

L1 Gives You Wings : Alu と processed pseudogene

ヒトゲノムの40%程度は反復配列が占めている。配列の総長ではL1が、コピー数ではAluが最も多い。L1 (LINE-1) はその名の通り、(LINE, long interspersed nuclear element, 別名 non-LTR レトロトランスポゾン) に属し、Alu は SINE (short interspersed nuclear element) の一員である。他にも LINE や SINE の仲間、endogenous retrovirus、そして processed pseudogene などが繰り返し配列としてヒトゲノム中には散在している。ヒトのゲノムサイズの肥大化、冗長化は主にこれらの反復配列のせいだと言えるが、とりわけL1は肥大化に大きく貢献している。なぜなら、L1は自身のみならず、Alu や processed pseudogene をも転移させているからである。この可能性は以前から指摘されていたが、Heidmannらのグループによってこれが実験的に証明された (Esnault et al. 2000; Dewannieux et al. 2003)。実験は、L1の *in vivo* の転移系を改変して行われた。

転移を確認するために、ネオマイシン (neomycin) 耐性遺伝子 (*neo*) に逆向きのイントロンを挿入し、これを antisense 鎖だけが合成されるようにプロモーターとポリ A シグナルを配置した (Esnault et al. 2000)。neo はそのままでは転写されず、antisense 鎖がスプライシングされ、ゲノム中に挿入された場合にだけネオマイシン耐性になる仕組みである。フレオマイシン (phleomycin) 耐性遺伝子を入れたベクターにこれを組み込んだ。また、ヒトのL1を別のハイグロマイシン (hygromycin) 耐性ベクターに組み込んだ。同様に MoMLV をハイグロマイシン耐性ベクターに組み込んだコンストラクトも作成した。抗生物質が多く出てきてややこしいが、ベクターを一緒にトランスフェクションし、フレオマイシンとハイグロマイシンで選択すると両方のプラスミドを同時に持つ細胞だけが選択される。さらに G418 (ネオマイシンの仲間) で選択すると、neo が転移した細胞だけを選択できるはずである。

G418 耐性細胞は、L1 ベクターを共トランスフェクションした場合には、neo ベクター単独の場合の10倍以上の数が観察された。PCR と Southern hybridization、そして配列決定によって共トランスフェクションの場合には全ての例でイントロンが除かれていることが確認できた。逆に単独の場合には全くイントロンが除かれていなかった。つまりL1のタンパク質が供給されないと転移は起こらず、ベクターがゲノムに組み込まれているだけということを示すことができた。共トランスフェクションによる転移では、TSD (target site duplication) が確認でき、通常のL1の転移と同様の機構で転移していることが示された。また、L1のORF1、ORF2をそれぞれ欠失させた場合にはどちらも転移が確認されなかったことから、両タンパク質が processed pseudogene の生成に必須であることがわかった。このような *trans* に作用した転移では、RNA の配列そのものは重要ではないこと

も、ポリ A シグナルを変更したり、*neo* の前に L1 の配列を付加したりした実験から明らかとなった。最後に MoMLV を共トランスフェクションした場合には processed pseudogene の生成は起こらなかった。主に processed pseudogene の転移を引き起こしているのは L1 であることがはっきりと証明されている。

同様に Alu を転移させる実験系が構築された (Dewannieux et al. 2003) 。Alu は 7SL RNA 由来の SINE で、RNA polymerase III によって転写される。従って、Dewannieux らは *neo* に逆向きに挿入するイントロンを自己スプライシングイントロンに変更して、スプライソソームの関与無しでイントロンが除去されるように改変した。*neo* は Alu の途中で逆向きに挿入された。

Alu の転移効率は非常に高く、 6×10^{-4} 程度であった。これは 7SL エンハンサーと Alu プロモーターの組み合わせよりも強い転写活性を示す CMV プロモーターで転写させた β グロビン遺伝子の転移効率の 300-500 倍の効率であった。つまり、この転移効率は転写量の多さによるものではない。転移した Alu はゲノム中の Alu の性質を反映していた。Alu は Pol III による転写開始点からポリ A まで挿入されており、後ろに続く Pol III 転写産物は含んでいなかった。Alu のポリ A は付加されたものではなく、DNA 上にコードされたものだが、転移産物ではポリ A の長さが長くなっているものも確認された。これは逆転写の際のポリ A でのスリップを示唆している。また、TSD も観察され、TTAAAA に似た配列に挿入されていた。染色体上の位置の嗜好性は認められなかった。

Alu のポリ A を欠失させると転移はほとんど見られなくなったことから、ポリ A が L1 のタンパク質に認識されていることが確認された。また、Alu のかなりの長さを欠失させると転移効率は数十分の一にまで減少した。逆に L1 の ORF2 を欠失させた場合にも転移効率は 100 分の 1 以下にまで減少した。しかし、予想に反して、ORF1 を欠失させた場合には、転移効率の改善が見られた。Alu の保存された RNA 二次構造が SRP9/14 タンパク質 (7SL RNA と結合するタンパク質) と結合することで Alu を安定化させ、ORF1 タンパク質を不要にしている可能性を Dewannieux らは提示している。ORF1 が本当に不必要であるならば、ORF2 だけしかコードしていない L1 も Alu の転移に貢献していることになる。もっとも転写翻訳されるならばの話だが。

以上のように、L1 は processed pseudogene や Alu を転移させているわけだが、これには L1 の特殊な性質によるところが大きい。他の non-LTR レトロトランスポゾン自身は自身の RNA の配列のかなりの長さを認識して逆転写するのに対して、L1 は末端のポリ A しか認識しない。従って、他の non-LTR レトロトランスポゾンならば転移させないような mRNA や SINE を転移させてしまう。実際ヒトでは線虫や酵母、ショウジョウバエに比べて processed pseudogene の数が遙かに多い。マウスやヒトの L1 に見られるような弱い自己認識がどの程度幅広い生物の

L1 に共通する性質なのか、また、それが生物の進化にどのように寄与してきたのかは大変興味深い話題である。

Esnault C, Maestre J, Heidmann T.

Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes.

Nat Genet. 2000 Apr;24(4):363-367.

Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T.

LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences.

Nat Genet. 2003 Sep;35(1):41-48.

2006/12/07

小島 健司 著

禁 無断複写転載