The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Translation from nonautonomous type IAP retrotransposon is a critical determinant of transposition activity : Implication for retrotransposon-mediated genome evolution
Author(s)	齋藤, 映介
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49956
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏　　名	齋　藤　映　介（さい とう えい すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　２２４５５　号
学位授与年月日	平成20年９月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Translation from nonautonomous type IAP retrotransposon is a critical determinant of transposition activity : Implication for retrotransposon-mediated genome evolution **（非自律型 IAP レトロトランスポゾンからの翻訳は、転移において重要な役割を持つ：レトロトランスポゾンによるゲノム進化への示唆）**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　竹田　潤二 （副査） 教　授　塩田　達雄　　教　授　金田　安史

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

レトロトランスポゾンはヒトゲノムの約４０％を占める転移因子である。レトロトランスポゾンの転移はゲノムの進化に大きな役割を果たしてきたとされており、転移機構の解明は生物の進化を考える上で重要な指標になると予想される。

Intracisternal A particle(IAP)はマウスレトロトランスポゾンの一つであり、ゲノム中に約１０００コピーが存在している。現在、観察できるレトロトランスポゾンの多くは不活化され転移活性を失っているが、IAPには転移活性を維持しているものが存在しており、レトロトランスポゾンの転移メカニズムを解明するための優れたモデルとなると考えられる。IAPにはそれ自身がコードするタンパクにより転移を行う自律型IAPと、自律型IAPから発現するタンパクを用いて転移を行う非自律型IAPがある。生体内では非自律型IAPの転移を高率に認めるが、その機構の詳細は不明である。本研究ではIAPに種々の変異を導入し、転移におよぼす影響を調べることにより、転移機構の一端を明らかにした。

〔　方法ならびに成績　〕

IAPの転移活性を定量するため、自律型および非自律型IAPベクターにGFPレポーターを組み込んだpFLおよびpDE1を作製した。また、自律型および非自律型IAPタンパクの発現ベクターであるpFLexおよびpDE1exを作製した。GFP蛍光はFACSを用いて測定した。pFLをHeLa細胞にトランスフェクションすると転移が起こり、GFP蛍光が観察される。pDE1のみをトランスフェクションしても転移は起こらないが、pFLexと同時にトランスフェクションすると、pDE1 IAP-RNAがpFLexのタンパクにより転移活性を得て、蛍光が観察される。

転移におけるIAPタンパクの機能を調べるため、非自律型IAPであるpDE1に様々な変異を導入し、転移活性を測定した。*cis*に発現する非自律型IAPタンパクを大きく欠損させると、転移効率は有意に減少した。さらに*cis*に発現するタンパクの重要性を確かめるため、タンパクの発現を完全に消失したpDE1と、pDE1exおよびpFLexを全て同時にトランスフェクションしたところ、転移は起こらなかった。これより、*cis*に発現するタンパクの重要性が確認された。

次に、非自律型IAPタンパクの機能を調べるため、免疫染色を試みた。非自律型IAPタンパクを標識するため、pDE1のC末端側にHAタグを付加したpDE1-HAを作製した。pFLをHeLa細胞にトランスフェクションしたところ、自律型IAPタンパクは核の周囲に局在した。pDE1-HAをトランスフェクションすると、非自律型IAPタンパクは核外に広く分布していた。pFLとpDE1-HAを同時にトランスフェクションすると、非自律型IAPタンパクと自律型IAPタンパクは核の周囲に共局在した。このことから、自律型IAPタンパクと非自律型IAPタンパクが細胞内で何らかの相互作用をもつことが示唆された。IAPタンパクの相互作用をさらに確かめるため、pFLおよびpDE-HAをHEK293細胞に同時にトランスフェクションし、免疫沈降およびウエスタン・ブロッティングを行ったところ、HA抗体により沈降したタンパクの中にpFLに由来する自律型IAPタンパクが存在した。

〔　総　　括　〕

本研究により、*cis*に発現した非自律型IAPタンパクがIAPの転移において機能をもち、転移効率を向上させることがわかった。非自律型IAPタンパクは、非自律型IAP-RNAと自律型IAPタンパクとのパーティクル形成を補助していると考えられる。

以前の報告より、自律型IAPの転移にはIAPタンパクが*cis*に発現することが重要であると考えられている。一方、生体で見られるIAPの転移の多くは非自律型IAPによるものであるため、非自律型IAPが自律型IAPタンパクの*trans*な作用を効率よく受けていると考えられる。このことは、従来の*cis*発現が重要であるという報告からは説明できなかった。*cis*に発現した非自律型IAPタンパクが機能を有し、自律型IAPタンパクの*trans*な作用を促進するとする本研究の結果は、非自律型IAPの高転移能力に説明を与えるものであり、レトロトランスポゾンの転移によるゲノム進化を考察する上で、新たな指標となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

レトロトランスポゾンは転移因子の一つである。レトロトランスポゾンは転移により生物のゲノム環境に変化を与えるため、転移機構の解明は進化を考える上で重要な指標になるとされている。

Intracisternal A particle (IAP)はレトロトランスポゾンの一つであり、自律型のものと非自律型のものがある。自律型IAPタンパクは転移活性を持つが、非自律型IAPタンパクは欠損があり転移活性を持たないため、現在まで全く注目されなかった。しかし、実際にマウスで転移が確認されるIAPのほとんどは非自律型であり、またそれらの非自律型IAPタンパクは欠損が小さく、リーディングフレームが保たれているという特徴がみられることから、活性を持たないとされる非自律型IAPタンパクにも機能があるのではないかと考えた。非自律型IAPタンパクの機能を調べたところ、*cis*発現した非自律型IAPが、非自律型IAP-RNAと自律型IAPタンパクとの結合を仲介し、転移を促進するモデルが得られた。

転移活性を持たないIAPタンパクが機能を持つという報告は今までなく、本研究は、転移を考察する上での新たな指標となり、学位の授与に値すると考えられる。