T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

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,岩﨑　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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（論文博士）

論　文　要　旨（和文2000字程度）

（Summary）

報告番号	乙 第　　号	氏　名	林　由訓

（ 要　旨 ）

LINE（Long Interspersed Element）は真核生物ゲノム中に幅広く存在する転移因子の一種である。LINEの構造は、5'非翻訳領域（5'UTR）、タンパク質コード領域（ORF)及び3' UTRから構成され、5' UTRには自身配列の転写に必要なプロモーターが存在し、ORFにはLINE転移に必須なタンパク質がコードされている。また3' UTRには、LINE転移時に認識される配列が存在する。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（EN）活性により、宿主ゲノムDNAにニックを入れ、3′水酸基が生成される。続いてLINEタンパク質の逆転写酵素（RT)により、この3′水酸基をプライマーとしてLINE RNAの逆転写反応をおこない、cDNAを合成する。この反応により新しく合成されたLINE DNAは、宿主DNA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 。このLINE転移過程において、LINEは自身3'末端配列を特異的に認識して転移する事が知られている。しかしながら、LINEがどのようにして自身の3'末端配列を特異的に認識しているのか、その詳細な認識機構は明らかにされていない。そのため本実験では、2つのゼブラフィッシュLINE（ZfL2-1及びZfL2-2）を使用して、LINEの自身3'末端配列の認識機構を明らかにする事を目指した。

当研究室における先行研究の結果から、ZfL2-2の3'末端配列は、RNAに転写されると特徴的なstem-loop構造を形成する事が示されている。またZfl2-1の3'末端配列も、構造予測の結果から、RNAに転写されるとZfL2-1特有のstem-loop構造を形成する事が示唆された。これらのstem-loop配列が、ZfL2-1及びZfL2-2それぞれの転移に必須であるか培養細胞を用いた転移実験により確認した。Stem-loop配列を欠失したZfL2-1変異体及びZfL2-2変異体を使用した場合、両変異体とも転移実験により転移を検出出来なかった。この結果からZfL2-1、ZfL2-2共に、自身の3'末端のstem-loop配列が転移に重要である事が示された。続いてstem-loop配列のどの領域が転移に重要であるか、stem-loop配列の様々な変異体を作製し、転移実験により検証した。その結果、ZfL2-1、ZfL2-2共にstem-loop配列のloop領域を特異的に認識して転移している事が明らかとなった。このLINEによる自身stem-loop配列の特異的認識機構が、LINEタンパク質と自身stem-loop RNAとの特異的結合によるものか検証する為、ZfL2-2タンパク質と自身stem-loop RNAとの結合実験を行った。その結果、ZfL2-2タンパク質は自身stem-loop RNAと結合する事が明らかとなり、自身stem-loop RNAからstem-loop配列欠失したRNAを使用した場合では、ZfL2-2タンパク質との結合は見られなかった。さらにstem-loop RNAのどの領域がZfL2-2タンパク質との結合に重要であるか、様々変異RNAを作製して検証した結果、ZfL2-2タンパク質との結合には、自身stem-loop RNAのloop領域が重要である事が示された。

最後に自身stem-loop RNAとの特異的結合には、ゼブラフィッシュLINEタンパク質のどの領域が重要であるか明らかにする事を目指した。ZfL2-2タンパク質にアミノ酸変異を導入し、自身stem-loop RNAとの結合実験を行った結果、ZfL2-2タンパク質にコードされているENとRTの間の領域に自身stem-loop RNAとの結合する領域がある事が明らかとなった。ZfL2-1タンパク質の場合もZfL2-2タンパク質同様の領域で自身stem-loop RNAと結合する事が示された。以上の結果をまとめると、

① 培養細胞を用いた転移実験の結果から、ZfL2-1 及び ZfL2-2 は自身の stem-loop 配列の loop 領域を特異的に認識して転移する

② ZfL2-2 タンパク質と stem-loop RNA を用いた結合実験の結果から、ZfL2-2 タンパク質は自身 stem-loop RNA の loop 領域と特異的に結合する

③ ZfL2-1 及び ZfL2-2 タンパク質の EN と RT の間に自身 stem-loop RNA と結合する領域が存在する

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	林　由訓

（要　旨）

LINEs mobilize their own copies via retrotransposition. LINEs can be divided into two types. One is a stringent type, which constitute a majority of LINEs. The other is a relaxed type. To elucidate the molecular mechanism of retrotransposition, we used here two different zebrafish LINEs belonging to the stringent type. By using retrotransposition assays, we demonstrated that proteins (ORF2) encoded by an individual LINE recognize the cognate 3’ tail sequence of the LINE RNA strictly. By conducting in vitro binding assays with a variety of ORF2 proteins, we demonstrated that the region between the endonuclease and reverse transcriptase domains in ORF2 is the site at which the proteins bind the stem-loop structure of the 3’ tail RNA, showing that the strict recognition of the stem-loop structure by the cognate ORF2 protein is an important step in retrotransposition. This recognition can be bipartite, involving the general recognition of the stem by cTBR (conserved tail-binding region) of ORF2 and the specific recognition of the loop by vTBR (variable tail-binding region). This is the first report that clearly characterized the RNA binding region in ORF2, providing the generality for the recognition mechanism of the RNA tail by the ORF2 protein encoded by LINEs. Because the TBR region is somewhat conserved in almost all LINEs, it can be applicable to other LINEs including human L1 that belongs to the relaxed type.

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).