

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570002

研究課題名 (和文) レトロトランスポゾンの挿入多型と植物ゲノムの多様化の解析

研究課題名 (英文) Insertion polymorphism of retrotransposons and diversity of the plant genome

研究代表者

大坪 久子 (OHTSUBO HISAKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：20158801

研究成果の概要：

1. シロイヌナズナ第3染色体ペリセントロメア末端のヘテロクロマチン領域について、塩基配列の微細構造解析から Lys-tRNA 合成酵素遺伝子の「重複」がまず起きたこと、「重複」したその iso-遺伝子の分岐年代の推定から、重複がアラビドプシゲノムの大規模再編成と同時期(50～75MYA)に起きたこと、倍加した iso-遺伝子の偽遺伝子化の年代計算から、iso-遺伝子は偽遺伝子化した後、レトロトランスポゾン、トランスポゾンの度重なる挿入によってヘテロクロマチン化したと考えられる。

2. イネのレトロトランスポゾン、*RIRE7*は低メチル化状態で発現が上昇するレトロトランスポゾンで、イネ染色体セントロメア領域に局在する。インド型と日本型イネ系統間で多型をしめす *RIRE7-TU1* について、*RIRE7*の両 LTR 上と隣接領域のメチル化パターンを解析、*RIRE7*挿入の有無によって対応領域のメチル化のパターンの変化を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：トランスポゾン・多型・ゲノム多様化・ゲノム構築・進化

1. 研究開始当初の背景

レトロトランスポゾンは種類も構造も多様性に富み、ゲノムに占める割合も高く、生物種を通じて普遍的に存在している。ゲノムプロジェクトの進展にともない、全ゲノム配列がほぼ決定されたシロイヌナズナとイネの系では、レトロトランスポゾンが、セントロメアやペリセントロメア領域を構成するヘテロ

クロマチンの主要要素であることが明らかになってきた。これらの系では、種の内外を問わず多様な系統が揃っており、各系統間では、しばしばレトロトランスポゾンの挿入多型が観察される。系統間に多型が存在することは、そのレトロトランスポゾンの挿入が系統の分岐後に起きたことを示しており、系統分化の過程におけるゲノムの多様化を反映したもの

である。特に LTR レトロトランスポソンの場合、二つの LTR に蓄積された置換変異数からその挿入年代を推定できる利点がある。すなわちレトロトランスポソンによる宿主ゲノムの多様化を進化の時系列で把握できる最適の系である。我々は、イネのセントロメア領域に局在する LTR レトロトランスポソン、*RIRE7* の発現量がゲノム DNA の低メチル化にともなって著しく増大することを見いだした。また、シロイヌナズナの第 3 染色体ペリセントロメア領域末端に存在する Lys -tRNA 合成酵素遺伝子のホモログが、レトロトランスポソンの度重なる挿入によってヘテロクロマチン化していることを観察している。本研究はそれら二つのヘテロクロマチン領域を対象に、「植物ゲノムの多様化」の過程をレトロトランスポソンの挿入多型とゲノムの重複を手がかりとして解析するものである。

2. 研究の目的

本申請研究ではヘテロクロマチン領域を形成するレトロトランスポソンに着目し、その領域における系統間の多型とその動態を解明する。具体的には(1)シロイヌナズナの第3染色体ペリセントロメア領域に存在する Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の偽遺伝子化に、レトロトランスポソンがどのようにかかわってきたか、その領域の微細な構造解析と挿入年代の推定から明らかにする、さらにシロイヌナズナの近縁種から遠縁種に至る系統について Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の重複の有無を調べ、ついでレトロトランスポソンの挿入多型の有無を明らかにする。

(2)イネセントロメア領域に局在し、DNA の低メチル化状態で高い発現量を示すレトロトランスポソン (*RIRE7*) に着目し、低メチル化による自身とその周辺領域のメチル化の変化を解析する。同時に、野生イネと栽培イネにおいて *RIRE7* の挿入多型を示す座位を複数見だし、*RIRE7* の挿入の有無が周辺領域のメチル化に及ぼす影響を解析する、

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ第3染色体ペリセントロメア末端領域における Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の偽遺伝子化とそこに挿入されたレトロトランスポソンの挿入年代の測定

多数のレトロトランスポソンが挿入された Lys -tRNA 合成酵素遺伝子は、重複遺伝子の片割れである。このヘテロクロマチン領域の形成には、Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の「重複」が先立っており、そこに多数のトランスポソン、レトロトランスポソンが挿入されて

ヘテロクロマチン化されたと考えられた。塩基配列を元に微細構造を解析したのち、挿入されたレトロトランスポソンの両 LTR 間の塩基置換数を測定、各の LTR レトロトランスポソンの挿入以来の年齢を推定した。塩基置換数を「レトロトランスポソンの年齢」に置き換えるための分子時計の構築は、レトロトランスポソンが挿入された Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の重複領域 (iso-gene) における同義置換率を、重複元の Lys -tRNA 合成酵素遺伝子 (パラログ)、トマトの Lys -tRNA 合成酵素遺伝子 (オーソログ) の配列を外群として、シロイヌナズナとトマトの分岐年代 (112~156 Myrs) を基準に算出する方法をとった。この部分は分担者の田村が担当した。

(2) イネレトロトランスポソン、*RIRE7* の発現と DNA メチル化の解析

イネのトランスポソン、レトロトランスポソンを載せたマクロアレイを用いた実験の結果では、低メチル化状態で最も発現が上昇するのはイネのセントロメアに多く局在するレトロトランスポソン *RIRE7* であった (発表準備中)。本研究では、日本晴 (ジャポニカ系統) 第 10 染色体セントロメア近傍に存在するレトロトランスポソン *RIRE7-TU1* について、その 5' LTR と 3' LTR 配列、および隣接配列を対象として Bisulfite sequencing 法を用いて、シトシンのメチル化部位とメチル化の種類 (CG, CHG or CHH) を明らかにした。メチル化酵素欠損イネ変異体 (MET2、農水省・広近氏より供与) DNA についても、低メチル化によるサイレンシングの解除にともなう LTR とその近傍の DNA メチル化の状態を解析した。また、レトロトランスポソン挿入の有無によるその領域のメチル化のパターンの変化を知る目的で、対応する座位に挿入のないインデカ系統 (IR36) についても、同様にシトシン残基のメチル化の解析を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ第3染色体ペリセントロメア末端領域における Lys -tRNA 合成酵素遺伝子の偽遺伝子化とそこに挿入されたレトロトランスポソンの挿入年代の測定

シロイヌナズナの PAC クローン K11J14 (全長 90627 bp) は、第 3 染色体上のセントロメアから 1 Mb 離れたペリセントロメアに存在する。このクローン上には散在性反復配列である gypsy 型レトロトランスポソンが 9 個、copia 型レトロトランスポソンが 4 個、non-LTR 型レトロトランスポソン (LINE) が 1

個、En/Spm、Ds タイプを含む DNA 型トランスポゾンが 5 個、さらに、未同定の配列が 1 個存在することが分かった。多くの因子（トランスポゾン、レトロトランスポゾンを指す）は重層構造をとっており、挿入順序が特定できた。これらの因子の合計は 86039 bp で、クローン K11J14 のうちの 95% を占めることがわかった。これらの因子を除外した配列は、その相同性から Lys-tRNA 合成酵素 (LysRS) の iso 遺伝子であることがわかった。いくつかの因子は isoLysRS 遺伝子の intron のみならず exon 内にも挿入されていることから、この iso 遺伝子は重複されたのちに、完全に不活性化されたと考えられる。現在発現している Lys-tRNA 合成酵素遺伝子は、同じ第 3 染色体上に存在するが、「重複」したその iso-遺伝子の分岐年代の推定から、両遺伝子の重複がアラビドプシスゲノムの大規模再編成とほぼ同時期 (50 ~ 75MYA) に起きたと推定された。倍加した iso-遺伝子の偽遺伝子化の年代計算から、iso-遺伝子は偽遺伝子化した後、トランスポゾンの度重なる挿入によってヘテロクロマチン化したと推定された。挿入されたレトロトランスポゾンの両 LTR 間の塩基置換数を測定し、塩基置換数を「レトロトランスポゾンの年齢」に置き換えるための分子時計の構築は、レトロトランスポゾンが挿入された Lys-tRNA 合成酵素遺伝子の重複領域 (iso-gene) における同義置換率に基づいて計算した。すなわち、重複元の Lys-tRNA 合成酵素遺伝子 (パラログ)、トマトの Lys-tRNA 合成酵素遺伝子 (オーソログ) の配列を外群とし、シロイヌナズナとトマトの分岐年代 (112 ~ 156 Myrs) を基準にして算出した (田村が分担)。

(2) イネレトロトランスポゾン、RIRE7 の発現と DNA メチル化の解析

RT-PCR による低メチル化状態における RIRE7 の発現解析

トランスポゾンマクロアレイによる解析の結果、ゲノムのメチル化が低下したときに、発現が上昇する LTR レトロトランスポゾンが数種見つかったが、セントロメア近傍に局在する RIRE7 もそのひとつであった。このマクロアレイの実験結果は、実際に、5aza-cytidine (低メチル化剤) 処理をしたイネ培養細胞 (0c) およびイネ低メチル化変異体由来の転写産物を用いた Northern blot、RT-PCR 解析からも確認された。RT-PCR 解析の場合、カルス、植物体いずれにおいても、コントロール (未処理あるいは野生型) に比して 10 倍以上の RIRE7 転写産物の増加が確認さ

れた。

第 10 染色体セントロメア近傍に存在する RIRE7-TU1 の DNA メチル化パターンの解析

RIRE7-TU1 について、5' LTR と 3' LTR 配列、および上流側、下流側の隣接配列を対象として、Bisulfite sequencing 法を用いて、シトシンのメチル化部位とメチル化の種類 (CG, CHG or CHH のどの C がメチル化されるか) を調べた。解析はジャポニカ (日本晴)、その低メチル化変異体 (Osj-met2) および対応する領域をもつインディカ (IR36) のゲノム DNA を用いて行った。

なお、インディカ (IR36) のゲノム DNA では、標記の座位に RIRE7-TU1 が挿入されておらず、両者のメチル化パターンを解析することで、RIRE7-TU1 の挿入の有無による周辺領域のメチル化パターンの相違を示すこととなる。すなわち、RIRE7-TU1 が挿入されているジャポニカ (日本晴) の場合、上流域および下流域のメチル化の度合いは、ともに RIRE7-TU1 LTR と同様にメチル化されているが (CG: 90% 以上、CNG: 70% 以上、CHG: 約 20%)、インディカ (IR36) の場合、そのメチル化度は、上流域では低く、下流域では変わらないという結果が得られた。TU1 の場合、標記の結果であったが、他の染色体領域に存在する RIRE7 (TU2, 3, 4etc) の場合、両 LTR 内部についても、その隣接領域についても、必ずしも TU1 と同じメチル化の度合いとパターンが得られたわけではない。周辺に存在するトランスポゾンやレトロトランスポゾンによっても、メチル化のパターンが影響を受けている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Chen H, Samadder PP, Tanaka Y, Ohira T, Okuizumi H, Yamaoka N, Miyao A, Hirochika H, Ohira T, Tsuchimoto S, Ohtsubo H, Nishiguchi M. OsRecQ1, a QDE-3 homologue in rice, is required for RNA silencing induced by particle bombardment for inverted repeat DNA, but not for double-stranded RNA. Plant J. 2008, 56:274-86.

2. Tsuchimoto, S., Hirao, Y., Ohtsubo, E., and Ohtsubo, H. New SINE families from rice, *OsSN*, with poly(A) at the 3' ends. *Genes Genet. Syst.* 83: 227-236 (2008)

3. Kumar S, Nei M, Dudley J, and Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences Briefings in Bioinformatics 9:299-306 (2008)

4. Tanaka, M., Kiyohara, A., Takasu, A., Kishima, Y., Ohtsubo, H. and Sano, Y. Rice transposable elements are characterized by various methylation environments in the genome. BMC Genomics 8, 469 (2007)

5. Xu, J. H., Cheng C., Tsuchimoto, S., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. Phylogenetic analysis of *Oryza rufipogon* strains and their relations to *Oryza sativa* strains by insertion polymorphism of rice SINEs. *Genes.Gent. Syst.* **82**: 217-229 (2007)

〔学会発表〕(計6件)

1. H. Ohtsubo, S. Tsuchimoto, C. Cheng, J. Xu, M.Y. Kondo, N. Kurata, T. Miyabayashi, E. Ohtsubo. "SINE Code" is an excellent tool for identification of *Oryza* species. In OBC 5 on "Speciation and Adaptation - Ecological Genomics of Model Organisms and Beyond -" March, 2007, Okazaki

2. 西村啓士郎、土本 卓、大坪栄一、大坪久子: アブラヤシの新規レトロトランスポゾン、*Ya3*ファミリーの同定と挿入多型解析. 日本遺伝学会第79回大会、2007年9月、岡山、

3. 大坪久子、田村浩一郎、大坪栄一: シロイヌナズナ Lys-tRNA synthetase 遺伝子の倍加と偽遺伝子化およびヘテロクロマチン化. BMB2007 ワークショップ 4W18, 2007年12月、神戸

4. 大坪久子、田村浩一郎、大坪栄一: シロイヌナズナ Lys-tRNA 合成酵素 遺伝子の重複、偽遺伝子化、ヘテロクロマチン化. 日本遺伝学会第80回大会、2008年9月、名古屋

5. Tamura, K. (2008) Does comparative genomics really tell us about Darwinian selection? 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同年会. 2008年12月、神戸

6. 田村浩一郎: MEGA4による分子系統解析. 日本進化学会第10回大会、2008年8月、駒場

〔図書〕(計1件)

Ohtsubo, H., Tsuchimoto, S., Xu, J. H., Cheng, C., Kondo, M.Y., Kurata, N. and Ohtsubo, E.: Rice retroposon, *p-SINE* and its use for classification and identification of *Oryza* species. In "Rice Biology in the Genomics Era" in the Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry, eds. A. Hirai, T. Sasaki, Y. Sano, and H. Hirano, Springer, Heidelberg, Germany (2008)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 久子

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

(2) 研究分担者

田村 浩一郎

首都大学東京・都市教養学部・准教授

(3) 連携研究者

なし