宿主タンパク質の候補を5種類得た。

2010年度はこれらの宿主タンパク質が LINE RNA と結合することで LINE 転移中間体に含まれることを明らかにした。また、これら5種類のタンパク質以外にも、LINE タンパク質と直接的に相互作用し、LINE 転移中間体に含まれる宿主タンパク質が存在することを明らかにした。現在、これらのタンパク質についても質量分析による解析を進めているところである。更には、これらの宿主タンパク質が、LINE 転移においてどのような機能を担っているのか、培養細胞を用いた転移実験において解析中である。本研究による宿主タンパク質の同定は、今後の LINE の転移メカニズムの全容解明に向けて有用な知見をもたらすものである。

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 1 件)

Suzuki J., Yamaguchi K., Kajikawa M.*,
Ichiyangi K., Adachi N., Koyama H.,
Takeda S. & Okada N.* (* corresponding
authors) Genetic evidence that the
non-homologous end-joining repair pathway
is involved in LINE retrotransposition.
PLoS Genetics 5: e1000461
(<http://www.plosgenetics.org/>) (2009) 査
読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

Kajikawa M. Yamaguchi K. & Okada N. Host
factors are involved in the 5' joining of
the LINE integration. ASM Conferences
(mobile DNA). Montreal, Canada. 4/28/2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 正樹 (KAJIKAWA MASAKI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・講
師
研究者番号：90361766

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し