

non-LTR レトロトランスポソンの 5'挿入機構

Luan らによって 1993 年に target-primed reverse transcription (TPRT) モデルが提唱されて以来 (Luan et al. 1993)、non-LTR レトロトランスポソンの 3'側の挿入機構についてはかなり詳細にわかってきている。エンドヌクレアーゼが切断した標的 DNA をプライマーにして、自身の RNA を逆転写する。現在では、その次のステップに関心が集まっている。すなわち、cDNA 合成の終了、そして sense 鎖の DNA の合成である。ここでは主に、L1 と R2 という 2 つの non-LTR レトロトランスポソンでわかってきたことを紹介したい。

<L1 の解析から>

様々な遺伝病の原因となる L1 については、ヒトゲノム配列の決定以来多数の解析がなされてきた。元々 L1 では、5'側が途中で切れているコピーが多数存在することが知られていた。このように 5'側が途中で切れることを 5' truncation と呼ぶ。個々のコピーの 5'末端を全長の配列と比較すると、3'側が多く、5'側に進むに従って徐々に少なくなっていることがわかる。しかし、5'UTR の途中から始まるコピーがほとんど見られないのにもかかわらず、全長のコピーは多数観察される。そこから、全長のコピーと 5' truncation のコピーとは異なる機構によって挿入される可能性が考えられてきた。

一方、2001 年には新しい機構が提唱された (Ostertag and Kazazian 2001)。twin-priming と名付けられたこの機構では、切断されたゲノム DNA の両方の 3'末端から逆転写が行われる。Ostertag らは最近転移した L1 のコピーの約 25% で 5'側の配列が逆向きになっていることから twin-priming モデルを提唱している。通常の TPRT では、切断された bottom 鎖 (antisense 鎖) の 3'末端から逆転写が開始され、その後、top 鎖 (sense 鎖) が切断されて、合成された cDNA を鋳型に DNA 合成が行われると考えられている。一方、cDNA 合成が終わるよりも早く top 鎖が切断されてしまった場合、top 鎖の 3'末端が相補性のある RNA の配列とアニールして、逆転写が行われてしまうような状況が考えられる。この結果、両側からレトロトランスポソンの逆転写が起こるため、5'側には、3'→5'方向のレトロトランスポソンが、3'側には、5'→3'方向のレトロトランスポソンが合成される。合成された鎖は、レトロトランスポソンの中央部分で配列の短い相補性によって組み換えられる。これが想定されている twin-priming の機構である。

cDNA 合成が終わるよりも早くに top 鎖が切断された場合でも、top 鎖の 3'末端が cDNA の途中の配列と相補性を持っている場合には、5' truncation が起こるはずである。Martin らはこのような double TPRT モデルを提唱している (Martin

et al. 2005)。この場合、top 鎖の 3'末端、すなわち target site duplication (TSD)の 3'末端の配列は、レトロトランスポソンの 5'側の配列と数塩基程度の相同性を持つ。これは、microhomology と呼ばれている。しかし、同じ microhomology を持つ 5' truncation の機構として全く異なるモデルも提唱されている。それが、microhomology-mediated end-joining モデルである (Zingler et al. 2005)。

Zingler らは 5' truncation を起こした L1 のコピーの TSD の 3' 末端と L1 の 5' 末端に 1-12 塩基の相同性が見られることを示している。これは、ランダムに転移する場合と比較して有意に長い。一方、全長の L1 のコピーではそのような傾向は認められなかった。Martin らも 5' truncation を起こした L1 のコピーでは 1-8 塩基の相同性が有意に多いことを報告している (Martin et al. 2005)。Zingler らは Martin らとほぼ同じ解析結果から、DNA 修復系の一つである microhomology-mediated end-joining (error-prone end-joining, microhomology-driven single strand annealing と呼ばれる) が関与しているのではないかと考えた。microhomology-mediated end-joining は 1-10 塩基の相同性を利用して、切断された DNA の結合が起こる機構で、古典的な non-homologous end-joining に必要な Ku70、DNAPKcs、XRCC4 などが関与しないことが報告されている。Zingler らのモデルの根拠は、L1 の 5'境界領域には、microhomology だけでなく、数塩基の挿入や欠失がみられることである。このような挿入欠失は、microhomology-mediated end-joining でも見られることが報告されている (Odersky et al. 2002)。一方、double TPRT モデルではこの説明は出来ないと主張されている。一つ注目すべき点は、double TPRT モデルでは、2 本目の、すなわち sense 鎖の合成が逆転写酵素によって担われているのに対して、microhomology-mediated end-joining モデルでは、細胞の DNA ポリメラーゼが担っていることである。レトロウイルスでは細胞質で逆転写を行うため、2 本の鎖を両方とも逆転写酵素が合成する必要があるが、non-LTR レトロトランスポソンでは、核内で逆転写が起こるため、細胞の DNA ポリメラーゼを使用することが可能である。ショウジョウバエの non-LTR レトロトランスポソン Jockey とトリパノソーマの L1Tc (L1 と名が付いているが、いわゆる哺乳類の L1 とは系統的に離れている) の逆転写酵素は DNA を鋳型にして DNA を合成する活性が報告されている (Ivanov et al. 1991; Garcia-Perez et al. 2003)。

ここまでは、ゲノム配列の解析から提唱されている機構であるが、L1 では *in vivo* の転移系が構築されているので、新規に挿入された配列を解析することも可能である。Symer らの解析では、実験で転移した L1 とゲノム中の L1 との間には、高い共通性が見られた (Symer et al. 2002)。5' truncation はもちろん、5'側の逆位や microhomology、5'境界での鋳型によらない数塩基の挿入 (non-template nucleotide addition)、別の RNA を鋳型にした塩基の挿入などが観

察された。Gilbert らは更に詳細に解析を行っている (Gilbert et al. 2005)。彼らが解析した 100 個の挿入の中には、6 つの全長の L1 が含まれるが、その内 2 つでは、5'境界に G が付加されていた。これは、5'cap の 7-methylguanosine を逆転写したものだと考えられる。一方、5' truncation を起こした L1 のコピーでも鋳型を持たない塩基の付加が起こっているが、その配列は G に偏ってはいない。18 個では 5'側の逆位が起こっていた。ちなみに Gilbert らは鋳型を持たない塩基の付加を逆転写酵素の terminal transferase 活性によるものと解釈している。ここでは複雑になるので詳しくは述べないが、この他に、他の RNA へ鋳型が入れ替わって逆転写される場合や、挿入の際にゲノム中に既に挿入されている L1 と組み換えを起こす場合など、多様なケースが報告されている。

L1 の解析から得られた 5'挿入に関する知見とモデルをまとめると以下のようになる。

- (1) 全長の L1 の 5'側の挿入は未知の機構による。この際、5'cap が逆転写されることはあるが、ランダムな塩基の挿入は起こらない。
- (2) 逆位を伴わない L1 の 5' truncation には TSD の 3'端と L1 の内部配列の microhomology が重要な役割を果たす。Double TPRT モデルでは、top 鎖の切断点 (TSD の 3'端) をプライマーにして逆転写酵素が DNA を合成する。一方、microhomology-mediated end-joining モデルでは、細胞の DNA 修復系の microhomology-mediated end-joining 機構が働いて、DNA ポリメラーゼによって DNA が合成される。両者では sense 鎖を合成するポリメラーゼの種類が異なる。
- (3) 逆位を伴う L1 の 5' truncation は twin-priming による。top 鎖の切断点をプライマーにし、RNA を鋳型にして逆転写酵素が TPRT を行う。この際、プライマーは microhomology によって RNA とアニールする。逆向きのレトロトランスポゾン同士の結合もやはり microhomology によるがその機構は未知である。

このように 5'側の挿入機構には未知の部分が多い。(2)、(3)の機構は、ゲノムの安定性やゲノム進化においては重要な意味合いを持つが、non-LTR レトロトランスポゾンにとっては転移の失敗として意味を持たないことは注意しておくべきだろう。

<R2 の解析から>

もう一つ、5'側の挿入機構が解析されているのが R2 である。R2 は 28S rDNA に特異的に挿入され、28S rRNA と一緒に転写されると考えられている。R2 の場合、RNA と標的となるゲノム DNA との間に非常に長い相同性が存在する。こ

こは、周辺の配列がそれぞれに異なる L1 とは大きく異なる。L1 では内部のプロモーターによって転写開始点が決定されている。

Eickbush らはカイコの R2 のタンパク質と RNA をショウジョウバエの胚に注射することで R2 を転移させる系を構築した (Eickbush et al. 2000)。転移効率を上げるために RNA は R2 の 5'UTR と 3'UTR だけをつないでいる。R2 の 5'側に 28S rRNA の配列を付け足さない場合には挿入位置の 5'側の rDNA に数塩基から数百塩基にも及ぶ顕著な欠失が認められた。内在性の R2 の場合にはあっても数塩基程度の欠失しかないの、これは人工的なものであろう。また、数塩基の鑄型を持たない塩基の挿入も認められた。続いて、より自然の状況に近いように、R2 の 5'側にカイコの 28S rDNA の配列を 480 塩基あるいは 170 塩基付け加えたコンストラクトを作成したところ、挿入位置に 28S rDNA の欠失は認められなくなった。ところで、カイコの 28S rDNA とショウジョウバエの 28S rDNA では数塩基の違いがあり、それによって挿入後の配列が元々のショウジョウバエの配列か、あるいは、逆転写されたカイコの配列かを区別できる。興味深いことに、ほとんどのコピーでは、カイコの 28S rDNA 配列とショウジョウバエの 28S rDNA の一部が入れ替わっていた。さらに、モザイク状になっている場合もあった。ここから、Eickbush らは R2 だけでなくカイコの 28S rDNA 配列まで続けて逆転写されたものがショウジョウバエの 28S rDNA と相同組み換えされることによって 5'側の挿入が起こっているというモデルを提唱している。

Fujimoto らもカイコの培養細胞 C65 を用いた *in vivo* 転移系によってほぼ同じモデルを提唱している (Fujimoto et al. 2004)。Fujimoto らは全長のカイコの R2 を転移させる系を構築し、PCR によって転移の有無を検出している。彼らは 3'側と 5'側の挿入を別々に解析している。3'側の挿入には、R2 のタンパク質が必要だが、5'側の挿入には R2 のタンパク質は必要ではなく、5'側の 28S rDNA と同じ RNA 分子として転写されることが必要であると主張している。

このように、rDNA など転写される反復配列に挿入される配列特異的なレトロトランスポゾンでは、L1 の全長が挿入される機構とは全く異なる機構で挿入が行われている可能性がある。

Bibillo らは R2 の *in vitro* 系での解析から、template jump という機構を提唱している (Bibillo and Eickbush 2002, 2004)。Bibillo らは *in vitro* の実験から、R2 タンパク質が、鑄型の RNA の 5'末端まで逆転写を終えた後、別の RNA の 3'末端から逆転写を続けることを発見し、これを template jump と読んだ (Bibillo and Eickbush 2002)。この現象が複数回起こることで鑄型 RNA の数倍の長さの cDNA が合成できる。ところが、鑄型の RNA の 3'末端が DNA オリゴヌクレオチドとアニールしていると、この template jump が起こらない。また、RNA の逆転写終了後に RNA へだけでなく、DNA への template jump も起こることもわかった。

これらから、鋳型 RNA の 5'末端まで逆転写を終えた R2 タンパク質の一部は、別の一本鎖 RNA または一本鎖 DNA の 3'末端へと鋳型を変更し、DNA 合成を継続することができると言える。これを non-LTR レトロトランスポソンの転移に当てはめると、レトロトランスポソンの全長を逆転写し終えた後に、切断された top 鎖の 3'末端へと鋳型を変更して DNA 合成を続けるという機構が想定できる。一方、別の RNA へ template jump すれば、5'側が遺伝子の cDNA で 3'側がレトロトランスポソンの cDNA というキメラ遺伝子が合成されることも考えられる。実際、後者のような挿入配列も L1 で報告されている (Gilbert et al. 2005)。

2004 年の論文で Bibillo らが更に template jump の詳細を詰めた結果、template jump と 5'境界での鋳型によらない数塩基の挿入 (non-template nucleotide addition) との驚くべき関係が明らかになった (Bibillo and Eickbush 2004)。R2 の逆転写酵素は鋳型 RNA の 5'末端まで逆転写を終えた後、鋳型無しに 1-3 塩基を付加する活性を持っている。この活性は、鋳型 RNA の 5'末端の構造に大きな影響を受ける。5'-cap があると、付加はほとんど起こらないが、5'末端の OH 基が露出している場合には、3 塩基付加することが多い。リン酸基がある場合には、0-3 塩基の付加が起こる。更に、R2 の逆転写酵素は、プリンを付加しやすく、A は 3 塩基、G は 2 塩基、C や T は 1 塩基付加する傾向がある。そして、この付加された塩基が template jump 後の鋳型の 3'末端の塩基、あるいはその付近の塩基とアニールすることで template jump が安定化される。ただし、A のように 3 塩基も付加されてしまうと template jump の効率は落ちる。この解析は RNA から RNA への template jump を調べたものだが、これが RNA から DNA への template jump にも当てはまるならば、5'末端の挿入に non-template nucleotide addition が大きな役割を果たしていることになる。また、5'末端の挿入が、どの塩基が付加されるかという確率的な要素によって影響を受けることになり、5'境界の多様性を生む原因になっていることにもなる。R2 と L1 とも系統的に離れている L1Tc の逆転写酵素も template jump を起こすことが示されている (Garcia-Perez et al. 2003)。ただし、この場合には、鋳型 RNA の 5'末端と 3'末端とが 2 塩基一致する場合のみ template jump が起こっている。

Bibillo らは、鋳型 RNA の途中で template jump が起こる可能性について否定的な結果を得ている。これは non-template nucleotide addition が template jump に重要であるという結果と一致する。これは同時に、5' truncation の機構として、template jump がふさわしくないことを意味している。鋳型 RNA の途中では、5'側の RNA が邪魔になって受け手となる RNA の 3'末端が逆転写酵素と結合できないためであろう。

上述したように、Zingler らは、microhomology-mediated end-joining モデルの根拠として、5'境界に見られる塩基の挿入、欠失を挙げている (Zingler et al. 2005)。

しかし、Bibillo らの解析によると non-template nucleotide addition は逆転写酵素が触媒している。Cost らによる L1 の *in vitro* の TPRT 解析系でも、non-template nucleotide addition が観察されている (Cost et al. 2002)。これらは、microhomology-mediated end-joining モデルの主張と矛盾する結果である。また、データは示されていないが、Bibillo らは、R2 のエンドヌクレアーゼが一本鎖 DNA の 3' エキソヌクレアーゼ活性も持っているコメントしている。となれば、塩基の欠失も細胞の DNA 修復系の関与無しで可能となる。microhomology-mediated end-joining の関与については今後解析が必要となるだろう。

R2 の解析から提示されたモデルをまとめると、

- (4) R2 のように RNA の 5' 側の配列が標的 DNA と一致する場合には、上流での相同組み換えによってレトロトランスポゾンの全長が挿入される。
- (5) 逆転写酵素の持つ鋳型無しにヌクレオチドを 3' 末端に付加する性質が、付加されたヌクレオチドと top 鎖の 3' 末端付近のヌクレオチドとのアニールによる安定化を生み、template jump を引き起こす。

残念ながら、*in vitro* の解析から明らかになった R2 の逆転写酵素の性質は、上述の 28S rDNA との相同組み換えと相容れない性質である。一つの原因としては、*in vitro* の解析では、数百塩基の短い RNA が鋳型に使用されていることがあると思われる。また、L1 では全長の挿入の際にはランダムな non-template nucleotide addition は観察されておらず、R2 の *in vitro* の結果が全長の挿入の際の機構を示すものなのか、それとも 5' truncation の場合に当てはまるのかも不明である。このように 5' 側の挿入機構の解析はようやく緒に就いた段階であり、モデルの可否も含めて今後様々な解析がなされていくことだろう。その一端を筆者が担えれば良いのだが。

次ページにここまでで提案されたモデルをまとめた図を載せた。理解の助けになれば幸いである。

Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH.

Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition.

Cell. 1993 Feb 26;72(4):595-605.

Ostertag EM, Kazazian HH Jr.

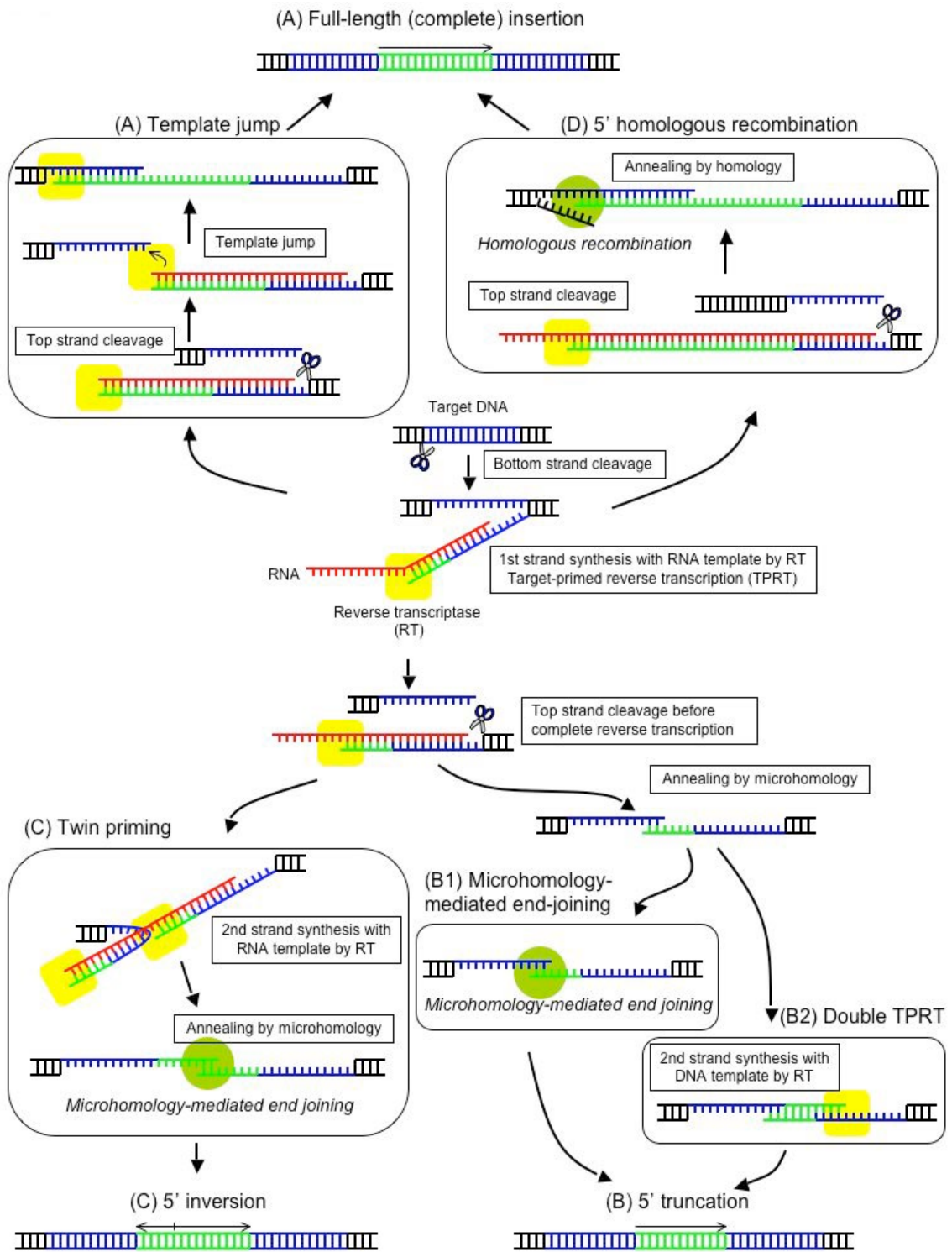
Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition.

Genome Res. 2001 Dec;11(12):2059-2065.

Martin SL, Li WL, Furano AV, Boissinot S.

The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism.

Cytogenet Genome Res. 2005;110(1-4):223-228.



Zingler N, Willhoeft U, Brose HP, Schoder V, Jahns T, Hanschmann KM, Morrish TA, Lower J, Schumann GG.

Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining.

Genome Res. 2005 Jun;15(6):780-789.

Odersky A, Panyutin IV, Panyutin IG, Schunck C, Feldmann E, Goedecke W, Neumann RD, Obe G, Pfeiffer P.

Repair of sequence-specific 125I-induced double-strand breaks by nonhomologous DNA end joining in mammalian cell-free extracts.

J Biol Chem. 2002 Apr 5;277(14):11756-11764.

Ivanov VA, Melnikov AA, Siunov AV, Fodor II, Ilyin YV.

Authentic reverse transcriptase is coded by jockey, a mobile Drosophila element related to mammalian LINES.

EMBO J. 1991 Sep;10(9):2489-95.

Garcia-Perez JL, Gonzalez CI, Thomas MC, Olivares M, Lopez MC.

Characterization of reverse transcriptase activity of the L1Tc retroelement from Trypanosoma cruzi.

Cell Mol Life Sci. 2003 Dec;60(12):2692-701.

Symer DE, Connelly C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, Boeke JD.

Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo.

Cell. 2002 Aug 9;110(3):327-338.

Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, Moran JV.

Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells.

Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(17):7780-7795.

Eickbush DG, Luan DD, Eickbush TH.

Integration of Bombyx mori R2 sequences into the 28S ribosomal RNA genes of Drosophila melanogaster.

Mol Cell Biol. 2000 Jan;20(1):213-223.

Fujimoto H, Hirukawa Y, Tani H, Matsuura Y, Hashido K, Tsuchida K, Takada N, Kobayashi M, Maekawa H.

Integration of the 5' end of the retrotransposon, R2Bm, can be complemented by homologous recombination.

Nucleic Acids Res. 2004 Mar 3;32(4):1555-1565.

Bibillo A, Eickbush TH.

The reverse transcriptase of the R2 non-LTR retrotransposon: continuous synthesis of cDNA on non-continuous RNA templates.

J Mol Biol. 2002 Feb 22;316(3):459-473.

Bibillo A, Eickbush TH.

End-to-end template jumping by the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon.

J Biol Chem. 2004 Apr 9;279(15):14945-14953.

Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD.

Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro.

EMBO J. 2002 Nov 1;21(21):5899-910.

2006/05/08

小島 健司 著
禁 無断複写転載