

## L1 の 3 番目の遺伝子転移機構 : template-switch

L1 は 2 種類の機構で遺伝子の配列を転移させることが知られている。*trans-mobilization* と 3' transduction である。*trans-mobilization* では、L1 のタンパク質が細胞 mRNA を *trans* に認識してその polyA tail から逆転写することで遺伝子の一部、あるいは全部を転移させる。転移したものは通常プロモータを持たず偽遺伝子化するため、*processed pseudogene* と呼ばれる。この機構では、挿入された配列は全て遺伝子の配列である。3' transduction は L1 の転写が L1 の 3' 末端で終わらずに read-through し、下流の polyA signal まで進んだ転写産物が、下流の polyA tail から逆転写される現象である。ここで挿入されるのは、5' 側に L1 の配列を持ち、3' 側に L1 以外の配列を持つキメラ配列である。

逆に 5' 側に遺伝子の配列を持ち、3' 側に L1 の配列を持つキメラ転移配列は存在しないものだろうか？ 遺伝子の転写が、イントロンに挿入された L1 で終了するとこのような転写産物が出来る。このような転写産物のほとんどでは L1 のタンパク質が正常に作られないと考えられるので、もし転移するとしても非常に低い頻度であろう。しかもこの場合には L1 は完全長でなければならない。

ところが実際に見つかったキメラ挿入配列は、5' 側に U6 snRNA の配列、3' 側に不完全な L1 の配列というキメラになっていた (Buzdin et al. 2002)。Buzdin らは、ヒト特異的な L1 の挿入を探索し、ヒト染色体の 10p13 の位置に U6 と L1 の融合した挿入を発見した。この挿入の 5' 側 107bp は U6 snRNA の全長で、3' 側は L1 の 5' 側が欠失した 1324bp の配列であった。挿入は 20bp の target site duplication (TSD) を持っていた。次に U6 の配列をヒトゲノムで探索すると、コンセンサス配列に対して 85-100% の相同性を持つ全長の U6 が 161 個見つかった。この内 56 個は 10p13 で見つかったような U6 と L1 の融合した構造を取っており、11-21bp の TSD が見つかった。L1 と U6 のコンセンサスからの変異の蓄積はほぼ相関しているのだから、かなり昔から U6 と L1 のキメラが生まれ続けていることがうかがえた。

以後、他の snRNA でもキメラ転移産物が見ついている。Buzdin らは続く論文 (Buzdin et al. 2003) において BLAT を用いた *pseudogene* の探索から 25 個のキメラを発見した。最も多かったのは U6-L1 のキメラだったが、他にも U3-L1、U5-L1、5S rRNA-L1 のキメラが見つかった。U6 と 5S rRNA では、全長が挿入されていたが、U3 と U5 は 3' 側が欠失していた。特に U3 では、見つかった 7 つ全てのキメラで同じ 5' 側の 1-75 だけが挿入されている。3' 側が L1 ではなく、Alu や mRNA であるものも見ついている。彼らは 5' 側には核内 RNA が多く、3' 側には細胞質内 RNA が多い点を指摘している。この傾向はキメラ形成が核内で起こっていることを示唆している。これらのキメラは 8 から 25bp の TSD に挟

まれており、多くはポリ A 末端を持っていた。また、この内のいくつかは旧世界猿と類人猿が分岐する以前に転移したことが PCR によって確認できた。

Budzin らはキメラの出来る機構について 3 つの可能性を考えている (Budzin et al. 2002)。(1) L1 の 5' 側に U6 が独立に挿入された可能性、(2) L1 の上流に U6 が挿入され、スプライシングによって連結された RNA が転移した可能性、そして、(3) 逆転写の過程で鋳型 RNA が L1 から U6 に移った (template-switch) 可能性である。U6 と L1 の両方を挟んだ 1 対の TSD の存在、異なる位置で L1 が切れていることなどから、最後の可能性が最も高い。

実際にこのようなキメラが L1 の転移によってできることは Moran と Gilbert らの 2 本の論文によって証明された (Gilbert et al. 2005; Garcia-Perez et al. 2007)。Gilbert らの論文では HeLa 細胞での転移系において、U6 snRNA が 5' 側に接続された L1 が転移していることが報告されている。107bp の U6 遺伝子が 101bp の L1 の上流に同じ向きで接続しており、両側には 17bp の TSD が見つかった。

Garcia-Perez らはまず、Budzin らの解析と同様に BLAST によって各種 RNA 遺伝子を探索し、U6-L1、U6atac-L1、U3-L1、U5-L1 のキメラを発見した。U3 と U5 では 3' 側が欠失しているという報告も Budzin らの報告と共通する。続いて、Gilbert らの実験と同様の HeLa 細胞転移系で U6 のプライマーと L1 のプライマーとで PCR を行い、15 個に 1 個が U6 と L1 のキメラになっていることを示している。ヒトの L1 でもマウスの L1 でも U6 とのキメラ形成率に大きな違いは無かった。さて、上述のようにキメラになる RNA には U6 RNA などの snRNA が多い。snRNA はスプライソソームの構成因子だから、スプライシングに依存してキメラが形成される可能性が考えられる。元来 L1 はスプライシングを必要としないのだが、実験系の都合によりイントロンが挿入された L1 が使用されているため、このようなキメラ形成はアーティファクトである可能性も否定できない。そこでイントロンを自己スプライシングイントロンである group I intron に変えたものを使用したところ、U6-L1 の転移は L1 の転移全体の 4% の割合で起こっており、スプライシングは U6-L1 キメラの形成に必要なことが確認された。U3 と U6atac についてもキメラが形成されることが実験的に確認された。しかも、U3 の場合にはヒトゲノム中に見つかったものと同じ位置で 3' 側が欠失していた。Gilbert らの論文と併せて考えると、上記の (2) の可能性は明瞭に排除できる。L1 はタグを付けてプラスミドの形で導入しているので 5' 側の別の遺伝子からの転写はあり得ない。(1) の可能性も実験系での L1 の転移頻度の低さを考えるとまずあり得ない。数日の間に 2 回の転移が同じ位置に起こるという可能性は極めて低い。従って、(3) の template switch がキメラ形成の機構と考えて良さそうである。

Garcia-Perez らは template switch と *trans*-mobilization (彼らは template choice と呼んでいる) との関係についても解析を行っている。L1 の 5'UTR と ORF1、ネオマイシン耐性遺伝子カセットを持つが L1 の ORF2 を持たないコンストラクト L1.3/ORF1*mneoI* の転移を調べることで L1 のタンパク質が *trans* に作用する場合を見ている。タンパク質を供給する L1 のコンストラクト (driver) にはネオマイシン耐性遺伝子がコードされていないので L1.3/ORF1*mneoI* の転移と区別できる。更に template switch と template choice とを区別するために driver の L1 ではポリ A の直前に 2bp の挿入を入れておいた。L1.3/ORF1*mneoI* の転移 2500 個を調べても 1 つも 2bp の挿入が見られなかったことから、template choice によって L1.3/ORF1*mneoI* が転移していることがわかった。更に、U6 のプライマーと L1 のプライマーとの間の PCR により、template choice によって起こった L1.3/ORF1*mneoI* の転移から U6 への template switch が起こっていることも示されている。これは Buzdin らの報告する U6-Alu などのキメラの形成機構を実験的に再現していると言える。以上の結果からは、template switch が L1 の polyA を逆転写した直後に起こる確率は非常に低く、processed pseudogene は L1 の蛋白質が mRNA を *trans* に認識して転移させたと考えて良いこと、そして、そのような *trans*-mobilization の産物から更に template switch が起こりうることを示している。

解析が non-coding RNA に偏っているため、mRNA が template switch 後の基質 RNA になるかどうかは不明瞭だが、どうやらその確率は低いようだ。non-coding RNA の中でも U6 RNA が非常に多い点、そして U3 や U5 では 3'側がいつも同じ位置で切れる点を考え合わせると、snRNA への template switch は偶然ではなく、L1 の転移に核小体、もしくはスプライソソームが関わっており、その過程での snRNA と L1 蛋白質との特異的な相互作用によって template switch が引き起こされている可能性が濃厚である。となれば、L1 が遺伝子の配列を転移させる機構 3 種類はそれぞれゲノム進化における役割が異なると考えてもあながち誤りではないだろう。*trans*-mobilization は mRNA を転移させ、template switch は non-coding RNA を転移させ、3' transduction は通常転写されない領域を含んで DNA を転移させる。今後は L1 により転移した非 L1 配列がどのような形で生物機能に関わっているのかが解明されていくであろう。

Buzdin A, Ustyugova S, Gogvadze E, Vinogradova T, Lebedev Y, Sverdlov E.

A new family of chimeric retrotranscripts formed by a full copy of U6 small nuclear RNA fused to the 3' terminus of L1.

Genomics. 2002 Oct;80(4):402-6.

Buzdin A, Gogvadze E, Kovalskaya E, Volchkov P, Ustyugova S, Illarionova A, Fushan A, Vinogradova T, Sverdlov E.

The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through in vivo RNA recombination.

Nucleic Acids Res. 2003 Aug 1;31(15):4385-90.

Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, Moran JV.

Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells.

Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(17):7780-95.

Garcia-Perez JL, Doucet AJ, Bucheton A, Moran JV, Gilbert N.

Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase.

Genome Res. 2007 May;17(5):602-11.

2007/12/19

小島 健司 著

禁 無断複写転載