

投げ縄と鋏は使しよう : GIR1 と Ty1

スプライソソーム (spliceosome) やグループ II 自己スプライシングイントロンのスプライシングでは、最初のステップでイントロン 5'末端の 5'-リン酸基が 3'末端から数十塩基上流の A の 2'-OH と結合し、2', 5'リン酸ジエステル結合を形成する。この時イントロンは「σ」字に似た構造となり、この構造は lariat (投げ縄) 構造と呼ばれている。これに対して、グループ I 自己スプライシングイントロンは、投げ縄構造を取らず、5'-リン酸基は遊離グアニンヌクレオチドと結合する。このようにスプライシングでは投げ縄構造を取る必然性はない。しかし、この投げ縄構造も鋏と同様に使いようでいろいろな機能を持たせることができることが 2 種類の利己的遺伝因子の研究から明らかになった。

変形菌類ゴマシオカタホコリ *Didymium iridis* の rDNA 中に見つかったグループ I イントロンは 2 つのグループ I イントロン様のリボザイム構造を持ち、一つ (GIR2) は、通常ของกลุ่ม I イントロンとしてスプライシングを触媒する。もう一方 (GIR1) は、切断だけを触媒する。このイントロンはホーミングエンドヌクレアーゼもコードしており、5'側から、GIR1、ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子、GIR2 という構造を取っている。GIR2 は GIR1 から GIR2 までの直鎖 RNA を切り出す。続いて、GIR1 は自身の内部で RNA を切断し、GIR1 の上流部分の RNA と GIR1 の 3'側から GIR2 までの RNA を生成する。

Nielsen らはこの切断の位置が GIR1 の 5'末端 12 塩基の有無によって異なるように見えることを発見した (Nielsen et al. 2005)。5'末端を 3 塩基だけ欠いた GIR1 は IPS1 と呼ばれる位置で DNA を切断するが、5'末端を 12 塩基欠いた GIR1 は IPS1 の下流 2 塩基の位置 IPS2 で DNA を切断することが primer extension 実験で示された。実はこの違いは立体障害によるもので、IPS1 の C230 と IPS2 の U232 とがリン酸基を共有しているためであった。これは、アルカリフォスファターゼ (AP) とポリヌクレオチドキナーゼ (PNK) 処理後の泳動度の違いから明らかにされた。

枝分かれを持った RNA は多種の RNase に耐性である。実際、mung bean nuclease (一本鎖特異的 endonuclease) で処理した際に断片が残ったのは、5'末端を 12 塩基欠いた GIR1 からできる C230 と U232 が共有結合した RNA だけで、5'末端を 3 塩基だけ欠いた GIR1 からの RNA は完全に分解された。更に、snake venom phosphodiesterase (exonuclease) で処理すると 4 塩基の投げ縄構造を持った RNA が残り、これを更に mung bean nuclease で処理すると exonuclease で切断できない 2 塩基の断片が残った。exonuclease は 3',5'-phosphodiester bond を切断するので、切断できない 2 塩基は 2',5'-phosphodiester bond で結合していることがわか

る。更に、Nielsen らは C230 から C233 までを順次デオキシヌクレオチドに置換して 2'-H とした RNA での切断活性を解析した。U232 を dU232 にした場合にのみ切断が観察されず、他では切断が見られたことから、U232 の 2'-OH と C230 の 3'-PO₄ が反応して 2',5'-phosphodiester bond ができることがわかった。

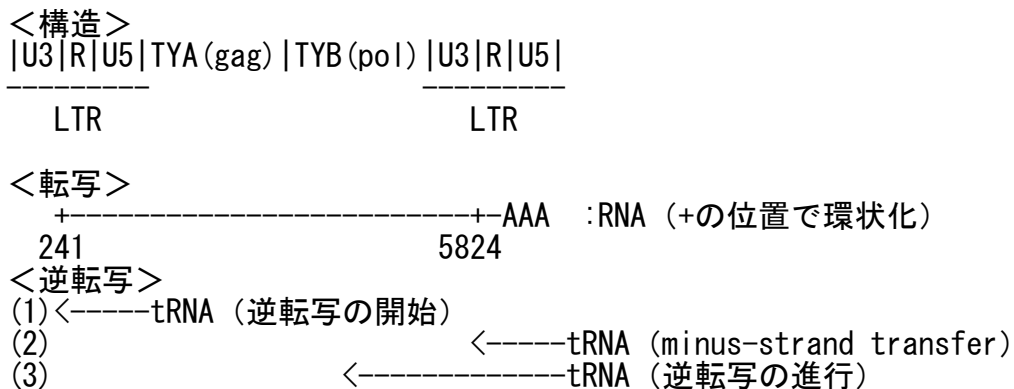
GIR1 は通常のグループ I イントロンとは異なり、5' スプライシング部位を含む P1 ヘリックスを欠いている。すなわち、GIR1 はグループ I イントロンの 3' スプライシング反応の亜型として、スプライシングの第 2 ステップ（第 1 ステップはグアニンヌクレオチドの 3'-OH と上流エクソンの 3'-OH とのエステル転移反応 transesterification、言い換えればグアニンヌクレオチドの 3'-OH とイントロンの 5'-PO₄ との結合反応）の反応である、上流のエクソンの 3'-OH と下流のエクソンの 5'-PO₄ との結合を触媒する代わりに、U232 の 2'-OH が C230 の 5'-PO₄ との結合による RNA の環状化を触媒する。これにより環状部が非常に短い投げ縄 RNA が合成され、おそらくこの環状部は 5'-cap に類似した機能を果たすのだろう。

Ty1 は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で解析が進んでいる、Ty1/copia グループの代表的な LTR レトロトランスポゾンである。酵母ではレトロトランスポゾンの転移に必要な宿主側の因子が網羅的な変異体での解析から明らかになってきている。DBR1 の変異体では Ty1 の cDNA 合成量が大きく減少し、転移量も減少する。DBR1 にコードされるタンパク質 Dbr1p はスプライシング後にできるイントロンの投げ縄構造を切断する 2'-5' phosphodiesterase である。DBR1 の変異体では、投げ縄イントロンが蓄積するが mRNA 合成そのものは問題なく起こることが分かっている。

Cheng らは Ty1 の 5' 末端の構造に 2',5'-phosphodiester bond が関わっているのではないかと仮説を立て、Ty1 の RNA の 5' 末端をクローニングし、野生型の酵母では、Ty1 の RNA は細胞質ではほとんどが 5'-cap されており、virion-like particle (VLP) では 5'-cap のあるものとないものがあることを示した (Cheng and Menees 2004)。一方、DBR1 の変異体では 5' 末端をうまくクローニングすることができなかった。そこで、DBR1 の変異体から抽出した Ty1 の VLP の RNA を Dbr1p で処理した後、クローニングを行うと問題なくクローニングができた。

逆転写酵素は 2',5'-phosphodiester bond を乗り越えて逆転写できることが知られている。そこで、プライマーを 5' 末端向きと 3' 末端向きに作成し、RT-PCR を行ったところ、241 番目の塩基が 5824 番目の塩基と結合していることが示された。LTR レトロトランスポゾンでは、5' 末端と 3' 末端に全く同一の配列を持った LTR (long terminal repeat) があり、LTR は 5' 側から、U3、R、U5 に分けられる (下図参照)。Ty1 の 5824 番目の塩基は、3' 側の LTR の U3 の 3' 末端に相

当する。241番目の塩基は5'側のLTRのRの5'末端に相当する。Ty1の転写では、5'LTRのRから転写が始まり、3'側のRで終了するため、Ty1のRNAは、5'末端が3'側のU3の3'末端の塩基と結合して投げ縄構造を取り、その3'側には、R領域のRNAがつながっていることになる。Chengらは、続いてイントロンRNAの投げ縄構造を確認するのに用いられるribonuclease protection assayを行い、確かにTy1のRNAが投げ縄構造を取っていることを確認した。



ノーザンハイブリダイゼーションの結果では、VLP内のRNAは投げ縄構造を取っているが、細胞内のRNAは直鎖状であることが示された。結果を解釈すると、Ty1のRNAは転写後まず、5'-capがつけられ、直鎖状のRNAとなる。その後、未知の機構によって投げ縄構造を取り、Dbr1pによって2',5'-phosphodiester bondが切断されると、5'-capの無い直鎖状のRNAになるのだろう。投げ縄構造はおそらく逆転写の効率を上昇させる。LTRレトロトランスポゾンやレトロウイルスでは、tRNAをプライマーにして、5'側のLTRのU5とRをまず逆転写する(上図)。このcDNAが3'側のLTRの相同配列に移動(minus-strand transfer)し、残りの領域が逆転写される。5'側のLTRから3'側のLTRへの移動はRとU3の境界で起こるので、5'側のLTRのRの5'末端と3'側のLTRのU3の3'末端が2',5'-phosphodiester bondで結合していれば非常に効率が良いことは明瞭である。

ところで、何故DBR1の変異体ではTy1のcDNA量が減少するのだろうか？逆転写酵素は枝分かれを持った鋳型を逆転写する能力はあるが、その効率はかなり低い。よって、minus-strand transferの後、Dbr1pによって枝分かれが切断されないと、cDNAの合成量は減少してしまう。また、枝分かれを持った鋳型の逆転写ではエラー頻度が高いことも報告されている。結果、DBR1の変異体ではわずかに転移したTy1のU3とRの境界には変異が蓄積することになる。

残念ながらTy1の場合にはどの配列が投げ縄構造の形成に寄与しているのかは今後の解析に任せるしかない。しかし、Ty1とは系統的に遠く離れたTy3も

DBR1 の変異体では転移効率が落ちることを考慮すると、幅広い LTR レトロトランスポゾンやレトロウイルスで投げ縄構造が作られていることは想像に難くない。投げ縄構造は新規のリボザイムが担っているのかも知れないし、あるいは宿主因子が担っているのかも知れない。

Nielsen H, Westhof E, Johansen S.

An mRNA is capped by a 2', 5' lariat catalyzed by a group I-like ribozyme.
Science. 2005 Sep 2;309(5740):1584-1587.

Cheng Z, Menees TM.

RNA branching and debranching in the yeast retrovirus-like element Ty1.
Science. 2004 Jan 9;303(5655):240-243.

2006/10/11

小島 健司 著
禁 無断複写転載