

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22460

研究課題名（和文）新規標的遺伝子同定法を用いたmiRNA-標的遺伝子ペアの保存性の検証

研究課題名（英文）Testing the evolutionary conservation of miRNA-target pairs identified by a new exhaustive method

研究代表者

野澤 昌文（Nozawa, Masafumi）

東京都立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：50623534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：研究期間内にmiRNA-標的mRNAペアを安定的に回収して決定する方法を確立することはできなかった。ライブラリを作成し、ショートリードシーケンスも行ってみたが、得られたリードにはmiRNAの配列がほとんど含まれておらず、信頼できるデータは得られなかった。一方、miRNA-標的mRNAペアの同定にあたって必要となる高精度ゲノム配列の決定に関しては、ショウジョウバエ4種においてロングリードとショートリードの併用によりScaffold N50が数Mbpの長さのアセンブリを得た。さらに、3～16MbpのY染色体配列を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したY染色体配列の決定方法は、今後様々な生物においてゲノム配列を決定する際に重要な基盤となるはずである。特にこれまでなかなか難しかったY染色体の決定方法をある程度確立できたことは、今後、性決定以外の点におけるY染色体の機能や毒性などを研究する上で、重要な基盤になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The method to stably extract miRNA-mRNA pairs and sequence these pairs was not successfully established. Library was constructed from extracts and sequenced, but the reads obtained rarely contained miRNA sequences. On the other hand, the method to obtain high-quality genome assembly from *Drosophila* species, which was essential for the identification of miRNA-mRNA pairs, was successfully established. Combining long- and short-read sequences, I obtained the genome sequences of four *Drosophila* species with Scaffold N50 of several Mbp. Furthermore, the Y chromosome sequences of 3 to 16 Mbp were also successfully determined.

研究分野：分子進化、ゲノム進化

キーワード：低分子RNA 遺伝子発現制御 進化 ショウジョウバエ

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内の遺伝子発現は、クロマチン状態、エンハンサーの相互作用、転写因子のプロモーター領域への結合、mRNA の安定性、翻訳速度など、何層にもなるメカニズムによって時空間的に制御されている。これらに加えて microRNA (miRNA) とよばれる約 20 ヌクレオチドの低分子 RNA が様々なタンパク質コード遺伝子の mRNA を分解またはその翻訳を阻害して遺伝子の発現を制御していることが明らかになった (Lee et al. 1993; Ambros 2004; Bartel 2018 など)。シーケンス技術の発展とともに、非モデル生物を含む多くの生物において miRNA 遺伝子が網羅的に同定され、miRNA の作用機序、起源、進化過程について数多くの知見が得られてきた (Allen et al. 2011; Moran et al. 2014; Quah et al. 2015 など)。

一方、miRNA の機能、すなわち miRNA を介した遺伝子発現制御機構の全容は依然として未解明のままである。というのも miRNA は数が多いうえ、1 つの miRNA は通常複数の標的遺伝子を持つため、個別の実験で全ての標的遺伝子 (標的 mRNA) を同定することはほぼ不可能だからである。実際、モデル生物においても実験的に同定されている miRNA-標的 mRNA ペアは極めて限定的である (Bartel 2009)。そのため、miRNA の機能を網羅的に探る方法として、miRNA と標的 mRNA の配列相補性に基づく標的遺伝子予測 (Enright et al. 2003; Agarwal et al. 2015)、miRNA-標的 mRNA ペアと複合体を形成する Argonaute タンパク質の抗体を用いて免疫沈降をしたのち、大規模シーケンスを行う Ago HITS-CLIP Seq 法 (Chi et al. 2009)、miRNA によって分解途中にある標的 mRNA を捕捉して大規模シーケンスを行う Degradome-Seq 法 (German et al. 2008) などの手法が用いられてきた。しかし、は予測されたペアの 90% 以上が偽陽性であり精度が低いことが指摘されていた (Pinzon et al. 2017)。また、も最終的には別々に得られた miRNA と標的 mRNA の膨大なシーケンスデータから対合しうる miRNA-標的 mRNA ペアを予測する必要があるうえ、は抗体を必要とする、は翻訳を抑制する miRNA には使用できないなど、実用面での問題もあった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、生体内の miRNA-mRNA ペアから直接両者のキメラ cDNA 断片を合成して大規模シーケンスを行うことで、生物情報学的予測を全く用いずに miRNA の標的遺伝子を網羅的に同定するという手法を開発することを目的とした。また、今後本手法を多くのショウジョウバエ種に適用するために、その基盤として高精度ゲノム配列、特に反復配列の多い Y 染色体アセンブリを整備することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ、以降 Mel) を用いた本手法の確立

miRNA-標的 mRNA ペアの抽出：細胞質 (幼虫、蛹、成虫の各全組織) から miRNA-標的 mRNA ペアを 2 本鎖 RNA のまま抽出した。ア) 細胞膜を溶解するだけの粗抽出法、イ) miRNA-標的 mRNA ペアを架橋して安定化させる方法、など複数の方法を条件検討しながら修正・改良し、もっとも効率よく 2 本鎖 RNA を回収できる条件を探った。

cDNA 合成：miRNA-mRNA ペアの miRNA 部分をプライマーにして逆転写を行った (図 1)。miRNA と mRNA の相補性は不完全であるので、逆転写の条件を検討した。

2 本鎖 DNA 合成：ランダムプライマーを用いて 2 本鎖 DNA を合成した。得られた 2 本鎖 DNA は miRNA と標的 mRNA のキメラ配列になるはずである。miRNA と標的 mRNA の配列相補性は不完全であるため、理論上配列決定後に miRNA 由来の部分と mRNA 由来の部分とを区別できる。

ライブラリ作成：アダプター結合と PCR の後、ライブラリを大量にショートリードシーケンスした。得られた各リードペアには、miRNA と標的 mRNA 由来の配列が両方含まれているため、生物情報学的な予測なしに miRNA-標的 mRNA ペアを同定できると予想した (図 1)。

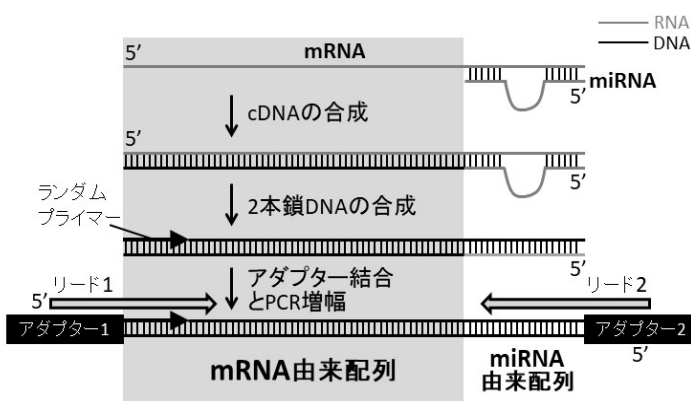


図 1. 本手法の原理と流れ

## (2) 高精度ゲノム配列（特に Y 染色体配列）の決定法の確立

高分子 DNA の抽出：成虫オス約 50 匹から Nanobind Tissue Big DNA Kit を用いて高分子 DNA を抽出した。それを 27G のニードル/シリンジで 15 回出し入れして適度に断片化し、Pippin Pulse を用いて断片長がおおよそ 20~200kbp になっていることを確認した。

ロングリードシーケンス：上記 DNA を用いて Oxford Nanopore MinION を用いてロングリードシーケンスを行った。

ショートリードシーケンス：同様に Illumina HiSeq X または NovaSeq 6000 を用いて雌雄それぞれの DNA についてショートリードシーケンスを行った。

Y 染色体配列の同定：得られたロングリード配列を用いて Flye (Lin et al. 2016) によるアセンブリを行った。さらに Racon (Vaser et al. 2017) によるコンセンサスコール、ショートリード配列を用いた Pilon (Bruce et al. 2014) によるポリッシングなどを行い、ゲノムアセンブリを得た。

YGS 法 (Carvalho and Clark 2013) と雌雄ゲノムカバレッジ比を組み合わせることで Y 染色体 Scaffold を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ、以降 Mel) を用いた本手法の確立

残念ながら、研究期間内に miRNA-標的 mRNA ペアを安定的に回収する方法を確立することはできなかった。無理にライブラリを作成し、ショートリードシーケンスも行ってみたが、得られたリードには miRNA の配列がほとんど含まれておらず、信頼できるデータは得られなかった。研究期間を 1 年間延長していただいたが、2020 年初めから続いた新型コロナウイルスの影響が最後まで尾を引いてしまったことが残念である。研究期間は終了してしまったが、今後も手法の確立に向けて継続して取り組む予定である。

### (2) 高精度ゲノム配列（特に Y 染色体配列）の決定法の確立

*montium* グループに属する 4 種のゲノムアセンブリを構築した。その結果、表 1 に示すような高精度ゲノム配列を得ることに成功した。

表 1. 本研究で確立した手法で決定した 4 種のショウジョウバエのゲノムアセンブリ統計値

Species	<i>D. khanoyana</i>	<i>D. kikkawai</i>	<i>D. parvula</i>	<i>D. tani</i>
Max Scaf. (bp)	19,310,265	32,886,591	24,387,666	18,763,442
No. of Scaffolds	209	289	289	344
Assembly size (bp)	212,865,006	187,021,122	184,444,493	187,945,175
Avg. Scaf. Size (bp)	1,018,492	647,131	638,216	546,352
Scaf. N50 (bp)	6,232,130	7,220,477	5,176,214	3,432,294

得られたゲノムアセンブリから YGS 法 (Carvalho and Clark 2013) を用いて Y 染色体由来すると予想される Scaffold を同定した (図 1)。Y 染色体のサイズが不明であるため、具体的にどのくらいの Y 染色体配列を決定できているのかは不明であるが、低品質 Scaffold (オスゲノムアセンブリ中に含まれる 15-mer がオスのショートリード中にも見つかる割合が 80%未満である Scaffold) も含めると、3 Mbp~16 Mbp の Y 染色体配列を決定することに成功した。

今後、Hi-C 法やオプティカルマッピングを併用することでさらに高精度の Y 染色体配列の決定を目指していく予定である。

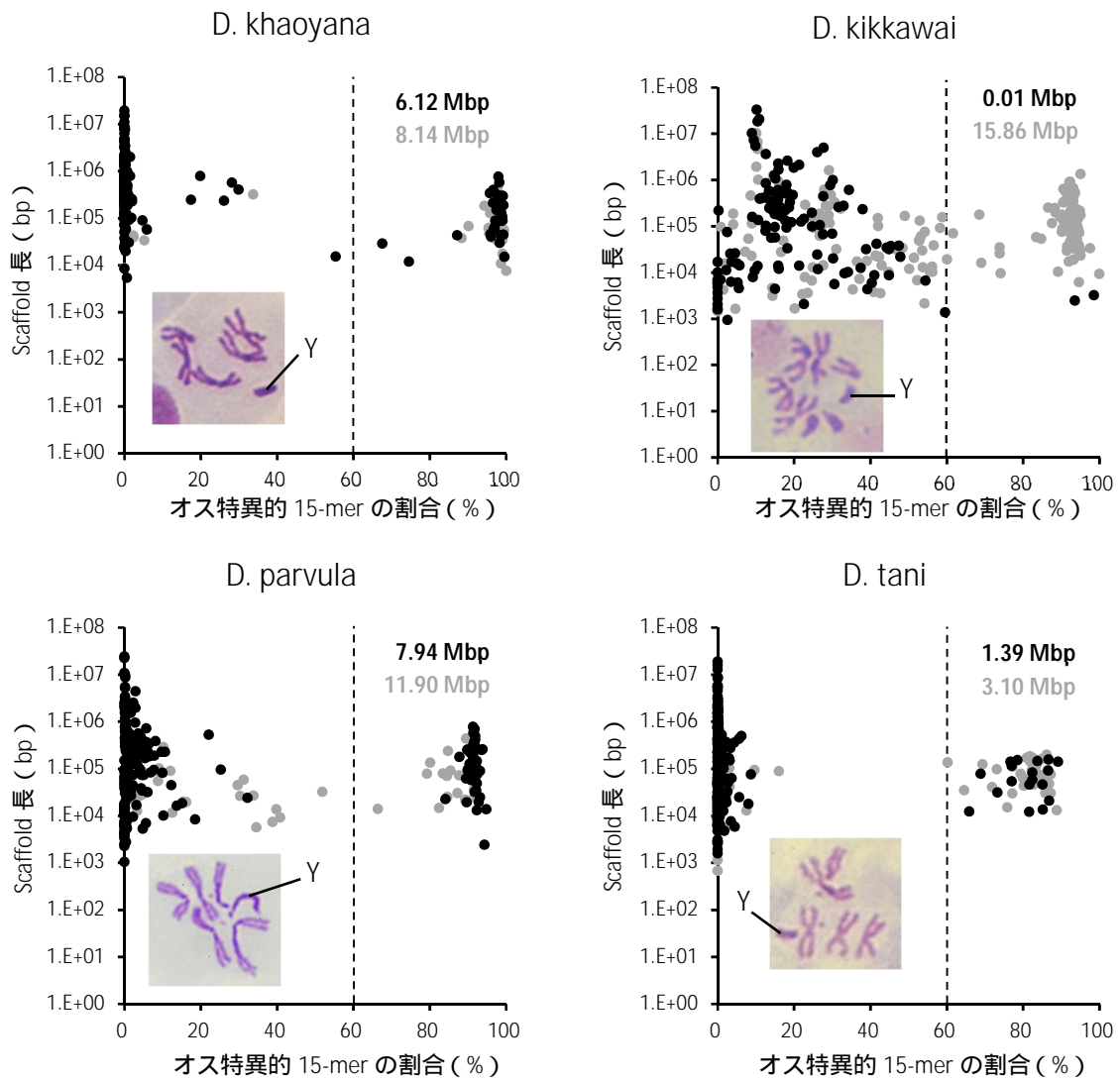


図 1 . オス特異的 15-mer の割合 (%) と Scaffold 長 (bp) の関係 黒丸は YGS 法において高品質と判定された Scaffold、灰丸は低品質と判定された Scaffold を表す。点線は Y 染色体由来の Scaffold かどうかを判定する閾値 (今回はオス特異的 15-mer の割合が 60% 以上) を表す。黒字の数値は高品質 Scaffold のうち Y 染色体と判定された Scaffold を、灰色の数値は低品質 Scaffold も含めた Scaffold のうち Y 染色体と判定された Scaffold の全長を表す。各図の余白内にオスの中期染色体を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた遺伝子量補償の即時性と柔軟性の検証
3. 学会等名 名古屋大学GTRセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤伶圭, 小川雅文, 小川佳孝, 初見真知子, 野澤 昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける Y 染色体消失過程の解明 ~ Y 染色体遺伝子の転座と獲得に着目して
3. 学会等名 第94回日本遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 多様なショウジョウバエを用いて解明する性染色体の進化過程と遺伝基盤
3. 学会等名 生命科学4プラットフォーム「支援説明会・キックオフシンポジウム」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 多様なショウジョウバエを用いた性染色体進化の解明
3. 学会等名 斎藤成也教授退職記念シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野澤昌文, 佐藤伶圭
2. 発表標題 性染色体の進化: 多様なショウジョウバエを用いたアプローチ
3. 学会等名 第23回日本進化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤伶圭, 野澤 昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるY染色体消失過程の解明
3. 学会等名 第23回日本進化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける性染色体の進化: 性染色体の誕生から消失まで
3. 学会等名 新学術領域「性スペクトラム」第4回領域会議 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける性染色体の進化
3. 学会等名 総合研究大学院大学先導科学考究 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野澤昌文
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いて性染色体進化の謎に迫る
3. 学会等名 東京都健康安全研究センター技術懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------