

氏名	よしながともかず 吉永智一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	論理博第1394号
学位授与の日付	平成13年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	転位性遺伝子としての HIV-1 インテグラーゼの基質 DNA 配列特異性の解析および各塩基の機能解析に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 井口 八郎 教授 七田 芳則

論文内容の要旨

転位性遺伝因子は遺伝子量の増大や遺伝子の再編成に関与することにより生物の進化に大きく寄与してきたと考えられている。転位性遺伝因子は大きなファミリーを形成しており、原核生物から真核生物の広範囲に亘って発見されているが、大半のものは共通の祖先から進化し、共通の反応機構により転位を行っていると考えられる。例えば、転位性遺伝子の末端には保存された配列 CA ヌクレオチドを持ち、かつ転位を触媒する酵素(トランスポゼースまたはインテグラーゼ)の活性中心のモチーフはすべて同じである。申請者は転位因子の反応機構を分子レベルでさらに詳細に解明することを目指し、研究対象としてレトロウイルス HIV のインテグレーション反応を選んで解析を進めた。この系は、反応段階が少なく、*in vitro* で1種類の酵素インテグラーゼだけで反応することができるため、上の目的に特に有利と考えられた。

この研究を開始した当時、レトロウイルスのインテグレーション反応は大筋として次の3段階からなると考えられていた—(1)long terminal repeat (LTR) 末端の2ヌクレオチドを切り取る反応(3'プロセッシング)、(2)3'プロセッシング反応によって生じた—OH末端が、挿入のターゲットとなる DNA の燐酸結合を切断すると同時に自らが切断点に結合する反応(ストランドトランスファー)(3)細胞の修復系の酵素群によるギャップの修復。そこで、申請者はこれらの各段階に対応するインテグラーゼ:DNA複合体を同定することにより、反応過程の詳細とその特異性を追究することを企て、そのために組換え体 HIV-1 インテグラーゼと LTR 末端を模して合成した 21 bp のオリゴヌクレオチドを基質として用いる *in vitro* インテグレーションアッセイ系にさらに UV クロスリンク法を組み合わせるといふ新しい解析法を開発した。この UV クロスリンクアッセイにおいて検出される三本のバンドのうち、一番サイズの大きいバンド a ではその出現に基質 DNA 配列に対する特異性が見られ、DNA 配列としては LTR 末端から3番目と4番目の塩基対が非常に重要であることがわかった。さらにバンド a ではインテグラーゼが LTR の3'末端の2塩基のどちらかとクロスリンクされていること、またバンド a は3'プロセッシング反応直前の複合体(プレクリページ複合体)に相当することなどがわかった。つまり、インテグレーション反応における基質 DNA 配列特異性は反応の段階ではなくて DNA 結合の段階で生じていることが示された。

申請者はさらに、欠失変異基質やミスマッチ変異基質を作製して UV クロスリンクアッセイを行い、LTR 末端4塩基対(5'-CAGT-3'/5'-ACTG-3')に含まれる個々の塩基の役割を解析することに成功した。LTR の3'末端2塩基は無くてもストランドトランスファー反応が起きるが、通常はこの2塩基によってプレクリページ複合体が形成される。次の2塩基 CA は配列特異的結合に重要で、どちらかを変異させるだけでインテグラーゼは基質 DNA にほとんど結合できず、従って反応も起らない。LTR の5'末端の2塩基については、配列特異性は存在しないがストランドトランスファーに重要であり、この2塩基が無いと3'プロセッシングは起こるがストランドトランスファーは起きない。5'末端から3番目の T もストランドトランスファーに重要である。5'末端から4番目の G は配列特異的な結合に重要である。以上のように個々の塩基は異なる役割を担っていることが一連の綿密な実験によって示された。

これらの研究成果を踏まえて、申請者は独創的なレトロウイルスのインテグレーションメカニズムのモデルを提唱してい

る。また、インテグラーゼ/トランスポゼースファミリーにおける基質 DNA の認識機構について比較しながら論じ、さらに転位性遺伝因子の進化に関しても、免疫遺伝子の再編成を含めて興味深い考察を行っている。

なお、参考論文は HIV-1 インテグラーゼコアドメインとインテグラーゼ阻害剤の共結晶の構造を解析し報告したものである。

論文審査の結果の要旨

学位申請者は生物の進化に大きく寄与してきたと考えられる転位性遺伝因子 (transposable genetic element) のファミリーについて比較検討し、これらが共通の反応機構を持つことを確認した上で、最も単純な反応機構を進化させてきたと考えられるレトロウイルス Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) のインテグレーション反応を研究対象に選んだ。申請論文は生化学的手法を駆使して HIV-1 インテグラーゼの基質配列特異性ならびに各塩基の機能について研究したものである。

申請者はまず、long terminal repeat (LTR) 末端を模して合成したオリゴヌクレオチドと組換え体インテグラーゼを用いた *in vitro* インテグレーションアッセイを構築した。それを用いて、反応の初期段階である基質 DNA とインテグラーゼの結合の特異性を調べることを企て、当初ゲルシフトアッセイなどの定法による解析を試みたが成功しなかった。その原因は、インテグラーゼは難溶性の蛋白であり、特に DNA 存在下で大きな複合体を形成するため非変性ゲルでは電気泳動できないか、もしくは酵素の通性としてインテグラーゼは反応後速やかに基質 DNA と解離してしまうかのいずれかであろうと推測された。そこで、申請者は DNA と蛋白を短波長 UV で照射して共有結合的に架橋した後に、変性ゲル電気泳動にかける工夫をこの分野で初めて試み、見事に成功した。この UV クロスリンク法によって、これまでは区別できなかったインテグラーゼと基質 DNA の結合の段階と 3' プロセッシング反応の段階を区別して解析できるようになった。

また申請者はこのアッセイ系で、UV クロスリンク後に再度反応を継続させることができることを発見し、このことを利用して一連の綿密な解析を遂行した。特に重要な結果として、基質 DNA の標識部位を工夫することにより、インテグレーション反応における基質 DNA 配列特異性は反応の段階ではなくて DNA 結合の段階で生じていることを明らかにすることができた。これは、当該分野において特筆に値する新知見として評価されている。

申請者はさらに、欠失変異基質のみならず、ミスマッチ変異基質を作製して活用するという創意に富む実験を遂行し、LTR 末端 4 塩基対 (5'-CAGT-3'/5'-ACTG-3') に含まれる個々の塩基の役割を解析することに成功した。実際、LTR の 5' 末端 3 塩基はストランドトランスファーにのみ重要であることがわかり、インテグレーション反応のメカニズムを考える上で非常に興味深いデータが得られた。

これらの研究成果を踏まえて、申請者はレトロウイルスのインテグレーションメカニズムのモデルを提唱している。これは、今後の研究の道標として大変意義がある。また、インテグラーゼ/トランスポゼースファミリーにおける基質 DNA の認識機構について比較して論じている。さらには転位性遺伝因子の進化に関しても興味深く独創的な考察を加えている。以上の成果は、転位因子の研究分野に新たに貴重な一石を投じたものとして高く評価される。よって、本論文は理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。

なお、平成13年3月15日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた。