

結晶構造から見る Y1 transposase: IS608, SSO1474, ISDra2

転移因子は自身の配列をゲノムから切り出し別の位置に挿入する。この挿入の機構が複数回独立に進化してきたことは転移因子のコードするタンパク質配列を比較すると明らかである。単独でゲノムへの挿入を触媒する酵素としては5種類がこれまで知られている。DDE transposase、tyrosine recombinase、serine recombinase、rolling circle (or Y2) transposase、そして Y1 transposase である。また、逆転写酵素とエンドヌクレアーゼが共役することで転移する機構が non-LTR retrotransposon 等で見られる。

IS200/IS605 ファミリーは最小の自律性転移因子として知られている。例えば、代表的な転移因子である IS200 は *Salmonella typhimurium* LT2 から見つかかり、長さはたった 707 bp である。一方で *Helicobacter pylori* で見つかった IS605 や IS608 は2つのタンパク質をコードし、前側の TnpA が IS200 のタンパク質と相同、後ろ側の TnpB が機能未知のタンパク質である。TnpB は IS1341 や IS891 の転移酵素と推測されているタンパク質と相同であるが IS608 の転移には必須ではない。

IS608 の TnpA の X 線結晶構造決定から、新しい transposase として Y1 transposase が提唱された (Ronning et al. 2005)。IS608 の TnpA は二量体を形成し、構造的には RNA recognition motif (RRM) と類似していた。RRM は非常に幅広いタンパク質に見られる構造で、TnpA はその中でも Rolling circle replication protein (RCR, rolling circle (or Y2) transposase) や conjugative relaxase である TrwC や TraI に似ている部分が認められた。中でも RCR は TnpA と同様に HUH (ヒスチジン2つの間に疎水性アミノ酸が挟まれている) モチーフを持つこと、保存されたチロシン残基があることでも共通点がある。ただし、RCR では保存されたチロシンが2つあり、間に3つのアミノ酸を挟む構造が保存されている点で Y1 transposase と異なっている。また、知られている全ての RCR は単量体である。TnpA の HUH とチロシン残基は互いに離れているが、片方の TnpA 分子の HUH はもう一方の TnpA 分子のチロシンの近くにある。従って二量体になって初めて酵素活性が得られると考えられる。が、チロシンは HUH とは別の方向を向いており、活性部位を構成するためには何らかの構造変化が必要である。

HUH の2つのヒスチジン、保存されたチロシンはいずれも転移に必須であり、またチロシンは転移中間体の DNA と共有結合することがわかった。共有結合は、IS608 の左側 (タンパク質コード領域の上流側) では転移因子の 5' 末端と形成される。一方右側では転移因子ではない側の 5' 末端と形成される。従って、左側では転移因子の外側の 3' 末端、右側では転移因子の 3' 末端が 3'-OH の形で露出する。これがおそらく組み換えの際に別の位置の DNA を攻撃するのだろう。

Tyrosine recombinase はチロシンと結合するのが DNA の 3'末端である点で Y1 transposase と異なる。

IS200/IS605 ファミリーは末端逆位配列 Terminal Inverted Repeat を持たない。また、TSD も作らない。ただし、末端よりも少し内側にヘアピンを作る配列を持っている。上流側のヘアピンを LE IP、下流側のヘアピンを RE IP と呼び、この配列は IS608 の仲間では CCCCTAGCT₃₋₄AGCTATGGGGA である。このヘアピンについては転写制御や翻訳終結への関与が想定されていたが、Ronning らはヘアピンが転移因子の末端の認識に役立っているという仮説を立てて、TnpA と DNA をクロマトグラフィーで解析した。実際に TnpA はヘアピンと結合した。興味深いことに、上の DNA 鎖のヘアピンとは結合したが、下の DNA 鎖（相補鎖）のヘアピンとは結合しなかった。結晶構造では、2本のヘアピン DNA が二量体の両方の TnpA 分子に渡って結合している。

ヘアピン配列内にあるが塩基対を作らない T17 はフリップアウトして外側に露出し、TnpA のフェニルアラニンやアルギニンと相互作用する。これが TnpA が上側と下側のヘアピンを識別するのに役立っている。

続いて *Sulfolobus solfataricus* の IS200 の仲間の転移酵素 SSO1474 の構造が決定された (Lee et al. 2006)。構造は IS608 の TnpA と非常によく似ている。マンガンを活性中心に持った構造が決定され、HUH の後ろ側のヒスチジン H⁶² とこのモチーフの前にあるグルタミン酸 E⁵⁵ が直接、H⁶⁰ が水分子を挟んでマンガんに配位していた。マンガンはマグネシウムと置換可能であり、生体内でどのようにしてマグネシウムが配置されているのかを示している。また、ヒスチジンのイミダゾール基は E⁵⁵ と H²⁰ との水素結合によって安定化されていた。H²⁰ もまた保存されたアミノ酸で、これらのアミノ酸の置換は IS608 において活性を大きく低下させる。

しかしながら、IS608 の TnpA 同様、SSO1474 でも保存されたチロシン Y¹²¹ は HUH モチーフやマンガンと離れ、違う方向を向いていた。活性を持った状態になるには、DNA との結合単独でも、マグネシウムとの結合単独でも不十分おそらくは両者との結合が構造変化の引き金になるのだろう。

IS200 ファミリーに属する *Deinococcus radiodurans* の転移因子 ISDra2 の転移酵素の結晶構造も決定されている (Hickmann et al. 2010)。IS608 が 4 塩基配列 TTAC を標的に転移するのに対して、ISDra2 は 5 塩基 TTGAT を認識して挿入される。Hickmann らは ISDra2 の転移酵素と様々な DNA（標的およびヘアピン配列）との共結晶構造を決定し、その転移機構に迫っている。IS608 の転移では、LE IP の直前の 4 塩基 AAAG が標的 TTAC と塩基対を形成している。Watson-Crick 塩基対ではない。しかし IS Dra2 では、標的中の 4 塩基 TGAT が LE IP の直前の 4 塩基 CACA と塩基対形成し、最初の塩基 T は転移酵素によって認識されている。

すなわち転移酵素中の3アミノ酸との水素結合によってTが認識される。このようにLEIPとの単純な塩基対形成ではなく、1塩基長い標的配列が認識されているので、engineeringによって長い標的配列を認識できるように改変するのは簡単ではなさそうである。

構造上の類似性から、Y1 transposaseはRCRと同じグループの転移酵素と言う事が可能である。Y1 transposaseは転移因子の片側のDNA鎖だけを切り出し、別の位置に挿入する。RCR(rolling circle(or Y2) transposase)を持つ真核生物の転移因子HelitronでもIS200/IS605と同様に片側の鎖だけを転移させるモデルが想定されている。末端付近にヘアピン構造を持つ点も共通する。Y1 transposaseを持つ転移因子とRCRを持つ転移因子が共通の起源を持つかどうかは定かではないが、少なくとも類似の転移機構を想定する事ができるだろう。Helitronの転移機構はまだ不明な点が多い。この点でもIS200/IS605の研究の進展を期待したい。

Active site sharing and subterminal hairpin recognition in a new class of DNA transposases.

Ronning DR, Guynet C, Ton-Hoang B, Perez ZN, Ghirlando R, Chandler M, Dyda F.

Mol Cell. 2005 Oct 7;20(1):143-54.

PMID: 16209952 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Lee HH, Yoon JY, Kim HS, Kang JY, Kim KH, Kim DJ, Ha JY, Mikami B, Yoon HJ, Suh SW.

Crystal structure of a metal ion-bound IS200 transposase.

J Biol Chem. 2006 Feb 17;281(7):4261-6. Epub 2005 Dec 11.

PMID: 16340015 [PubMed - indexed for MEDLINE] Free Article

DNA recognition and the precleavage state during single-stranded DNA transposition in *D. radiodurans*.

Hickman AB, James JA, Barabas O, Pasternak C, Ton-Hoang B, Chandler M, Sommer S, Dyda F.

EMBO J. 2010 Nov 17;29(22):3840-52. doi: 10.1038/emboj.2010.241. Epub 2010 Oct 1.

PMID: 20890269 [PubMed - indexed for MEDLINE] Free PMC Article

2014/01/29

小島 健司 著

禁 無断複写転載