

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	転移因子LINE の転移・増幅における5´連結機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	山口勝己
Author(English)	Katsumi Yamaguchi
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9928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9928号, Conferred date:2015/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

## 論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第 号	氏 名	山口 勝己
<p>(要 旨)</p> <p>Long interspersed element (LINE) は真核生物のゲノム中に存在し、自身のmRNAの逆転写反応を介してゲノム中で転移・増幅する転移因子である。エキソン領域がヒトゲノム中の約1~2%であるのに対して、LINEは、ヒトゲノムDNA中に約90万コピーと膨大な数で存在している。この膨大な数のLINE配列は、真核生物ゲノムに様々な改変をもたらし、ゲノムの複雑さやゲノム進化に影響を与えてきたと考えられている。しかし、LINEがどのようにして、これほどまでに莫大なコピーを獲得するに至ったのか、その転移・増幅機構は解明されていない部分が多い。</p> <p>これまでに考えられているLINEの転移・増幅は、自身配列の転写から始まる。転写されたLINE mRNAは核外へ輸送され、LINEタンパク質が翻訳される。このLINEタンパク質は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転移に必須であることが示されている。このLINEタンパク質とLINE mRNAが複合体 (LINE RNP) を形成する。核内へ移行したLINE RNPは標的となるゲノムDNAの一本鎖を切断する。次に、この切断位置からLINEタンパク質 (RT) がLINE mRNAの逆転写反応を開始する (LINE cDNAの合成)。一本鎖目のゲノムDNA切断位置から始まる自身mRNAの逆転写反応はTarget Primed Reverse Transcription (TPRT) と呼ばれる。その後、二本鎖目の切断、LINE cDNA相補鎖の合成、新規に合成されたLINEの5'末端とゲノムDNA切断末端の連結を経て、LINE転移が完了すると考えられている。しかし、TPRT後のこれらの過程がどのように進行するのか明らかにされていない。</p> <p>以上のようにTPRT反応により、LINE DNAの3'末端とゲノムDNAが連結されることが示されている。一方で、LINE DNAの5'末端とゲノムDNA末端がどのように連結されるのか、その分子機構は明らかにされていない。そこで、私は、LINEの5'末端連結機構を明らかにするため、ヒトHeLa-RC細胞とニワトリDT40細胞中で新規に転移させた様々なLINE (ZfL2-2、ZfL2- 1、L1、Nimb-2_DR) の5'末端配列を解析した。まず、私は、LINEが挿入されるゲノムDNA部位生じる重複や欠失 (それぞれ、TSD、TST) を解析した。その結果、DT40細胞の場合、L1の挿入配列は、~15bpのTSDのみ、ZfL2- 1挿入配列は、~5bpのTSDのみを伴っていた。この結果は、TSD長は、LINEの種類によって固有の長さであることを示す。以前の研究によって、TSDかTSTのどちらが生じるかは、LINE転移時に生じるゲノムDNAの二本鎖目の切断位置の違いで決定されることが提案された (一本鎖目の切断位置から上流の場合はTST、下流の場合はTSD)。そのため、二本鎖目の切断もLINEの種類によって固有の位置で起こることが示唆された。一方で、HeLa-RC細胞の場合、L1の挿入配列、ZfL2- 1挿入配列両方に様々な長さのTSTやTSDが生じていた。これらの様々な長さのTSDやTSTの生成は、DT40細胞では見られなかったが、HeLa-RC細胞で見られたため、何らかの宿主因子が関与する可能性がある。二本鎖目の切断位置がLINEの種類によって固有であることから、HeLa-RC細胞で観察された様々な長さのTSDやTSTは、TSD生成時に二本鎖目の切断で生じる特有なゲノムDNA末端、すなわち3'突出末端がHeLa-RC細胞中の何らかの宿主因子のプロセッシングを受けて生じると考えられる。次に、LINE挿入配列末端と宿主ゲノムDNA末端の連結部に存在する、LINE由来かゲノムDNA由来か区別できない配列 (マイクロホモロジー; MH)、数塩基から数十塩基の由来不明の挿入配列 (エクストラヌクレオチド; 5' EX)、LINE配列末端とゲノムDNA末端の平滑な連結 (Direct joining; DJ) を解析した。この解析の結果、5' EXがその隣接配列由来であることと、5' EX生成には標的となるゲノムDNA部位の3'突出末端が必要であることが示された。この結果は、5' EXは、①逆転写中のLINE cDNA末端と3'突出ゲノムDNA末端がアニールし、②アニール部分でDNA合成され、③そのアニール部分が解離するというサイクルを繰り返して生成することを示唆する。</p> <p>これらの結果を総合して私は、LINEの5'末端連結には少なくともアニーリングまたはダイレクトの2種類の経路が存在するモデルを提案する。</p>			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

## 論 文 要 旨 ( 英 文 )

(300語程度)

報告番号	乙 第 号	氏 名	山口 勝己
<p>( 要 旨 )</p> <p>Long interspersed elements (LINEs) are transposable elements that exist in the chromosomal DNA of most eukaryotes; as such, they have a large impact on the genome evolution of their hosts. LINEs mobilize by a mechanism called retrotransposition in which the LINE RNA is reverse-transcribed into DNA and then integrated into the host chromosome. The integration of the 3' end of the LINE element into the target genomic DNA simultaneously occurs with the initiation of reverse transcription. However, the molecular mechanism of the integration of the 5' end is not well understood. To elucidate the molecular mechanism of the integration of LINEs, I characterized the 5' ends of more than 200 LINE de novo retrotransposition events into chicken DT40 or human HeLa-RC cells. First, I showed that Human L1 inserts produced 15-bp target-site duplications (TSDs) and zebrafish ZfL2-1 inserts produced 5-bp TSDs in DT40 cells, suggesting that TSD length depends on the LINE species. Because the TSD length may be associated with the length of 3' overhangs which were generated by cleavage of both strands at the target genomic DNA site, I speculate that the length of 3' overhangs may also depends on the LINE species. Further analysis of 5' junctions revealed that, in cultured cells, the integrants of the zebrafish ZfL2-2 LINE produce extra nucleotides at their 5' ends (5'EXs), and 5'EXs originate from their flanking sequences. We also found that 3' overhang at the target genomic site is required for the generation of the 5'EXs, suggesting that exposed 3' overhang and LINE cDNA interact with each other through annealing for DNA synthesis, resulting in generation of 5'EXs. These results led us to propose a new model for 5' end joining which can be divided into two fundamental types—annealing or direct, the type of which is determined by the extent of exposure of 3' overhangs generated after the second-strand cleavage and by the involvement of host factors.</p>			

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).