

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュLINEタンパク質による自身の3' tail RNA認識機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	林由訓
Author(English)	yoshinori Hayashi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9927号, 授与年月日:2015年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:梶川 正樹,岩崎 博史,木村 宏,本郷 裕一,相澤 康則,岡田 典弘
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9927号, Conferred date:2015/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

目次

1. 第一章 序論	2
1.1 転移因子とは	2
1.2 LINE	2
1.3 LINE 転移・増幅機構	3
1.4 LINE の分類 (stringent type と relaxed type)	4
1.5 本研究の目的	5
2. 第二章 材料と方法	6
2.1 オリゴヌクレオチド	6
2.2 転移実験用プラスミドの作製	7
2.3 ゼブラフィッシュ LINE タンパク質 in vitro 合成用プラスミドの作製	8
2.4 GST 融合 LINE タンパク質と LINE stem-loop RNA との結合実験	11
2.5 逆転写酵素活性の測定	12
2.6 HeLaRC 細胞培養	13
2.7 培養細胞を用いた転移実験	13
3. 第三章 結果	15
3.1 本研究で用いたゼブラフィッシュ LINE、ZfL2-1 と ZfL2-2	15
3.2 ZfL2-1 と ZfL2-2 は自身の stem-loop 領域を特異的に認識して転移する	16
3.3 ZfL2-2 タンパク質は自身 RNA の stem-loop 構造を特異的に認識して結合する	18
3.4 ZfL2-2 タンパク質内に存在する RNA 結合領域の探索	22
3.5 ZfL2-2 タンパク質の EN-RT 領域は自身 RNA との特異的結合に必要十分である	25
3.6 ZfL2-1 タンパク質も ZfL2-2 と同様の EN-RT 領域で自身 RNA と結合する	28
3.7 TBR 内の塩基性アミノ酸は LINE RNA との結合に関与する	29
3.8 TBR の塩基性アミノ酸は ZfL2-2 の転移に必須である	35
4. 第四章 考察	36
4.1 L2 クレードに属する LINE の TBR 領域の同定	36
4.2 TBR の保存領域と非保存領域	36
4.3 relaxed type LINE の RNA 認識機構	38

1. 第一章 序論

1.1 転移因子とは

転移因子は、真核生物ゲノム中に存在し、ゲノム DNA 中のある部位から他の部位へ転移・増幅する。転移因子の割合は、生物種間で大きく異なり、ゲノムサイズが大きい生物種ほど高い傾向にある (Kidwell, 2002; Lynch, 2006; Lynch and Conery, 2003)。このため、転移因子は宿主ゲノムのサイズ増大に寄与してきたと考えられている。転移因子の転移・増幅は、宿主生物の必須遺伝子を破壊し、生物個体の生存を脅かし得る。しかし一方で、新規に転移・増幅した転移因子配列が変異を蓄積し、新たな機能を持つ配列に変化する場合もある。実際に、転移因子由来の配列が宿主生物ゲノム内で新たな機能を獲得した例が多数報告されている (Gogvadze and Buzdin, 2009)。例えば、転移因子由来の機能性配列の中には、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーあるいはインシュレーターなど遺伝子の転写調節に関与するものや、新たなスプライス部位やポリ A シグナル配列など mRNA の構造に関与するものなどが報告されている。また、転移因子配列は、新たな機能性配列を生み出すだけでなく、異なる遺伝子座に存在する転移因子間の組み換えにより、転移因子間のゲノム配列の重複や欠失を引き起こし、宿主生物ゲノムの多様性に大きな影響を及ぼしてきた。このように転移因子は、真核生物のゲノム進化、ひいては真核生物の進化に少なからず寄与してきたと考えられている。

転移因子はその転移機構の違いから、DNA が直接転移するトランスポゾンと、RNA を介して転移するレトロポゾンに大別される。レトロポゾンはその配列の特徴から、両末端に長い反復配列 (long terminal repeat、LTR) を持つ LTR 型とそれを持たない non-LTR 型に分類される。non-LTR 型には、数 kbp の長い散在性反復配列 (long interspersed element、LINE) や数百 bp の短い散在性反復配列 (short interspersed element、SINE) などが含まれる。

1.2 LINE

LINE は、non-LTR 型レトロポゾン的一种であり、自身の RNA の逆転写反応を介して新たな DNA コピーを合成し転移・増幅する。LINE は、5' 非翻訳領域 (untranslated region、UTR)、2 つのタンパク質コード領域 (open reading frame、ORF) である ORF1 及び ORF2、3' 非翻訳領域で構成されている (図 1; Dombroski et al., 1991; Scott et al., 1987)。5' UTR には、自身配列の転写に必要な内部プロモーターが存在する。ORF1 と ORF2 には、LINE の転移に必要なタンパク質がコードされている。3' UTR には、転移時に LINE タンパク質に認識される配列が存在する。

ヒトのゲノム内で最もコピー数の多い LINE は LINE-1 (L1) と呼ばれる。L1 はヒトゲノムの 17% を占めており、その多くは変異や切断により転移活性を失っている。しかし現在でも、ヒトゲノム中には転移活性を有する L1 が 100 コピー程度存在しており (Brouha et al., 2003; Beck et al., 2010)、生殖細胞と体細胞において転移していることが知られている。生殖細胞での

LINE 転移は子孫に遺伝され、世代を超えて影響を及ぼし得る。例えば、集団間・個体間のゲノム多型を生み出したり、遺伝病を引き起こしたりする例が知られている (Beck et al., 2010; Belancio et al., 2008; Ewing and Kazazian, 2010; Huang et al., 2010; Iskow et al., 2010)。一方、体細胞での LINE 転移は、子孫に遺伝されることはないが、個体内で影響を及ぼし得る。例えば、L1 が哺乳類の脳神経細胞内で転移し、神経ネットワークの個人差を生み出す可能性が示唆されている (Coufal et al., 2009; Muotri et al., 2005)。また、がん細胞中での LINE 転移が、がんの進行に関与する可能性も示唆されている (Bestor, 1998; Iskow et al., 2010)。以上のように、LINE は現在も転移しており、宿主ゲノムに影響を与え続けている。LINE 転移に関する理解を深めることは、宿主生物ゲノムの成り立ち及びその進化を理解する上で重要である。

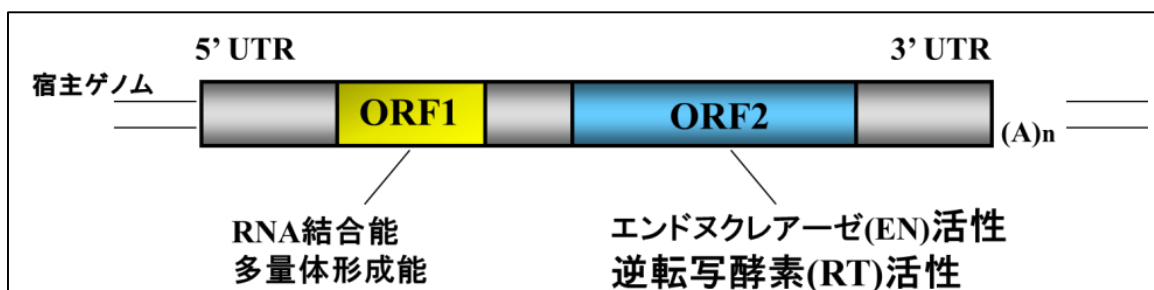


図 1 LINE の構造

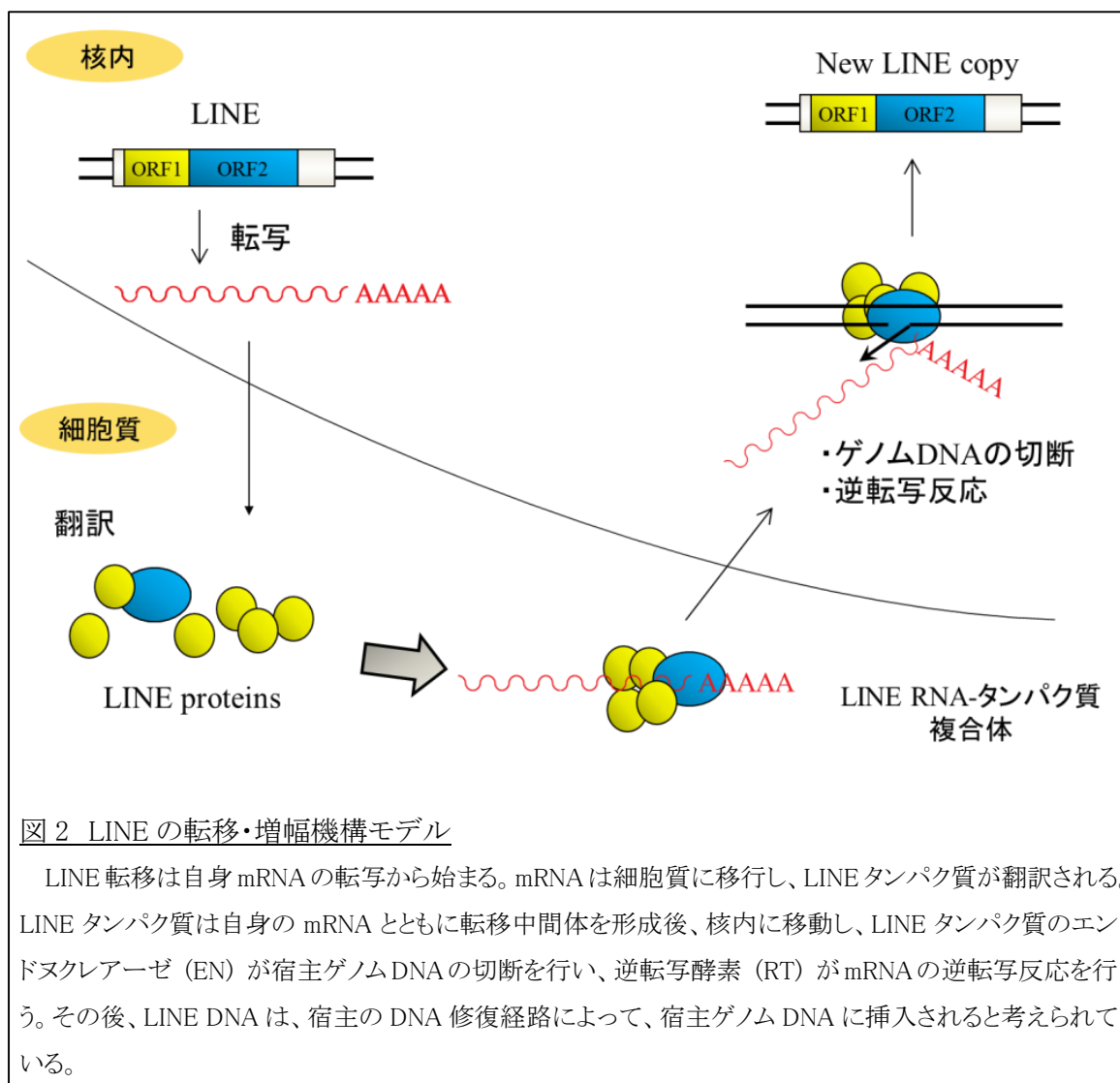
LINE は、5'非翻訳領域 (UTR)、タンパク質コード領域 (ORF1 及び ORF2)、3' UTR から構成されている。5' UTR には、自身配列の転写に必要な内部プロモーターが存在する。ORF1 と ORF2 には LINE 転移に必要なタンパク質がコードされている。3' UTR には、転移時に LINE タンパク質に認識される配列が存在する。

1.3 LINE 転移・増幅機構

現在考えられている LINE の転移機構を図 2 に示す。LINE 転移は、LINE mRNA の転写から始まり、この LINE mRNA から LINE タンパク質が翻訳される。LINE タンパク質は自身の mRNA とともに転移中間体を形成し、転移中間体は核内に移動すると考えられている。その後、LINE タンパク質のエンドヌクレアーゼ (endonuclease, EN) 活性が、宿主ゲノムの DNA にニックを入れることで 3' 水酸基を生成する。次に、生成された 3' 水酸基をプライマーとして、LINE タンパク質の逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) 活性が、LINE RNA の逆転写反応を行い、cDNA を合成する。この EN と RT により行われる反応は、LINE 転移の特徴的な反応であり、target-primed reverse transcription (TPRT) と呼ばれる (Cost et al., 2002; Luan et al., 1993)。TPRT の後、新しく合成された LINE DNA は、宿主の DNA 損傷修復経路によって、宿主ゲノム DNA に挿入されると考えられている (Suzuki et al., 2009)。

TPRT モデルは、LINE タンパク質の生化学的解析から提唱された (Cost et al., 2002; Luan

et al., 1993)。これらの解析では、LINE タンパク質が TPRT に必要な2つの活性、すなわち二本鎖 DNA の片方の鎖を切断する活性と DNA の 3'水酸基をプライマーとした逆転写活性を持つことが示された。また、実際にこれらの活性が転移に必要なのかどうかは、培養細胞を用いた転移検出系を用いて示された (Feng et al., 1996; Moran et al., 1996)。以上のように、EN 及び RT の転移における機能は生化学的解析で明らかにされ、それらの転移における必要性は培養細胞を用いた実験により明らかにされた。



1.4 LINE の分類 (stringent type と relaxed type)

Eichbush らのグループによる R2Bm の研究結果から、LINE 逆転写酵素による LINE RNA の逆転写反応は LINE 配列の 3'末端から開始される事、また LINE 逆転写酵素が LINE RNA の 3'末端領域を特異的に認識して逆転写反応を行う事が示されている (Luan et al., 1993)。また

当研究室においてもウナギの LINE (UnaL2) を使用した転移実験の結果から、UnaL2 は自身の 3' 末端にある stem-loop 配列を認識して転移している事を示している (Kajikawa and Okada, 2002)。一方、ヒト LINE (L1) ではそのような特異性は見られない (Moran et al., 1996)。これらの知見から LINE は逆転写反応時に、自身 RNA の 3' 末端配列を特異的に認識するもの (stringent type) と認識しないもの (relaxed type) の 2 グループに分類できると考えられる (Okada et al., 1997)。

1.5 本研究の目的

Stringent type の LINE 転移は、自身の 3' 末端を特異的に認識して転移する知見が得られているものの、どのようにして LINE は自身の 3' 末端を認識して転移しているのか詳細な解析は為されていない。そのため本実験では、既に当研究室で単離されている 2 つのゼブラフィッシュ LINE (ZfL2-1 及び ZfL2-2: 共に stringent type に属する) を使用して、自身の 3' 末端配列を特異的に認識して転移する機構を明らかにする事を目的とした。

2. 第二章 材料と方法

2.1 オリゴヌクレオチド

本研究で使用した DNA オリゴヌクレオチドは、SIGMA Genosis より購入した(表1、表2)。

プライマー名	配列(5'→3')
ZW1-F1	ATATGGATCCTGACCATTATGTGAAGCTGCTTTGACACAATCTACAT
ZW1-R1	ATATGGATCCATTCAATTC AATTCAATTCAGCTTTATTTGTATAGCGCTTTTACAATGTAGATTGTGTCAAAG
ZW2-F1	ATATGGATCCTGTCCCTCATTTGTGAAGTCGCTTTGGATAAAAGCGCTGCTAAATGAC
ZW2-R1	ATATGGATCCTTTACATTTACATTTACATTTAGTCATTTAGCAGACGCTTTTATCC
ZL1S2-F1	ATATGGATCCTGTCCCTCATTTGTGAAGTCGCTTTGACACAATCTACAT
ZL1S2-R1	ATATGGATCCTTTACATTTACATTTACATTTAGTCATTTAGCAGACGCTTTTACAATGTAGATTGTGTCAAAG
ZL2S1-F1	ATATGGATCCTGACCATTATGTGAAGCTGCTTTGGATAAAAGCGCTATACAAATAAAGC
ZL2S1-R1	ATATGGATCCATTCAATTC AATTCAATTCAGCTTTATTTGTATAGCGCTTTTATCC
ZW2-Sm-F1	ATATGGATCCTGTCCCTCATTTGTGAAGTAAAAAGGATAAAAAGCGCTGCTAAATGAC
ZW2-Lm-F1	ATATGGATCCTGTCCCTCATTTGTGAAGTCGCTTTTCGAAAGCGCTGCTAAATGAC
ZW2-Lm-R1	ATATGGATCCTTTACATTTACATTTACATTTAGTCATTTAGCAGACGCTTTCGAA

表1 LINE 転移実験用プラスミドの作製に使用した DNA オリゴヌクレオチド

プライマー名	配列(5'→3')
m33-F1	GTGAGCATGCCTCAAACTTCGGGCTGCG
m33-R1	AGTTTGTAGGCGATGCTCAGGAGAGCATC
m34-F1	AAC TTGCGGAAGCGGAGAGAATTTGGCGG
m34-R1	CTCCGCTTCGCGAAGTTTGTAGCGATGCTC
m39-F2	CTTCCAGGGCTCGAGGCTCTTGATCCAG
m38_m39-R2	AAAACTAGTGGCGCCGCTAGGTGTCATGG
m39-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTCTTGATCCAGGCC
m42-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTAAAAAGAGGTG
m43-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTATTTGGTGCGAG
m49andm51-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACTTTGCGAGAA
m50andm51-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTGCTGCTCGGA
m48andm50-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTAAAAAGTAGG
m41-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTATAAAATAAAAAGG
m53andm55-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGAT
m54andm55-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAG
m52andm54-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTAAAAATAAAAT
m54andm55-F3	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAG TCATATAGT GCGCTCAAAA CAGCAACCCG CGCCCTGGAA CGTAATGGGA
m54andm55-F4	CGCCCTGGAA CGTAATGGGA AAAAACTAA TTTAGAGGTC TTTAGAATTG CGTACAAAGA
m53andm55-R3	AAAACTAGTG CGCGCGCTT A CTGGCAGAT TTTAGAGCCC TCCTATAGCT GGACATACTG TCCTTTGACG CAATTCTAAA
ZFGm66-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm66-F2	CAGCAACCCG CGCCCTGGAA CGTAATGGGA AAAAACTAA TTTAGAGGTC TTTAGAATTG CGTACAAAGA CAGTATGTCC
ZFGm66-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATGTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm67-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCGCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm68-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTACTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm69-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm70-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTCTAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm70-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTAGAAA
ZFGm79-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTGCTCGGATGCTCTCGTGAGCATCGCTCAAAACTTCGGGCTCGGGAGAGAAAATGGC
ZFGm79-F2	CAAACTTCGGGCTCGGGAGAGAAAATGGCGGAAAACCTAAAACTCTGCACATAGATTAACTACAAAACCTCTCTGTGC
ZFGm79-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACTTTGCGAGTTAACTTCCTCTGAAAGAGGACAGAGAGTTTGTATGTTAATCTATG
ZFGm78-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTCTGTGATCAGGCGCAGCCGCTGCGACCTCTCTGACACCATGGTATAATAGTCATCTCGTG
ZFGm78-R2	AAAACTAGTGGCGCCGCTTAAAAAGTAGGCGAGGATTAGTGCCATTGTTGATTTTCAGACGGTAATACGTCTGCTGGC
ZFGm82-F1	CTTCCAGGGCTcgcgCATGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm82-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm82-R1	AAAACTAGTgcggcgcTTACCTGGCAGATgTTAGAGCCgcCTATAGCTGGACATACTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm83-F1	CTTCCAGGGCTcgcgCATGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm83-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTAcAAGACAGTATGTCC
ZFGm83-R1	AAAACTAGTgcggcgcTTACCTGGCAGATgTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATACTGTCTTGTAACGCAATTCTAAA
ZFGm84-F1	CTTCCAGGGCTcgcgCATGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm84-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTAcAAGACAGTATGTCC
ZFGm84-R1	AAAACTAGTgcggcgcTTACCTGGCAGATTTTAGAGCCgcCCTATAGCTGGACATACTGTCTTgGTACGCAATTCTAAA
ZFGm85-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm85-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm85-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm86-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCGCAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm86-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm86-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm87-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm87-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm87-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm88-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm88-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm88-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm89-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm89-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAAAACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm89-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA
ZFGm90-F1	CTTCCAGGGCTCGAGGCTAGGTATAATAGTCATCTGCTGCGCTCAAAACAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAAATGGA
ZFGm90-F2	CAGCAACCCGCGCCCTGGAACGTAATGGA AAGCACTAATTTAGAGGTCCTTTAGAATTGCGTACAAAGACAGTATGTCC
ZFGm90-R1	AAAACTAGTGGCGCCGCTACCTGGCAGATTTAGAGCCCTCCTATAGCTGGACATCTGTCTTTGTACGCAATTCTAAA

表2 LINE タンパク質発現用プラスミドの作製に使用した DNA オリゴヌクレオチド

2.2 転移実験用プラスミドの作製

様々な変異 stem-loop 配列を持つゼブラフィッシュ LINE ZfL2-1 および ZfL2-2 の転移実験用プラスミドを作製した。作製したプラスミドを表 3 に示す。

プラスミド名	使用プライマー		鋳型プラスミド
	フォワード	リバース	
Z1L1S2	ZL1S2-F1	ZL1S2-R1	p74.18
Z2L1S2	ZL1S2-F1	ZL1S2-R1	pBB4
Z1L2S1	ZL2S1-F1	ZL2S1-R1	p74.18
Z2L2S1	ZL2S1-F1	ZL2S1-R1	pBB4
Z2Sm1	ZW2-Sm-F1	ZW2-R1	pBB4
Z2Lm1	ZW2-Lm-F1	ZW2-Lm-R1	pBB4

表 3 ゼブラフィッシュ LINE 転移実験用プラスミド

様々な変異 stem-loop 配列を持つ転移実験用プラスミドは、予め ZfL2-1 タンパク質コード領域が含まれた転移実験用プラスミド p74.18 (Sugano et al., 2006)、あるいは、ZfL2-2 タンパク質コード領域が含まれた転移実験用プラスミド pBB4 にさまざまな stem-loop 配列を組み込むことで作製した。挿入した stem-loop 配列の作製手順を以下に示す。

フォワードプライマー (100 μ M)	1 μ l
リバースプライマー (100 μ M)	1 μ l
10 $\times$ KOD Buffer	5 μ l
2mM dNTPs	5 μ l
25mM MgSO ₄	3 μ l
KOD (1U/ μ l)	1 μ l
超純水	34 μ l
合計	50 μ l

上記の PCR 反応溶液を調整し、

94°C 2 分	×2
95°C 30 秒	
55°C 30 秒	
68°C 1 分	

の条件で PCR 反応を行った。PCR 後の増幅産物を BamHI で制限酵素処理した。この PCR

産物を p74.18 あるいは pBB4 の BamHI サイトにクローニングした。

2.3 ゼブラフィッシュ LINE タンパク質 in vitro 合成用プラスミドの作製

LINE stem-loop RNA との結合実験に用いたゼブラフィッシュ LINE タンパク質は、pEU-E01G(TEV)-N2 ベクター(小麦胚芽無細胞系タンパク質合成用ベクター(愛媛大学遠藤先生よりいただいた))を使用した。ZfL2-2 タンパク質 in vitro 合成用プラスミドの作製手順を以下に示す。

pBB4(ZfL2-2 のタンパク質コード領域を含んだ転移実験用プラスミド)を鋳型に、Z2FNtI プライマーと Z2RxhI プライマーを使用して ZfL2-2 のタンパク質コード領域を PCR で増幅した。増幅した PCR 産物を NotI と XhoI で制限酵素処理し、pEU-E01G(TEV)-N2 ベクターの NotI と XhoI の間にクローニングした。得られたプラスミドを gtZfL2-2 と命名した(野生型 ZfL2-2 タンパク質合成用プラスミド)。

ZfL2-2 タンパク質に点変異を導入した変異タンパク質の合成を行うために、ZfL2-2 変異タンパク質合成用プラスミドを作製した。作製には inverse PCR を用い、以下の手順で行った。

gtZfL2-2 (50 ng/ μ l)	1.0 μ l
10 $\times$ KOD-plus-Neo (TOYOBO)	5.0 μ l
2mM dNTP each	5.0 μ l
25mM MgSO ₄	3.0 μ l
フォワードプライマー (10 μ M)	1.5 μ l
リバースプライマー (10 μ M)	1.5 μ l
KOD-plus- Neo (1U/ μ L)	1.0 μ l
超純水	32.0 μ l
合計	50.0 μ l

上記の PCR 反応溶液を調整し、

94°C 2 分	×10	×1
98°C 10 秒		
68°C 5 分		
25°C 1 分		

の条件で inverse PCR を行った。inverse PCR 後の増幅産物に 1 μ l の制限酵素 Dpn I (9U/ μ l; TOYOBO) を加え、37°C で 1 時間制限酵素処理を行う事で、inverse PCR の鋳型に使用した gtZfL2-2 を切断した。制限酵素処理後の inverse PCR 増幅産物をコンピテントセルに導入し、得られたコロニーからプラスミドを抽出し、Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen) で精製した。inverse PCR 法で作製した ZfL2-2 変異タンパク質合成用プラスミドを表 4 に示す。

プラスミド名	変異を導入した位置	使用プライマー		鋳型プラスミド
		フォワード	リバース	
GtZfL2-2(P311R)	311番目のProをArgに変異	Z2-P311R-F1	Z2-P311R-R1	gtZfL2-2
GtZfL2-2(W325A)	325番目のTrpをAlaに変異	Z2-W325A-F1	Z2-W325A-R1	gtZfL2-2
GtZfL2-2(R334A)	334番目のArgをAlaに変異	m33-F1	m33-R1	gtZfL2-2
GtZfL2-2(K419I)	419番目のLysをIleに変異	Z2-K419I-F1	Z2-K419I-R1	gtZfL2-2
GtZfL2-2(D689Y)	689番目のAspをTyrに変異	Z2-D689Y-F1	Z2-D689Y-R1	gtZfL2-2
GtZfL2-2(W934A)	934番目のTrpをAlaに変異	Z2-W934A-F1	Z2-W934A-R1	gtZfL2-2

表 4 ZfL2-2 点変異タンパク質合成用プラスミド

LINE stem-loop RNA との結合実験に用いる ZfL2-2 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミドを作製した。手順を以下に示す。

gtZfL2-2 (1 ng/ μ l)	1.0 μ l
10×KOD-plus-Neo (TOYOBO)	5.0 μ l
2mM dNTP each	5.0 μ l
25mM MgSO ₄	3.0 μ l
フォワードプライマー (10 μ M)	1.5 μ l
リバースプライマー (10 μ M)	1.5 μ l
KOD-plus- Neo (1U/mL)	1.0 μ l
超純水	32.0 μ l
合計	50.0 μ l

上記の PCR 反応溶液を調整し、

94°C 2 分	×30	×1
98°C 10 秒		
55°C 30 秒		
68°C 1 分		
25°C 1 分		

上記の条件で PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)で精製し、30 μ lの超純水で溶出した。精製した PCR 産物を pEU-E01G(TEV)-N2 ベクターの NotI と XhoI サイト間に In-Fusion HD Cloning kit (Clontech)を用いて以下の手順でクローニングした。

NotI, XhoI 制限酵素処理した pEU-E01G(TEV)-N2 ベクター (50ng/ μ l)	1 μ l
精製後の PCR 増幅産物	3 μ l
5×In-Fusion HD Enzyme Premix	1 μ l
合計	5 μ l

上記の反応液を、50℃ 15 分インキュベート後、コンピテントセルに導入し、得られたコロニーからプラスミドを抽出し、Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen)により精製した。作製した ZfL2-2 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミドを表 5 に示す。

プラスミド名	由来	使用領域	使用プライマー		鋳型プラスミド
			フォワード	リバース	
TBR2(311-447)	ZfL2-2	311番目のProから447番目のPheまで	m39-F1	m42-R2	gtZfL2-2
TBR2(311-419)	ZfL2-2	311番目のProから419番目のLysまで	m39-F1	m42-R2	gtZfL2-2
TBR2(311-371)	ZfL2-2	311番目のProから371番目のLysまで	m39-F1	m49andm51-R1	gtZfL2-2
TBR2(324-389)	ZfL2-2	324番目のProから389番目のPheまで	m50andm51-F1	m48andm50-R1	gtZfL2-2
TBR2(324-371)	ZfL2-2	324番目のProから371番目のLysまで	m50andm51-F1	m49andm51-R1	gtZfL2-2
TBR2(324-346)	ZfL2-2	311番目のProから419番目のLysまで	ZFGm92-F1	ZFGm92-R1	プライマー同士の annealing
TBR2(347-371)	ZfL2-2	311番目のProから419番目のLysまで	ZFGm93-F1	ZFGm93-R1	プライマー同士の annealing

表 5 ZfL2-2 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミド

LINE stem-loop RNA との結合実験に用いる ZfL2-1 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミドも上記と同様の手順で作製した。作製した ZfL2-1 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミドを表 6 に示す。

プラスミド名	由来	使用領域	使用プライマー		鋳型プラスミド
			フォワード	リバース	
TBR1(356-416)	ZfL2-1	356番目のProから416番目のArgまで	m41-F1	m53andm55-R1	p74.18
TBR1(369-435)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	m54andm55-F1	m52andm54-R1	p74.18
TBR1(369-416)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	m54andm55-F4	m54andm55-F3	m54andm55-F4 プライマー

表 6 ZfL2-1 の EN-RT 間領域タンパク質合成用プラスミド

ZfL2-1 タンパク質の EN-RT 間領域(47 アミノ酸) (TBR1; Tail Binding Region 1)に変異を導入したタンパク質を合成するためのプラスミドを作製した。作製方法は、上記と同様の手順である。作製したプラスミドを表 7 に示す。

プラスミド名	由来	使用領域	変異を導入した領域	使用プライマー		鋳型プライマー
				フォワード	リバース	
TX1(R376A)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	376番目のArgをAlaに変異	ZFGm85-F1	ZFGm85-R1	ZFGm85-F2□
TX1(K379A)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	379番目のLysをAlaに変異	m54andm55-F1	m52andm54-R1	ZFGm86-F2
TX1(R383A)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	383番目のArgをAlaに変異	ZFGm87-F1	ZFGm87-R1	ZFGm87-F2
TX1(R387A)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	387番目のArgをAlaに変異	ZFGm88-F1	ZFGm88-R1	ZFGm88-F2□
TX1(K390A)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	379番目のLysをAlaに変異	ZFGm89-F1	ZFGm89-R1	ZFGm89-F2
TX1(K391A)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	391番目のLysをAlaに変異	ZFGm90-F1	ZFGm90-R1	ZFGm90-F2
TX1(R398L)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	398番目のArgをLeuに変異	ZFGm66-F1	ZFGm70-R1	ZFGm70-F2
TX1(K402Q)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	402番目のLysをGluに変異	ZFGm66-F1	ZFGm69-R1	ZFGm66-F2
TX1(R409S)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	409番目のArgをSerに変異	ZFGm66-F1	ZFGm68-R1	ZFGm66-F2
TX1(R410A)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	410番目のArgをAlaに変異	ZFGm66-F1	ZFGm67-R1	ZFGm66-F2
TX1(K413T)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	413番目のLysをThrに変異	ZFGm66-F1	ZFGm66-R1	ZFGm66-F2
TX1(R410AK413T)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	410番目のArgをAlaに変異 413番目のLysをThrに変異	ZFGm82-F1	ZFGm82-R1	ZFGm82-F2
TX1(K402QK413T)	ZfL2-1	369番目のProから435番目のPheまで	402番目のLysをGluに変異 413番目のLysをThrに変異	ZFGm83-F1	ZFGm83-R1	ZFGm83-F2
TX1(K402QR410A)	ZfL2-1	369番目のProから416番目のArgまで	402番目のLysをGluに変異 410番目のArgをAlaに変異	ZFGm84-F1	ZFGm84-R1	ZFGm84-F2

表 7 ZfL2-1 TBR1 の変異タンパク質合成用プラスミド

2.4 GST 融合 LINE タンパク質と LINE stem-loop RNA との結合実験

GST 融合ゼブラフィッシュ LINE タンパク質と RNA との結合実験は以下の手順で行った。初めに、500ng/ μ l に調整したタンパク質合成用プラスミド DNA を 2 μ l とタンパク質合成試薬の TNT[®] SP6 High-Yield Wheat Germ Master Mix (Promega) を 3 μ l 混合し、25℃で 1 時間インキュベートし、GST 融合 LINE タンパク質を合成した。合成した GST 融合 LINE タンパク質を抗 GST 抗体で精製するため、30mg/ml の Dynabeads ProteinG (Invitrogen) 5 μ l と 0.5mg/ml の抗 GST 抗体 (abcam, ab6613) 0.5 μ l を室温で 10 分混合し、GST 抗体を結合した Dynabeads ProteinG を得た (抗 GST-Dynabeads)。これらを以下の量で stem-loop RNA と混合した。混合時、非特異吸着を抑えるため yeast tRNA (2mg/ μ l) を加えた。

抗 GST-Dynabeads	20.0 μ l
GST 融合ゼブラフィッシュ LINE タンパク質	1.5 μ l
stem-loop RNA (10fmol/ μ l)	1.0 μ l
yeast tRNA (2mg/ μ l)	1.0 μ l
B200Na (25mM Tris-HCl pH 7.8, 200mM NaCl, 0.1% Tween20)	150.0 μ l
合計	173.5 μ l

上記の混合液を、室温で 10 分間転倒攪拌した。その後 BuFB (25mM Tris-HCl pH7.8, 50mM NaCl) 溶液で 5 回 wash し、GST 融合ゼブラフィッシュ LINE タンパク質と結合しなかった stem-loop RNA を取り除いた。続いて、GST 融合ゼブラフィッシュ LINE タンパク質と stem-loop RNA との結合を切り離すために、80℃で 5 分間インキュベートし、1 μ l を逆転写反応の鋳型に使用した。逆転写反応は、タカラバイオ社の Primescript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を使用し、以下の手順で行った。

RNA 溶液	1.0 μ l
5×PrimeScript Buffer	2.0 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l
Random 6mers (100uM)	0.5 μ l
超純水	6.0 μ l
合計	10.0 μ l

上記の組成で溶液を混合し以下の条件で逆転写反応を行った。

37°C 15 分	×1
80°C 5 秒	
25°C 1 分	

逆転写反応液 1 μ l を定量 RT-PCR の鋳型に使用した。定量 RT-PCR を行う際、タカラバイオ社の SYBR PremixEx Taq II (Perfect Real Time) を使用した。

逆転写反応液	1.00 μ l
SYBR Premix Ex Taq II	6.25 μ l
Z2T2qF02 プライマー (10uM)	0.50 μ l
Z2T2qR01 プライマー (10uM)	0.50 μ l
超純水	4.25 μ l
合計	12.50 μ l

上記の組成で溶液を混合し、下記の反応条件で定量 RT-PCR 反応を行った。

95°C 30 秒	×40
95°C 5 秒	
60°C 30 秒	
95°C 15 秒	
25°C 1 分	

2.5 逆転写酵素活性の測定

アミノ酸変異を導入した GST 融合 ZfL2-2 タンパク質が逆転写酵素活性を保持しているか否か調べるため、stem-loop RNA を欠失した RNA (NoSL) を鋳型にランダムプライマーを使用して逆転写反応を行った。

GST 融合 ZfL2-2 タンパク質	1 μ l
10fmol/ μ l NoSL RNA	1 μ l
100 μ M random 6mers	1 μ l
0.5 mM dNTP mixture	2 μ l
500mM Tris-HCl (pH7.5)	2 μ l
1.5M NaCl	2 μ l
20mM MgCl ₂	2 μ l
超純水	9 μ l
合計	20 μ l

上記の組成で溶液を混合後、以下の条件で逆転写反応を行った。

37°C 55 分	 ×1
80°C 5 分	
25°C 1 分	

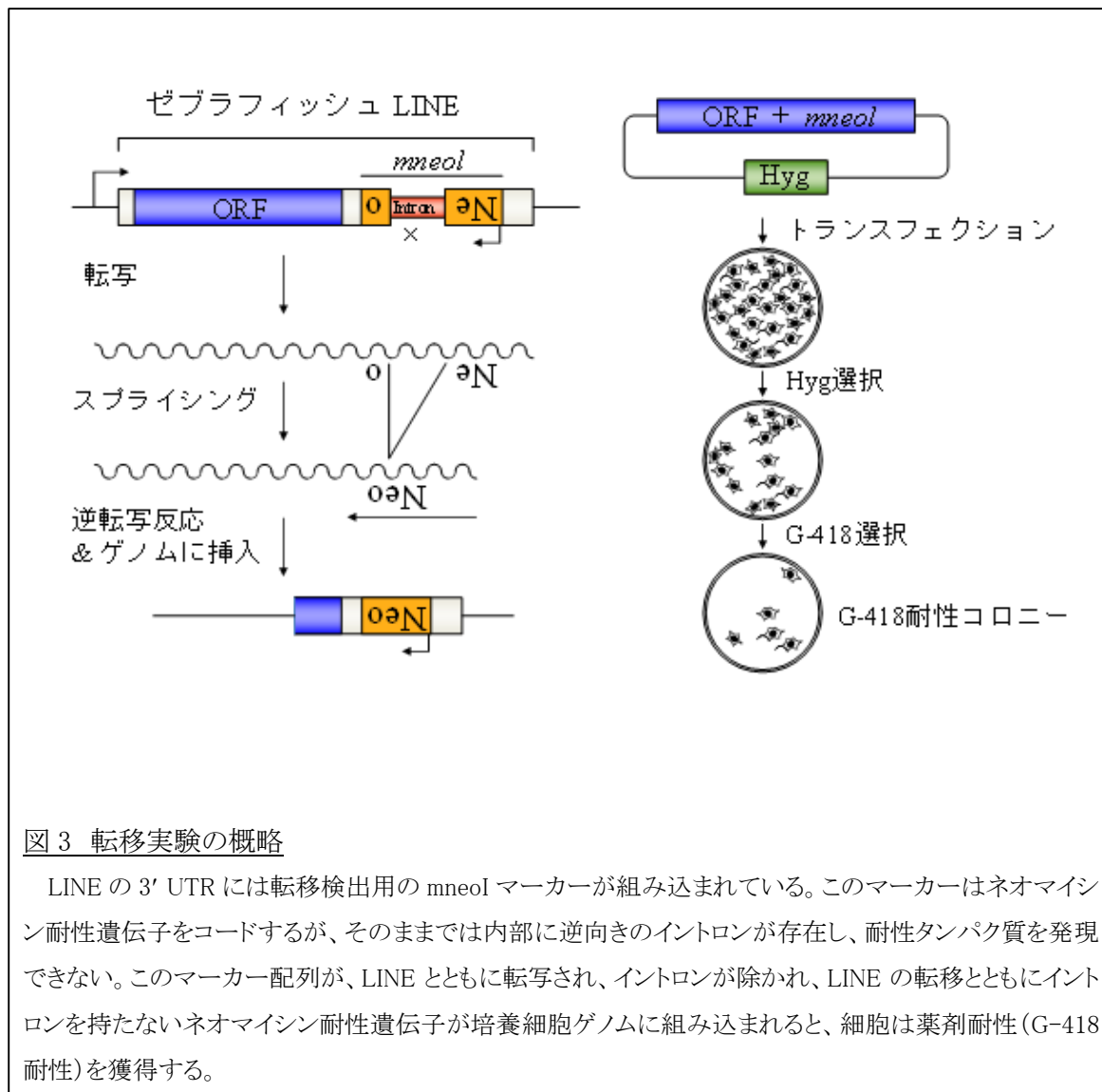
逆転写反応後の溶液 1 μ l を用いて、2.6 項と同様に cDNA 量を測定した。本実験は LINE タンパク質の鋳型非特異的逆転写活性を測定している。

2.6 HeLaRC 細胞培養

当研究室で株化されていたヒト培養細胞 HeLaRC (HeLa 細胞由来; Sugano et al., 2006) は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) に 10%ウシ胎仔血清 (FBS) を添加した培地を使用し、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

2.7 培養細胞を用いた転移実験

転移実験の概略を図 3 に示す。まず、HeLaRC を 2×10^5 細胞/well で 6 well プレートに継代した (Day1 とする)。1 日後、500ng のプラスミド DNA と 1.5ul の FuGENE6 (Roche Molecular Biochemicals) を混合し、各 well の HeLaRC 細胞に添加することで、HeLaRC 細胞にプラスミド DNA を導入した (Day2)。この導入操作は、FuGENE6 トランスフェクション試薬の説明書に従った。プラスミド DNA を導入してから 24 時間後、ハイグロマイシン (Invitrogen) を含む培地 (200 ug/ml) に培地交換した (Day3)。Day6、7 にハイグロマイシンを含んだ培地で培地交換を行い、ハイグロマイシン耐性 (Hyg^R) 細胞を選択した。プラスミド DNA を導入してから 6 日後 (Day8)、Hyg^R 細胞を 10 mm シャーレに継代し、Day8 から Day17 までの間 G-418 (Promega) を含む培地 (400 ug/ml) で培養した。Day18 において、G-418 耐性 (G-418^R) 細胞 (すなわち転移が生じたと考えられる細胞) を 100%エタノール (Wako) で固定し、ギムザ液で染色した。染色後、G-418^R 細胞の数を計測し、Hyg^R 細胞数に対する G-418^R 細胞を転移頻度として算出した。



3. 第三章 結果

3.1 本研究で用いたゼブラフィッシュ LINE、Zfl2-1 と Zfl2-2

本実験では、当研究室で既に単離されている転移活性を持つ 2 つのゼブラフィッシュ LINE、Zfl2-1 及び Zfl2-2 を使用した(図 4) (Sugano et al., 2006)。Zfl2-1 は全長約 5kb で、5'非翻訳領域(untranslated region、UTR)、2 つのタンパク質コード領域(open reading frame、ORF1 及び ORF2) 及び 3' UTR から構成されている(図 4A)。一方、Zfl2-2 は全長約 4kb で、5' UTR、1 つの ORF 及び 3' UTR から構成されている(図 4A)。両 LINE ともその 3' UTR には転移に必要な配列を保持している(図 4A 青、赤)。Zfl2-2 RNA の NMR 構造解析から、この転移に必要な配列は RNA に転写された際、stem-loop 構造を取る事が示されている(Nomura et al., 2006)。また、Zfl2-1 の転移に必要な配列もその二次構造予測から stem-loop 構造をとると考えられる(図 4B)。しかし、それぞれの LINE の stem-loop 構造はその一次配列比較から、特にループ部分で異なることが分かる。この stem-loop 配列の下流には、それぞれ繰り返し配列が存在し、その繰り返しは、Zfl2-1 では(TGAAT)を一単位、Zfl2-2 では(TGTAAA)を一単位としている(図 4B)。LINE 転移時の LINE RNA の逆転写反応はこの末端繰り返し配列から開始されることが示されている(Kajikawa and Okada, 2002)。

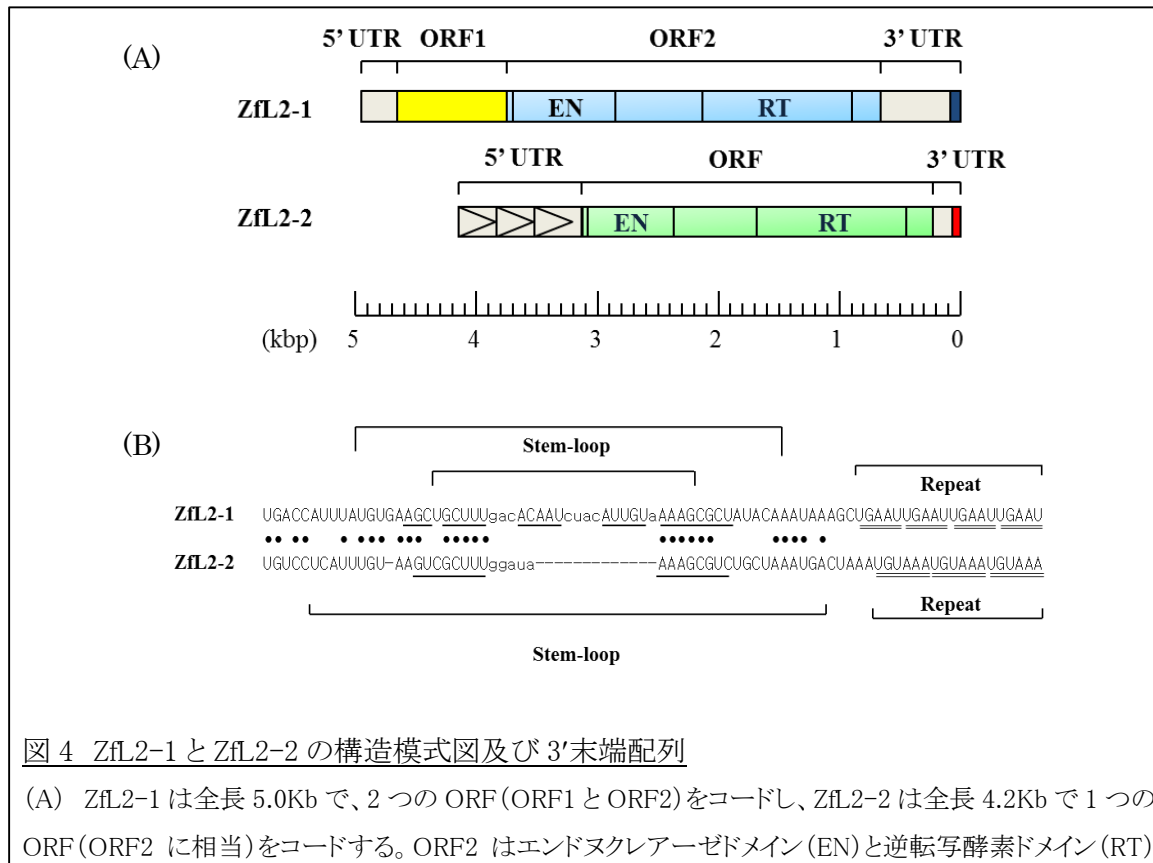


図 4 Zfl2-1 と Zfl2-2 の構造模式図及び 3'末端配列

(A) Zfl2-1 は全長 5.0Kb で、2 つの ORF (ORF1 と ORF2) をコードし、Zfl2-2 は全長 4.2Kb で 1 つの ORF (ORF2 に相当) をコードする。ORF2 はエンドヌクレアーゼドメイン (EN) と逆転写酵素ドメイン (RT)

をコードする。ZfL2-1 及び ZfL2-2 の 3'末端に存在する転移に必須の配列を青色 (ZfL2-1) と赤色 (ZfL2-2) で示した。(B) ZfL2-1 及び ZfL2-2 の stem-loop 配列。相同性のある塩基配列を黒丸(●)で示し、下線で示した領域は stem 構造を形成する配列を示す。末端繰り返し配列を二重線で示した。

3.2 ZfL2-1 と ZfL2-2 は自身の stem-loop 領域を特異的に認識して転移する

ZfL2-2 の 3'末端配列は、RNA に転写されると、stem-loop 構造形成する (Nomura et al., 2006)。また、二次構造予測から、ZfL2-1 の 3'末端配列も RNA に転写されると stem-loop 構造を形成すると考えられる。培養細胞を用いた転移実験では、ZfL2-1 も ZfL2-2 もともに、この stem-loop 配列の欠失変異体ではその転移を検出できない (Sugano et al., 2006; Kajikawa et al., 2012)。これは、この stem-loop 配列がゼブラフィッシュ LINE 転移に必須の機能を持つことを示している。しかし、この stem-loop 配列が LINE 転移においてどのような機能を持つのか解明されていない。私は、この stem-loop 配列の転移における機能解明を目的に研究を行った。

まず、stem-loop 配列の転移における必要性を詳細に解析するため、ZfL2-2 の stem-loop 配列に様々な変異を導入した LINE 配列を作製し転移実験を行った。約 60 bp の stem-loop 配列全体を欠失させた場合、先行研究同様、ZfL2-2 の転移は検出されなかった (Sugano et al., 2006) (図 5; Z2ΔSL2 変異体)。次に、stem-loop 配列が RNA に転写された時、特定の三次構造 (stem-loop 構造) を形成することが転移に必要なか否か検証するため、stem 塩基対の形成ができない変異体を作製しその転移の検出を試みた (図 5; Z2Sm1 変異体)。その結果、この変異体では転移が検出されず、stem-loop 配列の転移における機能には、LINE RNA 上での stem-loop 構造形成が重要であることが示された。ZfL2-1 の stem-loop 配列 RNA も stem-loop 構造を形成していると考えられる。そこで、ZfL2-2 の stem-loop 配列を ZfL2-1 の stem-loop 配列に置換した変異体を作製し転移実験を行った (図 5; Z2SL1 変異体)。しかし、この変異体では転移が検出されず、ゼブラフィッシュ LINE ZfL2-1 の stem-loop 配列はゼブラフィッシュ LINE ZfL2-2 の stem-loop 配列の機能を相補できないことが示された。すなわち、ZfL2-2 はその転移において、自身 RNA の stem-loop 構造と ZfL2-1 RNA の stem-loop 構造を‘識別’している可能性が示唆される。そこで、ZfL2-2 と ZfL2-1 の RNA stem-loop 構造の stem 部分と loop 部分を交換した ZfL2-2 変異体 (図 5; Z2L1S2 変異体と Z2L2S1 変異体) の転移頻度を測定した。この 2 つの変異体のうち、自身の loop 構造を持つ (stem 構造は ZfL2-1) ZfL2-2 変異体は、野生型の～30%の転移頻度で転移が観察されたが、自身の loop 構造を持たない (stem 構造を自身のもの) ZfL2-2 変異体は、その転移が観察されなかった。この実験結果は、ZfL2-2 の転移において、自身 RNA の 3'末端領域に存在する stem-loop 構造の loop 領域が特異的に認識される機構が存在することを示唆する。この結果と一致するように、ZfL2-2 の loop 配列を異なる loop 配列に置換した LINE 変異体は転移することができない (図 5; Z2Lm1 変異体)。

ゼブラフィッシュ LINE 転移における 3'末端 RNA loop 構造の特異的認識機構の存在をさら

に検証するため、ゼブラフィッシュ ZfL2-1 を用いて同様の転移実験を行った(図 6)。約 60 bp の stem-loop 配列全体を欠失させた場合、先行研究同様、ZfL2-1 の転移は検出されなかった (Sugano et al., 2006) (図 6; Z1 Δ SL1 変異体)。さらに、ZfL2-2 の stem-loop 配列を持つ ZfL2-1 変異体は転移できないが、自身の loop 構造(stem 構造ではなく)を持てば、転移可能であることが示された(図 6; Z1SL2、Z1L1S2、Z1L2S1 変異体)。これらの結果は、ZfL2-1 および ZfL2-2 が、それぞれ自身 3'末端 RNA の loop 構造を特異的に認識し転移していることを示唆する。

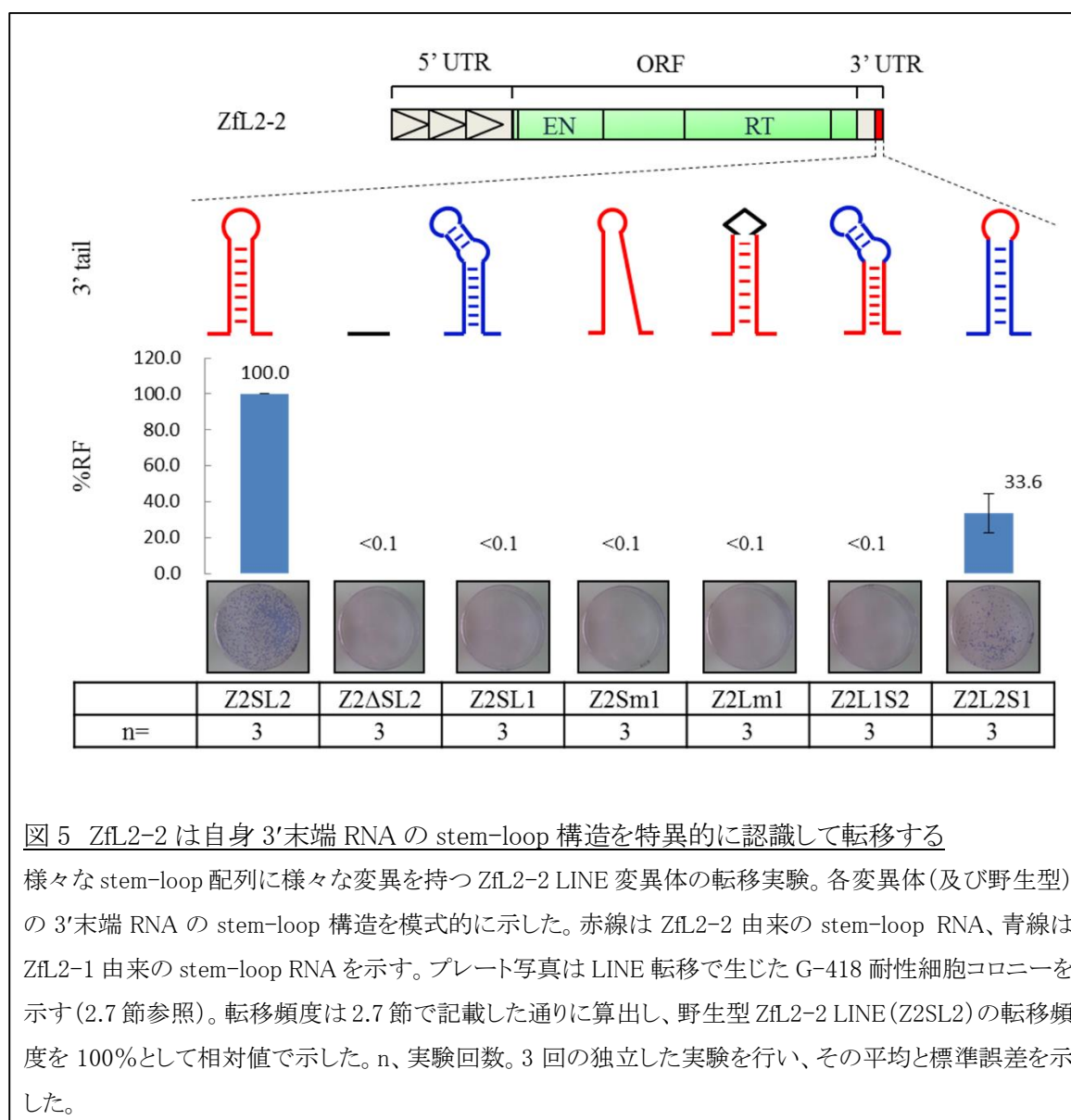


図 5 ZfL2-2 は自身 3'末端 RNA の stem-loop 構造を特異的に認識して転移する

様々な stem-loop 配列に様々な変異を持つ ZfL2-2 LINE 変異体の転移実験。各変異体(及び野生型)の 3'末端 RNA の stem-loop 構造を模式的に示した。赤線は ZfL2-2 由来の stem-loop RNA、青線は ZfL2-1 由来の stem-loop RNA を示す。プレート写真は LINE 転移で生じた G-418 耐性細胞コロニーを示す(2.7 節参照)。転移頻度は 2.7 節で記載した通りに算出し、野生型 ZfL2-2 LINE (Z2SL2) の転移頻度を 100%として相対値で示した。n、実験回数。3 回の独立した実験を行い、その平均と標準誤差を示した。

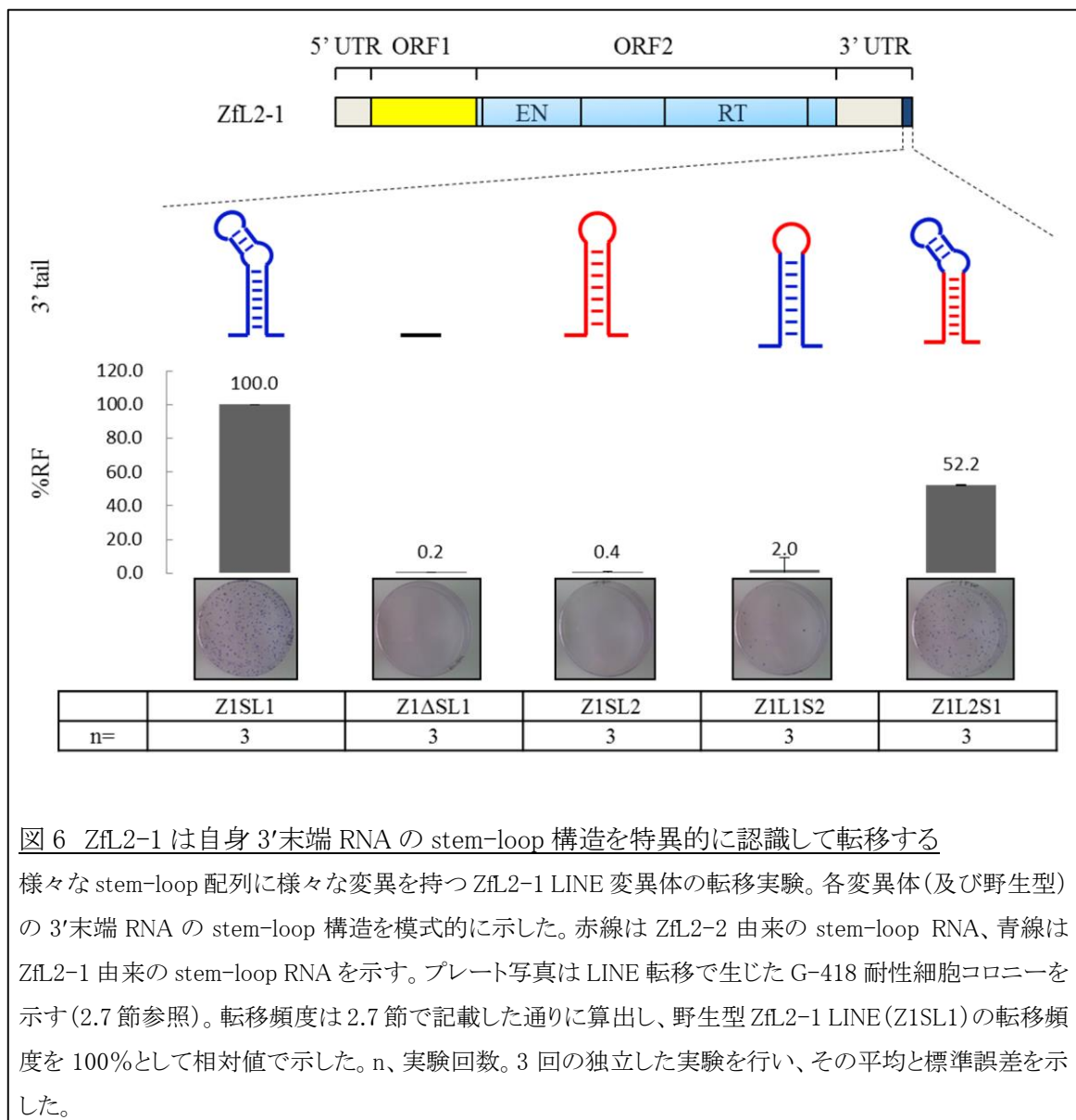


図6 ZfL2-1は自身3'末端RNAのstem-loop構造を特異的に認識して転移する

様々なstem-loop配列に様々な変異を持つZfL2-1 LINE変異体の転移実験。各変異体(及び野生型)の3'末端RNAのstem-loop構造を模式的に示した。赤線はZfL2-2由来のstem-loop RNA、青線はZfL2-1由来のstem-loop RNAを示す。プレート写真はLINE転移で生じたG-418耐性細胞コロニーを示す(2.7節参照)。転移頻度は2.7節で記載した通りに算出し、野生型ZfL2-1 LINE(Z1SL1)の転移頻度を100%として相対値で示した。n、実験回数。3回の独立した実験を行い、その平均と標準誤差を示した。

3.3 ZfL2-2 タンパク質は自身 RNA の stem-loop 構造を特異的に認識して結合する

ZfL2-1 および ZfL2-2 変異体の細胞内転移実験から、ゼブラフィッシュ LINE の転移には、自身3'末端RNAのstem-loop構造形成が重要であることが示めされた。また、stem-loop構造がそのloop領域を介してLINEの転移機構に特異的に認識されていることが示唆された。この実験結果の最も簡単な説明(仮説)は、LINEタンパク質が、自身RNAと3'末端stem-loop構造を介して特異的に結合し、この特異的結合がLINE転移に必須であるという考え方である。

LINE転移の過程において、LINE RNAとLINEタンパク質はそれぞれ結合し、転移中間体を形成する事が知られている。しかし、この転移中間体の形成に必要と考えられているLINEタンパク質のRNA結合能は配列‘非特異的’のものであり、その活性はORF1タンパク質にある

ことが示されている(Martin, 1991; Hohjoh and Singer, 1996; Seleme et al., 2005; Kulpa and Moran, 2005, Matsumoto et al., 2006; Doucet et al., 2010)。一方、ORF2 タンパク質が RNA 結合能を持つという報告は現在までに為されていない。

本転移実験からその存在が示唆される LINE タンパク質と LINE RNA との結合は、‘配列 (RNA 構造) 特異的’な結合である。また、ZfL2-2 は ORF2 に相当するタンパク質しかコードしないことから、タンパク質側の RNA 結合領域は ORF2 タンパク質内に存在すると考えられる。もしこのような LINE タンパク質と LINE RNA との特異的な結合が存在するのであれば、ORF1 タンパク質を介した RNA 結合とは別の機能があるのではないかと考えられる。ゼブラフィッシュ LINE RNA の 3'末端 stem-loop 構造は逆転写開始位置のすぐ上流に位置している。‘特異的’ RNA 結合は、LINE RNA の逆転写反応の開始などに関与するのかもしれない。

私は、この LINE タンパク質 (ORF2 タンパク質) と LINE RNA との‘特異的’相互作用の存在を検証するため、ZfL2-2 タンパク質と ZfL2-2 stem-loop RNA を *in vitro* で合成し、結合実験を行った。本結合実験には、N 末端に GST を融合した ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) を使用した (図 7A)。野生型 ZfL2-2 stem-loop RNA 配列は図 7B に示した (図 7B; SL2WT)。BamHI サイトにはさまれた配列が ZfL2-2 RNA の stem-loop 領域であり、そのほかの領域は LINE と無関係の配列である。BamHI サイト間の配列を置換することで様々な RNA を合成した (図 7C)。BamHI サイト間に配列の挿入がない RNA を結合実験の陰性コントロールとして用いた (図 7C; NoSL)。LINE タンパク質に結合した RNA 量は、それぞれの RNA の共通配列にアニールするプライマーを用いた定量 RT-PCR で測定した (図 7B; 矢印線)。

ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) は、LINE 配列を持たない RNA (NoSL) と比較して、野生型 ZfL2-2 stem-loop を持つ RNA (SL2WT) と約 10 倍多く結合した (図 8A)。また、本結合実験に必須の因子、抗 GST 抗体 (2.4 項参照)、を除いた場合、この結合は検出されなかった (図 8A; Anti-GST -)。さらに GST タンパク質のみでも LINE RNA との結合は観察されなかった (図 8A; GST)。以上の結果から、ZfL2-2 タンパク質は自身 RNA の 3'末端 stem-loop 構造と特異的に結合する事が明らかとなった。

この ZfL2-2 LINE RNA の 3'末端 stem-loop 構造が ZfL2-2 タンパク質との結合に必須であることをさらに検証するため、stem-loop 配列の様々な変異体 RNA を作製し結合実験を行った。まず、stem-loop 構造の破壊変異体では、LINE タンパク質との結合が検出されなかった (図 8B; SL1Sm1)。また、ZfL2-1 RNA の stem-loop 構造 (SL1WT) でも結合は見られなかった。ZfL2-1 と ZfL2-2 RNA の stem-loop 構造のモザイク変異体 (L2S1、L1S2) では、自身の stem 構造が存在する場合 (L2S1) でのみ結合が検出された。さらに ZfL2-2 RNA stem-loop 構造の loop 変異体 (SL2Lm1) でも結合は検出されなかった。以上の結果は、ZfL2-2 タンパク質は、自身 RNA の 3'末端 stem-loop 構造を特異的に認識して結合することを示し、この特異的認識には loop 領域が重要であることを示す。これらの結合実験結果は、前述の転移実験の結果とよく一致する。

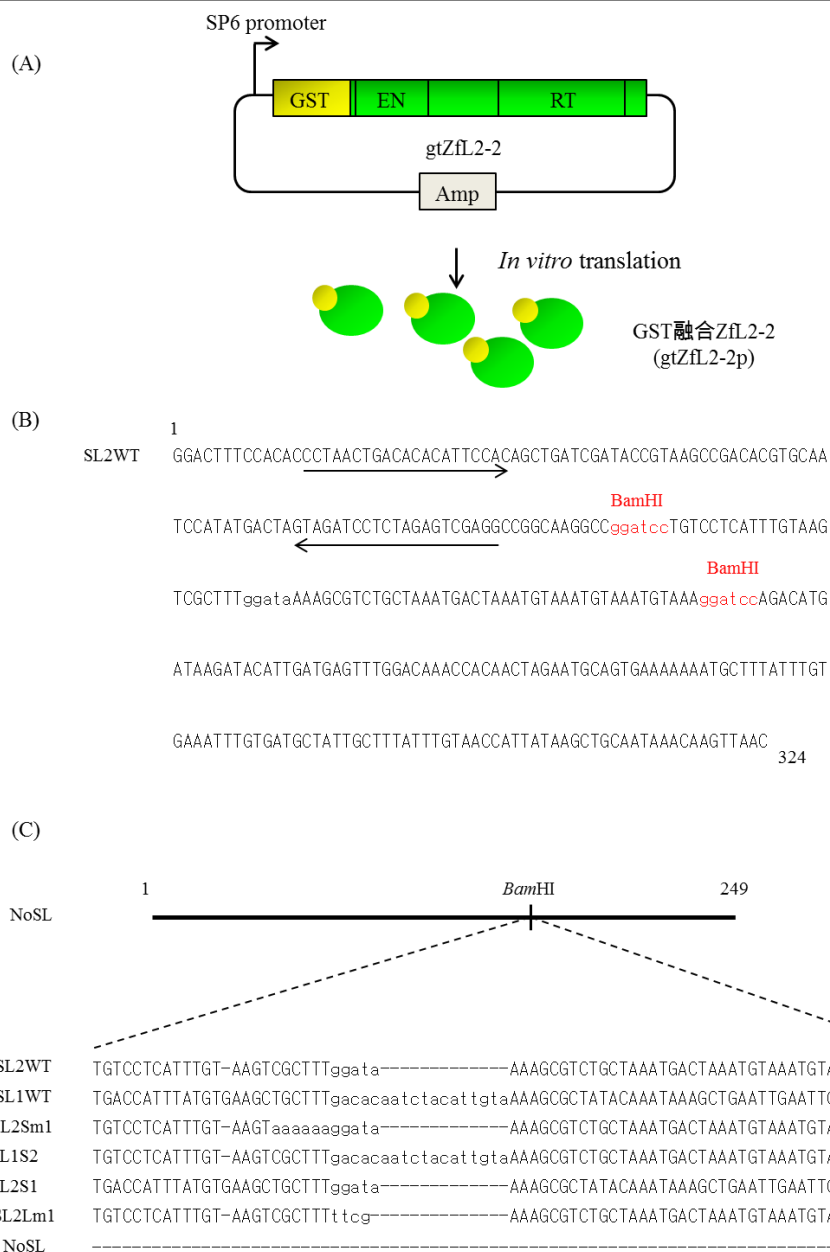


図 7 結合実験に使用した ZfL2-2 全長タンパク質および LINE RNA

(A) GST 融合 ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) の in vitro 合成。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、エンドヌクレアーゼ (EN)、逆転写酵素 (RT)、アンピシリン耐性遺伝子 (Amp)。Plasmid DNA gtZfL2-2 から in vitro translation で GST 融合 ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) を合成した。(B) 野生型 ZfL2-2 stem-loop を持つ RNA (SL2WT) の塩基配列。矢印は定量 RT-PCR プライマーの位置を示す。(C) 結合実験に使用した RNA の塩基配列模式図。SL1WT、野生型 ZfL2-1 stem-loop 配列。SL2Sm1、ZfL2-2 stem-loop の stem 変異配列。L1S2、stem 配列が ZfL2-2 で loop 配列が ZfL2-1。L2S1、stem 配列が ZfL2-1 で loop 配列が ZfL2-2。SL2Lm1、ZfL2-2 stem-loop 配列の loop 変異配列。

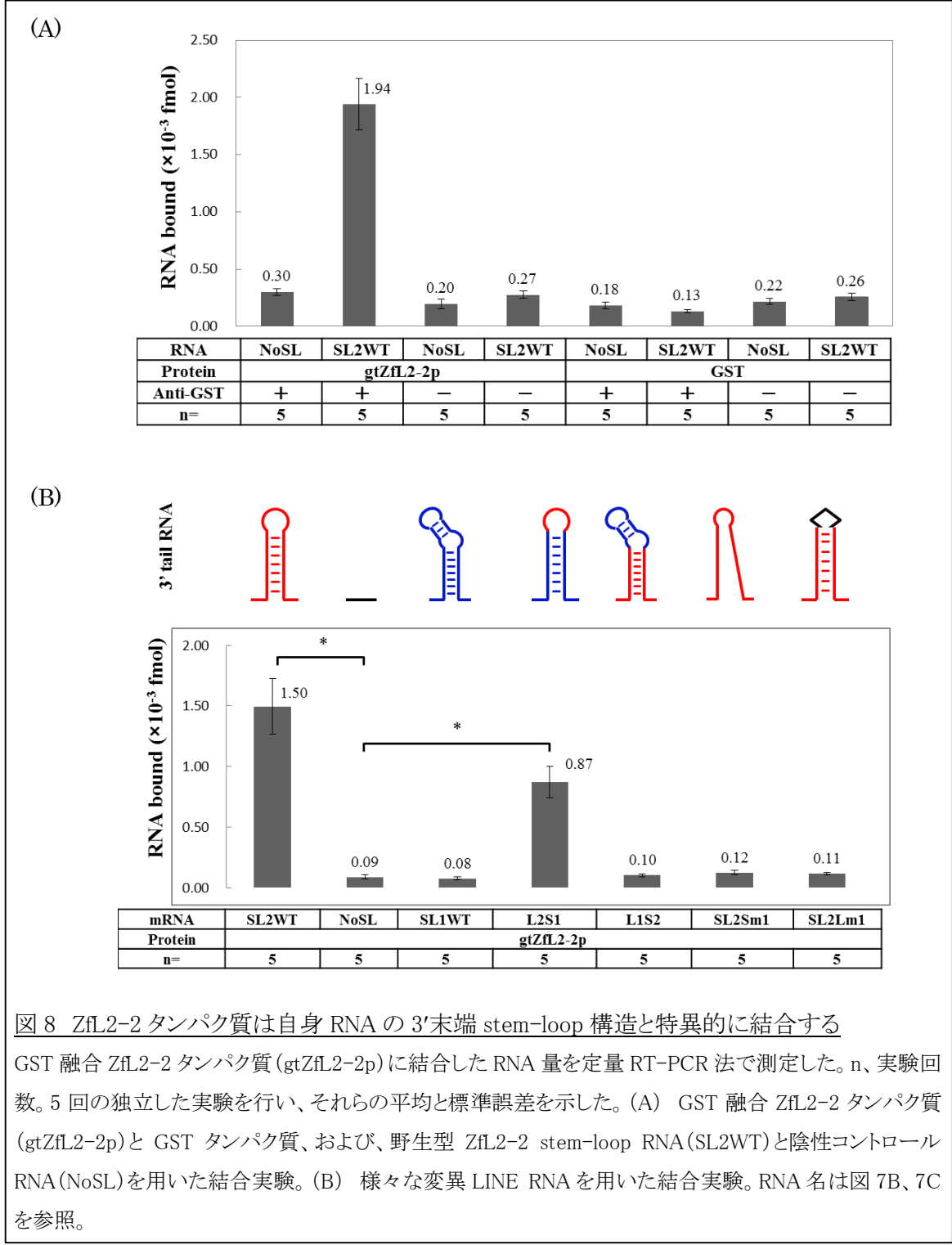


図 8 ZfL2-2 タンパク質は自身 RNA の 3'末端 stem-loop 構造と特異的に結合する

GST 融合 ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) に結合した RNA 量を定量 RT-PCR 法で測定した。n、実験回数。5 回の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。(A) GST 融合 ZfL2-2 タンパク質 (gtZfL2-2p) と GST タンパク質、および、野生型 ZfL2-2 stem-loop RNA (SL2WT) と陰性コントロール RNA (NoSL) を用いた結合実験。(B) 様々な変異 LINE RNA を用いた結合実験。RNA 名は図 7B、7C を参照。

3.4 ZfL2-2 タンパク質内に存在する RNA 結合領域の探索

ZfL2-2 タンパク質のどの領域が自身 RNA の stem-loop 構造との結合にかかわるのか探索した(図 9)。

ZfL2-2 とその近縁な LINE のコードする ORF2 タンパク質には、その C 末端に転移に必須だが機能未知の保存領域が存在する(Kajikawa et al., 2004)。そこで、この機能未知保存領域が LINE RNA との結合に関与するか否か検証するため、保存領域内の 934 番目のトリプトファン(W)をアラニン(A)に置換したタンパク質変異体を作製し RNA 結合実験を行った(図 9h; gtZf2-2(W934A)p)。また、LINE タンパク質のエンドヌクレアーゼ活性に必要な 237 番目のアスパラギン酸(D)をアラニン(A)に置換した変異体、逆転写酵素活性に必要な 689 番目のアスパラギン酸(D)をチロシン(Y)に置換した変異体も作製し、同様に転移実験を行った(図 9a、9g; gtZf2-2(D237A)p、gtZf2-2(D689Y)p)。その結果、これら 3 つの変異体すべてにおいて、ZfL2-2 RNA の 3'末端 stem-loop 構造(SL2WT)に特異的な RNA 結合が検出され、これらの領域が RNA との特異的結合に関与する証拠は得られなかった。

ゼブラフィッシュ ZfL2-2 の 3'末端 stem-loop 配列とほぼ同一の 3'末端配列をもつ LINE は、ゼブラフィッシュ以外の魚類でも発見されている。これらの LINE うち、ウナギゲノム内に存在するものは UnaL2(Kajikawa and Okada, 2002)、トゲウオゲノム内に存在するものは GaL2-2(Repbase から配列を取得)、サケゲノム内に存在するものは SsL2(Repbase から配列を取得)と呼ばれる。これら LINE の 3'末端配列を図 10B に示すが、ほぼ同一である。この 4 種のコードする LINE タンパク質は全体にわたって高い相同性を示す。そのため、これら 4 種の LINE タンパク質の相同性解析では機能性領域を同定することは困難である、しかし私は、この 4 種の LINE と ZfL2-1 LINE のタンパク質を比較することで、エンドヌクレアーゼ領域と逆転写酵素領域の間に、塩基性アミノ酸に富んだ保存性の高い領域を発見した(図 10; 横線部)。そこで、エンドヌクレアーゼ領域と逆転写酵素領域の間に自身 RNA との結合領域が存在するのではないかと考え、この領域に点変異を導入した変異体タンパク質を 5 種作製し、RNA 結合を行った(図 9b-f; gtZfL2-2(P311R)p、gtZfL2-2(W325A)p、gtZfL2-2(R334A)p、gtZfL2-2(W344A)p、gtZfL2-2(K419I)p (変異体の記載法は上記と同様))。その結果、2 つの変異体タンパク質、gtZfL2-2(W325A)p と gtZfL2-2(R334A)p、で自身 RNA との結合が検出されなくなった。この 2 種の変異体タンパク質が発現していない可能性も考えられるため、タンパク質の非特異的逆転写酵素活性を測定したところ、どちらの変異体タンパク質も野生型 ZfL2-2 タンパク質と同等の活性を示したことから、少なくとも逆転写活性を保持した状態で発現されていることが確認された(図 11)。これらの結果は、ZfL2-2 タンパク質のエンドヌクレアーゼ領域と逆転写酵素領域の間に自身 RNA との結合に関与する領域が存在することを示唆する。

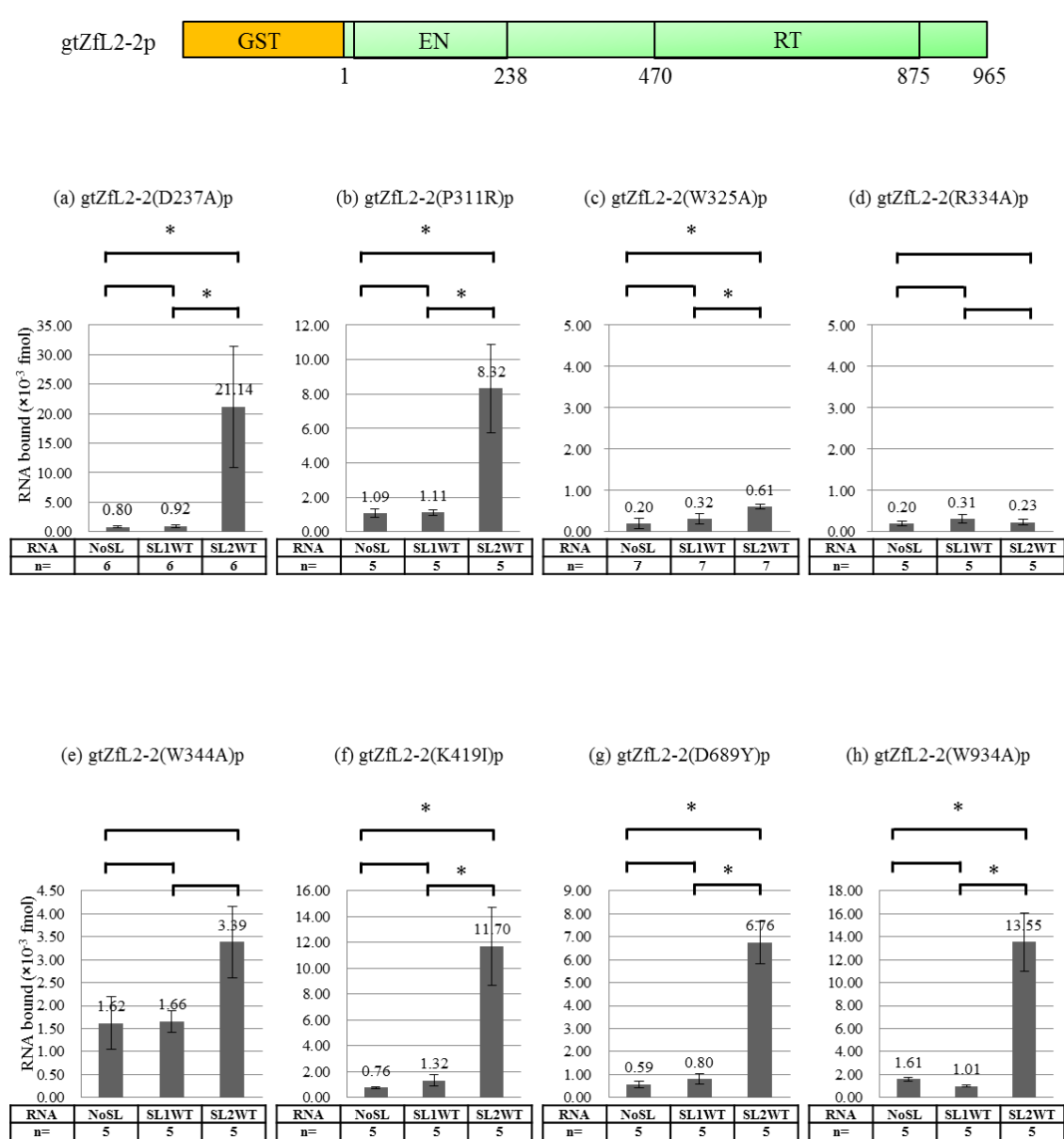
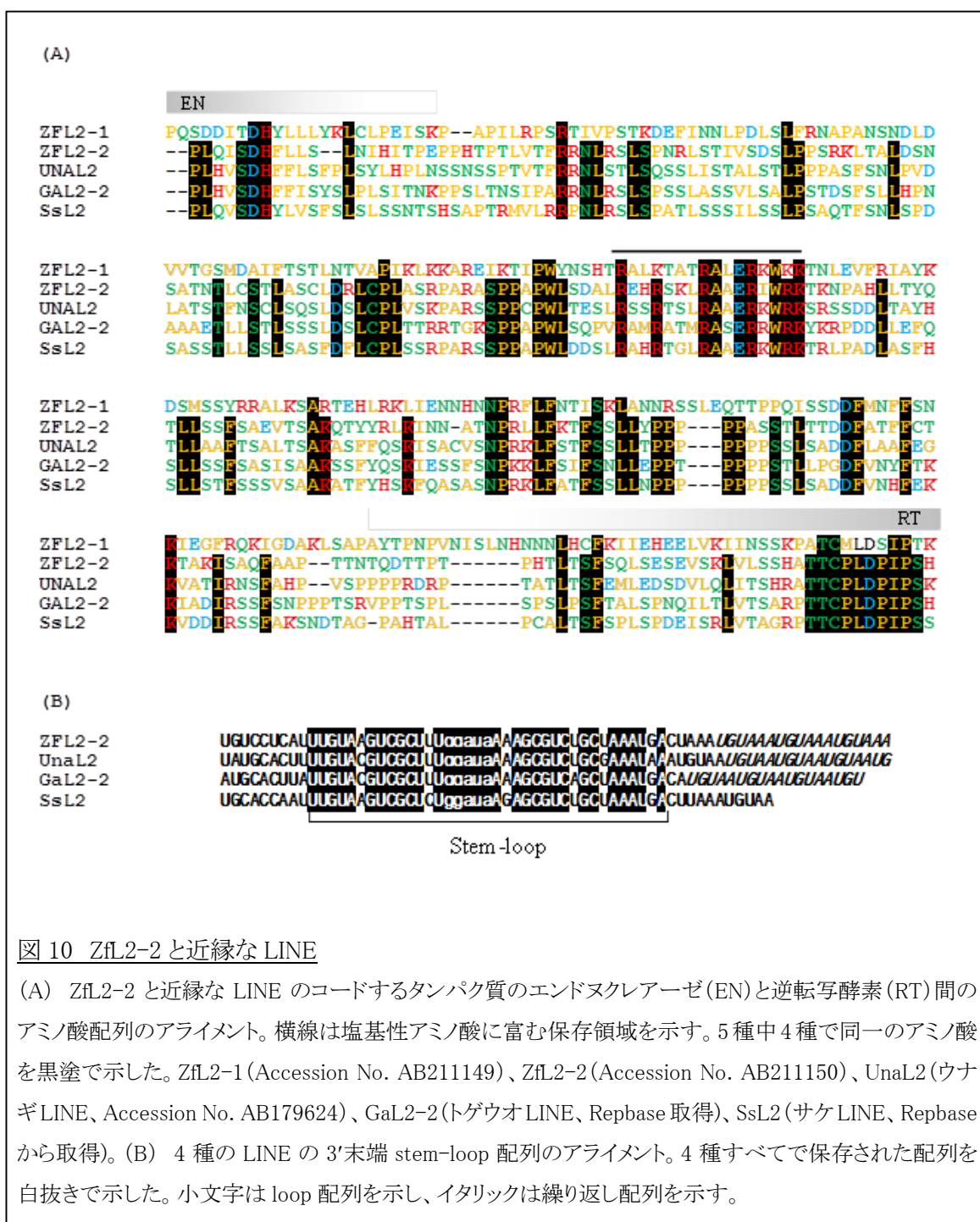
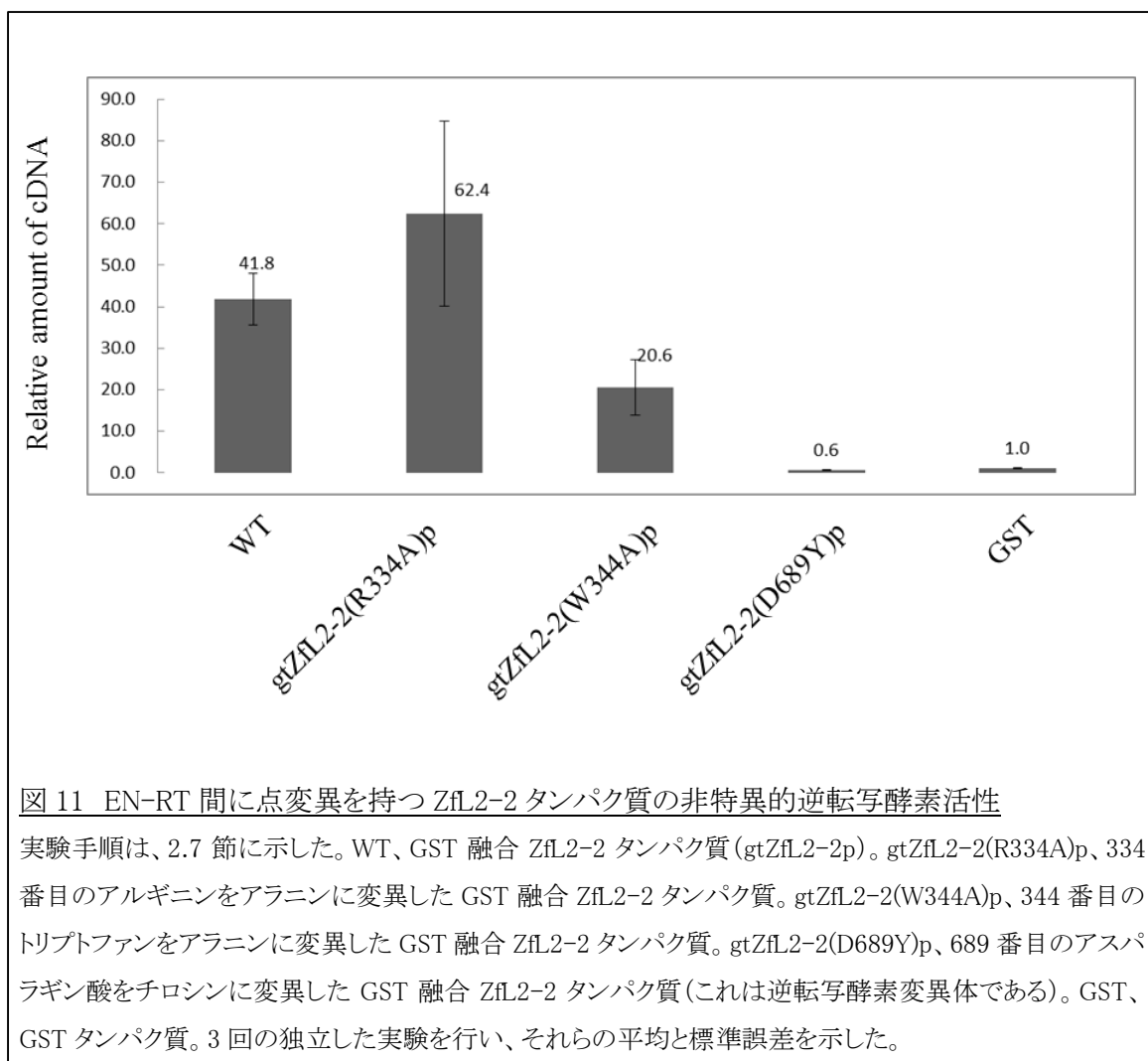


図9 GST 融合 ZfL2-2 タンパク質変異体の RNA 結合実験

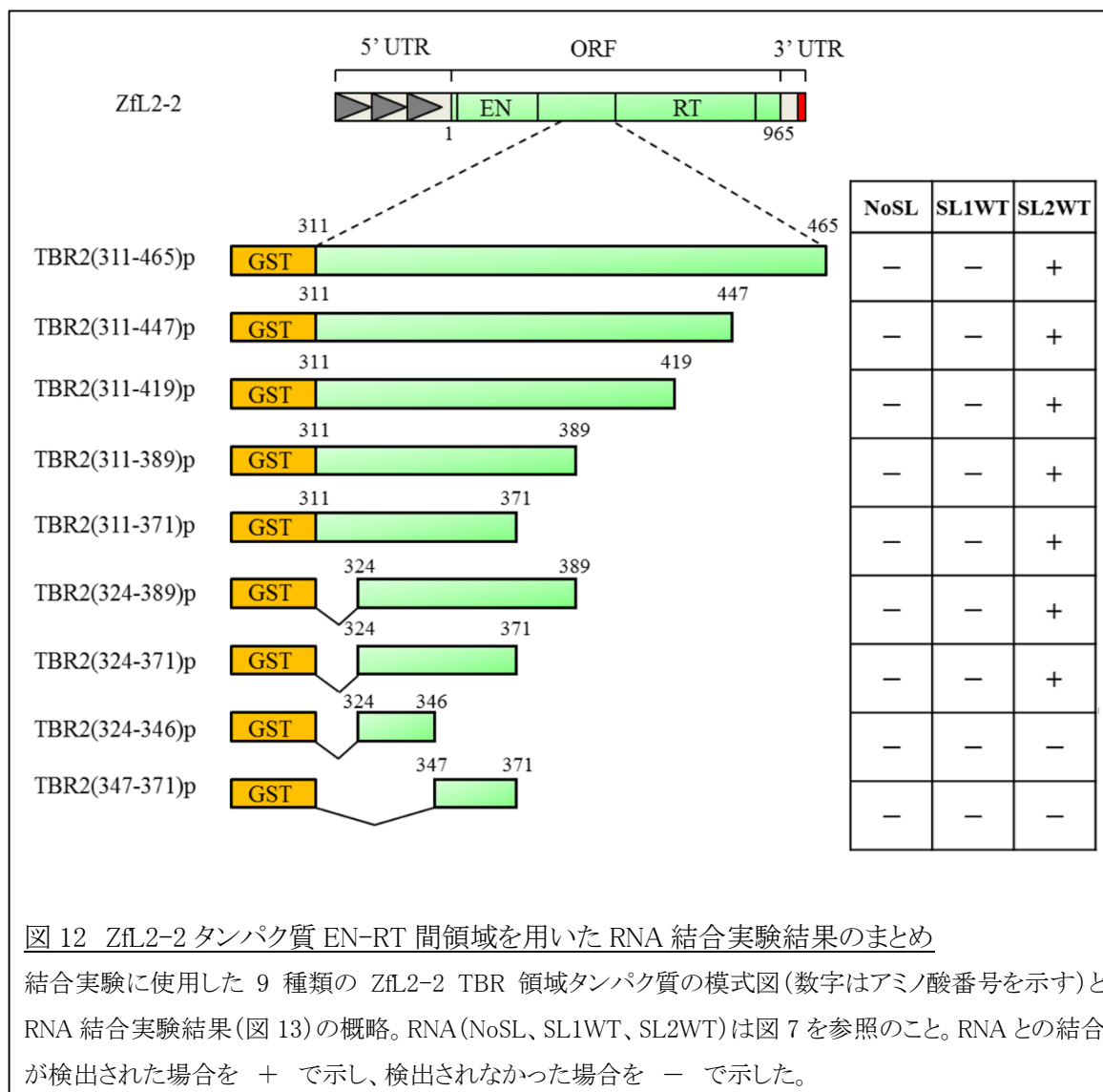
ZfL2-2 タンパク質のアミノ酸に点変異を導入し、stem-loop RNA との結合実験を行った。GST 融合 ZfL2-2 タンパク質(gtZfL2-2p)の模式図とアミノ酸番号を上部に示した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、エンドヌクレアーゼ(EN)、逆転写酵素(RT)。(a) gtZfL2-2(D237A)p 変異体の結果。(b) gtZfL2-2(P311R)p 変異体の結果。(c) gtZfL2-2(W325A)p 変異体の結果。(d) gtZfL2-2(R334A)p 変異体の結果。(e) gtZfL2-2(W344A)p 変異体の結果。(f) gtZfL2-2(K419I)p 変異体の結果。(g) gtZfL2-2(D689Y)p 変異体の結果。(h) gtZfL2-2(W934A)p 変異体の結果。n、実験回数。それぞれの実験は5回以上の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。





3.5 ZfL2-2 タンパク質の EN-RT 領域は自身 RNA との特異的結合に必要十分である

ZfL2-2 タンパク質の EN と RT の間の領域のみで自身 RNA の 3'末端 stem-loop 構造と結合できるかどうか検証するため、ZfL2-2 タンパク質の EN~RT 間領域と GST との融合タンパク質を作製した。ZfL2-2 タンパク質の EN~RT 間領域を TBR2 (Tail Binding Region, 2 は ZfL2-2 の略) と命名し、例えば 311 番目から 465 番目のアミノ酸をコードする場合、TBR2(311-465)p と表記した。作製した 9 種類の TBR2 タンパク質の概略を図 12 に示す。また、その結合実験結果を、図 13 に示す。図 13 の結合実験において、RNA との結合が観察されたものを +、観察されなかったものを -、として、図 12 にまとめた。図 11、12 が示すように、ZfL2-2 タンパク質の 324 番目から 371 番目のわずか 48 アミノ酸だけで、自身 RNA の 3'末端 stem-loop と特異的に結合できる、すなわち、自身 (ZfL2-2) の RNA (SL2WT) と ZfL2-1 の RNA (SL1WT) を区別して結合できる、ことが明らかとなった。



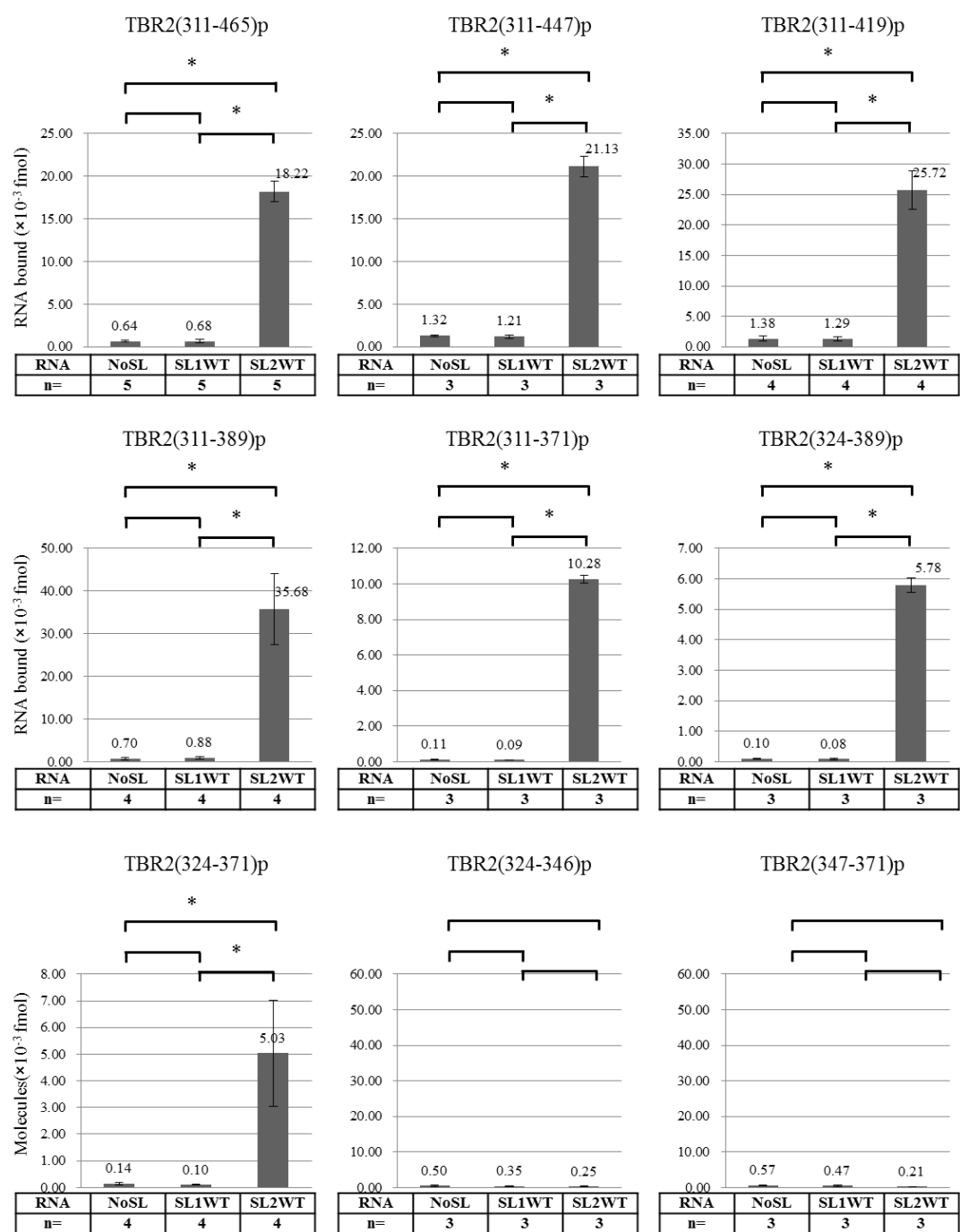
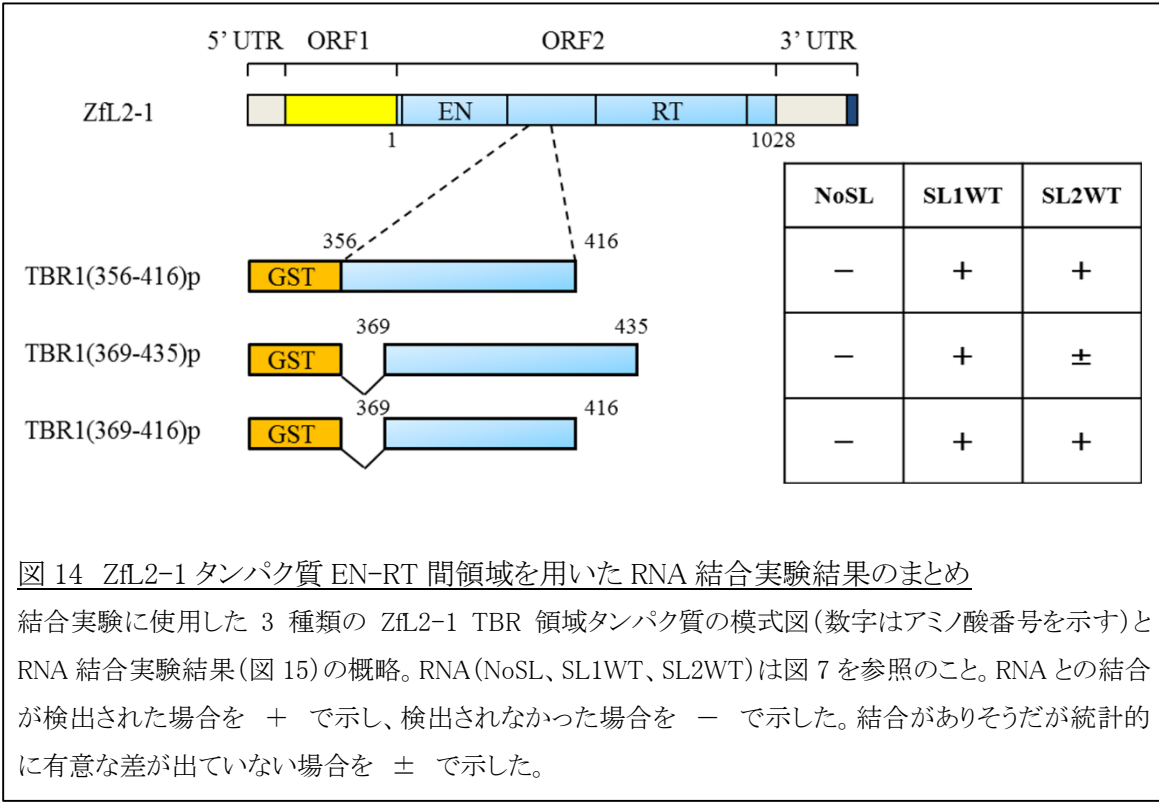


図 13 Zfl2-2 TBR2 タンパク質を用いた RNA 結合実験

各 TBR2 タンパク質の構造は図 12 を参照のこと。RNA (NoSL、SL1WT、SL2WT) は図 7 を参照のこと。n、実験回数。3 回以上の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。

3.6 ZfL2-1 タンパク質も ZfL2-2 と同様の EN-RT 領域で自身 RNA と結合する

次に、ZfL2-1 タンパク質にも同様の RNA 結合領域が存在するかどうか検証するため、ZfL2-1 タンパク質を使用して RNA 結合実験を行った。上記の実験と同様、ZfL2-1 タンパク質の EN~RT 間領域と GST との融合タンパク質を作製した。ZfL2-1 タンパク質の EN~RT 間領域を TBR1 (Tail Binding Region, 1 は ZfL2-1 の略) と命名し、例えば 356 番目から 416 番目のアミノ酸をコードする場合、TBR1(356-416)p と表記した。作製した 3 種類の TBR2 タンパク質の概略を図 14 に示す。また、その結合実験結果を、図 15 に示す。図 15 の結合実験において、RNA との結合が観察されたものを +、観察されなかったものを -、結合しているようだが統計的有意差が検出できなかったものを ±、として図 14 にまとめた。図 14、15 が示すように、ZfL2-1 タンパク質の 369 番目から 416 番目のわずか 48 アミノ酸だけで、自身 RNA の 3'末端 stem-loop とできることが示された。興味深いことに ZfL2-1 TBR1 タンパク質は、自身の ZfL2-1 RNA のみならず ZfL2-2 RNA とも結合できることが示された。しかし、LINE stem-loop RNA を含まない NoSL RNA とは結合しておらず、これらの結合が、単なる非特異的なものでないことが分かる。



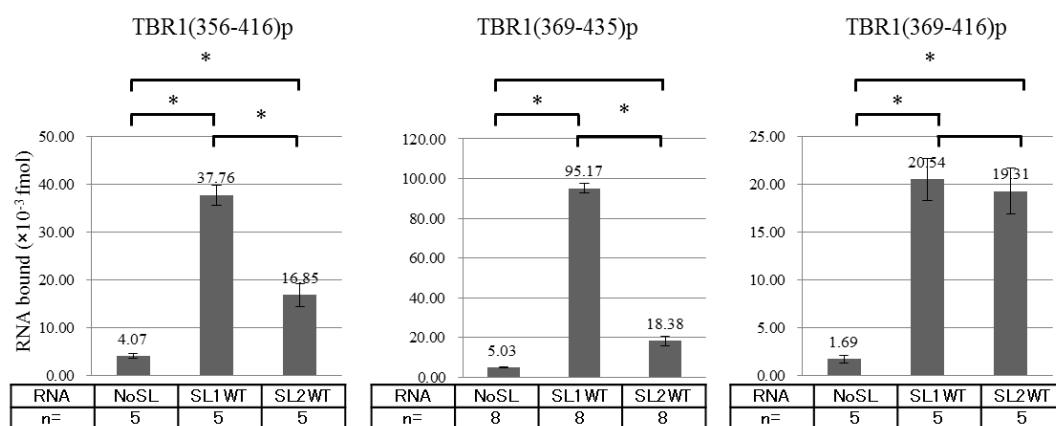


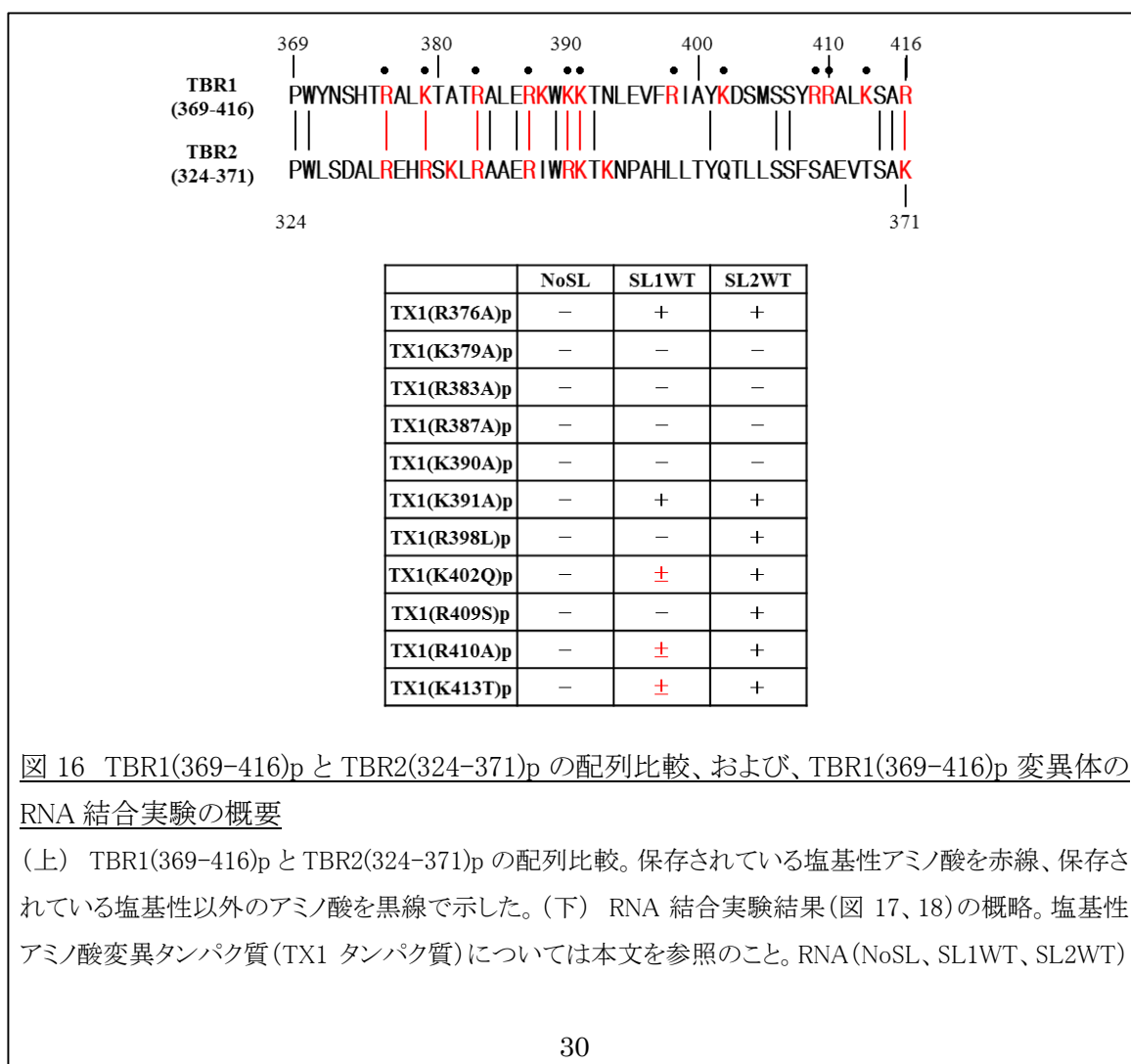
図 15 ZfL2-1 TBR1 タンパク質を用いた RNA 結合実験

各 TBR1 タンパク質の構造は図 14 を参照のこと。RNA (NoSL、SL1WT、SL2WT) は図 7 を参照のこと。n、実験回数。5 回以上の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。

3.7 TBR 内の塩基性アミノ酸は LINE RNA との結合に関与する

ここまでの実験で、ゼブラフィッシュ LINE ZfL2-2 と ZfL2-1 のタンパク質はともに、そのエンドヌクレアーゼと逆転写酵素の間の領域 (以後 TBR 領域と呼ぶ) で自身 RNA の 3' 末端 stem-loop 構造と結合していることが示された。本研究で同定できた RNA 結合に必要な最小の TBR 領域を図 16 に示す。この最小領域はどちらもその長さが 48 アミノ酸であり、~40% の相同性を持つ。特に RNA (酸性) との結合に関与すると予想される塩基性アミノ酸の位置に高い保存性が見られた。しかし一方で、塩基性アミノ酸位置の保存性は TBR 最小領域の N 末端側領域に集中しており、C 末端側には ZfL2-1 にしか存在しない塩基性アミノ酸が多く存在した。私は、これら保存性の違う塩基性アミノ酸が RNA 結合とどう関与するか検証するため、ZfL2-1 と ZfL2-2 の両方の stem-loop RNA に結合した ZfL2-1 の最小 TBR タンパク質、TBR1(369-416)p を持ちいて実験を行った。実験は、TBR1(369-416)p の塩基性アミノ酸に変異を導入し、その変異タンパク質の RNA 結合能を測定した。変異タンパク質の名前は、例えば、TBR1(369-416)p の 376 番目のアルギニン(R)をアラニン(A)に変異させた場合、TX1(R376A)p とした。まず、位置保存性のある 6 つの塩基性アミノ酸に変異を導入し、それら変異タンパク質の RNA 結合能を解析した。その結果を図 17 に示す。また、結果の概要を図 16 に示す。6 変異中 2 つでは野生型同様、ZfL2-1 RNA および ZfL2-2 RNA のどちらとも結合できた (図 16、17; TX1(R376A)p、TX1(K391A)p)。一方、4 変異では両 LINE RNA (SL1WT、SL2WT) との結合能が失われた (図

16, 17; TX1(K379A)p, TX1(R383A)p, TX1(R387A)p, TX1(K390A)p)。この結果は、位置保存性のある塩基性アミノ酸の多くが、ZfL2-1 タンパク質においても ZfL2-2 タンパク質においてもそれぞれの LINE RNA との結合に関与していることを示唆する。次に、位置保存性の無い塩基性アミノ酸、すなわち、ZfL2-1 の TBR にしか存在しない塩基性アミノ酸に変異を導入し、RNA 結合実験を行った(図 16、18)。変異を導入した 5 つのうち、3 つでは、ZfL2-2 RNA (SL2WT)とは結合できるが ZfL2-1 RNA (SL1WT)とは結合できなくなった(図 16、18; TX1(R398L)p, TX1(K402Q)p, TX1(R409S)p)。また、残りの 2 つにおいても、ZfL2-2 RNA (SL2WT)との結合の方が ZfL2-1 RNA (SL1WT)よりも強い結果が得られた(図 16、18; TX1(R410A)p, TX1(K413T)p)。この結果は、ZfL2-1 TBR にのみ存在する塩基性アミノ酸の多くが ZfL2-1 RNA との結合にのみ必要なアミノ酸であることを示唆する。この可能性をさらに検証するため、ZfL2-1 TBR にのみ存在する塩基性アミノ酸の二重変異体を作製し結合実験を行った(図 19)。その結果は、ZfL2-1 の最小 TBR 領域の C 末端側に存在する、ZfL2-2 には存在しない塩基性アミノ酸は、ZfL2-1 RNA の結合は必要だが ZfL2-2 RNA との結合には必要ないこと示していた。



は図 7 を参照のこと。RNA との結合が検出された場合を $+$ で示し、検出されなかった場合を $-$ で示した。結合がありそうだが統計的に有意な差が出ていない場合を $\pm$ で示した。

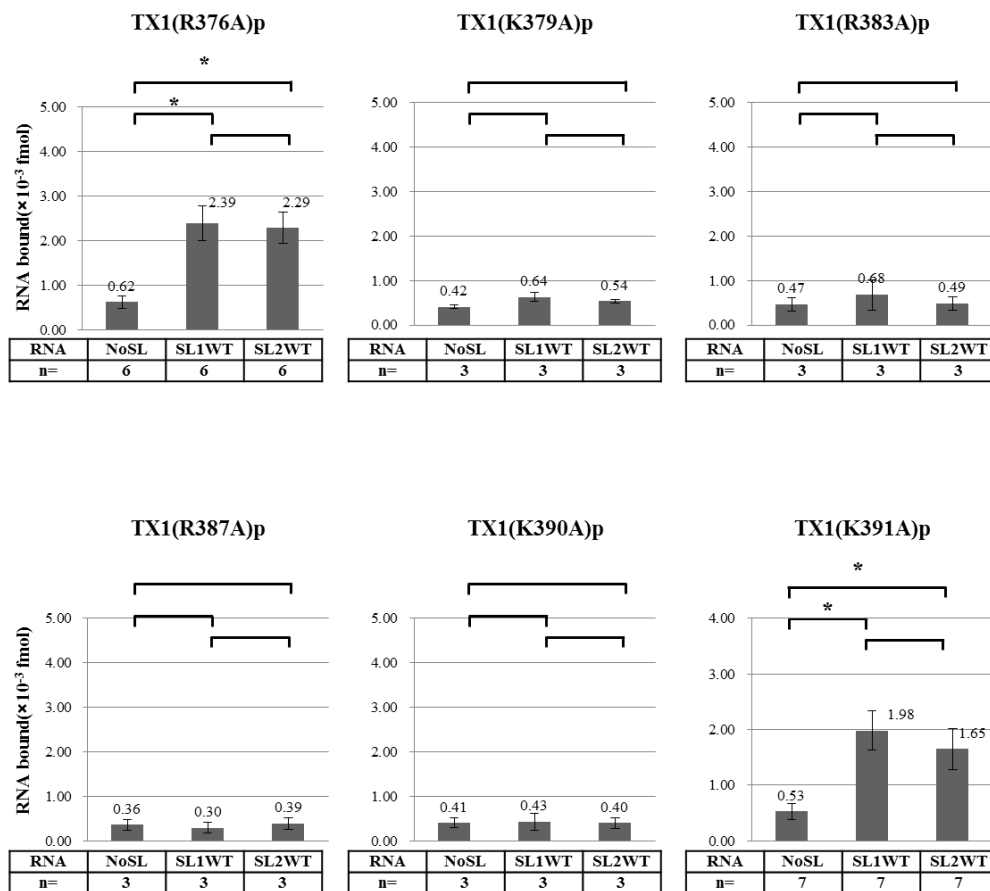


図 17 TBR1(369-416)p の保存された塩基性アミノ酸の変異体解析

TBR1(369-416)p の塩基性アミノ酸のうち、TBR1(369-416)p と TBR2(324-371)p でその位置が保存されている塩基性アミノ酸に変異を導入し、RNA 結合実験を行った。各変異タンパク質については本文および図 16 を参照のこと。RNA (NoSL, SL1WT, SL2WT) は図 7 を参照のこと。n、実験回数。3 回以上の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。

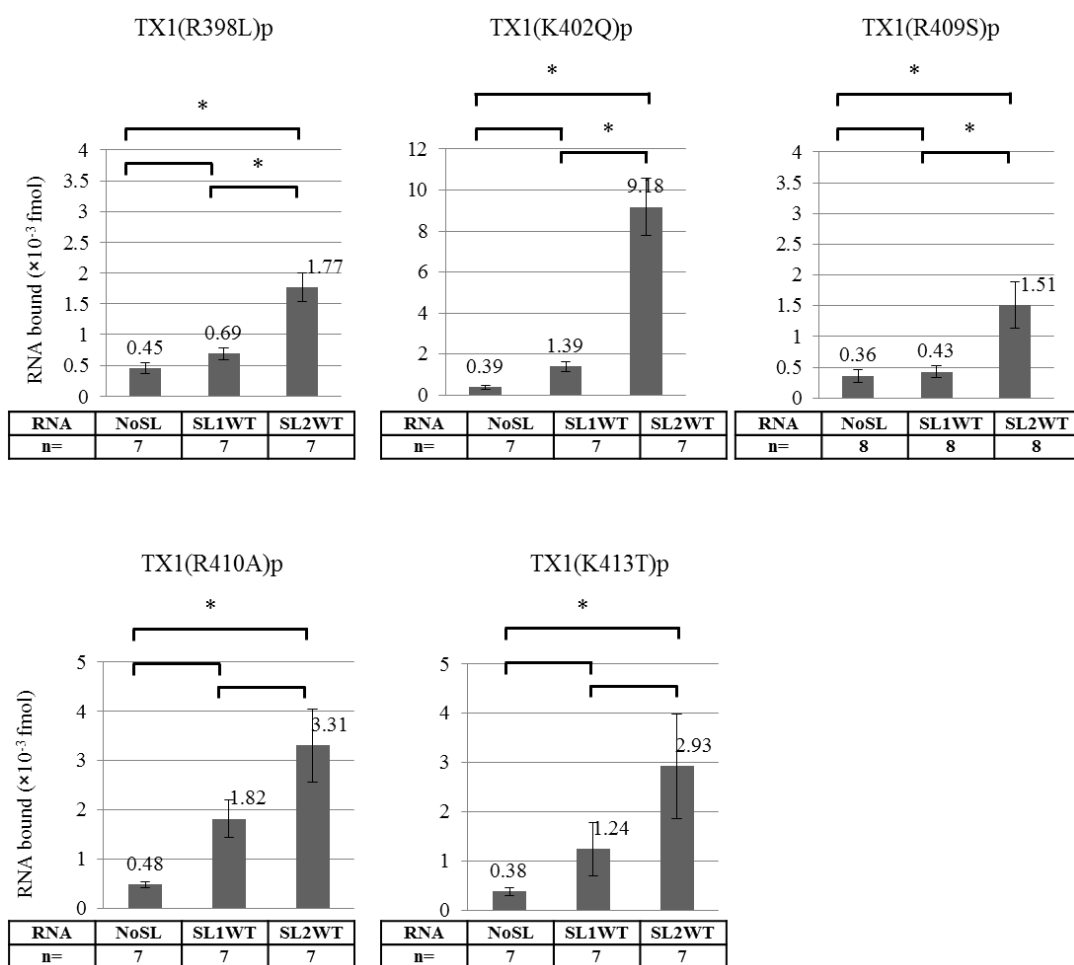
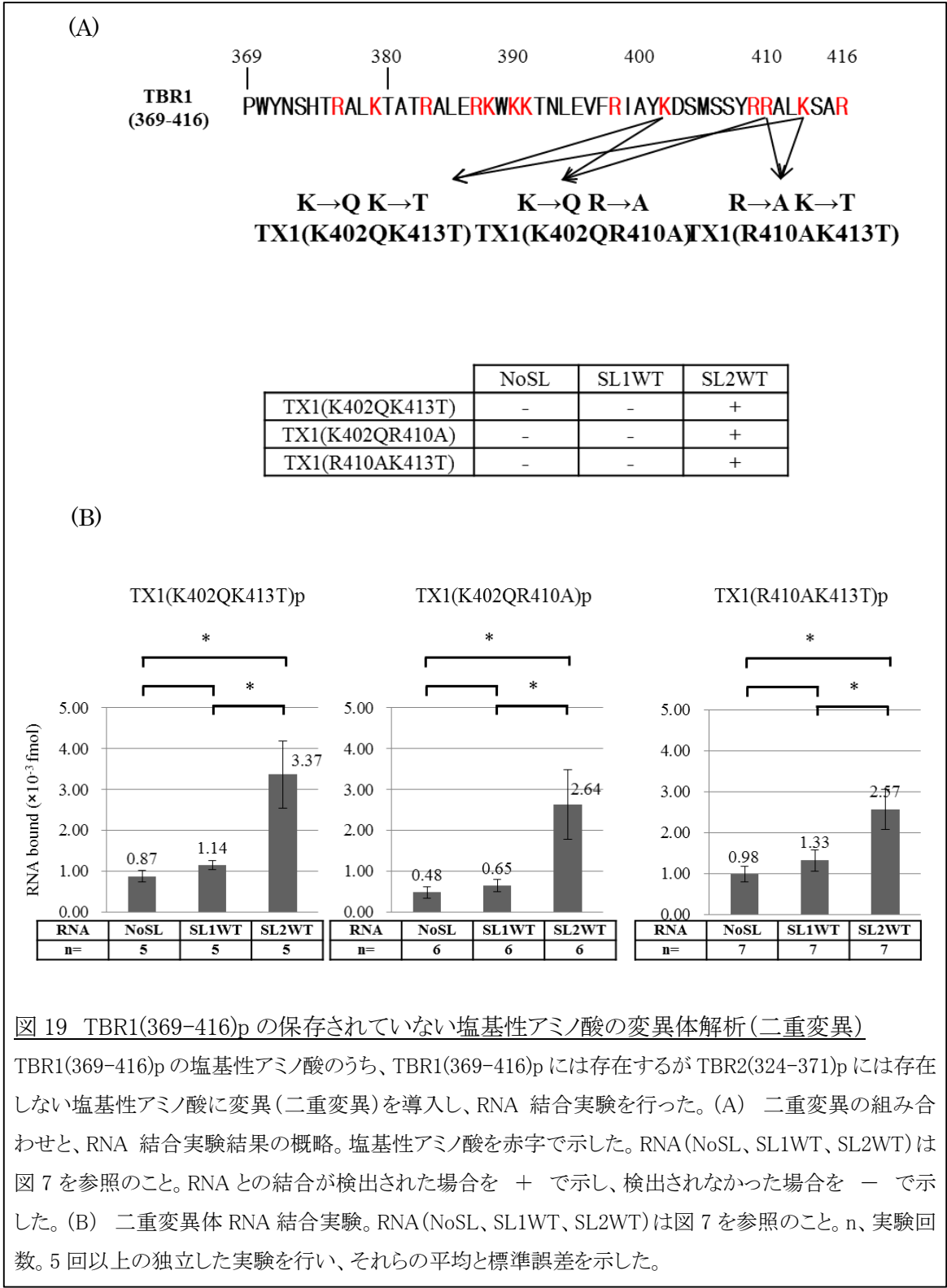


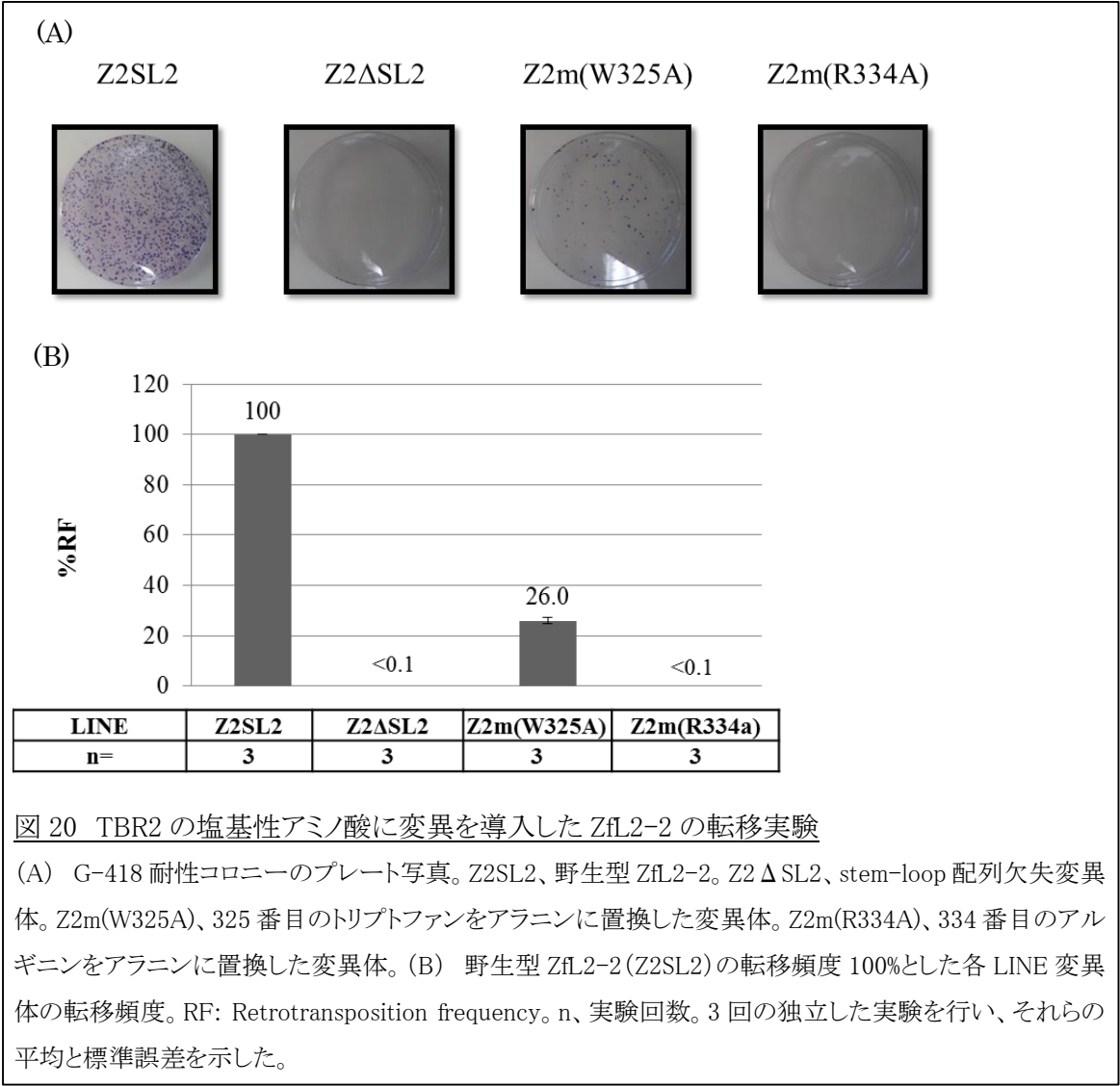
図 18 TBR1(369-416)p の保存されていない塩基性アミノ酸の変異体解析(点変異)

TBR1(369-416)p の塩基性アミノ酸のうち、TBR1(369-416)p には存在するが TBR2(324-371)p には存在しない塩基性アミノ酸に変異(点変異)を導入し、RNA 結合実験を行った。各変異タンパク質については本文および図 16 を参照のこと。RNA (NoSL, SL1WT, SL2WT) は図 7 を参照のこと。n、実験回数。7 回以上の独立した実験を行い、それらの平均と標準誤差を示した。



3.8 TBR の塩基性アミノ酸は ZfL2-2 の転移に必須である

上記結合実験の結果から、TBR1 及び TBR2 の塩基性アミノ酸が stem-loop RNA との結合に重要である事が示された。では自身 stem-loop RNA との結合に必須である TBR 内の塩基性アミノ酸に変異を導入したゼブラフィッシュ ZfL2-2 は、転移できるか否か、転移実験により検証した。まず、ZfL2-2 TBR の 325 番目のトリプトファン(W)をアラニン(A)に置換した変異体、Z2m(W325A)を作製した。この変異は LINE RNA との結合に影響を及ぼさない(図 9)。Z2m(W325A)では、野生型と比較して1/4程度とその転移頻度は低下したものの、転移が検出された(図 20)。次に、自身の stem-loop RNA との結合を阻害する変異、334 番目のアルギニン(R)のアラニン(A)置換(図 9)を持つ変異体 Z2m(R334A)を作製し、転移実験を行った。この変異体では、stem-loop 配列の欠失変異体(Z2ΔSL2)と同様、その転移を検出する事が出来なかった(図 20)。以上の結果から、TBR 領域を介した LINE タンパク質と LINE RNA の 3'末端 stem-loop 構造との結合がゼブラフィッシュ LINE の転移に必須である事が示された。



4. 第四章 考察

4.1 L2 クレードに属する LINE の TBR 領域の同定

2 つのゼブラフィッシュ LINE、ZfL2-1 及び ZfL2-2 は、L2 クレードと呼ばれるグループに属する。ZfL2-1 及び ZfL2-2 を使用した転移実験の結果から、ZfL2-1 stem-loop 配列の stem を ZfL2-2 の stem に置き換えた Z1L1S2、また ZfL2-2 stem-loop 配列の stem を ZfL2-1 の stem に置き換えた Z2L2S1 では、それぞれ転移が検出できた(図 5、6)。一方、ZfL2-1 stem-loop 配列の loop を ZfL2-2 の loop に置き換えた Z1L2S1、及び ZfL2-2 stem-loop 配列の loop を ZfL2-1 の loop に置き換えた Z2L1S2 では、共に転移効率が著しく低下した(図 5、6)。従って、ZfL2-1 及び ZfL2-2 共に自身の stem-loop 配列の loop 領域を特異的に認識している事が明らかとなった。ZfL2-1 及び ZfL2-2 stem-loop 配列の stem 領域に変異を導入した Z1Sm1, Z2Sm1 の場合でも転移効率が著しく低下した(図 2)。先行研究の結果から、ZfL2-2 stem-loop とよく似た配列を持つ UnaL2 を使用した場合、UnaL2 の stem 領域に変異を導入すると転移効率が著しく低下した(Kajikawa and Okada, 2002; Nomura et al., 2006)。すなわち、stem-loop 配列の stem 領域もまた LINE 転移に重要である事が示されている。これは stem 領域に変異を導入した事による loop 構造の変化によって、LINE が loop 領域を認識できなくなった可能性があるが、stem 領域もまた LINE タンパク質により認識されている可能性も十分に考えられる。

GST 融合 ZfL2-2 タンパク質(gtZfL2-2p)と stem-loop RNA を使用した結合実験の結果から、ZfL2-2 タンパク質は自身の stem-loop 配列の loop 領域と特異的に結合し、stem 配列を ZfL2-1 のものに置き換えた Z2L2S1 でも結合する事が示され(図 8)。一方、stem-loop 配列の stem 領域に変異を入れた SL2Sm1 では、loop 領域に変異を導入していないのにも関わらず、gtZfL2-2p との結合が検出されなくなった。これは stem 領域に変異を導入した事による loop 構造の変性によって、ZfL2-2 タンパク質が loop 領域と結合できなくなった可能性あるいは、stem 領域も ZfL2-2 タンパク質により認識されている可能性がある。即ち転移実験で得られた実験結果が、結合実験で得られた結果と相関している事が明らかとなり、細胞内で起きている現象を in vitro の実験系で示す事が出来た。また今回の結合実験結果は、ORF2 タンパク質と自身 RNA との結合を示す事ができた初めての例である。本実験系を使用する事で L1 や他のグループに属する LINE ORF2 タンパク質の RNA 結合領域も明らかにする事が可能になるだろう。

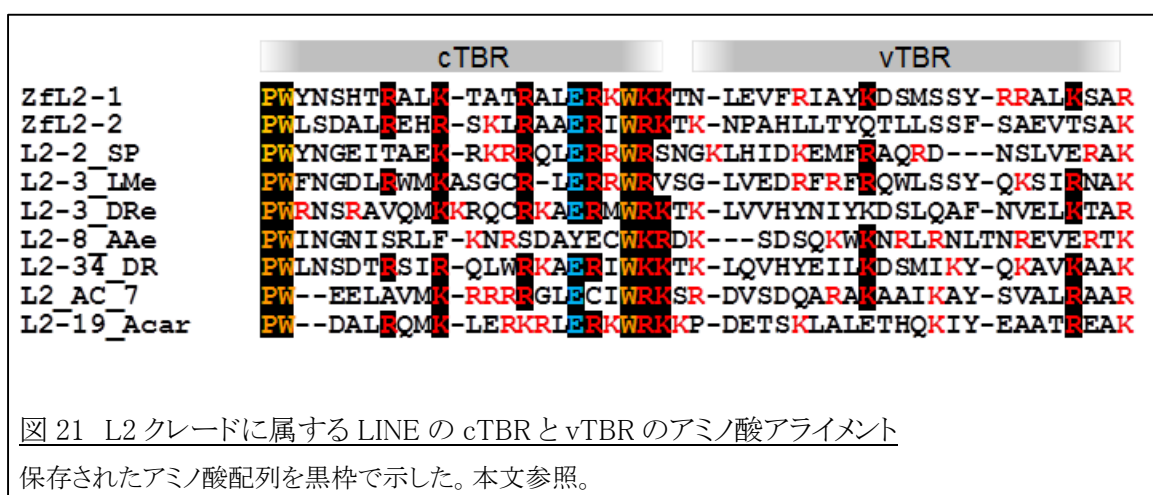
4.2 TBR の保存領域と非保存領域

これまで LINE にコードされた ORF1 タンパク質が自身 LINE RNA と結合するという報告はあるものの、ORF2 タンパク質が自身の RNA と結合するという報告はなされていない。今回 ZfL2-2 タンパク質(ORF2 タンパク質に相当)を使用した結合実験により、ORF2 タンパク質と自身 RNA との特異的な結合を示す事が出来た。また ZfL2-2 のエンドヌクレアーゼ(EN)と逆転写

酵素 (RT) の間の塩基性アミノ酸に富む領域 (約 50 アミノ酸) が、stem-loop RNA との結合に関与する事も示すことができた (ZfL2-1 TBR1(369-416)p 及び ZfL2-2 TBR2(324-371)p)。

ZfL2-1 の 369 番目のプロリン (P) から 391 番目のリジン (K) までの 23 アミノ酸からなる領域 TBR1(369-391) と ZfL2-2 の 324 番目のプロリン (P) から 346 番目のリジン (K) までの 23 アミノ酸からなる領域 TBR2(324-346) を比較すると、相同性が高い (図 16)。興味深い事に、この領域は L2 クレードに属する複数の LINE においても高く保存されている事が判明した (図 21)。この高い保存性を持つ領域は、stem-loop 構造を認識するために必須の共通の領域である可能性が考えられる。私は、この 23 アミノ酸からなる領域を common TBR (cTBR) と名付けた。この cTBR における ZfL2-1 と ZfL2-2 の共通する塩基性アミノ酸に変異を導入した場合 (TX1(R376A)p、TX1(K379A)p、TX1(R383A)p、TX1(R387A)p、TX1(K390A)p 及び TX1(K391A)p)、4 つの変異タンパク質では、ZfL2-1 RNA (SL1WT)、ZfL2-2 RNA (SL2WT) 共に結合できなくなった (図 16、17)。この結果は、これら 4 つの塩基性アミノ酸が ZfL2-1 及び ZfL2-2 stem-loop RNA の共通の構造、例えば stem 構造、を認識することを示しているのかもしれない。また、TBR2 の cTBR に存在する 324 番目のプロリン (P)、325 番目のトリプトファン (W)、341 番目のグルタミン酸 (E) 及び 344 番目のトリプトファン (W) も L2 クレードの LINE 間で保存されている (図 21)。ZfL2-2 タンパク質の 344 番目のトリプトファン (W) をアラニン (A) に置換した場合、自身 stem-loop RNA との結合は観察された (図 9e; gtZfL2-2(W344A)p)。一方 325 番目のトリプトファン (W) をアラニン (A) に置換した場合、自身 stem-loop RNA との結合は観察されなかった (図 9c; gtZfL2-2(W325A)p)。この結果は、cTBR の塩基性アミノ酸に加えて、cTBR で保存されているアミノ酸もまた stem-loop RNA との結合に関与している可能性を示す。

ZfL2-1 の 392 番目のスレオニン (T) から 416 番目のアルギニン (R) までの 25 アミノ酸からなる領域 TBR1(392-416) と ZfL2-2 のスレオニン (T) から 371 番目のリジン (K) までの 25 アミノ酸からなる領域 TBR2(347-371) 間の相同性は低い (図 16)。この領域は L2 クレードに属する複数の LINE でも cTBR とは異なり相同性が低い (図 21)。私は、この 25 アミノ酸からなる領域を variable TBR (vTBR) と名付けた。興味深い事に vTBR における ZfL2-1 のみ存在する 5 つの塩基性アミノ酸のそれぞれ変異を導入した場合 (TX1(R398L)p、TX1(K402Q)p、TX1(R409S)p、TX1(R410A)p 及び TX1(K413T)p)、全ての変異タンパク質で ZfL2-2 RNA (SL2WT) との結合は検出されたものの、ZfL2-1 RNA (SL1WT) との結合は弱くなったかあるいは検出されなくなった (図 16、18)。この結果は、vTBR の塩基性アミノ酸が自身 stem-loop RNA の loop 領域との結合に関与することを示すのかもしれない。即ち、それぞれの LINE が自身 RNA と特異的に結合して転移できるように、vTBR のアミノ酸配列を変化させているのかもしれない。



4.3 relaxed type LINE の RNA 認識機構

LINE は、逆転写反応時に自身 RNA の 3'末端配列を特異的に認識する stringent type と特異的に認識しない relaxed type の 2 つに分類できると考えられている (Okada et al., 1997)。本実験で使用した 2 つのゼブラフィッシュ LINE ZfL2-1 と ZfL2-2 は stringent type に分類される。本研究により、ZfL2-1 及び ZfL2-2 の自身 RNA の 3'末端配列 (stem-loop RNA) の特異的認識は、LINE タンパク質と stem-loop RNA との結合により成し遂げられることが示された。一方、relaxed type の代表はヒト L1 である。L1 の場合、polyA tail を認識して転移すると考えられている。そのため L1 RNA 以外にも宿主 mRNA の poly A tail も認識する事が可能である。事実、ヒトゲノム中には L1 によって‘コピー’された 8000 以上ものレトロ偽遺伝子が存在している (Mandal et al., 2013)。また、ヒト L1 配列を含んだプラスミド DNA を HeLa 細胞に導入し、L1 タンパク質を発現させ、精製した L1 タンパク質複合体には、L1 RNA に加えて宿主 mRNA が多量に含まれていることが報告されている (Kulpa and Moran, 2006)。しかし一方で、L1 タンパク質複合体は多くの宿主 mRNA を含んでいるにもかかわらず、L1 は宿主 mRNA よりも自身の L1 RNA を特異的に認識して転移している。この機構は cis-preference と呼ばれる。近年、ヒト L1 ORF2 タンパク質の C 末端領域に非特異的な RNA 結合領域がある事が報告された (Piskareva et al., 2013)。しかし、この RNA 結合領域と自身配列を特異的に認識して転移している事との関連性は明らかにされていない。

現在まで cis-preference の分子機構は明らかにされていないが、この機構は L1 ORF2 タンパク質と自身 RNA が特異的に結合する事で起こる可能性が考えられる。そのため、L1 にも ZfL2-2 の TBR 様領域があると推察されたが、配列の保存性からは発見できなかった。R2 クレードに属する R2Bm では、ZfL2-1 や ZfL2-2 の TBR と類似したアミノ酸配列ではないが、逆転写酵素の上流に自身 RNA と結合する領域が存在することを Eichbush らのグループが発見している (Jamburuthugoda and Eickbush, 2014)。従って、L1 の場合でも EN と RT の間に L1 RNA と結合する領域が存在するのかもしれない。

今回私は、ゼブラフィッシュ LINE を用いた研究で、ORF2 タンパク質が TBR を介して自身 RNA と特異的に結合することを示した。LINE タンパク質と LINE RNA の結合様式の一般性や特異性を解明していくことで、relaxed type の転移・増幅機構や cis-preference の分子機構が明らかにできるかもしれない。

引用文献

1. Brosius J. (1991) Retroposons—seeds of evolution. *Science*. Feb 15;251(4995):753.
2. Kazazian HH Jr, Moran JV. (1998) The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet*. May;19(1):19–24. Review.
3. Ostertag, E.M., and Kazazian, H.H., Jr. (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 35, 501–538.
4. Kazazian HH Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. Mar 12;303(5664):1626–32, Review.
5. Goodier JL, Kazazian HH Jr. (2008) Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. Oct 3;135(1):23–35.
6. Cordaux R, Batzer MA. (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet*. Oct;10(10):691–703.
7. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. Nov 29;87(5):905–16.
8. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, Gabriel A. (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*. Dec 20;254(5039):1808–10.
9. Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*. Feb 26;72(4):595–605.
10. Cost, G.J., Feng, Q., Jacquier, A., and Boeke, J.D. (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J*. Nov 1;21(21), 5899–5910.

11. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. (2002) Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. Aug 9;110(3):315-25.
12. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol*. Apr 14;357(5):1383-93.
13. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, Ichiyanagi K, Adachi N, Koyama H, Takeda S, Okada N. (2009). Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet*. Apr;5(4).
14. Malik HS, Burke WD, Eickbush TH. (1999) The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol Biol Evol*. Jun;16(6):793-805.
15. Kapitonov VV, Tempel S, Jurka J. (2009) Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. *Gene*. Dec 15;448(2):207-13.
16. Sugano T, Kajikawa M, Okada N. (2006) Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINES from zebrafish. *Gene*. Jan 3;365:74-82.
17. Ohshima K, Hamada M, Terai Y, Okada N. (1996) The 3' ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the 3' ends of long interspersed repetitive elements. *Mol Cell Biol*. Jul;16(7):3756-64.
18. Okada N, Hamada M, Ogiwara I, Ohshima K. (1997) SINEs and LINES share common 3' sequences: a review. *Gene*. Dec 31;205(1-2):229-43, Review.
19. Okada N, Hamada M. (1997) The 3' ends of tRNA-derived SINEs originated from the 3' ends of LINES: a new example from the bovine genome. *J Mol Evol*. 44 Suppl 1:S52-6.
20. Kajikawa M, Ohshima K, Okada N. (1997) Determination of the entire sequence of turtle CR1: the first open reading frame of the turtle CR1 element encodes a protein with a novel zinc finger motif. *Mol Biol Evol*. Dec;14(12):1206-17.
21. Ogiwara I, Miya M, Ohshima K, Okada N. (1999) Retropositional parasitism of SINEs on LINES: identification of SINEs and LINES in elasmobranchs. *Mol Biol Evol*. Sep;16(9):1238-50.

22. Ogiwara I, Miya M, Ohshima K, Okada N. (2002) V-SINEs: a new superfamily of vertebrate SINEs that are widespread in vertebrate genomes and retain a strongly conserved segment within each repetitive unit. *Genome Res.* Feb;12(2):316-24.
23. Kajikawa M, Okada N. (2002) LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell.* Nov 1;111(3):433-44.
24. Baba, S., Kajikawa, M., Okada, N., and Kawai, G. (2004) Solution structure of an RNA stem-loop derived from the 3' conserved region of eel LINE UnaL2. *RNA Sep*;10(9), 1380-1387.
25. Kajikawa M, Ichianagi K, Tanaka N, Okada N. (2005) Isolation and characterization of active LINE and SINEs from the eel. *Mol Biol Evol.* Mar;22(3):673-82.
26. Luan DD, Eickbush TH. (1995) RNA template requirements for target DNA-primed reverse transcription by the R2 retrotransposable element. *Mol Cell Biol.* Jul;15(7):3882-91.
27. Mathews DH, Banerjee AR, Luan DD, Eickbush TH, Turner DH. (1997) Secondary structure model of the RNA recognized by the reverse transcriptase from the R2 retrotransposable element. *RNA.* Jan;3(1):1-16.
28. Osanai M, Takahashi H, Kojima KK, Hamada M, Fujiwara H. (2004) Essential motifs in the 3' untranslated region required for retrotransposition and the precise start of reverse transcription in non-long-terminal-repeat retrotransposon SART1. *Mol Cell Biol.* Sep;24(18):7902-13.
29. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH Jr. (1996) High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell.* Nov 29;87(5):917-27.
30. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet.* Apr;24(4):363-7.
31. Dewannieux, M., Esnault, C., and Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.* Sep;35(1), 41-48.

32. Belancio VP, Whelton M, Deininger P. (2007) Requirements for polyadenylation at the 3' end of LINE-1 elements. *Gene. Apr 1*;390(1-2):98-107.
33. Dewannieux M, Heidmann T. (2005) LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res. 110(1-4)*:35-48. Review.
34. Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH, Boeke JD, Moran JV. (2001) Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol. Feb*;21(4):1429-39.
35. Kulpa DA, Moran JV. (2006) Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat Struct Mol Biol. 2006 Jul*;13(7):655-60.
36. Nomura Y, Kajikawa M, Baba S, Nakazato S, Imai T, Sakamoto T, Okada N, Kawai G. (2006) Solution structure and functional importance of a conserved RNA hairpin of eel LINE UnaL2. *Nucleic Acids Res. 34(18)*:5184-93.
37. Kajikawa M, Sugano T, Sakurai R, Okada N. (2012) Low dependency of retrotransposition on the ORF1 protein of the zebrafish LINE, ZfL2-1. *Gene. May 10*;499(1):41-7.
38. Martin, S.L. (1991) Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol. Sep*;11(9):4804-7.
39. Hohjoh H, Singer MF. (1996) Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J. Feb 1*;15(3):630-9.
40. Seleme MC, Disson O, Robin S, Brun C, Teninges D, Bucheton A. (2005) In vivo RNA localization of I factor, a non-LTR retrotransposon, requires a cis-acting signal in ORF2 and ORF1 protein. *Nucleic Acids Res. Feb 1*;33(2):776-85.
41. Kulpa DA, Moran JV. (2005) Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet. Nov 1*;14(21):3237-48.

42. Matsumoto T, Hamada M, Osanai M, Fujiwara H. (2006) Essential domains for ribonucleoprotein complex formation required for retrotransposition of telomere-specific non-long terminal repeat retrotransposon SART1. *Mol Cell Biol.* Jul;26(13):5168–79.
43. Doucet AJ, Hulme AE, Sahinovic E, Kulpa DA, Moldovan JB, Kopera HC, Athanikar JN, Hasnaoui M, Bucheton A, Moran JV, Gilbert N. (2010) Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *Plos Genet.* Oct 7;6(10) e1001150.
44. Drew, A.C., and Brindley, P.J. A retrotransposon of the non-long terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. (1997) Similarities to the chicken-repeat-1-like elements of vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* Jun;14(6), 602–610.
45. Lai CK, Mitchell JR, Collins K. (2001) RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol.* Feb;21(4):990–1000.
46. Harkisheimer M, Mason M, Shuvaeva E, Skordalakes E. (2013) A Motif in the Vertebrate Telomerase N-Terminal Linker of TERT Contributes to RNA Binding and Telomerase Activity and Processivity. *Structure.* Oct 8;21(10):1870–8.
47. Jamburuthugoda VK, Eickbush TH. (2014) Identification of RNA binding motifs in the R2 retrotransposon-encoded reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* Jun 23.
48. Ohshima K. (2012) Parallel relaxation of stringent RNA recognition in plant and mammalian L1 retrotransposons. *Mol Biol Evol.* Nov;29(11):3255–9.
49. Alemán C, Roy-Engel AM, Shaikh TH, Deininger PL. (2000) Cis-acting influences on Alu RNA levels. *Nucleic Acids Res.* Dec 1;28(23):4755–61.
50. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet.* Sep;35(1):41–8.
51. Weber MJ. (2006) Mammalian small nucleolar RNAs are mobile genetic elements. *PLoS Genet.* Dec 8;2(12).

52. Garcia-Perez JL, Doucet AJ, Bucheton A, Moran JV, Gilbert N. (2007) Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase. *Genome Res.* May;17(5):602-11.
53. Hancks DC, Goodier JL, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH Jr. (2011) Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Hum Mol Genet.* Sep 1;20(17).
54. Pei B, Sisu C, Frankish A, Howald C, Habegger L, Mu XJ, Harte R, Balasubramanian S, Tanzer A, Diekhans M, Reymond A, Hubbard TJ, Harrow J, Gerstein MB. (2012) The GENCODE pseudogene resource. *Genome Biol.* Sep 26;13.
55. Mandal PK, Ewing AD, Hancks DC, Kazazian HH Jr. Enrichment of processed pseudogene transcripts in L1-ribonucleoprotein particles. (2013) *Hum Mol Genet.* Sep 15;22(18):3730-48.
56. Okada N, Hamada M, Ogiwara I, Ohshima K. SINES and LINEs share common 3' sequences: a review. (1997) *Gene.* Dec 31;205(1-2):229-43.