

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657165
 研究課題名（和文）ヒトでの構成的ヘテロクロマチンの消失：機構解明へ向けた痕跡部分の構造解析
 研究課題名（英文）Extinction of constitutive heterochromatin blocks in humans: structural analysis for clarification of mechanisms
 研究代表者
 古賀 章彦 (KOGA AKIHIKO)
 京都大学・霊長類研究所・教授
 研究者番号：80192574

研究成果の概要（和文）：大規模なヘテロクロマチンが短期間（種分化が起こる程度の時間）に増幅（生成を含む）あるいは縮小（消失を含む）する現象が、ヒト科やテナガザル科など、霊長類の多数のグループでみられる。その機構の解明につなげることを目指し、増幅や縮小を起こしたヘテロクロマチンの特性を調べた。反復配列が転移などでセントロメアやテロメアに入り込んだ際にこれが起こること、および増幅や縮小の効率は塩基配列に依存することが判明した。

研究成果の概要（英文）：This study deals with rapid changes in the amount of constitutive heterochromatin, including emergence, amplification, reduction and extinction. These changes are frequently observed in many primate groups, such as hominids and gibbons. Cloning, sequencing and hybridization experiments revealed that such rapid changes are associated with integration of repetitive sequences into the centromere or telomere and the speed of change depends on their nucleotide sequences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：分子進化学

科研費の分科・細目：人類学・自然人類学

キーワード：染色体、反復配列、ヘテロクロマチン、セントロメア、テロメア

1. 研究開始当初の背景

チンパンジーとヒトは、ヒト科に属する。この2種の間で、染色体の構造に関して大きく異なる点がある。チンパンジーでは多くの染色体が、端部にヘテロクロマチンの大きな固まりをもつものに対して、ヒトの染色体にはこれがないことである。チンパンジーとヒトの系列が分かれた後にヒトのほうで消失が起こったことを、研究代表者らは先行研究で明らかにしていた。同様の現象、すなわち、ある種は染色体端部ヘテロクロマチンを持ち、その近縁種はもたないという状況は、テナガザル科にもみられる。たとえばフクロテ

ナガザルの染色体に、チンパンジーと同様の形状の端部ヘテロクロマチンがあり、アジルテナガザルにはこれがみられない。ただしテナガザル科の場合は、フクロテナガザルのほうで急速に増幅したという考えも成り立つ。このような、染色体端部ヘテロクロマチンの短期間（種分化が起こる程度の時間）での増幅（生成を含む）や縮小（消失を含む）は、新世界ザルなど、霊長類の中の他のグループでも起こっている。その機構は、本課題開始当初は不明であったし、機構解明のための現状の把握も詳細にはなされていなかった。

2. 研究の目的

急速な増幅や縮小が起こる機構を明らかにすることを先の目標に置き、本研究課題では、急速な増幅や縮小があった染色体端部ヘテロクロマチンの特性を調べることを目的とした。チンパンジー（ヘテロクロマチンがある）とヒト（ヘテロクロマチンがない）、フクロテナガザルとアジルテナガザル、ヨザルとマーモセットが、主たる対象であり材料である。

3. 研究の方法

チンパンジーの大規模ヘテロクロマチンについては、本課題の開始時点で、その実体はわかっていた。Subterminal satellite (StSat)とよばれる反復配列で、32bpの単位が縦列で連なったものである。ヒトではこれが消失したことを示す結果もすでに得ていた。本研究課題では、ヒトの塩基配列データベースから痕跡を探ること、および痕跡の状況から消失の機構を類推することを目指した。

フクロテナガザル (*Symphalangus syndactylus*) の染色体端部に大規模なヘテロクロマチンがあることは、数年前に知られていた (図1)。またヨザル (*Aotus azarae*) については、20年ほど前から知られていた。そしてどちらも、塩基配列や構造などはわかっていなかった。研究代表者は本研究課題で、反復配列のクローンを簡単な作業で得る方法を開発し、これをフクロテナガザルとヨザルに適用して、クローニングを行った。続いて塩基配列の解析、また染色体上の分布の調査を行い、増幅や消失の機構の類推につなげた。

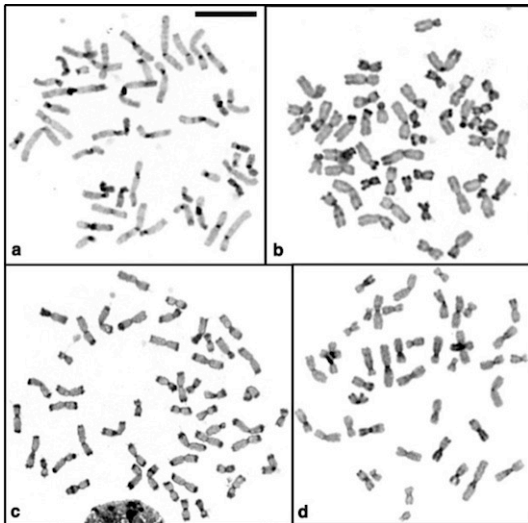


図1 C-バンド染色の結果。a ヒト、b チンパンジー、c フクロテナガザル、d アジルテナガザル。黒く染まった部分がヘテロクロマチンである。チンパンジーとフクロテナガザルに染色体端部ヘテロクロマチンがあることがわかる。

4. 研究成果

(1) ヒトでの StSat 反復配列の痕跡

まず、チンパンジーの StSat と同源性を示す塩基配列をヒトの塩基配列データベースから集める作業を行った。StSat 反復配列によく似ている塩基配列 (100塩基対以上の長さで80%以上の同源性) はみつからなかった。関連がある可能性を持つ領域 (50塩基対以上の長さで70%以上の同源性) は、4か所みつかった。いずれも他の反復配列の中に埋もれた状態であり、そのような部分はデータベースに収まっている塩基配列が正確でない可能性は、小さくない。そこで、データベースで同定されたこの塩基配列が実際にゲノムに存在するかどうかを調べる実験を行った。ゲノム DNA からの PCR での増幅である。条件を調整しながら繰り返したものの、予想される塩基配列の増幅産物は得られず、同源性検索でデータベースからみつかった4か所はいずれも偽であろうと判断した。

ヒトの塩基配列データベースは完成度が高く、StSat あるいはその痕跡があるとしてそれがみつからないことは、きわめて考えにくい。このため、ヒトでは痕跡も残らないような機構で StSat が消失した、あるいは排除されたことが、推測される。StSat は、チンパンジーでは染色体端部にある。その内部や、端にさらに近い領域には、重要な機能をもつ遺伝子はほとんど存在しないと考えるのは、妥当である。また、StSat より内側にもヘテロクロマチン領域が続いているとの考えも、無理がない。以上から、StSat より内側の部分で染色体の本体から切り離され、StSat の完全な消失に至ったのであろうと、類推した。

(2) クローニングのための実験法の開発

比較ゲノムハイブリダイゼーションとよばれる実験法がある。反復配列のコピー数を種間や個体間での比較する、あるいは遺伝子の発現レベルを組織間で比較するために、近年多用されている。研究代表者はこの方法に改良を加え、ゲノムに含まれる未知の反復配列を効率よくクローンとして得る方法を開発した。

たとえばフクロテナガザルの反復配列を入手するためには、まずフクロテナガザルのゲノムライブラリーを作る。全長約 40 kb のインサートが収まるフォスミドをベクターとする。このゲノムライブラリーからの個別のクローン数百個を、ナイロンメンブレンに整列の状態ではり付ける。このパネルに対してハイブリダイゼーションを行うが、その際のプロローブをフクロテナガザルのゲノム DNA とする。メンブレンでシグナルを発するクローンは反復配列を含むものであり、コ

ピー数が多いほどシグナルは強く、パネルに含まれる数も多い。このように、コピー数の多いものほど容易に同定される。他にも利点がある。同定の効率が反復配列の形状や塩基配列に依存しないことである。このため、ゲノムに含まれるすべての反復配列が、同定の対象となる。

パネルを複製し、一方のプローブをフクロテナガザル、他方をアジルテナガザルとすることで、フクロテナガザルではコピー数は多いがアジルテナガザルでは少ない（あるいは存在しない）反復配列を同定することもできる。比較の相手は変更しても、また多数を一度に用いてもよい。

(3) フクロテナガザルの端部ヘテロクロマチン

開発した実験法を利用して、フクロテナガザルではコピー数が多くアジルテナガザルでは少ない反復配列を同定した（図2）。塩基配列を調べたところ、アルファサテライト DNA であった（DDBJ に登録。アクセッション番号 AB678729）。アルファサテライト DNA は、霊長類のセントロメアの主要な DNA 成分であり、ヒト科やテナガザル科では 171 bp の単位が縦列反復配列となっている。染色体の標本にハイブリダイゼーションを行った結果は、アジルテナガザルがセントロメアのみでシグナルが出るのに対して、フクロテナガザルではセントロメアと染色体端部にシグナルが出るというものであった（図3）。これから、目指すヘテロクロマチンのクローニングに至っていること、そしてその実体がアルファサテライト DNA であることが、確認できた。

テナガザル科は4つの属から成っている。それぞれの属について、染色体端部でのアルファサテライト DNA の存在の有無を調べた。その結果、フクロテナガザルが含まれる *Symphalangus* 属に加えて、*Nomascus* 属にもこれがあることがわかった。ただし、*Symphalangus* 属のほうが規模は大きい。他の2属、すなわち *Hylobates* 属と *Hoolock* 属には、染色体端部にアルファサテライト DNA をもつ種はみつからなかった。4つの属の系統関係については、専門家の間でも見解の一致には至っていない。このため結論とすることはできないが、*Symphalangus* 属と *Nomascus* 属の共通の祖先でアルファサテライト DNA の移動が起こり、*Symphalangus* 属でこれが急速に増大したとするのが、いまのところの推測である。

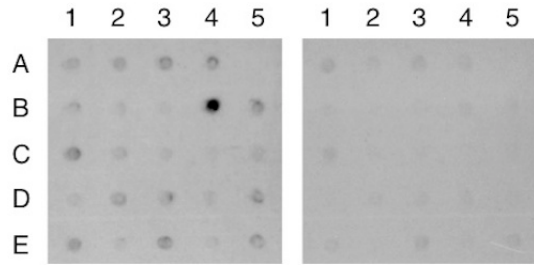


図2 比較ハイブリダイゼーションの結果の例。フクロテナガザルのゲノムライブラリーからのクローンをパネルにして複製しており、左はフクロテナガザルのゲノム DNA、右はアジルテナガザルのゲノム DNA をプローブにして、ハイブリダイゼーションを行った。B 行 4 列のクローンは、フクロテナガザルのみで増幅している反復配列を含んでいると推測され、続く解析でこれが確認された。

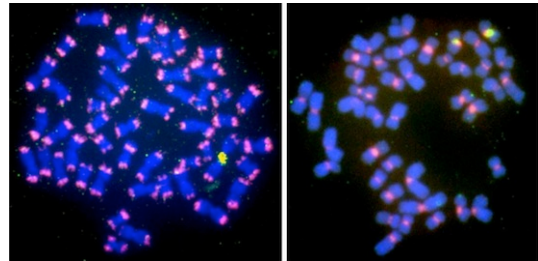


図3 染色体標本へのハイブリダイゼーションの結果。赤色の部分がシグナルである。左はフクロテナガザルの染色体であり、セントロメア領域およびテロメア領域にシグナルが出ている。右はアジルテナガザルの染色体で、セントロメア領域のみにシグナルが出ている。

(4) ヨザルの端部ヘテロクロマチン

ヨザルの染色体に大きなヘテロクロマチン領域があることが知られている。ただし、チンパンジーやフクロテナガザルのものと異なる点がある。アクロセントリック染色体の短腕がすべてヘテロクロマチンとなっていることある。開発した実験法を、ヨザル属の種である *Aotus azarae* に適用して、このヘテロクロマチンのクローニングを行った。塩基配列を調べたところ、これまでに知られていない縦列反復配列であった（DDBJ に登録。アクセッション番号 AB746944）。反復単位の長さは 185 bp である。この反復配列を OwlRep とよぶことにした。

染色体標本へのハイブリダイゼーションを行って、OwlRep の染色体上の分布を調べた。ほとんどのアクロセントリック染色体の短腕に加え、少数のメタセントリック染色体のセントロメア周辺にも存在することがわかった。

OwlRep の塩基配列には、目立つ特徴があ

る。個々の反復単位の内部に小さな反復が多数存在するという点である (図4)。とりわけ目立つのは14組の逆向き反復配列であり、複雑な二次構造を形成する可能性がある。この複雑な構造は、染色体の複製の障害となって染色体の切断をもたらしやすいと推測される。

上記の染色体上の分布、および構造の特性を踏まえて、ヨザルのヘテロロマチン領域の形成に至る進化的な過程を類推した。まず、OwlRep はセントロメアで生じた。あるいは他の場所で生じたものがセントロメアに、転移や組換えなどの機構で入り込んだ。セントロメアおよびテロメアでは反復配列の増減が常に起こっており、OwlRep はセントロメアの一部とみなされて増幅した。また、染色体間のセントロメアの接触を通じて、他の染色体に伝播した。ただし、OwlRep は切れやすい性質を備えており、OwlRep がメタセントリック染色体のセントロメアに存在することはその染色体の生存にとって不利であるため、多くのメタセントリック染色体には広がらなかった。アクロセントリック染色体に移った場合は、OwlRep がもたらす害は、メタセントリック染色体にくらべると小さいと予想される。そしてこの場合は、OwlRep が存在する場所はテロメア領域ともみなされる。OwlRep はテロメア領域を構成する反復配列とみなされ、テロメアの本来の性質のために増幅を遂げ、アクロセントリック染色体の短腕とよべるまでに伸長した。

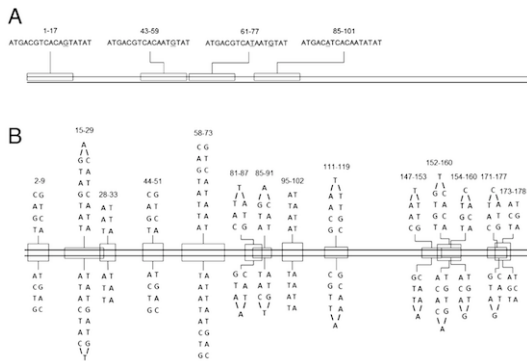


図4 OwlRep の反復単位の中にみられる反復構造。A 順向き反復配列。B 逆向き反復配列。

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) Prakhongcheep O, Chaiprasertsri N, Terada S, Hirai Y, Srikulnath K, Hirai H, *Koga A (2013)

Heterochromatin blocks constituting the entire short arms of acrocentric chromosomes of Azara's owl monkey: formation processes inferred from chromosomal locations (ヨザルのアクロセントリック染色体短腕を構成するヘテロロマチン: 染色体上の配置から推測される形成過程)

査読有

DNA Research: 2013年5月に改訂版が受理され印刷中

(2) Baicharoen S, Arsaithamkul V, Hirai Y, Hara T, Koga A, *Hirai H

In situ hybridization analysis of gibbon chromosomes suggests that amplification of alpha satellite DNA in the telomere region is confined to two of the four genera (テロメア領域でアルファサテライトDNAが増幅する現象はテナガザル科4属のうち2属のみで起こっていると推測される)

査読有

Genome 55 (11): 809-812.

DOI: 10.1139/gen-2012-0123

(3) Hara T, Hirai Y, Jahan I, Hirai H, *Koga A

Tandem repeat sequences evolutionarily related to SVA-type retrotransposons are expanded in the centromere region of the western hoolock gibbon, a small ape (類人猿のフーロックテナガザルのセントロメア近辺でSVAレトロトランスポゾンに関連した縦列反復配列が増幅している)

査読有

Journal of Human Genetics: 57 (12):

760-765

DOI: 10.1038/jhg.2012.107

(4) *Koga A

Under-representation of repetitive sequences in whole-genome shotgun sequence databases: an illustration using a recently acquired transposable element (反復配列はホールゲノムショットガン塩基配列データベースには過小に反映されている: ゲノムに最近侵入したトランスポゾンを用いての例証)

査読有

Genome 55 (2): 172-175

DOI: 10.1139/G11-088

(5) Koga A, Hirai Y, Hara T, *Hirai H
Repetitive sequences originating from the centromere constitute large-scale heterochromatin in the telomere region in the siamang, a small ape (類人猿のフクロテナガザルで、セントロメア由来の反復配列がテロメア領域で大規模なヘテロクロマチンを形成している)

査読有

Heredity 109 (3): 180-187

DOI: 10.1038/hdy.2012.28

[学会発表] (計4件)

(1) 古賀章彦・原暢・イスラト ジャハン・平井百合子・平井啓久

テナガザルにみられるトランスポゾンのゲノムへの影響:セントロメアへのヘテロクロマチンの供給

第28回日本霊長類学会大会

平成24年7月6日

椋山女学園大学 (名古屋市)

(2) 平井啓久・原暢・平井百合子・古賀章彦
テナガザルの染色体端部にある大規模ヘテロクロマチンの主成分

第28回日本霊長類学会大会

平成24年7月6日

椋山女学園大学 (名古屋市)

(3) 古賀章彦・平井百合子・平井啓久

チンパンジーにあってヒトにない染色体端部ゲノム不毛地帯: (2) 培養細胞を用いた組換えの検出

第27回日本霊長類学会大会

平成23年7月18日

犬山国際観光センター (愛知県犬山市)

(4) 平井啓久・平井百合子・古賀章彦・鶴殿俊史

チンパンジーにあってヒトにない染色体端部ゲノム不毛地帯: (1) 存在様式変異から推測される非相同染色体間末端組換え

第27回日本霊長類学会大会

平成23年7月18日

犬山国際観光センター (愛知県犬山市)

[その他]

ホームページ等

京都大学霊長類研究所

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 章彦 (KOGA AKIHIKO)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号: 80192574

(2) 研究分担者 (該当なし)

(3) 連携研究者 (該当なし)