

L1 の転写減衰と遺伝子の発現制御

ヒトゲノムの 16% を占める LINE-1(L1) は低い確率で転移し、遺伝病やガンを引き起こすことが報告されている。L1 はプロモータのメチル化などのエピジェネティックな制御によって抑制されているため転移することはほとんどない。しかし転移はしなくても、周辺の遺伝子の転写にいろいろと影響を与えているらしい。

Perepelitsa-Belancio らはヒトの L1 の sense 鎖に 19 個のポリ A シグナルがあることを POLYADQ というプログラムを用いて見つけた (Perepelitsa-Belancio and Deininger 2003)。AATAAA と ATTAAA に似た配列はそれよりも遙かに多く存在し、しかも antisense 鎖にはほとんど見つからなかった。ヒトの L1 をマウスの培養細胞 NIH3T3 で発現させ、Northern hybridization で確認すると、全長のバンドの他により短い転写産物のバンドが 4 つ観察された。これらの短い転写産物の長さは、L1 内部のポリ A シグナルで転写が終わっていると考えると妥当な長さであった。そこで、最も多い約 2kb の転写産物に対応したポリ A シグナルに変異を加えるとこの転写産物は観察されなくなり、代わりにより長い転写産物の量が多くなった。この結果はヒトやニワトリの培養細胞でもほとんど変わらなかった。EST からは組織によって使用されやすいポリ A シグナルが違うことが示唆された。更に 3'RACE で配列決定することによってポリ A シグナルが実際に使われていることが確認できた。

以上の結果から示されたことは、組織によって多少の違いはあるにせよ、L1 の内部のポリ A シグナルで転写が終結してしまう現象は一般的なものだということである。これは、たとえエピジェネティックな抑制を乗り越えて L1 の転写が始まったとしても、転写が不完全で転移まで至らない場合があることを示している。

Han らの解析では、ポリ A シグナルによる転写終結以外にも転写が途中で減衰する事態が頻繁に起こっていることが報告されている (Han et al. 2004)。Han らはまず、GFP の後ろに *lacZ* かヒトの L1 の ORF2 をつないだコンストラクトを作成し、ヒトの培養細胞である HeLa 細胞で発現させた。ORF2 をつないだコンストラクトでは、GFP タンパク質の量が *lacZ* の場合の 70 分の一まで減少し、RNA 量も減少していた。この現象はマウスの L1 でも、ヒトの L1 の ORF2 を antisense につないだときにも観察された。また細胞やプロモータの種類にも依存しなかった。ただし、sense 鎖の場合と antisense 鎖の場合にはその理由が全く異なることがわかった。antisense 鎖の場合、短い RNA のほとんどはポリ A を持っており、かつ、ポリ A の直前にポリ A シグナルが見つかった。つまり、antisense 鎖の場合にはポリ A シグナルで転写が終わっている。Perepelitsa-Belancio の論文

と矛盾するようだが、antisense でわずかに見つかったポリ A シグナルの一つらしい。一方で、sense 鎖の場合には、*lacZ* と比べて減っている全長の RNA の分の 15% 程度しか短い転写産物は確認できなかった。彼らは残り 85% 分を、ポリ A が付加されていない、不安定な転写終結産物によるものだと考え、続く実験を行っている。

まず、ORF2 タンパク質が翻訳されないように frameshift や nonsense mutation を導入しても全長 RNA の減少は観察されたので、ORF2 タンパク質によって RNA 合成が阻害されているためではないことが確認された。続いて、ORF2 の様々な位置を欠失させたコンストラクトでは、欠失の位置に関わらず RNA 量の減少が見られた。ここから、特定の配列が RNA 量の減少を引き起こしているわけではないとわかった。そこで、彼らは、L1 の ORF1 と ORF2 の sense 鎖に顕著に A が多いことに着目し、そのような傾向を示さない 5'UTR や antisense 鎖（当然 T が極端に多い）と比較した。ORF1 や 5'UTR は短いため、ORF2 の長さに合うようにタンデムにつないだコンストラクトを使用して RNA の長さの影響を取り除いている。ORF1 を 4 つつないで ORF2 と同じ長さにした場合には、RNA 量の減少が観察されたが、5'UTR の場合には見られなかった。また、ORF1 や 5'UTR の antisense 鎖でも RNA 量の減少は認められなかった。これらの結果は、A に富んだ ORF1 と ORF2 の sense 鎖の配列が RNA 量を減らしていることを示唆している。

さて、RNA 量の減少には、RNA の分解速度の上昇と、RNA の生産量の減少の 2 つの原因が考えられる。アクチノマイシン D で転写を止めて RNA の分解速度を測ったところ、L1 の全長の RNA の分解速度は *lacZ* の全長の RNA の分解速度の 2 倍以下であった。RNA 量の減少全体を説明するにはこれだけでは不十分である。そこで、nuclear run-on assay によって転写の進行状態を解析した。nuclear run-on assay とは、核を精製すると新たな転写開始は起こらなくなることを利用して、持続中の転写を *in vitro* で終了させた後、RNA を抽出し、プローブをハイブリダイゼーションさせることでそれぞれの位置の転写量を測定することができるという手法である。*lacZ* では ORF の 5'側でも 3'側でも転写量に違いは見られなかったが、L1 の ORF2 では、3'側に進むに従って転写量の減少が観察された。以上から、L1 の ORF2 では A に富んだ配列のため転写が効率的に進行せず、途中で止まる割合が多いことが RNA 量の減少につながっていることが明らかとなった。

L1 の ORF2 の A に富んだ配列が転写効率を下けているのならば、L1 の sense 鎖の A の割合を下げてやれば転写効率の改善、さらに転移効率の上昇が期待できる。そこで、Han らは、マウスの L1 のアミノ酸配列を変えないようにして、発現量の多い遺伝子で用いられているコドンに置き換えた L1 を作成した (Han

and Boeke 2004)。ここでは、オリゴヌクレオチドを設計し、それをつなぎ合わせ、PCR で増幅することで全長の L1 を作成している。ORF2 の 24% の塩基を変えることで、40% であった A の割合は 26% にまで減少している。すると、RNA もタンパク質も合成量が上昇した。更に転移実験をしたところ、ORF2 だけ変えた場合には、通常の L1 の 20 から 25 倍、ORF1 まで変更すると実に 200 倍以上の転移効率を示した。転移したものをクローニングし、実際に通常のレトロトランスポジションによって転移していることが確認できた。

以上の 3 本の論文の結果からは、L1 の sense 鎖では、L1 内部のポリ A シグナルによって転写が途中で終わってしまう現象に加えて、A の異常な多さから転写が不完全に終わってしまう現象によって全長の L1 の RNA の合成量は非常に少なくなっていることが明らかとなった。また、L1 自身の転移には全く無関係だが、antisense 鎖でも内部のポリ A シグナルによって転写が途中で停止してしまうことがわかった。ところで、L1 の転写は必ずしも L1 のプロモータから始まるわけではない。イントロンに L1 が挿入されている場合には、遺伝子の転写の過程で L1 が一緒に転写される。L1 が遺伝子の sense 鎖の向きに挿入されるか、antisense 鎖の向きに挿入されるかは偶然に左右されるので、L1 のどちらの鎖での転写終結も遺伝子の転写に影響を与えることになる。ヒトの遺伝子の 79% には少なくとも 1 つの L1 が挿入されている (Han et al. 2004) というからその影響は計り知れない。

Han らは発現量の最も多い 5% と最も少ない 5% の遺伝子を抽出し、その中に挿入されている L1 の量を調べた (Han et al. 2004)。発現量の多い遺伝子では挿入されている L1 の数が少なく、発現量の少ない遺伝子では L1 の数が多いという相関関係が認められた。イントロンの長さを補正しても明らかな傾向が見られた。この傾向は、sense、antisense 両方に共通している。ここからは、L1 の挿入されている数が多いと転写が途中で終わってしまう割合が高くなり、結局発現量が低くなってしまふという因果関係をうかがうことができる。あるいは発現量が多い遺伝子のイントロンに L1 が挿入されると有害性が高く、淘汰されてしまふのかもしれない。

Wheelan らは、このような転写への影響から、L1 の挿入による遺伝子の分断 (“gene-breaking”) がおこっているのではないかと考えた (Wheelan et al. 2006)。L1 の ORF2 の 3' 末端に近い位置の antisense 鎖には、比較的強いポリ A シグナルがあり、転写を終わらせている。また、antisense 鎖には、5'UTR 内にプロモータ活性が報告されている。ならば、イントロンに L1 が挿入されることで、遺伝子の前側と後ろ側が分断される可能性もある。

Wheelan らは L1 の antisense プロモータから転写されていると予測される遺伝子と、L1 のポリ A シグナルによって転写が終わっていると考えられる遺伝子を

ヒトの EST から抽出した。そして、ポリ A シグナルとプロモータとは L1 のほぼ両末端にあるため、その中から L1 が全長で挿入されている場合だけを選び出した。L1 の antisense プロモータから転写されていると予測される遺伝子は 15 個見つかったが、上流部分が L1 のポリ A シグナルで止まっていることを示す証拠は EST からは得られなかった。そこで、RT-PCR を行って、5'側の転写産物を調べたところ、少なくとも 3 遺伝子では 5'側の転写が L1 のポリ A シグナルで終わっていることが確認できた。従って、L1 による gene-breaking は確かに起こっているらしい。

エクソンへの L1 の転移が変異を引き起こすことは明白だが、これらの研究が示すように、イントロンへの挿入でも様々な変異を引き起こすことが明らかになってきた。Han らは L1 をヒトのトランスクリプトームの”fine-tuner”として捉える必要があるのではないかと指摘している (Han et al. 2004)。L1 はもはや”junk”ではない。

Perepelitsa-Belancio V, Deininger P.

RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity.

Nat Genet. 2003 Dec;35(4):363-366.

Han JS, Szak ST, Boeke JD.

Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes.

Nature. 2004 May 20;429(6989):268-274.

Han JS, Boeke JD.

A highly active synthetic mammalian retrotransposon.

Nature. 2004 May 20;429(6989):314-318.

Wheelan SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD.

Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution.

Genome Res. 2005 Aug;15(8):1073-1078.

2006/11/28

小島 健司 著

禁 無断複写転載