

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程入学

氏名 明賀 史純

指導教官名 大坪 栄一

論文題目 シロイヌナズナ・イネに存在する *Mu* 様トランスポゾンに関する研究

トランスポゾンは、ゲノムの多様化をもたらす可動性遺伝因子であり、動物、植物、細菌に至る様々な生物種に存在することが知られている。植物の代表的な DNA 型トランスポゾンとしてはトウモロコシの *Ac/Ds*、*En/Spm* 及び *Mu* があり、それぞれ構造上の特徴や転移の際に生じる標的配列の重複の塩基数などが異なっている。中でも *Mu* は、最も転移能が高く、標的とする挿入配列の特異性が低いという点から、様々な変異体の形成など遺伝育種面で有用であることが指摘されている。*Mu* は、両端に約 210 bp の逆向き反復配列 (TIR) を持つという他のトランスポゾンにはない特徴があり、転移に際して 9 bp の標的配列の重複を生じる。*Mu* の自律性因子 *MuDR* (4942 bp) は、二つの遺伝子 *mudrA* と *mudrB* を内部に持つており、それぞれ 823 アミノ酸残基のタンパク質 (MURA) と 207 アミノ酸残基のタンパク質 (MURB) をコードしている。MURA は、原核生物の特異な一群の IS のトランスポゼースと相同性が見られること、実際に *Mu* の末端反復配列への結合する能力を持つことが示されており、トランスポゼースであると考えられている。一方、MURB の機能は全く分かっていない。*Mu* は、*Ac/Ds* と *En/Spm* と比較すると解析が遅れており、未だにその転移機構に関する知見は少ない。また、他の植物では *Mu* 様トランスポゾンが同定されたとする報告はほとんどなく、*MuDR* のような自律性因子は同定されていない。本研究では、シロイヌナズナ・イネゲノムに存在する *Mu* 様トランスポゾンを単離同定することによって、トウモロコシ以外の他の植物種にも *Mu* 様トランスポゾンが存在することを示し、それらとトウモロコシの *MuDR* と比較することで種間の構造的特徴の違いを明らかにした。また、*Mu* 様トランスポゾンのいくつかではトランスポゼース遺伝子が発現していることを見出し、それらが転移活性を持つ自律性因子である可能性が示

唆された。さらに、シロイヌナズナの *Mu* 様トランスポゾンの1つに挿入していた配列がレトロポゾン SINE (Short INterspersed Element) であることを明らかにして、シロイヌナズナゲノムにも SINE が存在することを示した。

### 1. シロイヌナズナの多様な *Mu* 様トランスポゾンの同定と構造解析

シロイヌナズナ (Columbia 系統) の全ゲノム配列は既に 95% 以上が決定され、データベースに登録されている。そこで、トウモロコシ *MuDR* の *mudrA* 遺伝子の配列の一部を query としてホモロジー検索を行い、シロイヌナズナに 142 個の *Mu* ホモログ (*AtMu*; *Arabidopsis thaliana Mu* と命名) が存在することを見出した。トウモロコシ *MuDR* の *mudrA* 遺伝子に相当するシロイヌナズナの遺伝子 (*tnpA* と命名) の相同性から、各メンバーは大きく 3 つのグループに分類された。各グループ間では因子長が約 4, 8 及び 15 kb と大きく異なり、相同性により分類した結果と因子長が相関することが分かった。3 グループのうちの 1 つには *MuDR* と同様に因子の末端に 150~300 bp の長さの末端逆向き配列 (TIR) を持つものが存在したが、興味あることに他のグループの *AtMu* には TIR が存在しなかった。しかし、これらの配列の両端には *MuDR* と同様に挿入に際して 9 bp の標的となったと考えられる配列が重複して存在していた。TIR を持つメンバーのうちの 1 つは、Columbia とは生態型および種が異なるシロイヌナズナの系統には存在しておらず、標的配列のみが存在することを確認した。

*tnpA* 遺伝子にハイブリダイズするプライマーを用いた RT-PCR により、いくつかのメンバーの発現を調べたところ、培養細胞やメチル化阻害剤である 5-azacytidine (5-azaC) で処理した培養細胞、DNA 低メチル化突然変異体 (*ddm1*) の植物体などでは *tnpA* が発現していたが、野生型の植物体では発現していなかった。このことは、シロイヌナズナ植物体中では *tnpA* の発現が抑制されており、脱メチル化や脱分化などによりその抑制が外れて *AtMu* がシロイヌナズナゲノム中で転移する可能性を示唆する。さらに RT-PCR と 5' 及び 3'-RACE 法を用いた転写産物の解析から、*tnpA* 遺伝子において *AtMu* の各グループ間でイントロンの位置が異なっていた。

さらに、*AtMu* の末端に IR を持たないメンバーには、*tnpA* 遺伝子とは逆向きに存在すると予想される大きな ORF (*tnpB* と命名) が存在した。そこで、*tnpA* 遺伝子と同様に、RT-PCR と 5' 及び 3'-RACE 法を用いた転写産物の解析を行った結果、この *tnpB* が転写されていることが明らかになり、エキソンの位置及びそこにコードされるアミノ酸配列も推定できた。*tnpB* も *tnpA* 同様にグループ間でイントロンの位置が異なっていた。*tnpB* 産物 (TNPB) のアミノ酸配列はトウモロコシの MURB より大きく、相同性は存在しなかったが、各メンバー間では高い相同性が存在した。シロイヌナズナとトウモロコシで *tnpA* 遺伝子は保存されているのに対し *tnpB* 遺伝子は保存されていないことから、トランスポゼースである TNPA

は種間で保存され、一方 TNPB は植物種で独自に進化してきた可能性が示唆された。

## 2. イネに存在する *Mu* 様トランスポゾン *Tnr2* の解析

*Tnr2* は、レトロポゾン *p-SINE1* のメンバーの一つへの挿入配列として見出されたもので、イネ染色体上に数百コピーで散在しており、両端に 56 bp の逆向き反復配列が存在し、転移に際して 9 bp の標的配列の重複を生じるが、その大きさ (147 bp) から自身では転移できない非自律性因子と考えられた。これまでにイネゲノムライブラリーのスクリーニングから多数の *Tnr2* のメンバーが同定されたが、その中のひとつにトウモロコシの *MuDR* がコードする *mudrA* の一部配列と有意な相同性を持つクローンが見つかった。このことから、*Tnr2* はイネに存在する *Mu* 様トランスポゾンであり、*mudrA* との相同領域を持つクローンは、その自律性因子の部分配列ではないかと推察された。*mudrA* 遺伝子に相当する *Tnr2* の遺伝子 (*tnpA*) の部分配列をプローブに用いたサザン法による解析を行ったところ、イネ *O. sativa* cv. IR36 のゲノムには *Tnr2* の *tnpA* と非常に高い相同性を持つ配列が 2 コピー存在すると予想される結果を得た。この部分配列にハイブリダイズするプライマーを用いた IPCR (Inverse-PCR) などによって *Tnr2* の *tnpA* をコードする全領域を含む DNA フラグメントを得た。

次に、その塩基配列をプローブとして *Tnr2* の *tnpA* 転写産物のノーザン法による解析を行った。イネ植物体及び培養細胞において共に、*tnpA* が発現していることが分かった。発現量は、日本晴植物体に比べて Oc 培養細胞の方がやや多かった。DNA メチル化阻害剤 5-azaC による処理の有無で発現量に差は見られなかったことから、*AtMu* の場合と異なり *Tnr2* トランスポゼースの発現はメチル化による抑制を受けないと考えられる。

RT-PCR と 5' 及び 3'-RACE 法により得られた *tnpA* の cDNA の塩基配列を決定して推定されるアミノ酸配列を *AtMu* 及び *MuDR* と比較したところ、約 30, 40 % と高い相同性を示した。特に、*Tnr2* の *tnpA* のエキソン 2 およびエキソン 3 は、*MuDR* と非常に高い相同性を示したが、エキソン 1 およびエキソン 4, 5 の領域の相同性は低かった。また、*Tnr2* の *tnpA* は *AtMu* 及び *MuDR* とは異なる位置にイントロンが存在すること、いくつかの alternative splicing により生じたと考えられる転写産物も量的には少ないが存在することが分かった。ポリアデニル化はポリアデニル化シグナルを含む約 200 bp の領域内の複数のサイトで起きていた。そして転写終結部の近傍には *MuDR* や *AtMu* の一部のグループと同様に 12 - 42 bp のダイレトリピートが存在していた。さらに、*Tnr2* の *tnpA* 転写産物とは明らかに異なる、約 60% の相同性を持つ別の転写産物が得られた。また、この配列以外にもホモロジー検索により *Tnr2* の *tnpA* に高い相同性を持つ配列がイネゲノム DNA に存在することが明らかとなった。このことは、*Tnr2* とは別の転移可能な *Mu* 様トランスポゾンがイネゲノム中に存在することを示唆する。

### 3. シロイヌナズナの SINE、*AtSN1* と *AtSN2* の発見

シロイヌナズナゲノムに存在した *AtMu* の一つのメンバーの内部に挿入配列が存在することを見出した。この配列は挿入に際して *Mu* ホモログの標的となったと考えられる 15 bp の配列が重複して存在し、内部に RNA ポリメラーゼ III が認識するプロモーター配列 (A 及び B-box) が、3' 端にポリ A が存在することから、シロイヌナズナのレトロポゾン SINE であると考えられ、*AtSN* (*Arabidopsis thaliana* SINE) と名付けた。データベースを基にしたホモロジー検索により多数のメンバーを同定したが、それらは内部配列の違いから二つのサブファミリー (*AtSN1* と *AtSN2*) に分けることができた。各々のコンセンサス配列は 159 と 149 bp であり、最終的に *AtSN1* には 71 個、*AtSN2* には 128 個のメンバーが存在することが分かった。*AtSN* のメンバーには、端の領域を欠失した因子が全体の約四分の一の割合で存在していた。欠失した因子の内、5' 領域を欠失したものが大部分であり、その多くには標的配列の重複が存在した。この結果は、5' 端を欠失した因子が全体長を持つメンバーと同様なメカニズムで転移したことを示唆する。また、動物の SINE と異なり、コンセンサス配列におけるメチル化ターゲット部位の塩基が各メンバーにおいて高頻度に置換されていないことからメチル化部位を保存するメカニズムが存在する可能性が考えられた。さらに、*AtSN* の標的配列における 5' のニッキング部位には 5'-T/AA (A) -3' と表せるような動・植物の他の SINE とよく似たモチーフが存在した。*AtSN1* と *AtSN2* のメンバーはコンセンサス配列と比較して非常に多くの塩基置換が起きていたことや、調べた全てのメンバーにおいて Columbia 系統以外の異なる 2 系統 (Landsberg, Wassilewskija) の生態型のシロイヌナズナにも存在したことから、メンバーの増幅がシロイヌナズナが各生態型に分かれる以前に起こったのではないかと考えられた。

以上、本研究は、シロイヌナズナ・イネゲノム中に *Mu* 様トランスポゾンが存在していることを示し、トウモロコシ以外の植物にも *Mu* ファミリーが存在することを明らかにした。また、シロイヌナズナの *Mu* ファミリー (*AtMu*) の解析中に 1 つのメンバーの内部に挿入していたシロイヌナズナの SINE を見出し、その構造的特徴を明らかにした。*AtMu* の解析から、1 つの植物種においてさえ構造的特徴が大きく異なる 3 つの *Mu* ファミリーのグループが存在することが示された。そして *AtMu* には、*MuDR* と同様な因子の末端に TIR を持つメンバー以外に TIR を持たないメンバーが存在するという結果は、今までの DNA 型トランスポゾンの概念の範疇を越えるものであり、新規の *Mu* ファミリーのグループが存在する可能性を示した。さらに、いくつかの *AtMu* ではトランスポゼース遺伝子が発現していることから、これらの因子がゲノム中で転移する可能性が示唆された。本研究で得られた知見は、これまでほとんど解明されていない *Mu* ファミリーの存在様式や転移機構の解明に大きく貢献すると期待される。