

ホーミングエンドヌクレアーゼと localized marker exclusion

チミンの代わりに 5-ヒドロキシメチルウラシル (HMU) を持つファージの仲間は HMU ファージと呼ばれる。これは制限酵素系に対する防御だと考えられている。枯草菌 *B. subtilis* に感染する SPO1 と SP82 は HMU ファージに属し、互いに近縁なファージである。SPO1 と SP82 の DNA ポリメラーゼ遺伝子中には同じ位置に、グループ I に属する自己スプライシングイントロンが挿入されている。この中には ORF があり、どちらも H-N-H タイプのホーミングエンドヌクレアーゼがコードされている。ORF 以外の RNA 領域が互いによく似ているのに対して、ホーミングエンドヌクレアーゼの配列はかなり異なっている。

SPO1 のホーミングエンドヌクレアーゼは I-HmuI、SP82 のものは I-HmuII と命名された (Goodrich-Blair and Shub 1996)。Goodrich-Blair らは、I-HmuI と I-HmuII が通常のホーミングエンドヌクレアーゼと異なり、DNA の片側の鎖しか切断しないことを *in vitro* の実験で証明した。通常のホーミングエンドヌクレアーゼは DNA の二重鎖を切断するので、標的 DNA と混ぜて反応させた後に電気泳動すると、速く泳動する短い DNA 断片が見られる。ところが、I-HmuI と I-HmuII を精製し、DNA と混ぜて反応させた後、非変性ゲルで泳動したところ、逆に遅く泳動された。これはゲルシフトアッセイのように、全長の DNA とホーミングエンドヌクレアーゼとが結合していることを示唆している。そこで、変性ゲルで泳動したところ、片側の鎖だけが切断されていることがわかった。DNA 鎖を区別して末端を RI ラベルして解析したところ、I-HmuI はイントロンの挿入されている位置よりも 4 塩基下流を、I-HmuII は 52 塩基下流を切断することが示された。しかも、SPO1 にコードされた I-HmuI は SP82 の DNA を SPO1 よりも良く切断し、SP82 にコードされた I-HmuII は SPO1 の DNA をより切断した。通常のホーミングエンドヌクレアーゼはイントロンの挿入位置前後を認識し切断するため、イントロン挿入後には認識配列が無くなり切断しなくなる。これに対し、I-HmuI と I-HmuII ではイントロンの有無に関わらず切断が観察された。

このように I-HmuI と I-HmuII は通常のイントロン内にコードされたホーミングエンドヌクレアーゼとは相当異なった特徴を持っている。それでは、どのようにしてこれらは維持されているのだろうか。

Goodrich-Blair らは localized marker exclusion、あるいは local marker exclusion と呼ばれる現象に着目した。SPO1 と SP82 を同じ細胞に共感染させると、SPO1 の遺伝子 29 から 32 の領域が高い頻度で SP82 の配列に交換されてしまう現象が知られている。I-HmuI と I-HmuII が挿入されている DNA ポリメラーゼは遺伝子 31 に相当し、切断点は DNA ポリメラーゼ遺伝子内である。そこで、SPO1 の遺伝子 31 を選択的に切断する I-HmuII が localized marker exclusion に関与している

のではないかと考えた。I-HmuII の N 末から 4 番目のリシンを UAA (ochre) 終止コドンに置換したファージ (SP82K4oc) を感染させた場合、通常の細胞では I-HmuII は合成されない。しかし、リシン tRNA が UAA をも認識するようになったサプレッサー変異株では、I-HmuII が合成される。SPO1 と SP82K4oc を通常の細胞に感染させると子孫の 20%前後が I-HmuI のコード配列を持っていた。しかし、サプレッサー変異株に感染させると、1%未満にまで低下した。一方、SPO1 の配列が SP82 に導入される現象は、I-HmuI の活性の有無に関わらず見られなかった。

以上の結果からは、SP82 の遺伝子 31 (DNA ポリメラーゼ) に挿入されている I-HmuII が SPO1 の遺伝子 31 にニックを入れることにより SP82 の配列を鋳型とした修復が行われ、SPO1 の遺伝子 31 の周辺配列が SP82 のものに入れ替わる機構が想定される。

localized marker exclusion は HMU ファージの他にも T 偶数系ファージでも知られている。T 偶数系ファージに属する、互いに近縁なファージである T2 と T4 を同じ細胞に共感染させると、T2 の配列の一部が T4 のものに入れ替わってしまう現象が知られている。とりわけいくつかの座位周辺では、その傾向が顕著で、共感染後の子孫の内 T2 の配列を持つものは 1%未満になってしまうほどである。本来は子孫の半分は T2、半分は T4 となるはずなのであるが、localized marker exclusion が起こる座位の一つが遺伝子 56 周辺である。T2 と T4 では遺伝子に高い相同性が見られるのに、T4 の遺伝子 56 の隣の遺伝子 69 は T2 には存在しない。同様に T4 の遺伝子 32 の隣の遺伝子 ORF32.1 も T2 には存在せず、遺伝子 32 の周辺は localized marker exclusion が起こっている。

遺伝子 69 の N 末側は GIY-YIG タイプのホーミングエンドヌクレアーゼの活性ドメインと相同性が見られた (Belle et al. 2002)。T4 ファージでは、他に 5 つの GIY-YIG ホーミングエンドヌクレアーゼが見つかっており、segA-E と名付けられている。内、SegA と SegE は、コードされている箇所から数百 bp 離れた位置を切断することが知られている。Belle らは遺伝子 69 を SegF と名付け、SegF が隣の遺伝子 56 の内部の配列を切断することを明らかにした。SegF は T2 の遺伝子 56 のコード鎖の 298 番目と非コード鎖の 296 番目を特異的に切断するが、T4 の遺伝子 56 は切断しない。この傾向は T2 と T4 の DNA を混ぜた場合にも明らかで SegF は T2 の配列のみを切断する。in vitro と異なり、in vivo では T2 も T4 もシトシンが 5-ヒドロキシメチルシトシンに変えられ、更にグリコシル化されているが、in vivo でも SegF は T2 の遺伝子 56 を特異的に切断した。また、SegF が無い場合には localized marker exclusion が起こらなくなった。ただし、T2 の配列が全く T4 のものに置換されなくなるわけではなく、子孫で T2 の遺伝子 56 を持っているものは全体の 20%程度だった。これは、localized marker exclusion が

無くても全長にわたって T2 の配列は T4 の配列に 10-40% は置換されてしまうためである。

T4 と T2 の遺伝子 56 は塩基レベルで 71% の相同性がある。SegF の切断位置はその中でも両者が完全に一致する 31 塩基の中にある。T2 でこの位置が切断されると、配列のよく似た DNA を鋳型にして DNA を修復しなければならないのだが、その場合の鋳型となるのは T4 しかない。SegF は T4 では遺伝子 56 の隣にコードされているが T2 には存在しないので、T4 と T2 で配列が高度に保存されているのは、遺伝子 56 と SegF を挟む二つの遺伝子 *dam* と *soc* になる。だから、T2 の遺伝子 56 の内部を SegF が切断すると、相同組み換えによって *dam* と *soc* の内部の配列が T4 のものに入れ替えられ、SegF の遺伝子は T2 に移されることになる。このように SegF は巧妙に自分自身のコピーを増殖させる。

イントロン内にコードされる通常のホーミングエンドヌクレアーゼは、自分を持たない対立遺伝子座に自身を挿入することで、同種、あるいは同一集団中での自分を持つ個体の割合を増やそうとしている。一方、localized marker exclusion は近縁な他種に自身のコピーを広める戦略と言える。ホーミングが最も有効に働くのは接合と分裂を伴う集団中である。localized marker exclusion は近縁種の DNA と自分の DNA が裸の状態で出会う環境が必要になる。通常の細胞では、近縁種間の生殖は成立しないことが多いので、これはファージのような遺伝因子の中でのみ取り得る戦略なのかもしれない。

Goodrich-Blair H, Shub DA.

Beyond homing: competition between intron endonucleases confers a selective advantage on flanking genetic markers.

Cell. 1996 Jan 26;84(2):211-221.

Belle A, Landthaler M, Shub DA.

Intronless homing: site-specific endonuclease SegF of bacteriophage T4 mediates localized marker exclusion analogous to homing endonucleases of group I introns.

Genes Dev. 2002 Feb 1;16(3):351-362.

2006/07/18

小島 健司 著
禁 無断複写転載