

TANT 法でたんとトランスポゾンの挿入配列を決める

レトロトランスポゾンの挿入位置は一般に target site duplication (TSD) と呼ばれる、両側に出来た縦列反復配列によって知ることができる。しかし、TSD は失われる場合や変異が入る場合もあり、その場合には挿入前の配列を知ることができない。そこで、Ichiyanagi らは TANT (target analysis of nested transposons) 法と命名した手法を開発した (Ichiyanagi et al. 2007)。TANT 法では、既知のトランスポゾンの配列の中に挿入されたレトロトランスポゾンだけを選んでその挿入位置を調べる。トランスポゾンは配列が分かっている反復配列なので、元の配列を知ることが可能である。この手法の最大の特徴は、挿入位置が削られるような転移を検出することが可能であることである。これによって定量的に重複 (TSD) と欠失 (TST, target site truncation) の割合を調べることが可能となった。

Ichiyanagi らはまず、ヒトの L1 で TANT 法により L1 の挿入位置を解析した。挿入の様々な性質はこれまでの報告と一致した。続いて、ゼブラフィッシュの 3 種類の non-LTR レトロトランスポゾン、CR1-1_DR、CR1-2_DR、CR1-3_DR についても TANT 法で挿入配列を解析した。これらのレトロトランスポゾン

(CR1_DRs) の挿入の多くは、1-14 bp の TSD を両側に持っていた。一方で、平滑に挿入されている場合や、逆に配列が失われている場合 (TST) もかなりの頻度で観察された。TST の長さは、1-549 bp と長さにかかなりの違いが見られ、短いものと長いものとは出来る機構が異なっていることが想定された。挿入位置に配列の嗜好性は見られなかったが、70% 程度の挿入では、レトロトランスポゾンの 3' 末端の反復配列と挿入位置の配列の間に短い配列の一致 (microhomology, MH) が認められた。その長さはランダムを仮定した場合よりも有意に長かった。これは、レトロトランスポゾンの RNA と標的 DNA とがアニールして逆転写を助ける機構の存在を示唆している。

また、レトロトランスポゾンの 3' 末端と標的配列との間に余分な塩基が挿入されている例が 14-24% 見られた。興味深いことに、5' 側にも余分な塩基が挿入されている例が、とりわけ 5' truncation のある CR1_DRs で多数 (49-62%) 観察された。L1 では 5' 側の塩基の挿入は 9% 程度しか観察されない。これらの配列と相同な配列はゲノム中に見あたらないので、余分な塩基の挿入は、鋳型無しに塩基が付加されたか、あるいは、鋳型を取り替えながら短い配列を複数つないだかのどちらかによって合成されたと考えられる。また、5' 側にも MH が観察できる例も多かった。

TST の起こっている挿入では、余分な塩基の挿入が見られる割合が顕著に高くなっており、この両者の間に関係があることが示唆された。ただし、CR1-2_DR

の 5'側では有意な差異は見られなかった。これは CR1-2_DR が ORF1 を持たないことと関係があるのかも知れない。

最後に、Ichiyanagi らは、ゼブラフィッシュの CR1_DRs とヒトの L1 との 5'側の挿入の特徴の違いが何に起因するのかを調べるため、CR1-2_DR をヒトの培養細胞で転移させる実験を行った。CR1-2_DR はゼブラフィッシュでの場合と異なり、5'側の挿入において余分な塩基の挿入が観察されず、代わりに MH が多く見られた。このような性質は L1 に近く、5'側の挿入の性質の違いが宿主に依存している可能性を示唆している。

Ichiyanagi らは同様の手法によってゼブラフィッシュの L1 の仲間（おそらく Tx の仲間と Swimmer の仲間）の挿入の特徴も解析している (Ichiyanagi and Okada 2006)。結果は、上述のものとはほとんど変わらず、ゼブラフィッシュでは、5'側の塩基の挿入がヒトの L1 の 3 倍多く観察された。また、他の MH などの特徴はヒトの L1 と共通していた。

ゼブラフィッシュでの塩基挿入の機構については想像の域を出ないが、Ichiyanagi らは 3'側の塩基挿入は逆転写酵素が、5'側の挿入は宿主の DNA ポリメラーゼが担っていると考えている。そう考えるとヒトの培養細胞では CR1-2_DR で 5'側に余分な塩基の挿入が観察されない理由が理解できる。

「non-LTR レトロトランスポゾンの 5'挿入機構」でも記した通り、5'側の挿入機構では、それぞれの実験やゲノム情報の解釈は難しく、同じ内容でも異なるモデルが提案されている状態である。レトロトランスポゾンの種類によって挿入機構が異なる可能性もある。加えて今回の解析では、宿主毎に異なる機構が用いられている可能性が示された。今後は宿主とレトロトランスポゾン双方の多様性を考慮して結果を解釈する必要があるだろう。

Ichiyanagi K, Nakajima R, Kajikawa M, Okada N.

Novel retrotransposon analysis reveals multiple mobility pathways dictated by hosts.

Genome Res. 2007 Jan;17(1):33-41.

Ichiyanagi K, Okada N.

Genomic alterations upon integration of zebrafish L1 elements revealed by the TANT method.

Gene. 2006 Nov 15;383:108-16.

2007/01/16

小島 健司 著

禁 無断複写転載