

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08098

研究課題名(和文)トランスポゾンの構造崩壊と再活性化機構の解明

研究課題名(英文)Structural decay and reactivation mechanism of transposons

研究代表者

伊藤 雅信 (Ito, Masanobu)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：60221082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポゾンの長期的運命の解明のため、ショウジョウバエのP因子をモデル系として集団内挙動と転移調節について調査した。その結果、P因子は水平伝播の直後から構造崩壊しつつ集団へ速やかに拡散すること、および転移制御には卵の細胞質に蓄積するある種のpiRNA量が重要であり、この生産にはオス親ゲノム由来のP因子が大きく関与すること、などを明らかにした。トランスポゾン利用技術の基盤形成のため、キイロショウジョウバエの野外集団中で他のP因子よりも顕著にコピー数が多いKP因子の構造に着目し、新規ベクターを構築した。KP因子3'側の内部欠失周辺構造が転移後の修復率を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在トランスポゾンと宿主の進化的競争が展開中であるショウジョウバエのP因子に注目し、侵入の初期動態を解析した。トランスポゾン侵入後の構造変化(崩壊)の様態、および不活性化に關与するトランスポゾン-宿主間相互作用の分子実体の解明が進んだ。複数の新規遺伝子導入ベクターを構築した。既存のP因子ベクターに比べて高い導入率を示す構造的条件がほぼ明らかになった。医薬品開発や有用物質などの生産を目的とした遺伝子導入操作における大幅なコスト削減と作業時間の短縮を通じて、昆虫機能利用技術の進展にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)： P elements were demonstrated to exist in *D. simulans* isofemale lines established in Japan in 2008 and later. Some lines can induce intensive gonadal dysgenesis in *D. simulans* at 29 °C. An astonishingly rapid spreading of transposons was suggested in new gene pools. In addition, we demonstrated that the level of P-element piRNAs is one of the determinants for the P-M hybrid sterility and that both of the piRNA-cluster-embedded P elements and the transcriptionally active KP elements from the paternal genome play important roles in suppression of P element activities. Expression levels of the P element piRNA and KP element mRNA vary among F1 progeny due to the constitution of the paternal genome in *D. melanogaster*. P elements vectors having the 3' structure of KP element showed higher rates of introduction to both of the individuals and culture cells. This suggests that the nucleotide sequence around the deficiency point of KP element would be involved in the higher rate.

研究分野：遺伝学、進化遺伝学

キーワード：トランスポゾン 転移因子 ショウジョウバエ 水平伝播 P-Mシステム Pエレメント P因子 piRNA

1. 究開始当初の背景

(1) 真核生物のゲノムに例外なく存在するトランスポゾン（転移因子、動く遺伝子）は、ゲノム内を転移して自身のコピーを増やすとともに、ときに種の壁を越えて別種の遺伝子プールに侵入する（水平伝播）。トランスポゾンは、離脱/挿入が周辺遺伝子に及ぼす影響などを通して、ゲノムの可塑性や進化に深く関連しているが、侵入の初期におけるトランスポゾンのコピー数の増加や構造の変化、および宿主の転移抑制機構についてはほとんど解明されていない。

(2) 現在トランスポゾンは遺伝子組換えベクターとして広く利用されている。しかし転移抑制や再活性化のメカニズムには不明な点も多く、用いたトランスポゾンベクターの構造と導入遺伝子の長期安定性の関係を実験的に検証した研究はない。

2. 研究目的

(1) 真核生物のゲノム可塑性や進化と深い関連がうかがわれるトランスポゾンの長期的運命の解明のため、水平伝播により新たな遺伝子プールに侵入した直後の経時的構造変化（構造崩壊）の過程を明らかにする。

(2) トランスポゾンの利己的な振る舞いは、個体の適応度に必ずしも寄与しない。宿主-トランスポゾン間の進化的競争関係の包括的理解を目指し、トランスポゾンの転移調節メカニズムを解明する。

(3) トランスポゾン利用技術の基盤形成のため、構造多型間の転移効率および安定性の差異を明らかにし、新規遺伝子導入ベクターを構築する。

3. 研究方法

(1) 最近新たな種に侵入（水平伝播）を果たしたショウジョウバエの P 因子に注目し、コピー数の変動、構造の崩壊、転移が宿主個体に及ぼす遺伝的影響を、ゲノム PCR、遺伝子導入、交配実験などにより多面的に解析した。

(2) P 因子の転移抑制能力に大きな幅を示す複数のキイロショウジョウバエ系統を材料として、次世代シーケンサーによる RNA-seq、RT-PCR などの手法により、転移調節における piRNA の関連を調査した。

(3) キイロショウジョウバエ P 因子の多型に着目し、これらの構造的特徴を持った新規ベクターを構築した。これらを培養細胞ならびにショウジョウバエ個体に導入

し、転移効率と転移後ギャップ修復の比較から、高い遺伝子導入効率を備えたベクター構造を探った。

4. 研究成果

トランスポゾン長の長期的運命の解明、およびトランスポゾン利用技術の基盤形成のため、ショウジョウバエのP因子をモデル系として、以下の成果を得た。

(1) オナジショウジョウバエに侵入したP因子の解析：2003-2015年に樹立された日本各地集団のP因子の構造多型を明らかにした。日本集団に侵入（2006年以降2008年以前と推定される）以来、P因子が盛んに転移し、構造崩壊による多型化が進行していることが明らかになった。しかし、オナジショウジョウバエには、キイロショウジョウバエのゲノムで高い占有率を示すKP因子は、検出されなかった。また、その他の不完全型因子の中にも、高い占有率を示すものはなかった（図1）。構造多型化は侵入した種ごとに異なる様相を示すことが示唆された。さらに、福岡集団のゲノムから完全型P因子をクローニングし、挿入位置を決定することに成功した。対馬集団や彦根集団には、高い転移誘導能力を持つP系統が見られ、キイロショウジョウバエと同様、温度感受性（29℃以上）のメス不妊を高頻度で誘発することを示した（Yoshitake et al., 2018）。P因子を含め、トランスポゾンの水平伝播はこれまで考えられたより頻繁に起きていること、および水平伝播後は極めて速やかに遺伝子プールに拡散することが示された。

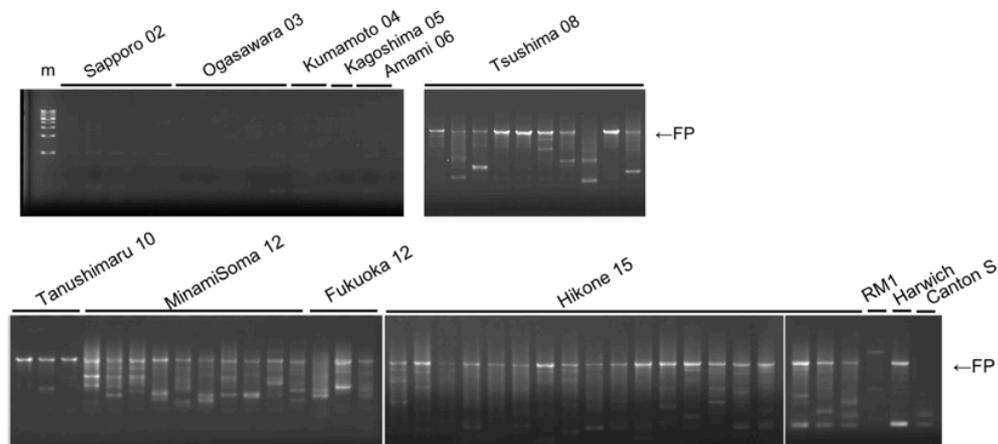


図1 P element の *D. simulans* 日本集団の侵入

(2) P因子の転移制御と piRNA の関連調査：P-Mシステムにおいて様々な変異を持つショウジョウバエ系統を用い、次世代シーケンサーによるRNA-seq、RT-PCRなどの

手法により P 因子の転移誘導と転移制御の能力に関する調節因子を調査した。その結果、野外集団において P 因子の転移制御の決定に卵細胞質に蓄積するある種の小分子 RNA (piRNA) の量が密接に関与することを明らかにした (Wakisaka et al., 2017) 。また、この小分子 RNA の生産には、オス親ゲノムに由来する P 因子が重要な役割を担うことを示した (Wakisaka et al., 2018) 。

(3) 放射性物質が遺伝子に与える影響とトランスポゾンの関連：福島第 1 原発事故によって環境中に拡散した放射性物質が及ぼす遺伝的影響の調査に関連して、福島周辺キイロショウジョウバエ集団における逆位染色体の頻度、および P 因子の転移活性を調査した。福島集団の新規および全地球偏在型逆位染色体の頻度は、いずれも 2011 年以降大きく変動していないことを明らかにした。放射線被曝による P 因子の活性化、およびこれに関連した突然変異率の変化は検出されなかった (Itoh et al., 2018) 。

(4) 新規遺伝子導入ベクターの開発：キイロショウジョウバエの P 因子は、完全型因子の部分欠損により様々な構造多型が生じている。このうち野外集団において顕著にコピー数の増加が知られる KP 因子の構造に着目して、新たに 6 種のベクターを構築した。それぞれに GFP 遺伝子を組み込んでショウジョウバエ培養細胞に導入し、蛍光量によってコピー数を推定した。その結果、6 世代後の安定株中コピー数に、既存

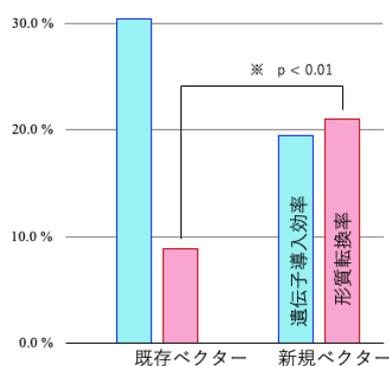


図2 ベクター間の形質転換率の比較

ベクターと比較して有意な差が生じた。KP 因子の 3 ‘側に存在する内部欠失周辺構造が転移後の修復率の向上に寄与し、コピー数が増加した可能性が示唆された。個体への導入実験の結果もこれを支持した (図 2)。(投稿準備中)

<引用文献>

- ① Yoshitake, et al. (2018) The *P* element Invaded Rapidly and Caused Hybrid Dysgenesis in Natural Populations of *Drosophila simulans* in Japan. *Ecology and Evolution* 8: 9590-9599.
- ② Wakisaka et al. (2017) Diversity of *P* 2 element piRNA production among M' and Q strains and its association with P-M hybrid dysgenesis in *Drosophila*

melanogaster. Mobile DNA 8: 13.

- ③ Wakisaka et al. (2018) Association of zygotic piRNAs derived from paternal *P* elements with hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA 9:7.
- ④ Itoh et al. (2018) Frequencies of chromosome inversions changed in *Drosophila melanogaster* after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant Accident. PLoS ONE 13(2): e0192096.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Yoshitake, Y., Inomata, N., Sano, M., Kato, Y., and Itoh, M. (2018) The *P* element Invaded Rapidly and Caused Hybrid Dysgenesis in Natural Populations of *Drosophila simulans* in Japan. Ecology and Evolution 8: 9590-9599. (doi.org/10.1002/ece3.4239).
- ② Wakisaka, K. T., Ichianagi, K., Ohno, S., and Itoh, M. (2018) Association of zygotic piRNAs derived from paternal *P* elements with hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA 9:7. (doi.org/10.1186/s13100-018-0110-y)
- ③ Itoh, M., Kajihara, R., Kato, Y., Takano-Shimizu, T., and Inoue, Y. (2018) Frequencies of chromosome inversions changed in *Drosophila melanogaster* after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant Accident. PLoS ONE 13(2): e0192096. (doi.org/10.1371/journal.pone.0192096).
- ④ Wakisaka, K. T., Ichianagi, K., Ohno, S., and Itoh, M. (2017) Diversity of *P* element piRNA production among M' and Q strains and its association with P-M hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*. Mobile DNA 8: 13. (doi.org/10.1186/s13100-017-0096-x)

[学会発表] (計6件)

- ① Rumi Kondo, Mutsumi Oda, Yusaku Yoshitake, and Masanobu Itoh (2019) Early stage of *P* element invasion and hybrid dysgenesis in natural populations of *Drosophila simulans* in Japan. SMBE2019, Barriers and drivers of evolutionary innovation by horizontal gene transfer. SMBE19-871.
- ② Yusaku Yoshitake, Mutsumi Oda, Mai Sano, Nobuyuki Inomata, Rumi Kondo, Yasuko Kato, and Masanobu Itoh (2018) Rapid invasion of *P* element in *Drosophila simulans* in Japan. Japan Drosophila Research Conference 13

(JDRC13)

- ③ 佐野まい・桑原巴愛・猪股伸幸・加藤容子・伊藤雅信 (2018) オナジショウジョウバエに導入したKP因子の挙動と機能 日本遺伝学会第90回大会
- ④ 織田睦、吉武祐作、伊藤雅信、近藤るみ (2018) 日本のオナジショウジョウバエ自然集団における転移因子P-ELEMENTの動態調査 第41回日本分子生物学会年会
- ⑤ 伊藤雅信・猪股伸幸・吉武祐作・佐野まい・加藤容子 (2017) 転移因子Pエレメントのオナジショウジョウバエ日本集団への急速な侵入 日本遺伝学会第89回大会
- ⑥ 脇坂啓子・一柳健二・大野聖子・伊藤雅信 (2017) キイロショウジョウバエにおける父性P因子由来の接合子 piRNA と雑種交配不全との関連 日本分子生物学会 第40回日本分子生物学会年会<2017年度生命科学系学会合同年次大会>

[その他])

ホームページ

所属大学 HP (<http://www.bio.kit.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：加藤容子

ローマ字氏名：Kato Yasuko

所属研究機関名：京都工芸繊維大学

部局：応用生物学系

職名：助教

研究者番号：10534373