

## rRNA との共転写の役割 : R1 と R2

RT を除く他のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 特異的 non-LTR レトロトランスポゾン (retrotransposon) はリボソーム RNA (rRNA) と同じ方向に挿入されている。ここからは、rRNA と一緒に non-LTR レトロトランスポゾンも転写されていることが想定される。rRNA は細胞中の全 RNA の 5 割以上を占めるほど多く、例えばその一部に non-LTR レトロトランスポゾンが挿入されていたとしても膨大な量の転写産物が合成される計算になる。ところが、実際にはそのようなことは起こらない。レトロトランスポゾンが転移量を調節しているためなのか、正常な rRNA の割合を高めるために生物が制御しているのかは定かではないが、R1 や R2 に挿入された rDNA 単位の転写量は著しく減少することが報告されている。

Long らの解析によると、キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 胚中の R1 の RNA の数は rRNA の千分の一以下である (Long and Dawid 1979)。Long らの解析した系統では X 染色体の rDNA のコピーの約半分に R1 が挿入されているので、これは非常に少ない数である。サンドウィッチハイブリダイゼーション (プローブとなる DNA をメンブレンに固着させた後、サンプル RNA とハイブリダイズさせ、更に標識した別のプローブ DNA とハイブリダイズさせる手法。これにより同じ RNA に 2 種類の DNA プローブの相補配列が両方とも乗っていることが示される。) の結果から、R1 が rRNA と同じ RNA として転写されていることが示された。しかし、全長の R1 と全長の rRNA を含んだ RNA の存在は確認できなかった。ただし、0.5~1.0kb 程度の短い R1 の挿入の場合では、R1 を含んだ rRNA 前駆体が合成されているらしい。これは、全長の rRNA 前駆体よりも少し長い RNA で R1 の配列を含んだものが観察されることと、R1 の 3' 末端付近の配列と rRNA の挿入位置前後の配列を含んだ RNA が確認されることに基づいている。短い R1 の挿入では rRNA と同じ RNA として細胞質に出ていっているが、その長さは通常の rRNA よりも短く、正常でないプロセッシングが起こっているらしい。

Jamrich らは電子顕微鏡観察により、5kb 以上の挿入がある rDNA コピーの転写は全体の 1% 程度に過ぎず、転写が起こっている rDNA の大半は 5kb 未満の挿入しかないことを示している (Jamrich and Miller 1984)。ここで使用された *bobbed* 系統は、雌の rDNA の約半分に 5kb の R1 が存在し、発生異常を来す系統なので、挿入のある rDNA コピーはたとえ rRNA が不足していても転写されないことが分かる。また、13kb の転写産物が見られることから、R1 全長が挿入されている場合には、全長の rRNA 前駆体 (8kb) と一緒に転写されることも示唆された。

Eickbush らはキイロシヨウジョウバエ *D. melanogaster* の rDNA 中に実験的に導入したカイコ *Bombyx mori* の R2 (R2Bm) と元々挿入されていた R2Dm の転写

レベルの解析から、挿入のない rDNA のコピー数が R2 の転写量に影響を及ぼすことを示した (Eickbush and Eickbush 2003)。X 染色体でも Y 染色体でもそれぞれの R2Bm コピーの転写量の間には、数十倍の開きがあり、転写量は挿入された R2Bm の長さとは関係がなかった。♀ (XX) で R2Dm の転写量を調べたところ、転写の 50% 以上は 1 コピーの非常に短い R2Dm の挿入から起きていることがわかり、その量は挿入のない rDNA のコピー数と反比例していた。転写量と挿入のない rDNA コピー数の関係は、R2Dm の別のコピーでも、R1Dm でも同じであった。R2Bm の転写もこれと同様の傾向は見られるが顕著ではない。これらの事実は、細胞中で挿入のない rDNA のコピー数が少ないと R1 や R2 が挿入された rDNA 単位の転写が増加することを示唆している。これは、Jamrich らの結果と相容れないようだが、おそらくこの場合でも R1 や R2 の挿入された rDNA 単位の転写は挿入の無い rDNA 単位に比べて非常に少ないのだろう。rDNA の転写量は転写される単位の数によって制御されており、rDNA のコピー数が少なくなると転写不活性の rDNA 単位の数が減少することが知られている。機能のある rRNA の量を維持するために挿入のある rDNA 単位の転写を選択的に抑制する機構があるのかも知れない。あるいは通常の反復配列をサイレンシングする機構が rDNA 領域でも働いているのかも知れない。

挿入のある rDNA 単位の転写抑制機構は明らかではないが、上述の研究は、たとえば、通常の rRNA の転写量の千分の一にせよ、R1 や R2 が rRNA と同じ RNA として転写されていることを示している。残念ながら、この rRNA/R1/R2 を含んだ RNA がどのようにして輸送され、翻訳され、再びタンパク質と共に核内へ輸送されるのかについての研究は実を結んでいない。しかし、最後の過程である転移の際に、この RNA の rRNA 部分が役に立っているようなのである。R2 では 5' 側の挿入に、この rRNA/R2 から逆転写された cDNA と標的の rDNA との間の相同組み換えが正しい位置での挿入に役立っていることが示されている。この詳細は、「non-LTR レトロトランスポゾンの 5' 挿入機構」を見ていただきたい。ここでは、R1 において 3' 側の正確な位置での挿入に rRNA/R1 から逆転写された cDNA と標的の rDNA との間の相同組み換えが働いていることを示した論文を紹介する。

Anzai らは、カイコの R1 である R1Bm をヨトウガの培養細胞 Sf9 で転移させる系を確立した (Anzai et al. 2005)。ヨトウガに感染するバキュロウイルス AcNPV は大量に転写翻訳されるタンパク質 polyhedrin をコードしている。この polyhedrin 遺伝子はウイルスの増殖に必須ではないため、この遺伝子を別の遺伝子に置き換えることで目的のタンパク質を大量に得ることができる。これが一般に用いられているバキュロウイルスタンパク質発現系であるが、Anzai らはこれを応用して、Sf9 の内部で R1Bm の RNA とタンパク質を大量に発現させ、転

移させることに成功した。この系では、下流の rDNA に設計したプライマーと R1Bm 内部のプライマーとで PCR することで転移を検出する。R1Bm の転移は電気泳動によって確認できたが、複数の長さの異なるバンドが混ざったスミアになっていた。実際、配列を決定すると、R1Bm の途中で途切れた転移産物や、逆に R1Bm の後ろにつなげられていたベクターの配列を含んで転移したものが観察された。しかし、ほとんどの転移では、rDNA 側は自然界の R1Bm の下流の境界と完全に同じであった。すなわち、逆転写の開始に際して、正しい R1Bm の境界ではなく、その上流や下流の位置から逆転写を開始してしまっているのだと考えられた。興味深いことに、R1Bm の途中で途切れた転移産物のいくつかでは、境界の TG の 2 塩基が R1Bm のものとも rDNA のものとも解釈できた。逆転写酵素の活性残基に変異を加えると転移産物は全く観察されなくなるので、これらの転移産物は組み換えによるものではないことが確かめられた。

それでは、境界に TG の 2 塩基が共有されるのはどのような理由なのだろうか？一つの可能性として、RNA の UG と標的 DNA の CA とがハイブリダイズして逆転写の開始を助けていることが考えられる。自然界では R1Bm の下流の rRNA と標的の rDNA とがハイブリダイズしていることになる。そこで、R1Bm の下流に rDNA の配列を 14 塩基と 50 塩基つなげたものを転移させたところ、今度は、電気泳動で 1 本のバンドだけが観察された。配列を決定すると、全ての転移産物で R1Bm の 3' 末端と rDNA とが正しく結合されていた。これは正しく R1Bm が 3' 末端から転移させるためには、その下流に rRNA の配列が続いている必要があることを示している。

R2 の上流の rRNA の必要性は、相同性を利用した組み換えの為であると考えられる。一方、R1 の下流の rRNA の必要性は、相同性を利用した標的 DNA/RNA 構造の安定化による逆転写の効率的な開始の為であろう。R1 でも R2 でもプロモーターの存在は確認されていない。このように R1 も R2 も長い進化の過程で、rDNA 内では不必要なものをそぎ落とし、おそらく新たに必要となったものを獲得してきたのだろう。このような挿入位置に対する最適化は配列特異性のもたらす一つの利益であるのかもしれない。

Long EO, Dawid IB.

Expression of ribosomal DNA insertions in *Drosophila melanogaster*.

Cell. 1979 Dec;18(4):1185-96.

Jamrich M, Miller OL Jr.

The rare transcripts of interrupted rRNA genes in *Drosophila melanogaster* are processed or degraded during synthesis.

EMBO J. 1984 Jul;3(7):1541-5.

Eickbush DG, Eickbush TH.

Transcription of endogenous and exogenous R2 elements in the rRNA gene locus of *Drosophila melanogaster*.

Mol Cell Biol. 2003 Jun;23(11):3825-3836.

Anzai T, Osanai M, Hamada M, Fujiwara H.

Functional roles of 3'-terminal structures of template RNA during in vivo retrotransposition of non-LTR retrotransposon, R1Bm.

Nucleic Acids Res. 2005 Apr 6;33(6):1993-2002.

2006/11/22

小島 健司 著  
禁 無断複写転載