

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248034

研究課題名(和文)魚介類RNA干渉機構の解明と増養殖・感染防御への応用

研究課題名(英文)Elucidation of RNA interference in fish and shellfish and its application for aquaculture and pathogen defense

研究代表者

浅川 修一 (ASAKAWA, Shuichi)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30231872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では魚介類においてRNA干渉に関わる小分子RNAを網羅的に解析し、それらの知見を水産分野に役立てることを目的に基礎研究を行った。次世代シーケンサーによるトランスクリプトームにより、トラフグ、メダカ、アコヤガイの各組織における小分子RNA発現プロファイルを明らかにした。トラフグにおいては1420種類のmiRNAを見出すとともに、それぞれのmiRNAに多数のisomiRが存在することを見出した。魚介類の病原体防御にRNAiを活用することを考え、病原体側の遺伝子構造の解析を推進した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we comprehensively analyzed the small RNA involved in RNA interference in fish and shellfish to get basic knowledge about RNAi of the aquatic organisms and utilize the knowledge in the field of fisheries. By the transcriptome using next-generation sequencer, we revealed small RNA expression profile in each tissue of the torafugu (*Takifugu rubripes*), medaka (*Oryzias latipes*) and pearl oyster (*Pinctada fucata*). We found 1420 miRNA species in torafugu, and then found existence of large number of isomiRs for each of miRNA. We had an idea to take advantage of the RNAi in pathogen defense of fish and shellfish. For this, we analyzed the genomic sequences of pathogenic organisms.

研究分野：水圏生物工学

キーワード：RNA干渉 miRNA piRNA torafugu medaka pearl oyster *Heterobothrium okamotoi* トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

1998年にRNA干渉(RNAi)に関する最初の報告がなされて以来、siRNA(一般に人為的なRNA)、miRNA、piRNA、内在性siRNAなどの小分子RNAが様々な作用機構でRNAサイレンシングに関わっており、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った。その結果、これまでのタンパク質遺伝子にだけに重点をおいたゲノム・遺伝子研究の流れを一変させている。

RNAiに関する応用としては、例えば医学分野でsiRNA等によるがん細胞などをターゲットとしたノックダウン実験が挙げられるが、その目的は小分子RNAを使ったターゲットタンパク質遺伝子の発現低下である。一方、内在の小分子RNAそのものをターゲットとする研究も進められている。例えばアフリカミドリザルを対象に特定の小分子RNAをターゲットにして発現を低下により、HDLの上昇とVLDLトリグリセライドの低下を導いた実験結果などが報告され、小分子RNA発現制御による表現型の改良ができることが示された。本研究では、RNAiを活用して増養殖や耐病性、食味などの水産学的应用を視野に入れているが、そのような試みは端緒に着いたばかりであった。

2. 研究の目的

本研究ではRNAiを様々な観点から活用して水産分野に役立てることを目指しており、そのための基礎研究として以下の項目達成を目的とした。

- (1)メダカ・トラフグ各組織小分子RNAのトランスクリプトーム解析と詳細なアノテーションやゲノムマッピングを行う。
- (2)クルマエビ、アコヤガイなどの小分子RNAのトランスクリプトーム解析を行い発現プロフィールを明らかにする。
- (3)筋成長や脂質代謝、免疫、真珠形成などの組織で高発現している小分子RNAの機能を明らかにする。
- (4)RNAiによる生体防御のターゲットとする病原体のモデルとしてトラフグ寄生虫ヘテロボツリウム (*Heterobothrium okamotoi*) を選び、そのトランスクリプトーム解析を行う。さらにRNAiのターゲット遺伝子の選抜を行い、感染症に対する生体防御について新規手法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織別小分子RNAの調整とcDNA化とシーケンシング：アコヤガイから各組織を単離し、小分子RNAを単離、精製した。アコヤガイの小分子RNAのcDNAを合成し、Illumina社のHiSeq2000で解読した。メダカ、トラフグについても先行研究を引き継いで、トランスクリプトーム解析を行い、メダカ、トラフグにおける発現プロフィールを明らかにした。

(2) シーケンスデータ解析：図1のようなストラテジでデータ解析を行った。既知miRNAに関しては、組織ごとの出現頻度をカウントした。

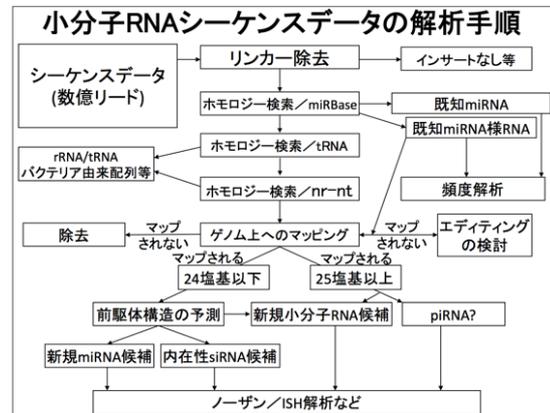


図1 小分子RNAシーケンスデータの解析手順

(3) トランスクリプトーム解析の結果、組織特異性が特徴的なmiRNAについて定量PCRによる検証を行った。

(4) *in situ hybridization* (ISH)/ノックダウンによるmiRNAの機能解析：筋肉形成との関連が示唆されているmiR-499に注目しISHを行い、発現の組織特異性や筋肉組織との関連を調べた。またノックダウンによる機能解析を行い筋形成との関連を調べた。

(5) *H. okamotoi* のトランスクリプトーム解析：*H. okamotoi* 個体全体からmRNAを抽出、cDNAを作製し、トランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) トラフグ小分子RNAの新規シーケンシング：Illumina HiSeq2000を用いて速筋、遅筋2個体、心臓、鰓(皮膚)、胆嚢(皮膚)、脳、卵巣、皮膚、腸、鰓、胸腺、頭側腎臓、体側腎臓、脾臓の小分子RNAの解析を行った。Genomic Workbenchによるアノテーションにより、miRNAと非miRNAの配列情報に分類した。

(2) トラフグ非miRNA小分子RNAの解析：SOLiDで既読の小分子RNAシーケンスのうち25~31塩基長のシーケンスデータを解読し多数のtRNAフラグメントを見出した。それらの解析の結果、トラフグ、メダカの両魚類の各組織において、Glu CTCなど8種類の特定のアンチコドン配列を持つtRNAのフラグメントがその他のtRNAフラグメントと比較して多く発現していることが明らかになった。また、ゲノム上に存在することが確認できた。さらにこれらの未知RNAのノーザンブロット解析の結果、いずれもおよそ30塩基の位置にバンドが検出され、その発現が確認できた。

(3) *H. okamotoi* のトランスクリプトーム解析：夏季のトラフグ生体の鰓から採取された*H. okamotoi*、4個体の虫体全体からトータル

RNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成した。増幅・精製の後、Ion PGMでのシーケンシングを行った。得られたデータのアセンブリを行った結果、平均443bpの長さのコンテイク16710個を構築できた。

(4)トラフグ小分子RNAの詳細なアノテーション：1億以上のリードのデータを解析した。その結果、約9000種類のmiRNAやputative miRNAに分類できた。そのうち約2000種類は魚類で初めて見いだされた。また、魚類特異的なmiRNAも見出された。さらに組織別に発現プロファイルを解析し、それぞれの組織に特異的なmiRNAを多数見出した。

(5)miR-499はヒトから各種魚類にいたる生物種で共通にミオシン重鎖遺伝子が消失しており、miR-499のみが残っている。メダカにおけるmiR-499の発現をin situ hybridizationなどで調べたところ、miR-499は宿主遺伝子が消失しているにもかかわらず発現していた。

(6)*H. okamotoi* 遺伝子の代謝マップ上へのマッピング：*H. okamotoi*についてトランスクリプトームの結果から、それぞれの遺伝子の配列から同源性検索を行ってKEGGなどの代謝マップ上にマッピングを行った。その結果、自由生活生の種とは代謝経路が異なることを示唆する結果が得られたため、その精査を進めた。これらのデータに基づき*H. okamotoi* 駆除のためのターゲット遺伝子候補の選抜を行った。その結果、RNAiのターゲット候補であり、その機能阻害により寄生虫の不妊化を導くことが期待されるvasa関連遺伝子などがリスト化された。

(7)トラフグmiRNAのプロファイリング結果の改訂：年々充実するmiRNA等の小分子RNAのデータベースの拡充に伴って解析した魚類小分子RNAのデータ解析をアップデートし、一層正確な小分子RNAのプロフィールを示すことに努めた。その結果、トラフグ各組織からのべ1420種類のmiRNAを見出した。またメダカおよびトラフグの免疫関連組織についても引き続き解析を進めている。解析の完了したトラフグの9種類の組織ではそれぞれの組織でのみ特異的な発現を示す特徴的なmiRNAをリスト化した。各miRNAの派生群であるisomiRを網羅的に見出した。5'側のindelによりシード配列部分が異なるmiRNAも見出した。シード配列が異なることから、同一のisomiR種内間でターゲットとする遺伝子が異なることが予想された。

(8)トラフグゲノムの精読：小分子RNAのマッピングの結果の完成度を一層高めるため、トラフグゲノム配列の高精度化も合わせて推進した。

(9)アコヤガイの小分子RNAのトランスクリプトーム解析を行った。その結果、アコヤガイで特徴的なmiRNAの発現プロファイルを明らかにした。また既報の生物とは異なる小分子RNAのサイズ分布を示すという新たな知見が得られた。この結果は、アコヤガイの卵

巣や精巣以外の組織でもmiRNAとは異なる小分子RNAが機能的に優占している可能性を示すものであり、今後のさらなる解析が望まれる。

(10)miR-499の機能解析：miR-499はミオシン重鎖遺伝子MYH14のイントロン内にあるmyomiRであり、これらのゲノム構造は脊椎動物で広く保存されている。メダカではMYH14が消失しており、miR-499のみが残っている。しかしメダカmiR-499の発現パターンはMYH14/miR-499が保存されている他の魚類と同様の心筋、遅筋特異的な発現パターンを示した。またmiR-499のノックダウンにより遅筋線維の形成不全を示した。

(11)魚介類病原菌のゲノム解析：生体防御のターゲットとして新たに細菌もターゲットとした。耐病性獲得に関する基礎データを得るため、エアロモナスなどの魚類感染菌などの解析を行った。

(12)RNA薬のドラッグデリバリーのため、蛍光siRNAを用いて魚類におけるRNAの動態解析を試み、高感度検出系の確立を進めるための基礎的検討を行った。

(13)新たな魚介類寄生虫のゲノム解析：現在食中毒を引き起こすことで問題となっている寄生虫、クドアに新たに注目し、そのゲノムシーケンシングを行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7件)

- ① Wongwarangkana C, Fujimori KE, Akiba M, Kinoshita S, Teruya M, Nezu M, Tsukahara M, Watabe S, Asakawa S, Deep sequencing, profiling and detailed annotation of microRNAs in Takifugu rubripes, BMC genomics, in press
- ② Fu X1, Zhang H, Tan E, Watabe S, Asakawa S, Characterization of the torafugu (Takifugu rubripes) immunoglobulin heavy chain gene locus, Immunogenetics, 査読有, 67(3), 2015, 179-193
DOI: 10.1007/s00251-014-0824-z
- ③ Zhang H, Tan E, Suzuki Y, Hirose Y, Kinoshita S, Okano H, Kudoh J, Shimizu A, Saito K, Watabe S, Asakawa S, Dramatic improvement in genome assembly achieved using doubled-haploid genomes, SCIENTIFIC REPORTS, 査読有, 4, 2014, 6780
DOI: 10.1038/srep06780
- ④ Jagoda SS, Wijewardana TG, Arulkanthan A, Igarashi Y, Tan E, Kinoshita S, Watabe S, Asakawa S, Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicaemia., Disease of Aquatic Organisms, 査読有, 109(2), 2014, 127-137

- DOI: 10.3354/dao02733
- ⑤ Jagoda SS, Tan E, Arulkanthan A, Kinoshita S, Watabe S, Asakawa S, Draft Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* Strain Ae34, Isolated from a Septicemic and Moribund Koi Carp (*Cyprinus carpio koi*), a Freshwater Aquarium Fish., *Genome Announcements*, 査読有, 2(3), 2014, e00572-14
DOI: 10.1128/genomeA.00572-14
- ⑥ Bhuiyan SS, Kinoshita S, Wongwarangkana C, Asaduzzaman M, Asakawa S, Watabe S, Evolution of the myosin heavy chain gene MYH14 and its intronic microRNA miR-499: muscle-specific miR-499 expression persists in the absence of the ancestral host gene., *BMC Evolutionary Biology*, 査読有, Jul 6, 2013, 13:142
DOI: 10.1186/1471-2148-13-142
- ⑦ Zhang H, Hirose Y, Yoshino R, Kinoshita S, Saito K, Tan E, Suzuki Y, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Watabe S, Asakawa S, Assessment of homozygosity levels in the mito-gynogenetic torafugu (*Takifugu rubripes*) by genome-wide SNP analyses, *Aquaculture*, 査読有, 380-383, 2013, 114-119
DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.12.003
- [学会発表] (計12件)
- ① 向野颯馬、陳盈光、水野直樹、浅川修一、トラフグ寄生虫 *Heterobothrium okamotoi* のトランスクリプトーム解析、平成27年度日本水産学会春季大会、2015年3月27日～2015年3月31日、東京海洋大学(東京都、港区)
- ② S. S. S. De S. Jagoda, Shuichi Asakawa, Genetic characterization of multidrug resistant *Citrobacter* spp. Isolated from septicemic fresh water ornamental fish, 9th symposium on disease in Asian aquaculture (DAA9)、2014年11月24日～2014年11月28日、Rex Hotel (Vietnam, Ho Chi Minh City)
- ③ Jagoda, S. S. S. De S, 木下滋晴、浅川修一、渡部終五、アエロモナス族 *Aeromonas veronii* における *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子の種内多様性の解析、平成26年度日本水産学会秋季大会、2014年9月19日～2014年9月22日、九州大学箱崎キャンパス(福岡県、福岡市)
- ④ Jagoda, S. S. S. De S, 陳盈光、木下滋晴、渡部終五、浅川修一、Draft genome sequence of *Aeromonas hydrophila* strain Ae34, isolated from a koi carp showing signs of haemorrhagic septicemia, 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートア
イランド(兵庫県、神戸市)
- ⑤ Shuichi Asakawa、Genome and transcriptome analysis of aquatic organisms by next generation sequencing, FABA2013(招待講演)、2013年5月30日～2013年6月1日、(Turkey、Erzurum)
- ⑥ Zhang Hong, Shuichi Asakawa、Towards high quality assembly of torafugu (*Takifugu rubripes*) genome using homozygous gynogenetic individuals、平成25年日本水産学会春季大会、2013年3月26日～2013年3月30日、東京海洋大学(東京都、港区)
- ⑦ Chaninya Wongwarangkana, Shuichi Asakawa、Comprehensive analysis of small RNAs in *Takifugu rubripes*、平成25年日本水産学会春季大会、2013年3月26日～2013年3月30日、東京海洋大学(東京都、港区)
- ⑧ Bhuiyan Sharmin Siddiqu, Shuichi Asakawa、A5'-flanking region can drive indigenous slow/cardiac-specific expression of myosin heavy chain gene, MYH14, in zebrafish、平成25年日本水産学会春季大会、2013年3月26日～2013年3月30日、東京海洋大学(東京都、港区)
- ⑨ Chaninya Wongwarangkana, Shuichi Asakawa、Comprehensive analysis of small RNAs in *Takifugu rubripes* and *Oryzias latipes*、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県、福岡市)
- ⑩ Bhuiyan Sharmin Siddiqu, Shuichi Asakawa、The Intronic miRNA, miR-499 of Zebrafish Myosin Heavy Chain Gene, MYH14, Regulating the Formation of Slow Muscle in Zebrafish, The Nordic Countries Meeting on Zebrafish As a Model Organism For Development and Disease、2012年11月21日～2012年11月23日、Nobel Forum, Karolinska Institutet (Sweden, Stockholm)
- ⑪ Bhuiyan Sharmin Siddiqu, Shuichi Asakawa、The Slow/cardiac Specific Intronic miRNA, miR-499 of Zebrafish and Torafugu of Myosin Heavy Chain Gene, MYH14, Regulating the Formation of Slow Muscle in Zebrafish, 18th Zebrafish and Medaka Meeting (ZMJM)、2012年9月22日～2012年9月23日、京都大学医学部芝蘭会館(京都府、京都市)
- ⑫ Chaninya Wongwarangkana, Shuichi Asakawa、Comprehensive analysis of small RNAs in *Takifugu rubripes* and *Oryzias latipes*、Seventeenth Annual Meeting of the RNA Society、2012年5月29日～2012年6月2日、University of

Michigan (USA, Michigan, Ann Arbor)

[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]

無し

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