

平成22年 6月14日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19201038
 研究課題名（和文） 機能未知なるカオナシ遺伝子の正体解明を目指す戦略的ゲノム研究
 研究課題名（英文） An Integrated Strategy for Unveiling the Function of KAONASHI
 (Unknown Functional) Genes.
 研究代表者
 清水 信義（SHIMIZU NOBUYOSHI）
 慶應義塾大学・医学部・名誉教授
 研究者番号：50162706

研究成果の概要：カオナシ遺伝子を統合的に解析するために、慶應ヒト遺伝子データベースを構築し、メダカカオナシ遺伝子のノックダウン解析結果や初期胚における発現パターンによる検索を可能とした。さらにヒトカオナシ遺伝子を培養細胞で強制発現させた細胞内局在解析や、高効率なメダカ発現コンストラクトの開発を行った。タンパク質コード遺伝子のみならず小分子カオナシ RNA を対象としてシーケンシングと解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	22,200,000	6,660,000	28,860,000
2008年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
年度			
年度			
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

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：メダカ、ノックダウン、モルフォリノ、カオナシ

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解読によって30億のDNA塩基配列から23,000余の遺伝子が同定された。しかし、機能が判明あるいは推定できるものは6割程度で残り4割の機能は不明である。ゲノムに潜む遺伝子の探索は未完成であくまでも暫定的であり、それらの中には機能を全く推定できない遺伝子が、我々の厳密な解析から1,000個以上存在することが判明した。代表者はこれら顔の見えない遺伝子を「カオナシ遺伝子」と命名しゲノムワイドに探索して300個を厳選し、その重要性を解明する新研究課題として「機能未知なるカオナシ遺伝

子300個の網羅的解析」を遂行した。この間、ゲノム解読研究で培ったノウハウの総力を結集して、ゲノム構造の決定・mRNAトランスクリプトの確認・タンパク質構造の推定・比較ゲノム解析などを行ってきた。特に、機能解析のきっかけを得るためにメダカ型カオナシ遺伝子を同定し、その後にメダカの胚発生をモルフォリノオリゴ(MO)でノックダウンし、形態形成の異常を観察するという戦略を実践した。その結果、現在までに130個のメダカ型カオナシ遺伝子に関して発生過程における遺伝子発現パターンおよび形態形成への影響などを分類することができた。例えば、あるカオナシ遺伝子をノックダウンす

ると、脳の形成に関して脳室の縮小あるいは拡大が起こることを見いだしており、それぞれヒトの小脳症および水頭症の発症過程を追究する貴重なモデルになると考えている。その他にも血管形成異常、体軸の形成異常等の胚が得られた。このような大規模なノックダウン解析は脊椎動物では報告されておらず、我々の研究成果がヒト機能未知遺伝子の機能解析を進める上での礎石となることは間違いない。

2. 研究の目的

先行研究では様々な表現形を示すノックダウン胚が得られた。そこで、これらの先行研究を進展すべく、ノックダウン解析により得られた情報をデータベース化すると共に、

代表的な機能既知遺伝子のノックダウン解析、カオナシ遺伝子の細胞内局在解析、魚類に存在しないヒトカオナシ遺伝子を強制発現させるための発現コンストラクトの開発、さらにはタンパク質コード遺伝子のみならず、機能未知の小分子RNAをターゲットとしたシーケンシング解析を試みた。

これらのバイオインフォマティクスや細胞生物学等の複数の手法を組み合わせた多面的な解析によりカオナシ遺伝子の正体解明を最終目標とし、基盤整備を行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子データベース構築

先行研究ではEnsembl (EBI)のデータベースから遺伝子配列を入手し、遺伝子機能についてある一定の基準を満たす遺伝子を全てエントリーから削除して残された1,800個の機能未知遺伝子から、マニュアルアノテーションにより1,029個のカオナシ遺伝子を選別した。

本研究では

Ensembl (EBI)からの遺伝子データ入手
NCBIからの遺伝子データ入手
上記データの統合
発現解析データの入力
ノックダウン解析データの入力

によりカオナシ遺伝子を含むヒト全遺伝子データベースを構築することで、カオナシ遺伝子と他の機能既知遺伝子に関連づけて検索可能なシステムの構築を試みた。

(2) 遺伝子ノックダウン解析

先行研究ではカオナシ遺伝子のみに対し遺伝子ノックダウンを行ったが、本研究では対照実験として転写因子を中心とした機能既知遺伝子を複数選別し、ノックダウン解析を行った。さらに特徴的な表現形が得られてい

る遺伝子についてもコントロール実験を行った。

(3) カオナシ遺伝子の細胞内局在解析

先行研究で表現形が得られた遺伝子と魚類に存在しないカオナシ遺伝子を選択し、哺乳類細胞での局在を検討した。先行研究の遺伝子ノックダウンにより脳室の拡大が見られた KAO-0865 とメダカには存在しない KAO-B171、KAO-B014の全長をそれぞれRT-PCRにより増幅し、eGFPとの融合タンパク質としてpENTR1Aにクローニングした。LR Clonase反応により発現コンストラクトであるpcDNA6.2/EmGFPに交換し、cos細胞で強制発現を行った。

KAO-B014に於いてはペプチド抗体を作製し、内在性KAO-B014タンパク質の細胞内局在も検討した。

(4) メダカ発現コンストラクトの開発

レスキュー用コンストラクト

pCS2+は両生類で開発された発現ベクターであり、CMVプロモーターのトランスジェニック動物が作製できる他、SP6プロモーターによりmRNAの合成が可能である。ENUライブラリーからスクリーニングされた変異体のレスキューなどに用いられるが、本研究ではノックダウン解析により表現形が得られた遺伝子にMOが与えた影響をキャンセルするため、MOと相補にならない用にコドンを変えた人工mRNAをクローニングし、MOと同時にインジェクションすることで遺伝子ノックダウンからのレスキューを試みた。pCS2+は以前よりpoly(A)シグナル配列が逆転しているなどの問題があったため、制限酵素サイトの導入、T7プロモーターの導入、LR Clonaseによる交換が可能なGateway化などを行いpCS6+DESTを開発した(図1)。pENTR/D-TOPOにKAO-0865、KAO-0090、KAO-0351を全長クローニングし、LR Clonase反応によりpCS6+DESTに交換した。得られた発現コンストラクトを用い、mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit (Ambion)によりmRNAを合成した。

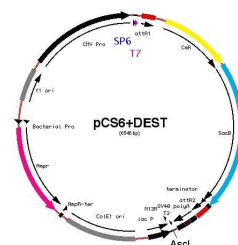


図1: mRNA発現コンストラクト pCS6+DEST

トランスジェニック用コンストラクト

トランスジェニックメダカは1細胞期の胚に発現コンストラクトをマイクロインジェクションすることで作製できる。しかし、導

入効率はマウス等と比べても低く、薬剤スクリーニングもできない。また、ゼブラフィッシュと比べても使用できる遺伝子組み換えツールが少ないことも問題である。特に本研究で目標としたヒトカオナシ遺伝子は機能も構造もまったくわからないため、GFP 融合遺伝子とする事で機能阻害が生じる可能性もある。そこで、IRES (internal ribosomal entry site) によりバイシストロニックな発現コンストラクトを作製した。さらに1つの発現コンストラクトに2つの発現ユニットを持つコンストラクトも構築し、それぞれトランスジェニックメダカの作製を試みた。

(5) メダカ小分子 RNA のシーケンシング

先行研究ではタンパク質コーディング遺伝子のみを対象として解析を行った。本研究では non-coding RNA 遺伝子にも着目し、特に30塩基程度の小分子 RNA についてシーケンシングを行い、その染色体上の分布や由来を検討した。

安楽死させたメダカの精巣 30 個を滅菌水で洗浄後 TRIzol Reagent (Invitrogen 社) を加え、ディスポーザブルペッセルを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ後のサンプルを規定の手法によりクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿により精製し Total RNA とした。得られた Total RNA 200 µg を用いて DynaExpress miRNA Cloning Kit II により低分子量画分のクローニングを行った。インサートを有する計 300 クローンを取得しシーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) 慶應遺伝子データベースの構築

Ensembl と NCBI よりヒト遺伝子を入力し、Ensembl のアノテーションをもとに遺伝子データの統合を行った (図 2)。その結果ヒト全 28,626 遺伝子のうち NCBI に存在しない 4,368 個と Ensembl に存在しない 5,179 個を除く 19,079 個が両データベースで遺伝子として定義されていることが判明した。全 28,626 遺伝子のうち全く既知のドメインを持たない物は 8,604 個あり、先行研究では 1,000 個余であったことから多数の偽遺伝子、予測遺伝子、non-coding RNA 遺伝子がそれぞれのデータベースに含まれている事が予想された。

メダカ初期胚で発現解析を行ったカオナシ遺伝子を含む 240 個の遺伝子の発現パターンを入力し、発現様式毎に検索できるシステムを構築した (図 3)。さらにノックダウンを行った遺伝子についても表現形毎に検索できるようにした (図 4)。これら発現データ、ノックダウン解析データは個別遺伝子のページで一覧できるようにした (図 5)。

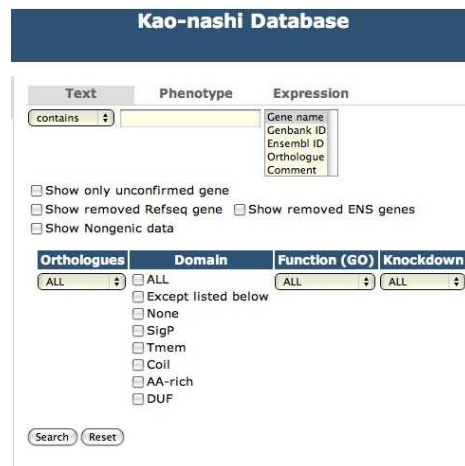


図 2 : 慶應遺伝子データベース

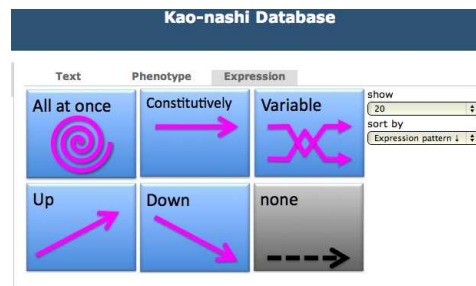


図 3 : 発現様式毎検索画面

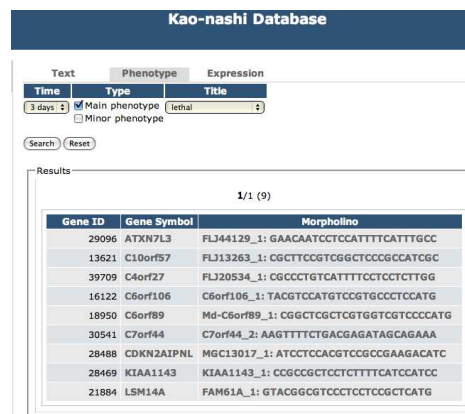


図 4 : ノックダウン解析検索画面

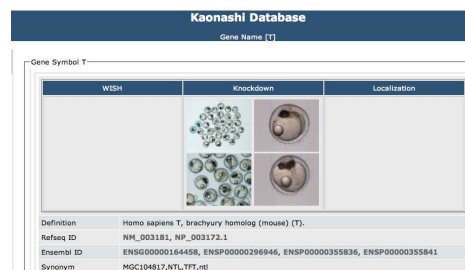


図 5 : 個別遺伝子データ画面

(2) 遺伝子ノックダウン解析

FGF, GATA, HOX, RAX, SIX, SOX, TBX などの発生に関わる転写因子を中心とした既知遺伝子 20 個の MO を作製し、ノックダウン解析を行った。GATA1、T(nt1)、RAX の 3 つにつ

いてはゼブラフィッシュで得られている変異体とほぼ同等の表現形が得られたが、他の17遺伝子に関しては変異体の表現形が不明瞭、あるいは再現できなかった。これは当初予想していたよりもかなり低い値であった。

先行研究で特異な表現形が得られた KAO-0865 についてもコントロール MO を設計し、再現性を確認した。

(3) カオナシ遺伝子の細胞内局在解析

KAO-0865 と KAO-B171 は膜タンパク質であるが、それぞれ核、ゴルジ体への局在を示した。一方、既知のドメインが全く存在しない KAO-B014 は核への局在を示した(図6)。ノックダウン解析と時期組織別発現解析を行った KAO-0865 は発生のごく初期段階から成体のほぼ全ての組織でも発現しているユビキタな発現を示す遺伝子であった。ノックダウン解析では頭部で特異な表現形を示したが、発現様式と表現形との関連性は見られなかった。

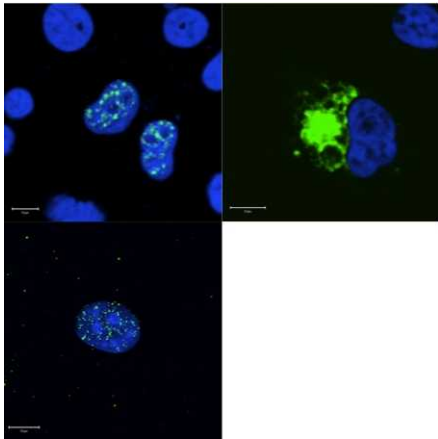


図6：カオナシの細胞内局在 (左上より、KAO-0865, B171, B014)

(4) メダカ発現コンストラクトの開発

レスキュー用コンストラクトの構築と MO との co-injection

LR Clonase による交換反応により構築した KAO-0865, KAO-0090, KAO-0351 発現コンストラクトより mRNA を転写、精製後に MO と co-injection することで表現形の回復が見られるか検討したが、全てに於いて有為な差は得られなかった。

トランスジェニック用コンストラクト

トランスジェニックメダカを作製する上で最大の問題はスクリーニングである。

特に発現させる遺伝子が蛍光タンパク質でない場合はヒレの部分切除が可能になるまでの1ヶ月間、数十個体を飼育する必要があり、それぞれのF1世代の飼育を含めると多大な労力が必要となる。また、発現量の多い

個体を選別する事も極めて困難である。そこで、従来はレポータータンパク質と目的遺伝子の発現コンストラクトを同時にインジェクションすることなどで対応していたが、本研究ではより直接的に対象遺伝子の発現が確認できるように IRES を用いたバイシストロニック発現コンストラクトの構築を行った。

CMV あるいは EF1a プロモーター下にカオナシ遺伝子を挿入し、その下流に IRES-eGFP を配置した。これら発現ユニット全体をホーミング酵素である PI-SceI 認識配列で挟み込む事でゲノムへの導入効率の向上を試みた(図7)。しかし、CMV、EF1a 直下に GFP を配置した発現コンストラクトでは蛍光が確認できたのに対し、IRES ベクターでは全く蛍光が確認できなかった。



図7：IRES 発現コンストラクト

そこで、1つのコンストラクト上に2つの発現ユニットを持つ発現コンストラクトを構築した(図8)。



図8：デュアル発現コンストラクト

その結果、2つ別々のプロモーターにより2つの蛍光タンパク質が制御されたトランスジェニックメダカを作製することができた(図9)。

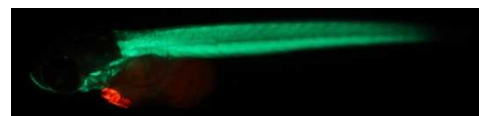


図9：心筋 RFP、骨格筋 GFP メダカ

プロモーターあるいはレポーター遺伝子を置き換えたコンストラクトでも同時に発現が見られる事も確認しており、デュアル発現コンストラクトにより、今後多種多様なトランスジェニックメダカを作製を促進できる。

(5) メダカ小分子 RNA のシーケンシング

メダカ精巢から抽出した Total RNA の 30 塩基程度の低分子量画分をクローニングし、シーケンシングを行った。BLAST 解析の結果、およそ2割程度のインサートが tRNA や rRNA 由来のものであったが、大部分の物は遺伝子以外の配列であった。そのうちの半数程度はメダカ染色体に複数箇所にマッチした事が

ら反復配列由来の piRNA であると予想されたが、染色体に 1 カ所しか存在しない配列も多数得られた。これら機能未知小分子 RNA も「カオナシ (RNA) 遺伝子」として今後も引き続き機能解析を進めたい。

以上のように、本研究では先行研究をさらに発展させ、バイオインフォマティクス解析、細胞生物学的解析、個体を用いた発現解析、さらには新規カオナシ RNA 遺伝子の解析も行った。

全く機能のわからないカオナシ遺伝子ではあるが、薄皮をはくように徐々にその片鱗を見せ始めている。しかし、機能ドメインをもつ遺伝子あるいは既知遺伝子と異なり適用できる解析手法は未だ少ない。

一方、発表論文(3)のように ENU 変異体ライブラリーからのスクリーニングの結果ではあるが、カオナシ遺伝子である KIAA1440 が胸腺の発達に重要な役割を果たしている事も解明されている。今後も多角的なアプローチを駆使し、1 つでも多くのカオナシ遺伝子の「カオ」を曝露したい。

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9件)

(1). Negishi, T., Nagai, Y., Asaoka, Y., Namae, M., Mitani, H., Sasaki, T., Shimizu, N., Terai, S., Sakaida, I., Kondoh, H., Katada, T., Furutani-Seiki, M. and Nishina, H.: Retinoic Acid Signaling Positively Regulates Liver Specification by Inducing *wnt2bb* Gene Expression in Medaka, *Hepatology*, **51**(3):1037-1045. (2010). 査読有り

(2). Nakamura, S., Kurokawa, H., Asakawa, S., Shimizu, N. and Tanaka M.; Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing theca cells. *Dev Dyn*. **238**(10):2652-2657 (2009). 査読有り

(3). Iwanami, N., Okada, M., Hoa, V.Q., Seo, Y., Mitani, H., Sasaki, T., Shimizu, N., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M. and Takahama, Y.; Ethylnitrosourea-induced thymus-defective mutants identify roles of KIAA1440, TRRAP, and SKIV2L2 in teleost organ development. *Eur J Immunol*. **39**(9):2606-2616. (2009). 査読有り

(4). Hashimoto, H., Miyamoto, R., Watanabe, N., Shiba, D., Ozato, K., Inoue, C., Kubo, Y., Koga, A., Jindo, T., Narita, T., Naruse, K., Ohishi, K., Nogata, K., Shin-I, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Miyamoto, T., Mochijiki, T., Yokoyama, T., Hori, H., Takeda, T., Kohara, Y., and Wakamatsu, Y.; Polycystic Kidney Disease in the Medaka (*Oryzias latipes*) pc Mutant Caused by a Mutation in the Gli-Similar3 (*glis3*) Gene. *Plos ONE*, **4**(7):e6299 (2009). 査読有り

(5). Iwanami, N., Higuchi, T., Sasano, Y., Fujiwara, T., Hoa, V.Q., Okada, M., Talukder, S.R., Kunimatsu, S., Li, J., Saito, F., Bhattacharya, C., Matin, A., Sasaki, T., Shimizu, N., Mitani, H., Himmelbauer, H., Momoi, A., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M. and Takahama, Y.; WDR55 Is a Nucleolar Modulator of Ribosomal RNA Synthesis, Cell Cycle Progression, and Teleost Organ Development. *PLoS Genet.*, **4**(8):e1000171 (2008). 査読有り

(6). Liang, C.S., Ikeda, D., Kinoshita, S., Shimizu, A., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N. and Watabe, S.; Myocyte enhancer factor 2 regulates expression of medaka *Oryzias latipes* fast skeletal myosin heavy chain genes in a temperature-dependent manner. *Gene*. **407**:42-53 (2008). 査読有り

(7). Ahsan, B., Kobayashi, D., Yamada, T., Kasahara, M., Sasaki, S., Saito, T.L., 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, S.I., 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. and Morishita, S.; UTGB/medaka: Genomic Resource Database for Medaka Biology. *Nucleic Acids Res.*, **36**: D747-752 (2008). 査読有り

(8). Su, F., Osada, Y., Ekker, M., Chevrette, M., Shimizu, A., Asakawa, S., Shiohama, A., Sasaki, T., Shimizu, N., Yamanaka, T., Sasado, T., Mitani, H., Geisler, R., Kondoh, H. and Furutani-Seiki, M.; Radiation hybrid maps of Medaka chromosomes LG 12, 17, and 22. *DNA Res.* **14**(3):135-40

(2007). 査読有り

(9). Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M. and Kondoh, H.; The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *PNAS*, **104**(23): 9691-9696 (2007). 査読有り

[学会発表](計3件)

浅川 修一、清水 厚志、佐々木 貴史、清水 信義、カオナシ遺伝子群の解析およびオンライン画像データベースの構築、第31回日本分子生物学会年会(2008.12.12)(神戸ポートアイランド)神戸

清水 厚志、浅川 修一、佐々木 貴史、清水 信義、カオナシ遺伝子群のノックダウン解析およびオンラインデータベースの構築、第30回日本分子生物学会年会(2007.12.11)(パシフィコ横浜)横浜

Shimizu, A., Asakawa, S., Sasaki, T., and Shimizu, N., An On-line Database System for Knock-down Analysis of KAO-NASHI Genes. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting, San Diego (Oct.26. 2007)

[その他]

「DNA研究とその応用」

NHK 高校講座生物第23回 第3部 遺伝
2007年10月15日

<http://www.nhk.or.jp/kokokoza/tv/seibutsu/archive/resume023.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 信義 (SHIMZU NOBUYOSHI)
慶應義塾大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 50162706

(2)研究分担者

浅川 修一 (ASAKAWA SHUICHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 30231872

清水 厚志 (SHIMZU ATSUSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 30327655

佐々木 貴史 (SASAKI TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 70306843

(3)研究協力者

楊 浩 (YO GO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 10464992

塩浜 愛子 (SHIOHAMA AIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40383731

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