

## REP という反復配列 : REPtron と RAYT

原核生物の反復配列には成り立ちも機能も不明なものがまだいくつもある。近年研究が進んだ CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) はその一つであった。今回紹介する反復配列は、その名も”REP” (実はこれは repetitive extragenic palindromic structure の略) は 1984 年に大腸菌で最初に見つかった短い(20bp-40bp)反復配列である。遺伝子間領域に分布しており、パルンドロームあるいはそれに似た構造をとりうる、真正細菌に普遍的な反復配列の 1 種である。REP はしばしば、逆向きに 2 つが向き合った構造をとり、間隔を置いてタンデムに並んでいる。この構造は BIME (bacterial interspersed mosaic elements)と呼ばれている。大腸菌では 600 コピーほど、*Stenotrophomonas maltophilia* では 1600 コピーがゲノム中に見つかる。REP、BIME の生物学的機能については、転写因子との結合等が示されて来たが、その成り立ちや成立過程については未だに詳しい事はわかっていない。

Nunvar らは、テトラサイクリン耐性を獲得したバクテリアを解析している際に、水平伝播した histidine kinase/response regulator/sodium-symporter 遺伝子の近傍に IS200/IS605 の転移酵素 Y1 transposase に似た遺伝子を発見した(Nunvar et al. 2010)。この transposase のホモログを他の真正細菌のゲノムから探索し、その近傍を解析すると、REP が見つかったので、この遺伝子を、RAYT (REP-associated tyrosine transposase)と命名した。REP は 2 つが向き合った状態になったものがタンデムに並んでおり、これは BIME の特徴と一致した。RAYT と IS200/IS605 の転移酵素とを比較すると、HUH (U: hydrophobic residue)と保存されたチロシンは共通しているが、RAYT だけに保存されたアミノ酸、IS200/IS605 の転移酵素だけに保存されたアミノ酸も見つかった。配列比較は Ton-Hoang らの論文でも示されている(Ton-Hoang et al. 2012)。

Bertels と Rainey は、*Pseudomonas fluorescens* SBW25 のゲノム配列を利用してその進化機構を解析している(Bertels and Rainey, 2011)。この解析は、あえて REP の構造情報を利用せず、頻度の高い oligonucleotides のモチーフを解析している。その結果として 3 種類の REP が見つかった。多くの REP は単独で見つかったが、かなりの割合の REP では、隣に一定の間隔を空けて次の REP が見つかった。その間隔は REP の種類ごとにはっきりと決まっており、必ず REP の向きは反対であった。すなわち、BIME の単位である。この向き合った 2 つの REP と間に挟まれた配列が合わせて切り出されている例が SBW25 集団のゲノム配列解読により確認できた。また、単独の REP は、2 つが向き合った場合よりも変異が多く蓄積されていた。以上の事は向き合った一対の REP が転移の単位であ

ることを示唆しており、著者らはこれを REPIN (REP doublets forming hairpin) と命名している。

*in vitro* の RAYT の活性は Ton-Hoang らにより解析された (Ton-Hoang et al. 2012)。示された活性は、5' 末端の GATG を必要とし、一本鎖の REP に結合する、BIME の上流と下流を切断する、そして 2 本の DNA を入れ替える strand transfer 活性である。この論文では、BIME、RAYT を含めた一群のユニットを REPtron と呼称している。

Messing らは、*Escherichia coli* MG1655 の RAYT である TnpA<sub>REP</sub> をクローニングし、結晶構造を 2.6Å の解像度で決定した (Messing et al. 2012)。この構造は予想通り、IS200/IS605 の転移酵素 Y1 transposase に非常に良く似ている。しかし、モノマーで存在し、マンガンの存在下でのみ活性を示し、通常の状態では自己不活性化している。

Di Nocera らは、REP の 5' 末端が GTAG に似ているか、CGTC に似ているかにより REP が 2 つのグループに大別できる事を示した (Di Nocera et al. 2013)。GTAG タイプは、Proteobacteria、Cyanobacteria、Chloroflexi phyla、PVC (Planctomycetes, Verrucomicrobia and Chlamydiales) superphylum から見つかる。

CGTC タイプは Proteobacteria、Chlorobi、Bacteroidetes、Spirochaetes、Thermotogae から見つかる。Proteobacteria の中でも GTAG タイプは gammaproteobacteria に多く、CGTC タイプは alphaproteobacteria に多い。REP では 5' 末端に GTAG あるいは CGTC があり、その 3' 側にステムループ構造をとる配列が来る。ループ部分が 2-4 塩基と非常に短いものが見られる点、そして G-T 塩基対がステム領域に見られる点は DNA ではなく RNA がステムループ構造をとる事を示唆し、従って REP は転写されて機能すると考えられる。REP のほとんどは遺伝子間領域に見つかるが、一部の REP はタンパク質の N 末端や内部配列をコードする。多くの GTAG タイプの REP では近くに RAYT が見つかる。一方で、CGTC タイプは RAYT とリンクしていない。RAYT に似た遺伝子が、長めの逆向き反復配列がタンデムに並んだものの近傍にある例がいくつか見つかかり、これらは、

REPtron と RAYT に対応して、TIRtron と TIRYT (terminal inverted repeat-associated tyrosine transposase) と命名された。TIRYT は IS200/IS605 の転移酵素よりも RAYT に似ているが、C 末側が長く、また特有のアミノ酸も見つかる点に違いがある。

以上の研究からは、RAYT は、GTAG タイプの REP の 5' 側 GTAG を認識し、それに近い保存配列を切断し、その DNA の 5' 末端を BIME の下流でゲノム DNA と組換える事で、最終的に 1 本鎖の染色体外環状 DNA を作る、というモデルが立てられる。これが転移あるいは、rolling circle replication の基質となることで BIME の配列が増幅される。これは IS200/IS605 の転移酵素が触媒する反応とよく似ている。違う点は、IS200/IS605 では、この逆向きヘアピンの間に転移

酵素がコードされており、RAYT は BIME の内側ではなく近傍に位置しているという点である。従って、REPtron そのものは転移因子と呼ぶ事は出来ない。RAYT を持たない CGTC タイプの REP がどのように増幅されるのか、また、TIRtron がどのように維持されているのかなど、まだまだ不明な点が多い。転移酵素が自律的に自己複製できないタイプの可動性遺伝因子としては、retron などがある。retron も発見されて久しいのに未だに増殖機構も生物学的機能も不明な因子である。原核生物の可動性遺伝因子にはまだまだ謎が多い。

Nunvar J, Huckova T, Licha I. Identification and characterization of repetitive extragenic palindromes (REP)-associated tyrosine transposases: implications for REP evolution and dynamics in bacterial genomes.

BMC Genomics. 2010 Jan 19;11:44. doi: 10.1186/1471-2164-11-44. PubMed PMID: 20085626; PubMed Central PMCID: PMC2817692.

Bertels F, Rainey PB.

Within-genome evolution of REPINs: a new family of miniature mobile DNA in bacteria.

PLoS Genet. 2011 Jun;7(6):e1002132. doi:10.1371/journal.pgen.1002132. Epub 2011 Jun 16. PubMed PMID: 21698139; PubMed Central PMCID: PMC3116915.

Ton-Hoang B, Siguier P, Quentin Y, Onillon S, Marty B, Fichant G, Chandler M.

Structuring the bacterial genome: Y1-transposases associated with REP-BIME sequences.

Nucleic Acids Res. 2012 Apr;40(8):3596-609. doi: 10.1093/nar/gkr1198. Epub 2011 Dec 22. PubMed PMID: 22199259; PubMed Central PMCID: PMC3333891.

Messing SA, Ton-Hoang B, Hickman AB, McCubbin AJ, Peaslee GF, Ghirlando R, Chandler M, Dyda F.

The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindrome bound to its associated nuclease.

Nucleic Acids Res. 2012 Oct;40(19):9964-79. doi: 10.1093/nar/gks741. Epub 2012 Aug 9. PubMed PMID: 22885300; PubMed Central PMCID: PMC3479197.

Di Nocera PP, De Gregorio E, Rocco F.

GTAG- and CGTC-tagged palindromic DNA repeats in prokaryotes.

BMC Genomics. 2013 Jul 31;14:522. doi: 10.1186/1471-2164-14-522. PMID: 23902135 [PubMed - indexed for MEDLINE] Free PMC Article

2014/05/07

小島 健司 著

禁 無断複写転載