

ホヤゲノムにおける 5' スプライスリーダー配列をもつ mRNA の網羅的解析

●佐藤 ゆたか ◆佐藤 矩行

京都大学大学院理学研究科

<研究の目的と進め方>

カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は脊索動物門に属し、われわれヒトを含む脊椎動物と基本的体制を共有している。一方、ホヤはトランススプライシングによって 5' スプライスリーダー配列が mRNA に付加されることが知られている唯一の脊索動物でもある。本申請研究ではこの 5' スプライスリーダー配列を持つ mRNA に焦点を絞り、その遺伝子の 5' 末端を網羅的に決定することを第一の現実的な目的とする。それによって以下のことを明らかにし、ホヤにおける転写制御ネットワーク解明の基礎情報を整備する。

- 1) 5' トランススプライシングを行う遺伝子の正確な遺伝子構造の決定 (5' トランススプライシングはしばしばポリシストロニックな転写産物のプロセッシングとの関連を議論されているのでそれを含めて解析を行う)
- 2) 5' トランススプライシングを行う遺伝子の網羅的な同定
- 3) アウトロン (トランススプライシングによって除かれる遺伝子の 5' 末端の転写開始点からスプライシングのアクセプターサイトまでの配列) およびプロモーター領域の同定

また、今後、多様な動物のゲノム解析が進むにつれ、SL 遺伝子をもつ動物種も新たに同定されることが予想される。本研究を通して、こうした動物における SL 遺伝子の同定のための方法論を確立する。

従来のカタユレイボヤの遺伝子予測はこの動物に特有のポリシストロンの構造や 5' 末端付近の cDNA 情報の不足などによって不正確な部分も多く指摘されており、ゲノムワイドな様々な研究の大きな障害となっている。そこで、本研究の成果によって、そうした不足の情報を補い、カタユレイボヤをゲノムワイドなシステム解析の脊索動物のモデルとして確立する。また、ホヤ胚は転写制御のネットワークを解析するために非常に適した動物であるので、本研究成果によって明らかになるプロモーター領域を用いて転写制御のネットワークを基本的骨組みとする発生システムの全貌解明へとつなげていく。

<研究開始時の研究計画>

カタユレイボヤをもちいて胚と成体からスプライシングリーダーをもつ mRNA にのみ由来する cDNA ライブラリーを作製する。このライブラリーを 384 ウェルプレートにアレイ化し、それをもとにそれぞれから 10,000-15,000 程度の 5' 側末端配列 (5'-EST) を得る。その後、コンピューターをもちいて以下の解析を行う。

- 1) スプライシングリーダーをもつ mRNA をつくる遺伝子 (以下 SL 遺伝子) のリスト化
- 2) SL 遺伝子のアウトロンを除く正確な 5' 末端構造の決定
- 3) ポリシストロンの網羅的同定およびポリシストロン以外でトランススプライシングを受ける遺伝子の同定
- 4) トランススプライシングとシススプライシングにおけるスプライシングアクセプター・レセプター部位の特徴づけ

5) SL 遺伝子の機能分類等に基づくトランススプライシングの機能とその進化に関する解析

<研究期間の成果>

カタユレイボヤをもちいて胚と成体から RNA を抽出し、Oligo-capping 法により mRNA の 5' 末端をマークしたのち、その逆転写産物をもとに、スプライシングリーダー配列を含むプライマーを利用してスプライシングリーダーを持つ遺伝子の cDNA のみを PCR 法によって増幅した。これをライブラリー化し、それぞれを 384 プレート 50 枚 (19200 クローンずつ) にアレイ化した。

この中から 72 枚のプレートのシーケンシングを行った。得られた配列からスプライシングリーダーを完全に含む配列のみをスクリーニングしたところ、19,576 の配列が得られた。この配列はクラスタリング解析によれば、5,776 個の遺伝子に相当する。またクラスタリング解析をもとに飽和曲線を描くと、この二つのライブラリーは現段階でほぼ飽和に近いと考えられたので、この段階でシーケンシングを終えた。この EST はすべてゲノムブラウザ上にマッピングされ、遺伝子のアノテーションに利用されている。

ホヤゲノムにコードされる遺伝子のうち約半数 (~ 8000) がトランススプライシングをうけると考えられるが、そのうちの 72% が本研究によってリスト化されたことになる。これはホヤの全遺伝子 (~ 16000) のうち 1/3 以上に相当する。また、同時にその遺伝子のアウトロンを除く 5' 末端構造を正確に決定したことにもなる。これら EST のゲノム配列へのアライメントの結果は、予想通り従来の遺伝子モデルの不十分さを改めて示す結果となった。

トランススプライシングとシススプライシングにおけるアクセプターサイトを比較してみたが、他のいくつかの動物で認められるような明確なシグナル配列は認められなかった。また、時としてトランススプライシングが第一イントロンと第二エキソンの境界のアクセプターサイトを介して行われていた (本来は「シス」のスプライシングが行われる部位である)。このことが生物学的な意義を持つのかどうかは不明であるが、シススプライシングとトランススプライシングが (すべてではないとしても) おなじメカニズムを共有していることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

ホヤは一世紀以上の歴史を持つ古典的な発生生物学の材料である。近年の分子生物学的手法を用いた解析によりその発生のメカニズムが詳細にわかりつつある。また、2002 年のゲノム解読により、そのメカニズムをゲノムワイドに解析する道が開かれた。ホヤは脊索動物でありながら、脊椎動物に比べはるかに単純なゲノム構造を持っているので、ゲノムワイドに脊索動物の基本的体制構築のメカニズムを明らかにする目的にもっとも適した動物であるといえる。したがって、ホヤを用いた発生の研究は脊椎動物の研究の重要なリファレンスとなると同時に、脊索動物の起源に

についての発生・進化的研究にもつながる。

ゲノムワイドな解析にはゲノムの正確なアノテーションが重要であることは明らかである。ホヤではゲノム決定後も正確な遺伝子アノテーションに向けて多くの努力がなされてきたが、ゲノムワイドな解析を行うための基礎情報としては未だ不十分であるのが現状である。本研究はその不足の情報を効率よく補い、ホヤを用いた多くの研究の重要な基礎情報を提供している。その意味で本研究成果はきわめて重要である。

たとえば、ホヤは多くのポリシストロンが存在している。これまで線虫などで既知のオペロンとは異なりオペロン内のシストロン間に介在配列が全く存在しない。従って、こうした遺伝子をコンピュータアルゴリズムのみで予測することはきわめて難しい。ポリシストロンの転写産物はスプライシングリーダーの付加（トランススプライシング）によって、モノシストロニックなRNAへと転換されるので、本研究によってオペロンおよびそこにコードされる遺伝子の一次構造が正確に決定されるのである。また、最近の多くの研究が示すように、ホヤは特に転写制御の解析に適した動物である。転写制御の解析には転写を制御する転写因子の解析も重要であるが、転写を制御される側の遺伝子、特にそのシスエレメントの解析が重要である。そのためには多くの場合、転写開始点あるいは遺伝子の5'末端位置の情報が必要になるが、本研究ではホヤの約半数（～8000）と見積もられるスプライシングリーダーを持つ遺伝子については本研究のようなアプローチが必要になる。

スプライシングリーダーを付加するトランススプライシングを行う動物は広く存在するが、その進化的起源は明らかではない。進化的に見てパッチ状にランダムにトランススプライシングを行う動物が存在することは、すべての共通祖先がトランススプライシングの機構を持っていてその後の進化で多くの系統で失われていったという説を支持するよう見える。しかし、現在までにいくつかの動物で明らかにされている断片的情報に基づけば、トランススプライシングの機構はそれぞれの動物間でお互いによく似ているものの細かい点ではそれぞれ独自のメカニズムを持っているようにもみえ、そのため収斂進化によるものであるとする説も以前有力である。この問題を解決するためには、トランススプライシングをうける遺伝子を網羅的に解析し、ゲノムワイドなレベルで解析する必要がある。その意味で本研究はESTに基づいた初めてのゲノムワイドなトランススプライシングの解析でありその進化を考える上で必須の情報を提供している。また、本研究で行った方法は今後ゲノム解読がなされ、同様の解析が必要となった場合のモデルケースとなりうる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

上記のようにトランススプライシングが第一イントロンと第二エクソンの境界のアクセプターサイトを介して行われているなどの現象は当初予想していなかった。また、トランススプライシングのアクセプターサイトが一カ所でない場合もあった。こうした例外処理をコンピュータアルゴリズムに取り込むことに困難があり、本解析の結果を完全に反映させた遺伝子モデルの作製にまでは至っていない。

正確な遺伝子モデルを完成させることによって、より正確なポリシストロンの予測が可能になる、遺伝子モデルが依然として不完全であるため、正確なポリシストロンの同定までに至っていない。

スプライシングをうける遺伝子の機能分類を行ったところ、とくにその遺伝子種に偏りは認められないが、これもより完全な遺伝子モデルを用いることでより正確なものとなるはずであり、最

終的な結論に至っていない。また、本研究課題とは別に進行中の「トランススプライシングをうけない」遺伝子の5'末端構造の研究は予想外の困難に直面し遅れが出ているので、トランススプライシングをうける遺伝子とうけない遺伝子の直接の比較は現在のところ実現されていない。

<今後の課題、展望>

上述のように様々な例外処理を取り込んだ遺伝子モデルの完成が最重要の課題である。

また、現在のEST解析に使ったライブラリーはほぼ飽和状態に近いので、残り28%程度のトランススプライシング遺伝子の解析には新しいRNAソースを用いて別のライブラリーを作製し、さらにEST解析を進める必要がある。

<研究期間の全成果公表リスト>

なし