

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570003

研究課題名（和文）メダカの転移因子の突発的転移頻度上昇の機構

研究課題名（英文）Factors causing sudden increase in the transposition frequency of transposable elements in medaka fish

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：

メダカの *Toll* 因子では、転移頻度がある世代で突然上昇するという現象が起こる。この現象の分子レベルでの機構を探るために、転移酵素遺伝子をもつ因子のメダカへの導入と、転移頻度の測定を主体とする実験を行った。高い転移頻度を示したメダカでは、因子の挿入は、遺伝子の下流で起こっていた。この結果から、上流の遺伝子からのリードスルーが転移酵素 mRNA の増加をもたらし、これが転移頻度の上昇につながると、推測した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：転移因子、トランスポゾン、転移頻度、突然変異、遺伝的変異、メダカ

1. 研究開始当初の背景

Toll 因子は、*hAT* (*hobo/Activator/Tam3*) ファミリーに属する DNA 型転移因子である。メダカのゲノムに、散在反復配列として数百コピー存在する。ただし、このうちで自律的コピー、すなわち転移酵素の遺伝子を内部にもつコピーは、多くて 5 コピーほどである。0 コピーの個体も珍しくない。自律的コピーの全長は 4.4 kb である。

チロシナーゼは、黒色素メラニンの合成

の最初の段階を担う酵素である。その遺伝子の欠損のためにメラニンができず、このためにアルビノの表現型となる突然変異は、ヒトやマウスで多数知られている。メダカのチロシナーゼは 547 アミノ酸からなり、その遺伝子は全長約 5 kb で、5 つのエクソンをもつ。

メダカで、チロシナーゼ遺伝子に *Toll* 因子の挿入をもつアルビノ突然変異系統がある。挿入の位置は第 1 エクソンの中央部で

あり、*Toll* 因子の内部に転写がすすむとすると、92 番目以降のアミノ酸が変化し、108 番目のアミノ酸の次が終止コドンとなる。目は、野生型が灰色であるのに対してこのアルビノ系統は赤、体表は、野生型が灰色であるのに対してアルビノは黄色かかった桃色である。挿入している *Toll* 因子は、全長 1.9 kb の非自律的コピーである。内部が欠失し、転移酵素遺伝子のほとんどの領域を失っている。

この系統の 1 つのサブ系統で、高頻度の復帰突然変異を体細胞で起こす個体がみつかった。メラニンが体細胞の一部で合成され、このために体表に黒斑をもつ。また、このサブ系統からは、生殖細胞系列での復帰突然変異も、高頻度で生じる。復帰突然変異の原因は、チロシナーゼ遺伝子に挿入している *Toll* 因子が抜けることである。体細胞、生殖細胞のどちらの復帰突然変異も、ある世代で突然起こるようになり、その後数世代で、突然変異率は低下する。

2. 研究の目的

本研究は、*Toll* 因子の転移頻度が突然上昇する機構を調べることを、目的とした。可能性としては、自律的コピーの存在の状態に何らかの変化が生じ、それが転移酵素の発現量に影響を与えることが、推測された。まずこの推測が正しいかどうかの見当をつけ、続いて自律的コピーの内部や近辺にどのような変化が生じているかを明らかにするという手順で、研究をすすめた。

今回、転移頻度の突然の上昇が観察されたメダカは、実験室で 5 年以上維持している突然変異系統である。メダカの自然集団でこの現象が起こる可能性を探ることも、本研究の目的に含めた。

3. 研究の方法

転移頻度の上昇の直接の原因が、転移酵素の発現量の上昇であるとする、転移頻度と発現量に正の相関がみられるはずである。最初にこの確認を行った。続いて、人為的に発現量を上げれば転移頻度も上がると予想し、その確認を行った。これで状況証拠がそろったため、自律的コピーの状態を具体的に明らかにする作業に移った。メダカに自律的コピーを導入し、挿入が起こった地点の近辺での遺伝子等の分布を調べるという手法で、行った。

自然集団で転移頻度の上昇が起こる可能性については、メダカの生息域全体からのサンプルでの完全長コピーの分布を調べ、

続いてこれらのコピーの自律性の有無を調べるという順序で、行った。

4. 研究成果

(1) 転移頻度と発現量との相関

転移頻度の上昇は、アルビノのサブ系統の 1 つで起こる。ただし、サブ系統のすべての個体で起こるわけではない。この状況を利用して、転移頻度と発現量との相関を調べた。

まず、体表の黒斑の数を指標として、数の多い個体、中程度の個体、まったくみられない個体を、選んだ。この 3 つのグループを A、B、C とし、それぞれに 6 組のペアができるように、数をそろえた。各 6 組、計 18 組の交配を行い、それぞれから受精卵を 20 個ずつ集めた。5 日目の胚にまで発生がすすんだ時点で、20 個を込みにして RNA を抽出し、RT-PCR で転移酵素の発現量の推定を行った。得られたデータの分散分析で、グループの間に、発現量の 5% レベルの有意差が認められた。発現量のグループ内平均値は、A は C の 2.2 倍、B は C の 1.7 倍であった。

このように、転移頻度と発現量には正の相関があることが示された。この実験は、遺伝子構成の背景をグループ間で完全にそろえてはいないため、厳密な証明であるとはいえない。しかし、サブ系統は 5 年以上実験室で維持したものであり、その間に近親交配、すなわち遺伝的構成の均一化は進行している。このため、十分に信頼できる結果であると、考えた。

(2) 自律的コピーをもたない系統の準備

メダカの細胞に転移酵素を人為的に供給してその効果を調べる実験を、計画した。このために使うメダカは、*Toll* 因子の自律的コピーをもたないものが、理想である。近交系であればなお望ましい。このような材料を準備するために、メダカの高度の近交系 3 系統と、中程度の近交系 4 系統について、自律的コピーの数の推定を行った。推定の方法は、ゲノム DNA のサザンブロットである。因子の各部をプローブとし、現れるバンドの数をコピー数の推定値とした。解析の結果、端部のプローブにはシグナルは出るが中央部のプローブでは出ない系統として、HNI 系統が該当した。この系統は高度の近交系であり、塩基配列公共データベースの整備もすすんでいる。このため、以降の実験に適した系統であるといえる。

(3) 転移酵素 RNA の効果

転移酵素を人為的に供給してその効果を調べる実験を、HNI 系統を用いて行った。まず、転移酵素の RNA を受精卵に注入した。転移酵素は 851 アミノ酸からなる。ネガティブコントロールとして、317 番めと 318 番めのコドンが終止コドンとなるように改変を加えた RNA を用いた。それぞれのグループを、A、B とする。注入から 7 日後にゲノム DNA を抽出し、ゲノム中にある非自律的コピーをはさむプライマーを 5 組用いて、PCR を行った。転移が起これば *Toll* 因子が抜けるため、その分短くなった DNA 断片が生じるはずである。5 組のすべてについて、A ではそのような断片が生じており、B ではみられなかった。A の産物の量は、自然で転移が起こる場合の 100 倍以上であり、転移頻度が高いことが推察された。以上のように、転移酵素 RNA が非自律的コピーの転移をもたらすことが、確認された。

(4) 自律的コピーの導入

転移酵素遺伝子の発現量の増加が、転移頻度の上昇の直接の原因であると、これまでの結果から判断することができる。次に調べるべきことは、どのような条件がそろって転移酵素遺伝子の発現が増加するかである。そのためには、自律的コピーをもたない系統に自律的コピーを導入し、入った状態と転移頻度との関係を調べればよい。そこで、この目的のための自律的コピーの導入、および 1 コピーが入った個体の選抜を、行った。

導入は、自律的コピーのクローンを転移酵素 RNA とともに HNI 系統の受精卵に注入することで行った。240 個の受精卵に注入を施し、レポーター遺伝子である GFP 遺伝子の発現を指標として、発生の早い段階で染色体に転移したと思われる胚 94 個を残した。稚魚の時点でさらに選抜をして、41 個体を残した。このうちの 17 個体が、生殖可能な成魚にまで育った。それぞれの個体を、導入を行っていない HNI の個体と交配し、次世代をさらに HNI と交配して、染色体上に自律的コピーの挿入をもつ系統を、17 系統作った。続いて、サザンブロットでのバンドの数から各系統の自律的コピーの数を推定した。1 コピーと判定されたものは 14 系統であった。挿入の場所が系統ごとに異なることは、サザンブロットでのバンドの位置の違いから、確認できた。

この 14 系統について、それぞれの非自律

的因子の転移頻度を測定した。方法は、*Toll* 因子をはさむプライマーを 5 組用いた PCR である。7 日めの胚 20 個から抽出したゲノム DNA でこれを行い、*Toll* 因子の分が短くなった DNA 断片の量を、比較した。転移産物が生じない系統、すなわち転移が起こらないと思われるものが 2 系統あった。残り 11 系統では、転移頻度が最も高い系統は最も低い系統の 11.5 倍、2 番めに高い系統は 8.2 倍の転移頻度を、示した。以降の解析は、転移頻度が 2 番めまでの 2 系統 (A1、A2 とよぶ)、および転移が起こらない 2 系統 (B1、B2 とよぶ) を選んで、行った。

(5) 挿入点近辺の特性

上記の 4 つの系統から、自律的コピーの既知の塩基配列を手がかりに逆向き PCR (inverse PCR) を行い、自律的コピーに隣接する部分のクローンを得た。そのクローンの塩基配列を、メダカの塩基配列データベースと照合し、自律的コピーの挿入が起こっている地点の特定を試みた。

A1、A2 では、遺伝子の下流に、転移酵素遺伝子が同じ方向となるように因子が入っていることが、判明した。上流の遺伝子の第 1 エクソンの開始点から挿入点までの距離は、A1 が 7.2 kb、A2 が 6.0 kb であった。これに対して、B1 と B2 は、いずれも直前の遺伝子は 15 kb 以上離れ、しかも転写の向きは逆であった。

(6) 転移頻度上昇の機構

以上の結果から、つぎのような機構が推測される。「メダカのゲノムでは、*Toll* 因子は低い頻度で転移している。自律的コピーが転移し、その挿入の位置が遺伝子の下流であり、しかもその遺伝子の転写と転移酵素遺伝子の転写が同じ向きとなる配置であった場合、遺伝子からのリードスルーの産物に転移酵素のコーディング領域が含まれることがある。これは転移酵素の量の増加をもたらし、その結果として転移頻度が上昇する。自律的コピーが再び転移して、遺伝子の下流という位置関係が消失すると、転移頻度の低い状態、または転移が起こらない状態に、移行する。」

(7) 自然集団での可能性

Toll 因子の自律的コピーが 1 個あれば、同じ細胞にある非自律的コピーの多くも同時に転移することがあることが、ここまでの結果から判明した。したがって、自然集団に自律的コピーがどのような分布で保有

されているかについての情報は、同様の現象が自然で起こり得るかどうかを推測するために有用である。この情報を得るための調査を行った。

材料には、メダカの生息域全体を代表できるように選んだ32地点からのサンプルを用いた。ナショナルバイオリソースプロジェクト・メダカから分譲を受けたものである。それぞれのサンプルのゲノムDNAを抽出し、*Toll* 因子の自律的コピーの各部をプローブとして、サザンブロットを行った。

内部の欠失が起こっているコピーは、非自律的コピーである。そのようなコピーは、32地点のすべてのサンプルで、2倍体ゲノムあたり数百の数で存在していた。完全長のコピーについては、もたないものが22地点で、2倍体ゲノムあたり1-4コピーもつものが10地点であった。

完全長のコピーは必ずしも自律的コピーであるとはいえない。塩基置換で自律性が失われることもあり得るからである。そこで、完全長のコピーをもつ10地点のうちからランダムに選んだ2地点について、必要な交配を施し、非自律的コピーのエクシジョンをPCRで調べることで、自律性の検証を行った。いずれも、自律的コピーであると判定された。

以上の結果から、メダカ自然集団には*Toll* 因子の自律的コピーは少数ながら保持されており、このため自然の状態では転移頻度の突然の上昇があり得ることが、示唆された。メダカの*Tol2* 因子が自然集団で突然変異原となり得ることは、以前の研究ですでに証明している。*Toll* 因子も同様であることが、今回の研究で示された。

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 Koga A*, Shimada A, Kuroki T, Hori H, Kusumi J, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S
The *Toll* transposable element of the medaka fish moves in human and mouse cells.
Journal of Human Genetics 52: 628-635.
(2007)
査読有

- ② Koga A*, Higashide I, Hori H, Wakamatsu Y,

Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S
The *Toll* element of medaka fish is transposed with only terminal regions and can deliver large DNA fragments into the chromosomes.
Journal of Human Genetics 52: 1026-1030.
(2007)
査読有

- ③ Hikosaka A, Koga A*
PCR detection of excision suggests mobility of the medaka fish *Toll*.
transposable element in the frog *Xenopus laevis*.
Genetical Research 89: 201-206. (2007)
査読有

- ④ Kodama K, Takagi S, Koga A*
The *Toll* element of the medaka fish, a member of the *hAT* transposable element family, jumps in *Caenorhabditis elegans*.
Heredity: 101: 222-227. (2008)
査読有

- ⑤ Koga A, Cheah FS, Hamaguchi S, Yeo GH Chong SS*
Germline transgenesis of zebrafish using the medaka *Toll* transposon system
Developmental Dynamics: 237: 2466-2474.
(2008)
査読有

[学会発表] (計 5 件)

古賀章彦、濱口哲
メダカのトランスポゾン *Toll* : 転移触媒酵素の構造・機能・変異
2008年12月9日
第30回日本分子生物学会年会 横浜市

古賀章彦・濱口哲・酒泉満
脊椎動物のトランスポゾン：*Toll* 因子の転移酵素遺伝子はメダカ自然集団で完全な消滅に至っていない
2008年8月22日
第10回日本進化学会大会 東京都

古賀章彦
hAT ファミリーのトランスポゾンであるメダカの *Toll* 因子は旧口動物と新口動物の両方で転移する
2008年9月5日
日本遺伝学会第80回大会 名古屋市

児玉健・古賀章彦・高木新
メダカのトランスポゾン *Toll* の
Caenorhabditis elegans での転移
2008年12月10日
第31回日本分子生物学会年会 神戸市

Koga A

Toll and *Tol2* of medaka: two similar *hAT*-family
elements at different evolutionary stages in a
single fish genome

February 9, 2009

2nd International Conference and
Workshop: Genomic Impact of Eukaryotic
Transposable Elements
Pacific Grove, CA, USA

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

島田 敦子 (SHIMADA ATSUKO)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 20376552