

イントロンとホーミングエンドヌクレアーゼはどう出会った？

homing endonuclease は多くが自己スプライシングイントロン内部にコードされている。また、自己スプライシングタンパク質である intein 内部にコードされている場合もある。更に、独立したタンパク質として遺伝子間領域にコードされているものもファージでは報告されている。Shub の研究室から報告された 2 つの論文は、homing endonuclease を内部に持つ自己スプライシングイントロンがどのように誕生したのかについて示唆を与えてくれる（紹介記事 Edgell 2009 参照）。

最初の論文は T 奇数系ファージに存在する homing endonuclease についてのものである（Bonocora and Shub 2009）。T7 系ファージの遺伝子 5 は DNA polymerase をコードしている。T7 ファージは遺伝子 5 と遺伝子 5.5 の間に遺伝子 5.3 をコードしている。この遺伝子はシアノバクテリアの I-Ssp6803I というエンドヌクレアーゼと弱い類似性が認められ、homing endonuclease の一種と考えられる。一方 T3 ファージは同じ位置に HNH homing endonuclease に属す遺伝子 5.3 を持ち、近縁の *Yersinia* ファージ ϕ YeO3-12 と *Pseudomonas* ファージ PA11 も相同な遺伝子を持っている。 ϕ I、W31、K1F の各ファージはどちらの遺伝子 5.3 も持っておらず、遺伝子 5 と 5.5 の間はたった 19 塩基しか離れていない。しかし、遺伝子 5 の後ろから 156 塩基目に 601 塩基のグループ I イントロンを持つ。このイントロンは HNH homing endonuclease をコードしている。また、他の近縁なファージである、*Yersinia pestis* ファージ A1122、 ϕ IIP、 ϕ IHW、H、ViIII、C21R は homing endonuclease も intron も持っていない。T3、 ϕ YeO3-12、PA11 の遺伝子 5.3 と、 ϕ I、W31、K1F のイントロンの HNH homing endonuclease は互いに近縁であることがわかった。

ϕ I と W31 のイントロンの持つ homing endonuclease は in vitro でイントロンの挿入されていない遺伝子 5.5 を切断することがわかった。この切断は bottom strand 一本鎖の切断で top strand は切断されなかった。イントロンにコードされていない homing endonuclease については、T3 と T7 の遺伝子 5.5 の発現がうまくいかなかったので、ファージを感染させた細菌の抽出液を用いて切断実験を行っている。すると ϕ I と T3 については bottom strand の切断が認められ、homing endonuclease コード領域を取り除くと切断が起こらなくなることから homing endonuclease が切断を担っていることが示された。以降、 ϕ I の homing endonuclease を I-TsII（Intron-encoded endonuclease from T-seven-like phages）、T3 の homing endonuclease を F-TsII（Free-standing endonuclease from T-seven-like phages）と表記する。I-TsII と F-TsII は ϕ IIP、T7 の遺伝子 5 の配列と、 ϕ I、W31 の遺伝子 5 からイントロンを取り除いた配列の DNA を切断することができたが、

ϕ I のイントロンを持ったままの遺伝子 5 を切断することは出来なかった。面白いことに T3 の遺伝子 5 は I-TsII には切断されたが、T3 由来の F-TsII には切断されなかった。これは F-TsII が T3 のゲノムを切断してしまうと T3 にとって有害となるからであろう。

I-TsII、F-TsII いずれの切断位置もイントロンの挿入されている位置の 3' 側 1 塩基後ろであることは、シーケンスゲルでの電気泳動で明らかにされた。切断されるのは、GA の相補鎖である TC の間である。

いずれの homing endonuclease も homing endonuclease 自身の homing に寄与することが示されている。 ϕ I 野生型とイントロンを除いた ϕ I を共感染させると、イントロンを持つファージの割合が 54% から 92% へ増加した。また、T3 の遺伝子 5 の配列を F-TsII 感受性に置換した上で遺伝子 5.3 (F-TsII) を除いたファージを T3 野生型と共感染させると、置換された遺伝子 5 の配列と遺伝子 5.3 を両方持つファージの割合が 90% 以上に達した。

話は変わって、T4 ファージに近縁でシアノバクテリアに感染するファージのグループ myophage には光合成系の遺伝子がコードされている。psbA は全てのファージにコードされており、psbD は一部のファージにコードされている。この 2 つの遺伝子はほとんどのファージで 177 bp 以下の間隔でコードされている。例外は S-PM2 でこのファージでは 2 つの遺伝子の間に別の 2 つの ORF が存在する。そして、psbA には活性に重要な位置に 212 bp のグループ I イントロンが挿入されている。S-RSM88 というファージも psbA と psbD に挟まれた領域が S-PM2 の配列とほぼ一致する。2 つの ORF の内、前側の orf177 のタンパク質は T4 ファージの遺伝子 49 のコードするエンドヌクレアーゼと類似性が認められた。遺伝子 49 は holiday junction resolvase であるが、Zeng らは orf177 を新種の homing endonuclease であると考え、解析を行った (Zeng et al. 2009)。

S-PM2 の orf177 のコードするタンパク質は別のファージ S-BM4 の psbA 遺伝子コード領域を二本鎖切断する活性を示したが、イントロンを持った S-PM2 の相同領域は切断しなかった。このため Zeng らはこのタンパク質を F-CphI

(free-standing homing endonuclease, Cyano phage, I) と命名した。F-CphI の切断位置は、top strand がイントロンの挿入位置の下流 6 塩基目、bottom strand は下流 2 塩基目であった。従って 4 塩基の 3' 突出が生じる。また、F-CphI は近縁なファージ P-SSM2 の相同な配列も切断したが、P-SSM2 の F-CphI に相同なタンパク質は切断活性を示さなかった。これは別の配列を切断するためかもしれないし、あるいは偽遺伝子化しているのかもしれない。

F-CphI の認識する DNA 領域はイントロンの挿入位置の上流 10 塩基から下流 9 塩基までであった。実際に、イントロンが挿入されている psbA の DNA は切断できない。また、S-BM4 と S-PM2 の 2 種類のファージは psbA の配列に違いが

あるがイントロンを取り除いた S-PM2 を F-CpH1 が切断したことから、配列の違いは切断活性に影響せず、イントロンの有無だけが切断に影響していることがわかった。

以上の 2 つの結果から、homing endonuclease をコードしたグループ I イントロンの進化について興味深い知見が得られる。イントロン内の homing endonuclease とイントロン外の homing endonuclease では増殖機会に違いがある。イントロン内のものは、イントロンの挿入されていない同種の DNA へ挿入の機会を窺う。一方イントロン外の場合は近縁な別種の DNA へ挿入する機会を狙う。これは homing endonuclease が自身のコードされている DNA を切断しないための戦略の違いである。すなわちイントロン内のものは、イントロンの有無が標的位置の配列を大きく変えているため、イントロンの無い標的を切断することが出来るのに対して、イントロン外の場合は、標的 DNA の塩基配列のわずかな違いを指標に見分ける必要があるためである。しかし、Zeng らの結果は、イントロン内に挿入されていなくても近傍にあれば homing endonuclease がイントロンの有無を指標にして自己非自己を見分けることが可能になることを示している。この様式は collaborative homing と名付けられている。また、Bonocora らの結果は、イントロン内の homing endonuclease とイントロンのそばの homing endonuclease が同一起源を持つ場合があることを示している。組み合わせると以下のようなシナリオができあがる。

元々イントロンと homing endonuclease は別々に標的を選択していた。すなわちイントロンは、非常に重要な位置に挿入されることで組み換えにより取り除かれる機会を最小限に抑えている。一方 homing endonuclease は異種間の組み換えによりコピーを増やすため、高度に保存された 2 つの領域の間に挿入され、片方の保存された配列を切断するように進化した。別々に進化してきたイントロンと homing endonuclease はたまたま高度に保存された同じ遺伝子を標的とするようになり、組み換えで同じゲノム上に存在するようになる。イントロンと homing endonuclease は協調して、近縁なファージにコピーを増やす戦略を取るようになるが、やがて homing endonuclease の標的配列認識の厳密性が無くなり、イントロンの有無で標的を見分けるように進化する。これにより近縁種だけでなく同一種のイントロンを持たないゲノムへのコピーが可能となる。偶然 homing endonuclease がイントロン内に転移すると、よく見られるような homing endonuclease をコードしたイントロンが完成する。

Edgell DR.

Selfish DNA: homing endonucleases find a home.

Curr Biol. 2009 Feb 10;19(3):R115-7. Review. PubMed PMID: 19211047.

Bonocora RP, Shub DA.

A likely pathway for formation of mobile group I introns.

Curr Biol. 2009 Feb 10;19(3):223-8. PubMed PMID: 19200727; PubMed Central PMCID: PMC2856452.

Zeng Q, Bonocora RP, Shub DA.

A free-standing homing endonuclease targets an intron insertion site in the psbA gene of cyanophages.

Curr Biol. 2009 Feb 10;19(3):218-22. PubMed PMID: 19200728.

2011/03/10

小島 健司 著

禁 無断複写転載