公募研究：2000年度，2001年度，2003年度

# 線虫の発生過程における低分子非翻訳RNA種の発現比較

●牛田　千里

弘前大学農学生命科学部

**〈研究の目的と進め方〉**

DNA二重らせんの発見から1990年代後半に至るまで，機能性の非翻訳RNA（ncRNA）といえば，tRNAやrRNAに代表されるごくわずかなRNA分子種しか知られておらず，そのイメージとしては「遺伝子発現における仲介者」といったものであった。何十種類という生物のゲノム解読が完了しても，そこにコードされているncRNA遺伝子を予測することは難しく，それらの発見は偶然によるところが大きかった。本特定領域開始当初には，ポストゲノムプロジェクトの世界的な一研究動向として，細胞内に発現しているタンパク質を全体として把握しようとするプロテオーム解析や，タンパク質遺伝子と予測されたDNAの配列をもとにつくられたマイクロアレイやDNAチップを用いた遺伝子発現解析が盛んに行われていた。しかし，ncRNAについてはこれに相当する総括的な研究は行われていなかった。生命の全体像を把握するためにはゲノムDNAやタンパク質同様，ncRNAについても理解を深めることが必要である。これまでの機能性ncRNAの発見が偶然によるものであったことの理由の１つは，従来の研究方法が，ある生命現象から出発してそれに関与する因子を同定するという方向のものであったからである。しかし近年急速に進歩してきたRNA研究技法の確立やデータの蓄積，遺伝子ノックアウト技法の開発は機能未知のRNA分子を同定し，それらの機能にアプローチする方向での研究も可能にしつつある。以上のような背景のもと，本研究ではncRNAが複雑な遺伝子ネットワークの中でどのように他の機能分子と関わりあって様々な生命現象に関与しているか理解することを目的とし，細胞に存在する機能性ncRNAを組織的に網羅する「ncRNA分子種のカタログ化」を行うことを目指した。

研究を進めるにあたって下記３点を柱に据えた。

１）ncRNAをカタログ化するシステムの構築
２）状態の異なる個体に由来するncRNAカタログの比較
３）新規ncRNA分子種の機能解析

上記１）では生体内に存在するncRNAをリストアップするための方法と，それらを理解しやすい形に表現してまとめる方法をシステムとして構築することを，２）ではそのシステムを利用して生体内ncRNAの発現パターンを全体として把握し，比較することを目指した。また，これが特徴のある発現パターンを示す新規ncRNAの同定に結びつくことを期待した。３）では一連の実験を通して発見した新規ncRNAについて，遺伝学的あるいは生化学的解析により機能を明らかにすることを目的とした。研究の初期段階では１）に重点をおいて実験を進め，ncRNAをリストアップする方法が確立できた段階で２）に進み，１）と２）に一通りの見通しが立った段階で３）に取り組むことを計画した。生物材料として線虫（Caenorhabditis elegans）を選んだ。その理由は，遺伝学を用いて新規RNA遺伝子の機能解析が可能であること，ゲノムプロジェクトが終了しておりゲノム配列から新規RNA遺伝子の検索が可能であること，決定している細胞系譜をもとに新規RNA遺伝子の発現細胞の同定が可能であること，多細胞生物である線虫を用いることによって，老化，行動，神経発生，胚発生等に関わる新規RNA の発見が期待でき，その成果はマウス等のヒトモデル動物への応用につながるからである。

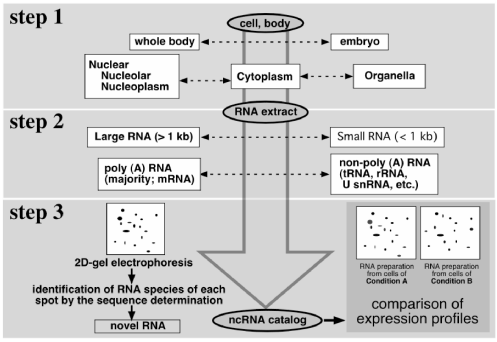


図１．二次元ゲル電気泳動法を応用した RNA の発現比較システム．生体に存在する RNA 種は配列や大きさ，高次構造等に大きな違いがあるため，二次元ゲル電気泳動法によって解析する前にある程度分画しておくことが必要であると考えられる。例えば細胞を核と細胞質，オルガネラに分け（step 1），それぞれから RNA を抽出した後，RNA の大きさにより分画したり，既知の RNA は試料から除いておくなどの処理を施す（step 2）ことが考えられる。こうして調製した試料を二次元ゲル電気泳動にかけ，検出された RNA スポットパターンの再現性を確認した上で，今度は異なる条件下にある細胞や個体から同様に調製した RNA 試料の二次元ゲル電気泳動のパターンと比較し，検出されるスポットの有無に対応をつける（step 3）。片方に検出されたスポット由来の RNA はその個体あるいは細胞でのみ発現していることが，両方で検出されたスポット由来の RNA は両者で発現していることが予想される。

**〈研究開始時の研究計画〉**

１）線虫実験系の導入

申請者は本特定領域に研究課題を申請する以前はバクテリアのncRNAに関する研究を行っていたため，本課題を開始するにあたって，線虫を用いた実験系の導入と，大量に線虫からRNAを調製するための準備から始めなければならなかった。そこで，研究計画の第一は線虫を用いて一連の実験を行うための装置や技術の導入とした。

２）二次元電気泳動法を用いたncRNAカタログ化システムの構築

研究開始当初，RNAを大雑把に分類すると，mRNA，tRNA，rRNA，スプライシングに働く核内低分子RNA（U1, U2, U4, U5, U6 snRNA），特定の配列を含みrRNAの修飾に働く核小体RNA（U snoRNA），そして他の非翻訳RNAとできた。ここ数年のRNA研究の発展により，現在ではこれらに加えて，miRNAやsiRNAがメジャーなRNAファミリーとしてあげられる。これらはそれまでのデータの蓄積をもとに，配列モチーフや構造の特徴が明らかになっているので，ゲノム解析で得られたDNAの塩基配列から情報科学的手法を用いて，コードする遺伝子をか

なり確実に推定することができる。またmRNAに関しては，個々の大きさや種類，細胞内での発現量はまちまちであるが，ORFの比較やDNAチップを利用した解析などからその同定や発現の変化が体系的に研究されつつある。これらに対して他のncRNAについては従来のゲノム解析やトランスクリプトーム解析から得られる情報だけでは遺伝子の同定や発現を予測することが難しかった。そこで，二次元ゲル電気泳動法を用いて細胞から抽出したRNAを分離し，その発現パターンの全体を泳動像として把握できるような系の構築を計画した（図１）。また，個々のスポットに含まれるRNA種の同定し，それらの情報を整理してデータベースとしてまとめることを計画した。

３）線虫の発生過程における低分子ncRNAの発現比較

二次元ゲル電気泳動法による低分子RNA分離システムを利用して，線虫の卵（正確には未受精卵から孵化直前まで発生が進んだ胚が混在した状態のもの），幼虫L1～L4，成虫における低分子RNAの発現パターンを比較して，それぞれの時期に特異的に発現しているRNA種を単離，同定することを計画した。

４）新規ncRNAの同定と発現確認

一連の実験を通して得られた新規ncRNA候補について，末端配列を正確に決定し，キャップ構造の有無や二次構造について検討する。また，それぞれの発現をノザンハイブリダイゼーションやRT-PCRによって確認する。さらにはin situハイブリダイゼーションにより，それらの発現の時期特異性や局在に関する情報を得る。

**〈研究期間の成果〉**

１）線虫実験系の導入

線虫の実験系についてはゼロからの立ち上げであったが，九州大学・大島靖美教授（現崇城大学教授）の研究グループや神戸大学・藤原俊伸助手にお教えいただき，申請者の研究室に導入することができた。

２）二次元電気泳動法を用いたncRNAカタログ化システムの構築

従来のRNA二次元ゲル電気泳動法をもとに，mixed-stage（様々な発生段階にある虫が混在している状態）の線虫から調製した50nt以下および50-150ntの低分子RNA画分を再現性よく，簡便に分離できるような二次元ゲル電気泳動法を確立した。二次元ゲル電気泳動と同様のゲル組成で一次元のゲル電気泳動を２回行った場合には15本のバンドにしか分離できなかった線虫50nt以下のRNA画分が，二次元に展開することにより，134個のスポットに分離できた（図２（A）左）。このうち任意に選んだ23個のスポットからRNAを精製し，cDNAを合成して配列を決定した。１つのスポットに複数のRNA種が含まれている場合が多く，また，rRNAやtRNAなど既知のncRNAの一部の配列と一致する配列をもつものが多く単離された。miRNAも数種類含まれていた。解析した299個のcDNA配列の中で，得られた新規RNA候補は11種類であった。その長さは23-31ntであった。いずれもmiRNAやsiRNAの定義に該当するような特徴を満たしてはいなかった。

(研究期間の全成果公表リスト1）-2, 2)-1, 3)-1,4)-1, 3, 5,6参照)

３）線虫の発生過程における低分子ncRNAの発現比較

線虫のL2-L4期にある幼虫および成虫をそれぞれ同調培養により集め，RNAを抽出して50nt以下の画分について二次元ゲル電気泳動を行い，そのパターンを比較した(図２（A）右４つのパネル)。その結果，いずれのパターンも概要は同様のものであったが，いくつかの違いが見られた。例えば図２（A）のL2やL3の結果では，L4のパネルとadultのパネルに白丸で示したRNAスポットに該当する位置に同様のスポットは検出されなかった。

線虫の卵の低分子RNA発現パターンを他の発生段階と比較することも行った。ここでいう「卵」とは，未受精卵から孵化直前の胚までを含む。卵からのRNA抽出方法はL1-成虫からの場合と異なるので，コントロールとして用いたmixed-stageの虫のRNA調製も卵からの抽出法にあわせた。両者の二次元ゲル電気泳動の結果は，先のL2～成虫の場合と異なり，一見して大きく異なった（図３（B））。特に卵由来のものでは図３（B）右パネルの黄色い円で示した領域にmixed-stage由来のものでは見られなかった特徴的なスポットが検出された。卵由来のRNA二次元ゲル電気泳動像に特異的に検出されたスポット４個を選んでRNAを精製し，cDNAを合成して配列を解析した結果，１個の新規ncRNA候補が得られた。

(研究期間の全成果公表リスト1）-2, 4)-1, 3, 5, 6 参照)

L1の虫については十分量の虫を集めることが困難であったが，現在引き続き検討中である。

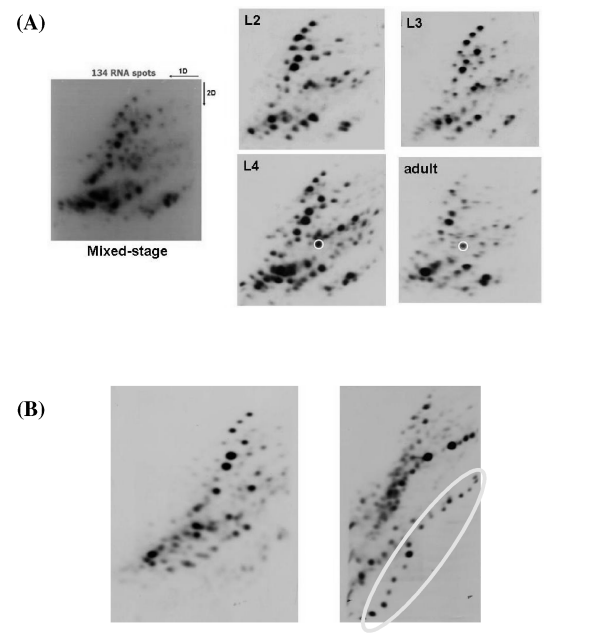


図２．二次元ゲル電気泳動による線虫低分子 RNA の分離.
（A）mixed-stage の虫と L1～L4，成虫（adult）から調製した低分子 RNA 画分（50nt 以下）の二次元ゲル電気泳動像。L4 および adult の写真に白い円で囲んだスポットは L2 および L3 の写真の該当する位置にスポットが検出されなかった例を示す。
（B）mixed-stage の虫（左）と卵（右）から調製した低分子 RNA 画分（<50nt）の二次元ゲル電気泳動像。右の写真の黄色い円は卵特異的に検出されたスポットを示す。

４）新規ncRNAの同定と発現確認

50nt以下のRNA画分から得られた新規ncRNA候補は12種類（11種類はmixed-stageの虫由来の画分から単離，１種類は卵由来の画分から単離），二次元ゲル電気泳動による分離システムを構築する過程で得られた他の新規ncRNA候補が22種類ある。合計34種類の新規ncRNA候補のうち，9種類（CeR-2, 4, 5, 6, 7, 3/8, 9, 19, 111）はノザンハイブリダイゼーションにより発現が確認された(CeR-3 RNAとCeR-8 RNAはパラログであり，両者には数塩基の違いがある。ノザンハイブリダイゼーションでそ

の違いを検出することは難しかったので，CeR-3またはCeR-8の意味でCeR-3/8と記述)。CeR-6 RNA, CeR-7 RNA, CeR-9 RNAは典型的なH/ACA型RNAの構造をもち，rRNAのシュードウリジル化に働くことが予想された。CeR-19 RNAはC/Dされた。これに対して，CeR-3 RNA, CeR-8 RNA, CeR-4 RNAはH/ACA型RNAに類似した二次構造をもつことが配列から予想されたが，rRNAやU snRNAの修飾に働くものとはいくつか異なる点が見られた。CeR-2 RNA，CeR-5 RNAはいずれも約120ntのRNAであるが，配列についても二次構造についても既存のncRNA種との類似性を見いだすことができなかったため，それぞれ別個の新規RNAファミリーに属するものと考えられた。CeR-111 RNAは反復配列由来のRNAであるが，ノザンハイブリダイゼーションの結果，約40ntの大きさにメジャーなシグナルが検出されたので，siRNAとは異なるものと考えられた。

CeR-2, 4, 5, 6, 7, 3/8, 9の各RNAについてはin situハイブリダイゼーションの結果も得られており，いずれも核小体に存在することが示された。CeR-6, 7, 9についてはその構造から核小体に局在することが予想され，それを裏付ける結果となった。他のRNAについては，局在に関する知見が得られたことが，今後機能解析に進む上での有力な情報となると考えられる。一例としてCeR-2 RNAの場合を図３に示した。

(研究期間の全成果公表リスト1）-1, 2, 4)-1, 3, 5, 6 参照)

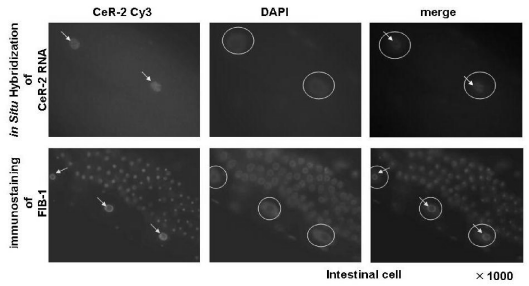


図３．CeR-2 RNA の *in situ* ハイブリダイゼーション．
（上左）CeR-2 RNA に相補的な配列をもつプローブを用いて FISH を行った結果，（上中央）上左と同じ視野の DAPI 染色像，（上右）上左と上中央の写真を重ね合わせたもの，（下左）核小体タンパク質フィブリラリンに対する抗体を用いて行った免疫染色の結果，（下中央）下左と同じ視野の DAPI 千色像，（下右）下左と下中央の写真を重ねたもの。矢印はそれぞれのシグナルを示す。

**〈国内外での成果の位置づけ〉**

本研究は電気泳動パターンとRNA種の対応付けをncRNA分子種のカタログ化に盛り込むという点において他グループのRNomics研究とは一線を画す。この方法は線虫のみならず，他の生物種にも広く適用できる。研究成果は論文の他，国内外のいくつかの学会で発表してきた（第23回日本分子生物学会年会[2004]口頭発表，キーストーンシンポジウ[2005]ポスター発表，Symposium on Structural and Evolutionary Genomics, Genome and RNA: Expression and Functions, Costa Rica [2005]口頭発表)。いずれにおいても本手法を試したいとの依頼があり，プロトコルをお送りしている。2004年の論文（成果公表リスト1）-1）に関しては今年初めに発表されたDengらの論文にも引用された(Deng et al. Genome Res. 16: 20-29 [2006])。

**〈達成できなかったこと，予想外の困難，その理由〉**

達成できなかったことはmixed-stageの線虫由来の低分子RNAのカタログ化において一部のRNA配列を解析するにとどまり，完成せず，データベースの形にまとめて公開するに至らなかったこと，特定の発生段階にある虫由来のRNA二次元電気泳動像において検出された特異的なスポット由来のRNA配列の解析がごく一部に終わったことの２点である。予想外の困難としては，cDNA合成に予想外に手間取ったことがあげられる。反応過程で特殊なオリゴヌクレオチドを使用するため，系を確立するのに多少の時間を要した。また，RNA種によってはcDNAが得られないこともあった。

**〈今後の課題〉**

今後の課題としてまずは線虫低分子RNAの二次元ゲル電気泳動パターンに対応づけたRNA種のリストをデータベース化してウェブ上に公開できる形にすることを完成させたい。その後は，課題の中心を個々のRNAの機能解析に移す。解析の方法としては，遺伝子破壊や過剰発現による表現型への影響を調べたり，関連因子を同定したりするとともに，それぞれの生合成経路についても解析を進め，機能解明の手がかりを得たい。

**〈研究期間の全成果公表リスト〉**

１）論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）

1. Wachi, M., Ogawa, T., Yokoyama, K., Hokii, Y., Shimoyama, M., Muto, A., Ushida, C. Isolation of eight novel Caenorhabditis elegans small RNAs, Gene, 335, 47-56 (2004).

2. Hokii, Y., Kubo, A., Ogasawara, T., Nogi, Y., Taneda, A., Arai, R., Muto, A., Ushida, C., Twelve novel C. elegans RNA candidates isolated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Gene, Epub ahead of print (2005).

２）データベース／ソフトウェア

1.種田晃人，牛田千里：cDNA配列抽出プログラム，http://rna.si.hirosaki-u.ac.jp/cDNA/

３）特許など

1.出願中：特許願　整理番号04P239HU　受付番号50500020999

４）その他顕著なもの，

1.牛田千里：線虫にみるRNA機能の多様性．「機能性non-coding RNA」（仮題）著書執筆分担．（校正中）

2.牛田千里：小さなRNAの大きな世界．RNA Network Newsletter 1, 26-29頁，2003年.

3.牛田千里，保木井悠介，窪昭佳，和地恵，小川智勝，下山正義，武藤昱：Functional RNomicsシステムの開発と線虫新規低分子RNAの同定．第26回日本分子生物学会年会シンポジウム口頭発表，2003年.

4.牛田千里：線虫の非翻訳RNA．細胞工学，第23巻，10号，1186-1192頁，2004年.

5.牛田千里：線虫non-coding RNAの解析，千葉工業大学公開シンポジウム「新規機能RNA分子の検索とその応用に関する検討」講演，2005年

6. Yusuke Hokii, Masayoshi Shimoyama, Akiyoshi Kubo, Takahiro Ogasawara, Yuko Nogi, Yuki Sugawara, Risa Arai, Akira Muto, Chisato Ushida: Novel noncoding RNA candidates isolated from Caenorhabditis elegans by a two-dimensional gel electrophoresis. Symposium on Structural and Evolutionary Genomics, Genome and RNA: Expression and Functions, Costa Rica.口頭発表，2005年.