

琉球大学学術リポジトリ

ヨナグニ蚕由来 Cecropia-ITR-MLE の転移活性評価と生物地理学的解析

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 中島裕美子</p> <p>公開日: 2010-10-05</p> <p>キーワード (Ja): 末端逆位繰り返し配列(Inverted Terminal Repeat : ITR), Lepidoptera(鱗翅目昆虫), Bombyx mori(カイコ), Bombyx mandarina(クワコ), トランスポゼース(TP : Transposase), トランスポゼース(TP:Transposase), 転移因子</p> <p>キーワード (En): Cecropia-ITR-MLE, BmTNML, Inverted Terminal Repeat, Lepidoptera, Bombyx mori, Bombyx mandarina, Transposase : TP, Attacus atlas, Inverted Terminal Repeat(ITR), Mariner-like-element(MLE), Transposase</p> <p>作成者: 中島, 裕美子, 日下部, 宜宏, Nakajima, Yumiko, Kusakabe, Takahiro</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/18190

ヨナグニ蚕由来 *Cecropia*-ITR-MLE の転移活性評価と
生物地理学的解析

課題番号 14560048

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))
研究成果報告書

平成 16 年 4 月

研究代表者

中島 裕美子
(琉球大学遺伝子実験センター・助教授)

はしがき

本研究においては、研究代表者により、*Cecropia*-ITR-MLE の生物地理的解析、および下記 1 名の分担者が加わったの、ヨナグニ蚕から単離された活性型マリナー様配列: MLE(*mariner-like-element*)の転移活性の評価に関する解析が行われた。

日本列島およびアジアに生息している主として鱗翅目昆虫について、鱗翅目昆虫である *Cecropia* 蚕の MLE、末端位繰り返し配列をプライマーとした PCR 法により単離した全長配列について解析された結果を指標に、それらの地理的空間的分布および、進化的な分岐における考察をした。また、既に与那国蚕から単離され、転移活性を持っていると考えられる MLE 全長配列について、その活性を評価する実験を行った。

本研究課題を遂行するにあたり、科学研究費の補助が非常に大きな比重を占めており、ここに感謝の意を表します。

2004 年 4 月 28 日

中島裕美子

研究組織

研究代表者：中島 裕美子 (琉球大学・遺伝子実験センター・助教授)

研究分担者：日下部 宜宏 (九州大学・大学院・農学研究院・助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	1,900	0	1,900
平成 15 年度	1,600	0	1,600
総計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Nakajima, Y., Nakamura, T., Banno, Y., Fujimoto, H., Hashido, K., Shiino, T., Tsuchida, K., Takada, N., and Maekawa, H. : Comparison of *mariner*-like elements among *Bombyx mandarina* individuals inhabiting east Asia in the light of the segregation of *B. mori* and *B. mandarina*. *Int. J. Wild Silkmoth and Silk*, 8:57-64, 2003.
2. Nakajima, Y., Fujimoto, H., Negishi, T., Hashido, K., Shiino, T., Tsuchida, K., Hidaka, M., Takada, N., Maekawa, H. Possible horizontal transfer of *mariner*-like sequences into some invertebrates including lepidopteran insects, a grasshopper and a coral. : *J. Insect Biotechnology and Sericology*, 71, 109 -121, 2002.

(2) 口頭発表

1. Y. Nakajima *et al.*, Possible horizontal transfer of *mariner*-like sequences into some invertebrates including lepidopteran insects, a grasshopper and a coral inhabiting Japan islands, The First International Workshop of Lepidoptera Genomics, Tsukuba, Japan. 2002年9月30日～10月3日.
2. Y. Nakajima *et al.*, Sequence comparison of *Cecropia*-ITR-MLEs among some invertebrate including lepidopteran insects inhabiting Japan islands, Joint Meeting of Korean Society of Sericultural Science and Japanese Society of Sericultural Science, Suwon, Korea. 2002年10月17日～10月19日.
3. 中島裕美子¹、藤本浩文²、中村隆³、伴野豊³、橋戸和夫²、土田耕三²、高田直子²、前川秀彰²、(¹琉球大学・遺伝子実験センター、²国立感染症研究所・放射能管理室、³九州大学大学院・農学研究院・遺伝子資源開発研究センター), *Cecropia*-ITR-MLE比較に分類されるマリナー様配列比較によるカイコとクワコの分岐についての考察, 日本蚕糸学会第68回関西支部・平成14年度九州支部合同研究発表会, 京都府網野町, 2002年10月26日～27日.

4. 中島裕美子¹、藤本浩文²、中村隆³、伴野豊³、橋戸和夫²、土田耕三²、高田直子²、前川秀彰²、(¹琉球大学・遺伝子実験センター、²国立感染症研究所・放射能管理室、³九州大学大学院・農学研究院・遺伝子資源開発研究センター), *Cecropia*-ITR-MLE比較に分類されるマリナー様配列比較によるカイコとクワコの分岐についての考察, 日本蚕糸学会第73回大会、東京農業工業大学, 2003年3月28日~29日.
5. 中島裕美子¹、藤本浩文²、中村隆³、伴野豊³、橋戸和夫²、土田耕三²、高田直子²、前川秀彰²、(¹琉球大学・遺伝子実験センター、²国立感染症研究所・放射能管理室、³九州大学大学院・農学研究院・遺伝子資源開発研究センター), 与那国島のヨナグニ蚕、日本列島のウスタビガ、クスサン、東アジアにおけるクワコにおける *Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列の比較, 日本野蚕学会第9回大会, 京都工芸繊維大学, 2003年4月18日~19日.
6. 中島裕美子¹、藤本浩文^{2,3,4}、中村隆⁵、伴野豊⁵、橋戸和夫^{2,6}、椎野禎一郎⁷、土田耕三²、高田直子²、前川秀彰² (¹琉大・遺伝子実験センター、²感染研・放射能、³東大院・農、⁴原研、⁵九大院・遺伝子資源開発研究センター、⁶国立精神・神経センター、⁷感染研・感染情報), 鱗翅目昆虫ゲノムにおける水平伝播型トランスポゾン *mariner*, 日本進化学会福岡大会2003, 九州大学, 2003年8月1日~4日
7. Y. Nakajima *et al.*, *Mariner*-like sequences and their possessing insertion sequences classified into the *Cecropia*-ITR-MLE family in the genome of some invertebrates including lepidopteran insects, grasshopper and a coral inhabiting Asian region, Kolymbari Crete, Greece, 2003年8月25日~30日
8. Y. Nakajima *et al.*, Comparison of *mariner*-like elements among *Bombyx mandarina* individuals inhabiting East Asia in the light of the segregation of *B.mori* and *B. mandarina* genomes, 第2回日韓合同蚕糸学術大会, 2003年11月19日~21日.

9. 中島裕美子¹、藤本浩文^{2,3,4}、中村隆⁵、伴野豊⁵、橋戸和夫^{2,6}、椎野禎一郎⁷、土田耕三²、高田直子²、前川秀彰² (¹琉大・遺伝子実験センター、²感染研・放射能、³東大院・農、⁴原研、⁵九大院・遺伝子資源開発研究センター、⁶国立精神・神経センター、⁷感染研・感染情報), *Cecropia*-ITR-MLE比較によるクワコとカイコの分岐に関する考察, 第69回関西支部・第59回九州支部合同研究発表会, 京都工芸繊維大学, 2003年10月24日~25日.
10. 中島裕美子¹、中村 隆²、伴野 豊²、藤本浩文³、橋戸和夫³、土田耕三³、高田直子³、前川秀彰³ (¹琉大・遺伝子実験センター、²九大農院・遺伝子資源開発研究センター、³ 感染研・放射能), $n=27$ のクワコにおける *Cecropia*-ITR-MLE 比較から考察した、日本へのクワコ移入伝播モデル, 日本蚕糸学会第 74 回大会, 岩手大学, 2004 年 3 月 29 日~30 日.

(3) 出版物

1. 中島裕美子、佐藤良也、(¹琉大・遺伝子実験センター), 水平伝播を含む活性型転移因子からみた生物ゲノムの多様性, 文部科学教育通信 N077, 2003.6.9, 28-29.
2. 中島裕美子 (¹琉大・遺伝子実験センター), マリナーを指標とした生物の移動と分岐の考察, 沖縄ミニシンポジウム(確率論-遺伝進化-バイオインフォマティクス) レクチャーノート 2004.4, 107-113.

研究成果

(1) *Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列と生物の地理的分布、および、進化における分岐に関わる解析結果

セクロピア蚕 MLE の末端逆位繰り返し配列(*Cecropia*-MLE-ITR)は、鱗翅目昆虫を主とした日本列島に生息する生物種において、水平伝播型の MLE 全長配列を単離するのに有効な PCR プライマーであり、この手法によって単離された配列(*Cecropia*-ITR-MLE)の比較から、地理的移動も含めた種の分岐解析に使える可能性を示唆することができた (Nakajima *et al.*, 2002)。

しかしこのタイプは、日本列島に同じような分布域で生息していると考えられているクワコ (*Bombyx mandarina*) には存在しない。従って数十万年以降に日本列島に生息していた鱗翅目昆虫にこのグループのアウトブレイクが起こった時期にはクワコ ($n=27$) は日本に生息していなかったこと、更に朝鮮半島には、 $n=27$ と $n=28$ のクワコが生息していることから、 $n=27$ のクワコはかなり近年に朝鮮半島を経て日本に移動したと考えられる。一方、 $n=28$ のクワコと $n=27$ クワコの分離は約 300 万年前(Maekawa *et al.*, 1989)という説があることから、 $n=27$ クワコはかなり長い間朝鮮半島に閉じ込められていた可能性も想定できる。

現日本のカイコほぼ全て系統で確認される 4.2 kb のバンドは、2 種類の起源を同じくすると考えられるレトロトランスポゾン *BMC1* と *L1Bm* が入れ子状態に挿入された MLE (*BmTNML*) であり、カイコを特徴づけるバンドであることが報告されている (Tomita *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1999)。別の配列に挿入された MLE、あるいは一部が欠失して生じたと思われる MLE を比較したところ、 $n=27$ 個体からの MLE は *BmTNML* と系統樹において同じグループに収束した。以上の結果から、これらの MLE は、カイコとクワコの共通祖先から分かれて $n=28$ および $n=27$ へ分岐する以前 (300 万年前) にゲノムに挿入された配列である可能性が考えられた (Nakajima *et al.*, 2003)。

今後はまず、水平伝播型 *Cecropia*-ITR-MLE のアジア地域における分布、その境界域を明らかにし、地質年代からのデータに照らし合わせて、このタイプがゲノムに挿入された年代を正確に算出することを目的として研究を進める。また、これらの配列における塩基置換の頻度や領域から、生物集団の空間的、時間的相関関係を明らかにする。そのためには、できるだけ広範囲に生息する数多くの種からのサンプルを収集し、それらについて網羅的な解析を行う。

(2) ヨナグニ蚕から単離した活性型 MLE 配列における転移活性解析実験の経過

1.

完全長のマリナー (1.3 kbp) を含む Amp 耐性プラスミドよりトランスポゼースコード領域を PCR 増幅後、pENTR11 (Km 耐性) に挿入した (pENTR-mTra)。この pENTR-mTra よりトランスポゼースコード領域を LR 反応で、大腸菌発現ベクター pDEST14 (Amp 耐性) に転移させた。

完全長のマリナー（1.3 kbp）を含む Amp 耐性プラスミドに pGSP1.1 由来の Km 耐性遺伝子をランダムに挿入したプラスミドライブラリー（ドナープラスミド）を作製した。このライブラリーをヘルパープラスミドである pDEST14-mTra とアクセプタープラスミドである Gm 耐性プラスミドを含む大腸菌に形質転換し、Gm と Km を含む培地で培養後、プラスミドを抽出し、再度大腸菌に形質転換し、Gm と Km を含む培地で選択を行った。大腸菌中で、ヘルパープラスミドの働きによりマリナー認識配列間の Km 耐性遺伝子が Gm 耐性プラスミド上に転移すれば、Gm と Km 耐性プラスミドが得られるはずであるが、実際には同一プラスミド中に二つの耐性遺伝子を合わせ持つクローンが得られなかったことから、マリナーの大腸菌中での転移活性は非常に低いことが予想された。

2.

そこで、カイコ培養細胞中での転移活性を調べるために pENTR-mTra のトランスポゼースコード領域を LR 反応で、カイコ発現ベクター pDEST38（Amp 耐性）に転移させた。大腸菌の場合と同様に、ドナープラスミドライブラリーとアクセプタープラスミドとともに培養細胞にトランスフェクションし、3日後にプラスミドを回収し、大腸菌に形質転換し、Gm と Km を含む培地で選択を行ったが、転移を示唆するクローンは得られなかった。

この原因は、大部分の次にドナー配列がカイコ染色体に転移してしまったために、プラスミドに転移したクローンが得られなかった可能性が考えられる。そこで、pGSP1.1 の Km 耐性遺伝子を IE1 プロモーター制御下の GFP-Zeo 遺伝子に置換し、再度ドナープラスミドライブラリーを作製し、pDEST38-mTra とともにカイコ培養細胞にコトランスフェクションした。トランスポゼースによりマリナー配列がカイコ染色体に転移すれば、Zeo 耐性細胞株が得られるはずであるが、Zeo による選択後、生き残る細胞が得られなかった。

この原因は、マリナー因子の転移には、末端の反復配列に加えて、近傍の配列が切り出し反応に必要であることが考えられたため、現在、マリナーの周辺配列を含むドナープラスミドライブラリーを作製中である。

目次

Possible horizontal transfer of *mariner*-like sequence into some invertebrates including lepidopteran insects, a grasshopper and a coral. 1-13

Comparison of *mariner*-like elements among *Bombyx mandarina* individuals inhabiting east Asia in the light of the segregation of *B. mori* and *B. mandarina* 14-22

水平伝播を含む活性型転移因子からみた生物ゲノムの多様性 23-24

マリナーを指標とした生物の移動と分岐の考察 25-31