

Alu RNA のプロセッシング : *scAlu*

霊長類ゲノムに大量に蓄積されている *Alu* は 7SL RNA 由来の SINE であり、齧歯類の B1 と同じ起源を持つ。*Alu* は left *Alu* monomer と right *Alu* monomer が融合した二量体の SINE である（「ある (*Alu*) SINE の来歴」参照）。7SL RNA と *Alu* の配列を比較すると、中央部が *Alu* では失われている事がわかる。7SL RNA の二次構造においては、*Alu* と共有されている、5'側と 3'側から構成される領域を *Alu* domain、共有されていない中央部の領域を S domain と呼ばれる。*Alu* domain には、signal recognition particle (SRP) 蛋白質のヘテロ二量体 SRP9/14 と結合する活性がある。

small cytoplasmid *Alu* (*scAlu*) RNA は細胞質中に見られる、poly A を持たない 120 nt 程度の長さの、*Alu* 由来の RNA である。Matera らが HeLa 細胞で *Alu* の配列をプローブに Northern hybridization を行なったところ、300 nt 程度の polyA を持つ (polyA<sup>+</sup>) RNA の他に、polyA を持たない (polyA<sup>-</sup>) 120 nt 程度の RNA が見つかった (Matera et al. 1990)。Primer extension により 5'末端の位置を決めると、どちらの RNA も似た位置から転写されていることがわかった。*Alu* の 20 番目の塩基が 5'末端であるものが多かったが、polyA<sup>+</sup>の RNA についてのみ 1 番目の塩基からの RNA が見つかった。この polyA<sup>-</sup>の RNA が *scAlu* である。従って、*scAlu* は left *Alu* monomer だけから構成されている。

この後、Maraia らにより *scAlu* が *Alu* の 1 番目の塩基から転写されていることが示された (Maraia et al. 1993)。彼らは HeLa からサイズ分画をした RNA を primer extension により配列決定した。*in vitro* の RNA polymerase III の転写開始点と一致する事から、*in vivo* でも RNA polymerase III によって *Alu* が転写されていることが確認された。RNA によっては 1 番目の塩基の前に G がついているものがあり、RNA polymerase III の転写開始点が固定されていないという事実と矛盾しない。配列からは新旧どのグループの *Alu* からでも *scAlu* が合成されるが特に新しい *Alu* の配列を持つものが多い事も明らかになった。*scAlu* は HeLa 細胞 1 つあたり  $10^3$  から  $10^4$  コピー存在していた。

続いて、最近転移した dimer の *Alu* を載せた plasmid を、*Alu* を持たないアフリカツメガエルの卵に injection する実験により、dimer の *Alu* からでも *scAlu* ができること、*scAlu* は polyA を持たないこと、right monomer だけからなる RNA は *scAlu* の 5-10%程度しかないこと、などが示された。また、*Alu* は転写終結点を含まないため、この実験では、*Alu* の長さを超えた 350 nt 程度の RNA がまず合成されることが予想された。しかし実際には 350 nt 程度の長さの polyA<sup>+</sup>の RNA と polyA<sup>-</sup>の 118 nt の *scAlu* の他に、280 nt の polyA<sup>-</sup>の RNA ができることも明ら

かとなった。hybridizationによりこの 280 nt の RNA は *Alu* 全長に相当する事がわかった。

*in vitro* で合成し、 $^{32}\text{P}$  でラベルされた全長の *Alu* RNA を HeLa 細胞の細胞抽出液中で incubate する実験により、全長 *Alu* RNA の 3'側が切除されて *scAlu* RNA ができることが証明された。この実験でも 280 nt の RNA は認められる。

Maraia らの手法では、*scAlu* RNA の 5'末端は決定できても 3'末端は決定できなかった。Shaikh らはサイズ分画して取って来た RNA の 3'末端に oligo C を酵素的に付加し、oligoG のプライマーを用いて PCR することで 3'末端を決定した (Shaikh et al. 1997)。7 つの *scAlu* RNA の配列を読み、*scAlu* RNA の 3'末端が 117 番目の U、118 番目の A、あるいは 119 番目の C であることを明らかにした。oligoC を付加しているため 3'末端が C であるかどうかは決定できない。117 番目の U で終わる 4 配列では、末端の 3 塩基が UUU で、GC-rich な配列に続いていることから、著者らはこの配列が RNA polymerase III の転写終結シグナルであり、転写がここで終わっていると考えた。残る配列では UUU が見られない。この意見に従うと、*scAlu* RNA は転写の終結と転写後の切断の 2 種類の機構によって作られる RNA の集合体ということになる。

さて、*Alu* の RNA は SRP と結合する 7SL RNA に由来する。実際、*Alu* RNA も SRP と結合する。*Alu* RNA は 7SL RNA 由来の配列が 2 つ繋がっているの、left monomer と right monomer の 2 つがそれぞれ SRP と結合することができる。EMSA を使って 3 種類の *Alu* の left monomer の SRP への結合の強さを調べると、古いタイプの *Sx* が最も弱く、新しい *Y* ともっと新しい *Ya5* はその 2-3 倍強い事がわかった (Sarrowa et al. 1997)。この違いはもちろん塩基配列の違いに起因している。一方、right monomer では逆に、*Sx* が最も結合が強く、*Y* はその 3-5 分の 1、*Ya5* に至っては 10-20 分の 1 であった。*Sx* と *Y* とで 4 塩基の置換があるだけだが、native gel での電気泳動の結果から二次構造はかなり異なる事がわかり、おそらくは塩基置換により RNA の塩基対形成が壊れた事で RNA の二次構造が変化し、SRP との結合が弱くなったと考えられる。ちなみに *Y* と *Ya5* とでは 3 塩基の違いがあり、*Sx* と *Ya5* とでは合計 7 塩基異なる。

興味深い事に、全長の *Alu* RNA を 3T3 細胞に導入すると、*AluYa5* を導入した場合のみ *scAlu* RNA が観察された。*AluSx* や *Y* を導入した時にはほとんど見られない。*AluY* から派生し、変異を蓄積した別の *Alu* である AFP-*Alu*

(alphafetoprotein (AFP) 遺伝子中に挿入された *Alu*) を導入しても *scAlu* RNA が観察される。AFP-*Alu* においても right monomer は left monomer よりもはるかに SRP への結合が弱い。AFP-*Alu* と *AluYa5* では left monomer の配列も違うので、right monomer が left monomer よりも SRP への結合が弱いことが *scAlu* RNA 合成に関係していると考えられる。

scAlu RNA がどのようにしてできるのかの示唆は Chen らの研究から得られる (Chen et al. 1998)。彼らは *Alu* の祖先である 7SL RNA において 3'末端が切断され、1 塩基の A が付加されることを明らかにしている。micrococcal nuclease 処理により内在性の RNA を全て分解した HeLa 細胞抽出液に *in vitro* で合成した *Alu* RNA と [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP を加えると、*Alu* RNA が放射能ラベルされるのが確認された。ここでは、彼らがイヌの 7SL RNA のうち *Alu* の right monomer に相当する部分を人為的に作成し、*Alu* RNA と称している事に注意する必要がある。すなわち、この論文中の *Alu* RNA とは、7SL RNA の 2 つの RNA domain の内、S domain を取り除いた *Alu* domain 領域であり、SINE の *Alu* を使っている訳ではない。7SL RNA の場合も同様に修飾されたが、U4 snRNA や U6 snRNA は修飾されなかった。これらのことは、7SL RNA と *Alu* RNA が特異的に 3'末端に A 付加を受ける事を示している。T1 RNase と T2 RNase により切断することで、どちらの A 付加も UCUCU の後ろで 1 塩基だけだと明らかになった。*in vitro* で合成する *Alu* RNA の末端の長さを変えた場合でも A 付加された RNA は同じ長さであった。*Alu* RNA を 5'側から削った場合、3'側から削った場合には A 付加は起こらなかった。一方、中央部を削った場合には SRP と結合する領域を残していると A 付加が起こったが、そこまで削ってしまうと起こらなくなった。前者では 3'末端に余分な塩基を加えても取り除かれたが、後者では取り除かれなまま残った。以上の事から、SRP との結合が、3'末端のトリミングと A 付加に必要であることが示唆される。実際、A 付加された RNA は SRP と結合していることが免疫沈降により示されている。最後に核小体画分から RNA を抽出し、A 付加の有無を調べることで、核小体内部で既に A 付加が起こっている事が示されている。

残念ながら、Chen らの解析は本当の *Alu* RNA を用いていないが、SRP と同じ修飾を *Alu* RNA も受けているとすると scAlu RNA の構造はきれいに説明できる。上記の末端 UCUCU の内、UCUC は *Alu* RNA と 7SL RNA に共通する二次構造の 3'末端である。*Alu* の left monomer の末端は、UCUCUACUA となっており、U の後ろで切断し A を付加すると、ちょうど Shaikh らの論文で示された scAlu RNA の 3'末端と一致する。Chen らの実験でも、末端が UCUCUA の場合、A が除去された上で  $^{32}$ P ラベルされた A が付加されている。一方、*Alu* の right monomer の末端は UCUC の後ろに polyA が続いている。対応する実験がされていないので定かではないが、おそらくは最後の U が無いので切断と A の付加は起こらないだろう。ならば、*Alu* の right monomer の後ろで切断された polyA<sup>-</sup>の RNA は合成されない。しかしながら、Maraia らの解析で見られる 280 nt の polyA<sup>-</sup>の RNA は *Alu* の right monomer の polyA の前で切断されているように見えることから、弱いながらも right monomer の 3'側でも切断が起こっているのかもしれない。

細胞にとっては *Alu* RNA の切断、修飾は 7SL RNA と間違って認識しているだけなのだろう。しかし、*Alu* RNA は切断され、polyA を失う事で転移することができなくなる。細胞内で *scAlu* RNA は全長の *Alu* RNA に比べて遥かに大量に蓄積している。従って、*Alu* RNA の切断、修飾は非常に重要な *Alu* の転移抑制機構として働いていると言えよう。

Maraia RJ, Driscoll CT, Bilyeu T, Hsu K, Darlington GJ.

Multiple dispersed loci produce small cytoplasmic *Alu* RNA.

Mol Cell Biol. 1993 Jul;13(7):4233-41.

Shaikh TH, Roy AM, Kim J, Batzer MA, Deininger PL.

cDNAs derived from primary and small cytoplasmic *Alu* (*scAlu*) transcripts.

J Mol Biol. 1997 Aug 15;271(2):222-34.

Sarrowa J, Chang DY, Maraia RJ.

The decline in human *Alu* retroposition was accompanied by an asymmetric decrease in SRP9/14 binding to dimeric *Alu* RNA and increased expression of small cytoplasmic *Alu* RNA.

Mol Cell Biol. 1997 Mar;17(3):1144-51.

Chen Y, Sinha K, Perumal K, Gu J, Reddy R.

Accurate 3' end processing and adenylation of human signal recognition particle RNA and *Alu* RNA in vitro.

J Biol Chem. 1998 Dec 25;273(52):35023-31.

2009/03/05

小島 健司 著

禁 無断複写転載