

転移性遺伝因子の転移活性決定要因の解析

Factors determining transposition activity of transposable elements

研究代表者 立教大学理学部生命理学科 助教授 関根 靖彦

Associate Professor, Department of Life Science, College of Science

Rikkyo (St. Paul's) University, Yasuhiko SEKINE

トランスポゾンとはあらゆる生物のゲノムに存在し、転移能力によりゲノムの変異や再編成を引き起こす。本研究は大腸菌の代表的なトランスポゾン IS1 を中心に、その転移に影響を与える諸要因について解析を行った。その結果、IS1 の転移に必要な宿主因子 H-NS に関して、H-NS の DNA 結合活性は必要無いが、マルチマー形成活性が重要であること、H-NS は IS1 の転移部位の選択にも影響を与えることが明らかになった。また、hns 株でも転移がおこるトランスポゼース側の変異と宿主側の変異を同定した。さらに、IS1 の転移に影響を与える新規の宿主因子を同定した。また、新しい IS1 ファミリーメンバーをラン藻や古細菌のゲノムから発見し、その配列比較と変異導入実験によりトランスポゼースの活性中心 D-D-E モチーフを同定した。

Abstract

Insertion sequences (IS) are discrete DNA segments able to move to new sites. IS1 is the smallest active transposable element in bacteria and is involved in various kinds of genomic rearrangements. H-NS is a host-encoded factor required for IS1 transposition. In this study, the central domain of H-NS, which is involved in oligomerization of the H-NS protein, was found to be important for IS1 transposition. It was found that H-NS affects target site selection for IS1 transposition. Using the papillation assay, mutations in either the transposase genes or chromosomal genes, which can induce transposition of IS1 in the absence of H-NS, were identified. IS1 transposase was shown to have the D-D-E motif that represents the active center of the protein.

1. 研究目的

転移性遺伝因子(トランスポゾン)は生物のゲノムに普遍的に存在し、それが引き起こす様々な DNA 組換え現象を通してゲノムの変異や再編成を引き起こす。トランスポゾンは自身がコードするトランスポゼースの作用により標的 DNA 上のランダムな位置に転移する。様々な細菌ゲノムの全塩基配列が明らかになっているが、それらのゲノム上には例外なく多種多様な IS (insertion sequence; 小型のトランスポゾンの総称)が存在しており、ゲノム配列の比較によって IS が関与するゲノム構造の変動が広く実

証されつつある。IS が細菌ゲノムのダイナミズムの原動力の1つであることは疑う余地のないことであるが、「IS は宿主菌がどのような状態のときに転移するのか?」という問いに対する明確な答えは得られていない。本研究は大腸菌の IS の転移活性に影響を与える因子(宿主因子ならびにトランスポゼース内のアミノ酸残基)を探索し、その作用機作を解析することを通して、IS の転移反応を内外の因子との関わりあいの中で捉えることを目的として行った。

2. 研究経過

2.1 IS1 の遺伝子発現機構について

本研究の主たる対象である IS1 は全長が 768 bp で、active なトランスポゾンでは最小の因子である。IS1 は内部に out-of-frame の 2 つの orf、insA と B'-insB をコードし、トランスポゼースは両 orf が重なる部位で insA の翻訳の読み枠が -1 方向にずれること（翻訳フレームシフト）を介して両 orf の融合タンパク質として産生される。翻訳フレームシフトが起こらない場合は、InsA タンパク質が産生され、これは転移のインヒビターとして機能する（Figure 1）。

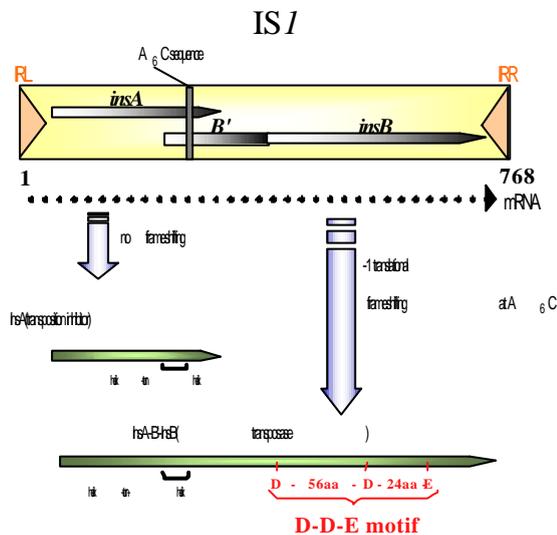


Figure 1. Structure and gene expression of IS1

2.2 転移に関する宿主因子の解析

(1) IS1 の転移における H-NS の作用機構の解析

我々は、大腸菌のヒストン様タンパク質 H-NS の欠損株 (hns⁻) では hns⁺ 株に比べ IS1 の転移頻度が 1/100 以下(検出限界以下)になることから、H-NS が IS1 の転移には必須であることを既に報告している。しかし H-NS がどのように IS1 の転移に関与するのかについての分子機構は全く不明である。そこで、その分子機構の解明を目的として、以下の解析を行った。

(a) H-NS の DNA 結合活性: H-NS は DNA 結合活性を有していることが知られている。H-NS は IS1 の DNA に結合することにより転移を促進している可能性を検討するために、

IS1 をクローニングしたプラスミドを各種制限酵素で切断して生じた DNA 断片に対する H-NS タンパク質の結合活性をゲルシフト法により解析した。その結果、IS1 DNA には H-NS の特異的結合部位は存在しないことがわかった。

(b) IS1 の転移に関する H-NS の機能ドメインの解析:

H-NS は、各種の遺伝子の転写抑制の必要な N 末ドメイン、マルチマー形成に必要な中央ドメイン、DNA 結合に必要な C 末ドメイン、から成る。IS1 の転移にどのドメインが必要であるかを調べるため、各ドメインに変異をもつ H-NS を産生する大腸菌内での IS1 の転移活性を調べた。その結果、N 末や C 末ドメインの変異がある場合は転移は起こるが、中央ドメインの変異がある場合に転移は起こらなかった。この結果は、IS1 の転移には H-NS のマルチマー形成能が必要であることを示すと同時に、H-NS の DNA 結合能は不要であることを示す。

(c) hns 株でも転移能を有する変異トランスポゼースの取得:

プロモーターを持たない —ガラクトシダーゼ (lacZ) 遺伝子を内部に持つ IS1 (ミニ IS1 (lacZ)) をトランスポ

ゼース遺伝子とともにプラスミドにクローニングする。

(ここで用いるトランスポゼース遺伝子は翻訳フレームシフトなしで発現するように、フレームシフト部位に 1 塩基の挿入変異を持つ。)

このプラスミドを保持する大腸菌

内でミニ IS1 (lacZ) が染色体上の転写領域に挿入した場合、

lacZ 遺伝子が発現するので、X-gal を含む寒天培地上のコロニーには青い斑点 (パピリ) が生じる。パピリの数が転

移頻度を反映する。hns⁻ 株の大腸菌のコロニーにはパピリ

は殆ど生じなかった。次に、この実験系 (パピレーション

アッセイ) において、IS1 のトランスポゼースを運ぶプラ

スミドにランダムな変異を導入し、hns 株であるにもかかわらず、

パピリが多数生じたコロニーを得た。これらのコロ

ニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を解析した

ところ、2 例についてはトランスポゼースの ¹³⁰Arg Ser、

1 例については ¹³¹Leu Phe、1 例については ¹⁰⁵Ala Val の

一塩基置換変異を持っていた。hns 株におけるこれらの変異トランスポゼースの転移能を測定したところ、その転移能は野生型トランスポゼースの約 70 倍以上に上昇していた。変異部位は H-NS の作用機作と何らかの関連があると考えられる

(d) H-NS が IS1 の転移部位の選択に与える影響 : (c) で述べた H-NS 非依存的転移能を有するトランスポゼースによる hns⁺ 株と hns⁻ 株における標的プラスミドへの IS1 の転移部位の分布を調べた。その結果、hns⁺ 株ではある特異的な AT-rich の領域に集中して転移がおこったのに対し、hns⁻ 株ではその領域への集中傾向が弱くなり、他の non-AT-rich な領域にも転移がおこった。この結果は、H-NS が IS1 の転移における標的部位の選択に関与していることを示唆する。

(e) hns 株で IS1 の転移を回復させる宿主側のサプレッサー変異の同定 : hns 株の染色体に Tn10 のランダム挿入変異を導入し、パピレーションアッセイにより、パピリの数が増加する株の取得を試みた。その結果、2 種の変異株を取得し、その変異部位を決定したところ、Tn10 は aspA と mhpD に挿入されていた。これらの変異体での転移頻度は、hns 株の 7-8 倍以上だった (Figure 2A)。これらの遺伝子産物は、アミノ酸や芳香族化合物の分解酵素であり、これらの代謝産物は共通して TCA サイクルの中間体となることから、この結果は IS1 の転移にある種のアミノ酸代謝や TCA サイクルが影響を及ぼすことを示し、IS1 の転移に細胞内の物質代謝やエネルギーレベルが関与している可能性を示唆する。

(2) 新たな宿主因子の探索

hns⁺ 株の染色体に Tn10 のランダム挿入変異を導入し、パピレーションアッセイにより、パピリの数が減少する株の取得を試みた。その結果、2 種の変異株を取得し、変異部位を決定したところ、Tn10 は galT と ybhD (機能未知遺伝子) に挿入されていた。これらの変異体での転移頻度は

野生株の 1/5 から 1/20 であった (Figure 2B)。galT はガラクトース代謝に関する遺伝子であることから、この結果は IS1 の転移に細胞内の糖代謝やエネルギーレベルが関与している可能性を示唆する。

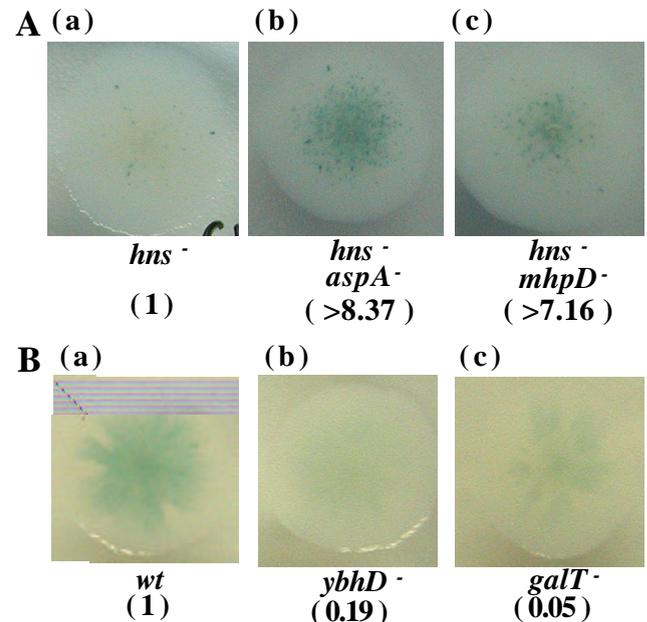


Figure 2. Colonies of E.coli strains. Relative value of transposition frequency of mini-IS1 in each strain is indicated in parenthesis.

2.3 トランスポゼース遺伝子の発現に影響を与える要因の解析

(1) トランスポゼース遺伝子の発現のマイクロアレイによる解析

大腸菌 MG1655 株の染色体には約 60 コピーの IS が存在しており、これらは配列の類似性からいくつかのファミリー (IS1 ファミリー、IS3 ファミリー、IS4 ファミリー、IS630 ファミリーなど) に分類される。これらの IS の中には内部が欠失しているものもあるが、大半は内部にプロモーターとトランスポゼース遺伝子をコードしている。IS の転移活性は当然トランスポゼース遺伝子の転写量と密接に関連していると考えられる。そこで、各種 IS のトラ

ンスポゼース遺伝子の転写量の変化を包括的に解析するためにマイクロアレイを作成した。具体的には、奈良先端大の森浩禎博士、大島拓博士の協力を得て、大腸菌 K-12 株の全遺伝子マイクロアレイに、代表的な 9 種の IS (IS1, IS2, IS3, IS5, IS30, IS150, IS186, IS609, ISEc1) のトランスポゼース遺伝子 DNA をスポットした。これを用いて、大腸菌生育条件 (生育温度、栄養、各種ストレス) を変えた場合のトランスポゼース遺伝子の転写量の変化の解析を行っている。

(2) 翻訳フレームシフトの効率に影響を与える因子の同定

2.1 で述べたように、IS1 は転移を引き起こすトランスポゼースと転移のインヒビターである InsA タンパク質を産生し、転移活性は両タンパク質の量比により変動する。この量比は翻訳フレームシフトの効率により決定される。そこで、翻訳フレームシフトの効率に影響を与える因子の同定を試みた。パピレーションアッセイで用いたプラスミドとほぼ同じであるが、翻訳フレームシフトが起こらないとトランスポゼースが産生されないような遺伝子を運ぶプラスミドを大腸菌に保持させる。この大腸菌のコロニーには数日でパピリが生じる。この大腸菌の染色体に Tn10 のランダム挿入変異を導入し、パピリ形成が早くなる株、もしくは遅くなる株を選択することによって、翻訳フレームシフトの効率に影響を与える宿主側の因子の探索を行っている。

2.4 IS1 のトランスポゼースの活性中心 D-D-E モチーフの同定

IS1 トランスポゼースでは、ラムダファージインテグレーションファミリーに保存されている H-R-Y モチーフが活性中心であるとされてきた。我々は、大腸菌以外の生物 (ラン藻、古細菌) ゲノムから IS1 ファミリーに属する因子 6 種を同定し、それらのトランスポゼースを調べたところ、H-R-Y モチーフは保存されておらず、多くの転移性遺伝因子のトランスポゼースの活性中心として指摘されている

D-D-E モチーフを構成する 3 つの酸性アミノ酸が保存されていることを見出した (Figure 1)。実際に、この 3 つの酸性アミノ酸への置換変異は転移活性を著しく低下させた。この結果は、IS1 においても D-D-E モチーフが活性中心として機能することを示す。

3. 研究成果

H-NS の作用機作を探るために有効な、hns 株で IS1 の転移が回復する宿主側およびトランスポゼース側の変異を同定できた。また、H-NS 以外の新たな宿主因子を同定できた。これらの結果は、IS の転移が宿主の機能によりどのように調節されているかという興味深い問題に新しい糸口を与えるものである。また、IS1 は他のトランスポゾンと同様に D-D-E モチーフを有することが証明でき、D-D-E モチーフの普遍性を示した。

4. 今後の課題と発展

H-NS の作用機構を知るために、IS1 転移の in vitro 系を構築し、そこに H-NS を添加した場合の効果を調べる。本研究で取得した H-NS なしで転移能を有する変異体トランスポゼースを用いた場合の in vitro での転移を調べる。

本研究で同定された宿主因子について、その作用機構を、H-NS との関係も念頭に置きながら、遺伝学的、生化学的に解析する。

マイクロアレイ解析で、トランスポゼース遺伝子の発現が変動する条件が見つかった場合は、その条件における当該 IS の転移頻度の変動を調べる。

5. 発表論文リスト

1. Transposition of cyanobacterium insertion element ISY100 in *Escherichia coli*. Urasaki, A., Sekine, Y. and Ohtsubo, E. J. Bacteriol., 2002, 184, 5104-5112.
2. Presence of a characteristic D-D-E motif in IS1 transposase. Ohta, S., Tsuchida, K., Choi, S., Sekine, Y., Shiga, Y., and Ohtsubo, E. J. Bacteriol. 2002, 184, 6146-6154.