

台湾産クワコからのマリナー様転移因子の単離とその系統解析

鎌内 悠^{1), 2)}・川西祐一²⁾・矢後勝也³⁾・小田切顕一⁴⁾・上田恭一郎⁵⁾・
伴野 豊⁶⁾・前川秀彰²⁾・Yu-Feng Hsu⁷⁾・黄勇平⁸⁾・
日高道雄¹⁾・中島裕美子²⁾

¹⁾ 琉球大学理学部, ²⁾ 琉球大学分子生命科学センター, ³⁾ 東京大学大学院理学研究科,
⁴⁾ 九州大学大学院比較社会文化研究院, ⁵⁾ 北九州市立博物館, ⁶⁾ 九州大学大学院農学研究科,
⁷⁾ Department of Life Science, National Taiwan Normal University⁸⁾, 中国科学院上海生命科学院

(2008年12月8日受付; 2009年1月8日受理)

Isolation and phylogenetic analysis of *mariner*-like elements of *Bombyx mandarina* inhabiting Taiwan.

YU KAMAUCHI, YUICHI KAWANISHI, KATSUYA YAGO, KENICHI ODAGIRI, KYOICHIRO UEDA, YUTAKA BANNO,
HIDEAKI MAEKAWA, YU-FENG HSU, YONG PING HUANG, MICHIO HIDAHA, and YUMIKO NAKAJIMA

One of *mariner*-like elements, *Cecropia*-ITR-MLE, was isolated from the region corresponding to the *BmTNML* locus of *Bombyx mori*, of genomic DNA of *Bombyx mandarina* inhabiting Taiwan. Isolated clones of the *Cecropia*-ITR-MLE were sequenced and all clones from *B. mandarina* (Taiwan) did not contain other insertion sequences while clones isolated from the same region of *B. mandarina* (China), (Korea) and (Japan) contained *LIBm* and/or *BmamaT1*. Isolated clones (Taiwan) were classified into the Japanese type *Cecropia*-ITR-MLE cluster but not in Continental type one. Several clones were classified into the same group as Chinese clones in this Japanese type group. The others were classified into clearly separated Korean and Japanese type group. Taiwan and Chinese group clones are not isolated from *B. mandarina* containing Korean and Japanese type so far. On the contrary, Korean and Japanese group clones are not isolated from *B. mandarina* containing Chinese group. Therefore, Taiwan group could be derived through the China continental group, and Korean and Japanese group included in *B. mandarina* (Taiwan) might be derived from the old land area covered both Korean peninsula and Japanese Kyushu island through Ryukyu islands which constructed a long-crescent shaped peninsula connected to Taiwan few ten thousands ago and divided to islands by the rising up of sea-surface after that.

Key words : *Cecropia*-ITR-MLE, *Bombyx mandarina*, *Mariner*, Taiwan, Phylogeny

結 言

マリナー因子は転移因子のファミリーであり、植物から哺乳類までのゲノムDNAに広く分布していることが知られている。マリナー因子は約 1.3 kbp の塩基長を有し、自身を転移させる活性のあるトランスポゼースをコードする Open Reading Frame (ORF) を有している。また、両端にはトランスポゼースの認識部位と考えられている約 30 bp の逆位末端繰返し配列 (ITR) を持っている (HARTL, 1989)。転移活性のある因子はモーリシャスショウジョウバエ (*Drosophila mauritiana*) から *Mos1* として単離されたものが最初である (MEDHORA et al., 1991; JACOBSON et al., 1986)。その後、セクロピア蚕 (*Hyalophora cecropia*) のプレプロセクロピン A 遺伝子のイントロンから、*Mos1* に相同な配列として、マリナー様因子 (MLE) が見出された (LIDHOLM et al., 1991)。これらの配列比較から ORF 中の保存配列が明らかにされ、それを基に MLE のコンセンサス領域を単離するための degenerated プライマーが設計された (ROBERTSON, 1993)。その後、カビから哺乳類までのゲノムから種々の相同配列が単離されているが、完全な ORF をもつ配列は少ない。

我々は、degenerated プライマーによって単離される MLE のコンセンサス領域を比較するのではなく、ITR をプライマーとして配列全体を単離し比較することで、同じグループの MLE がどのような分布をしているか、また、どのように進化してきたかを推定できると考えている (NAKAJIMA et al., 1998)。この考えに基づき、中国、韓国、日本に生息するクワコから *H. cecropia* の MLE の ITR 配列をプライマーとした PCR によって増幅できる MLE (*Cecropia*-ITR-MLE : CIM) を比較したところ、日本の本州に特徴的なグループ (日本タイプ) とそれ以外のグループ (大陸タイプ) に明確に分けることが出来た (KAWANISHI et al., 2007)。中国産、韓国産のクワコの中にも日本タイプが存在している。日本タイプからは MLE 中に挿入されている因子としてレトロトランスポゾン的一种である *LIBm* 以外にクワコに特徴的な DNA 型転移因子である *maT* ファミリーに属する *BmamaT1* が新たに見出された (KAWANISHI et al., 2008)。このように CIM は多様に変異していることから、地理的に離れている台湾産クワコの CIM を調べることは、クワコの進化を解析する上で重要であるといえる。MLE はゲノム中に多くのコピーが存在するため、比較対象を限定することが難しい。MLE 塩基配列の比

²⁾ 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町字千原1
Tel, Fax: 098-895-8942
連絡先: yumiko28@comb.u-ryukyu.ac.jp

較に基づき、その進化過程を解析するためには、進化的に同じバックグラウンドを持つ MLE どうし、すなわち、オーソロガスな MLE どうしを比較する必要がある。そこで我々は、さらに特化した配列を単離、比較し、より詳細な進化的関係を明らかにできるか否かを検討した。そのための遺伝子座としてカイコで見出された *BmTNML* 座位を取り上げることにした (NAKAJIMA et al., 1999; KAWANISHI et al., 2007)。この座位には CIM が挿入されており、カイコではさらにレトロトランスポゾン *L1Bm* (ICHIMURA et al., 1997) が挿入され、それに *BMCI* (OGURA et al., 1994) が挿入された三層構造をとっている (NAKAJIMA et al., 1999)。この領域は、これまでに解析した約 30 のカイコ系統全てに見出されることから、かなり古い時期に挿入が起こったと考えている。カイコはクワコから家畜化されているので、クワコでも相当領域が存在するはずであり、そこを単離して比較することで挿入後の CIM の進化の過程をたどることが出来ると考えた。また、配列が固定されていることから、MLE 挿入後のクワコ集団の動きや進化をたどることも可能であると考えた。

南西諸島は数万年前には島々が陸続きで台湾まで繋がっていたといわれているが、現在では海面上昇により離れた島となっている。また、現在の南西諸島は亜熱帯気候でクワコは生息していない。台湾と陸続きであった時代には南西諸島は温帯気候だったと推定されており、その頃にはクワコが生息していたと考えられる。何故なら台湾では 2,000 m を超える山があり、クワコが気温の低い高地には生息しているからである (クワコは卵の殻の形状からもともと北方系であり、極東ロシアにも生息している (河原畑, 1998))。そのため、台湾産クワコの DNA から *BmTNML* 座位相当領域を単離し、その中に局在する CIM の配列を決定し比較することで、南西諸島が陸続きであった時代にこの地域にクワコが分布していた可能性を推定できると考えた。

そこで、台湾産クワコから DNA を抽出し、PCR 反応により *BmTNML* 座位相当領域を増幅し、さらに *H. cecropia* の ITR で nested-PCR を行うことにより、その座位に CIM が存在することを確認した。これらの配列を既に得られている中国、韓国、日本産クワコから単離された CIM 配列と比較した。

材料と方法

供試虫：台湾の埔里および復興、中国上海から採集されたクワコ幼虫を使用した。それ以外は NBRP により九州大学から提供された。

ゲノム DNA 抽出：供試虫から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) により調製したゲノム DNA に対し、カイコ *BmTNML* 座位に特異的なプライマー *BmTNML*-UP500 (5'-AAAGTGAGCGCTCATCTAG

G-3') 及び *BmTNML*-DOWN500 (5'-TCCAGCGCAACTACATCTAC-3') を使用して *Ex Taq* ポリメラーゼ (タカラバイオ) により PCR を行った。PCR は、①94 °C 2 min, ②94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 2 min (40cycles), ③72 °C 3 min, ④4 °C 保存の温度条件で行った。CIM の挿入確認のために、*H. cecropia* MLE の ITR の配列 (5'-TTAATATTAGGT CCTACATATGAAATTAGCGTTTTTGT-3') をプライマーとして使用し nested PCR を行った。温度条件は、①95 °C 1 min, ②95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 75 °C 1 min (40cycles), ③75 °C 4 min, ④4 °C 保存で行った。得られた PCR 産物は、TA クローニングキット (Invitrogen) を使って pCR2.1 ベクターに挿入しクローンを単離し、PRISM3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems and Hitachi) を使用して塩基配列を決定した。

アラインメントと系統解析：アラインメントは MEGA4 を使い、内蔵された clustalW によって自動処理した後、MEGA4 のアラインメントエディタを用いて手動でギャップ位置を調整した。系統樹推定は、MEGA4 に内蔵された近隣接合法により実施し、推定した系統樹の検定は 1000 回のリサンプリングによるブートストラップ検定により行った (THOMPSON et al., 1994; SAITOU and NEI, 1987; KUMAR et al., 2004; <http://www.megasoftware.net/mega3/>)。 *BmTNML* 座位相当領域の MLE 領域を同定するため、トランスポーズの完全な ORF をもつ CIM である *Attacus atlas* の MLE 配列と BLAST (bl2seq) を使用して比較した。挿入配列があるものは、MLE 部分を FASTA ver. 2 の 'ALIGN' により検索し挿入配列を排除した。中国、韓国、日本産クワコから単離した *BmTNML* 座位相当領域の CIM と台湾産クワコから単離されたクローンとを比較した。

結 果

PCR 増幅

台湾産クワコゲノムに対する UP500 及び DOWN500 プライマーを用いた *BmTNML* 座位相当領域の PCR 増幅により、予想された約 2.3 kbp の断片が得られた (Fig. 1a)。さらに増幅産物に対して *Cecropia*-ITR をプライマーとして nested PCR を行なったところ、CIM の全長に相当する約 1.3 kbp の断片が増幅された (Fig. 1b)。これはカイコや他のクワコで見られた、*L1Bm* や *BMCI*、*BmamaT1* などの挿入がない長さに相当する。

分子系統解析

台湾産クワコから単離した *BmTNML* 座位相当領域のクローンの塩基配列を決定した。それらの CIM 領域を特定し、すでに明らかになっている中国、韓国、日本産クワコの同座位の CIM 領域の塩基配列と比較し、系統樹を推定した (Fig. 2)。台湾産クワコから単離した *BmTNML* 座位相当領域の

CIM配列は、系統樹上で2つのタイプに分かれた。一つは中国産クワコから単離されたクローンと同じクラスターに分類されるタイプ、もう一つは韓国産、日本産と同じクラスターに入るタイプであった。

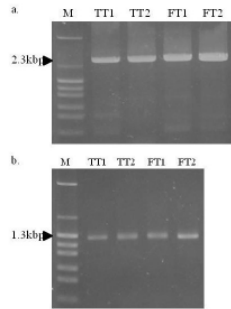


Fig. 1. PCR amplification of genomic DNA from *B. mandarina* inhabiting Taiwan. (a.) Electrophoresis of PCR products amplified by the primer set of BmTNML-UP500 and BmTNML-DOWN500. Predicted size of the PCR products is 2.3 kbp for the *BmTNML* locus without any insertions. (b.) Electrophoresis of nested PCR products to 2.3 kbp bands shown in Fig.1-a, by using ITR of *Cecropia*-ITR- MLE (CIM) as primers. 1.3kbp bands could be predicted. M shows a pHY size marker.

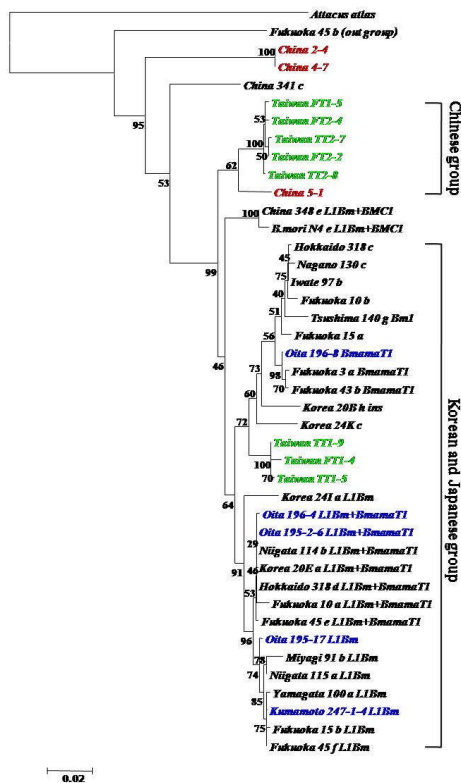


Fig. 2. Full-length phylogenetic tree of *B. mandarina* *Cecropia*-ITR MLEs located into the *BmTNML* corresponding locus of *B. mori*. Taiwan (green), China (red), Oita (blue), Kumamoto (blue) and the others (black) are shown by indicated color letters. Two groups were demonstrated to be classified to the Chinese group and the Korean and Japanese group, respectively.

考 察

ゲノムの種々の部位に挿入されている CIM は、日本の本州に特徴的なグループ（日本タイプ）とそれ以外のグループ（大陸タイプ）に分けられることが明らかになっている（KAWANISHI et al., 2007）。CIM が古くにアジアに生息していたクワコの祖先集団のゲノムに挿入され、その後その祖先集団がアジア全域に分布を広げていった可能性が高い。ゲノム全体に挿入された CIM の中の 1 つが、*BmTNML* 座位相当領域に挿入されたと考えている。種々の部位に挿入された CIM を比較するのではなく、特定の部位に挿入され固定された CIM を比較することでクワコの地理的移動を進化的に追跡できると考えている。そのため、*BmTNML* 座位相当領域に特徴的な日本タイプに焦点を当てて解析した。

この日本タイプの CIM は日本のみならず中国産、韓国産クワコからも単離されていることから、朝鮮半島、日本列島、琉球列島、台湾が隆起と沈降により複雑に融合離反を繰り返して形成されていった地殻形成過程で（木村, 2002）、それぞれの集団が独自に進化してきたといえる。日本タイプ中に韓国産のものが入ったり、台湾産が小さなグループを形成したりしているのはそのためであると考えている（Fig. 2）。しかしほとんどの日本産クワコから単離された CIM は大きなサブクラスターを構成しており、特に本州から単離されたものが独自進化をたどってきたと考えられる（Fig. 2 参照）。台湾産クワコから見いだされた中国産クワコと同じグループに分類されるタイプは、日本タイプと似ているが異なる集団が中国や韓国で進化してきたことを示す根拠になる。また、台湾産クワコから本州グループのクラスターに分類されるタイプが単離されたことから、日本タイプとして独自進化を取ってきたものが、現在は離れている台湾と過去に繋がりがあったことが示唆された。これは、百万年前から数万年前にかけて南西諸島で隆起と沈降が繰り返され（木村, 2002）、朝鮮半島から九州、そして琉球列島にかけて陸続きであった時代が何回もあったことと関係していると考えられる。クワコはもともと北方系であることから、1,000 m 以下の山しかない南西諸島では発見されていない。この理由は亜熱帯気候では生息できないためと思われる。亜熱帯に位置する台湾では生息が確認されたが、生息地帯が 2,000 m を超える高山であることから、この推論が当てはまるといえる。かつては大陸と陸続きで尚且つ気温が低い温帯の気候であった南西諸島においてクワコが生息しており、それは台湾を含む地域にまで広がっていたと推測できる。

以上のことから台湾産クワコは、中国大陸を経て台湾へ至った大陸経路ルートと、日本列島や朝鮮半島から南西諸島を経て台湾へ至った琉球孤

- structure comprising a *mariner*-like element and two additional retrotransposons found in the *Bombyx mori* genome. *J. Mol. Evol.*, **48**, 577-585.
- OGURA, T., OKANO, K., TSUCHIDA, K., MIYAJIMA, N., TANAKA, H., TAKADA, N., IZUMI, S., TOMINO, S. and MAEKAWA, H. (1994) A defective non-LTR retrotransposon is dispersed throughout the genome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Chromosoma*, **103**, 311-323.
- OOSUMI, T., BELKNAP, W. R. and GARLICK, P. K. (1995) *Mariner* transposons in humans. *Nature*, **378**, 672.
- ROBERTSON, H. M. (1993) The *mariner* transposable element is widespread in insects. *Nature*, **362**, 241-245.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. and GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.