

ホヤゲノムから転写される翻訳されない機能性 RNA の解析

●真壁 和裕

徳島大学総合科学部

<研究の目的と進め方>

数あるモデル生物の中でもホヤは系統進化的に極めて重要な位置を占める動物であると共に、最新の分子生物学的実験もできる類い希な実験動物である。カタユレイボヤ、ついでユレイボヤの同属近縁2種のゲノム配列が決定・注釈付けされ、我々もマボヤの複数の発生段階の胚の RNA の配列と分布に関する網羅的な記載を行いデータベース化し、その内容を充実されてきた。この成果を受けて、ゲノムにコードされるタンパク質、とりわけ転写因子及びシグナル分子などの機能研究が目覚ましく発展しつつある。

一方でさまざまな生物で、miRNA・siRNAなどの低分子性 RNA や ORF のない機能性 RNA が生体内で重要な役割を担っていることが示されてきている。我々自身も上記の研究過程で、予想を上回る数の非翻訳 RNA が存在することを見いだしていた。

そこで本研究では、これまでの研究の中心だった転写因子と DNA 上の Cis 調節配列から成る遺伝子バッテリーやシグナル伝達ネットワークの構成要素に加えて、第三の重要な役者として機能性 RNA を捉え、未知の非翻訳 RNA を収集して発現を調べ、発生過程やできあがった組織や器官の細胞機能の発現や維持に関わる機能を調べることを目的とする。さらに、こうした RNA の強制発現や破壊の結果を、形態・細胞・発生および DNA マイクロアレイによるゲノムワイドな解析情報基盤を利用して解析することは、既にゲノム配列を元に発生の分子メカニズムが判明しつつあるホヤを用いることで、新たなゲノム機能情報を得られると思われ、さまざまな生命現象に関わるゲノム機能を体系的に解析することに大きく貢献できると考えられる。

<研究開始時の研究計画>

かつて卵内の RNA の配列と分布に関する網羅的な記載を行った過程で予想を上回る数の非翻訳 RNA が卵内で存在することを見出した。当時その意義は不明であったが、本研究ではその成果であるデータベースを利用して非翻訳 RNA の探索を行う予定である。本研究では、下記の研究計画に述べるような方法を用いて非翻訳 RNA の探索ならびにそれぞれの非翻訳 RNA の発現によってもたらされる機能の解析を行う。

・データマイニング

上に述べたように同属2種と目レベルで異なる1種の合計3種のホヤから大量の EST が得られている。この中には相当数の ORF をもたない RNA が存在する。こうした RNA の中には生命現象において重要な働きを担うものがあることが、他のいくつかの生物で知られている。そこで、ORF をもたない RNA 群をデータベースから探し出して新規の非翻訳 RNA を発見する。

・発現の解析

それぞれの RNA が何らかの時間空間的な発現制御を受けているかを解析し、いつどのような組織や細胞で発現されているかを同定する。

・機能の解析

上記の方法で得られた予測配列の生体内での機能を迅速・詳細に解析するべく、実際にホヤ胚にマイクロインジェクション法で注入してその機能を解析する。ホヤの発生は非常に速く、ホヤ胚での遺伝子の強制発現及び機能破壊による表現型の取得は迅速であるため、ハイスループットな解析が可能である。こうした実験胚に対する効果を形態学的・細胞生物学的・発生生物学的な観点から解析することによって、特定の個々の組織における機能性 RNA の機能解明を目指す。一方、これまでの多くの研究から、機能性 RNA の機能破壊は生体内の微妙な調節に関わるために軽微な表現型になることもあることが予想される。そこで本研究では、全ゲノムをカバーするマイクロアレイを用いたアッセイによってその機能を解析する。これらふたつのアプローチは相互に補完的なものであり、データを双方向にフィードバックすることによってさらに成果をあげていく。

上記研究計画のうち、2007年度は特にデータマイニングに焦点を絞って、ORF をもたない poly(A)RNA の探索と低分子性の機能性 RNA (miRNA・siRNA) の探索を行うことを主眼にする。

<研究期間の成果>

・ORF をもたない poly(A)RNA の探索

データマイニングを行うにあたり、最初にデータベースの整備を行った。東京大学金久研究室の川島秀一助手と米国 JGI の川島武士氏の協力の下に、これまで我々が構築してきたマボヤの EST データベース MAGEST を大幅に改良したうえで、受精卵 EST 約 54K 配列 (約 6K クラスター) に加えて遺伝研の協力によって得た卵割期 EST 約 14K 配列 (約 3K クラスター)・原腸胚 EST 約 25K 配列 (約 37K クラスター)・神経胚 EST 約 8K 配列 (約 2K クラスター)を載せた MAGEST2.0 β を構築した。これによって、コンティグ約 11K とシングルレット約 6K の合計約 17K 配列が得られた。カタユレイボヤのゲノム解析によると全ゲノム遺伝子約 14K のうち変態期までに半分が発現することから、必要なデータがほぼ入手できたと考えられる。

次に、ここから KEGG/GENES/SWISSPROT/JGI-Ciona といったデータベースに対して exonerate によるサーチをかけ、スコアが 100 未満の高い閾値でヒットした約 10,000 の配列を除去した。残った約 7,000 の配列を、JGI の Ciona プロテイン ver.1&2 に対して blastx によるサーチをかけ、 e^{-10} 未満の低い閾値でヒットした約 400 の配列を除去した。さらに、残った約 6,600 の配列から、Ciona ゲノムに相同配列がないと思われる除去し、最後にマボヤのミトコンドリアゲノムに由来すると考えられる配列を除去したところ、22 の配列が残った。このなかには、これまで解析の対象となつてこなかった ORF をもたない poly(A)RNA (RNA-like な non-coding RNA) が含まれると期待される。

・低分子の機能性 RNA (miRNA・siRNA) の探索

低分子の機能性 RNA は通常の cDNA ライブラリーに入ることではないため、ゲノムデータベースを利用したマイニングを試みた。京都大学佐藤研究室の早川由純氏との共同研究で、Ciona ゲ

ノムに存在する既知の保存された miRNA 配列を選び取り、その発現を確認している。

一方、実際の細胞から短い RNA だけを選択的に抽出するプロトコルを確立し、約 40nt 以下の RNA を精製した。これをコンカテマイズしてライブラリー化し、クローニングする作業を進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

ゲノムからの保存された既知 miRNA の探索は、その方法が決まり切っていることもあって、米国のグループに先行されてしまったことが判明した。しかし、このことは同時に、我々のアプローチが正しいものであることを示していると思われる。

一方、mRNA-like な non-coding の機能性 RNA は、一般的にその存在が必ずしも信じられていないこともあって、今のところ競争関係にあるグループがないように思われる。しかし、そのような RNA は *Xenopus* などに存在し、特有の機能を担っていることが知られている (例えば、Kloc *et al.*, 2005)。我々がホヤからもそのような RNA を単離し、機能を明らかにすれば、国内のみならず国外でも大きく評価されると予想される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ORF をもたない poly(A)RNA の探索に関しては、2006 年度の作業から、確かに我々の方法で機能性の RNA を選択的に絞り込んだということが、ミトコンドリア RNA 等の存在によって証明されたと思っているが、その一方でマイニング時の閾値の設定等で結果がさまざまに振れることや、*Ciona* のゲノム配列との相同性をどこまで期待できるか等の根本的な問題を考慮する必要があることが判明してきた。基本方針としてどこまで広く網をかけるか等を再度検討して研究を進める予定である。

低分子性の機能性 RNA に関しては、データマイニングが予想以上に難しいという事態に直面したので、まずは地道に低分子性 RNA を各発生段階の胚や組織から精製してクローニングする方向で軌道修正を行おうとしている。低分子性の RNA が細胞当たりの収量が少ないこともあって、RNA 抽出も予想を超えて困難だったが、現在はそこからライブラリーの作製を行っている。

<今後の課題、展望>

• ORF をもたない poly(A)RNA の探索

2006 年度のマイニングにおいて *Ciona* プロテインデータベースに類似配列が存在しなかった約 6,000 配列のうち、*Ciona* ゲノムに相同配列がなかったものに改めて焦点を当て、これらの中から機能をもった mRNA 型の non-coding RNA を探索する試みを行う予定である。

• 低分子の機能性 RNA (miRNA・siRNA) の探索

マボヤ受精卵・卵割期胚・原腸胚・神経胚・尾芽胚からそれぞれ低分子 RNA を調製し、コンカテマイズしてライブラリーを作製する。できあがったライブラリーから順次クローンをシーケンシングし、新規の機能性 RNA を単離する。

• 発現の解析

上記研究に引き続いて、それぞれの RNA がどのような時間空間的な発現制御を受けているかを解析し、発生段階特異性や細胞特異性を明らかにする。

• 機能の解析

ホヤの特性を活かした準ハイスループットな分子発生物学的な解析を行い、上記の方法で得られた予測配列の生体内での機能を迅速・詳細に解析する。こうした実験胚に対する効果の表現型を、細胞系譜・運命決定・形態形成などの観点から、細胞生物学的・

発生物学的に解析することによって、機能性 RNA の機能解明をめざす。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

なし

2) データベース/ソフトウェア

マボヤ EST データベース MAGEST

http://www.genome.ad.jp/magest/welcome_j.html

3) 共同研究

東京大学金久研究室の川島秀一氏および米国 JGI の川島武士氏と共同で MAGEST2.0 β を構築

京都大学佐藤研究室の早川由純氏と共同で低分子性の機能性 RNA の単離と発現を解析