

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23114006

研究課題名(和文)レトロトランスポゾンがもたらす非コードDNA領域のクロマチン構造変化

研究課題名(英文)Modulation of chromatin structure on the non-coding DNA through retrotransposons

研究代表者

梶川 正樹(Kajikawa, Masaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・講師

研究者番号：90361766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 61,400,000円

研究成果の概要(和文)：レトロトランスポゾンの新規転移をゼブラフィッシュ生体内で人工的に誘導できる実験系を開発した。本実験系を用いて、生体内で新規転移したレトロトランスポゾンの転写が抑制されていないことを発見した。内生の変異原であるレトロトランスポゾンは、その転写および転移が高度に抑制されていると考えられていたが、本発見はこれまでの考えを覆す成果である。更に、新規転移したレトロトランスポゾンDNAの低メチル化状態および転写の活性化が、ゼブラフィッシュの世代を超えて引き継がれることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel system inducing a new insertion of retrotransposons in zebrafish in vivo. Using this system, we revealed that the transcription of the newly inserted retrotransposons has not been silenced though the transcription had been considered to be highly repressed so far. Moreover, we revealed that the activation of the newly inserted retrotransposons is maintained at least for several generations of the life cycle of zebrafish. These data provide a new insight in the field of retrotransposon study.

研究分野：分子生物学

キーワード：転移因子 レトロトランスポゾン DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムには多量の非コード領域が存在する。この非コード領域の大きな構成要素のひとつにレトロトランスポゾンが存在する。レトロトランスポゾンは、転移因子の一種であり、宿主ゲノム上で自身のコピーを転移により増幅する。例えば、ヒトゲノムはその約半分の領域が転移因子で構成されており、転移因子が宿主生物ゲノムの大きな構成要素であることが分かる。また、転移因子は、宿主ゲノム DNA の単なる構成要素のみならず、ゲノムの発現やその成り立ちに大きく関与していると考えられている。しかし、転移因子が、宿主ゲノムの発現調節にどのような影響を及ぼしているのか良く理解されていない。また、転移因子がその大きな構成要素となっている、宿主ゲノムの非コード領域の機能に関してもいまだ数多くの謎が残されている。

### 2. 研究の目的

生物ゲノムの非コード DNA 領域の機能としてよく知られているものには、テロメアやセントロメアその他、エンハンサーやインシュレーターなどの遺伝子発現調節に機能を持つ配列が知られている。しかし、既知の機能配列は非コード DNA わずかな領域を占めるのみであり、非コード DNA 領域にはまだ明らかにされていない、ゲノムの遺伝子ネットワーク発現に必要な機能があると考えられている。本研究の大目標は真核生物非コード DNA 領域の機能の全貌を明らかにすることである。この目標を見据えて、私は、非コード DNA 領域の大きな部分を構成するレトロトランスポゾンが、非コード DNA の機能とその成り立ちにどのような影響を及ぼしてきたのか、また、及ぼしているのかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

生体内でレトロトランスポゾンを新規転移させる実験系は構築されていない。本研究ではまず、生体内でレトロトランスポゾンを新規に転移させる実験系の構築を目指した。用いた生物種はゼブラフィッシュである。ゼブラフィッシュ生体内でレトロトランスポゾンの一種である転移因子 LINE を新規に転移させる。新規に転移した LINE 配列が宿主のゲノム配列のエピジェネティックなゲノム情報、主に、DNA のメチル化とヒストン修飾にどのような影響を及ぼすのか解析する。加えて、新規転移した LINE 配列自身にどのようなエピジェネティックな情報が導入されるのか解析する。

### 4. 研究成果

(1) レトロトランスポゾンの新規転移をゼブラフィッシュ生体内で人工的に誘導できる実験系を開発した。in vitro で LINE RNA を人工的に合成し、この合成 LINE RNA をゼ

ブラフィッシュの受精卵にマイクロインジェクションで導入する。LINE RNA をマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュをある一定時間発生させた後、ゲノム DNA を抽出し、定量 PCR で LINE の新規転移を検出する実験系を構築した。LINE RNA の種類や導入量によって、LINE の新規転移数を細胞当たり 1~10,000 コピーにも及ぶ広範囲で調整することに成功した。本実験系は、LINE の新規転移が宿主ゲノムに及ぼす影響の解析のみならず、LINE が宿主細胞内で発生段階の何時、どの程度転移しているのか、非コード領域の構成要素である LINE の転移・増幅様式の解明にも非常に有用なツールである。また、本実験系を用いて LINE 配列のみならず任意の遺伝子配列を宿主ゲノムに挿入することにも成功しており、ある目的タンパク質の大量発現系への応用も可能である可能性がある。更には、ゼブラフィッシュの人工変異原として様々なゼブラフィッシュ変異体を作製するためのツールとして応用する可能性も十分に考えられる。

(2) ゼブラフィッシュ生体のゲノム DNA 内に新規転移した転移因子 LINE のプロモーター領域は、DNA のメチル化修飾を受けないことを発見した。また、この新規転移 LINE 配列の低メチル化状態が LINE 近傍の宿主ゲノム DNA にも広がることを発見した。一般に転移因子は、その過剰な転移が宿主ゲノムに大量の変異を引き起こしゲノムの機能を損なう恐れがあるため、LINE の転移は転写の段階で高度に抑制されていると考えられている。事実、ゼブラフィッシュのゲノム DNA 中に既に存在している LINE 配列はその CpG サイトが高度にメチル化されていることが明らかにされている。しかし、今回の我々の研究成果は、新規に転移した LINE 配列にはこの DNA のメチル化修飾が導入されないことを示している。ほぼ同一の配列である内生の LINE 配列と新規転移した LINE 配列の DNA メチル化状態が大きく異なるのは非常に興味深い知見である。このメチル化状態の相違の分子メカニズムを解明することは、今後の転移因子研究に欠かすことのできない重要な課題である。

(3) ゼブラフィッシュ生体のゲノム DNA 内に新規転移した転移因子 LINE は、その転写が抑制されていないことを発見した。内生の変異原であるレトロトランスポゾンは、その転写および転移が高度に抑制されていると考えられていたが、本発見はこれまでの考えを覆す成果である。今後、これら新規転移 LINE 配列からの転写が更なる LINE 転移を引き起こしているか否か明らかにする必要がある。本研究結果は、LINE がゼブラフィッシュの遺伝子配列内部やその近傍に新規転移した場合、近傍遺伝子の転写に大きな影響を及ぼしうる可能性を示唆するものである。

(4) 新規転移したレトロトランスポゾン DNA の低メチル化状態および転写の活性化は、ゼブラフィッシュの世代を超えて引き継がれることを発見した。これまでの知見では、マウスを用いた実験で、転移因子 LINE の転写抑制が生殖系列細胞において piRNA を介して行われていることが示されているが、この知見から推測すれば、新規転移した LINE 配列を世代を経れば、すなわち、新規転移 LINE 配列が生殖系列細胞を経るれば、その転写が抑制されると考えられる。しかし、今回の我々の研究結果は、新規転移 LINE が少なくとも 2 世代後の子孫に引き継がれても、すなわち生殖系列を 2 回経由しても、その転写が抑制されないことが示された。内生 LINE は高度な DNA のメチル化を介してその転写が抑制されていると考えられるにもかかわらず、新規転移 LINE に転写抑制がかからない事実は非常に興味深い。これらの事実は、レトロトランスポソンの転移活性がエピジェネティックな機構により調節され且つ世代を超えて伝達されることを示唆している。転移因子 LINE の転写調節がどのような分子メカニズムで調節されているのかを解明することは今後の重要な課題である。

(5) 新規転移 LINE 配列の転写活性化の維持に LINE 配列の 5' 末端領域の約 50bp の配列が重要であることを発見した。この領域に転写活性化を維持するために必須の何らかの因子が作用していると考えられる。興味深いことに、この 50bp の配列は、その転写が高度に抑制されていると考えられる内生 LINE 配列にも同一のものが存在する。同じ配列にもかかわらず、新規転移 LINE の転写は活性化され、内生 LINE の転写は高度に抑制されている事実は非常に興味深い。

#### 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7件)

Yamaguchi K., Kajikawa M. and Okada N. LINE retrotransposition and host DNA repair machinery. *Mob. Genet. Elements*, 5, 92-97 (2015) 査読有  
DOI: 10.1080/2159256X.2015.1096998

Yamaguchi K., Kajikawa M. and Okada N. Integrated mechanism for the generation of the 5' junctions of LINE inserts. *Nucleic Acids Res.*, 42, 13269-13279 (2014) 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gkv041

Hayashi Y., Kajikawa M., Matsumoto T. and Okada N. Mechanism by which a LINE protein recognizes its 3' tail RNA.

*Nucleic Acids Res.*, 42, 10605-10617 (2014) 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gku753

Terasaki N., Goodier J.L., Cheung L.E., Wang Y.J., Kajikawa M., Kazazian H.H. and Okada N. In vitro screening for compounds that enhance human L1 mobilization. *PLoS One*, 8, e74629 (2013) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0074629

Kajikawa M., Yamaguchi K. and Okada N. A new mechanism to ensure integration during LINE retrotransposition: a suggestion from analyses of the 5' extra nucleotides. *Gene*, 505, 345-351 (2012) 査読有  
DOI: 10.1016/j.gene.2012.02.047

Kajikawa M., Sugano T., Sakurai R. and Okada N. Low dependency of retrotransposition on the ORF1 protein of the zebrafish LINE, ZfL2-1. *Gene* 499, 41-47 (2012) 査読有  
DOI: 10.1016/j.gene.2012.02.048

Nakamura M., Okada N. and Kajikawa M. Self-Interaction, nucleic acid binding, and nucleic acid chaperone activities are unexpectedly retained in the unique ORF1p of zebrafish LINE. *Mol. Cell. Biol.* 32, 458-469 (2012) 査読有  
DOI: 10.1128/MCB.06162-11

#### [学会発表](計2件)

山口勝己、梶川正樹、ゼブラフィッシュ生体内での LINE 新規転移部位の DNA メチル化状態の解析、口頭発表、日本遺伝学会第 87 回大会、仙台、2015/9/26

柳川麦、梶川正樹、転移因子の新規転移が引き起こすクロマチン構造変化、ポスター発表、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015/12/1

松本琢磨、梶川正樹、転移因子 LINE タンパク質の RNA 認識機構、ポスター発表、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015/12/1

松本琢磨、梶川正樹、転移因子 LINE タンパク質の RNA 認識機構、ポスター発表、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015/12/1

田村政人、岩森暖、梶川正樹、新規転移した LINE の転写制御に関する研究、口頭発表、第 38 回日本分子生物学会年会、神

戸、2015/12/4

〔図書〕(計1件)

梶川正樹、化学同人、ゲノムをつかさどるインターメア、2015、p101-110

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 正樹 (KAJIKAWA, Masaki)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
講師

研究者番号：90361766