

氏名	もりながやよい 森永弥生
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博第1433号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生物学専攻
学位論文題目	Molecular Function and Biological Implications of Archaeal Intron-encoded Homing Endonucleases (古細菌イントロンにコードされるホーミングエンドヌクレアーゼの分子機能とその生物学的意義)
論文調査委員	(主査) 教授 内田有恆 教授 喜多恵子 助教授 左子芳彦

論文内容の要旨

遺伝子を分断する介在配列であるイントロンは、転写後に前駆体RNAからスプライシングによって除かれることから、遺伝情報をもたない生物学的に無意味なDNA配列であり、真核生物ゲノムに特徴的な遺伝子構造であると考えられてきた。しかしながら、近年種々の微生物ゲノムを研究することにより、古細菌のゲノム上にも従来の予想をはるかに越える多数のイントロンが存在することが明らかになってきた。本論文では、古細菌ゲノム上に存在するイントロンの生物学的意義とその遺伝的伝達・維持機構を解明することを目的として、古細菌ゲノム上のイントロン挿入多型を生み出す分子機構をイントロン内部ORF産物の分子機能に注目して解析している。

主な内容は以下の通りである。

第一章では、研究の背景としてイントロンの定義や種類、生物界における分布を概説すると共に、本研究で焦点をあてる古細菌イントロンのゲノム規模での分布やスプライシング機構について述べている。

第二章では、超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* 種内の近縁株を含む約60株の古細菌についてrRNA遺伝子(rDNA)イントロンの分布とその塩基配列を比較解析した結果を述べている。イントロンはCrenarchaeota門に分類される超好熱性の古細菌株からのみ検出され、進化的に同一起源と考えられるイントロンが生物種の系統関係を反映しない分布パターンを示したことから、これらが古細菌ゲノム間を水平伝播する可能性イントロンであると考えた。

第三章では、まず古細菌rDNAイントロン内部に見い出されるORFについて解析を行い、これらがLAGLIDADG型ホーミングエンドヌクレアーゼ(HEase)をコードすると予測した。次に、*A. pernix*の16Sおよび23S rDNAイントロン内部ORFをそれぞれ*E. coli*発現系により大量発現させ、ORF産物の機能解析を行った結果について論述している。これらのタンパク質(I-ApeIおよびI-ApeII)はイントロン未挿入の対立遺伝子DNAを部位特異的に切断するホーミングエンドヌクレアーゼ(HEase)活性を有していた。認識配列の同定の結果、I-ApeIは5'-GCAAGGCTG[^]AAAC↓TTAAAG-3'(↓は+鎖、[^]は-鎖の切断末端)の19bp認識、I-ApeIIは5'-CTGACTCTC[^]TTAA↓GGTAGCCAA-3'(↓は+鎖、[^]は-鎖の切断末端)の22bp認識であり、DNA切断部位はそれぞれのHEaseがコードされるイントロンの挿入部位と一致していた。また、いずれのHEaseも*A. pernix*細胞内で発現しており、I-ApeIはモノマー、I-ApeIIはホモダイマーを形成する事を明らかにした。更に精製したI-ApeIを*A. pernix*のイントロン(-)株細胞にエレクトロポレーションで導入したところ、染色体DNAが16SrDNA内部で部位特異的に切断されたことから、この酵素が*A. pernix*細胞内の生理条件下でも活性をもつ事を示した。以上から、古細菌イントロンの挿入機構として、HEaseによる標的遺伝子の二重鎖切断を契機として、相同組換えにより修復されイントロン(-)遺伝子に部位特異的に水平伝播するというモデル(ホーミングモデル)を考察している。

第四章では、I-ApeIIによる標的DNA分子認識機構を明らかにする目的で、認識配列内に種々の一塩基置換または多重塩基置換を導入した変異基質に対するI-ApeIIの切断効率を体系的に測定した。その結果、I-ApeIIの基質認識において重

要な塩基を特定した。しかしながらI-ApeIIは認識配列内部の多くのSNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) に対して寛容であり、塩基認識の厳密性は塩基の座位によって異なった。更にI-ApeIIが異なる立体構造ファミリーに属するHEase, I-PpoI (細胞性粘菌 *Physarum polycephalum* 由来) と isoschizomer の関係にある事を見出した。両者のアミノ酸配列の一致率は11.6%であり、構造モデリングの結果からも互いに異なる立体構造をもつと考えられた。上記の変異基質に対する両者の切断効率を比較した結果、2つのHEaseの間で標的DNA認識様式が異なる可能性を示唆している。

以上のようなHEaseのエンドヌクレアーゼ活性における特性は、切断可能な標的DNA配列のバリエーションを増やすことに繋がり、結果的に可能性イントロンが水平伝播できる生物種の範囲を広くするという戦略に寄与していると考察している。

論文審査の結果の要旨

80~100℃の高温条件下で活発に増殖する超好熱古細菌は、種々のバイオ産業技術に応用可能な耐熱酵素を産生すること、また系統進化的に真正細菌とも真核生物とも異なる「第三の生物」に属すること等の理由から、ゲノム研究の対象として強い関心が寄せられている。本研究では、超好熱古細菌ゲノムにおいて従来真核生物ゲノムに特徴的な遺伝子構造であるとされていたイントロンが特定領域に高頻度に挿入されており、それらの一部のイントロンはゲノム間を水平伝播する可動遺伝子としての性質を併せ持つことを明らかにした。さらに、イントロンの可動性に不可欠なタンパク質、ホーミングエンドヌクレアーゼ (HEase) を同定し、その基質特異性の詳細を明らかにした。

本研究の評価すべき点は以下の通りである。

- (1) 古細菌 *Aeropyrum pernix* 種内の12株におけるrDNAイントロン挿入パターンの多様性を明らかにするとともに、*Desulfurococcus* 属や *Pyrobaculum* 属において散発的に報告されていた古細菌rDNAイントロンの分布を系統立てて解析する事により、イントロン挿入パターンに規則性を見出した。加えて、同一部位に挿入されているイントロンの塩基配列の比較に基づき、古細菌rDNAイントロンが一種の可動遺伝子であることを示唆する知見を提供した。
- (2) *Aeropyrum pernix* K1株rDNAイントロン内部にコードされる2つのHEase (I-ApeI, I-ApeII) を新たに同定し、これらの反応特性および認識配列を明らかにした。また、*A. pernix* 細胞からこれらの酵素のエンドヌクレアーゼ活性を検出し、古細菌細胞内部でHEaseが発現し活性を維持していることを初めて示した。I-ApeI, I-ApeIIは認識配列が長い「レアカッター酵素」としての特徴を活かして、メガクローニング (数百万bp規模のサイズのDNA断片のクローニング) やゲノム工学分野におけるツールとしての応用が期待される。
- (3) HEaseによる塩基配列認識機構は未解明な点が多いことから、I-ApeIIをモデルとして標的DNA配列認識機構を解析した。認識配列 (22bp) の内部に網羅的な塩基置換を導入した基質群や、多重塩基置換を導入した基質群を作製しエンドヌクレアーゼ活性の変化を測定した結果、I-ApeIIと標的DNAとの分子間相互作用において特に重要な塩基を特定すると共に、この酵素が認識配列内部の塩基置換に寛容である事を見出した。これらの知見は、多様な認識配列をもつレアカッター酵素群を人為的にデザインして作製する技術の開発に結びつくものである。
- (4) I-ApeIIが異なる立体構造ファミリーのHEase, I-PpoIのisoschizomerである事を見出した。上述の一連の変異型基質を用いた検討から、両酵素の標的DNA認識様式が異なることが判明した。これは、同一のDNA配列に対して異なる複数の分子認識様式が存在する事を見出した最初の例であり、今後構造生物学的な側面からタンパク質とDNAとの相互作用を探究する上で重要なモデルになると考えられる。

以上のように、本論文は古細菌ゲノムにおけるイントロン多型が可動性イントロンの水平伝播により生じたことを示すとともに、イントロン伝播の分子機構における鍵酵素の機能と生物学的意義についてまとめたものであり、微生物学、分子生物学、タンパク質工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年2月19日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。