

## 論文の内容の要旨

論文題目

# Structures and Transposition Activity of A Novel Giant DNA Transposon, *Teratorn*

(巨大な新規 DNA トランスポゾン *Teratorn* の構造と転移活性)

氏名：井上 雄介

### <序論>

動く遺伝因子は生物に侵入し自己複製を行う寄生性の遺伝因子であり、細胞外に出て個体間を伝播するウイルスや、転移によって宿主のゲノム内で増幅するトランスポゾンが含まれる。動く遺伝因子はいずれも細胞に寄生し自己複製するという共通の性質をもつ一方、そのゲノムの構成や増幅の様式、生活環には著しい多様性が見られる。それでは、どのようにして動く遺伝因子は多様化してきたのであろうか？これまで、異なる因子どうしが組換えを起こすことによって、以前とは異なる生活環を持った新しい因子が生まれる、という可能性が提唱されていた。実際、異なる生活環をもった因子どうしが遺伝子を共有しているケースが複数報告されており(LTR型レトロトランスポゾンとレトロウイルス、*Polinton*型DNAトランスポゾンと複数のDNAウイルスなど)、両者の進化的な関連を支持している。しかし、その配列の類似性の低さから、因子間の系統関係は殆どの場合で不明瞭であり、どのような過程を経て新規の動く因子が生じるのかは

よく分かっていない。しかし私はメダカの巨大トランスポゾン *Teratorn* の解析から、DNA トランスポゾンと DNA ウイルスが一体化を起こした事例を見出し、この問題に対する手がかりを得た。

複数のメダカ突然変異体の原因因子として断片配列が報告されていた DNA トランスポゾン様配列 *Teratorn* は、大きさが少なくとも 42kb 以上とトランスポゾンとしては非常に大型であることが知られていた。したがって、*Teratorn* には内部配列の由来や生活環などについてユニークな特徴を備えており、未知の遺伝因子である可能性が期待された。そこで本研究では *Teratorn* の全長配列を決定し、その特性を解析した。

## <結果>

### 1. *Teratorn* は 180kb を上回る

ショットガンシーケンスによるゲノム解読法はリピート配列のアセンブルが困難であるため、公表されているゲノム配列上では *Teratorn* の塩基配列は末端部分を除き不明であった。そこで、*Teratorn* 全長を含む BAC クローンをスクリーニングし、ゲノム中に存在する約 40 コピーの *Teratorn* のうち 6 コピーについて PacBio RS-II により全長配列を決定した。その結果 *Teratorn* は約 180kb と巨大なトランスポゾンであることが判明した(図 A)。遺伝子予測を GENSCAN および GeneMarkS を用いて行ったところ、*Teratorn* 内部には約 90 個の遺伝子が存在することが示唆された。

### 2. *Teratorn* は転移活性をもつ *piggyBac* 型 DNA トランスポゾンである

*Teratorn* 内部には DNA トランスポゾンファミリーの 1 つである *piggyBac* の転移酵素と相同性を示す遺伝子が存在していた(図 A、マゼンタ)。そこで *Teratorn* の転移活性の有無を知るために、転移酵素を恒常発現するプラスミド、および *Teratorn* の末端配列で Puromycin 耐性遺伝子を挟んだコンストラクトを作成し、HEK293T 細胞に導入した。その結果、*Teratorn* 末端配列を境界としてその内側の配列が切り出されることが PCR により確認された。また、Puromycin 含有培地で約 10 日培養すると、転移酵素発現プラスミドを共導入した場合にのみ生き残った細胞からなるコロニーが形成されたこと、及び挿入部位のシーケンス結果から、挿入活性を持つことが示された。さらに、*Teratorn* 末端配列のサザンブロッティングの結果、近交系 Hd-rR の個体間でバンドパターンに違いが見られたことから、内在性の *Teratorn* についても転移が起きたことが示唆された。以上から、*Teratorn* は転移活性をもつ *piggyBac* 型 DNA トランスポゾンであることが示された。

### 3. *Teratorn* はヘルペスウイルスゲノムを含む

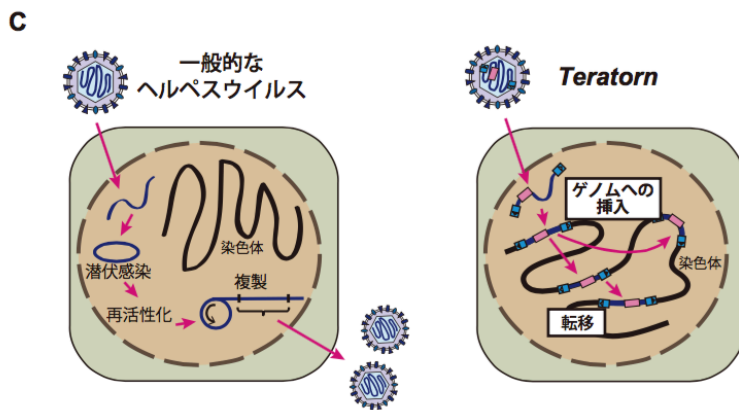
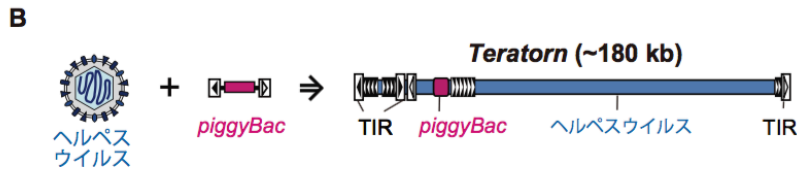
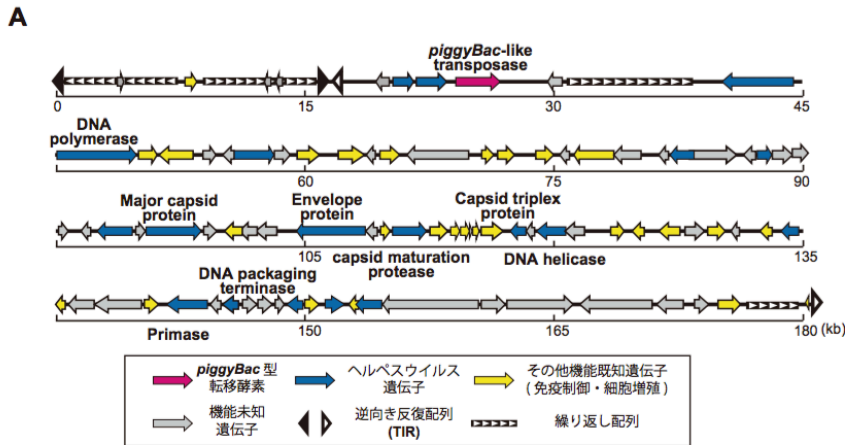
興味深いことに、*Teratorn* 内に存在する約 90 個の遺伝子のうち、17 個はヘルペスウイルスの遺伝子と相同性が見られた(図 A、青)。ヘルペスウイルスは脊椎動物において広く繁栄している大型の二本鎖 DNA ウイルスであり、潜伏感染する性質をもつ。しかしその生活環のなかでウイルス DNA が宿主細胞の染色体に組み込まれることはないため、内在化は稀である。系統解析の結果、*Teratorn* は魚類・両生類に感染するヘルペスウイルス(*Alloherpesviridae* 科)に属することが示された。またこの属内で保存されている 13 個の遺伝子をすべて持つことから、*Teratorn* は完全なヘルペスウイルスゲノムを含むことが示唆された。また、*Teratorn* 内の遺伝子はメダカ初期胚・成体の様々な組織で発現しており、DNA メチル化阻害剤である 5-azacytidine をメダカ培養細胞に処理したところウイルス遺伝子の発現上昇がみられたことから、*Teratorn* はウイルスとしての性質を保持している可能性が示唆された。

### 4. 他の真骨魚類における *Teratorn* 様配列の存在

さらに *Teratorn* がメダカ以外の生物種に存在する可能性を検証するために、*Teratorn* 内のヘルペスウイルス様遺伝子 13 個について blast 検索を行った。その結果、ゲノムが解読されている真骨魚類 67 種のうち少なくとも 19 種について、*Teratorn* 様配列の存在が示唆された。系統解析の結果、これらの内在性ヘルペスウイルスは互いに近縁であり、*Alloherpesviridae* 科のなかで 1 つのクラスターを形成した。したがって、*Teratorn* に近縁なヘルペスウイルスが様々な真骨魚類のゲノムに内在化していることが示唆された。さらに、いくつかの種においてはメダカと同様に *Teratorn* 様配列が *piggyBac* と一体化した状態で存在しており、トランスポゾンとヘルペスウイルスの一体化が真骨魚類において広く起きている可能性が示唆された。

### <結論>

本研究より、*Teratorn* は *piggyBac* 型トランスポゾンとヘルペスウイルスの一体化により生じた新規の動く遺伝因子であることが示唆された(図 B)。カット&ペースト型の DNA トランスポゾンと一体化してゲノムに内在化したウイルスは真核生物においては本研究が初の報告である。一体化の生物学的意義は不明だが、おそらく染色体内への挿入により宿主内でのより安定的な存続を可能にし、さらにトランスポゾンの転移機構を介して増殖することも可能にした、と考えられる(図 C)。本研究は、異なる因子間の相互作用が新たな生活環をもつ因子を生み出すことを示す一つの例として重要であり、組換えを介して動く遺伝因子の多様化がもたらされた可能性を支持している。



## 図 Teratorn の構造と生活環

**A.** Teratornの内部構造。 **B.** Teratornはヘルペスウイルスと*piggyBac*型DNAトランスポゾンの一体化により生じた新規の動く遺伝因子である。 **C.** Teratornの生活環のモデル。ヘルペスウイルスは一般的にその生活環のなかで宿主の染色体にDNAを組み込まない(左)。これに対しTeratornは トランスポゾンとの一体化により、転移を介して宿主のゲノム内で増幅できるようになったと考えられる(右)。