

偽まこりんのお仕事 : *Makorin1-p1*

遺伝子の配列とよく似ているが機能的なタンパク質やRNAをコードしない配列は、偽遺伝子（pseudogene）と呼ばれる。偽遺伝子の中には、non-LTR retrotransposon の一種である L1 によって mRNA が逆転写されてできるものがある。これらは processed pseudogene と呼ばれ、イントロンを持たないのが最大の特徴である。processed pseudogene は L1 の転移頻度の高い我々哺乳類に多く存在する。しかし、「機能を持たない」という基準は一般に「元の遺伝子と似た機能を持たない」という意味で考えられており、それ以外の働きを持っている可能性は以前から指摘されていた。

Hirotsune らは processed pseudogene に元の遺伝子の転写量を制御する機能があるという報告をしている（Hirotsune et al. 2003）。彼らは、キイロショウジョウバエの遺伝子 *sex-lethal* を組み込んだトランスジェニックマウスを作成する過程で奇妙な変異体に気づいた。この変異体は、外来遺伝子 *sex-lethal* 遺伝子をヘテロで持つが、80%という高い割合で生後2日以内に死亡した。これらの個体は体が小さく、骨の硬質化の程度が著しく低くなっていた。骨の発育不全の他にもまぶたが不完全であったり、腎臓が嚢胞化したりするなどの異常が見られた。しかし、*sex-lethal* 遺伝子を組み込んだ1つの系統でしか見られないことから、これらの異常は *sex-lethal* 遺伝子の働きによるものではなく、導入により破壊された遺伝子の働きによるものと考えられた。

ホモ個体でも、ヘテロ個体と同程度の異常が生じた。また、野生型メスとヘテロオスとを掛けあわせたヘテロの子供では、90%以上に異常が見られたのに対して、野生型オスとヘテロメスとを掛けあわせたヘテロの子供では、ほとんど異常は観察されなかった。この事実は、インプリンティングによってオス由来の遺伝子のみが働いている可能性を示している。

Hirotsune らはコスミドと BAC のライブラリーを用いて、D5Mit237 マーカーのそばに *sex-lethal* 遺伝子が向き合った形で2コピー挿入されており、7kbほどが失われていることを明らかにした。近傍には3つの転写される遺伝子があり、内2つはどちらの親がヘテロかに関わらず転写量に変化が見られなかったため、残りの1遺伝子を原因遺伝子と考えた。この遺伝子は、*Makorin1* 遺伝子の processed pseudogene で *Makorin1* の5'側の領域700bp程度のみをコードしている。また、フレームシフトも見られることからタンパク質をコードしていないことは明らかである。

Makorin1 には長いもの（~2,900bp）と短いもの（~1,700bp）の2種類の転写産物があるが、どちらも同一のタンパク質をコードしている。この2種と *Makorin1-p1* の全てを検出できるプローブを設計し、northern blotting を行ったら

ころ、ヘテロ個体では、*Makorin1* の短い転写産物と *Makorin1-p1* の転写産物の量が減少していた。しかもこの減少はヘテロオスと野生型メスとの間に生まれたヘテロ個体では見られるが、ヘテロメスと野生型オスとの間の子供には見られなかった。また成長につれて目立たなくなっていく。これらの事実は、*Makorin1* あるいは *Makorin1-p1* がインプリンティングを受けていることを示唆しているが、メチル化は確認できなかった。しかし、変異体マウスを野生マウス *Mus spretus* あるいは *Mus molossinus* と掛け合わせてオス由来の遺伝子とメス由来の遺伝子とを区別することでオス由来の *Makorin1-p1* が特異的に発現していることを示している。

以上の結果は、父親由来の *Makorin1-p1* のみが発現し、これによって配列の似た *Makorin1* の転写産物の量が調整されていることを示唆している。*Makorin1* 及び *Makorin1-p1* を CMV プロモーターの下流につないで、*Makorin1* の発現されない NIH3T3 細胞で一過的に発現させた。*Makorin1* 単独で導入すると 16 時間後には RNA が観察されるが、32 時間後には RNA が無くなっていた。しかし、*Makorin1-p1* を同時に発現させると、32 時間後にも RNA の存在が観察された。著者らはこれを *Makorin1* の 5' 側の配列に mRNA の分解を制御する配列があるためと考えた。実際、*Makorin1* の 5' 側 700bp だけを欠失させた場合には mRNA は非常に安定になった。更に、*Makorin1* の 5' 側 800bp に無関係の遺伝子 *Katanin P60* をつなげると *Katanin P60* 単独の場合に比べて早く分解されるようになり、そこに *Makorin1-p1* を発現させると分解されにくくなることが明らかになった。以上からは、*Makorin1* の 5' 側の領域に mRNA を分解されやすくするシグナルがあることが想定される。何故かその効果は短い方の *Makorin1* 転写産物にのみ働き、長い転写産物には効果が見られない。

続いて *Makorin1* あるいは *Makorin1-p1* の配列を CMV プロモーターの下流に配置した cDNA を野生型あるいは *sex-lethal* ヘテロ（片方の染色体の *Makorin1-p1* の付近に *sex-lethal* 遺伝子が挿入されている）のマウスの卵に注射し、トランスジェニックマウスを作成した。得られたトランスジェニックマウスに異常は観察されず、*Makorin1*、*Makorin1-p1* の強制発現は障害を引き起こさないことがわかった。逆に *Makorin1*、*Makorin1-p1* を発現させたヘテロマウスでは若干の生存期間の延長、皮膚の異常の減少が観察された。

上記のような解析から Hirotsune らは転写される processed pseudogene である *Makorin1-p1* が元の遺伝子 *Makorin1* の mRNA の量を制御する機能を有しているという結論に達している。これが “pseudogene trans-regulation” モデルに発展した。すなわち、哺乳類にはタンパク質をコードしない processed pseudogene が多数存在するが、その中の転写されるものは、元の遺伝子の RNA の安定性を制御することで生物によって必要な機能を果たしているというものである。

ところが、最近になってこの結論に異議が唱えられている (Gray et al. 2006)。Gray らは *Makorin1-p1* の配列をクエリーに EST データベースに対して BLAST 検索をしたが、ヒットした配列は全て *Makorin1* のものだったことから、*Makorin1-p1* の転写に疑問を感じた。EST 解析の結果から、これまで知られていなかった 0.75kb の転写産物 exon3b が見つかったため、これが~700bp の *Makorin1-p1* の転写産物と間違えられているのではないかと考え、exon3b と *Makorin1-p1* を区別するプライマーを用いて RT-PCR を腎臓で行ったところ、exon3b の転写は確認されたが、*Makorin1-p1* は転写されていなかった。exon3b 転写産物は、*Makorin1* のエクソン 1-3 を持つが、続くエクソン 4 へのスプライシングが起らず、イントロン 3 内部のポリ A シグナルで転写が終わっている。このため、*Makorin1* タンパク質の前側半分程度しかコードされていない。著者らは更に、*Makorin1-p1* とは 100% 一致するが *Makorin1* とは 3 塩基の違いを持ったプライマーを用いて腎臓の RT-PCR を行ったが、*Makorin1* の転写産物しか増幅されないことを示している。Gray らはこれらの結果から、Hirotune らの論文で *Makorin1-p1* の転写とされたのは、*Makorin1* の選択的転写産物 exon3b であり、Hirotune らの RT-PCR の結果はゲノムのコンタミネーションであると結論づけている。

更に、*Makorin1-p1* が両方のアリールともメチル化されていること、*Makorin1* はメチル化されておらず、インプリンティングもされていないことを明らかにしている。ただし、これは必ずしも Hirotune らの結果と矛盾する結果ではない。

また、*Makorin1* のイントロン 3 に β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを作成し、その表現型を観察した。このマウスでは、*Makorin1* の前半に β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子が融合したタンパク質が、*Makorin1* の本来発現する中枢神経系や精巣に発現するのが確認された。一方、*Makorin1* の正常な 1.7kb と 2.9kb の転写産物を作るために必須なイントロン 7 の転写量は正常の 1% 以下にまで減少する。しかし、このトランスジェニックマウスでは異常は観察されない。またマウスの系統を変えてトランスジェニックマウスを作成しても同じ結果が得られた。

以上の結果を踏まえると、*Makorin1-p1* が転写されて *Makorin1* の mRNA の分解を制御しているというモデルは疑わざるを得ない。Gray らのトランスジェニックマウスの結果からは、*Makorin1* と表現型の異常との間には関係が無いと考えるのが妥当である。Gray らの研究の主張するところは、Hirotune らの結果をもたらし機構の解明ではなく、*Makorin1-p1* の研究から提示された pseudogene trans-regulation モデルの再考である。この論文の持つ意義は大きい。今後、*sex-lethal* 遺伝子の挿入によって表現型に異常が生じ、*Makorin1* の転写産物の量

に変化が生じた機構の解明がなされることでモデルの是非が問われることになるだろう。

Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A.

An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene.
Nature. 2003 May 1;423(6935):91-6.

Gray TA, Wilson A, Fortin PJ, Nicholls RD.

The putatively functional Mkrn1-p1 pseudogene is neither expressed nor imprinted, nor does it regulate its source gene in trans.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 8;103(32):12039-44.

2007/07/24

小島 健司 著

禁 無断複写転載