

## 家畜の家畜化された転移酵素：ZBED6/MGR

ここ 60 年間の豚の品種改良により、筋肉がより多く脂肪がより少ない豚肉を作り出すことが可能になってきた。この品種改良が選り出した遺伝形質の一つが、insulin-like growth factor 2 の第 3 イントロン中のたった一塩基の、G から A への置換である。この置換が父親から入ってきた場合には、骨格筋での IGF2 の発現を 3 倍にも上昇させる。そして骨格筋の量を増やし、肉の収穫量を 3-4%改善させる。この置換塩基を含む 16 塩基は有胎盤哺乳類で完全に保存されている。すなわち、この保存された 16 塩基に結合する転写抑制因子が結合できなくなるのが IGF2 の発現上昇の原因であると考えられる。

マウスの C2C12 細胞では、この仮想転写抑制因子が発現していることが確認されている。この細胞を用いて Markljung らと Butter らは独立にこの転写制御因子の同定に成功した (Markljung et al. 2009; Butter et al. 2010)。彼らは共に SILAC (stable isotope labeling of amino acids in culture) と LCMS (liquid chromatography mass spectrometry) を利用して同じ転写制御因子にたどり着いた。これを Markljung らは ZBED6 (zinc finger BED domain-containing 6)、Butter らは MGR (muscle growth regulator) と命名した。(以降、Markljung らの結果は ZBED6、Butter らの結果は MGR、両者ともに示した結果は ZBED6/MGR と表記することにする。) SILAC とは、安定同位体を用いる手法である。まず、2 つにわけた培養細胞の片方には軽い同位体を、もう一方には重い同位体を加えて培養する。ここでは重い同位体として  $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$  を取り込んだアルギニンとリジンを使用している。上述の豚の変異の無い標的配列 (q) と変異のある標的配列 (Q) の biotin でラベルされた二本鎖 DNA を合成し、q を軽い同位体で培養した細胞の核抽出液と、Q を重い同位体で培養した細胞の核抽出液と混ぜ合わせる。更に streptavidin でコーティングされたビーズを加えた後、遠心してビーズに結合した (すなわち DNA と結合した) 部分だけを取り出す。これを等量ずつ混合し、変性させた後、SDS-PAGE により分画、切り出し、アルカリ化、トリプシン処理後に LCMS にかけてアミノ酸配列を決定する。DNA への結合量に違いがあると、同位体の違いにより区別ができる。

ZBED6/MGR のタンパク質コード領域は別の遺伝子 *Zc3h11a* の第 1 イントロンに含まれており、Northern hybridization と RT-PCR の結果では、ZBED6 と *Zc3h11a* の発現組織は一致し、脳、筋肉、卵巣、精巣で強い発現が見られた。ENCODE による RNA polymerase II 結合部位は *Zc3h11a* と ZBED6 の上流にあり、両者は同じ転写開始点から転写される、splice variant の関係であると言える。

ZBED6/MGR は N 末に核移行シグナルと 2 つの BED ドメイン、C 末に hAT 二量体化ドメインを持つ。BED ドメインと hAT 二量体化ドメインの組み合わせ

は hAT タイプの転移因子のコードするタンパク質に特徴的なものであり、hAT が取り込まれた物であるとわかる。2つの BED ドメインは相互に近縁であり、進化の過程で重複されたことがわかった。しかも BED ドメインは有胎盤哺乳類で高度に保存されており、アミノ酸レベルでほぼ 100% 相同であった。

ZBED6/MGR の BED ドメインは q との結合に必須であり、MGR の hAT 二量体化ドメインは必要ではなかった。しかし、MGR は近くの CpG がメチル化されている q とは結合しない。

ZBED6 には翻訳開始点の異なる 2 種類の isoform が確認された。ZBED6 の 61-80、231-248 は核移行シグナルで、この両方を含むレポータータンパク質は核小体に局在し、後者のみの場合には核小体以外の核に局在したので前者に核小体への移行シグナルがあると考えられる。BAC を用いて MGR を過剰発現させると増殖の遅延が観察された。IGF2 の領域のメチル化の程度は C2C12 では低い。逆に、siRNA による ZBED6 の抑制により Igf2 の発現量は増加し、細胞の寿命が延び、筋繊維形成が速くなった。

ChIP-sequencing により ZBED6 の結合する配列を調べると、Igf2 の q 配列を含め 2500 カ所への結合が観察された。結合配列のコンセンサスは GCTCGC となり、q の AGGCTCGC と完全に一致した。これらの結合配列の周辺の遺伝子を調べると発生や細胞分化などに関与する遺伝子が多いことがわかった。

ZBED6 は有胎盤哺乳類にしか分布しないが、ZBED6 と相同な配列がカモノハシとオポッサムでも確認された。これらの配列はタンパク質をコードしていない。従って、単孔類と獣類(有袋類と有胎盤類)の分岐以前に挿入された hAT が、有袋類との分岐後に有胎盤類の共通祖先で ZBED6 として必須遺伝子化したものだとわかる。単孔類/獣類の分岐から有袋類/有胎盤類の分岐まではおそらく数千万年の差があるので、その間タンパク質をコードしたまま中立進化していたとは考えにくい。有袋類との分岐以前にも遺伝子として働いていたのが有袋類(単孔類も?)ではその機能が失われたと考える方が自然であろう。

Markljung E, Jiang L, Jaffe JD, Mikkelsen TS, Wallerman O, Larhammar M, Zhang X, Wang L, Saenz-Vash V, Gnirke A, Lindroth AM, Barrés R, Yan J, Strömberg S, De S, Pontén F, Lander ES, Carr SA, Zierath JR, Kullander K, Wadelius C, Lindblad-Toh K, Andersson G, Hjälml G, Andersson L. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth.

PLoS Biol. 2009 Dec;7(12):e1000256. Epub 2009 Dec 15.

PubMed PMID:20016685; PubMed Central PMCID: PMC2780926.

Butter F, Kappei D, Buchholz F, Vermeulen M, Mann M.

A domesticated transposon mediates the effects of a single-nucleotide polymorphism responsible for enhanced muscle growth.

EMBO Rep. 2010 Apr;11(4):305-11. Epub 2010 Feb 5.

PubMed PMID:20134481; PubMed Central PMCID: PMC2854606.

2011/04/10

小島 健司 著

禁 無断複写転載