

ゾロの傷痕 : The Mark of Zorro

non-LTR retrotransposon の内、最も解析が進んでいるのは、ヒトの L1 である。L1 ではヒト培養細胞を用いた転移系が構築されており、種々の解析に用いられている。しかし、細胞の蛋白質がどのように L1 の転移に関わっているのかを知るには、ヒトの培養細胞では限界がある。一方、そのような遺伝学的な解析に最適な生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* には、LTR retrotransposon は存在するが、non-LTR retrotransposon は存在しない。このことが、non-LTR retrotransposon の転移に関わる宿主因子の解析の障害となっていた。

Goodwin らは出芽酵母 *S. cerevisiae* と比較的近縁な酵母であり、カンジダ症の病原体である *Candida albicans* から 3 種類の non-LTR retrotransposon を報告している (Goodwin et al. 2001)。Zorro1 から 3 と名付けられた 3 種類はどれも L1 クレードの中で L1 とは最も離れた系統上の位置を占めた。彼らが解析した 16.2Mb の *C. albicans* の SC5314 株のゲノム配列中からは、Zorro1 と Zorro3 のほぼ完全長で蛋白質コード領域に終止コドンやフレームシフトの無いコピーが含まれていた。Zorro1 では ORF1 と ORF2 とがオーバーラップしている。一方 Zorro3 では同じフレームにコードされているが、間に 4 つの終止コドンが挟まれていた。Zorro1 と Zorro2 の 3' 末端には polyA は見つからず、サブテロメア領域の配列に隣接していた。一方、Zorro3 は 5' 側 3' 側共に polyA に隣接しており、近縁株間の比較からも polyA の内部あるいは直前直後に挿入されていることがわかった。

C. albicans の複数の株を用いて行なった Southern hybridization の結果から、Zorro1 はコピー数が少なく、株が分かれる前に転移していたことがわかった。一方、Zorro3 は株間でバンドパターンが異なり、株が分かれた後に転移したことが示された。しかしコピー数は非常に少ないので、ターンオーバーが起こっていることがわかる。Zorro1 も Zorro3 も全長に相当する RNA が見つかったことから現在も転写されていると考えられる。

Goodwin らは Zorro を non-LTR retrotransposon の転移のモデル系として開発すべく研究を続けた (Goodwin et al. 2007)。現在も転移活性を持っている候補として、蛋白質がコードされており、転写が確認され、株間で転移が確認できた Zorro3 を選んだ。*C. albicans* の別株 ATCC10261 で inverse PCR と PCR を行い、2 コピーを配列決定したところ、SC5314 株の Zorro3 と共通の特徴が見られた。また、近縁種 *C. dubliniensis* のゲノム配列を調べると Zorro3 に近縁な retrotransposon が見つかり、同様の特徴を示した。いずれも非常に短い 5'UTR を持ち、ORF1 と ORF2 の間に非コード領域が挟まれており、5'側 3'側とも polyA であった。近縁株の比較からはやはり挿入される前の配列も polyA であり、polyA の内部ある

いは直前直後に挿入されていることがわかった。これらの共通する特徴から、SC5314株のZorro3は転移可能な配列であると判断し、転移系の構築に利用した。

転移系では転移のレポーターとして、URA3 遺伝子とプロモーター配列に、逆向きのイントロンを挟んだ配列を、Zorro3 の 3'UTR に逆向きに挿入した。*C. albicans* に Zorro3 の入ったプラスミドを導入し、ウリジンを含まない培地で育てると、転移の起こったクローンだけが増殖する。8 クローンを Southern hybridization すると確かに挿入が確認され、30 クローンの挿入の境界を inverse PCR と配列決定すると、全て polyA で終了しており、27 クローンは Zorro3 の 3' 末端に相当する位置で終わっていた。残り 3 つはそれよりも 5' 側で polyA につながっていた。またゲノム配列と比較する事で全ての Zorro3 が polyA に挿入されていることが明らかとなった。ここからは、Zorro3 は polyA 特異的に転移する non-LTR retrotransposon であると言う事ができる。

3'側の挿入配列がわかったので 5'側に primer を設計し、Zorro3 の内部に設計した primer との間で PCR を行なう事で、19 クローンについては Zorro3 の 5'側の境界配列が得られた。12 クローンは全長が挿入されていた。他の 6 クローンでは、Zorro-3 を転写するために人為的に導入した ACT1 プロモーターの配列まで含まれていた。すなわち全長よりも長い配列が挿入されていた。残り 1 つだけが 5'側が欠失していた。また、5'側の配列が得られなかった 11 クローンでは、元々挿入されている内在性の全長 Zorro3 と組み換えを起こして挿入されていることがわかった。Zorro3 は 22°C、27°Cでは転移するが、37°Cでは転移しなかった。また、L1 と同様に、Zorro3 のコードする蛋白質が転移に必要なことなども示している。

Zorro3 の転移系の構築により、L1 との共通点、非共通点が明らかになった。しかし、*C. albicans* の系では実験的に限界があり、*S. cerevisiae* の系の構築が期待された。*S. cerevisiae* を利用すればほとんどの遺伝子の変異株があるので、遺伝学的な研究が容易であり、non-LTR retrotransposon の転移に必要な宿主側因子の同定が一気に進む事が期待される。

C. albicans の系統では、例外的に CUG がロイシンではなくセリンをコードしている。このため、Dong らは、*S. cerevisiae* で転移させるために、Zorro3 の CUG コドンでセリンをコードする UCU に全て置換した配列 scZorro3 を作成した

(Dong et al. 2009)。これをプラスミドとして導入したところ転移が確認されたので、更に 2 番染色体に組み込んだ株を作成した。この状態で scZorro3 の蛋白質に変異を加え、転移頻度の変化を観察したところ、L1 などでは報告されているとおり、逆転写酵素、エンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーの変異では転移頻度が低下した。この転移が内在性の LTR retrotransposon Ty1 によるものでないことは、Ty1 が転移できなくなる変異株 *spt3 Δ* でも転移が確認されることで確

認できた。また相同組み換えに必須な *rad52* の変異株でも *scZorro3* は転移した。配列を決定したところ、いずれも polyA に挿入されていた。L1 と共通する特徴として、5'境界に鋳型無しの塩基の挿入があったり、*scZorro3* 以外の鋳型を利用している場合も認められた。一方、*Zorro3* を *C. albicans* で転移させた場合と異なり、多くは 5'欠失していた。また、頻繁に template switch が見られるのも *scZorro3* だけで、*Zorro3* では見られない。エンドヌクレアーゼに変異を導入した *scZorro3* の転移では、100bp 以上の長さの標的配列の重複、欠失が認められた。また、3'側の欠失も見られた。これらの特徴はエンドヌクレアーゼ非依存的な L1 の転移と共通する。以上のように、*scZorro3* の転移では、*Zorro3* とは異なった特徴が見られ、これは宿主が異なるためと考えられる。また、*Zorro3* 自身も L1 とは系統的に遠く離れた non-LTR retrotransposon であるため、性質も異なっている可能性が高い。このような点は、ヒト L1 の転移に関わる情報を得るのには障害になるかもしれない。しかし逆に性質の違いは、non-LTR retrotransposon の多様性を示すものかもしれない。L1 と *scZorro3* とで異なった結果が出た場合には注意深く見ていく必要があるだろう。今後の進展に期待したい。

Goodwin TJ, Ormandy JE, Poulter RT.

L1-like non-LTR retrotransposons in the yeast *Candida albicans*.

Curr Genet. 2001 Apr;39(2):83-91. PubMed PMID: 11405100.

Goodwin TJ, Busby JN, Poulter RT.

A yeast model for target-primed (non-LTR) retrotransposition.

BMC Genomics. 2007 Aug 3;8:263. PubMed PMID: 17683538; PubMed Central PMCID: PMC1965478.

Dong C, Poulter RT, Han JS.

LINE-like retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics. 2009 Jan;181(1):301-11. Epub 2008 Oct 28. PubMed PMID: 18957700; PubMed Central

PMCID: PMC2621178.

2010/01/09

小島 健司 著

禁 無断複写転載