

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580080

研究課題名(和文) 昆虫ゲノムにおける転移因子の動向による異種交雑の指標確立

研究課題名(英文) Establishment of the index about the Interbreeding phenomenon by tracing the transposable elements in the insect genome

研究代表者

中島 裕美子(Nakajima, Yumiko)

九州大学・アイソトープ総合センター 伊都地区実験室・教授

研究者番号：70244340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：カイコは野生クワコと交配可能であり、人工的に雑種を作ることは可能だが自然界でこの2種の雑種系統は生き残れないと考えられている。本研究では雑種個体の簡便判定法の確立を目指し、ゲノム中の転移因子に注目した。まず、カイコ、クワコのゲノム上の同位置に挿入されている数種類の転移因子の挿入順位とその年代を、両種のこの領域の塩基配列データを用いて推定できた。次にゲノム上の上述の位置で特徴的な構造を持つユニット(カイコのみで転移因子の3重構造)の交配雑種次世代以降での動向、昆虫のrRNA遺伝子中に配列特異的に挿入されている転移因子R2Bmのゲノム中での動向を追跡することが雑種判定に有効であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：As domesticated silkworms (*Bombyx mori*) are capable of mating with wild silkworms (*Bombyx mandarina*), it is possible to create artificial hybrids, but these two species of hybrid systems in nature are not considered to be capable of surviving. In this study, we aimed to establish a simple judgment method of hybrid individuals by focusing on the transposable elements in the genomes. First, we succeeded in to estimate the insertion order and the age of several kinds of transposable elements that were inserted into the same position on the genomes of the *B. mori* and *B. mandarina*, by using the nucleotide sequence data of both species in this region. Next, we suggested that it was effective in hybrid determination to trace the unit(tripartite structure of transposable elements found only in silkworms) of the interbreeding and the generations thereafter at the above-mentioned position, the rR2Bm profiles that were inserted in a sequence-specific manner into the rRNA genes in *mandarina*.

研究分野：進化生物学、応用昆虫科学

キーワード：雑種 転移因子 カイコ、クワコ mariner-like element MLE BmTNML 座位 28SrRNA遺伝子 R1, R2

1. 研究開始当初の背景

近年、環境変動による生態系の変化等により、多くの地域で外来生物の移入問題が深刻になっており、移入した生物種の同定、本来生息していた生物との雑種の有無の判別方法の確立は重要な課題である。移入種を判別する手段としてはミトコンドリア DNA の配列比較や DNA バーコーディング比較法が主流であり、他に簡便な手法は殆ど開発されていない。

研究代表者は先行研究において、種を超えて水平伝播したと考えられている DNA 型転移因子 MLE(*mariner-like element*)に注目して研究をしてきた。MLE はカイコゲノムでは 6 タイプ (*Bmmar1*~*Bmmar6*) が報告されている。その中の *Bmmar2* に分類されるタイプで、セクロピア蚕 (*Hyalophora cecropia*) の全長 MLE (引用文献 1.) の末端逆位繰り返し配列(*Inverted Terminal Repeat*)をプライマーとしてピックアップされる

MLE : CIM (*Cecropia-Inverted-Mariner*) はカイコゲノム中 (常染色体上) に 19 コピー

(座位) 存在する。この CIM のカイコの系統間、生息場所の異なるクワコの集団間における配列、コピー数、CIM 周辺領域を含めたゲノム構造の比較から、これらの領域が集団間で顕著な多型を示し、そのことが集団を特徴づける一つのマーカーとして使える可能性をつかんだ (引用文献 2.)。

またカイコでは、CIM の挿入された 19 座位のうち 6 番染色体上の 1 座位には CIM にさらに他の転移因子 3 種類が挿入されているユニット (*BmTNML* 座位と代表者が命名 : 文献 3.) が存在する。同じ座位はクワコでも存在するが、今のところクワコのこの座位にカイコのような転移因子の 3 重構造は存在しないと思われる。そこでカイコ、クワコ数集団のゲノム配列を用いて、*BmTNML* 座位への CIM、その他の転移因子の挿入年代、挿入順位の算出を研究分担者の間野との共同研究とともにに行った。その結果、以下のことを明らかにした。1) CIM とホストゲノムの置換速度はほぼ同じで、転移因子をイベントの時刻の推定として使えること、2) CIM はクワコとカイコが共通祖先から分岐する前にゲノムに転入した。3) クワコとカイコの共通祖先からの分岐年代は既報とほぼ同じ算定値で約 700 万年前となった。4) *BmTNML* 座位上の CIM にレトロトランスポゾン *L1Bm* が挿入された後、カイコの系統のみで更にレトロトランスポゾン *BMCI* が挿入された。5) 一方、一部のクワコ集団でのみ、*BmTNML* 座位の 3' 側に DNA 型トランスポゾン *BmamaT1* が挿入された。6) そのクワコ集団中の更に

一部の集団の *BmTNML* 座位から *BmamaT1* が脱落した。7) クワコの多様性は有効集団サイズにして 500 万-1000 万年前に共通祖先で確立された。8) カイコの多様性は有効集団サイズにして 15 万-30 万年前に共通祖先で確立され家畜化されたのはクワコのごく一部だが数匹ではなさそうであることが示唆された。以上の結果は、本研究課題を開始した初年度にほぼ論文を完成させ研究期間中に投稿し、2013 年に発表された。そこで次に、カイコ、クワコゲノムの *BmTNML* 座位以外の座位への CIM の挿入年代の推定により、両種の祖先ゲノムに CIM が一斉に挿入されたかどうかを確認する必要があると考えた。また上述から 6 番染色体上の *BmTNML* ユニットがカイコとクワコを識別する有用なマーカーである可能性が浮上したためこのユニットの雑種個体判定用マーカーとして開発を目指した。

一方、rRNA 遺伝子クラスター中の 28SrRNA 遺伝子にターゲット配列特異的に挿入されているレトロトランスポゾン *R1*, *R2* の挿入状況、5' 欠失パターン、コピー数などが示されていること (引用文献 4.) から、カイコとクワコ、あるいは異なる地域に生息するクワコの集団間でこれらの間に差異がある可能性が想定された。

以上から、昆虫の染色体上の特定座位の転移因子の動向を指標として異種や移入集団の判別をする本計画の提案に至った。

2. 研究の目的

(1) *BmTNML* 座位以外の 18 座位への CIM の挿入年代を推定し、CIM 同じ時期に一斉にカイコとクワコの共通祖先のゲノムに挿入されたのかを検証する。

(2) カイコとクワコの交雑次世代以降のゲノムにおける *BmTNML* の動向 (受け継がれている方) を追跡し、雑種判定に有効であるかを検証する。

(3) カイコ第 11 番染色体上の 28SrRNA 遺伝子クラスターに配列特異的に挿入されている non-LTR 型レトロトランスポゾン *R1Bm*, *RBm2* について、特徴的な 5' 側の欠失が、カイコの系統、クワコの集団によってどの程度差異があるか、また、どの領域の欠失が顕著かを検出するとともに、ゲノム中 (28SrRNA 遺伝子クラスター内) のコピー数の算定を行う。またクラスター外に存在する *R1*, *R2* も含め、それらが挿入されやすいホットスポットを探索し、その染色体構造を予測する。

(4) カイコ、クワコ、インドクワコの EST データを用いて、rDNA 遺伝子クラスター上、

およびそれ以外のゲノム上に挿入されている *R1*, *R2* 部分配列の転写配列の解析を進める。(5) インドクワコ (*B. huttoni*) のゲノム DNA を用い、MLE のゲノム上での分布の概要と、カイコ-クワコで顕著な構造の相違がある *BmTNML* 座位のような転移因子入れ子ユニットを探索する。また、*R1*, *R2* の個体中ゲノム (28SrRNA 遺伝子内外) での分布やコピー数をカイコ、クワコと比較する。

3. 研究の方法

(1) CIM の挿入年代の推定

CIM が単独で挿入されている座位 (9 番と 11 番染色体) に挿入された CIM およびその周辺の宿主ゲノム配列を用いて、コアレセントモデルに基づくベイズ推定により、CIM 挿入年代と算定した。

(2) *BmTNML* 座位の雑種次世代以降の動向

カイコ♀と交配前に *BmTNML* 座位が存在しないことを確認したクワコ♂ (あるいは逆の掛け合わせ) の F1 において、*BmTNML* 座位が確実にヘテロに受け継がれているかどうかを確認する。また F2 以降における *BmTNML* 座位の動向も調査し、雑種での転移因子マーカーの動向が理論上の数値と一致するか交配実験後の調査により検証した。

(3) *R2Bm* 因子の集団間比較

R2Bm (カイコの *R2* 因子) の隣接する 5' 側 28rRNA 遺伝子内の領域に ³²P でラベルしたプライマー と、*R2* 因子内の 3' 側にプライマーをいくつか設計し PCR を行い、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。この方法で、non-LTR 型レトロトランスポゾン特徴的な 5' 側の欠失を検出し、同時に本方法とともにサザンブロット法も併用し、rRNA 遺伝子クラスター中の *R2Bm* のコピー数を同定した。

(4) カイコゲノムにおける rDNA 配列の断片の存在を検出するため、ゲノムのコンテイングと EST、さらに同族鱗翅類の rDNA 配列を、BLAST 解析を基に収集し、それらを CAP3 Sequence Assembly Program を用いてアライメントさせ、rDNA 遺伝子、*R1* および *R2* の全長の転写単位の配列を決定した。次にゲノム領域オーソログから、インドクワコ、クワコ、カイコの低カバレッジゲノム配列からの *R1*, *R2* 配列を持つ contig までの配列を抽出し、同時にアッセンブルゲノム内の *R1*, *R2* 及び rDNA 配列全てに応じる非コード RNA の再構築を行った。

(5) インドクワコについての解析

ゲノム DNA を用い、CIM (*Bmmar2* タイプ) の探索と MLE の全容および、*R1*, *R2* の分布の把握を行う。

4. 研究成果

(1) *BmTNML* 座位以外の 9,11 染色体上の 2 つの座位への CIM の挿入年代推定の結果から、CIM はカイコと共通祖先のゲノムへほぼ同時に挿入された可能性が高いことが示唆されたが、全ての座位を解析してはいないので、今後、他の座位についての解析を進めたい。

(2) カイコとクワコを交配させた次世代 (どちらが♂でも♀でも、またクワコの生息場所に拘わらず) においては、カイコ型とクワコ型のヘテロの個体が出現し、それぞれの配列は、カイコ、クワコ双方の *BmTNML* 領域のものであった。また、F1 以降の後代 においても (人工交配)、カイコ型は維持されることが示唆された。これらから、日本クワコにおいて、*BmTNML* 座位の有無を調査することは、クワコにカイコ系統が混入したかどうかを確認できる簡便なスクリーニング法として有効であることが示唆され、ミトコンドリアの情報を加味すれば、集団の由来も同時に推定することが可能であると考えられた。

(3) *R2Bm* のプロファイルに関してカイコとクワコで比較したところ、*R2* はカイコの約 2 倍のコピー数 (200 ユニット中の約 40 コピー) 存在し、更に 5' 欠失現象が多く見られることから、特定のクワコ集団のゲノムにおいて *R2* が動いている、あるいは過去に活発に動いた可能性が、また交雑個体での *R2m* の 5' 欠失プロファイルは、クワコ親子個体 (集団) のゲノム中での *R2BM* の分布に依存し変動することが示唆された。

(4) カイコでは rDNA 領域の GC 含量は他のゲノム領域よりも高い中、*R1*, *R2* 因子の部分配列挿入周辺領域は更に高い GC 含量値を示し、全長挿入周辺領域配列の GC 含量はそれらよりも更に高かった。また、rDNA 領域以外に挿入されている *R1*, *R2* 部分配列が挿入された領域の GC 含有は rDNA 中に挿入された全長 *R1*, *R2* 挿入領域とほぼ同じく非常に高く、遺伝子に隣接した領域や、遺伝子融合箇所にも挿入されていた。従ってこれらの領域が転写に影響を及ぼすクロマチンに局所構造変化をもたらす二次構造の形成に関与している可能性が考えられた。また、rDNA および *R1*, *R2* の転写産物の長さに応じて複数の領域が非コード RNA の結合領域として同定され、また少数が複数の非コード RNA の特異的な標的となっていたことから、これらの上流または下流の遺伝子制御における *R1*, *R2* 部分配列が機能的な役割を果たしている可能性が考えられた。さらにクワコおよびインドクワコのゲノム上で *R1*, *R2* 挿入のないゲノム領域はすべて、カイコでは非コード RNA の標的であった。

(5) インドクワコのゲノム DNA の入手に困難

を極めたため、あまり進められなかったが CIM はカイコの *Bmmar2* に相当することが予測された。しかし他の *Bmmar* に関してカイコ、クワコの MLE と強い相関を持つ結果を得ることはできなかった。今後は、現在中国の西南大学に籍を置いている三田の協力を得ながらインドクワコゲノムの情報を入手しながら進めていきたい。

上記の研究成果に加え、本研究テーマの一つである MLE に関する解析を進めていく過程で、他の昆虫種の MLE に関するデータ、活性型 MLE である *mos1* を用いた実験からのデータ、またクワコの集団解析でミトコンドリア CO1 領域を用いた解析データを得ることができたので、協力研究者とともに学術発表を行った。

<引用文献>

1. Lidholm DA, Gudmundsson GH, Boman HG., A highly repetitive, *mariner*-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*., J Biol Chem., 25;266(18):11518-21., 1991.
2. Yuichi Kawanishi, Reiko Takaishi, Yutaka Banno, Hirofumi Fujimoto, Si Kab Nho, Hideaki Maekawa, Yumiko Nakajima, Sequence Comparison of *Mariner*-like Elements among the Populations of *Bombyx mandarina* Inhabiting China, Korea and Japan, Journal of Insect Biotechnology and Sericology 76, 79-87, 2007.
3. Yumiko Nakajima, Kazuo Hashido, Kozo Tsuchida, Naoko Takada, Teiichiro Shiino, Hideaki Maekawa, A novel tripartite structure comprising a *mariner*-like element and two additional retrotransposons found in the *Bombyx mori* genome, Journal of molecular evolution, 48(5), 577-585, 1999.
4. Jun Zhou, Thomas H. Eickbush, The pattern of R2 retrotransposon activity in natural populations of *Drosophila simulans* reflects the dynamic nature of the rDNA locus, PLoS Genet., 5(2):e1000386, 2009. doi: 10.1371/journal.pgen.1000386.
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 3 件)
 - ① Shigeki Nakagome, Yumiko Nakajima, Shuhei Mano, Biogeography Revealed by *Mariner*-Like Transposable Element Sequences via a Bayesian Coalescent Approach, Journal of Molecular Evolution, 77(3):64-69, 2013., doi: 10.1007/s00239-013-9581-0. 査読有
 - ② Masako Yokoo, Ryosuke Fujita,, Yumiko Nakajima, Mamoru Yoshimizu, Hisae Kasai, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Mos1transposon-based transformation of fish cell lines using baculoviral vectors, Biochem. Biophys. Res. Comm., 439, 18-22, 2013., doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.037 査読有
 - ③ Kaori Yamada, Yuichi Kawanishi, Akinori Yamada, Gaku Tokuda, Raj Deep Gurung, Takeshi Sasaki, Yumiko Nakajima, Hideaki Maekawa, A novel cluster of *mariner*-like elements belonging to *mellifera* subfamily from spiders and insects: implications of recent horizontal transfer on the South-West Islands of Japan, Genetica, 142, 149-160, 2014., DOI 10.1007/s10709-014-9762-9. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Yumiko Nakajima, Shigeki Nakagome, Shuhei Mano, A *mariner* transposon inserted by some other transposable elements at different period in the genome of domesticated *Bombyx mori* and the most related species *B. mandarina*, BIT's 3rd World DNA and Genome Day-2012, 2012.04.28., Xi'an, China.
- ② Yumiko Nakajima, Shigeki Nakagome, Shuhei Mano, Evolution and biogeography of *Bombyx mandarina* compared with the domesticated *mori* revealed by Bayesian inference of DNA sequences data from some transposons including *mariner*-like elements (MLEs), XXIV International Congress of Entomology, 2012.08.25., Daegu, South Korea
- ③ Kaori Yamada, Yuichi Kawanishi, Seiichiro Okuma, Hanako Iwasaki, Takeshi Sasaki, Yumiko Nakajima, Hideaki Maekawa, Verification of horizontal gene transfer (HGT) of movable element, *mariner*-like element (MLE), among various insects and spiders inhabiting the South-West Islands of Japan., XXIV International Congress of Entomology, 2012.08.23., Daegu, South Korea
- ④ 山田香織, 川西祐一, 岩崎華子, 佐々木健志, 中島 裕美子, 徳田岳, 前川秀彰, マリナー様配列 (MLE) のクモ・ハチに見られるゲノム内配列維持機構: 多様化を伴う垂直伝播?, 日本蚕糸学会合同支部

大会 第 66 回 (東北支部), 第 68 回 (中部支部), 第 64 回 (東海支部, 第 78 回 (関西支部), 第 68 回 (九州支部), 2012.11.10., 岩手大学, 盛岡市.

- ⑤ 山田香織, 川西祐一, Gurung Raj Deep, 佐々木 健志, 中島 裕美子, 徳田 岳, 前川秀彰, 南西諸島に棲息する昆虫類からの新しい *mellifera* タイプ MLE の単離とそれらの水平伝播について, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.13., マリンメッセ福岡, 福岡市.
- ⑥ 川西 祐一, 伴野 豊, 前川 秀彰, 中島 裕美子, 挿入座位を特定したマリナー様転移因子 (*mariner-like elements*; MLEs) の配列比較に基づく日本産クワコの系統解析, 平成 25 年度第 69 回日本蚕糸学会九州支部研究発表会 昆虫機能・利用学術講演会, 2013.10.09., 久米島博物館, 沖縄県島尻郡.
- ⑦ 行弘研司, 河本夏雄, 富田秀一郎, 秋月 岳, 伊藤雅信, 中島 裕美子, 日本産クワコはミトコンドリア COI 塩基配列の変異により二分される, 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014.09.18., 長浜バイオ大学, 長浜市
- ⑧ 行弘研司, 河本夏雄, 富田秀一郎, 阪口洋樹, 伊藤雅信, 中島裕美子, 日本産クワコの北陸から九州および周辺島嶼におけるミトコンドリア COI ハプロタイプの推移, 日本遺伝学会第 87 回大会, 2015.09.25., 東北大学川内キャンパス, 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島裕美子 (NAKAJIMA YUMIKO)
九州大学・統合安全管理センター・教授
研究者番号: 70244340

(2) 研究分担者

間野修平 (MANO SHUHEI)
統計数理研究所・准教授
研究者番号: 20372948

手島康介 (TESHIMA KOSUKE)
九州大学・理学系研究科・助教
研究者番号: 20447593

(3) 連携研究者

矢後勝也 (YAGO MASAYA)
東京大学・総合研究博物館・助教
研究者番号: 70571230

三田和英 (MITA KAZUEI)
(独) 農業生物資源研究所・上席研究員
研究者番号: 30159165

(4) 協力研究者

伴戸久徳 (BANDO HISANORI)
北海道大学・農学研究院・教授
研究者番号: 20189731

伴野豊 (BANNO YUTAKA)
九州大学・連合農学研究院・准教授
研究者番号: 50192711

行弘研司 (YUKUHIRO KENJI)
(独) 農業生物資源研究所・主席研究員
研究者番号: 50343992