

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770002
 研究課題名 (和文) ゲノム中に大量に散在するレトロトランスポゾン配列のゲノム機能における役割
 研究課題名 (英文) Functional roles for retrotransposons in genome regulation

研究代表者
 一柳 健司 (ICHIYANAGI KENJI)
 国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
 研究者番号：70401560

研究成果の概要：

MIR は哺乳類ゲノムに 1 万コピー以上存在するレトロトランスポゾンである。この配列はよく保存されており、何らかの機能を有していると考えられた。そこで、その機能をデコードするタンパク質を同定するため、酵母菌 one-hybrid スクリーニング系を用いて、この配列に結合するタンパク質をスクリーニングしたところ、ヒストン H2A.Z バリエーションおよび機能未知の Zn フィンガー・タンパク質を結合因子として同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・機能・再編・発現・維持

1. 研究開始当初の背景

レトロトランスポゾンは哺乳類ゲノムの半分近くを占める転移性因子の一群であり、転移することによってコピー数を増加させている。これらの転移機構はおおよそのところが解明されていたが、これらの配列がただの寄生配列なのか、それとも何らかの機能を有しているのかということについては、ほとんど分かっていなかった。多くの哺乳類ゲノ

MIRの配列構造



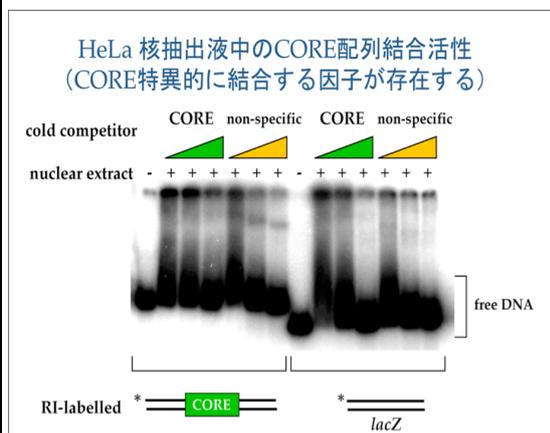
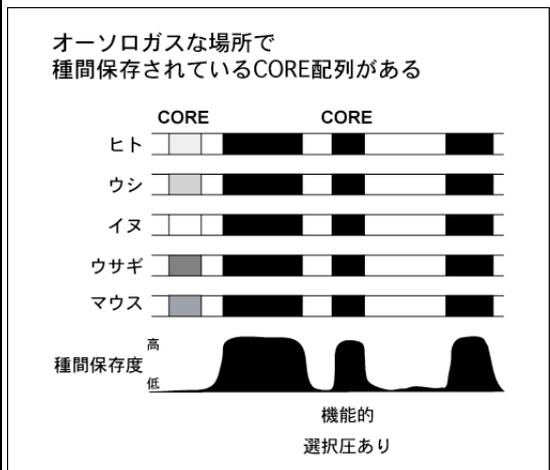
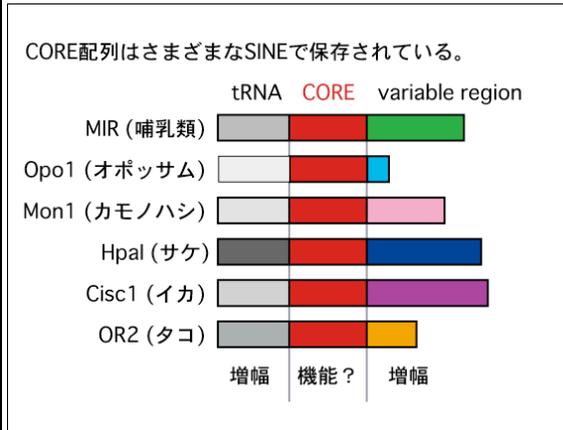
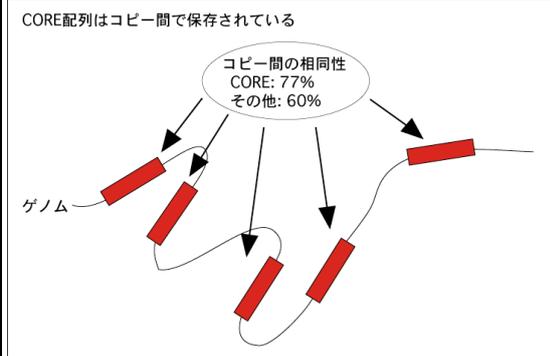
増幅にはtRNA領域とLINE-2領域が必要だが、CORE領域は必要でない。
 しかし、配列保存性が高いのはCORE領域。

ムが解読されたことを背景に、2006年頃から種間で保存された配列を同定する解析が精力的に行われ、non-coding 領域に予想以上に種間保存配列が存在すること、またそれらの多くがレトロトランスポゾン配列に由来することが明らかとなり、レトロトランスポゾンが何らかの機能を持っていることが示唆され始めていた。

MIR は哺乳類全体で共通に存在する唯一の SINE (レトロトランスポゾン的一种) であり、現存哺乳類の目・科が成立した頃 (約1億年前頃) に高い転移活性を持っていたと考えられているが、現在は活性を失っている。その古い起源にも関わらず、この配列は3つの観点から非常に良く保存されている。まず第一に MIR の中央配列が同一ゲノム内のコピー間でよく保存されている。MIR は tRNA 領域と中央領域 (CORE 配列)、および LINE 相同領域から成り、これらの領域がひと繋がりて転移する。つまり、それぞれの MIR のコピーの中の3領域は同時に発生したものであり、転移後、同じ時間だけランダムな変異にさらされてきたことになる。しかしながら、tRNA 領域と LINE 相同領域には多くの変異が蓄積しているのにも関わらず、CORE 配列は有意に変異が少ない。前述の MIR の大部分は1億年以上前のできたものだが、CORE 配列は1億年の間、あまり変異しなかったことになる。第二に、この CORE 配列は HpaI (サケの SINE)、OR2 (タコの SINE) など異なる SINE の間でも保存されている。保存性が見られるのは CORE 配列のみであり、tRNA 領域、LINE 相同領域はそれぞれの SINE に固有の配列になっている。このような SINE ファミリーは非常に特異であり、CORE 配列を共有する某かの意味があるように見える。最後に、哺乳類間で非常に良く保存された MIR 配列が多く見つかることである。これは正に、最初に触れた non-coding 種間保存配列である。これらのことから MIR は (特に CORE 配列は) 機能を有するレトロトランスポゾンの一つではないかと考えられた。

2. 研究の目的

MIR は哺乳類全体で保存されるレトロトランスポゾンであり、転移活性のピークが哺



乳類の種放散の時期と重なっているのも、もし MIR が機能を持っているとすれば、それは哺乳類進化を考える上でも大変興味深い。そこで、MIR の機能を解明することを目的として、まず MIR に結合するタンパク質を同定し、そのタンパク質をキャラクタライズすることを第一の目標に本研究を開始した。

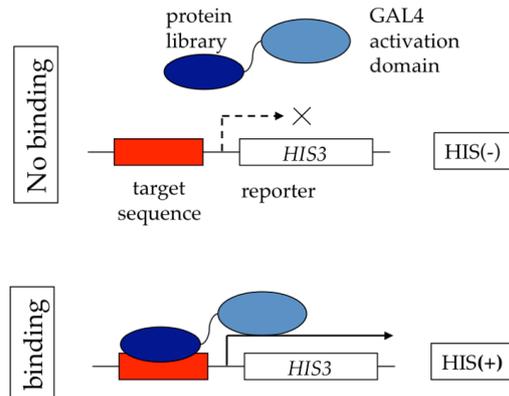
3. 研究の方法

MIR はゲノムに 1 万コピー以上存在するため、これらを全てノックアウトして表現型を観察する等のアプローチを取ることはできない。MIR は DNA 上の配列であるので、これが機能をコードしているのであれば、この配列に結合してその機能をデコードするタンパク質があるのではないかと考え、そのタンパク質の同定、キャラクタリゼーションを通して MIR の機能に迫ることを目指した。まず、HeLa 細胞の核抽出液中に MIR に結合するタンパク質が存在することを確認し、HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを作成して、この中から CORE 配列結合タンパク質をコードするものを酵母菌 one-hybrid 法によりスクリーニングを行うストラテジーを立てた。

4. 研究成果

前述のように、HeLa 細胞の核抽出液中に CORE 配列に結合するタンパク質が存在することが確認できたので、その結合因子を同定するため、HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを作成した。さらに CORE 配列を持つレポータープラスミドを作成した。レポーター遺伝子のプロモーター上流に 2 コピー以上の CORE 配列を含むものは転写の活性化因子なしに強い発現があったので、上流に 1 コピーだけ CORE 配列を持つものをレポーターに使用した。これらのコンストラクト、ライブラリーを用いて、酵母菌の one-hybrid 法にて CORE 結合因子をコードする cDNA クローンの単離を試みた。スクリーニングの条件を検討して、擬陽性コロニーの出現が少ない条件を選び出し、その条件下でポジティブクローンの選抜を行った。ポジティブクローンからプラスミドを単離して、再確認実験後、cDNA 配列を

決定したところ、ヒストンバリエーションの一つである H2A.Z と機能未知の Zn フィンガー・タンパク質を同定することができた。現在、前者については再構成ヌクレオソームを用いて、また後者についてはリコンビナント・タンパク質を用いて、その結合様式を解析しようとしているところである。特に H2A.Z は転写制御やクロマチン機能と深く関わっており、興味深い。



cDNA ライブラリー・サイズ	1x10 ⁶
独立な His(+) クローン数	~50
再現性テストをパスしたもの	2

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) Suzuki J., Yamaguchi K., Kajikawa M., Ichianagi K., Adachi N., Koyama H., Takeda S., and Okada N. (2009) “Genetic evidence that non-homologous end joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition.” PLoS Genet. 5: e1000461 査読あり

(2) Ichianagi K. and Okada N. (2008) “Mobility Pathways for vertebrate L1, L2, CR1, and RTE-clade retrotransposons.” Mol. Biol. Evol. 25:1148-1157 査読あり

(3) 一柳健司 (2008) “カモノハシ・ゲノムからみた哺乳類の進化” 科学 78:8817-8819 査読なし

[学会発表] (計1件)

Ichiyonagi K., Kitayama J., and Sasaki H. (2009) “Locus-specific hyper- and hypomethylation of mouse B1 elements in male germ cells.” in Genomic Impact of Eukaryotic Transposable Elements, Pacific Grove, CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 健司 (ICHIYANAGI KENJI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
研究者番号：70401560