

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440180

研究課題名(和文) 長期にわたり転移能力を維持している「長生き」なトランスポゾンの転移酵素の同定

研究課題名(英文) Identification of the transposases that contribute to the mobility of long-lived transposons.

研究代表者

彦坂 暁 (Hikosaka, Akira)

広島大学・総合科学研究科・准教授

研究者番号：30263635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネッタイツメガエルで長期間にわたって転移活性を保持している非自律型トランスポゾンT2-A1, T2-Cの転移酵素を探索した。その過程でゲノム中の転移酵素の進化(増幅・宿主による「家畜化」)を解析するパイプラインを作成し、ネッタイツメガエルおよびアフリカツメガエルにおける転移酵素の進化を解析した。またツメガエルゲノムの進化過程(とくにアフリカツメガエルの異質倍数体化)におけるトランスポゾンの動態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I explored the transposases that contribute to the mobility of long-lived nonautonomous transposons, T2-A1 and T2-C, in the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. In that process, I created an in silico pipeline to analyze the evolution of transposases, and analyzed the evolution of transposases in *X. tropicalis* and *X. laevis*. In addition, I elucidated the dynamics of transposable elements in *Xenopus* evolution, especially in the allopolyploidization of *X. laevis*.

研究分野：進化学

キーワード：トランスポゾン 転移酵素 ツメガエル

1. 研究開始当初の背景

「動く遺伝子」であるトランスポズンは、一般に宿主にとっては不必要で、転移によって宿主にとって有害な転移を引き起こすなど、宿主との間にしばしば軋轢も引き起こす。そのためトランスポズンの転移活性を保存する純化選択は働かない。特に DNA 型トランスポズンは「カット&ペースト」方式で転移するため、「コピー&ペースト」方式で転移するレトロトランスポズンのような効率的にコピーを増やす機構をもたないため、一つの宿主内で長いあいだ転移活性を維持して“生き延びる”のは難しいと従来は考えられてきた。

ところが我々はこの通念をくつがえすトランスポズンを発見した。我々は独自のゲノム情報解析プログラムを開発してネットイツメガエル *Xenopus tropicalis* の DNA 型トランスポズン T2-MITE ファミリーの網羅的探索を行ない、これを 16 サブファミリーに分類した。そのうちサブファミリー T2-A1 と T2-C はゲノム内で大量に増幅し、現在も転移活性を保持し、活発な転移により多くの種内多型を生み出していた。これらはネットイツメガエルとアフリカツメガエル *Xenopus laevis* が分岐する前からツメガエルゲノムに存在し、数千万年以上の長い間、転移活性を保持してきたと考えられた。我々は T2-A1, C がなぜこれほど“長生き”できたのかに興味をもち、さらに研究を進めることにした。

我々はバイオインフォマティクス的手法を用いて T2-MITE のネットイツメガエルゲノム内分布を調べた。その結果、T2-C は他の T2-MITE サブファミリーに比べて遺伝子の 5' 上流近傍に挿入される傾向が強く、また上流に T2-C が挿入された遺伝子群の空間的発現様式に強い相関が見られること(たとえば卵巣で発現が強く、皮膚では弱い傾向がある)を見いだした。この結果は T2-C などの T2-MITE の内部配列が宿主の遺伝子発現の調節に関与している可能性を示唆していた。

T2-MITE は内部に転移酵素をコードしない非自律的な DNA 型トランスポズンで、その転移に働く酵素は長い間不明であった。しかし近年、その候補として新規トランスポズンファミリー Kolobok の転移酵素 (Kol 転移酵素) が浮上してきた。我々はネットイツメガエルゲノムで Kol 転移酵素遺伝子が 25 のサブファミリーに分かれ、その多くが単一コピー遺伝子として(つまり自身はトランスポズンとして増幅するのをやめて)やはり数千万年以上にわたって保存されてきたことを見いだした。この事実は T2-MITE と同様に Kol 転移酵素群にも純化選択が働いてきたことを示唆していた。

これらの成果を踏まえ、T2-A1, C が“長生き”できた理由について、次の仮説を考えた。(1) 25 種の Kol 転移酵素の少なくとも幾つかは、T2-A1 and/or C に対する転移触媒活性を

もつ。

(2) T2-A1, C は内部に何らかの機能的配列(たとえば遺伝子発現調節配列)を含む。

(3) T2-A1, C の転移は、宿主種内に遺伝子/ゲノム機能の多様性をもたらし、宿主の利益につながった。

(4) そのため、T2-A1, C を転移させる Kol 転移酵素の活性が純化選択により保存された。

以上の背景にもとづいて研究計画を立案した。

2. 研究の目的

以上の仮説を検証していくために、本研究ではまず仮説(1)に焦点をあて、いまだ不明な T2-A1, C を動かす転移酵素を同定することを目的とし、その候補である Kol 転移酵素の機能解析を行うことを目的とした。最終的な目標は、培養細胞において実際に T2-A1, C を転移させる活性をもつ Kol 転移酵素を同定することとした。

3. 研究の方法

上記のように本研究の最終目標は、培養細胞において Kol 転移酵素の活性を証明することであるが、Kol 転移酵素 25 種類 × T2-MITE 2 種類のすべての組み合わせについてベクターを構築し、培養細胞で実験を行うのは非効率である。そこで当初の計画として、以下の戦略をとることにした。

(1) 簡便なタンパク質発現系で Kol 転移酵素タンパク質を合成する。

(2) 合成した Kol 転移酵素の試験管内での T2-A1, C 末端配列への結合能を指標にして、ゲルシフトアッセイ等の方法で候補を絞り込む。

(3) そこで絞り込んだ候補について、T2-A1, C に対する切り出し活性を培養細胞内で調べる。

(4) T2-A1, C の転移触媒活性を培養細胞で確認する。

4. 研究成果

(1) 大腸菌を用いた Kol 転移酵素タンパク質の発現系を構築した。PGEX 系ベクターと大腸菌 BL21 系株を用いた系、分子シャペロンを導入した大腸菌を用いた系、コールドショック発現系等での合成を行い、Kol 転移酵素タンパク質の発現を確認した。また大腸菌内で Kol 転移酵素タンパク質によるトランスポズン切り出し活性を検出する系の構築も試みた。しかし後者についてはまだ成功に至っていないのでさらなる条件検討を行う必要がある。

(2) 無細胞系を用いた Kol 転移酵素タンパク質の試験管内発現系を構築した。これを用いて T2-MITE の末端配列への結合性をゲルシフトアッセイで調べた。また試験管内でのプラスミドからの T2-MITE トランスポズン切り出し実験系の構築を試みた。しかしこれらのア

ッセイでは、現在のところ活性の検出には至っていない。今後、他の系を用いて合成したタンパク質について活性を検討する予定である。

(3)これらの実験と並行して、研究期間中に公開されたアフリカツメガエル *Xenopus laevis* のゲノム情報を参照して、より実験に適切な酵素-末端配列の組み合わせを探す方針をとった。ゲノム配列から転移酵素を探索・分類するパイプラインを作成し、これを用いてアフリカツメガエルのゲノム解析を行ない、ネットイツメガエルとの比較を行なった。これによりツメガエルにおける Kol 転移酵素の進化の様相を明らかにした。

(4)上記のパイプラインを応用して、転移酵素の保存性の高さが Kol 転移酵素に特異的なのか、それともツメガエルのトランスポゾンの一般的な特徴なのかを調べた。piggyBac, Harbinger, Mariner, hAT 等の DNA 型トランスポゾンスーパーファミリーについて解析を行い、Kol 転移酵素と比較した。その結果、Kol 転移酵素は DNA 型トランスポゾンの中でも特に保存性が高く、宿主にとって有益な働きをするように進化してきたことが分かった。

(5)上記の解析に加えて、アフリカツメガエルにおける T2-MITE の進化の解析も行った。我々が開発しネットイツメガエルの解析でも用いた TS-clustering の手法を用いて T2-MITE の網羅的探索および分類を行い、両種における T2-MITE の構成の比較を行った。

(6)上記(3)~(5)のようなアフリカツメガエルのゲノムの解析を行うためには、そのゲノム構造を明らかにする必要がある。特にアフリカツメガエルは異なる 2 種の祖先種の雑種に由来する異質 4 倍体に由来し、倍数体化後の進化過程で 2 種のゲノムが異なる役割を果たしてきた可能性がある。これを調べるためには、アフリカツメガエルの核型を構成する染色体のうち、どれがどちらの祖先種に由来するかを明らかにする必要がある。しかしこれまで、各染色体の由来は不明であった。

このような背景のもとで、アフリカツメガエルゲノム解析国際共同研究プロジェクトに参画し、トランスポゾンを用いて各染色体の由来を判定することをめざした。具体的には、両祖先種が別種として進化していた時期に一方の系統でのみ増幅・転移していたトランスポゾンがあれば、その分布を指標に染色体の区別ができると考えた。そこで、これまで我々が蓄積してきたトランスポゾンの解析手法を用いて、いずれか一方の祖先種の染色体に特異的に分布する

トランスポゾン由来配列を探索した。その結果、一方の祖先種 (A 種) 由来の染色体に特異的なトランスポゾン 1 種 (Harbinger スーパーファミリーに属する) と、他方の祖先種 (B 種) 由来の染色体に特異的なトランスポゾン 2 種 Harbinger スーパーファミリーおよび Mariner スーパーファミリーに属する) を見出した。これらを用いてどの染色体がどちらの祖先種に由来するかを判別することが可能となった。その結果、A 種に由来する染色体は B 種に由来する相同な染色体 (同祖染色体) に比べて例外なく長さが長いことが明らかになった。この成果はアフリカツメガエルにみられる倍数体化後のゲノム進化の解析のための基盤となるものである。

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 1 件)

1. Akira Hikosaka, Yoshinobu Uno, Yoichi Matsuda, Distribution of the T2-MITE family transposons in the *Xenopus (Silurana) tropicalis* genome. Cytogenetic and Genome Research, 査読有, 145 巻, 2015, pp230-242, DOI: 10.1159/000430764

[学会発表](計 4 件)

1. 高橋秀治、豊田敦、宇野好宣、黒木陽子、彦坂暁、原本悦和、田中利明、西城智仁、野口英樹、松田洋一、近藤真理子、藤山秋佐夫、上野直人、平良真規、浅島誠、*Xenopus laevis* 全ゲノム解析：アフリカツメガエル nodal5 と nodal6 遺伝子クラスターについての解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

2. 彦坂暁、ツメガエルにおける DNA 型トランスポゾンの進化、第 9 回日本ツメガエル研究集会、2015 年 9 月 15 日、秋田温泉さとみ (秋田県秋田市)

3. Akira Hikosaka, Seigo Konishi, Sarina Uno, Akira Kawahara, Molecular domestication of transposons in *Xenopus*. Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing, 2014 年 3 月 27 日、広島大学 (広島県東広島市)

4. 彦坂暁、ツメガエル Kolobok トランスポゾンの転移酵素の進化、第 7 回日本ツメガエル研究集会、2013 年 9 月 24 日、秋吉台国際芸術村 (山口県秋芳町)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

彦坂 暁 (HIKOSAKA AKIRA)
広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号：30263635