

# ヒトレトロトランスポゾンと宿主因子との間で繰り広げられる攻防と連携

三好 知一郎

## 1. はじめに

ゲノム上のある場所から別の場所へと移動する転移因子（トランスポゾン）は、Barbara McClintockによるトウモロコシを用いた先駆的な研究から発見され、その後多くの生物種のゲノム内に存在することがわかった。ヒトゲノムプロジェクトによりゲノムの概略図が明らかにされると、ゲノムの半分近くがトランスポゾン配列から構成されていることも明らかとなった。その中でも現生人類のゲノム上を自律的に転移することができるのはlong interspersed element-1 (LINE-1またはL1)のみである。これは転写後、自身がコードする逆転写酵素によって自らのRNAをcDNAへと変換し、ゲノム挿入を繰り返すことで増幅するレトロトランスポゾンである。無秩序なL1の転移は、遺伝子破壊など不利な変異にもつながるため、宿主はL1に対してエピジェネティック修飾による転写抑制やRNA分解制御を発達させ、転移を抑制してきた。これまでは、このような翻訳前の制御に焦点が当てられてきたが、翻訳後の制御、すなわちタンパク質レベルにおけるL1と宿主因子との相互作用は見逃されてきた。本稿では、L1から作り出されるタンパク質に着目し、最近我々が見いだした宿主制御因子群について概説する。

## 2. ヒトレトロトランスポゾンについて

トランスポゾンは、DNAトランスポゾンとレトロトランスポゾンに大別される。前者は自身のDNA配列を切り出して別のゲノムDNA配列内に移動するカット＆ペースト方式で転移し、後者は自身の転写産物を逆転写して移動するコピー＆ペースト方式によって転移する。多くの哺乳類ではDNAトランスポゾンはすでに転移能を失って

いるが、レトロトランスポゾンは高い転移能を保持している。レトロトランスポゾンはさらに、レトロウイルスと類似したlong terminal repeat (LTR)型とnon-LTR型に区別され、前者もヒトにおいては転移能を喪失していると考えられている（ただしマウスでは転移可能）。一方、先に述べたL1はnon-LTR型であり、疾患原因となる遺伝子破壊を引き起こすことが報告された後<sup>1)</sup>、培養細胞を用いた実験により、実験室レベルにおいても転移することが証明された<sup>2,3)</sup>。さらにnon-LTR型にはshort interspersed element (SINE)ファミリーに属するAluやSINE-R/VNTR/Alu-like (SVA)が知られている。これらは自身の配列だけでは転移することができないが、L1のタンパク質を利用して転移する非自律的なレトロトランスポゾンである<sup>4)</sup>。

L1とSINEをあわせると、ヒトゲノムの約28%程度を占有しているが、これらの配列の多くは、はるか太古の昔に転移した配列の痕跡であり、そのほとんどが転移能を失った“化石”のような存在である。ヒトではおよそ80~100コピー程度のL1配列が、高い転移能を持つと推定され、これまでに疾患原因となる挿入変異が100例以上報告されているが、研究の進展に伴い報告例は増加の一途をたどっている<sup>5)</sup>。最近では、集団内のゲノム多様性に加え、個体内の細胞間でもその挿入位置が異なることがわかってきた<sup>6)</sup>。これは、生殖細胞のみならず、多くのがん細胞、初期発生や神経前駆細胞といった体細胞においても、L1の発現量が大きく亢進することと密接に関係している。初期発生時に転移が起こった場合、細胞間における転移場所が異なるため、臓器特異的な疾患原因になる場合もある。興味深いことに、最近の報告ではL1の高発現そのものが正常な発生の進行に不可欠であることが示唆されているが、具体的なメカニズムに関してはまだ不明な点が多く残されている。

## 3. L1の転移サイクル

L1は、RNAポリメラーゼIIによって転写され、ORF1とORF2という二つのタンパク質をコードする（図1）。RNA結合タンパク質であるORF1は、L1の転移に必須であるが、その具体的な役割はよくわかっていない。ORF2は、DNAエンドヌクレアーゼ活性と逆転写酵素活性を持つ触媒サブユニットである。ORF2の逆転写酵素ドメインは、

京都大学大学院生命科学研究科（〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町 医学・生命科学総合研究棟）

**A battleground between human retrotransposons and host factors**  
Tomoichiro Miyoshi (Kyoto University, Graduate School of Biostudies, Yoshida-Konoe-cho, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920726

© 2020 公益社団法人日本生化学会

転移因子の種類	配列構造	長さ	ゲノム中の割合 (コピー数)
L1		~6 kb	17% (516,000)
Alu		~300 bp	11% (1,090,000)
SVA		~2 kb	0.2% (2,700)
processed pseudogene		不定 (cDNA による)	? (8,000 ~ 17,000)

図1 ヒトにおいて転移可能なレトロトランスポゾンの模式図

ヒトで唯一自律的に転移するL1は、二つのタンパク質 (ORF1とORF2) をコードしている。そのプロモーターは両方向性の転写活性を有する。ORF2はエンドヌクレアーゼ活性と逆転写酵素活性を持つ。AluやSVAは、L1のORF2を利用して転移する非自律的なレトロトランスポゾンである。Aluには7SL RNAと類似の配列が重複して存在し、それぞれLeftモノマー、Rightモノマーと呼ばれ、RNAポリメラーゼIIIの転写開始に必要なA, BボックスがLeftモノマー内に存在する。processed pseudogeneは、細胞内のmRNAがL1によって転移したcDNA配列であり、イントロン配列を含まない。

テロメアDNAの合成を行う逆転写酵素テロメラーゼと高い相同性を有し、両者は共通の祖先から派生したと考えられている。翻訳されたORF1とORF2は、細胞質において自身をコードするL1 RNAに結合し、ribonucleoprotein (RNP) を形成する (図2)。ORF2はpolyAテイルを認識するため<sup>7)</sup>、低頻度ながらも他のmRNAにも結合してこれを逆転写することから、ゲノム上にはイントロンを持たないmRNA由来のcDNA (=processed pseudogene) も多数存在する。Aluは、RNAポリメラーゼIIIによって転写されるためpolyAテイルを持たないが、転写終結部位の手前に長いpolyA配列が存在し、この配列を利用して、ORF2を自身のRNAにリクルートし、転移能を保持していると予想される<sup>4)</sup>。

核内に移行したL1 RNPは、ORF2によってTに富むDNA配列上にニック (一本鎖DNA切断) を導入し、ゲノム侵入を開始する (図2)。このときL1 RNAとゲノムDNAの間で、RNA-DNAハイブリッドが形成され、DNA切断端からORF2が逆転写反応を開始する、target-site primed reverse transcription (TPRT) というモデルが知られている<sup>3,8)</sup>。しかし、TPRTを含め、転移反応の全貌はまだよくわかっていない。たとえば、L1のcDNAをゲノムに挿入するためには、ニックが存在しないもう片方の鎖を切断する必要があるが、そのヌクレアーゼは同定されていない。また、TPRT反応中間体の制御や、最終的にcDNAを連結させる

仕組みも不明である。

#### 4. L1と相互作用する宿主因子群

ヒトが出現する以前、その共通祖先において転移していたと予想される太古のL1配列のプロモーター上には、転写抑制に関わるZincフィンガータンパク質の結合配列が存在する。しかし、現生人類において活発に転移するL1のプロモーター上から、この結合配列が見事に除かれており、その転写抑制機構から逃れている<sup>9)</sup>。このようにL1を抑制する作用とこれを逃れる試み、すなわち宿主とL1との関係は進化的軍拡競争にたとえられる。これまでにL1タンパク質と相互作用する因子として、ORF1を標的とする転移抑制因子が複数単離されているが、これは自然免疫に関連した生体防御機構だと思われる<sup>10)</sup>。興味深いことに、これらの抑制因子はHIVを含むRNAウイルスの抑制にも関与する。レトロトランスポゾンとレトロウイルスを抑制する分子機構は一部共通しているようだ。

このような抑制機構とは反対に、L1の転移活性を維持する方法はあるのだろうか？ 我々は、TPRT反応を制御する宿主因子の実態を明らかにしようとORF2複合体の解析を行った<sup>11)</sup>。その結果、さまざまなクロマチン制御因子やDNA修復因子が単離された。これは、L1の転移が単一の経路で説明されるのではなく、挿入場所やタイミング

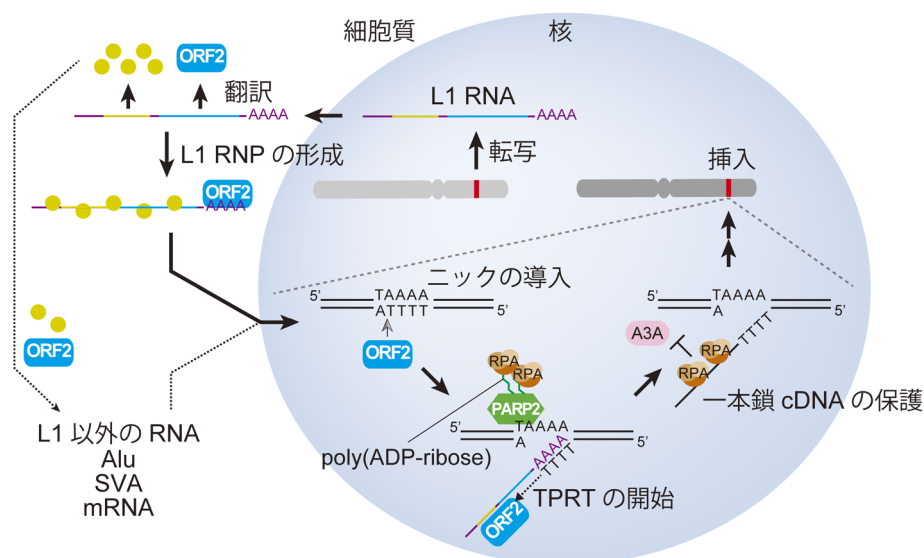


図2 L1の転移サイクルとこれを制御する宿主DNA修復因子

L1が転写された後、翻訳されたORF1とORF2タンパク質が、細胞質においてL1 RNAと複合体(RNP)を形成する。この細胞質L1 RNPを標的とする種々のL1抑制因子が単離されている。さらにL1タンパク質は、L1以外のRNA(Alu, SVA, mRNA等)とも相互作用し、転移を行う。核内に移動したL1 RNPは、ORF2によってTに富むDNA配列を切断し、ニックを導入する。切断されたDNA端からORF2の逆転写酵素活性によってcDNAが合成される。この反応機構はtarget-site primed reverse transcription (TPRT)と呼ばれる。このときTに富む配列とRNA上のpolyA配列が塩基対を形成すると考えられている。切断されたニックをPARP2が認識し、活性化されてADP-riboseを重合する。重合されたpoly(ADP-ribose)は、RPAといったDNA修復因子の集積の目印となる。本来であれば一本鎖DNAに結合するRPAだが、一本鎖DNAが露出する前段階でも、ゲノム上に集積するのではないかと予想される。これにより、迅速にTPRT中間体の一本鎖DNAを保護することが可能となるのかもしれない。さらにRPAは、A3Aのように一本鎖DNAを標的とするL1阻害因子の働きも抑制している。しかし、逆転写反応前後にはまだ不明な点が多く残されている。

グ(細胞周期)によって、それぞれ異なる制御を受けることを示唆する。今回、我々が着目したのは、抗がん剤の標的分子としても注目されるpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)ファミリーに属するPARP1とPARP2である。両者は、DNA上のニックすなわち一本鎖DNA損傷によって活性化され、ADP-riboseを重合する。このpoly(ADP-ribose)は、主にPARP1/2それ自身に付加され、他のDNA修復因子にとって目印となり、これらの因子の損傷部位への集積を促進する<sup>12)</sup>。TPRTはORF2のエンドヌクレアーゼ活性によるニックの導入から開始されるため、PARP1とPARP2が転移開始部位に直接結合することが容易に想像される。実際、エンドヌクレアーゼ活性を欠失したORF2はPARP2と相互作用しないため、PARP2はORF2によって導入されたニックを認識して結合しているようだ。一方で、PARP1はニックの有無に関わらず相互作用しており、ORF2と直接結合する可能性も考えられる。

転移をモニターするレポーター遺伝子を用いることで、L1転移頻度を測定することが可能だが、PARP阻害剤で処理した培養細胞では、転移頻度が顕著に低下していた。PARP1, PARP2をそれぞれ単独あるいは同時にノックダウンした細胞においても、L1転移頻度の低下が観察された。

すなわち、L1転移にはPARP活性が重要であり、PARP1とPARP2はともに転移に寄与していることがわかった。poly(ADP-ribose)を目印に、TPRT中間体を制御する別の因子がリクルートされるのではないかと予想し、解析を進めたところ、一本鎖DNAを保護するreplication protein A (RPA)が、poly(ADP-ribose)に直接結合することを見いだした。さまざまなRPA変異体を用いた解析から、RPAのpoly(ADP-ribose)の認識は、一本鎖DNAの結合に必須のアミノ酸残基と同一であった。つまり生体内では、RPAがpoly(ADP-ribose)と一本鎖DNAを類似の分子として認識する可能性がある。近年、poly(ADP-ribose)が核酸と類似の挙動を示すという報告が相次いでおり、今後も生体内でのpoly(ADP-ribose)の役割を詳細に調べる必要がある。前述の結果を裏づけるように、PARP2ノックダウン細胞では、RPAとORF2の相互作用は顕著に低下し、さらにRPAをノックダウンすると、L1転移頻度の低下が観察された。すなわち、ニックによって活性化されたPARP2が重合するpoly(ADP-ribose)を目印に、RPAはTPRT中間体に蓄積される。そして、逆転写反応によって合成された一本鎖cDNAが露出すると、RPAが迅速に結合し、TPRT中間体を保護するというモデルが考えられた(図2)。APOBEC3

ファミリーに属するA3Aは、L1の一本鎖cDNAを標的とする転移抑制因子として知られている<sup>13)</sup>。しかし、RPAが一本鎖DNAに結合すると、A3Aの作用は抑制されていた。これもRPAによる一本鎖DNA保護機能の一端を示すものであろう。一方で、PARP1による転移促進機構の詳細はまだ不明であり、今後の研究進展が待たれる。

一見矛盾するようだが、RPAは転移抑制因子であるA3Aとも相互作用していた<sup>11)</sup>。L1がPARPファミリーやRPAのように一本鎖DNA損傷修復経路と連携して転移する場合、この経路は、APOBEC3ファミリーのような宿主防御機構の標的にもなる諸刃の剣なのかもしれない。転写、RNP形成に加え、DNA修復経路も、宿主とL1にとって、第三の攻防の場となるのではないかと予想している。

L1相互作用分子のプロテオミクス解析を通じて、種々の核内制御因子の実態に一步近づくことができたが、新たな課題として、単一経路による制御では説明できない、多彩な制御機構の存在も浮かび上がってきた。実際、ORF2複合体として単離された因子の中から、PARPファミリーとは無関係な因子を選択してノックダウンした場合でも、L1の転移頻度が減少することを見いだしている（未発表）。進化的抑圧を経てもなおL1が転移し続けられる理由は、ある経路が宿主によって阻害されたとしても、転移に利用可能な経路が他に複数存在するためではないだろうか。

## 5. おわりに

L1は転移による挿入変異だけでなく、未解明の疾患原因となることも予想される。最近では、L1と慢性炎症との関係が注目されている。慢性炎症の表現型は、老化した組織や細胞だけでなく、L1抑制遺伝子に変異を持つ細胞においても観察され、その背景にはL1由来のcDNAが蓄積した結果、細胞質DNAセンサーが活性化され、持続的な炎症反応が促進されるためではないかと考えられている<sup>14,15)</sup>。しかしTPRTの作用機序を考慮すれば、cDNAの合成は核内で起こるはずだが、どのようなメカニズムで細胞質にcDNAが蓄積するのか不明である。あるいは細胞質においてもL1は逆転写反応を行うのであろうか？ その場合、cDNA合成開始に必要なプライマーはどこから供給されるのだろうか？ 宿主によるL1制御機構を明らかにする過程で、これらの疑問に対する答えも導き出され、疾患に対して有効な緩和手法の開発が進むことも期待される。

## 謝辞

ポストドク時代の恩師であるミシガン大学のJohn V. Moran博士、研究の機会を与えていただいた京都大学大学院生命科学科学研究科の石川冬木先生、一緒に実験を行った同大学院生の牧野竹志君、本稿について議論した同大学院生の杉野

海斗君をはじめ、研究室メンバーにこの場を借りて感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Kazazian, H.H. Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A.F., Phillips, D.G., & Antonarakis, S.E. (1988) Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, **332**, 164–166.
- 2) Moran, J.V., Holmes, S.E., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Boeke, J.D., & Kazazian, H.H. Jr. (1996) High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, **87**, 917–927.
- 3) Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H. Jr., & Boeke, J.D. (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, **87**, 905–916.
- 4) Dewannieux, M., Esnault, C., & Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat. Genet.*, **35**, 41–48.
- 5) Hanks, D.C. & Kazazian, H.H. Jr. (2016) Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob. DNA*, **7**, 9.
- 6) Muotri, A.R., Chu, V.T., Marchetto, M.C., Deng, W., Moran, J.V., & Gage, F.H. (2005) Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*, **435**, 903–910.
- 7) Doucet, A.J., Wilusz, J.E., Miyoshi, T., Liu, Y., & Moran, J.V. (2015) A 3' Poly(A) Tract Is Required for LINE-1 Retrotransposition. *Mol. Cell*, **60**, 728–741.
- 8) Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., & Eickbush, T.H. (1993) Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*, **72**, 595–605.
- 9) Jacobs, F.M., Greenberg, D., Nguyen, N., Haeussler, M., Ewing, A.D., Katzman, S., Paten, B., Salama, S.R., & Haussler, D. (2014) An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. *Nature*, **516**, 242–245.
- 10) Goodier, J.L. (2016) Restricting retrotransposons: a review. *Mob. DNA*, **7**, 16.
- 11) Miyoshi, T., Makino, T., & Moran, J.V. (2019) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Recruits Replication Protein A to Sites of LINE-1 Integration to Facilitate Retrotransposition. *Mol. Cell*, **75**, 1286–1298.e12.
- 12) Gibson, B.A. & Kraus, W.L. (2012) New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 411–424.
- 13) Richardson, S.R., Narvaiza, I., Planegger, R.A., Weitzman, M.D., & Moran, J.V. (2014) APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *eLife*, **3**, e02008.
- 14) Simon, M., Van Meter, M., Ablaeva, J., Ke, Z., Gonzalez, R.S., Taguchi, T., De Cecco, M., Leonova, K.I., Kogan, V., Helfand, S.L., et al. (2019) LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metab.*, **29**, 871–885.e5.
- 15) De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A.P., Elias, A.E., Skvir, N.J., Criscione, S.W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E.M., Boeke, J.D., et al. (2019) L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, **566**, 73–78.

## 著者寸描

## ●三好 知一郎（みよし ともいちろう）



京都大学大学院生命科学研究科准教授.  
博士（理学）.

■略歴 1999年東京工業大学生命理工  
学部卒業. 2004年同大学院生命理工学  
研究科修了. 東京大学大学院総合文化研  
究科ポスドク, ミシガン大学メディカル  
スクール人類遺伝学科ポスドクなどをへ  
て, 2015年より現職.

■研究テーマと抱負 テロメラーゼとL1  
は起源を同じくしながら, 研究人気からみれば両者はまるで光  
と影. 日の当たらない影にこそ, まだ見ぬ生命の本質が隠され  
ているのではないかという直感を信じて日々研究に取り組んで  
います.

■ウェブサイト <http://www.fish.lif.kyoto-u.ac.jp/transposon.html>

■趣味 史跡探訪, ビールに合うつまみの探索, 子供が喜ぶ芸  
の練習.