

他 (TA) 者を排除する転移因子と大核形成 : PiggyMac, TPB2, and TBE

近年になって繊毛虫の大核形成には他の生物のヘテロクロマチン化、RNAi 経路との共通点が示されるようになってきた。しかし一方で古くからトランスポゾンの関与も示唆されてきた。その一例が *Paramecium* で見られる IES (internal eliminated sequence) 末端の TA である。「繊毛虫の大核形成(1) : *Tetrahymena* の場合」と重複するが、*Paramecium* では、大核から除去される配列には 2 グループがある。一つは BES (breakage eliminated sequence) で境界があまり明瞭ではなく、切断され残った配列にはテロメア反復配列が付加される。もう一つが IES で通常遺伝子の内部にあり、切り出しが厳密に行われ、残った配列は結合される。IES 内部の配列はそれぞれユニークで逆位反復配列も持たないが、両末端が TA で、除かれた後に片方の TA だけが残ることが知られていた。この TA は Mariner/Tc1 スーパーファミリーの転移因子が作る target site duplication と同じことから、この仲間の転移因子に由来する酵素が切断を行っているのではないかという仮説が提示されていた。しかし同時に、Mariner/Tc1 が転移の際に 2 塩基の 3' 突出末端を形成する一方で IES の切り出しでは 4 塩基の 5' 突出末端が形成されることも知られており、疑問視されていた。

Baudry らは 4 塩基の 5' 突出末端を作ることが知られている別のグループのトランスポゾン piggyBac に着目し、*Paramecium* で一つの配列を発見した (Baudry et al. 2009; Motl and Chalker の紹介記事も参照)。トランスポゾンなどの反復配列は大核形成の際にほとんどが除去され、大核ゲノムには残らない。しかしこの piggyBac 由来の遺伝子は大核に残る。この遺伝子は、大核 (Macronucleus, Mac) にあることから piggyMac と名付けられた。piggyMac 周辺には Terminal inverted repeat や target site duplication などのトランスポゾンとしての特徴はないが、piggyMac は 1065 アミノ酸をコードし、活性残基 DDD と PHD ドメインを持っている点は piggyBac と共通する。一方で C 末に piggyBac の持たない約 300 アミノ酸の配列がある。

piggyMac は大核形成中に、SPO11 よりも遅れて発現し、新しい大核に局在する。SPO11 は減数分裂期組換えの開始反応である DNA 二重鎖切断の形成に必須なタンパク質である。自家接合 (autogamy) の際に RNAi により piggyMac の発現を抑制すると大核形成が起こるがその後正常に増殖しない。自家接合の実験では小核の減数分裂、核接合、大核形成の 3 段階を区別できないが、異なる 2 株を掛け合わせる実験を行うと、減数分裂と接合以降の過程を分離することができ、その間に RNAi を行うことができる。減数分裂前から RNAi を行っても減数分裂後だけに RNAi を行っても piggyMac の dsRNA の場合には正常な増殖は起らない。一方、SPO11 の dsRNA の場合には、減数分裂後に RNAi を行った場

合には正常な増殖が起こる。これは SPO11 が減数分裂に必要な因子だからである。従って piggyMac は核接合と大核形成の過程に必要な因子である。自家接合後の時間を区切って PCR を行った実験では、piggyMac の RNAi では IES の切り出しが起こっていないことが示された。

以上の結果は直接的ではないが piggyMac が IES の末端切断に関わっていることを示している。piggyBac の TSD は TTAA なのでその中央部は TA である。4 塩基の 5' 突出も考え合わせると piggyMac が IES の末端切断酵素であると考えるのは妥当であろう。

Paramecium と同じ貧膜口類に属する *Tetrahymena thermophila* にも piggyMac によく似た遺伝子があり、DDD が保存され、C 末端に余分な配列もある。*T. thermophila* には 3 つの piggyBac 由来の遺伝子があり、その内の 1 つ TPB2 が piggyMac と同様に IES の切り出しに関与していることが示されている (Cheng et al. 2010)。TPB2 も piggyMac 同様に大核形成時に発現し、RNAi により抑制されると大核形成異常を引き起こし細胞増殖ができなくなる。また、TPB2 の抑制では IES の切り出しだけでなく、BES の切断にも異常が出ることが示された。TPB2 は PDD1 と核内での局在が一致し、TPB2 抑制により PDD1 を中心に形成されるヘテロクロマチン上の構造が形成されなくなることから、TPB2 と PDD1 とは何らかの形で相互作用していることが示唆された。一方で PDD1 が IES に局在するのにはなんら影響を与えない。

in vitro で発現された TPB2 タンパク質は DNA 二重鎖を切断する。切断する配列にはある程度の嗜好性があり、TTAA、GTAG は切断するが GTTG は切断せず、AGTGAT は切断したが AGTGAC は切断しない。従って piggyBac の転移酵素のように強い TTAA への嗜好性は無い。切断末端が 4 塩基の 5' 突出になる点は piggyBac と TPB2 は共通する。*T. thermophila* では IES の末端は TA ではないが切断されると 4 塩基の 5' 突出を作ることが知られているので、これらの TPB2 の特徴は IES 切断酵素として矛盾しない。

piggyMac/TPB2 は貧膜口類の共通祖先で獲得された IES 切り出し酵素なのだろう。IES は TIR を持たないし、ほとんどがユニークな配列であることから、単純に piggyMac/TPB2 が IES の末端をゲノム中から認識して切断するとは考えにくい。既に知られている他の因子、PDD やヒストンの修飾、scan RNA などの関与があり、最後に piggyMac/TPB2 が TA を認識して切断するという経路を想定すべきだろう。

旋毛類の *Oxytricha trifallax* でも別の形でトランスポゾンの関与が示されている。「繊毛虫の大核形成(2) : *Oxytricha* の場合」で紹介したように、*O. trifallax* では、小核ゲノムの 95% が捨てられて大核が形成される。この中には、大量の DNA トランスポゾンが含まれている。DNA トランスポゾンは telomere-bearing element

(TBE)と命名され、配列によって 3 タイプ(TBE1-3)に分けられている。TBE は 3bp の標的配列重複(target site duplication, TSD)に挟まれた、4kb 前後のトランスポゾンである。TBE は 3 つの蛋白質をコードし、その内 5'側の 1 つが DD35E タイプの転移酵素 (transposase) である。3'側には、Kinase/ZnF と名付けられた蛋白質がコードされており、protein kinase 活性を持つ。中央部の蛋白質の機能はわかっていない。転移酵素には強い負の淘汰圧がかかっている。これは転移酵素としては異例である。

Nowacki らが Northern hybridization により確認したところ、TBE はいずれも接合中に転写されていた (Nowacki et al. 2009)。これは、接合型の異なる *O. trifallax* を混ぜ合わせて接合を誘導してから 24 時間後に相当する。また、RT-PCR により polyA を 3'末端に持った形で転写されていることも明らかとなった。そこで、TBE をそれぞれ 1 種類ずつ、あるいは組み合わせで RNAi により阻害する実験を行なった。dsRNA を入れる時間を、混合後 3 時間から 15 時間まで時間を振って調べたところ、12 から 15 時間後に dsRNA を入れた場合の効果が最も大きかった。この場合、生き残る細胞の数が非常に少なく、生き残ったものでも成長が遅れた。これは大核形成がうまく行かないためと考えられる。生き残った細胞では、大核形成の際の遺伝子の再編成がうまくいっていないものが多く認められた。以前の解析でも、順序の入れ替えの無い MDS の接続は比較的進んでいるものが多かったが、順序の入れ替えを必要とする MDS の接続は出来ていないものが多い傾向があったが、今回も同様の傾向が見られた。これは、遺伝子再編成において順序の入れ替えの無い MDS の接続 (IES の除去) が先行するためであろう。IES の除去は TBE の除去よりも先に起こる場合があることも示されている。従って、TBE の除去が起こらないことにより IES の除去が起こらず、遺伝子再編成が不全であるというわけではない。

興味深い事に、TBE1 から 3 を全て阻害した場合には遺伝子再編成の阻害効果が強く、1 と 2 の場合にも弱い阻害効果が見られたが、他の組み合わせや単独では遺伝子再編成は阻害されなかった。これは TBE1、2、3 がある程度相補的に遺伝子再編成に寄与している事を示唆している。

Cheng らは *O. trifallax* のようにたくさんの転移因子が切り出しに関わる形から、一つの遺伝子化された転移酵素が全ての切り出しを担う形に進化してきたと想定している。しかし TBE については IES の切り出しに積極的に関与しているという証拠は得られていない。むしろ TBE の異常が正常な IES の切り出しを妨害しているのかもしれない。TBE の切り出しは捨てられる大核から小核へと逃げようとする TBE の生存戦略と考えられないだろうか？切り出された後、小核に新しく転移する TBE は存在しないのか？ piggyMac/TPB2 についても piggyBac が競争相手の Tc1/Mariner を排除するという競争が起源なのかもしれない。

Baudry C, Malinsky S, Restituio M, Kapusta A, Rosa S, Meyer E, Bétermier M.

PiggyMac, a domesticated piggyBac transposase involved in programmed genome rearrangements in the ciliate *Paramecium tetraurelia*.

Genes Dev. 2009 Nov 1;23(21):2478-83.

PubMed PMID: 19884254

Motl JA, Chalker DL.

Subtraction by addition: domesticated transposases in programmed DNA elimination.

Genes Dev. 2009 Nov 1;23(21):2455-60.

Cheng CY, Vogt A, Mochizuki K, Yao MC.

A domesticated piggyBac transposase plays key roles in heterochromatin dynamics and DNA cleavage during programmed DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*.

Mol Biol Cell. 2010 May 15;21(10):1753-62. Epub 2010 Mar 31.

Nowacki M, Higgins BP, Maquilan GM, Swart EC, Doak TG, Landweber LF.

A functional role for transposases in a large eukaryotic genome.

Science. 2009 May 15;324(5929):935-8. Epub 2009 Apr 16.

PubMed PMID: 19372392.

2011/01/20

小島 健司 著

禁 無断複写転載