

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21310125
 研究課題名（和文）次世代シーケンシングによるメダカ小分子RNAの完全解析と機能の解明
 研究課題名（英文）Comprehensive and functional analysis of Medaka small RNAs using next generation sequencer
 研究代表者
 浅川 修一（Asakawa Shuichi）
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
 研究者番号：30231872

研究成果の概要（和文）：

本研究では次世代シーケンサーを用いてメダカおよびトラフグの各組織（速筋、遅筋、腸、眼、脳、心臓、肝臓、卵巣、精巣、初期胚など）から得た小分子RNA(miRNA, piRNA, siRNA)の塩基配列を解読し、その発現プロフィールを明らかにした。精巣、卵巣以外の各組織では miRNA が主要な発現産物であったが、精巣、卵巣では piRNA が主要な発現産物であることが推定された。またメダカとトラフグに共通に発現している未同定の小分子RNAを多数見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the sequences of small RNAs (miRNA, piRNA, siRNA) extracted from tissues (Fast muscle, slow muscle, intestine, eye, brain, liver, ovary, testis, and embryos) of medaka (*Oryzias latipes*) and torafugu (*Takifugu rubripes*), and showed the expression profiles of the RNAs. In the tissues except for ovary and testis, the major species of expression were miRNAs, whereas in the ovary and testis, those were assumed to be piRNAs. There were found many unknown RNA species that were commonly expressed in medaka and torafugu.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：動物ゲノム、メダカ、トラフグ、次世代シーケンサー、小分子RNA、マイクロRNA、piRNA、トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

近年の小分子 RNA(miRNA, piRNA, 内性 siRNA)の RNA サイレンシングに関する研究成果により、小分子 RNA 機能の解明は個々の遺伝子の発現調節から高次生命現象にいたる生命科学の進展において不可欠の要素であることが明らかになり、その結果、それまでのタンパク質遺伝子に重点をおいたゲノム・遺伝子研究の流れを一変させた。

ゲノム・遺伝子研究において小型魚類は簡単な設備で数百個体を扱えるなど実験的に有用な点が多く、マウスなどと同様、重要なモデル生物である。小型魚類のなかでメダカは我が国発のモデル生物で、国内で多数の純系が樹立されており、我々を含む国内の研究チームによってゲノム解析が完了している。これらの成果によってメダカはゲノム配列情報に基づいた遺伝学的解析が可能になっており、ゼブラフィッシュと同様に有用なモデル生物として世界的にも認知されてきている。その活用は我が国の学術的進展や独自性発揮の点でも意義が大きい。

しかし本申請を行なった 2008 年時点で、小分子 RNA に関する研究については、ゼブラフィッシュで miRNA に関する論文が既に 80 報以上報告されているのに対してメダカは 3 報であった。我々は、メダカのゲノム解析を推進してきた研究グループとしてメダカの小分子 RNA の大規模な解析は、国際競争上でも急務であると考えて本研究を立案した。

また申請段階ではメダカのみを対照としていたが、研究費の交付時点で研究代表者は慶應義塾大学医学部から東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻に所属が変わったため、モデル生物でかつ水産魚種であるトラフグも研究対象とした。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いてメダカ小分子 RNA 塩基配列を完全に解読し、その配列、種類、ゲノム上の位置、発現部位・時期、発現頻度を明らかにすること、個々の小分子 RNA の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

メダカ、トラフグ各組織から小分子 RNA を分画し、次世代シーケンサー SOLiD3 で解読した。得られたデータを、核酸配列データベースに対してサイズ別に分画し検索した。またメダカゲノム上に得られた配列をマップした。

4. 研究成果

メダカ成魚から 11 種類の組織（筋肉、消化管、眼球、脳、心臓、卵巣、精巣、受精卵、および 8 卵割期・発生ステージ 21・ステージ 22 の各個体）、およびトラフグ 1 年魚から 11 種類の組織（速筋、遅筋、消化管、眼球、脳、心臓、肝臓、成熟精巣、未成熟精巣、成熟卵巣、未成熟卵巣）を単離し、小分子 RNA を分画した。次にそれらにバーコード配列を付加しながら cDNA 化して増幅、混合し、SOLiD によって 3 ランシーケンシングを行なった。

それぞれのランでのベ 1.1 億リード、1.6 億リード、2.0 億リードのバーコードによる識別可能なリードデータを得た。これらからシーケンシングの平均クオリティ値が 20 以上のデータのみを抽出して解析を進めた。それらの小分子 RNA のシーケンスを miRNA のデータベースである miRbase に対して同源性検索を行なった結果、約 400 種の既知 miRNA、miRNA* と一致あるいは高い同源性を示すシーケンスに分類できた。また成熟精巣、未成熟精巣、成熟卵巣、未成熟卵巣においては miRNA の長さである 22 塩基前後でなく、25~30 塩基の小分子 RNA が大多数を占めていた。このことはショウジョウバエやマウスの生殖系列細胞において、小分子 RNA の中で主要な分子は piRNA であることと一致した結果であると考えられた。これら以外にも特定の tRNA の分解物が高い頻度を示した。またこれらのカテゴリーに分類できない小分子 RNA の存在が示唆された。

メダカにおいてこれらの小分子 RNA のうち主に piRNA と予測される塩基長 25-31nt の小分子 RNA をゲノム上にマップした。分布の特徴としては、25-31nt のデータセットでは特に卵巣で広範囲に小さなピークがみられた。一方、体細胞では特定の場所に集中してマッピングされる傾向が強く、その多くは tRNA のコード領域であった。卵巣、精巣においては塩基長ごとに分割したデータセットを作成したが、数多く見られた配列の分布をみると、各塩基長で見られるものと特定の塩基長で見られるものの 2 種類が確認できた。また反復配列が数多く転写されていることが示唆された。k-mer 解析によって、18-31nt の配列の反復回数を参照した。またこれまでの他生物の研究で piRNA はゲノム上の一方の鎖上にクラスター上にマップされること、ある場所を境目にして逆鎖から転写されることが報告されているが、メダカにおいても同様の傾向がみられた。

各染色体で数多くマップされた配列を BLAST 検索した結果、既知の小分子 RNA や

tRNA, rRNA にヒットしなかったものが、体細胞では 5 種、卵巣では塩基長 26nt で 23 種、30nt で 38 種を筆頭にのべ 153 種、精巣では塩基長 28nt の 36 種を筆頭にのべ 127 種が見出された。また 7 種の tRNA 断片が組織非特異的に著しく多くみられた。これらの新規小分子 RNA が実際に細胞内でどのような働きをしているかは不明であり、今後これらについてその生理学的機能を詳細に検討していく必要がある。

以上に加えて、トラフグでもメダカ同様のマッピングを行なうためのリファレンスシーケンスの完成度を高めるため、第一卵割阻止型雌性発生トラフグを作出し、ゲノムシーケンシングを行なった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 15 件)

1. C. Wongwarangkana, M. Akiba, R. Terai, K. Negoro, K. E. Fujimori, S. Kinoshita, A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, Y. Sato, T. Masatoshi, J. Kudoh, T. Hirano N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Comprehensive analysis of small RNA in Takifugu rubripes and *Oryzias latipes*, Seventeenth Annual Meeting of the RNA Society, Michigan, USA, June 2012.

2. C. Wongwarangkana, M. Akiba, R. Terai, K. Negoro, K. E. Fujimori, S. Kinoshita, A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, Y. Sato, T. Masatoshi, J. Kudoh, T. Hirano N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Comprehensive analysis of small RNAs in *Oryzias latipes* and Takifugu rubripes, The Japanese Society of Fisheries Science Spring meeting 2012, Tokyo University of Marine Sciences and Technology, March 2012.

3. Bhuyian, S.S., Kinoshita, S., Ceyhun, S., Asaduzzaman, Md., Asakawa, S., Watabe, S.; Function of intronic miRNA of myosin heavy chain gene, MYH14, in fish muscle formation, 平成 24 年度日本水産学会春季大会、東京、Abst. p. 102 (Mar. 2012) 3/26-30

4. C. Wongwarangkana, M. Akiba, R. Terai, K. Negoro, K. E. Fujimori, S. Kinoshita,

A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, Y. Sato, T. Masatoshi, J. Kudoh, T. Hirano N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Sequencing and Function Analysis of Takifugu rubripes Small RNA, The international symposium of muscle biochemistry, The University of Tokyo, October 2011.

5. Kinoshita, S., Bhuyian, S.S., Ceyhun, S.B., Asaduzzaman, Md., Asakawa, S., Watabe, S.; Regulation of myosin heavy chain gene expression and muscle development in teleosts, The International Symposium on Muscle Biochemistry, Tokyo, (Oct. 2011) 10/27-29

6. Bhuyian, S.S., Kinoshita, S., Ceyhun, S., Asaduzzaman, Md., Asakawa, S., Watabe, S.; Different expression patterns of the myosin heavy chain gene, MYH14, including its intronic miRNA among a few model fish species, The International Symposium on Muscle Biochemistry, Tokyo, (Oct. 2011) 10/27-29

7. Bhuyian, S.S., Kinoshita, S., Ceyhun, S., Asaduzzaman, Md., Asakawa, S., Watabe, S.; Differential expression of the myosin heavy chain gene, MYH14, and its intronic miRNA among fish species, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会、長崎、Abst. p. 109 (Sept. 2011) 9/28-10/2

8. C. Wongwarangkana, M. Akiba, R. Terai, K. Negoro, K. E. Fujimori, S. Kinoshita, A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, Y. Sato, T. Masatoshi, J. Kudoh, T. Hirano N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Comprehensive analysis of small RNA in Takifugu rubripes, Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan, June 2011.

9. チャニンヤウ ウォンワランカナ・寺井良太・根来庫介・秋葉正毅・小野陽介、藤森一造、木下滋晴、清水厚志・堺弘介・小島サビズ和子・満山進・喜久里育也・佐藤友紀、照屋盛実、鼠尾まい子・矢野修一・三輪友希乃・今田有美・塚原正俊、工藤純、平野隆、清水信義、渡部終五、浅川修二、Expression Profile of microRNAs in Takifugu rubripes, The Japanese Society of Fisheries Science Spring meeting 2011, Tokyo University of

Marine Sciences and Technology, March 2011.

10. 浅川修一・チャニンヤ ウォンワランカナ・寺井良太・根来庫介・秋葉正毅・小野陽介・藤森一浩・木下滋晴・清水厚志・堺弘介・小島サビヌ和子・満山進・喜久里育也・佐藤友紀・照屋盛実・鼠尾まい子・矢野修一・三輪友希乃・今田有美・塚原正俊・工藤純・平野隆・清水信義・渡部終五、Comprehensive analysis of small RNAs in Takifugu rubripes, The Japanese Society of Fisheries Science Spring meeting 2011, Tokyo University of Marine Sciences and Technology, March 2011.

11. C. Wongwarangkana, M. Akiba, R. Terai, K. Negoro, K. E. Fujimori, S. Kinoshita, A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, Y. Sato, T. Masatoshi, J. Kudoh, T. Hirano, N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Sequencing and functional analysis of Takifugu rubripes and Oryzias latipes small RNA, The 4th Asian Young Researchers Conference on Computational and Omics Biology, Matrix Biopolis, Singapore, December 2010.

12. 浅川修一・チャニンヤ ウォンワランカナ・寺井良太・根来庫介・秋葉正毅・小野陽介・藤森一浩・木下滋晴・清水厚志・堺弘介・小島サビヌ和子・満山進・喜久里育也・佐藤友紀・照屋盛実・鼠尾まい子・矢野修一・三輪友希乃・今田有美・塚原正俊・工藤純・平野隆・清水信義・渡部終五、"次世代シーケンサーを用いたメダカ・トラフグ小分子RNAのシーケンシング", The Japanese Society of Fisheries Science Autumn meeting 2010, Kyoto University, September 2010.

13. C. Wongwarangkana, M. Akiba, K. E. Fujimori, S. Kinoshita, A. Shimizu, K. Sakai, S. K. Kojima, S. Mitsuyama, I. Kikuzato, Y. Sato, K. Teruya, A. Shiroma, M. Teruya, M. Nezu, S. Yano, Y. Miwa, Y. Imada, M. Tsukahara, J. Kudoh, T. Hirano, N. Shimizu, S. Watabe, S. Asakawa, Sequencing and functional analysis of Takifugu rubripes and Oryzias latipes small RNA, International Symposium on Biodiversity Sciences, Nagoya, Japan, July 2010.

14. チャニンヤ ウォンワランカナ・秋葉正毅・藤森一浩・木下滋晴・清水厚志・堺

弘介・小島サビヌ和子・満山進・喜久里育也・佐藤友紀・照屋盛実・鼠尾まい子・矢野修一・三輪友希乃・今田有美・塚原正俊・工藤純・平野隆・清水信義・渡部終五・浅川修一、Deep sequencing and profiling of microRNAs in torafugu and medaka, The Japanese Society of Fisheries Science Spring meeting 2010, College of Bioresource Sciences, Nihon University, March 2010.

15. 浅川修一・チャニンヤ ウォンワランカナ・秋葉正毅・藤森一浩・木下滋晴・清水厚志・堺弘介・小島サビヌ和子・満山進・喜久里育也・佐藤友紀・照屋盛実・鼠尾まい子・矢野修一・三輪友希乃・今田有美・塚原正俊・工藤純・平野隆・清水信義・渡部終五・浅川修一、メダカ・トラフグ小分子RNAの解析, The Japanese Society of Fisheries Science Spring meeting 2010, College of Bioresource Sciences, Nihon University, March 2010.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

データサーバー

<http://133.11.222.76/>

<http://133.11.222.76/blast/blast.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川修一 (ASAKAWA SHUICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30231872

(2) 研究分担者

藤森一浩 (FUJIMORI KAZUHIRO)

(独) 産業技術総合研究所・研究員

研究者番号：60273025

清水厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30237655

(3) 連携研究者

堺 弘介 (SAKAI KOSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70245463

満山 進 (MITSUYAMA SUSUMU)

慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30296727

小島サビヌ和子 (KOJIMA SABINE KAZUKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：10445439