

# 完全長 cDNA ライブラリーを利用したトランスクリプトーム解析と技術開発

●菅野 純夫<sup>1)</sup> ◆中井 謙太<sup>2)</sup> ◆橋本 真一<sup>3)</sup>

1) 東京大学新領域創成科学研究科 2) 東京大学医科学研究所 3) 東京大学医学系研究科

## <研究の目的と進め方>

遺伝子発現ネットワーク研究の基盤の形成を目指し、特定領域研究「生命システム情報」及び特定領域研究「比較ゲノム」と連携し、完全長 cDNA ライブラリー、5' 端濃縮ライブラリー、5' 端 SAGE(5' SAGE) ライブラリーなどを利用したトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子の転写開始点の詳細とそのコアプロモータ領域をデータベース化をおこない、さらに、これらトランスクリプトーム解析に関連した技術開発を進める。

1, 特定領域研究「生命システム情報」及び特定領域研究「比較ゲノム」と連携し、ゲノム研究関連特定研究領域で解析の対象となる真核生物であるメダカ (近縁種2種)、ホヤ (各種)、ナメクジウオ、ギボシムシ、霊長類 (各種)、カイコ、コムギ、クラミドモナス等を中心に、オリゴキャップ法による完全長 cDNA ライブラリー、5' 端濃縮ライブラリー、5' 端 SAGE (5' SAGE) ライブラリーを作製し、それらの cDNA ライブラリーからのクローンの 5' 端 EST 配列を決定することで、遺伝子の転写開始点の詳細とそのコアプロモータ領域を同定する。

2, コアプロモータ領域の配列情報と EST、SAGE、マイクロアレイ等の遺伝子発現頻度情報を組み合わせた、コアプロモータ領域と転写制御の比較ゲノム解析を行うためのデータベースの作製をおこなう。

3, 上記の課題に関連し、技術開発を進める。

## <2007 年度の研究の当初計画>

1, ゲノム研究関連特定研究領域で解析の対象となる真核生物から 5'SAGE および完全長 cDNA ライブラリーを作製し、それらのライブラリーからのクローンの 5' 端配列を決定することで、遺伝子の転写開始点の詳細とそのコアプロモータ領域を同定する。

2, 5'SAGE ライブラリー作製法の効率化、RNA の微量化、5' -end Solexa 法や 5'SAGE 法を利用した non-coding RNA の同定及び定量化の開発を目指す。

3, 現在作製運用中の DBTSS を中核に、遺伝子発現頻度情報とコアプロモータ領域の配列情報を組み合わせた、比較ゲノム解析のデータベースの枠組みと、そのために必要なツール群を作る。

## <2007 年度の成果>

現在までに、「比較ゲノム」と連携し、ゼニゴケとクラミドモナス福澤秀哉 (京大)、ショウジョウハエ相垣敏郎 (首都大)、アピコンプレクサ原虫 渡辺純一 (東大)、メダカ堀寛 (名大) 等につき、総計で、完全長 cDNA ライブラリー 20 種を作製した。一部のライブラリーについては、5' 端の配列決定を進め、計 5 万のデータを得ている。さらに、それ以上の EST 配列決定では、小原グループと連携している。

また、5' 端濃縮ライブラリーに代わる、新しい超並列タイプの

Solexa あるいは SoLid シークエンサーを利用した 5' 端 tag 配列決定法を開発した。

1 つは、5' SAGE ライブラリー作製法を発展させたもので、25base の tag を得ることのできるものであり、これを利用し、1 つのカイコ 5' SAGE ライブラリーと、7 種のショウジョウハエ 5'SAGE ライブラリーを作成した。もう一つの方法はライブラリーを作らずいきなり、オリゴキャップした mRNA の 5' 端 cDNA を Solexa シークエンサーで読む 5' -end Solexa 法で、この場合にはライブラリーを作成する必要がない。この方法で 12 種類の細胞の 5' 端配列 tag を約 2 億タグ得た。これらの、新しい超並列タイプシークエンサーを利用した高効率 5' 端塩基配列決定は、世界で初めて試みである。新型の超並列シークエンサーを用いた、安価で高速な転写開始点決定法が確立されたことは今後のゲノム研究にとって極めて重要であると考えている。

情報解析では、上記の新しい方法による 5' 端タグ解析システムを構築し、各種の比較ゲノムプロジェクトに利用するとともに、一部のデータを DBTSS を通じて公開した。

## <国内外での成果の位置づけ>

完全長 cDNA ライブラリー、5'SAGE ライブラリーでは、本研究グループは、国内外で優位に立っている。今回の新しい方法の開発でさらにその優位が高まった。外国の研究グループからの共同研究の申し出も多く受け、可能な範囲で協力を行っている。

## <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

特に無し。

## <今後の課題>

超並列型シークエンサーから出る大量のデータをどのように保管して行くかが課題である。また、超並列型シークエンサーから得られる数千万から数億にのぼるタグ配列を 5' 端配列解析以外にも利用するためのシステムの開発も必要である。これにより、転写開始点情報のみならずゲノム情報や変異情報あるいはゲノムの修飾情報も得ることができよう。

現在の優位を生かし、「比較ゲノム」と連携し、さらなる 5' 端解析を進める。上記の技術を利用することで、多種類の生物で他の追従を許さない情報を得ることが可能であろう。

## <成果公表リスト>

### 1) 論文発表 (著者、タイトル、誌名、巻、ページ、年)

#### 1. 0801231941 (論文)

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*. 447:714-719, 2007.

#### 2. 0801231948 (論文)

Tsuritani K, Irie T, Yamashita R, Sakakibara Y, Wakaguri H, Kanai A, Mizushima-Sugano J, Sugano S, Nakai K, Suzuki Y. Distinct class of putative "non-conserved" promoters in humans: Comparative studies of alternative promoters of human and mouse genes. *Genome Res*. 17: 1005-1014, 2007.

#### 3. 0801231952 (論文)

Muramatsu S, Wakabayashi M, Ohno T, Amano K, Ooishi R, Sugahara T, Shiojiri S, Tashiro K, Suzuki Y, Nishimura R, Kuhara S, Sugano S, Yoneda T, Matsuda A. Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J Biol Chem*. 282: 32158-32167, 2007.

#### 4. 0801231957 (論文)

Yamamoto YY, Ichida H, Abe T, Suzuki Y, Sugano S, Obokata J. Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Res*. 35: 6219-6226, 2007.

#### 5. 0801231936 (論文)

Sakakibara Y, Irie T, Suzuki Y, Yamashita R, Wakaguri H, Kanai A, Chiba J, Takagi T, Mizushima-Sugano J, Hashimoto SI, Nakai K, Sugano S. Intrinsic Promoter Activities of Primary DNA Sequences in the Human Genome. *DNA Res*. 14:71-77, 2007.

#### 6. 0801232001 (論文)

Okabe T, Ohmori Y, Tanigami A, Hishigaki H, Suzuki Y, Sugano S, Kawaguchi A, Nakaya H, Wakitani S. Detection of gene expression in synovium of patients with osteoarthritis using a random sequencing method. *Acta Orthop*. 78: 687-692, 2007.

#### 7. 0801232011 (論文)

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K,

Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319: 64-69, 2008.

#### 8. 0801232028 (論文)

Wakaguri H, Yamashita R, Suzuki Y, Sugano S, Nakai K. DBTSS: database of transcription start sites, progress report 2008. *Nucleic Acids Res*. 36: D97-D100, 2008.

#### 9. 0801232033 (論文)

Ahsan B, Kobayashi D, Yamada T, Kasahara M, Sasaki S, Saito TL, Nagayasu Y, Doi K, Nakatani Y, Qu W, Jindo T, Shimada A, Naruse K, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto SI, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Kohara Y, Morishita S. UTGB/medaka: genomic resource database for medaka biology. *Nucleic Acids Res*. 36: D747-D752, 2008.

### 2) データベース公開 (DB名、URL、簡潔な内容紹介)

DB名: DBTSS URL: <http://dbtss.hgc.jp/>

各種生物の転写開始点の情報をデータベースとしたもの。現在は、ヒトとマウスが多いが、今後他の生物を充実。なお、5'SAGEのHEK293とRamosの配列データに関しては、<http://5sage.gi.k.u-tokyo.ac.jp/>にて、生データを公開している。

### 3) 発明及び特許

特になし。