

氏名（本籍）	大津 舞菜（千葉県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 222 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	LINE 逆転写酵素による LINE RNA の特異的な認識機構
論文審査委員	(主査) 教授 河合 剛太 (副査) 教授 坂本 泰一 教授 寺本 直純 教授 原田 和雄 武蔵野大学 教授 武藤 裕

学位論文の要旨

LINE 逆転写酵素による LINE RNA の特異的な認識機構

Long interspersed nuclear element (LINE) とは転位性因子の一種であり、多くの生物種が様々な種類の LINE をもっていることが知られている。また、LINE は生物種によって含まれている種類や数に特徴があり、ゲノム内の LINE の種類や数の偏りについては逆転写酵素による特異的な LINE RNA の認識が大きく影響していることが考えられる。よって、LINE の増幅機構を解明することは LINE が存在している意味や生物の進化の解析に重要なことであると考えられる。

ヒトゲノムについては 2001 年に全配列が明らかとなり、タンパク質をコードする領域はわずか 1%で、非翻訳領域が 99%を占めることが分かった。また、転位性因子が全ゲノムの約半分を占めており、さらに転位性因子の一種である LINE は全ゲノムの 21%を占めていることから、LINE を解析することがゲノムの構造や機能の解析にとって重要であることが考えられる。

LINE は自身にコードされた逆転写酵素により RNA を介して逆転写することで新たな位置に挿入されることが知られており、逆転写反応では逆転写酵素のうちのエンドヌクレアーゼドメインが DNA に切り込みを入れ、その DNA をプライマーとして逆転写が起きることが知られている。しかし、逆転写酵素による LINE RNA の認識機構の詳細は解明されていない。

そこで本研究では、LINE の逆転写に重要だと考えられている RNA の領域および逆転写酵素の領域について、立体構造解析および相互作用解析を行うことによってその認識機構を解明することを目的としている。本研究では、ゼブラフィッシュ由来のよく似た 2 種類の LINE (ZfL2-1, ZfL2-2) に着目し、これを研究対象とした。なお、本研究で用いている LINE は鳥で最初に発見された繰り返し

配列 (Chicken repeat 1: CR1) に近縁な LINE である。

LINE の特異的な認識メカニズムを解析するため、まず LINE RNA の単体での立体構造解析を行った。立体構造解析については溶液 NMR 法を用いて行った。安定同位体標識法および残余双極子相互作用法などの NMR の手法を活用して、ZfL2-1 の 34 残基の RNA (RNA1-34) の構造解析を行い、立体構造を決定した。さらに、得られた RNA1-34 の立体構造を、既往研究において立体構造が決定されている RNA2-17 (ZfL2-2 由来の 17 残基の RNA) の立体構造と比較することによって、LINE における逆転写酵素による認識特異性について考察した。

次に、相互作用解析を行った。LINE RNA と逆転写酵素について、それぞれ相互作用に関与する領域に対応する試料を用いて、まずはゲルシフト法による解析を行った。RNA については ZfL2-1 および ZfL2-2 由来の RNA と、さらにそれぞれの RNA の 1 残基を置換した RNA を用いた。逆転写酵素については、共同研究先によって推定されていた RNA を識別する最も短い配列 (RNA recognition domain: RRD) に対応するペプチドを用いた。ZfL2-1 由来の RRD (RRD1) は 67 アミノ酸残基であり、ZfL2-2 由来の RRD (RRD2) は 48 アミノ酸残基である。なお、RNA を認識する領域は、逆転写酵素の中のエンドヌクレアーゼドメインと逆転写酵素ドメインの間に位置する領域である。

ゲルシフト法による解析の結果、RRD2 は ZfL2-1 および ZfL2-2 のいずれに由来する RNA についても 1 残基の違いを識別していることが分かった。これに対し、RRD1 は ZfL2-1 で挿入されたステムループの有無を識別していることが分かった。以上のことから、よく似た 2 種類の LINE において、RRD による RNA の認識の方法が異なることが本研究によって初めて明らかとなった。

ゲルシフト法による解析と同様に、LINE RNA と逆転写酵素についてそれぞれ相互作用に関与する領域に対応する試料を用いて、NMR 法による相互作用解析を行った。RNA については ZfL2-1 および ZfL2-2 由来の RNA と、それぞれの RNA を 1 残基置換した RNA を用いた。なお、1 残基置換した RNA は元の RNA と同じ構造であることを NMR スペクトルの比較によって確認してある。ペプチドは RRD1 および RRD2 を用いた。

NMR 法による解析の結果、ゲルシフト法による結果と同様に、RRD2 は RNA の 1 残基の違いを識別していることが示された。一方、RRD1 は 1 残基の違いを区別しないことが示唆された。さらに、RRD2 は RNA2-17 の外側に飛び出している U10 ではなく G8 や U6 側から結合していることが示唆された。また、RRD1 は RNA1-34 の A10H8 側から結合していることが示唆された。

本研究において ZfL2-1 由来の RNA である RNA1-34 の構造解析を行い、立体構造を決定した。また、RNA とペプチドを用いた相互作用解析から RRD1 と RRD2 は RNA の認識方法が異なることが分かった。本研究によって LINE における RNA の認識機構に関する新たな知見が得られ、この知見は RNA とタンパク質の相互作用様式という観点からも興味深いものであると考える。

審査結果の要旨

ゲノムにおいてタンパク質をコードする領域はわずかであり、転移性因子が多くの割合を占めることが明らかとなっているが、その役割は未だ解明されていない。ヒトゲノムにおいては、タンパク質をコードする領域はわずか1%で非翻訳領域が99%を占めることが明らかにされているが、非翻訳領域の主要な構成要素である転移性因子の機能は明らかにされていない。よって、転移性因子を解析することがゲノムの解析にとって重要であることが考えられる。本論文は、転移性因子の一種である Long interspersed nuclear element (LINE) を研究対象とし、立体構造解析や相互作用解析によって LINE の増幅のメカニズムの解析を行った。これらの成果が全6章にまとめられている。

第1章では、序論として転移性因子や LINE について述べている。ゲノムにおける LINE の重要性を示し、本研究の研究意義を明確に示している。また、研究対象としているゼブラフィッシュ由来の LINE の増幅の特徴について述べられている。

第2章では、研究に用いた試料の調製について述べられている。目的に応じて、様々な種類の研究試料が十分な量得られていることが説明されている。

第3章では、NMR法による LINE RNA の立体構造決定について述べられている。本研究では、LINE が増幅する際の、逆転写酵素による認識に重要な LINE RNA の 3' 末端に存在するステムループの領域について解析している。2種類の LINE に注目しており、よく似ているが LINE の増幅の際の逆転写酵素による認識が特異的であることについて、2つの LINE (ZfL2-1 および ZfL2-2) を比較し解析を行っている。この章では、構造未決定の ZfL2-1 に由来する 34 残基の RNA について、安定同位体標識法および残余双極子相互作用法などの NMR の手法を活用して解析を行い、立体構造を決定したことが説明されている。さらに、得られた RNA の立体構造について、すで決定されていた ZfL2-2 由来の RNA の立体構造と比較することによって、LINE における逆転写酵素による認識特異性について考察したことが述べられている。なお、内部ループを含む 34 残基の RNA は、NMR 法としては比較的長い解析対象となるが、NMR 法における最新の技術を独自の手法で組み合わせることにより、その立体構造解析に成功していることが述べられている。

第4章では、ゲルシフト法による LINE RNA と逆転写酵素の相互作用解析について述べられている。解析には、LINE の増幅の際の逆転写酵素による LINE RNA の認識に関与している領域を用いている。逆転写酵素については、RNA 識別領域 (RRD) を用いており、RNA については LINE RNA の 3' 末端に存在するステムループの領域と、さらに立体構造解析から推察した認識に重要だと考えられる 1 残基を置換した RNA も用いることによって、認識の特異性を解析した。ゲルシフト法による解析の結果、ZfL2-2 に由来する RNA と RDD の相互作用については、すでに行われていた生化学的な実験の結果と一致する結果が得られた。さらに、本研究においてそれ以外の組合せの解析が初めて行われた結果、ZfL2-1 に由来する RRD は、ZfL2-1 において RNA に挿入されたステムループの有無を識別して

いるという新しい知見が得られた。したがって、よく似た2種類のLINEにおいて、RRDによるRNAの認識の方法が異なることが本研究によって初めて明らかとされた。

第5章では、NMR法によるLINE RNAと逆転写酵素の相互作用解析について述べられている。ゲルシフト法による解析と同様に、LINE RNAと逆転写酵素についてそれぞれ相互作用に関与する領域を用いて、NMR法による相互作用解析を行っている。解析の結果、基本的にゲルシフト法と同様な結果が得られており、2種類のLINEにおいて、RRDによるRNAの認識の方法が異なることが再確認されている。さらに、原子レベルで相互作用を解析できるNMR法の利点を生かし、それぞれのRNAにおいて、どの残基が相互作用に強く関与しているかを解析した。その結果、認識の様式は異なるものの、いずれのRRDもRNAの同じ側から結合していることが示された。以上のように、それぞれのRRDとRNAとの結合について新たな知見を得たことが述べられている。

なお、第4章と第5章では、それぞれの手法に合わせて適切な試料を設計し、さらに試行錯誤の上で最適なものを選択して研究を進めている。

第6章では、LINEの1つのグループであるL2に属する2種類のLINEについて、逆転写酵素によるRNAの認識の方法が異なることが本研究によって初めて明らかとなったことから、同じグループに属するLINEの分化の考察を述べている。

本論文はLINEにおけるRNAの認識機構について研究したものであり、RNAとタンパク質の相互作用様式について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

従って、学位申請者の大津舞菜は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。