

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570212

研究課題名（和文）トランスポゾンの増幅・転移が遺伝子発現ネットワークを進化させた可能性を探る

研究課題名（英文）Evolution of genetic regulatory networks through amplification and transposition of transposons.

研究代表者

彦坂 暁 (HIKOSAKA AKIRA)

広島大学・大学院総合科学研究科・助教

研究者番号：30263635

研究成果の概要（和文）：

我々はツメガエルにおいて長期間転移活性を保持しているトランスポゾンが遺伝子発現ネットワークの進化に関与してきた可能性について調べた。ゲノムデータから T2-MITE トランスポゾンを網羅的に探索・分類する手法を開発し、探索を行なった。またそれらのトランスポゾンが遺伝子に対してどのような位置に挿入されているかを解析し、遺伝子発現のデータも参照して、遺伝子ネットワークの進化に関与してきた可能性のある T2-MITE トランスポゾンを見つけた。

研究成果の概要（英文）：

We studied the possibility that some transposons whose transposition activities have been retained for a long time in *Xenopus* have been involved in the evolution of genetic regulatory network. We developed a new strategy to find and classify the T2-MITE transposon family and searched the *Xenopus* genomes for T2-MITEs. In addition, we analyzed insertion loci of such transposons and gene expression patterns of neighbor genes and found T2-MITE subfamilies whose transposition and amplification might have driven the evolution of genetic regulatory network of *Xenopus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：遺伝子進化、トランスポゾン、ツメガエル、ゲノム進化、MITE、自然選択、遺伝子発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

動く遺伝子である DNA 型の転移因子（トランスポゾン）は一般にホストにとっては無用なので、トランスポゾンを保存する自然選択

（純化選択）は働かない。そのためトランスポゾンは一つのホストの中で長期間にわたり活性を維持して“生きのびる”ことは困難だと考えられてきた。

ところが我々はこのような常識をくつがえす非常に“元気で長生き”なトランスポゾンを発見した。ツメガエルゲノム内で優勢な MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) 型トランスポゾン T2-MITE ファミリーのいくつかのサブファミリーはアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) とネッタイツメガエル (*Xenopus (Silurana) tropicalis*) の両種に存在しており、両種が分岐した数千万年以上も前から長期間にわたりゲノム内で存続してきたと考えられた。我々は T2-MITE を網羅的に探索・分類するための bioinformatics 的解析手法 (TS-clustering 法) を開発し、これを用いてネッタイツメガエルゲノムを用いて T2-MITE の探索・分類を行ない、これらを 16 のサブファミリーに分類し、これらのうちの幾つかは現在でも転移活性を維持している可能性が高いことを bioinformatics 的解析により示した (Hikosaka and Kawahara 2010)。

これらの T2-MITE サブファミリーがいかにしてこれほど長い間生きのびることができたのかは興味深い謎である。もしこれらの T2-MITE サブファミリーがホストにとってまったく有害無益だったなら、ゲノム内で長期間生きのびるのは難しかっただろう。これらのサブファミリーは単に配列が保存されているだけでなく、その転移活性が長期にわたって保存されていることから、我々は、これらが転移あるいは増幅すること自体が、ホストであるツメガエルに何らかの利益をもたらしてきたので、転移活性が純化選択によって保存されてきたのではないかと考えた。もしトランスポゾンの転移が宿主に取って有意義な機能をもつとすれば、進化学的に極めて興味深い。

トランスポゾンの転移がホストにとってどのような利益をもたらさうかは今のところ不明であるが、本研究ではとくに MITE 由来の同じ配列が大規模に転移・増幅したことが、ゲノム内の転写調節シスエレメント分布の変化、すなわち遺伝子発現ネットワークのつなぎかえ (rewiring) を引き起こし、ツメガエルの進化を促進してきた可能性に着目し、研究計画をたてた。

## 2. 研究の目的

MITE に由来する配列 (MITE-derived sequence: MDS) がネッタイツメガエルの遺伝子発現調節に関与している可能性を探るために、次の3点を明らかにすることを本研究の目的とした。

(1) MDS が遺伝子領域に対してどのような位置に存在しているか (エキソンのコーディング領域、ノンコーディング領域、イントロン、遺伝子の上流または下流、など) をネッタイツメガエルゲノム配列データ、およびアノテーションのデータベース解析により網羅的に明らかにする。

(2) MDS の近傍遺伝子の発現パターンと、挿入された MITE の種類・位置・距離の間に何らかの相関が見られるかを、ネッタイツメガエル遺伝子発現 (マイクロアレイ) データベース解析により明らかにする。

(3) MDS が近傍遺伝子の転写調節 (プロモーター/エンハンサー/サイレンサー) 機能に関与しているかを、ネッタイツメガエルへの外来遺伝子導入による in vivo での解析で明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Joint Genome Institute (JGI) が公開しているネッタイツメガエルゲノム配列データを用いて、T2 ファミリーの各サブファミリーの MITE 由来配列 (MDS) 挿入箇所を BLAST で検索する。次に各 MDS が近傍の遺伝子に対してどのような位置 (エキソンのコーディング領域、ノンコーディング領域、イントロン、遺伝子の上流または下流) にあるかを Ensembl が公開している遺伝子アノテーションデータベースに照らして調べる。この解析には多量の情報処理が必要なため、Ruby 言語により解析プログラムを開発して用いる。

(2) NCBI の遺伝子発現バンク (GEO) で公開されているネッタイツメガエルのマイクロアレイデータを用いて、(1) で見つけた MDS 挿入箇所の近傍に位置する遺伝子の発現パターンと、挿入されている MITE の種類、位置、距離との間に何らかの相関関係が見られるかを調べる。この解析には多量の情報処理が必要なため、Ruby 言語により解析プログラムを開発して用いる。

(3) 上記(2)で見つけた近傍遺伝子の発現調節に関与している可能性のある MDS と、その周辺領域をネッタイツメガエルから PCR によってクローニングする。これらを用いてシスエレメント機能解析用のレポーターベクターを作製し、ネッタイツメガエル受精卵に導入し、レポーター遺伝子の発現様式を調べる事によって発現調節の解析を行なう。

#### 4. 研究成果

(1) トランスポゾンなどの反復配列が、遺伝子に対してどのような位置に存在しているかをゲノム配列データおよび遺伝子アノテーションデータを用いて解析するワークフロープログラムを開発した。これを用いて T2-MITE 由来配列の挿入位置の解析を行ない、T2-MITE のあるサブファミリーが遺伝子の上流領域近傍に挿入される傾向が（他のサブファミリーに比べて）有意に高いことを明らかにした。この結果から、このサブファミリーが遺伝子発現調節エレメントとして働いている可能性が示唆された。

(2) T2-MITE 由来配列が上流領域近傍に挿入された遺伝子について、その発現様式をマイクロアレイデータを参照して解析するワークフロープログラムを開発した。これを用いて、上記サブファミリーが上流領域に挿入された遺伝子群の発現の組織特異性を調べたところ、それらの発現様式の間に関係がみられた。このサブファミリーが遺伝子発現調節エレメントとして働いている可能性がさらに支持された。

(3) 上記サブファミリー由来配列を含む領域をいくつか、発現調節機能を持つ配列の候補としてピックアップして、ネッタイツメガエルから PCR により単離した。これを用いて発現解析用のベクターの構築をおこない、現在も引き続き計画を進めている。

なお、研究の進展の過程で、当初計画時には予期できなかった事態が生じたため、これに対応して以下の成果もあげた。

(4) T2-MITE ファミリーが当初考えられていたよりも広い配列バリエーションを示す事が明らかになった。これまで T2-MITE は TTAA 配列をターゲットとし、AGGRR 配列を TIR (Terminal Inverted Repeat) 末端にもつものとされていたが、様々な証拠から、末端配列は AGGRR に限定されず、より広い末端配列のバリエーションがあることが示唆されてきた。そこで我々は以前開発した TS-clustering 法をベースに、T2-MITE をさらに広範囲に検索・分類する手法を Ruby 言語を用いて開発した。さらにこれを用いてツメガエルおよび他の動物種において T2-MITE の検索・分類を行なった。その結果、T2-MITE がゲノム内で大量に増幅している種、ほとんど見られない種など、T2-MITE のポピュレーションには種ごとに大きな違いがあることが分かった。

(5) 最近になってアフリカツメガエルのゲノ

ム情報が open になったため、これを用いた T2-MITE の解析を行なった。その結果、アフリカツメガエルにおいても T2-MITE はゲノム内で大量に増幅しているが、活性を保っているサブファミリーの構成は必ずしもネッタイツメガエルとは一致しないことが分かった。

#### 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 1 件)

1. Akira Hikosaka, Kazuki Nishimura, Tomoe Hikosaka-Katayama, Akira Kawahara. Recent transposition activity of *Xenopus* T2 family miniature inverted-repeat transposable elements. *Molecular Genetics and Genomics*. 査読あり、285 巻、2011 年、219-224、DOI 10.1007/s00438-010-0599-3

[学会発表] (計 4 件)

1. 彦坂暁、小西世悟、河原明、ツメガエルの転移因子 T2-MITE の転移酵素は純化選択により保存されてきたのか?、日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13 日、大阪大学

2. 彦坂暁、ツメガエル T2-MITE トランスポゾンが「長生き」な理由を考える、第 5 回日本ツメガエル研究集会、2011 年 10 月 6 日、静岡県熱海市

3. 彦坂暁、河原明、トランスポゾン T2-MITE のシスエレメント進化における役割、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 22 日、北海道旭川市

4. 彦坂暁、河原明、ツメガエルのトランスポゾン T2-MITE ファミリーを動かす転移酵素群の進化、第 12 回日本進化学会大会、2010 年 8 月 5 日、東京工業大学

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akirahs/Site/top.html>

#### 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・助教

研究者番号：30263635

(2)研究分担者

河原 明 (KAWAHARA AKIRA)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：50112157

(3)連携研究者

( )

研究者番号：