

RAG という転移酵素

我々脊椎動物の獲得免疫系の多様性を担うのは、いわゆる V(D)J 組み換えによる抗体と T 細胞受容体の多様化である。この組み換えを行うのが recombination-activating gene (RAG) の 2 つの遺伝子、RAG1 と RAG2 である。この系が DNA トランスポゾンに由来する仮説は発見当初から唱えられていた。DNA トランスポゾンは転移因子という性質上、自身の DNA を切り出してゲノム中の別の位置に挿入する。ところが、RAG による組み換えは、転移因子に由来しながら、後者の段階が起こらない。切り出された DNA の別の位置への挿入は、有害な結果を生む可能性があるため、起こらないように自然淘汰が働いたのだろう。では、その違いは何に起因するのだろうか？

まず、RAG と DNA トランスポゾンの transposase の作用機序を見てみることにしよう。RAG1 は transposase と同様に D,D,E の保存アミノ酸を持つが、他の配列は transposase とは全く似ていない。D,D,E の間隔が比較的似ているのは、hAT と呼ばれるグループの DNA トランスポゾンの transposase である。hAT は *hobo*、*Ac*、*Tam3* の 3 つの代表的なトランスポゾンの頭文字から採られたグループ名である。この hAT の仲間である *Hermes* の transposase の触媒する反応が 2004 年に報告された (Zhou et al. 2004)。

Zhou らは *Hermes* の transposase タンパク質を大腸菌で発現、精製し、*Hermes* の左末端あるいは右末端の DNA と混ぜて gel-shift assay で結合を見た。左 131 塩基への結合は右 110bp への結合よりも強かったため、続く切断実験でも左末端の DNA 配列 (*Hermes* 内部配列 80 塩基と外側の配列 51 塩基で構成される) を使用している。左末端 DNA と transposase とを混ぜると *Hermes* の境界で DNA が切断される。切断には、 Mn^{2+} あるいは Mg^{2+} が必要である。非変性ゲルと変性ゲルとでの泳動により、切断は、最初に転移因子の 5' 末端で起こり、その後で二本鎖切断が起こることが明らかとなった。(DNA は二本鎖なので、転移因子の両方の境界に 5' 末端と 3' 末端が存在することに注意。) そして、*Hermes* の外部の DNA が切断位置で互いに結合し、ヘアピン構造を採っていることが示された。最初の切断によって露出した 3'-OH がもう一方の鎖を攻撃し、組み換えを起こすことでヘアピン構造が形成される。このヘアピン形成の結果、転移因子の両末端は共に、5'-リン酸基、3'-OH となる。これは V(D)J 組み換えでも同じである。続いて、*Hermes* の 3'-OH は別の DNA 鎖を攻撃し、組み換えを起こす。これは、転移因子の挿入のステップである。2 つの 3'-OH が少し離れた位置で組み換えを起こすため、その間の DNA は修復され、結果 8 塩基の target site duplication (TSD) が形成される。

更に Zhou らは transposase の触媒する反応を 3 段階に分けてそれぞれへの保存アミノ酸の寄与を調べている。ここでは、(1)片側の鎖が切断される、(2)露出した 3'-OH がもう一方の鎖を攻撃し、二本目の鎖が切断されてヘアピン構造が形成される、(3)ヘアピン形成により露出した 3'-OH が別の DNA 鎖を攻撃して組み換えが起こる、の 3 段階に分けられている。hAT の仲間で保存されているアミノ酸は *Hermes* では、D180,D248,E572 に相当するが、いずれも全ての段階に関わっていることが示された。この内、D180 と D248 とは Mn^{2+} (生体内では Mg^{2+}) と直接結合する。また、hAT の transposase は他の DNA トランスポゾンの transposase やレトロウイルスの integrase とは配列は全く似ていないにも関わらず、二次構造予測では同じ RNaseH-fold を取ることが予測された。この構造予測は、X 線結晶構造解析によって確かめられた (Hickman et al. 2005)。

Hickman らの決定した構造によれば、*Hermes* の transposase は 3 つのドメインから構成され、その内の 2 つは RAG1 で予想される構造と一致する。1 つは他の transposase と共通する、retroviral integrase-like fold であり、酵素活性に必要なアミノ酸を含んでいる。このドメインに全て α ヘリックスで構成されるドメインが挿入されているため、D248 と E572 との間隔は他の transposase と比べてはるかに開く結果となる。

DNA トランスポゾンの中で転移中間体として、転移因子の外部配列がヘアピン構造を取ることが示されたのは、*Hermes* が初めてである。Tn5 や Tn10 など他の DNA トランスポゾンでは、転移因子自身の DNA がヘアピン構造を取ることが知られている。従って、*Hermes* の触媒する反応は、RAG の触媒する反応と高い共通性があると言うことができ、*Hermes* を含む hAT の転移機構は RAG の V(D)J 組み換え反応の起源となっていると考えて良さそうである。おそらく、「免疫系はトランスポゾンが作った? : Transib と RAG1」で紹介した、配列上最も RAG1 に近い transposase を持つ *Transib* の仲間も類似の転移機構、類似の transposase の立体構造を持っているだろう。

Zhou らが示したように *Hermes* の transposase は自身を切り出すだけでなく、挿入する活性をも有している。RAG の触媒する反応は、上述の区分で言うならば、(1)と(2)である。ところが、(3)に相当する切り出した DNA の挿入は V(D)J 組み換えでも起こりうることを示されている (Agrawal et al. 1998; Hiom et al. 1998)。

Agrawal らは *in vitro* での RAG による組み換え実験の過程で、基質として利用していた DNA よりも長い DNA が生成されることに気づいた (Agrawal et al. 1998)。基質 DNA は RSS12 と RSS23 を含む線状 DNA であり、RAG によって 317bp の DNA (両末端は RSS12 と RSS23) が切り出されることが想定される。実際、切り出された DNA とその両側の DNA 断片が時間経過に伴って増加した

が、同時に基質よりも長い DNA も増加した。基質よりも長い DNA は 317bp の配列だけを含み、その外側の配列は持っていなかった。更に、両末端に RSS12 と RSS23 を持つ DNA と RAG、HMG2 とを混ぜ合わせると、長い DNA が観察できた。すなわち、長い DNA の生成には、切断は不必要であるが、両末端の RSS12 と RSS23 が必要であった。ちなみに HMG1 及び HMG2 は DNA をねじ曲げる作用を持つタンパク質で切断効率を上昇させる働きを持つ。

続く plasmid を基質として用いた実験で、分子内転移 (intramolecular transposition) と分子間転移 (intermolecular transposition) の証拠を配列レベルで示している。これによると転移の際には、両末端がそれぞれ少し離れた位置の DNA を攻撃するため、5 塩基の TSD が出来ることが多く、低い頻度で 4 塩基と 3 塩基の TSD も観察される。標的となる配列には特徴は認められない。

Hiom らは RSS を含むオリゴヌクレオチドの末端を ^{32}P でラベルし、プラスミド pBR322 と RAG、HMG1 を混ぜ、RAG の活性に必要な Mg^{2+} を加えることで pBR322 がラベルされることを見つけた (Hiom et al. 1998)。これは RAG により切断されたオリゴヌクレオチドが pBR322 に転移することによって起こることが配列からも確認された。標的に特定の配列は認められないが、標的周辺は通常よりも GC-rich であった。転移の際には、5 塩基の TSD がよく生じることも Agrawal らと共通する結果である。両末端に RSS を持つ線状 DNA を RAG と混ぜた場合にも pBR322 への転移が観察され、これは Mg^{2+} の有無に関係なく起こった。 Mg^{2+} は RAG による DNA の切断に必須であるが、別の DNA への挿入は Mg^{2+} に依存しないことがわかる。更に、RSS を持つ線状 DNA の 3' 末端をデオキシヌクレオチドからダイデオキシヌクレオチドに変えた実験から、pBR322 への転移には、末端の 3'-OH が必要であることがわかった。

RAG と *Hermes* の transposase の触媒する反応は、上述のように 3 段階に分けることができる。その内、(2) と (3) は、DNA 内部の 5'-リン酸基と DNA 末端の 3'-OH とをつないで代わりに内部の 3'-OH を露出させるエステル転移反応である。(2) の反応では、露出した DNA 末端がヘアピン構造を取る一本鎖 DNA と交換され、(3) の反応では、直鎖二本鎖 DNA の片側の DNA 鎖と交換される。違いは、3'-OH に攻撃される DNA 鎖の形状であり、これを制御することが出来れば、切り出しと挿入とを区別することが可能となるはずである。

RAG による転移の効率は基質がヘアピン DNA の場合には、直鎖 DNA の場合よりも遙かに高いことが Lee らによって示されている (Lee et al. 2002)。Lee らは Hiom らと同様に RSS を持ったオリゴヌクレオチドの末端をラベルし、様々な形状のプラスミドへの転移を調べた。普通のプラスミドや Z-DNA、三本鎖、巻きがほどけた DNA 領域を含むプラスミドでは転移量は少なく、特定の位置に転移する傾向は認められなかったが、逆向きの 106bp の反復配列を含むプラス

ミドでは転移量が 10 倍に増加し、しかも特定の位置にだけ転移が起こっていることが確認できた。競合実験からも逆向き反復配列を持つプラスミドへの転移は通常のプラスミドへの転移の 10 倍の効率で起こることが示された。

逆向きの反復配列を持つプラスミドでは、supercoil のねじれを解消するために、反復配列領域が同じ DNA 鎖内で塩基対を形成して十字構造 (cruciform) をとることが知られている。そこで、トポイソメラーゼとエチジウムブロマイドを加えてねじれの強度を変えてやることで十字構造の量を段階的に変化させた。結果、supercoil が強いほど、すなわち十字構造が形成されやすいほど特定の位置への転移が増加することが示された。また、逆向き反復配列の長さを変化させても特定の位置への転移が観察されたが、反復配列の中央部分を反復しないようにした場合には、特定の位置への転移が観察されなくなった。配列決定によって転移のほとんどは十字構造の中央部分、すなわちヘアピンの先端で起こっていることが明らかとなった。更にオリゴヌクレオチドを用いた解析によって十字構造の内、ヘアピン構造があればその先端に特異的に転移することが示された。ヘアピンの先端と似た構造を持つ、一本鎖と二本鎖の境界へも部位特異的に転移する。

V(D)J 組み換えの際のエクソン側 (切り出されない側) はヘアピン構造をとるので、転移でのヘアピン構造への嗜好性は切り出し反応でのヘアピン形成の別の側面と見ることができる。切り出された DNA が元の DNA と結合すれば全く同じものに戻る。これは open & cut joint と呼ばれる。しかし、切り出しは 2 つの部位で同時に起こるので、例えば、RSS12 が元々 RSS23 と結合していた DNA と再び結合することもあり得る。これは hybrid joint と呼ばれ、結果として RSS 内部の配列が逆位を起こすことになる。ヘアピン DNA を大量に加えることによって hybrid joint を抑制することができることを Lee らは示している。すなわち、hybrid joint はヘアピン DNA への転移の特殊な例と見なすことができる。hybrid joint が RAG 以外の修復酵素の介在無しに起こることが示されている (Melek et al. 1998)。

ヘアピン構造はゲノム中の様々な位置に認められるし、DNA のねじれはタンパク質との結合によって引き起こされる。しかし、RAG によって切り出された DNA 断片は自由に何処へでも転移出来るわけではないため、これは転移先を制限する一つの要因にはなっているのかもしれない。しかし機能を見た場合には、RAG は hAT の transposase と全く違いは無さそうである。むしろ、当たり前のことではあるが、V(D)J 組み換えと転移との違いは他の種々のタンパク質の関与であると言えるだろう。生体内では、RSS を含む切り出された DNA 断片は RSS 同士が結合して環状 DNA となるが、この過程では、RAG に加えて様々な DNA

修復酵素が働いている。V(D)J 組み換えが転移因子に由来するのは確かだが、転移因子だけに由来するのではないことも確かである。

Zhou L, Mitra R, Atkinson PW, Hickman AB, Dyda F, Craig NL.

Transposition of hAT elements links transposable elements and V(D)J recombination.

Nature. 2004 Dec 23;432(7020):995-1001.

Hickman AB, Perez ZN, Zhou L, Musingarimi P, Ghirlando R, Hinshaw JE, Craig NL, Dyda F.

Molecular architecture of a eukaryotic DNA transposase.

Nat Struct Mol Biol. 2005 Aug;12(8):715-21.

Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG.

Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system.

Nature. 1998 Aug 20;394(6695):744-51.

Hiom K, Melek M, Gellert M.

DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations.

Cell. 1998 Aug 21;94(4):463-70.

Lee GS, Neiditch MB, Sinden RR, Roth DB.

Targeted transposition by the V(D)J recombinase.

Mol Cell Biol. 2002 Apr;22(7):2068-77.

Melek M, Gellert M, van Gent DC.

Rejoining of DNA by the RAG1 and RAG2 proteins.

Science. 1998 Apr 10;280(5361):301-3.

2007/02/22

小島 健司 著
禁 無断複写転載