

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650122

研究課題名(和文)染色体再編成におけるトランスポゾン動態のリアルタイム解明

研究課題名(英文) Real-time visualization of transposon dynamics in the course of chromosome rearrangement

研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII, Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・招へい准教授

研究者番号：40360276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：トランスポゾンは、転移因子としての遺伝子攪乱に加え、ゲノムに散在する反復配列として、多様な染色体編成変化を生み出す能力をもつ。本研究では、染色体再編成が促される細胞におけるトランスポゾン動態をリアルタイムに解明し、染色体編成変化への積極的貢献の有無を直接的に解析した。その結果、染色体変化はゲノムの恒常性維持機構を偶然かいくぐった産物が定着したのではなく、トランスポゾンの持つ変容能力を積極的に活用した結果であることを結論づけた。

研究成果の概要(英文)：In addition to its disturbing influence on the transcriptional circuit in host cells by transposition, transposon potentially has an ability to generate various gross chromosomal rearrangements by virtue of its repetitive and interspersed nature along the chromosomes. In this study, we visualize the real-time transposon dynamics in the course of induced chromosome rearrangement, and investigate the direct contribution of transposons to the event. Our results suggest that the chromosome rearrangement may not be a consequence of an unintended failure of genome surveillance machineries, but a consequence of actively liberating transposon and making use of its massive chromosome transfiguration ability.

研究分野：生物学

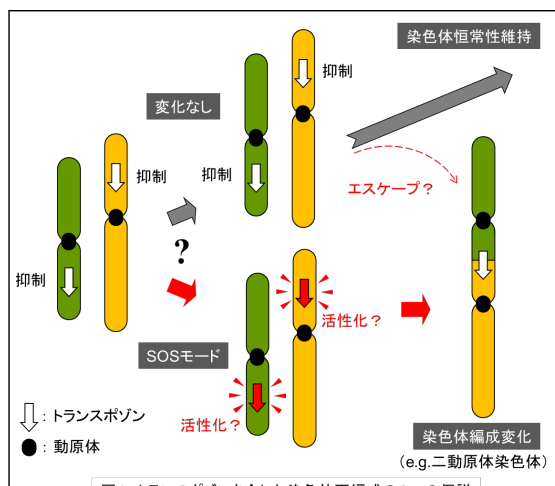
科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・染色体動態

キーワード：ゲノム 染色体 トランスポゾン セントロメア

### 1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン(Transposon)は、「動く遺伝子」として古くから注目され、特に生物進化において種分岐や生殖隔離を生む主要な原因の一つと考えられてきた。それは主に、転移因子としてのゲノム遺伝子発現の攪乱効果に加え、ゲノム中に散在するトランスポゾン配列同士の組換えが生み出す染色体編成変化による寄与が極めて大きいものと捉えられている。そのような染色体編成変化には、染色体の転座や部分重複、部分欠失、逆位などが含まれるが、その中で一定の確率で生じる二動原体染色体(図1参照)が、細胞分裂時に染色体分配装置によって逆向きに引っ張られることで生じる切断(Break)が、切断部の染色体融合(Fusion)を通じて新たな二動原体染色体を作り出し、それが再び染色体分配装置によって逆向きに引っ張られ(Bridge)、また別の切断に至るといった「BFBサイクル」を通じて、より多様な染色体編成変化を生むと考えられている。ゲノムの恒常性を維持し、生物種としての同一性を保つためには、このような作用は絶対に避けるべきで、通常細胞は様々な仕組みでトランスポゾンを不活性化している。

本研究で言及したい疑問は、進化に至る過程でトランスポゾンは活性化を許されるのか、という点であった(図1)。恒常性維持のために、いかなる場面でも敵対するトランスポゾン活性化は許容されず、その抑制からのエスケープで生じた低頻度の染色体再編成細胞が結果的に進化に定着したのか、ある



いは細胞は状況に応じて恒常性維持状態から染色体変化を促進する SOS モードへと変貌し、トランスポゾン活性化が許容されたために進化が生じたのか、染色体再編成に至る経緯はこれまで全く定かではなかった。

### 2. 研究の目的

上述のような経緯について理解を得るためには、細胞レベルでトランスポゾン活性化を直接解析する必要がある。しかし進化の過程にある細胞を検証することは極めて困難である。私たちは、分裂酵母の染色体動原体

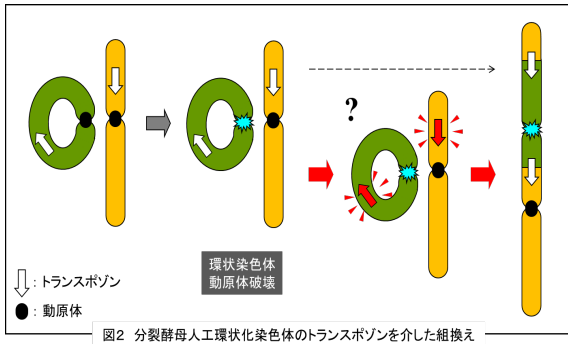
部位を生きたまま破壊する実験系で、自発的な染色体再編成の誘導に成功している(Ishii et. al. (2008) Science)。本研究ではその細胞でのトランスポゾン動態をリアルタイムに解析し、上記問題の理解に繋げることを目的とした。ここで得られる結論はトランスポゾンのゲノムにおける働きをより明確にするものであり、進化過程への洞察がより深まることが期待された。

そもそもトランスポゾンは細胞外来性の因子であり、内在性の遺伝子発現を攪乱する働きがあるため、基本的に宿主の細胞ゲノムとは対峙する存在と捉えられている。しかし近年になって、トランスポゾンが一つの主要構成要素を占める遺伝子外ゲノム領域、いわゆる「ジャンク DNA」領域は、当初想定されていたよりもはるかに重要な機能を有しており、特に RNA(ノンコーディング RNA)転写を通じて、さまざまな生物機能に参与している可能性が指摘されはじめている。すなわち、ゲノムの中枢をしめる発現遺伝子群は、常にトランスポゾンを敵対視して抑制し続けているわけではなく、むしろ適切に制御した上で、活用可能な部分については巧妙に有効活用している可能性が挙げられるのである。両者は染色体という枠組みの中ですでに共存体制を樹立しているのかもしれない。本研究では、そのような関係性についても明らかにしていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

分裂酵母実験株には Tf2 という LTR 型レトロトランスポゾンがゲノムに 13 コピー散在して挿入されている。本研究では、Tf2 がコードするインテグラーゼタンパク質に GFP を融合した人為改変トランスポゾン遺伝子をさらに 1 コピー余剰にゲノムに組み込み、そのツールを用いて染色体再編成過程におけるトランスポゾン分子動態の解析を行った。

染色体再編成の誘導には動原体破壊アッセイを用いた(図2参照)。私たちが分裂酵母で樹立した動原体破壊アッセイは、ネオセントロメア形成とテロメア融合という、進化の過程で頻発する染色体再編成を自発的に促す(Ishii et. al. (2008) Science)。この動原体破壊アッセイのような人為的誘導アプローチで得られる知見が、本当に生物進化での染色体編成変化に適用できるのか、研究開始時点には真の確証はなかった。しかしながら、私たちはこれまでに、この動原体破壊アッセイ系でも進化と同様なトランスポゾンの関与を見出ししてきた。それは、人為的に環状化させた染色体で動原体破壊を行うと、トランスポゾン配列を通じた染色体間の組換え染色体が自発的に得られたことであった(図2)。これまでの解析で、ネオセントロメア形成にもテロメア融合にも染色体末端が大きく関与することが判明し、環状化染色体はそれらを不能にするため(染色体末端の排



除)に行った操作であるが、それはトランスポゾン配列同士の組換え反応を浮き彫りにする結果となった。得られる組換え産物は多様であり、全て自発的に生じる反応であることから、環状化していない普通の染色体ではBFB サイクルにつながる分子反応を模している可能性は極めて高い。本研究ではこのような染色体再編成過程におけるトランスポゾンの分子動態をリアルタイムで観察することを目指した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Tf2 転写量変動解析

まずは染色体再編成の誘導に伴う Tf2 転写産物の誘導を GFP 融合型人工 Tf2 トランスポゾンで確認した。その結果、これまでの結果と同様に、染色体再編成に伴う Tf2 の 2 ~ 3 倍の mRNA 量の上昇は GFP 融合型人工 Tf2 でも検出された。従って、染色体再編成に伴う Tf2 の mRNA 量上昇は、ゲノムに散在する Tf2 全体が平均的に 2 ~ 3 倍程度 mRNA 量上昇を示したためであり、特定の Tf2 が極端に大きく転写上昇した結果の可能性は極めて低いことが結論づけられた。

##### (2) GFP 融合型人工 Tf2 の局在解析

次に、GFP 融合 Tf2 インテグラーゼタンパク質の変動について蛍光顕微鏡を用いて観察した。線状染色体における動原体破壊アッセイを染色体再編成のきっかけとし、その後の細胞における GFP シグナルを経時観察した結果、動原体破壊に伴って GFP シグナルの細胞核内の蓄積上昇が検出された(図3)。

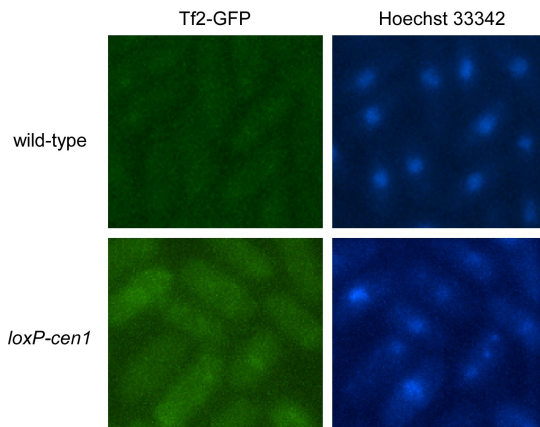


図3 動原体破壊誘導後の Tf2-GFP 局在

分裂酵母実験株における Tf2 インテグラーゼ

タンパク質は生来が機能欠損変異型であり、転移反応を起こすことは不可能であるが、染色体再編成に伴って、その直前まで反応は進行している可能性が示唆された。

##### (3) Tf2 由来小分子 RNA 解析

前述の Tf2 転写量変動解析では RT-PCR を用いて変動を検出したが、GFP 融合型人工 Tf2 遺伝子は内在性の Tf2 遺伝子に比べて GFP 分のサイズ増加が予想され、その変化に着目したノザンプロット解析も試みていた。その過程で、小分子 RNA に対するノザンプロットについても念のために試みたところ、動原体破壊に伴って Tf2 由来の小分子 RNA が特異的に出現してくるを見出した。

分裂酵母の小分子 RNA は、ヘテロクロマチン領域から生成される siRNA の研究が進んでいるが、本研究で見出された Tf2 由来の小分子 RNA は siRNA よりも大きな分子量を示す。現在その分子実体や生成経路について検討を進めている。

本研究は、実際に開始されるまでの準備段階で既に、GFP 融合型人工 Tf2 トランスポゾンなど、アッセイに用いるツールが全て完成しており、研究開始後は短い期間で結論が得られることが予想されていた。そのため、1年間の研究期間を設定していた。これはまた、Tf2 の活性化が本アプローチでは全く検出されず、実際には SOS モードによるトランスポゾン活性化の許容のような生理現象は存在しない(図1参照)という結論に達した場合に、早急に研究を完了させるためにも準備していた計画であった。しかしながら、本研究の結果は、染色体再編成がトランスポゾンの活性化を伴うような何らかのモード変化を経て起きていることを指し示している。本研究の知見を元に、トランスポゾン制御を介した積極的な染色体進化促進プログラムを今後は解明していきたいと考える。

近年の piRNA などを中心とした研究から、とりわけ生殖系列細胞でトランスポゾン抑制機構は高度に発達していることが判明している。発達には様々な理由が考えられるが、生殖系列細胞が種分岐と生殖隔離に直結していることを考えると、ひとつの大胆な仮説として、実は生殖系列細胞では本研究が仮想する SOS モードのような細胞状況でトランスポゾンの活性を高められるように活性調節機構を特別に準備しているのかもしれない。本研究で対象とする分裂酵母では piRNA などのメカニズムはなく、染色体再編成も生殖系列細胞に特化しているわけでもない。しかし、テロメア融合が減数分裂と同様の交差型組換え産物であるなど、特徴的な共通点も見出されている。さらには、動原体破壊という致命的な染色体が生み出す秩序の攪乱は、ゲノム不安定性を特徴的に伴うがん細胞のそれとも共通点があることが判明している。本研究の当初の狙いには含まれていなかった

が、小分子 RNA 生成経路との接点も見出された。本研究を通じて明らかとなる染色体再編成細胞でのトランスポゾン活性化の有無は、生殖細胞やがん細胞など、進化以外の多様な細胞動態の理解にも資することが期待できる。

#### 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 2 件)

Teppei Kitagawa, Kojiro Ishii, Kojiro Takeda, Tomohiro Matsumoto. The 19S proteasome subunit Rpt3 regulates distribution of CENP-A by associating with centromeric chromatin. Nature Communications、査読有、Vol. 5、2014、印刷中

doi: 10.1038/ncomms4597.

Yuki Ogiyama, Yuko Ohno, Yoshino Kubota, Kojiro Ishii. Epigenetically induced paucity of histone H2A.Z stabilizes fission-yeast ectopic centromeres. Nature Structural and Molecular Biology、査読有、Vol. 20、No. 12、2013、1397-1406

doi: 10.1038/nsmb.2697.

##### [学会発表](計 4 件)

石井浩二郎、分裂酵母を用いた自発的な染色体再編成機構の解析、第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20 日～2013 年 11 月 22 日、ホテルニュー三戸屋(仙台)

石井浩二郎、セントロメアの欠損に付随した染色体編成のダイナミクス、国立遺伝学研究所研究会「染色体 DNA の安定維持の分子メカニズム」、2013 年 9 月 27 日～2013 年 9 月 28 日、国立遺伝学研究所(静岡)

石井浩二郎、機能欠損染色体が生み出す細胞応答、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 19 日～2013 年 9 月 21 日、慶応大学(神奈川)

Kojiro Ishii、Chromosomal reorganizations after centromere dysfunction、International Symposium "Message from Yeast to Epigenetics"、2013 年 9 月 2 日～2013 年 9 月 3 日、グランディア芳泉(福井)

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII Kojiro)

大阪大学・生命機能研究科・招へい准教授  
研究者番号：40360276

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：