

メダカの体色突然変異に転移性遺伝因子が大きく寄与することの実証

Contribution of transposable elements to body color mutations in the medaka fish

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 古賀 章彦

Nagoya University Akihiko KOGA

協同研究者 京都工芸繊維大学 伊藤 雅信

Kyoto Institute of Technology Masanobu ITOH

DNA-based transposable elements are present in virtually all organisms, but vertebrates are exceptional in that transposition events have rarely been observed. The few examples so far obtained are mostly in the medaka fish. We analyzed the medaka genome for more examples of mutations induced by two endogenous DNA-based transposable elements. Cloning and sequencing of genomic DNA fragments that contained terminal regions of the *Tol2* element revealed two candidates for insertion-bearing mutant genes. PCR analysis of a specific insertion of the *Tol1* element provided evidence for various secondary mutations associated with imprecise excision of the element. Thus, DNA-based transposable elements are a major source of spontaneous mutations at least in the medaka fish. Similar events can be expected to occur also in other vertebrates because likely triggers for the resumption of transposition of the medaka elements are not specific to this fish species.

## 研究目的

生物はゲノムという遺伝情報のセットをもっており、形態や種々の機能にはその内容が反映している。そしてその内容に変化が生じることで、生命の多様性が産み出される。変化をもたらす要因には、放射線や化学物質などの外的要因のほかに、生物が自身に内包している多くの要因がある。たとえば、DNA複製の際の誤りや、染色体の組換えである。転移性遺伝因子（以下、転移因子）もまた、

ゲノムに変化をもたらす要因と考えられている。転移因子とは、染色体上のある場所から別の場所へ移動する能力をもつ反復配列である。

転移因子は、知られている限りほとんどの生物種のゲノムに存在する。そして、転移因子が原因であることが明らかな突然変異の例は多い。ただし、哺乳類や鳥や魚を含む分類群である脊椎動物は、例外的な一面をもつ。転移因子はRNA介在型とDNA型の2種類に大きく分けられるが、このうちのDNA型転移因子に関して、これが原因となる突然変異がほとんどみられないことである。このことから、「脊椎動物では、DNA型転移因子のゲノム変化への寄与は、ないか、またはあるとしても無視できるほど小さい」との考えが、大勢となっている。

脊椎動物で、DNA型転移因子が原因である突然変異の少数の例は、いずれもメダカで観察されている。そのメダカは、脊椎動物の遺伝や発生を研究するためのモデル生物として、基盤整備がすすんでいる。このため、DNA型転移因子の寄与を検討するには、格好の材料である。本研究では、メダカで同様の突然変異がほかにもみつかるか、また、みつかったとしてそれはメダカに特有の現象であるかという疑問点に答えるために、実験と考察を行った。

## 研究経過

### (1) 転移因子の挿入で生じる突然変異の探索

メダカの転移因子である *Tol1* 因子は、チロシナーゼ遺伝子の中央部に挿入して完全なアルビノ表現型をもたらしている因子として、1995 年にみつかった。チロシナーゼ遺伝子は、チロシナーゼという酵素をコードする遺伝子である。チロシナーゼは、黒色素メラニンの合成に必須の酵素である。メダカの別の転移因子である *Tol2* 因子も、同様に、チロシナーゼ遺伝子に挿入している因子として、1996 年にみつかった。ただし、挿入の場所は遺伝子の最後尾に近い部分で、中程度のアルビノの表現型をもたらしていた。また、*Tol2* 因子がチロシナーゼ遺伝子のプロモーターの部分に入り込んで、このために弱いアルビノを呈する別の突然変異も、2002 年にみつかっている。いずれも、突然変異体のチロシナーゼ遺伝子の構造を、野生型のものと比較するという手法で、因子の同定に至っている。

メダカには、上記のアルビノ突然変異のほかにも、体色に関する自然突然変異が、多数同定され、系統として各地の大学等に保管されている。それらのうちには、チロシナーゼ遺伝子の場合と同様に転移因子が原因であるものが含まれている可能性がある。ただし、遺伝子が同定されていないものがほとんどで、挿入があるとしても、それを直接検出することはできない。これを、塩基配列データベースを利用することで克服する方法を、我々は考案した。そして以下の手順で実行した。

対象としたのは *Tol2* 因子である。まず、体色の自然突然変異を 12 系統選び、フォスミドをベクターとするゲノムライブラリーを、それぞれについて作製した。そのライブラリーをプレート培地にまき、*Tol2* 因子の端部をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行った。このスクリーニングで得られたクローンは、*Tol2* 因子の端部に加えて、それに続く染色体の部分を、ほとんどがもっている。クローンを精製して、*Tol2* 因子の外側に向かうプライマーを用いて塩基配列を読めば、染色体の部分の配列が、数百塩基対得られる。基礎データとしてのこのような塩基配列を、各系統につき 10~20 個得て、それを塩基配列データベースと照合した。その結果として、前後数十 kb の塩基配列を、ほとんどのクローンについて得ることができた。この領域の塩基配列の構造を調べ、遺伝子と考えられる部分が *Tol2* 因子の挿入点または近辺にあるかどうかを調べた。みつかった場合は、それは突然変異の原因遺伝子の候補となる。

以上の探索を行って、白色素胞が欠損する *leucophore-free* 遺伝子と、体表に斑点ができる *variegated* 遺伝子について、候補が得られた。遺伝様式との関連を検討した結果から、真に原因となっている遺伝子をとらえている可能性は大きいといえる。現在、最終的な確認を行っている最中である。

## (2) 転移因子の欠失で生じる突然変異の探索

転移で染色体に入り込んだ転移因子が、再び転移することがある。DNA型転移因子の転移は、カット・アンド・ペーストの様式であるため、再転移のときには、入り込んでいた因子が抜け出す。このとき、因子の部分が正確に抜けて、染

色体のもとの塩基配列が回復することもあるが、多くの場合、数〜数十塩基対の変化が生じる。因子の端部が残ったり、逆に本来の染色体領域の一部が削れたりするためである。このようなことが起こった場合、遺伝子がもつ情報は、転移因子が入る前とも、入っている状態とも異なる、新たな状態となる。すなわち二次的な突然変異である。

二次的な突然変異は、脊椎動物以外の多くの生物種で、多数の例がある。これがメダカでも起こることを示す現象は、*Tol2* 因子ですでに観察されていた。これと同様の現象が、*Tol1* 因子でも観察された。本研究の目的に合致し、より深い考察が可能となるため、*Tol1* 因子でのこの現象を詳しく解析することにした。

チロシナーゼ遺伝子に *Tol1* 因子の挿入をもつアルビノ突然変異は、1995 年にみつかって以来、ずっと安定であった。すなわち、*Tol1* 因子が抜けてメラニン色素の合成が再開するような復帰突然変異は、起こっていなかった。このアルビノ系統は、多数のサブ系統に分岐しているが、そのうちの1つで、メラニン色素をもつ個体が生じた。この個体を分離して、その子孫で色素の出方の大きいものを選択して1ペアの交配を施し、これを5世代にわたって繰り返した。その結果、表現型はより鮮明になり、図1に示すような個体が高頻度で現れる状態となった。

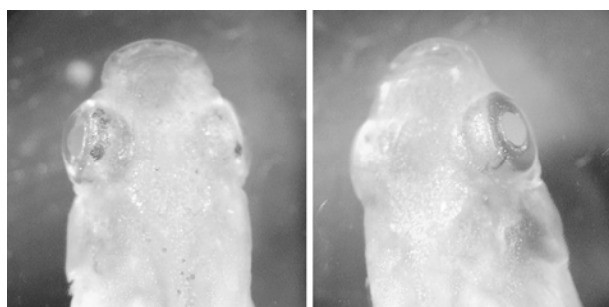


Figure 1. Fish exhibiting melanin pigmentation. Left: Fish with broad pigmentation on eyes and many pigmented spots on the dorsal skin. Right: Fish exhibiting spoke-like pigmentation in the eyes.

メラニンが作られるようになった原因は、チロシナーゼ遺伝子に入っている *Tol1* 因子が抜けることであると、容易に想像がつく。これを、*Tol1* 因子をはさ

むプライマーを用いてPCR解析を行い、確認した。続いて解明すべきことは、*Tol1* 因子が抜ける原因である。このサブ系統では転移を触媒する酵素の遺伝子が発現していることが、考えられる。その遺伝子を同定するための一連の実験を行い、図2に示すような、遺伝子を内部に含む *Tol1* 因子を同定した。

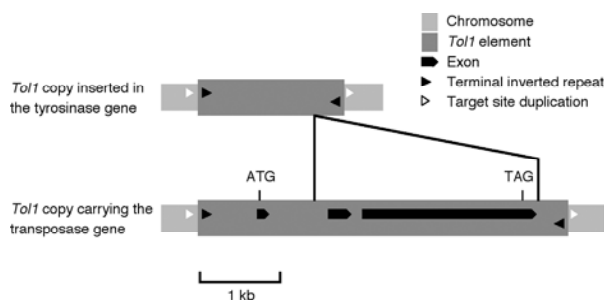


Figure 2. Structure of nonautonomous and autonomous copies of *Tol1*. Upper: Original, nonautonomous copy of *Tol1* that was inserted in the tyrosinase gene of an albino mutant fish. Lower: Complete, autonomous copy carrying a fully functional transposase gene.

## 考察

転移因子の挿入や欠失に伴って起こる体色の突然変異の事例を、本研究の結果として多数得た。このように転移因子が突然変異の原因となることが、メダカに特有のことであるのか、あるいは脊椎動物全般でも起こり得ることであるのかは、ゲノムの進化の機構を考察するうえで、必要な情報となる。

脊椎動物のゲノムにも、DNA型転移因子は多数存在する。しかし、自然の状態で転移が起こったとする報告は、メダカでの数例およびゼブラフィッシュでの1例があるのみである。このように転移がほとんど起こらない理由は、転移を触媒する遺伝子がほぼ崩壊してしまっていることにあると、推測される。現在では多くの生物種で、塩基配列データベースが充実しているが、その検索から転移触媒酵素の遺伝子がみつかったとする報告は、我々が知る限りは、ない。ただし、遺伝子が崩壊した残骸や、遺伝子の断片と考えられる配列は、多数存在する。こ

ここで、「何らかの理由で遺伝子がみつかっていないだけで、実は存在する」、あるいは「他の生物種から遺伝子が持ち込まれる」という状況を仮定すると、転移が再開することは、あり得ないことではない。メダカの *Tol1* 因子の転移は前者、*Tol2* 因子の転移は後者が実現した例であると、我々は推測している。

本研究で我々が同定した、*Tol1* 因子の転移触媒酵素の遺伝子は、メダカの塩基配列データベースには入っていない。これは、データベースを作るために使ったメダカ個体がこの遺伝子をもっていないものであったことが、理由であると考えられる。あるいは、転移因子のような反復配列は塩基配列データベースに反映されにくいことが、理由であるかもしれない。しかし、特定の系統に、実験を伴う解析を施したところ、遺伝子はみつかった。しかも、この遺伝子がゲノム中に1コピー存在するだけで、100~200 コピーある *Tol1* 因子の 30% 以上が転移可能な状態となった。

*Tol2* 因子のほうは、我々は、メダカに最近侵入して急速にコピー数をふやした因子であることを、以前提唱している。一般に、転移因子の転移頻度は、侵入の直後が最も高いと考えられている。転移を抑制する機構をホストの生物が獲得するには、自然選択が作用するための時間が必要だからである。最近侵入したという我々の仮説が正しいとすると、*Tol2* 因子がゲノム中で転移活性をもっており、転移に伴って突然変異を起こすことも、容易に説明がつく。

「転移触媒酵素の遺伝子が少数ではあるが崩壊を免れている」、また「他の生物種から転移触媒酵素の遺伝子が持ち込まれる」という2種類の可能性は、メダカに特有であるとは考え難い。この時期にたまたまメダカで実現していて、それを検出したと考えるほうが、理にかなっている。「脊椎動物では、DNA型転移因子のゲノム変化への寄与は、あるとしても無視できるほど小さい」との考えは、再考を要するものである可能性がある。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 古賀 章彦 ; 「トランスポゾン は原因として認識されることなく 遺伝的変異を創出する」、日本遺伝学会第78回大会 (つくば、2006)
2. 古賀 章彦 ; 「メダカのトランスポゾンの変異と分布」、日本分子生物学会2006フォーラム (名古屋、2006)
3. 古賀 章彦 ; 「メダカのトランスポゾン *Tol1* ; 転移触媒酵素の構造・機能・変異」、日本分子生物学会第30回年会 (横浜、2007)

### 誌上発表

1. Akihiko Koga A, Atsuo Iida, Hiroshi Hori, Atsuko Shimada, Akihiro Shima A; Vertebrate DNA transposon as a natural mutator: The medaka fish *Tol2* element contributes to genetic variation without recognizable traces" *Molecular Biology and Evolution* 23: 1414-1419 (2006).
2. Akihiko Koga A, Atsuko Shimada, Toshiya Kuroki, Hiroshi Hori, Junko Kusumi, Yoriko Kyono-Hamaguchi, Satoshi Hamaguchi; "The *Tol1* transposable element of the medaka fish moves in human and mouse cells" *Journal of Human Genetics* 52: 628-635 (2007).
3. Akihiko Koga A, Ichizo Higashide, Hiroshi Hori , Yuko Wakamatsu, Yoriko Kyono-Hamaguchi, Satoshi Hamaguchi; The *Tol1* element of medaka fish is transposed with only terminal regions and can deliver large DNA fragments into the chromosomes" *Journal of Human Genetics* 52: 1026-1030 (2007).
4. Akira Hikosaka, Akihiko Koga A; PCR detection of excision suggests mobility of the medaka fish *Tol1* transposable element in the frog *Xenopus laevis*" *Genetical Research* 9: 201-206 (2007).