逆転写を介したゲノム再編成

—カリフラワーモザイクウイルスの生活環を中心に—

農林水産省農業生物資源研究所 高野 誠

CaMV genome is a circular and double stranded DNA. But it uses RNA (35S RNA) as a replicative intermediate and employs reverse transcriptase for genome replication. During the replication process via reverse transcription, there are some possibilities to rearrange the genome construction. Such possibilities are usually suppressed but seem to be advantageous to the evolution.

CaMV/genome structure/retrovirus/reverse transcription/template switch

はじめに

1953年に J.D. Watson と F. Crick によって DNA の 2 重らせん構造が発表されて以来 DNA 複製の研究は急速に進展し、半保存的複製モデルが普遍的な基本原理として確立されるに至った。1970年代に入るといわゆるレトロウイルスに RNA 依存 DNA ポリメラーゼ（逆転写酵素）が存在することが確かめられ、RNA ゲノムが DNA を経由して複製する RNA→DNA→RNA 複製機構の存在が明らかになった¹⁾。1980年代になって 2 種の DNA ウイルス（B 型肝炎ウイルス、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)）の複製に逆転写が関与している可能性が示され^{2),3)}、DNA を遺伝情報の本体としながらも一旦 RNA を経由して逆転写によって複製を行うという新しいタイプの複製機構が考えられるようになってきた。

本稿では 3 番目の複製機構（DNA→RNA→DNA）を持つと考えられる CaMV の生活環について概説し、逆転写を介したゲノム再編成の可能性を考えてみた。

1. CaMV の遺伝子構造

CaMV のゲノムは長さ約 8 kb の環状二本鎖 DNA であり、ウイルス粒子の中に存在している状態では特定の部位、 α (－) 鎖に 1 ヶ所 ($\Delta 1$) と β (+) 鎖に 2 ヶ所 ($\Delta 2$ と $\Delta 3$) 不連続構造を有する (図 1)。全塩基配列の解析から、 α (－) 鎖上の一方に 8 つ

の open reading frame (ORF) が同定され (図 1)、そのいくつかについては遺伝子産物の機能も同定されている⁴⁾ (表 1)。

CaMV は 2 種類の転写産物 (35S RNA, 19S RNA) を持ち、そのうち長い方の 35S RNA はすべての ORF を含んでいる (図 1)。この 35S RNA は両端に 180bp の反復配列を持ち、そのゲノム構成もレトロウイルスのゲノミック RNA に非常によく似ている (図 2)。すなわち、レトロウイルスの特徴的なゲノム構成、gag-pol-env 配列は、その遺伝子産物の機能から考えて CaMV35S RNA 上で ORFIV (コートタンパク質) -ORFV (逆転写酵素) -ORFVI (封入体タンパク質) の配列として再現されている。レトロウイルスの env 遺伝子はゲノミック RNA のスプライシングで生じたサブゲノミック RNA から翻訳される。env に相当する ORFVI もサブゲノミック RNA (19S RNA) から翻訳される。このように CaMV の ORFV 周辺のゲノム構成は逆転写を行うために都合のよい構成になっていると考えられる。

2. CaMV の転写と発現

CaMV が葉に感染するとウイルス DNA は核へ移行する。核内に存在する修復酵素によって不連続部分が修復され閉環状の supercoiled DNA になり、ヒストンと結合してミニクロモソームを形成する⁵⁾。これは host の DNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写される。

ウイルス感染細胞には主として 2 種類のウイルス RNA (19S, 35S) が見出される^{6),7)}。これらの RNA はいずれも α (－) 鎖を鋳型として、別々のプロモー

Possibility of the genome rearrangement through the reverse transcription

Makoto TAKANO

National Institute of Agrobiological Resources

図 1. CaMV DNA (Cabb-BS 株, 8024bp) の物理地図²⁰⁾
 $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ は三重鎖構造不連続部位を示す。 α は一鎖 DNA, β は二鎖を示す。➡は open reading frame (ORF) の位置 (I~VIII) とその方向を示す。内側の矢印はウイルス RNA (35S, 19S) の転写方向と転写開始、終結の位置を示す。p35s, p19s は 35S RNA および 19S RNA のプロモーター領域を示す。A はプライマー (tRNA^{Met}) の推定結合部位。

ターから転写が開始され共通の poly (A) シグナルを利用して転写が終結しポリアダニル化される (図 1)。35S RNA は CaMV DNA を一周した後転写開始点からさらに 180 ヌクレオチド下流で転写が終結するため、両端に 180 ヌクレオチドの反復配列を持つことになる。

19S RNA は ORFVI (封入体タンパク質) をコードしており, *in vitro* タンパク質合成系でも活性を示す⁸⁾。35S RNA は *in vitro* タンパク質合成系の鋳型とはならず⁷⁾ ORFVI 以外の遺伝子がどのようにして翻訳されるのか不明である。しかし *in vivo* では 35S RNA が polycistronic mRNA として機能すると考えられる。こ

のような polycistronic な翻訳はこれまで真核生物ではみつかっていないが, 最近 ORFVII の下流に cat 遺伝子をつないだレポータープラスミド⁹⁾, ORFVI の翻訳産物の共存下で dicistronic に翻訳されることが報告された⁹⁾。電子顕微鏡による形態的観察¹⁰⁾ と合わせると, リボソームあるいは 35S RNA が封入体タンパク質と相互作用することにより, polycistronic な翻訳が可能な形に修飾されるという可能性が考えられる。

Takatsuji らは ORFV 遺伝子を酵母の発現ベクターにクローニングし, 活性を持った逆転写酵素を発現させるのに成功している¹¹⁾。量塩基配列から推定される ORFV 遺伝子産物の分子量は 78kD なのに対して, ウイルス粒子から精製した酵素や酵母で発現した酵素の分子量は約 60kD であった。一方大腸菌で発現させた ORFV 遺伝子産物の分子量は 78kD であったが, このタンパク質には酵素活性が検出されず不活性な前駆体タンパク質であると考えられる。レトロウイルスでは gag 遺伝子と pol 遺伝子の間にコードされている Asp プロテアーゼが gag-pol 融合タンパク質のプロセシングに関与することが明らかになっている¹²⁾。CaMV でも最近, ORFV の N 末端側に存在するプロテアーゼドメイン (図 2) から活性を持った Asp タイプのプロテアーゼが発現し, それがコートタンパク質や逆転写酵素のプロセシングに関与することが示唆された¹³⁾。また ORFV 遺伝子の 5' 側 (N 末端側) をプロセシングに相当する長さだけ欠失させて大腸菌で発現させると活性を持つ酵素が発現することも実証され (Takatsuji, *et al.* 投稿中) レトロウイルスと同様の post-translational な発現調節機構の存在が示唆された。

3. CaMVDNA の逆転写による複製

35SRNA は両端に 180 ヌクレオチドの反復配列を持つが, この他にも逆転写に必要とされる特徴的な構造を備えている。まず 5' 末端から約 600 ヌクレオチド下流 (α (一) 鎖 DNA の $\Delta 1$ にあたる位置) には小麦

表 1⁴⁾

ORF	Frame	遺伝子産物の分子量 (KD)	遺伝子産物の機能
I	3	41-46	全身的な感染に関与
II	1	18	昆虫伝播性
III	2	15	DNA 結合タンパク質
IV	1	44, 37	コートタンパク質
V	2	62, 58, 22, 18	逆転写酵素, プロテアーゼ
VI	3	62-66	封入体タンパク質
VII	3		?
VIII	2		?

図2. CaMV, Rous sarcoma virus (RSV) のゲノム構成 (文献20より改変)

—: ゲノミック RNA ■: 末端反復配列 ~: スプライシング *: スプライシングサイト
 □: gag ■: pol ■: env □: 構造あるいは調節遺伝子 P: リン酸化タンパク質 ○: RNA 結合ドメイン ▽: プロテアーゼドメイン ▼: 逆転写酵素ドメイン ◇: インテグラーゼ

図3. CaMV DNA の逆転写による複製モデル²⁰⁾

の tRNA^{Met} の 3' 末端配列に完全に相補的な配列が存在し^{14),15)}, 逆転写の際のプライマー結合部位と考えられる。また $\Delta 2$, $\Delta 3$ の不連続領域に対応する部分にはレトロウイルスの (+) 鎖 DNA 合成のプライミング部位に特徴的なポリプリン配列が見出される^{14),15)}。このような構造をもとに図 3 のような逆転写を介した複製モデルが想定された。複製の経路はこのように説明されるが、これらの反応が実際に感染細胞の中でおこっている状況を考えると事情はもう少し複雑である。

35SRNA は逆転写の鋳型となるが、自分自身を逆転写するための装置を作り出す mRNA としても機能している。そしてこの 2 つの機能は 1 つの分子について同時には成立しないため、時間的あるいは空間的に使い分けられている筈である。レトロウイルスでは逆転写の鋳型となるゲノミック RNA をウイルス粒子中に隔離してこの問題を解決している。CaMV でも逆転写酵素活性がウイルス粒子に結合した形で検出されている¹⁶⁾。またレトロウイルスの gag タンパク質にみられる RNA 結合モチーフが CaMV のコートタンパク質にも存在し、実際に RNA を結合することが確かめられている¹⁷⁾。したがって CaMV でも逆転写はウイルス粒子内でおこっていると考えられる。

4. 逆転写を介したゲノム再編成の可能性

CaMV は DNA ウイルスでありながら、一旦 RNA に転写され逆転写によって DNA ゲノムを再構成するという複雑なプロセスを経て複製する。そのために複製の過程でゲノム構成に変異がおきる可能性のあるプロセスがいくつか予想される。

まず DNA から転写された RNA は host の mRNA と同様にスプライシングされ得る。Hirochika らは CaMV-S 株で高頻度に観察される部位特異的な欠失変異が、鋳型 RNA のスプライシングによることを明らかにしている¹⁸⁾。また、イントロンを持ったソラマメのレグヘモグロビン遺伝子を ORFII に挿入すると、複製の過程でイントロンが正確にスプライシングされることも示された¹⁹⁾。

逆転写の過程でも jumping の段階 (図 3 参照) で組み換えによる欠失や重複がおこり得ることが容易に予想される。また template switch による外来 mRNA の取り込みも考えられる。筆者らは、CaMV DNA と pBR322 由来のプラスミドを同時感染させた時、ゲノム DNA の一部がプラスミドの Amp^r 領域と置き換わったウイルスを検出した (Hayashi *et al.* 投稿中)。変異領域の近傍には相同な配列が認められないことか

ら、この組み換えは template switch による可能性がある。template switch は同じ極性を持つ 35SRNA と mRNA との間でおきるため、in frame になった時には mRNA の持つ情報をも取り込むことが可能であり、遺伝情報の多様化にとって重要な機構と考えられる。

このように逆転写を介した複製機構はその過程にゲノム再編成の可能性を秘めているが、実際にはこのような変異はほとんど検出されていない。鋳型となる RNA のみをウイルス粒子内にパッケージし逆転写の場を細胞質から隔離することにより、このような変異がおきる可能性を排除しているものと考えられる。但しこのような、ゲノム構造や遺伝情報の変異に対して寛容な複製機構は、環境の変化に適応できる遺伝的冗長性を潜在的に産生し続けていることになり、CaMV の進化にとっては有利に作用してきたと考えられる。

ショウジョウバエや酵母のレトロトランスポゾンの転移機構や、processed gene, snRNA 遺伝子、ヒトゲノムの反復配列などの派生機構にも逆転写が関与していることが明らかになってきている。したがって逆転写を介した複製機構は CaMV や B 型肝炎ウイルスのゲノム複製に特異的な機構ではなく、真核生物における遺伝情報の増幅や多様化にも極めて重要な位置を占めていると考えられる。

最後に、本稿の執筆の機会を与えてくださった池田穰衛博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) *RNA tumor viruses* (ed. by Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., and Coffin, J.) (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 2) Varmus, H. (1983) *Nature* **304**, 116-117.
- 3) Hohn, T., Hohn, B., Pfeiffer, P. (1985) *TIBS* **10**, 205-209.
- 4) Gordon, K., Pfeiffer, P., Fütterer, J., Hohn, T. (1988) *EMBO J.* **7**, 309-317.
- 5) Menissier, J., De Murcia, G., Hirth, L. (1983) *EMBO J.* **2**, 1067-1071.
- 6) Covey, S. N., Lomossoff, G. P., Hull, R. (1981) *Nucleic Acid Res.* **9**, 6735-6747.
- 7) Guilley, H., Dudley, R. K., Jonard, G., Balázs, E., Richards, K. (1982) *Cell* **30**, 763-773.
- 8) Xiong, C., Muller, S., Lebeurier, G., Hirth, L. (1982) *EMBO J.* **1**, 971-976.
- 9) Bonneville, J. M., Sanfaçon, H., Fütterer, J., Hohn, T. (1989) *Cell* **59**, 1135-1143.
- 10) Shepherd, R. J. (1976) *Adv. Virus Res.* **20**, 305-339.
- 11) Takatsui, H., Hirochika, H., Fukushi, T., Ikeda, J. -E. (1986) *Nature* **319**, 240-243.
- 12) Miller, M., Jaskólski, M., Mohana Rao, J. K., Leis, J., Wlo-

- dawer, A. (1989) *Nature* **337**, 576-579.
- 13) Torruella, M., Gordon, K., Hohn, T. (1989) *EMBO J.* **8**, 2819-2825.
- 14) Guilley, H., Richards, K. E., Jonard, G. (1983) *EMBO J.* **2**, 277-282.
- 15) Pfeiffer, P., Hohn, T. (1983) *Cell* **33**, 781-789.
- 16) Volovitch, M., Modjtahedi, N., Yot, P., Brun, G. (1986) *EMBO J.* **3**, 309-314.
- 17) Feutterer, J., Hohn, T. (1987) *TIBS* **12**, 92-95.
- 18) Hirochika, H., Takatsuji, H., Ubasawa, A., Ikeda, J.-E. (1985) *EMBO J.* **4**, 1673-1680.
- 19) Hohn, B., Balazs, E., Ruegg, D., Hohn, T. (1986) *EMBO J.* **5**, 2759-2762.
- 20) 池田穰衛(1988) 細胞工学 **7**, 199-210.

たかの まこと

1955年生まれ。1983年京都大学農学研究科博士課程修了。1986年より現職。大学院修了後、いろいろなテーマを転々とし、現在は35S プロモーターの転写制御領域を解析中。趣味はジョギング。お昼休みになると足は自然にグラウンドに向かい、研究室の皆からジョグホリックと言われています。目標はsub 3。でもまだ道は遠い。

☎ 0298-38-7007

次号予定内容

(Vol.30 No. 4 / 通巻 170号)

巻頭言	向畑 恭男
総説	ホモポリペプチド鎖のβ構造形成の速度論
	病原体表面抗原の進化
	ハエ味覚器の糖受容蛋白質
	記憶シナプスの可塑性とインパルス頻度 ——ATP, アデノシンの役割——
トピック	細菌べん毛の分子構造とべん毛形成にともなう フラジェリンの構造変化
	無脊椎動物の視細胞のセカンドメッセンジャーは イノシトールの3リン酸か?
	タンパク質細胞内小胞輸送における NSF タンパク質の役割
	麻酔剤にレセプターは存在するか?
実験技術	光学顕微鏡によるナノメートル精度での運動の解析
談話室	古い予稿集を提供して下さい—事務局について考える—
研究室紹介	ジョンス・ホプキンス大学医学部・Pollard 研を中心に