

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650152

研究課題名(和文) 染色体構成の急速な変化がみられる霊長類：反復配列の関与に関する仮説の検証

研究課題名(英文) Rapid karyotypic changes in a primate taxon: possibility of participation of repetitive DNA as chromosome breakage inducer

研究代表者

古賀 章彦 (Koga, Akihiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：80192574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類のうちのヨザル属で、染色体構成の急速な変化がみられる。この現象に大量の反復配列の存在が関与しているとの仮説を立てた。この仮説は、全体としては、検証に多面的な実験や調査を要するものである。出発点として、仮説の前提となっている条件が成立するかどうかを判定することが必要であり、これを行うことを、本研究の目的とした。該当する反復配列に関して判定すべき事項は、この反復配列の構造の脆弱性、すなわちDNA複製に際して切れやすいか否かである。切れやすいことを示す結果を得て、仮説が成り立つための前提条件が成立すると結論に至った。

研究成果の概要(英文)：The owl monkey, also called the night monkey, is a New World monkey species. This monkey exhibits rapid changes in the structure and conformation of chromosomes. The author hypothesized that the rapid changes are associated with the presence of a large amount of repetitive DNA in the owl monkey genome. This hypothesis involves, as its initial part, that the repetitive DNA that is specific to the owl monkey is fragile; easily degraded in the process of DNA replication. Experimental results indicated that this DNA is fragile and, thus, the condition necessary for the above hypothesis was fulfilled.

研究分野：分子進化学

キーワード：染色体 反復配列 ゲノム 霊長類

## 1. 研究開始当初の背景

霊長類で、染色体構成の変化が他よりきわめて高い頻度で起こるグループが、2つある。旧世界ザルのゲノン属と、新世界ザルのヨザル属である。このうちのヨザル属のほうで、染色体構成の変化と関連が深いと考えられる現象が、以前から知られていた。主に染色体の端部に、構成的ヘテロクロマチンが大量に増幅していることである(図1。黒い部分がヘテロクロマチン)。関連を探ることを念頭に、このヘテロクロマチンの主成分となっている縦列反復配列(OwlRepと名付けた)のクローニングを行い、塩基配列を調べた。その結果から、内部に複雑な構造を有することが判明した。187塩基対の反復単位にパリンドローム構造を14個もつもので、DNA複製の際に切れやすいと推測した。これとは別にドイツの研究者のグループが、夜行性であるヨザル属の視力の向上に、視細胞の核でのヘテロクロマチンの特殊な形状が貢献していること(ただしヘテロクロマチンの種類は特定していない)を示していた。

上記のヨザル属の特徴に基づき、染色体構成の急速な変化が生じる原因について仮説を立てた。つぎのような3つの項目から成る。A. OwlRepはDNA複製の際に切れやすい。B. 視細胞でのヘテロクロマチンの特殊な形状にOwlRepが中心的な役割を果たしており、OwlRepの保持はヨザル属にとっては必要である。C. 切れやすいにも関わらずOwlRepを保持しているため、OwlRepの部分で染色体の開裂や融合が起こりやすく、これが染色体構成の急速な変化につながる。

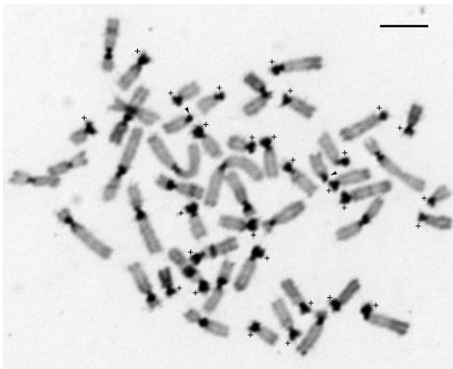


図1

## 2. 研究の目的

上記の仮説の検証は、多方面からの実験や調査を必要とし、大規模で長期的な取組みとなる。本研究課題は、この仮説のうちのAを検証することを目的とした。すなわち、OwlRepが切れやすいことを示すことである。

Bに関しては、本課題の2年目に始めた別の課題(新学術領域研究「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」に含まれる計画研究)で、ヨザルの網膜の組織切片に対してOwlRepの所在を調べる実験を行っており、

Bは成立するとの見込が、本課題終了の時点(平成27年3月)で立っている。Cは、AとBの完了後の将来の取組みとなる。

## 3. 研究の方法

調べるべきDNA断片を含むプラスミドをバクテリアの細胞に取り込ませた後、それを回収し、無傷で残っているプラスミドの割合を測る方法(詳細は、結果とともに次項に記す)を開発した。OwlRep、および比較対象となるDNA(複雑な構造のないDNA)を用いて測定を行い、得られた値を比較することで、切れやすさを推定した。

## 4. 研究成果

### (1) 残存率を比較する実験

OwlRepはヨザルのゲノムに存在するDNAであり、切れやすさを比較するための基準としては、同じヨザルから得た他のDNA断片で、かつ複雑な構造をもたないものが望ましい。このため、ヨザルのゲノムライブラリーからランダムにクローンを24個選び、そのうちで反復配列を含むものを除き、残ったものからあらためてランダムに8種類を選び、これを使うことにした。

つぎの手順で測定を行った。OwlRepを含むクローンと、比較対象となるDNA断片を含むプラスミドを、別々に、しかし同時に、バクテリアに導入した。プラスミドのベクターの部分には、Cam(クロラムフェニコール)耐性遺伝子が備わっている。プラスミドを内包するバクテリアを、Camを含まない液体培地で6時間培養(この間にプラスミドの複製が起こる)した後、数段階に希釈して、Camを含む寒天培地に広げた。これを18時間培養(この操作で、プラスミドをもたないバクテリアを除く)し、培地表面に生じたコロニーの数を数えた。OwlRepでのコロニー数を比較対象でのコロニー数で除し、その値をOwlRepの切れやすさの指標とした。切れたプラスミドは生き残らず、この値は1より相当低くなる(たとえば0.01以下)ものと予想していたが、予想に反して、平均が約0.4、そして90%信頼限界に1が含まれる結果となった。

生き残る割合に有意な違いがないことから、次に、切れた後に続けて修復が起こり、このためにプラスミドが環状の状態を回復する可能性を検討することにした。

### (2) 長さを比較する実験

切れた後に修復が起こる場合、修復が始まるまでの線状の状態のときにDNA分子が切り詰められ、そのために全体の長さが減少することは、十分に考えられる。この可能性を探るために、回収したコロニーからプラスミドを抽出して電気泳動で長さを比較した。比較対象DNAのほうは長さは不変で40kbのまま( $n=120$ )であったのに対し、OwlRepは平均 $6.4 \text{ kb} \pm 2.0 \text{ kb}$  ( $n=120$ )と短くなっていた。

(3) マーモセット由来の DNA を用いた比較  
OwlRep は切れやすいこと(ただし続けて修復が起こる)は確認できたものの、比較対象として用いる DNA には工夫を加えるべきと考えた。ここまでの実験で用いた比較対象は、反復配列の構造をもたない DNA であった。同じ長さの反復配列で構成されており、一方は複雑な構造をもち他方は複雑な構造をもたない DNA の間で比較できることが、理想である。ヨザルのゲノムに後者に該当する DNA が存在しないために、ここまでの実験では反復配列でない DNA を用いていた。

本課題の1年目が終わる頃に、別の課題(基盤研究(B)「ヒト上科で種特異的に生じている反復配列増減の比較ゲノム実験に基づく定量的な解析」)の成果として、マーモセット(ヨザルと同じく新世界ザル)のアルファサテライト DNA (霊長類のセントロメアの主要 DNA 成分となっている反復配列)に高次構造をもつものともたないものがあることが、判明した。前者を OwlRep に相当するとみなし、後者を比較対象とすれば、理想の条件がそろうことになる。

該当するクローンをを用いて、(1)および(2)と同じ実験を行った。結果は、(1)では、残存率の平均が約 0.3 で、そして 90%信頼限界に 1 が含まれた。(2)では、高次構造をもたないほうの長さ(バクテリアに導入する前で 40 kb)が不変 (n=96) であったのに対し、高次構造をもつほうは  $5.5 \text{ kb} \pm 1.9 \text{ kb}$  (n=96) と短くなっていた(図2。回収したプラスミドの構造変異を示す電気泳動の一例)。どちらも、ヨザル由来の DNA での結果と同等である。

以上の結果は、OwlRep はその構造のために切れやすいとの推測を、支持するものである。仮説の一部をなす A は正しいとみなすことができ、本課題の目的の達成となった。

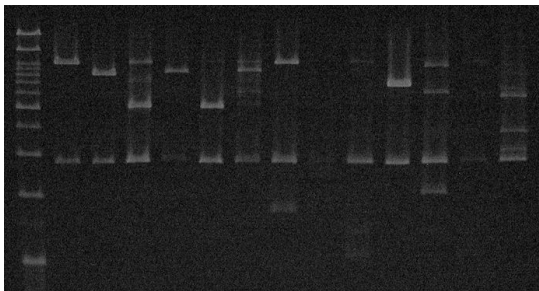


図 2

#### 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4件)

Sujiwattanarat P, Thapana W, Srikulnath K, Hira Y, Hirai H, \*Koga A (2015)  
Higher-order repeat structure in alpha

satellite DNA occurs in New World monkeys and is not confined to hominoids (アルファサテライト DNA の高次構造は新世界ザルにもありヒト上科に限定されない) Scientific Reports 5: 10315. 査読有  
DOI:10.1038/srep10315

Thapana W, Sujiwattanarat P, Srikulnath K, Hirai H, \*Koga A (2014)  
Reduction in the structural instability of cloned eukaryotic tandem-repeat DNA by low-temperature culturing of host bacteria (低温での培養は反復配列クローンの崩壊の軽減をもたらす)  
Genetics Research 96: e13. 査読有  
DOI: 10.1017/S0016672314000172

Watanabe K, Koga H, Nakamura K, Fujita A, Hattori A, Matsuda M, \*Koga A (2014)  
Spontaneous germline excision of *Toll*, a DNA-based transposable element naturally occurring in the medaka fish genome(メダカの内在性トランスポゾン *Toll* の生殖系列での切り出し)  
Genome 57 (4): 193-199. 査読有  
DOI: 10.1139/gen-2014-0011

\*Koga A, Hirai Y, Terada S, Jahan I, Baicharoen S, Arsaithamkul V, Hirai H (2014)  
Evolutionary origin of higher-order repeat structure in alpha satellite DNA of primate centromeres (霊長類のセントロメア反復配列にみられる高次構造の進化的起源)  
DNA Research 21 (4): 407-415. 査読有  
DOI: 10.1093/dnares/dsu005

[学会発表](計5件)

古賀章彦, オーン・プラコンチ、コンソン・シクルナト、平井百合子、平井啓久  
ヨザルのセントロメアを構成する反復配列の急速な置換(一般口頭発表)  
第29回日本霊長類学会、2013年9月8日、岡山理科大学(岡山市)

平井啓久、オーン・プラコンチ、ナンペ・チャイパセルチ、平井百合子、古賀章彦  
ヨザルのアхроセントリック染色体短腕にあるヘテロクロマチンの形成過程(一般口頭発表)  
第29回日本霊長類学会、2013年9月8日、岡山理科大学(岡山市)

古賀章彦, オーン プラコンチ, ナンペチャイパセルチ, 平井百合子, 平井啓久  
ヨザルの染色体変異に関与したと考えられる大規模反復配列(一般口頭発表)

第 30 回日本霊長類学会大会、2014 年 7 月 5 日、大阪科学技術センター（大阪市）

Akihiko Koga

DNA-based transposable elements as natural mutators in vertebrate genomes (Invited talk)

2014 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology、2014 年 10 月 23 日、COEX (Seoul, Korea)

Penporn Sujiwattanasat, Watcharaporn Thapana, Kornorn Srikulnath, Girohisa Hirai, Akihiko Koga

Higher-order repeat structure in centromeric repetitive DNA is not confined to central regions (Oral presentation)

日本進化学会第 16 回大阪大会、2014 年 8 月 21 日、高槻現代劇場（大阪府高槻市）

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 章彦 (KOGA, Akihiko)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：80192574

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし