

昆虫のテロメア維持機構(4)：テロメララーゼ

第 1 章で述べたように、節足動物で初めてテロメア反復配列が決められたのはカイコ(*Bombyx mori*)であった (Okazaki et al. 1993)。古来生糸の生産のために飼育されてきたカイコは、ショウジョウバエを相補する形で生物学研究に用いられてきた。テロメアの研究においても、テロメア反復配列を持たないショウジョウバエやハマダラカを補う形でカイコのテロメア構造、そしてテロメララーゼが注目される。結論から言えば、カイコはテロメララーゼを持っているが、テロメララーゼ活性は認められない、という、双翅目昆虫と他のテロメララーゼを持つ生物との中間的な性質を示す。

Sasaki らはカイコを含む昆虫においてテロメララーゼ活性の有無を調べた (Sasaki and Fujiwara 2000)。テロメララーゼ活性を測定するためには一般に TRAP(Telomeric Repeat Amplification Protocol)法と呼ばれる手法が用いられる。TRAP 法は細胞抽出液にプライマーと反応に必要なその他の基質を加えることでテロメア反復配列を付加させ、その産物を PCR によって検出する手法である。まず、ワモンゴキブリ (網翅目)、タイワンエンマコオロギ (直翅目)、エビガラスズメ及びアゲハチョウ (共に鱗翅目) で TTAGG の 5 塩基反復配列を合成するテロメララーゼ活性が検出された。組織別に活性を調べると、生殖細胞のみならず、体細胞全般にテロメララーゼ活性が認められた。我々哺乳類ではテロメララーゼは生殖細胞や幹細胞、そしてガン細胞などごく一部の細胞でのみ発現し、大部分の体細胞では発現していない。このため、体細胞は一定回数分裂するとテロメアが短くなり分裂できなくなる。これが生物時計として一般に知られるテロメアの役割である。これに対して、昆虫では体細胞でもテロメララーゼ活性を保持しており、テロメアは生物時計としての機能を持っていないことがわかる。

当然のことながら、双翅目のキイロショウジョウバエやその培養細胞ではテロメララーゼ活性が検出されない。また、上述のようにテロメア反復配列を持つカイコでもテロメララーゼ活性は検出されなかった。系統、組織、発生時期を変えても活性は認められない。

一方で、Fujiwara らはカイコでも、テロメア反復配列の付加が長い時間単位では起こることを示している (Fujiwara et al. 2000)。カイコでは、数十年前に放射線照射によって黒い幼虫皮膚がモザイク状に白くなる系統が作られている。この原因は、断片染色体と呼ばれるミニ染色体がたまに脱落することによる。この断片染色体は放射線照射によって染色体が切断されて生じた。Fujiwara らは、断片染色体にテロメア反復配列が付加されていることを確認している。この断片染色体の切断された側の末端はもともと染色体内部の配列なので、テロメア

反復配列は存在しないはずである。また、組換えによってテロメア反復配列を付加しうるような特徴的なサブテロメア配列も存在しない。一つの可能性としては、カイコでは非常に限定された時期にのみテロメラゼが活性化されるような機構が存在するのかもしれない。あるいはカイコでは、低いながらも常にテロメラゼが発現しており、長い時間単位で見ればテロメアの付加が確認されるのかもしれない。

こうなるとやはりカイコのテロメラゼをクローニングして発現解析、機能解析をすることが必要となる。テロメラゼはテロメラゼ逆転写酵素 (TERT) タンパク質と、テロメア反復配列の鋳型となるテロメラゼ RNA との 2 つから構成される。テロメラゼは両者とも配列の保存性が低く、縮重プライマーによる PCR では簡単には釣れてこない。しかしながら、近年ではゲノムプロジェクトの進展に伴って線虫や原生生物などでも TERT 遺伝子が見つかってきている。Osanai らはカイコとコクヌストモドキのゲノム配列情報から TERT 遺伝子を同定した (Osanai et al. 2006)。Osanai らは、カイコのゲノム DNA 配列情報から TERT を含む配列を発見した。残念ながらカイコゲノム配列の解読は不十分で TERT 全長を含む配列は得られなかった。そこで、この配列を基にして PCR によってその領域をクローニングし、さらに RACE によって mRNA の全長を決定した。mRNA の配列とゲノム配列とを比較したところ、驚くべきことにカイコの TERT はイントロンを 1 つも含んでいなかった。これが processed pseudogene でないことは、ゲノム中に 1 コピーしか見られなかったというサザンハイブリダイゼーションの結果から明らかである。フレームシフトやナンセンス変異は存在せず、カイコの TERT が活性を持ってないことを示す配列上の特徴は見あたらない。しかし、カイコの TERT は他の生物の TERT に比べて N 末端側が顕著に短いという特徴を持っていた。この特徴はコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の TERT でも共通するため、カイコのテロメラゼ活性が検出されなかったのはこれが理由ではなさそうである。もっともコクヌストモドキのテロメラゼ活性は解析されていないので、こちらでもテロメラゼ活性が低い可能性も否定できないが。一方、ノーザンハイブリダイゼーションのバンドは非常に薄く、カイコのテロメラゼ活性の低さはその転写量の少なさに由来している可能性が高い。カイコの TERT 遺伝子は TATA ボックスや、ポリ A シグナルなどの転写に最低限必要な因子は有しており、転写量の少なさはエンハンサーなどの変異によるものと思われる。また、5'UTR に開始コドン AUG が複数見られるなど翻訳レベルでの発現低下の可能性もある。Robertson らも Osanai らよりも遅れてカイコ、コクヌストモドキ、ミツバチの TERT 遺伝子を報告している (Robertson and Gordon 2006)。ミツバチでも同様に N 末部分が短い、エクソンが 9 つから成るなどカイコよりも他の TERT に近い構造をしている。

今後の課題は、やはりカイコのテロメラーゼ活性の *in vitro* での再現であろう。残念ながらまだテロメラーゼの RNA サブユニットは見つかっていないため、なかなか実現は難しい。ゲノム解読から他のテロメラーゼの配列が得られれば、TRAP 法やテロメア反復配列の有無の情報と照らし合わせることでテロメラーゼの活性予測が出来るようになるかもしれない。そして、最後にはテロメア反復配列が昆虫では何故これほど失われやすいかという疑問に答えられるようになって欲しいものである。

Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ishikawa H, Fujiwara H.

Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects.

Mol Cell Biol. 1993 Mar;13(3):1424-1432.

Sasaki T, Fujiwara H.

Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects.

Eur J Biochem. 2000 May;267(10):3025-31.

Fujiwara H, Nakazato Y, Okazaki S, Ninaki O.

Stability and telomere structure of chromosomal fragments in two different mosaic strains of the silkworm, *Bombyx mori*.

Zool. Sci. 2000 17(6):743-750.

Osanai M*, Kojima KK*, Futahashi R, Yaguchi S, and Fujiwara H. (*equal contributions.)

Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle)

Gene. 2006 Jul 19;376(2):281-289.

Robertson HM, Gordon KH.

Canonical TTAGG-repeat telomeres and telomerase in the honey bee, *Apis mellifera*.

Genome Res. 2006 Nov;16(11):1345-1351.

2006/09/13

加筆修正 2007/01/10

小島 健司 著

禁 無断複写転載