

今さら聞けない逆転写酵素の基礎知識

木庭 獵達

タンパク質の合成量は転写レベルで制御されていることが多く、mRNA発現量の変化を調べることによって推測できる。これを調べる方法としてノーザンブロット法やRT-PCR法があるが、特に後者は手軽にできる感度の良い方法である。最近では、リアルタイムPCRが当たり前のように普及し、定量的な遺伝子発現解析も可能になっている。ご存知の通り、RT-PCRのRTは逆転写(reverse transcription)を意味し、通常のPCRの前に逆転写酵素を用いたRNAからcDNAへの変換という過程を要する。PCRには、超好熱菌から単離されたDNAポリメラーゼが利用されているのに対し、逆転写酵素はレトロウイルスで発見され、実際に*in vitro*でのcDNA合成に利用され始めたのは1980年代からである。

「レトロウイルス」といえば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)やヒトTリンパ球向性ウイルスなどが有名だが、ヒト以外にもサル、ネコ、マウス、トリなどのさまざまな動物にレトロウイルスは存在する。これらは宿主を免疫不全状態したり、血液のがんを発症させたりと、何だかヤバそうという印象が一般的だが、本稿では病原体としてではなく実験ツールとしてのレトロウイルスに関して述べたい。レトロウイルスは宿主細胞に侵入すると、自身のゲノムRNAをDNAに変換する。ウイルス複製機構に関しては話がズレるので詳しく述べないが、このDNA合成の際に、レトロウイルスは自身の逆転写酵素を利用している。ここで特筆すべきことは、逆転写酵素は一般的に知られているDNAポリメラーゼと比較してDNA合成の正確性が低いという点である¹⁾。また、ウイルス種によってもその正確性に差異が認められ、特にHIVの逆転写酵素によるDNA合成では変異が生じやすい。HIVのゲノムサイズは約10,000塩基弱であるが、1度のゲノム合成に約6か所で塩基置換が起こるようだ²⁾。一見、「おいおい、そんなテキトーな感じで大丈夫なのかよ!」と思われるかもしれないが、この杜撰さ(変異率の高さ)はHIVにとっては逆に有利に働く。変異率の高さが子孫ウイルスの多様性を高め、宿主免疫系からの回避や薬剤や抗体に対する耐性の獲得といった利点が生じるからである。少々話が逸れてしまったが、いずれにせよHIVの逆転写酵素はDNA合成の精度が恐ろしく

低いと考えられる。一方で、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)やモロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)の逆転写酵素のDNA合成精度は比較的高い正確性を示す³⁾。そのため、これらのウイルスの逆転写酵素は市販のcDNA合成キットによく含まれている。

当初、逆転写反応における問題点としてあげられたことは、逆転写酵素の熱安定性の低さであった。RNAは基本的に一本の鎖であるが、長くなると折れ曲がって立体構造を作ることがある。RNAが立体構造を作るとcDNA合成の反応が止まってしまうことから、立体構造から一本の鎖の状態に戻すために、可能であれば高温で逆転写反応を行うことが望ましい。しかしながら、熱に不安定な逆転写酵素を高温で反応させることは困難であったため、先人たちは逆転写酵素中に存在する複数のアミノ酸残基に変異を導入するなど、いろいろと試行錯誤を繰り返すことで野生型酵素よりも高い熱安定性を与えた⁴⁾。最近では複数のメーカーにおいて、AMVやMMLVの改良型逆転写酵素が多く販売されており、cDNAの合成技術は飛躍的に進歩している。熱安定性の改善以外にも、幅広い鋳型RNAを標的とするのか、長鎖や複雑な立体構造をなすRNAを標的にするのかなど、目的とする鋳型の特徴に応じた改良型酵素が市販されているので、それぞれの実験に最適な酵素を選択することをお勧めしたい。

本稿では、逆転写酵素の性質とその発展の歴史について簡単に述べてきたが、レトロウイルスを含む複数のウイルス種は遺伝子導入やタンパク質発現の際の目的遺伝子の運び屋として利用されており、遺伝子の機能解析のための手法としても重要な役割を担っている。本来であれば、我々の敵とみなされていたウイルスであるが、他の微生物よりもゲノムサイズが小さく、単純な構造を有するということが実験ツールとして扱ううえで好都合であるといえるのかもしれない。

- 1) Battula, N. and Loeb, L. A.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4 (1976).
- 2) 佐藤裕徳ら: ウイルス, **55**, 221 (2005).
- 3) Ji, J. and Loeb, L. A.: *Biochemistry*, **31**, 954 (1992).
- 4) Arezi, B. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **400**, 301 (2010).