

R2 タンパク質の二分業体制

non-LTR レトロトランスポゾンの挿入では、まず、bottom strand と呼ばれる片側の DNA 鎖が切断され、時間をおいてもう一方の鎖 (top strand) が切断される。この時間差が逆転写の時間稼ぎとなっている。また、この top strand の切断が逆転写の終了前に起こることで 5' 側の欠失したコピーが生じるというモデルも提案されているため、この時間差がどのようにして作られているのかは重要な問題である。これに付随して、2 本の鎖の切断が同じタンパク質によって担われているのか、それとも、二量体 (dimer) となって 2 つのタンパク質が分業しているのかも長年問われてきた。

今回は、Christensen らの一連の仕事を紹介したい。彼らの材料は R2 である。R2 は 28S リボソーム RNA 遺伝子に特異的に挿入されるレトロトランスポゾンであり、最も良く挿入機構が解析されている non-LTR レトロトランスポゾンの一つでもある。

最初の論文で Christensen らは R2 タンパク質が主に切断位置の上流に結合することを示している (Christensen and Eickbush 2004)。用いられた手法は、主にゲルシフト (electrophoretic mobility-shift assay, EMSA) と DNase I footprint である。エンドヌクレアーゼ活性を保持したタンパク質と点変異によって活性を失ったタンパク質とを footprint assay で比較することで、bottom strand の切断前には、R2 タンパク質は切断位置の上流域 (top strand は-38 から-10 まで、bottom strand は-42 から-16 まで) を保護しているが、切断後には、切断位置の下流+12 の地点まで保護する範囲が拡大することを明らかにしている。また、R2 の 3' 末端付近の RNA (3'RNA) が存在する場合としない場合とを比較しており、bottom strand の切断には 3'RNA は不必要であったが、top strand の切断は 3'RNA の存在無しには起こらないことが示された。

続報では、R2 タンパク質が二量体を作り、それぞれが切断位置の上流と下流に結合していることを示している (Christensen and Eickbush 2005)。R2 タンパク質と標的となる 28S rDNA、そして R2 の 3'RNA を混ぜたゲルシフトの結果から、これらの 3 種の分子の結合状態に 4 つの種類があることがわかった。4 種類とは、DNA にタンパク質が 1 つ結合している状態、DNA にタンパク質が 1 つ結合しタンパク質に 3'RNA が結合している状態、DNA にタンパク質が 2 つ結合している状態、そして、DNA にタンパク質が 2 つ結合し片方のタンパク質に 3'RNA が 1 つ結合している状態である。R2 タンパク質が標的 DNA に 1 つ結合している状態では、切断位置の上流域 (top strand は-36 から-10 まで、bottom strand は-42 から-7 まで) に結合している。一方、2 つ結合している状態では、切断位置の下流域 (top strand は+7 から+22 まで、bottom strand は-5 から+17 まで) も DNase

I から保護されることから、2 つ目のタンパク質が下流に結合していることがわかる。また、N 末 120 アミノ酸だけのペプチドが切断位置の下流域 (top strand は+8 から+17 まで、bottom strand は-4 から+16 まで) を保護することから、2 つ目のタンパク質の結合には、N 末の zinc-finger あるいは、c-myb motif が関与していることが示唆される。

R2 タンパク質の濃度が低い場合には、タンパク質が DNA に一つしか結合せず、高い場合には 2 つ結合する傾向があることを利用して、上流に結合した R2 タンパク質が bottom strand の切断と逆転写を担うことが明らかとなった。一方、top strand の切断には R2 タンパク質が 2 つ結合している必要があることから、下流側に結合したタンパク質が top strand の切断をしていることが予測される。この結果は、逆転写不活性や切断不活性の R2 タンパク質などを用いた別の実験でも確認されている。

下流側に結合する R2 タンパク質の責任配列を決めたのが次の論文である (Christensen et al. 2005)。R2 タンパク質の N 末側には、1 つから 3 つの zinc finger motif (ZF) と 1 つの c-myb motif が存在する。Christensen らが解析に用いているカイコの R2 (R2Bm) では、CCHH タイプの ZF と c-myb motif が 1 つずつコードされている。Christensen らは G を N7 メチル化した標的 DNA やランダムにヌクレオシドを除去した DNA を用いた footprint を用いて、ZF が切断位置上流-3 から-1 に結合し、c-myb motif が下流+10 から+16 に結合することを明らかにした。

続いて DNA に変異を加えて結合の変化を見たところ、変異は bottom strand の切断には影響を与えず、top strand の切断を強く抑制した。逆転写の阻害は、-3 から-1 に変異を入れた場合に認められたが、これが ZF の結合阻害によるものなのか逆転写開始の阻害によるものなのかは分からなかった。逆にタンパク質に変異を入れた場合には、3'RNA との結合には影響が見られず、DNA との結合は顕著に低下した。ZF を破壊したタンパク質では bottom strand の切断も逆転写も起こらない。c-myb motif を破壊した場合には、bottom strand の切断と逆転写は正常に起こるが、top strand の切断が減少する。ZF は下流側に結合する R2 タンパク質で働くので、bottom strand の切断が起こらないのは、下流側の R2 タンパク質が上流側の R2 タンパク質を呼び込むためであると Christensen らは解釈しているが、ZF が上流側のタンパク質で異なる機能を持っている可能性も否定できないのではないだろうか。

さて、それでは上流側と下流側の R2 タンパク質はどのような違いによって区別されているのだろうか。Christensen らは、精製した R2 タンパク質に RNA が混ざってきていることに気づいた (Christensen et al. 2006)。この事実は、感度の高い銀染色で SDS-PAGE のゲルを染めた際に 2 本のバンドが見られ、片方は proteinase K 感受性、もう一方は RNase A 感受性であることからわかった。この

RNA は、タンパク質の N 末から zinc-finger の直前までに相当する 320nt の領域であった。この論文では、この RNA を 5'RNA と呼んでいる。

これより前の解析では 5'RNA が含まれた状態で解析されていたことになるため、この 5'RNA を RNase A 処理によって分解し、これまでと同様の実験を行った。すると、bottom strand の切断や TPRT には 5'RNA の有無は影響をもたらさなかったが、top strand の切断が大きく減少することがわかった。ゲルシフトの結果では、標的 DNA と R2 タンパク質と 5'RNA のみあるいは 3'RNA のみの場合には、R2 タンパク質は単量体にしかならなかったが、両方の RNA の存在下では二量体を構成することがわかった。続く footprint assay では、3'RNA が結合した R2 タンパク質は切断点の上流 (top strand は-38 から-11 まで、bottom strand は-42 から-8 まで) の DNA に結合し、5'RNA が結合した R2 タンパク質は切断点の下流 (top strand は-2 から+18 まで、bottom strand は-6 から+18 まで) の DNA に結合することが示され、両 RNA がある場合には上流下流共に保護された。ここからゲルシフトで示された二量体は 2 種類の R2 タンパク質が同じ標的 DNA の別々の位置に結合した結果だということがわかる。

5'RNA の量を増やすと bottom strand の切断は顕著に阻害された。これは、5'RNA と結合した R2 タンパク質は下流側と結合するため、上流側と結合し bottom strand の切断を担うタンパク質の量が減るためと解釈できる。一方、top strand の切断は、ある程度までは増加したが、それ以上増やすと逆に低下した。Christensen らはこれに 3 種類の仮説を立ててそれぞれについて検証している。彼らは、あらかじめ 1 本目の鎖を切断しておいた DNA を用いて 5'RNA が過剰にある条件でも 2 本目の切断は上昇しないこと、あらかじめ 5'RNA が過剰な条件で標的 DNA と結合させておき、その後で RNase A 処理して 5'RNA を取り除くと 2 本目の鎖の切断活性が上昇すること、を明らかにした。ここから、5'RNA が離れることで下流側に結合した R2 タンパク質が 2 本目の鎖を切断するというモデルを提示している。

最終的なモデルとして提案されているのは以下のようなものである。R2 タンパク質は結合する RNA が 5'側か 3'側かで 2 種類のコンフォメーションをとる。3'RNA と結合したタンパク質は切断位置の上流側に結合し、bottom strand の切断と逆転写を担う。5'RNA と結合した R2 タンパク質は、ZF と c-myb motif によって切断位置の下流側の DNA と結合する。上流側のタンパク質が逆転写を進行するのに伴って 5'RNA は下流側のタンパク質から離れ、下流側のタンパク質は top strand を切断する。このモデルは、実験結果を説明しつつ、R2 による逆転写の過程を綺麗に追うことができる優れたものである。今後の課題は、上流側の DNA 及び RNA と結合するタンパク質の領域の決定であろう。

Christensen S, Eickbush TH.

Footprint of the retrotransposon R2Bm protein on its target site before and after cleavage.

J Mol Biol. 2004 Mar 5;336(5):1035-45.

Christensen SM, Eickbush TH.

R2 target-primed reverse transcription: ordered cleavage and polymerization steps by protein subunits asymmetrically bound to the target DNA.

Mol Cell Biol. 2005 Aug;25(15):6617-28.

Christensen SM, Bibillo A, Eickbush TH.

Role of the Bombyx mori R2 element N-terminal domain in the target-primed reverse transcription (TPRT) reaction.

Nucleic Acids Res. 2005 Nov 10;33(20):6461-8.

Christensen SM, Ye J, Eickbush TH.

RNA from the 5' end of the R2 retrotransposon controls R2 protein binding to and cleavage of its DNA target site.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 21;103(47):17602-7.

2007/02/07

小島 健司 著

禁 無断複写転載