

リボソーム DNA の中の居心地は？ : R1 と R2

R1 と R2 はリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の中にだけ転移する non-LTR レトロトランスポゾンである。リボソーム RNA 遺伝子はコピー数が多く、塩基配列も非常に保存されているので、配列特異的なレトロトランスポゾンの多くが rDNA に挿入される。しかし、同時にリボソーム RNA 遺伝子は一般に協調進化 (concerted evolution) していると考えられており、配列は均一になるように淘汰圧がかかっている。配列の均一化は R1 や R2 にとって回避すべき問題である。なぜならば、全ての rDNA の単位から R1 や R2 が失われる場合はもちろん、逆に R1 や R2 が挿入されて固定されてしまうことも宿主を殺すことになってしまうからである。それでは、R1 や R2 はどのようにして rDNA 中で維持されているのだろうか？あるいは、逆に宿主はどのようにして R1 や R2 が固定されるのを防いでいるのだろうか？Perez-Gonzalez らはこの問題に 2 種のショウジョウバエ、*Drosophila melanogaster* と *D.simulans* を使ってアプローチしている。

R1 や R2 などの non-LTR レトロトランスポゾンは転移の際、3'側から自己を逆転写して挿入する。しかし全長の逆転写に失敗するケースが多く、ほとんどのコピーでは 5'側が欠失する。この欠失 (5' truncation) の位置は転移毎に異なる。もちろん不完全長のコピーは転移能を欠いている。結果として、不完全長のコピーは挿入された rDNA 単位と運命を共有することになる。この 5' truncation のコピー数は PCR、あるいは制限酵素処理後の Southern hybridization によって算定可能である。

D.simulans では rDNA が X 染色体上にしか存在しない。一方で *D.melanogaster* では X 染色体と Y 染色体の両方に rDNA が乗っている。実験の上で後者がより複雑になることは言うまでもない。そこで、Perez-Gonzalez らは最初に *D.simulans* で R1 と R2 のターンオーバーを解析することにした (Perez-Gonzalez and Eickbush 2001)。この解析では、まず、制限酵素で切断したゲノムをそのまま Southern hybridization して R1 や R2 の 5' truncation を見ようとしたが、全長の R1 や R2 のコピー数が他に比して多すぎるため上手く行かなかった。結局、上流の rDNA の配列に一方のプライマーを設計し、もう一方のプライマーは R1 や R2 の内部に設計し、これを使って PCR した R1 や R2 の 5'境界をポリアクリルアミドゲルで電気泳動することで、5' truncation の多型を検出することが可能となった。R1 や R2 内部のプライマーは複数作成し、これによって全ての 5' truncation 多型を検出出来ていると彼らは考えている。

R2 では 2 つの問題点によりこの先の解析は困難であることがわかった。まず、R2 では挿入の際に 5'側の rDNA の欠失が頻繁に見られる。この欠失の長さは数塩基から数十塩基に及ぶ。このため、rDNA の欠失した PCR 産物と R2 の 5'

truncation した PCR 産物とが同じ長さとなる可能性がある。また、コピー数が多いため、同じ位置やすぐ近くで独立に 5' truncation が起こっていることも考えられる。

一方、R1 はコピー数が少なく、それぞれの PCR 産物をはっきりと区別することが可能であった。1995 年にカリフォルニアで採集された *D.simulans* から作成された isofemale line (採集された 1 匹の雌個体の子孫の兄弟姉妹交配を続けることで得られる系統) を用いることで、野生集団中の多型を見ることができる。実際に全ての系統に共通する 5' truncation や一部の系統に共通する 5' truncation、そして 1 つの系統でしか見られない 5' truncation を見ることができた。全ての系統に共通する 5' truncation は 2 カ所しか見つからなかったのに対して、1 つの系統でしか見られない 5' truncation は全体で 19 カ所増幅できた。また、2 つの系統に共通するものが 6 カ所、3 つ以上の系統に共通するが全体では共通しないものは 8 カ所であった。この事実は、現存するコピーのほとんどは集団中に固定されていないコピー、すなわち最近転移したコピーであることを示している。同じ 5' truncation が複数存在することを示す結果は得られなかった。

isofemale line では、系統が確立される頃には、採集された雌とこの雌と最後に交尾した雄の染色体にあった 4 種類の多型の内 1 つだけが固定されている。しかし野生集団中で多型の生まれた時期 (ここでは R1 や R2 が転移した時期) については情報が得られない。その情報を得るためには、全ての多型が固定された、遺伝的に均一な集団から始める必要がある。幸い、*D.melanogaster* には、Harwich 変異蓄積系統 (Harwich mutation accumulation lines) と名付けられた、同じ系統から更に兄弟姉妹交配を繰り返すことで細分化した多数の系統が存在する。元となった系統では遺伝子型は 1 つに固定されているので、サブ系統間の比較により、細分化以後に起こった変異のみを見ることができる。Harwich 変異蓄積系統は最初の 41 世代の間兄弟姉妹交配を繰り返し、その後は系統内の 10 ペアを混ぜて任意交配させることで維持されている。

Perez-Gonzalez らはまず、プライマーに放射線同位体 ^{32}P でエンドラベルし、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することで 1 塩基の違いを検出できるように前述の手法を改良した (Perez-Gonzalez and Eickbush 2002)。この解像度の向上によって前述の R2 での問題は解決された。彼らが用いた Harwich 系統は作出後 353 世代を経ており、同じ系統内では 5' truncation の多型がほぼ固定されていることが確認出来た。電気泳動の各バンドの濃さが同じであることと、全コピー数の算定から、それぞれの 5' truncation が 1 コピーの挿入を示していることが予測された。

系統間では、多くの 5' truncation が共通しており、これは元の系統に存在していた挿入である。一方、系統毎に異なった 5' truncation も確認された。この内、

多くの系統に共通し一部の系統で見られないものは、元の系統の挿入が一部の系統で排除されたことを示している。一方、1つの系統にのみ見られる5' truncationはその系統での新しい転移を示唆している。また、R2でも、そしてR1でも、5'境界付近の多型によって全長あるいは全長に近い挿入を検出することが可能であった。

まとめると、

	Ancestral insertions			Substrain-specific insertion	Substrain-specific elimination
	Single-copy		Multi-copy		
	Full-length	5' truncated	Full-length		
R1	3	19	~52	184	39
R2	12	22	~15	16	55

となった。R1とR2でそれぞれのコピー数、転移、排除回数にかなりの違いが見られる。失われやすいコピーと失われにくいコピーがあることも示された。これはrDNAの繰り返し中の位置によって組み換え頻度が違うことによるのかもしれない。

更に、Perez-Gonzalezらはそれぞれの5' truncationをX染色体上のものとY染色体上のものに分類した(Perez-Gonzalez et al. 2003)。遺伝型が固定された系統では、雌は全く同一のX染色体を2つ持ち、雄はXとYを一つずつ持っている。従って、雄で見られて雌で見られない5' truncationはY染色体上のrDNAに挿入されたレトロトランスポゾンのものである。X染色体とY染色体で共通する5' truncationが認められなかったことは、両染色体間でのrDNAの組み換えが起こっていないことを示している。ITS(internal transcribed spacer)の配列から予測されているXY染色体間での組み換え頻度は 10^{-4} のオーダーであり、これと矛盾しない。

Y染色体上の新しいR1の5' truncationはX染色体上の約3倍あることがわかった。雌はXX、雄はXYを持つので、これは雄でのみR1の転移が起こっていることを示している。一方、R2ではX染色体もY染色体もほぼ同じ頻度であり、雌雄両方で転移が起こっているらしい。逆に排除率を調べると、Y染色体での排除率がX染色体に比べて高い。

面白いことに、5' truncationには同時に失われやすい組み合わせがあることがわかった。この組み合わせは、一度に複数のR1/R2の挿入したrDNA単位が失われると考えるとすんなりと理解できる。この場合、rDNAは姉妹染色体間や相同染色体間での組み換えではなく、同じ染色体内での組み換えによりrDNAがextrachromosomal circleとして切り出されると考える。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*では、rDNAは複数の単位をまとめてextra rDNA circleとして切り出されてプラスミド化することがわかっている。複数のrDNA単位が同時に切り出

されるとすると、近くにある R1/R2 の挿入は同時に失われやすい。一方で、もう一つの rDNA 均一化の機構として提案されている gene conversion では同時に複数の R1/R2 の挿入が失われる可能性は低い。また、*D.simulans* では系統毎に rDNA のコピー数が大きく異なることがわかっている (Perez-Gonzalez and Eickbush 2001)。100 コピーから 325 コピーまで 3 倍以上の開きがあり、R1 や R2 の挿入の割合も 2 倍近く違っている。これは rDNA のコピー数の増減を伴う大規模な組み換えが起こっていることを示唆している。rDNA のコピー数の増加と減少とが異なる機構によることを示す結果が出芽酵母からは得られており、R1 や R2 の排除だけが起こり、増幅が起こらないのはこのような理由によるのかもしれない。

Harwich 系統では、その性質を利用して様々な転移因子の転移・排除率が計算されている。R1 では、転移率は 12.5×10^{-4} /コピー/世代で、排除率は 2.6×10^{-4} /コピー/世代、R2 では、転移率は 0.7×10^{-4} /コピー/世代で、排除率は 2.3×10^{-4} /コピー/世代であった (Perez-Gonzalez and Eickbush 2002)。転移率は他の non-LTR レトロトランスポゾン (*I, Doc*) や LTR レトロトランスポゾン (*roo, copia, 17.6*) の $0.4-13 \times 10^{-4}$ /コピー/世代の枠内に収まっている。一方で他のレトロトランスポゾンでは排除率は 9.0×10^{-6} /コピー/世代以下であることが示されており、それと比べると R1 や R2 では非常に高い頻度で失われているのがわかる。これは、他のレトロトランスポゾンでは、偶発的な組み換えによってしか失われないのに対して、R1 や R2 では rDNA 内の組み換えで失われやすいためであろう。

排除率が高いということは、R1 や R2 は偶然絶滅する可能性が高いということである。この点では rDNA への標的特異性は不利である。しかし R1 や R2 が今日まで生き延びてきたのだから、それを補う利点があるはずである。まず考えられるのは非常に高い rRNA の転写活性を利用して転移率を上げている可能性だが、実際には、転移率は他のレトロトランスポゾンとほとんど変わらない。あるいは、全長の、すなわち転移能を持ったコピーの転移頻度が他よりも高いのかもしれない。実際、R1 や R2 の全長のコピーの割合は L1 に比べてはるかに大きい。しかし、これも転移不能なコピーが速やかに排除されることの結果に過ぎないのかも知れない。rDNA への配列特異性がなぜ複数回進化してきたのか？大きな謎である。

Perez-Gonzalez CE, Eickbush TH.

Dynamics of R1 and R2 elements in the rDNA locus of *Drosophila simulans*.

Genetics. 2001 Aug;158(4):1557-1567.

Perez-Gonzalez CE, Eickbush TH.

Rates of R1 and R2 retrotransposition and elimination from the rDNA locus of *Drosophila melanogaster*.

Genetics. 2002 Oct;162(2):799-811.

Perez-Gonzalez CE, Burke WD, Eickbush TH.

R1 and R2 retrotransposition and deletion in the rDNA loci on the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*.

Genetics. 2003 Oct;165(2):675-685.

2006/10/17

小島 健司 著
禁 無断複写転載