真核細胞の遺伝子発現と介在配列の生物学的意義[†]

添田 栄一

(国立遺伝学研究所)

昭和55年5月8日投稿受理

I. はじめに

原核細胞の mRNA は、遺伝子から連続して転写された構造をもつが、真核細胞の事実上の mRNA である細胞質 RNA は、DNA 鎖上をところどころ飛び越え転写されたような構造をとる。このことは、真核細胞の遺伝子が mRNA として表現されない部分（介在配列 intervening sequence）を断続的にもつことを意味する。換言すれば、遺伝子が蛋白に翻訳されるコード領域と、翻訳されない非コード領域を交互に繰り返されたモザイク状構造をとっていることにもなる。介在配列は1遺伝子当り1~7カ所以上あり、その長さは10~8000塩基対以上に及ぶ。真核細胞 DNA の大部分が非コード領域であり、そのうち、かなりの部分を介在配列が占めると予想される。このように遺伝子内に広範、かつ、普遍的に存在する介在配列の生物学的機能については不明な点が多かった。種間の遺伝子構造の比較においても、DNA 塩基配列の相同性（ホモロジー）の程度は、コード領域と比較し、決して高いとはいえなかった⁽¹⁾。したがって、介在配列を進化上の遺物的存在として見なされる傾向にあった^(2,3)。これに対し、最近の一連の研究結果は、介在配列の除去（スプライス）は mRNA が核から細胞へ移り、蓄積するために必要であることを示した。そして、ウイルスをベクターとし、組み込まれた真核細胞遺伝子の発現では、これを無視し特定の蛋白をつくらせることは不可能であることもわかった。本稿では、SV 40, ポリオーマなど小型腫瘍ウイルスを中心に真核細胞の介在配列の意義を論じたい。

II. 動物ウイルスと真核細胞の遺伝子発現

今日、SV 40, ポリオーマ, アデノウイルスなど小型 DNA 腫瘍ウイルスを用いた実験が広く行われているが、この理由の1つとして、これらのウイルスが比較的単純な遺伝子構成をもち、真核細胞での遺伝子発現を調べる簡便なモデル系となりうるからである。幸い、この系で得られた実験結果は、真核細胞で観察されたものとことごとく一致する。むしろ、真核細胞で不可能に近かった動的解析をこの系で実現できたと言ってもよい。

SV 40, ポリオーマが細胞に感染すると、細胞質 mRNA の5~10%以上に及ぶウイルス性 mRNA が現われる。その RNA の5'末端にはキャップ (5' MeGpppXp) がつき、先導配列 (leader sequence) と呼ばれる非コード領域が続く。この後には開始暗号 AUG に始まり終了暗号で終るコード領域 (body) があり、アミノ酸配列の鋳型となる。そして、3'末端側には再び非コード領域と、最後にポリアデニル酸が伸びている。これは真核細胞共通に見られる mRNA の特徴であるが、原核細胞 mRNA と比べると、鋳型となる DNA の一次構造を直接反映しておらず、mRNA にところどころ欠失している点が異なっている。この構造は DNA と mRNA のハイブリッド形成を行えば、mRNA の欠失した部分は単鎖 DNA の「こぶ」として現われ、いわゆる R-loop を形成する。この単鎖部分を取り除く特異的酵素ヌクレアーゼ S1 を用いれば残った DNA 部分を遺伝子地図上に位置づけることができる (S1 マップ法)⁽¹¹⁾。ポリオーマの初期遺伝子は3種類の癌蛋白を同一遺伝子部位からコードする重複遺伝子である^(4~11)。これはコード領域内に長さの異なった介在配列があり⁽¹¹⁾、スプライスによって coding frame のずれた3種類の mRNA ができる。この結果、これらの癌蛋白のN末端は共通のアミノ酸配列をもっているが、C末端側は異なったアミノ酸配列となっている。後期遺伝子からはウイルス外殻蛋白である VP-1,

[†] Implication of Intervening Sequence in Eucaryotic Gene Expression
Eiichi SOEDA (The National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411)
(Received May 8, 1980)

図1 ポリオーマウイルス後期遺伝子の構成⁽¹³⁾

上段に制限酵素 Hpa II, Hinf I, Hind III の切断点をポリオーマ遺伝子地図上に記した。下段の3つの線は後期 mRNA と遺伝子 DNA の位置を比べた。蛋白のコード領域は太線で、非コード領域は細線で表わしている。黒丸印はキャップ構造をもつ位置である。スプライスによって除去され、細胞質 mRNA に見られない介在配列部分を点線で示している。

VP-2, VP-3 がつくられる⁽¹²⁻¹⁶⁾。前期とは異なり後期遺伝子は先導配列とコード領域間に介在配列をもつ⁽¹⁷⁾(図1)。ただし、VP-1 と VP-3 の介在配列は VP-2 の N 末端からのコード領域として使用されている。VP-2 の mRNA は VP-1 と VP-3 の mRNA の全領域を覆うが、VP-2 の mRNA からは VP-1, あるいは VP-3 を生成することはない。mRNA の先導配列部分の構造は複雑である。たとえば、VP-2, VP-3 の mRNA の 5' 末端は不ぞろい (heterogeneous) であり、DNA に存在する短い配列が mRNA 部分から除かれていたり、1 度しか見られない DNA の塩基配列が 3~5 回 mRNA に出現する^(14,18,19)。この部分の DNA に変異をもつウイルスの亜株、変異株は数多く単離されている。ただし、子ウイルスの増殖は変異によって影響されない⁽²⁰⁾。

一方、真核細胞の核には hnRNA (heterogeneous nuclear RNA) と呼ばれる不均一で巨大な RNA が蓄積している。細胞質の mRNA と異なり、DNA と相補性をもつ正確なコピーであり、スプライスをうけていない。SV 40, および、ポリオーマの感染細胞の核内には、ウイルス DNA より数倍長い RNA が存在する。鎖の長さは不均一であり、その 5' 末端にキャップをつけ、ウイルス DNA の複製原点付近から転写されている。あるものは、3' 末端にポリアデニル酸をつけているが、それ以外は DNA からの完全な転写物である。また、核からはウイルス環状 DNA と結合した RNA ポリメラーゼ II 複合体 (viral transcriptional complex, 以下 VTC と略) が、中性変性剤ザルコシール処理によって遊離してくる。VTC の RNA ポリメラーゼは、すでに転写を開

始し、RNA 鎖の伸長を行っている途中のものであり、抽出の過程でウイルス DNA と人為的に結合したものでない。このことは以下の理由によって明らかにされた⁽²¹⁾。すなわち、ウイルス感染後、細胞質にみられる前期と後期の mRNA は DNA の別々の鎖から転写されるため、RNA ポリメラーゼが環状のウイルス DNA をどの方向に転写するかを調べることにより、前、後期どちらの mRNA の転写を行っていたかを知ることができる。そして、前、後期の mRNA の割合はウイルス感染細胞の DNA 複製を境に逆転するが、右回りと左回りの VTC の割合は、これと一致して変化していたからである。VTC の RNA ポリメラーゼは RNA 合成の前駆体を加えれば、環状 DNA を数回転写し、鋳型の DNA より長い RNA をつくる。ウイルス感染細胞の核にもこれと似た構造をもつ RNA が存在する。なお、核 RNA を *in vitro* の蛋白合成系に加えても、細胞質 mRNA と異なり、十分な腫瘍抗原、ウイルス外殻蛋白をつくることはできない⁽²²⁾。

以上の結果はウイルスの核内 RNA が真核細胞における hnRNA に相当し、細胞質の mRNA の前駆体になりうることを示している。そして、ここで得られたいくつかの知見をまとめれば、1) ウイルスの遺伝子発現は転写の開始段階で質的、量的な制御がなされていること。2) いったん核で RNA の転写が開始されれば、鋳型の DNA と完全に相補構造を持つ RNA が生成されるが、mRNA よりも数倍の鎖長を持つ。3) この RNA は 1 つの蛋白をコードできる mRNA の前駆体としての単位に切断され、切断点である 5' にはキャップがつき、

図 2 介在配列を欠く SV 40 の変異株の作製⁽²⁴⁾

他端の 3' 末端にはポリアデニル酸が伸びる。4) この前駆体 RNA から介在配列部位が除去され、蛋白合成の鋳型となる mRNA が細胞質に蓄積する。このウイルスで得られた細胞質 mRNA の形成過程 (processing) は真核細胞で得られた結果となら矛盾する部分はない。むしろ真核細胞での mRNA の processing の作業仮説を支持する根拠の一部として役立っている。

III. 介在配列部位の DNA を欠くウイルス変異株

SV 40 の前期遺伝子の large T に対する介在配列部位は small T の C 末端側半分のコード領域 (0.54~0.59 遺伝子単位間) である。この部位の DNA の 15-163 塩基対を欠くいくつかの変異株が人為的につくられ、総称し dl 54/59 と呼ばれる。この DNA 欠失は small T の分子量減少を招き、あるいは生成そのものに影響する。ただし、large T は正常につくられ、子ウイルスを増殖できる。ただし、介在配列の両端から 10 塩基対以内の DNA が削られると、large T も生成されなくなる。

SV 40, ポリオーマウイルスの後期遺伝子はウイルスのコート蛋白 VP-1, VP-2, VP-3 を生成する。VP-2, VP-3 の C 末端と VP-1 の N 末端は異なった coding frame で重複している。この重複は SV 40 は 113 塩基対であり、ポリオーマウイルスは 29 塩基対である^(13,23)。Gruss ら⁽²⁴⁾は SV 40 の VP-1 遺伝子の介在配列部位を完全に除く方法を開発し、除去による遺伝子発現への影響をみた。すなわち、VP-1 の介在配列部位の DNA と、それと隣り合ういくつかの部分制限酵素により除去す

る。この DNA 分解物を逆転酵素 (reverse transcriptase) のプライマーとし、感染細胞の細胞質にある VP-1 の mRNA を鋳型とすれば mRNA と同じ DNA をつくることができる。前期遺伝子の温度感受性変異株 tsA をヘルパーに使い、高温でこの DNA を感染させると、DNA は増幅され、ウイルス粒子として得ることができる。この変異株は dl 2350 と名づけられた。塩基分析の結果は VP-1 遺伝子の介在配列部位はきれいに除去され、VP-1 の mRNA と一致した塩基配列を持つことを示した (図 2)。したがって、この変異株 DNA は、他の外殻蛋白 VP-2, VP-3 の N 末端からのコード領域がほぼ除去されていることにもなる。dl 2350 と SV 40 の ts 変異株との相補性試験では、large T に関する前期 ts 変異株 A 28 との混合感染ではウイルス粒子を形成する。VP-1 を ts にする後期変異株 tsD とは相補性を示さなかった。dl 2350 の感染細胞が正常な VP-1 をつくっていないことは、さらに抗血清を使って実験でも確かめられた。では、介在配列を除去された変異株の遺伝子発現はどの段階で阻止されたのであろうか？ まず mRNA の存否が問われるが、S1 マップ法によれば、同変異株の感染細胞では VP-1 に相当する mRNA は検出されない。次に転写が開始されたかどうかについては mRNA の前駆体となる核の hnRNA を採り出せばよいが、hnRNA は核に微量しか存在せず、技術的に困難である。幸い、SV 40 の感染系では、中性変性剤ザルコシルによって核から SV 40 DNA-RNA ポリメラーゼ II 複合体を単離できる。dl 2350 の感染細胞からの複合体を抽

出し、活性を調べると野生株の感染細胞と同等の活性が得られ、しかも、転写されている RNA は VP-1 の mRNA と同じ DNA 鎖に由来していた。以上のことは、この変異株の後期遺伝子の転写はすでに開始されていたが、それ以後の段階で VP-1 mRNA が細胞質に現われることをはばまれていたと解釈された。最近、dl 2350 の先導配列部位にマウス β グロビンの介在配列を含む DNA を挿入することによって、VP-1 の mRNA が出現することが報告されている⁽²⁹⁾。また、マウスの α グロビン状の遺伝子は介在配列を完全に欠き、コード領域にフレームシフトが起っている。したがって、この遺伝子は発現できないといわれる^(30,31)。

IV. SV 40 をベクターとする真核細胞遺伝子 DNA の発現

インシュリン、生長ホルモン、ソマトスタチンの生産をプラスミッド、 λ ファージ等の原核細胞系で試みられた実験が記憶に新しい。他方、真核細胞系のベクターとして SV 40 が注目されている。この理由として、1. SV 40 の遺伝子構成は比較的単純であり、遺伝子のそれぞれの機能もよく理解されていること。2. ウイルスが細胞に感染したとき、ウイルス DNA は約 1 万倍に、ウイルス性 mRNA の約 5~10% を占める等、遺伝子発現が増幅されること。3. 真核細胞の遺伝子構成は原核細胞とは異なることが最近明らかにされているため、真核細胞の遺伝子発現は真核細胞系のベクターでのみ行われるという期待感があることなどであろう。SV 40 の感染細胞ではウイルス遺伝子の直接産物の 80% は VP-1 である。Mulligan ら⁽²⁵⁾は VP-1 遺伝子の機能的特徴を巧みに利用し、原核細胞の系で行われた方法を採用した。すなわち、ウサギ β グロビン mRNA から cDNA をつくり、大腸菌で増幅した後に VP-1 コード領域に phase を合せ挿入した。この組換え DNA をサル細胞に感染させると、SV 40 と β グロビンの雑種 mRNA が細胞質に検出され、 β グロビンの分子量と一致する蛋白が検出された。この蛋白は β グロビンの抗血清と免疫反応を行い、トリプシン分解で生じるペプチド 10 個のうち、8 個は β グロビンのそれと一致した。ただし、この蛋白は感染細胞中では不安定であった。Hamer ら⁽²⁶⁾は VP-2 のコード領域にウサギ β グロビンの cDNA を挿入し、蛋白の生成を試みたが、感染細胞では微量のグロビンの生成しか検出されなかった。そこで、彼ら⁽²⁷⁾は cDNA

の代りにマウスの β グロビン遺伝子 DNA を VP-2 遺伝子内に挿入した(図 3)。マウス遺伝子 DNA は 116 塩基対と 646 塩基対の 2 カ所に介在配列を含む。その他 3' 末端にマウス β グロビンの非コード領域とポリアデニル酸伸長に関する認識部位を含む。この SV 40-マウス β グロビンの雑種 DNA をサル腎細胞に感染させ、mRNA の構造を調べると、SV 40 と β グロビン遺伝子の介在配列部分は除かれ、蛋白合成の鋳型となるグロビン mRNA の生成が見られた。この mRNA は 2 種類ある。1 つは β グロビン mRNA のポリアデニル酸部位で終わった mRNA と、他はそこを越え VP-2 のポリアデニル酸部位で終わった mRNA である。この β グロビン遺伝子 DNA を逆に SV 40 DNA に挿入したとき、スプライスもポリアデニル酸の伸長もおこらない。つまり、これらの 2 つの機能を発現させるためにはパリンドローム型でない認識部位が DNA に存在することと、ネズミの遺伝子がサルの細胞で発現されるため、これらの発現の種特異性はかなり低いことを示している。

以上のことから、核 hnRNA の介在配列部位の除去(スプライス)は mRNA が細胞質に安定に蓄積するために必要であるが、この反応の種特異性は低いことがわかった。このことは組換え体の中の異種 DNA の形質発現のためには、ベクター側の介在配列を使う代りに、挿入した異種 DNA 側の介在配列を利用できることを示している。幸い、SV 40 の先導配列部分は遺伝子の発現に関係しないので、この部位に任意に組み込んだ異種 DNA を細胞に感染させれば、RNA 合成開始のプロモーターは SV 40 の後期遺伝子のものを、介在配列は挿入した異種 DNA のものを使い、遺伝子発現が行えることになる。Hamer ら⁽²⁸⁾はマウス β グロビン遺伝子 DNA を SV 40 後期遺伝子の先導配列部位に phase を合せず挿入した。この組換え体 DNA を SV 40 の tsA 変異株をヘルパーとし、高温で雑種ウイルスの増殖を行った後に、再びサル腎細胞に感染させた。そして感染細胞の細胞質には、多量の β グロビン由来の mRNA が蓄積され、ウイルス外殻蛋白に匹敵する量のマウス β グロビンの生成をみた。

V. おわりに

昨年の夏、米国 NIH のアレルギーと感染病研究所の組換え DNA 研究室を訪ねた。NIH の組換え DNA 実験の規制緩和後の実情視察と共同研究のためであった。当研究室は癌ウイルスポリオーマのゲノム DNA を λ フ

図 3 SV40・マウスβグロビン組換え DNA とその mRNA⁽²⁸⁾

上段は細線は SV40 DNA の後期遺伝子地図である。この上に DNA 複製開始点 (ORI), mRNA のキャップ (CAPS), ポリ A の伸長点 (TAIL) を印した。β グロビン遺伝子 DNA は太枠で表わした。この中の黒枠はコード領域であり、点の部分は介在配列部分である。mRNA の表示は DNA に準じている。ただし、スプライスにより除去される部分を点線で、キャップの位置を黒丸、ポリ A 部分を波線、非コード領域を細線で表わしている。

ァージ、あるいはプラスミッドに挿入し、大腸菌で増殖させた後、組換え体、および組換え DNA の安全性を調べた。この結果に基づき、組換え実験規制の大幅な緩和がなされた。「ポリオーマの発癌遺伝子をもった大腸菌を、あらゆる角度から調べ、その安全性を確認してきた。この結果は、他のほとんどの組換え実験に適用できるであろう」と主任の Martin 博士は自信をもって語ってくれた。事実、当研究室ではなんら特別の設備を用いず、現在日本で禁止されている DNA 腫瘍ウイルス、C 型 RNA 腫瘍ウイルスのクローニングが行われ、遺伝子操作が通常の生化学実験の 1 つの技術として日常化されていた。種を越えた遺伝子をもつ新生物の創生は単なる危惧にすぎなかったことを、その後の実験結果は示している。

本稿で述べたように、原核細胞と真核細胞の遺伝子構成や発現機構は根本的に異なる。真核細胞遺伝子に普遍的に存在する介在配列を例にとっても、これを除去し、蛋白翻訳へ導く機構は大腸菌にはない。まして、遺伝子発現の制御部分の構造に関しては、原核、真核細胞間の共通性を見出すのも困難である。ただし、この系は微量の異種 DNA を増幅し、分離純化する方法として優れている。このことは、増幅した DNA が宿主ベクターを介し、他の種へ転移する可能性を生じてくる。とりわけ、発癌遺伝子のような病原性に関与する遺伝子が、大腸菌系の組換え体を通し、ヒト細胞へ転移し、癌等の病害を誘

発する可能性がでてくる。この疑問に対する完全な解答はない。ただ、大腸菌あるいはプラスミッド系のポリオーマの組換え実験では、発癌性は全くなかったと云ってよい。

組換え実験技術の開発によって、微量の DNA を純化、増幅し、この構造解析を行うことは容易になった。残る問題は挿入された異種 DNA から多量の蛋白をつくらせることである。NIH で若い Hamer と部屋を共にし、彼から SV40 β グロビン遺伝子組換え DNA をサル細胞に感染し、生成された蛋白の電気泳動像を見せられたとき、ただ、あ然とさせられるのみであった。いくつかの蛋白のバンドのうち、最も濃いバンドがネズミ β グロビンであった。しかも免疫反応といった前処理もなく、細胞の粗抽出液にウイルス外殻蛋白に相当する量の異種蛋白が生成されていた。おそらく、これは異種の高等動物遺伝子が、遺伝子操作によって発現された、最も成功した 1 つの例として数えられるであろう。

米国 NIH への資料調査および「ICRF 小型 DNA 腫瘍ウイルス会議」出席のため、日本農芸化学奨励会より派遣費の補助を授かった。

- (1) J. van den Berg, A. van Ooyen, N. Mantei, A. Schamböck, G. Grosveld, R. A. Flavell and C. Weissman: *Nature*, **273**, 37 (1978).
- (2) W. Doolittle: *ibid.*, **272**, 581 (1978).

- (3) J. Darnell : *Science*, **202**, 1257 (1978).
- (4) E. Soeda, J.R. Arrand, N. Smolar, J.E. Walsh and B.E. Griffin : *Nature*, **283**, 445 (1980).
- (5) E. Soeda and B.E. Griffin : *ibid.*, **276**, 294 (1978).
- (6) E. Soeda, J.R. Arrand, N. Smolar and B.E. Griffin : *Cell*, **17**, 357 (1979).
- (7) E. Soeda, J.R. Arrand and B.E. Griffin : *Nucleic Acids Res.*, **7**, 839 (1979).
- (8) Y. Ito : *Virology*, **98**, 261 (1979).
- (9) T. Friedman, A. Esty, P. LaPorte and P. Deininger : *Cell*, **17**, 75 (1979).
- (10) 添田栄一, 伊藤嘉明 : 蛋白質・核酸・酵素, **24**, 1067 (1979).
- (11) J. Favaloro, R. Treisman and R. Kamen : "Method in Enzymology, Nucleic Acid and Protein Synthesis," Vol. 65, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1980, p. 718.
- (12) E. Soeda : *Nucleic Acids Res. Symp. Series*, **6**, s 157~160 (1979).
- (13) E. Soeda, J.R. Arrand and B.E. Griffin : *J. Virol.*, **33**, 606 (1980).
- (14) J.R. Arrand, E. Soeda, J.E. Walsh, N. Smolar and B.E. Griffin : *ibid.*, **33**, 619 (1980).
- (15) P. Deninger, A. Esty, P. LaPorte and T. Friedman : *Cell*, **18**, 771 (1979).
- (16) R. Hewick, A.L. Mellor, A.E. Smith and M.D. Waterfield, *J. Virol.*, **33**, 619 (1980).
- (17) R. Kamen, J. Favaloro, J. Parker, R. Treisman, A. J. Flavell, A. Cowie and S. Legon : "Differentiation," 印刷中.
- (18) A. J. Favell, A. Cowie, S. Legon and R. Kamen : *Cell*, **16**, 357 (1979).
- (19) S. Legon, A. J. Flavell, A. Cowie and R. Kamen : *ibid.*, **16**, 373 (1979).
- (20) B.E. Griffin and C. Meddock : *J. Virol.*, **31**, 645 (1979).
- (21) P. Galiglio and S. Mousset : *FEBS Lett.*, **56**, 149 (1975).
- (22) R. Kamen, T. Wheeler and A.E. Smith : *Virology*, **89**, 461 (1978).
- (23) R. Rogiers, A. van de Voorde, E. Soeda and W. Fiers : *Eur. J. Biochem.*, **85**, 205 (1978).
- (24) P. Gruss, C.-J. Lai, R. Dhar and G. Khoury : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 71 (1979).
- (25) R. C. Mulligan, B. H. Howard and P. Berg : *Nature*, **277**, 108 (1979).
- (26) D. H. Hamer, K. D. Smith, S. H. Boyer and P. Leder : *Cell*, **17**, 725 (1979).
- (27) D. H. Hamer and P. Leder : *ibid.*, **17**, 737 (1979).
- (28) D. H. Hamer and P. Leder : *Nature*, **281**, 35 (1979).
- (29) D. Gruss and G. Khoury : *ibid.*, **286**, 634 (1980).
- (30) Y. Nishioka, A. Leder and P. Leder : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 2806 (1980).
- (31) E. F. Vanin, G. I. Goldberg, P. W. Tucker and O. Smithies : *Nature*, **286**, 222 (1980).