

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15692

研究課題名（和文）レトロトランスポゾンによる家畜化関連遺伝子の発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of domestication-related gene expression by retrotransposons

研究代表者

下出 紗弓（Shimode, Sayumi）

広島大学・ゲノム編集イノベーションセンター・助教

研究者番号：90772103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、イエネコの家畜化関連遺伝子発現に与えるレトロトランスポゾンの影響を明らかにしようとするものであった。

先行研究で同定したRDRS C2aは内在性レトロウイルス（ERV）の一つであり、すべてのイエネコが保有している。RDRS C2aはネコ属の一部ではWDR4遺伝子にオーバーラップしており、その他のネコ科動物では保持されていないことがわかった。RDRS C2aのLTRは強いプロモーターを維持することが明らかになった。また、ERVの多くはDNAメチル化により不活化されているが、RDRS C2aの5'LTRはDNAメチル化されておらず、周辺遺伝子のプロモーターとして機能す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

本研究は、イエネコの家畜化関連遺伝子発現に与えるレトロトランスポゾンの影響を明らかにしようとするものであった。現在までイエネコの家畜化メカニズムを明らかにした報告はない。本研究結果の波及効果として、動物の家畜化にはどういった遺伝子発現制御機構の変化が必須であったか、種を超えた家畜化メカニズムの解明の足掛かりとなることが期待される。家畜化メカニズムの解明は、品種改良においても有用な基盤となり畜産業へも寄与する。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine the effect of retrotransposons on domestication-related gene expression of domestic cat.

RDRS C2a is endogenous retrovirus (ERV) and is located on the domestic cat's chromosome C2 and overlaps with WDR4. WDR4 and its surrounding sequences were highly conserved in the genome of the other Felidae species, but RDRS C2a was found only in a part of Felis.

RDRS C2a LTR had strong promoter activity. Most ERVs are inactivated by DNA methylation, but CpG sites in 5' LTR of RDRS C2a are hypomethylated, suggesting that it can be an promoter of its neighboring gene.

研究分野：ウイルス学

キーワード：内在性レトロウイルス レトロトランスポゾン ゲノム ネコ 家畜化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの家畜化された哺乳類には、穏やかな性格、短い口吻、白斑など共通の特徴がみられ、これら一連の表現型の変化は“家畜化症候群”と呼ばれる (Darwin, 1868; Wilkins et al., 2014)。イエネコにも家畜化症候群の特徴がみられるがその獲得メカニズムは不明である。

哺乳類ゲノムの約 40%はレトロトランスポゾンと呼ばれる転移因子である (Gregory, 2005)。レトロトランスポゾンの多くは不活化されているが、一部はプロモーター・エンハンサー活性を維持し、周辺の宿主遺伝子の発現変化をもたらす。研究代表者は、先行研究において、イエネコで保持されているレトロトランスポゾン的一种である **RDRS C2a** を同定していた。本研究では、このことに着目し、レトロトランスポゾンがイエネコにみられる家畜化症候群に寄与した可能性を明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、イエネコおよび大型ネコ科動物におけるレトロトランスポゾンのエンハンサー・プロモーター活性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) **RDRS C2a** の座位についての *in silico* 解析

内在性レトロウイルス (**ERV**) はレトロトランスポゾン的一种である。イエネコゲノムには **RDRS C2a** と呼ばれる **ERV** が保持されていることを先行研究で明らかにしていた。本研究課題では、新しく公開されたイエネコの全ゲノムデータ (アビシニアン **Felis catus 9.0** およびアメリカンショートヘア **AnAms1.0**) を対象とし、**RDRS C2a** の座位を特定した。また、イエネコ以外のネコ科動物の全ゲノムデータおよびショットガンシーケンスデータを対象とし、**RDRS C2a** の有無を調べた (表 1)。

表 1

通称	学名	リファレンスゲノム
イエネコ	<i>Felis catus</i>	<b>Felis_catus_9.0</b>
イエネコ	<i>Felis catus</i>	<b>AnAms1.0</b>
クロアシネコ	<i>Felis nigripes</i>	<b>PISY01053803.1</b>
ツシマヤマネコ	<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>	<b>BIMV02037717.1</b>
ジャガランディ	<i>Puma jagouarondi</i>	<b>JACEOH010000032.1</b>
チーター	<i>Acinonyx jubatus</i>	<b>QURD01000063.1</b>
ヨーロッパオオヤマネコ	<i>Lynx pardinus</i>	<b>CAAGRJ010006181.1</b>
カナダオオヤマネコ	<i>Lynx canadensis</i>	<b>mLynCan4_v1.p</b>
カラカル	<i>Caracal caracal</i>	<b>JACGTZ010000250.1</b>
ライオン	<i>Panthera leo</i>	<b>PanLeo1.0</b>
ジャガー	<i>Panthera onca</i>	<b>PISV01007697.1</b>
ヒョウ	<i>Panthera pardus</i>	<b>Panpar1.0</b>

#### (2) **RDRS C2a LTR** のルシフェラーゼアッセイ

ネコ腎臓由来株化細胞である **CRFK** 細胞から **RDRS C2a** の **LTR** を **pGL3-Basic vector (Promega)** にクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った。**HEK293T** 細胞を **24-well plate** に播種し、**Lipofectamine 2000 (Invitrogen)** によりレポータープラスミド (**30 ng**)、内部コントロールとなる **pRL-TK vector (3 ng)** を共導入した。トランスフェクション 1 日後、**Dual-Glo Luciferase Reporter Assay Sytem (Promega)** によりルシフェラーゼ活性を測定した。このとき、プロモーター・エンハンサー配列を有さない **pGL3-Basic vector** を陰性対照、**SV40** のプロモーター・エンハンサー配列を有する **pGL3-Control vector** を陽性対照とした。**DNA** メチル化がプロモーター・エンハンサー活性に及ぼす影響を評価するため、レポータープラスミドから **LTR** 部分を切り出し、**M.SssI methyltransferase (NEB)** により *in vitro* メチル化処理を行った。*in vitro* メチル化処理した断片と線状化したベクターを **T4 ligase** により結合し、ルシフェラーゼアッセイに供した。

(3) RDRS C2a のバイサルファイトシーケンス

ネコの株化細胞(ネコ全胎子由来細胞 **fcwf-4** 細胞、ネコ胎子由来線維芽細胞 **FER** 細胞、**CRFK** 細胞)および初代培養細胞(ネコ骨格筋細胞 **FSkMC**)からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトシーケンスにより **RDRS C2a** の DNA メチル化状態を調べた。抽出したゲノム DNA は **EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo Research)** によりバイサルファイト処理し、**RDRS C2a** の 5' LTR および 3' LTR を含む断片を増幅するよう PCR を行った。このとき、片側のプライマーを LTR の隣接領域、もう片側のプライマーを **RDRS C2a** の内部領域に設計することで、座位特異的な PCR を可能とした。得られた PCR 産物は **pCR4-Blunt-TOPO (Invitrogen)** にクローニングし、シーケンス解析を行った。シーケンス解析については **QUMA** ソフトウェア (<http://quma.cdb.riken.jp>) を使用した。

4. 研究成果

(1) RDRS C2a の座位についての *in silico* 解析

イエネコゲノムにおいて、**RDRS C2a** は **C2** 染色体上の **WDR4** 遺伝子にオーバーラップしていることがわかった(図1)。**WDR4** 遺伝子は 5 種類の転写バリエーションを保有するとされるが、そのうち **WDR4-201** のイントロン 1、に位置していた。ネコ科動物において、**WDR4** 遺伝子やその周辺配列については保存されていたが、**RDRS C2a** をもつのは、イエネコ、クロアシネコのみ、先行研究の結果を合わせると、ネコ属の一部でのみであった(図2)。

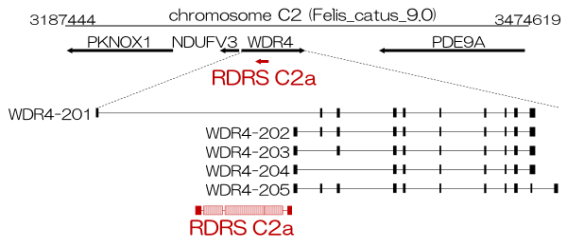


図1 イエネコゲノムにおけるRDRS C2aの座位

(2) RDRS C2a LTR のルシフェラーゼアッセイ

**RDRS C2a** の 5' LTR および 3' LTR にはプロモーターモチーフである **TATA box** や **CAAT box** が位置していた(図3)。**TFBIND** による検索の結果、**AML1** や **NFkB** など複数の転写因子結合部位が同定された。

ルシフェラーゼアッセイの結果、**RDRS C2a** の LTR は双方向性のプロモーター活性を示した(図4)。このプロモーター活性は DNA メチル化により減弱する傾向がみられた。

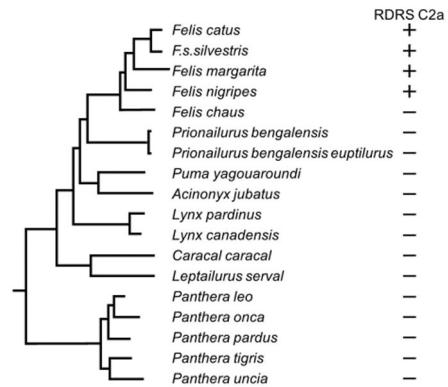


図2 ネコ科動物ゲノムにおけるRDRS C2a保有状況

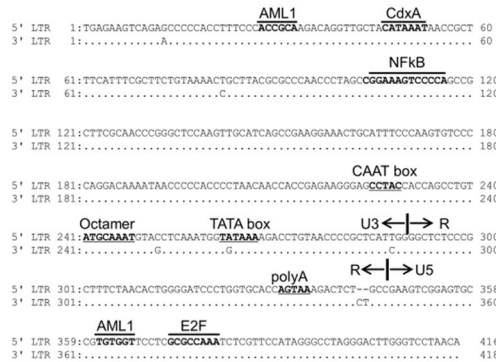
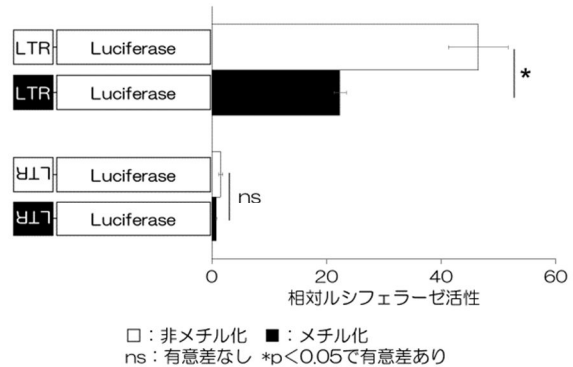


図3 RDRS C2a LTRの配列



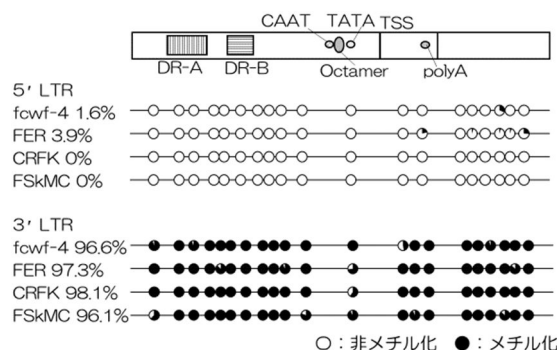
□: 非メチル化 ■: メチル化 ns: 有意差なし \*p<0.05で有意差あり

図4 RDRS C2a LTRの転写活性

(3) RDRS C2a のバイサルファイトシーケンス

調査したすべての細胞において、**RDRS C2a** の 3' LTR は高メチル化状態にあったが、5' LTR は低メチル化状態にあった(図5)。

これらの結果から、**RDRS C2a** の 5' LTR は不活化されておらず、自身もしくは周辺の宿主遺伝子の発現制御を行っている可能性が示唆された。現在、**RDRS C2a** のノックアウトに着手しており、さらなる機能解析を行う予定である。なお、本研究成果は未発表データも含むため、本報告書において結果を一部割愛した。



○: 非メチル化 ●: メチル化

図5 RDRS C2a LTRのバイサルファイトシーケンス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sayumi Shimode, Takashi Yamamoto	4. 巻 58
2. 論文標題 Characterization of DNA methylation and promoter activity of long terminal repeat elements of feline endogenous retrovirus RDRS C2a	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 70-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11262-021-01878-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sayumi Shimode
2. 発表標題 Characterization of DNA methylation and transcriptional activity of LTR of RDRS C2a
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------