

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

ふりがな		わたべ しゅうご		所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	
研究代表者氏名		渡部 終五					
研究課題名	和文	トラフグのポストゲノム解析に関する基礎研究					
	英文	Post-sequencing functional studies on the pufferfish (<i>Takifugu rubripes</i>) genome					
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計	
16年度以降は内約額 金額単位：千円	22,900	26,300	12,900	12,900	12,000	87,000	
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
渡部 終五	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授		水圏生物工学	総括およびバイオインフォマティクス技術による遺伝子解析 生物学的手法による遺伝子解析 筋特異的タンパク質の遺伝子解析 遺伝子機能解析技術の開発			
鈴木 謙	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授		水族生理学				
落合 芳博	東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教授		水圏生物工学				
末武 弘章	東京大学・大学院農学生命科学研究科・助手		水族生理学				
当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)							
<p>トラフグ <i>Takifugu rubripes</i> のゲノムサイズは約 400 Mb と脊椎動物の中では最も小さく、ヒトの 1/8 に過ぎない。脊椎動物の機能遺伝子数はトラフグとヒトで大きく変わらないことが示唆されており、したがってトラフグゲノムの機能解析に要する労力はヒトと比較してはるかに少ない。トラフグはこのような特徴から、脊椎動物ゲノム解析研究のモデルになることが期待され、諸外国で数年前から全ゲノム解析が行われ、最近、約 90% のゲノム情報をカバーするドラフトシーケンスが公開された。一方、トラフグの胚発生の実験や成魚までの飼育はわが国においてのみ可能である。本研究は、わが国におけるトラフグ飼育技術の利点を活かしつつ、トラフグゲノムのコンパクトなサイズとシーケンスデータを最大限に活用し、バイオインフォマティクス技術および遺伝子工学的技術により筋特異的遺伝子、筋分化制御因子、免疫関連遺伝子の網羅的解析を行う。次いで同定された各遺伝子の発生段階依存性的および組織特異的な発現変動の詳細を明らかにする。さらに、主要な遺伝子の転写調節領域の推定と推定領域の機能解析を行い、未だ不明な点が多い脊椎動物の筋発生や、筋細胞および免疫担当細胞の増殖・分化の分子機構を明らかにし、トラフグ全ゲノム解析の生データに生物学的意味をアノテーションすることを目的とする。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. トラフグの人工授精を行い、胚発生段階の試料を経時的に採取した。さらに稚魚および成魚の種々の組織から試料を採取し、first strand cDNA を合成してライブラリーを作製した。
2. 他生物種で報告されている塩基配列およびアミノ酸配列を利用し、トラフグゲノムデータベースを用いて筋特異的遺伝子のミオシン重鎖遺伝子(*MYH*)、トロポミオシン遺伝子(*TPM*)、さらには筋分化制御因子 MyoD ファミリーの遺伝子 *MyoD* および *myogenin* などの推定を行った。別途、cDNA クローニングによっても各遺伝子の発現を確認した。その結果、MyoD ファミリー遺伝子群は哺乳類とほぼ同数であったが、*MYH* および *TPM* についてはトラフグの方がより多く存在することがわかった。これは魚類におけるゲノム倍化現象に関連するものと思われる（研究成果・論文 No.4,10）。
3. トロポミオシン遺伝子(*TPM*)の解析では哺乳類で知られている *TPM1* ~ 4 の 4 種類の遺伝子の中、*TPM1* および *TPM4* に該当する 2 種類の遺伝子がみつかった。トラフグ *TPM* につきアミノ酸配列を演繹し、GENSCAN および Spidey を利用してエキソン・イントロン構造を予測し、第 1 エキソン上流の 5'側の領域を転写調節領域と推定した。さらに、この領域につき PipMaker を利用してヒト、マウスなどの哺乳類、ゼブラフィッシュやミドリフグの各 *TPM* のそれと比較し、両方で保存されている領域を抽出した（研究成果・論文 No.4）。
4. ミオシン重鎖遺伝子(*MYH*)の解析を行った。*In silico* クローニングされたトラフグ *MYH* は 16 速筋型、9 心筋型、5 遅筋/superfast 型、11 平滑筋/非筋細胞型の合計 41 遺伝子であった（研究成果・学会発表 No.1,3,8）。
5. *MyoD* および *myogenin* とともに、一部 *MYH* を対象に whole-mount *in situ* hybridization による発現部位の解析を行った。その結果、受精後 72 および 96 時間のトラフグ胚体の筋節において、*MyoD* に続き、*myogenin* が発現することが示された。さらに、これら筋分化制御因子の発現に誘導され、トラフグ胚体の筋節で速筋型および遅筋型 *MYH* の発現が確認された。また、平滑筋/非筋細胞型 *MYH* は胚全体に発現がみられた（研究成果・学会発表 No.1,3,8）。
6. イギリスのケンブリッジ RFCGR グループとの共同研究により、トラフグゲノムの BAC エンドシーケンス、cosmid エンドシーケンスおよびランドマーク BAC シークエンスのデータを活用し、トラフグ速筋タイプ *MYH* を含む mayfold 同士の位置関係を詳細に解析した。その結果、トラフグではヒト速筋型 *MYH* クラスタに対応する遺伝子座が 2 種類あることが示された（研究成果・論文 No.1）。
7. 成魚および稚魚トラフグの 15 組織から 24,398 EST の塩基配列を解析し、トラフグ・ゲノムデータに 10,116 EST をアノテーションした。ゼブラフィッシュ EST との比較から魚類に共通した遺伝子と種特異的遺伝子の存在が明らかになった（研究成果・論文 No.9）。
8. トラフグの温度適応機構を明らかにするために魚類で見つかった高温馴化特異的タンパク質 Wap65 の構造および遺伝子発現パターンをメダカで調べた。その結果、Wap65 には 2 つのアイソフォームが存在し、その中の 1 つはヘム結合能を有することが示された（研究成果・論文 No.5）。トラフグについてもゲノムデータベース上で 2 つのアイソフォームが確認されたので、それらの性状を調べ成果を論文にまとめて投稿中である（研究成果・学会発表 No.5）。
9. トラフグの IgM、IgD のほか、サイトカインとして IL-8、IL-12、細胞マーカーとして T 細胞の CD3ε、ヘルパー T 細胞の CD4、細胞障害性 T 細胞の CD8 の構造を決定したことにより、トラフグ生体防御機構に関する研究の基礎知見が得られた（研究成果・論文 No.6,7）。
10. トラフグ皮膚の粘液から新規レクチンをクローニングするとともに精製を行い、本レクチンが植物由来のものによく似ることを明らかにした（研究成果・論文 No.8）。
11. イギリスのセントアンドリュース大学グループとともに、受精後種々の温度で発生を進めて各発生段階の試料を採集した。目下、イギリスの共同研究者が筋分化制御因子 MyoD ファミリーおよびその他の筋分化に関連すると思われる転写因子の発現パターンの解析を進めている。
12. 各遺伝子の染色体上の位置を正確に把握するため、また、養殖上有用と思われる遺伝子を探索することを目的としてマイクロサテライトを用いた遺伝子連鎖地図の作製に着手した（研究成果・論文 No.2,3,11）。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 昨年度で計 5 年の研究計画の中、2 年が経過したが、所期の目的である筋分化の制御機構の解明については共同研究のイギリス・セントアンドリュース大学のグループの結果待ちのところがあり、論文として報告できるようなまとまった成果はこれからである。ちなみに、セントアンドリュース大学のグループは平成 14,15 年度で各 1 回ずつ浜名湖に隣接する本学附属水産実験所でそれぞれ 1 ヶ月滞在して試料収集を済ませた。
2. 筋特異的遺伝子解析については成果が上がった。ここで対象とした遺伝子は主にミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) およびトロポミオシン遺伝子 (*TPM*) であるが、*TPM* については慶応大学のヒトゲノム解析チームの協力を得て行われた。すなわち、従来高等脊椎動物では 4 種類の *TPM1* ~ 4 しか存在しないとされてきたが、トラフグでは *TPM1* および *TPM4* で各 2 種類の遺伝子が見つかり、各 2 種類の遺伝子が互いに組織分布を違えて機能を分担していることが示唆された。また、分子進化的には各 2 種類の遺伝子は魚類と哺乳類が分岐後に生じたもので、一般に認められている魚類のゲノム倍加現象を強く支持する結果が得られた (図 1)。
3. *MYH* についてはイギリスのケンブリッジ RFCGR のグループとの共同研究により解析を行った。 *In silico* クローニングされたトラフグ *MYH* は 16 速筋型、9 心筋型、5 遅筋/superfast 型、11 平滑筋/非筋細胞型の合計 41 遺伝子であった。ところで、哺乳類に存在する 6 種類の速筋型 *MYH* は、ヒトおよびマウスでそれぞれ、17 および 11 番染色体上においてタンデムクラスターを形成し、各遺伝子の配列も一致する。したがって、クラスター中の物理的な位置が発生における各 *MYH* 発現のスイッチングに関係することが示唆されている。そこで、トラフグ *MYH* についても同様な解析を行ったところ、トラフグには 3 種類以上の速筋型 *MYH* を含むクラスター遺伝子座が少なくとも 2 領域存在することが示唆された。ヒト全ゲノムデータベースを用いてヒト速筋型 *MYH* 遺伝子座と比較したところ、トラフグゲノムのシンテニー領域には大幅な遺伝子の再編成が認められた。一方、トラフグ速筋型 *MYH* 遺伝子座につきヒトのシンテニー領域を解析したところ、周辺には *MYH* は認められなかった。以上の結果から、トラフグ速筋型 *MYH* クラスターは哺乳類系列と分岐した後に、独自の進化を遂げて形成されたことが示唆された (図 2)。
4. 生体防御に関する研究においてはクローニングされたトラフグ体表粘液レクチンが植物のユリ目ものと類似することが示されるとともに、本レクチンが寄生虫に結合するだけでなく、飼育環境から単離された細菌に対して凝集活性をもつことが示された。
5. イギリス RFCGR グループとの共同研究の成果で、成魚および稚魚トラフグの 15 組織から 24,398 EST の塩基配列を解析し、トラフグ・ゲノムデータに 10,116 EST をアノテーションした。今後はこの成果を利用してマイクロアレイを作成し筋分化制御因子や筋特異的タンパク質の発現変動の詳細な解析を目指す。
6. 本研究の成果を公開することも併せて、本研究グループが主催、イギリスの RFCGR グループおよびセントアンドリュース大学グループの協力のもと本年の 11 月 3 ~ 6 日に国際シンポジウム「フグ・ゲノミクスー研究の現状と展望」(東大シンポジウム)を東京大学弥生講堂で開催する (<http://www.suikou.fs.a.u-tokyo.ac.jp/symposium/>)。ノーベル賞学者でトラフグの全ゲノム解析を最初に手がけた Sydney Brenner 博士と、慶応大学の清水信義博士が基調講演を行う予定になっている。

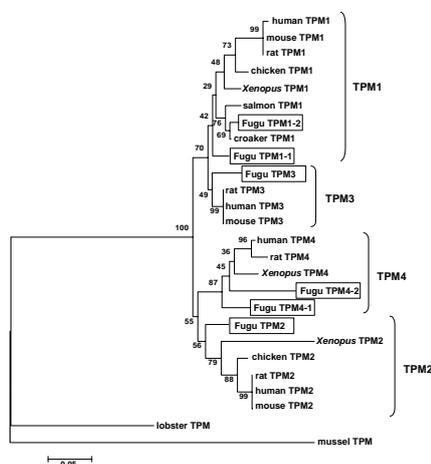


図 1. *TPM* の系統樹。トラフグでは *TPM1* および *TPM4* で各 2 種類の遺伝子が見つかった 2 種類の遺伝子は魚類と哺乳類が分岐後に生じたことが示唆される。

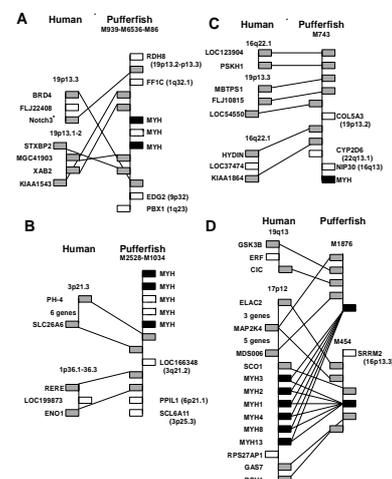


図 2. トラフグ速筋型 *MYH* 遺伝子座とヒトのシンテニー領域の解析。ヒトでは速筋型 *MYH* が 1 遺伝子座であるが、トラフグでは 3 遺伝子座以上存在する。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

論文

- Ikeda D, Clark MS, Liang C, Snell P, Edwards YJ, Elgar G and Watabe S: Genomic structural analysis of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) skeletal myosin heavy chain genes. *Mar. Biotechnol.* (in press).
- Furukawa S, Takeshima H, Otaka T, Mitsuboshi T, Shirasu K, Ikeda D, Kaneko G, Nishida M and Watabe S: Isolation of microsatellite markers by in silico screening implicated for genetic linkage mapping in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.* (in press).
- 池田大介、古川聡史、金子元、近藤秀裕、渡部終五: トラフグゲノムの養殖への応用. 月刊養殖 (印刷中).
- Toramoto T, Ikeda D, Ochiai Y, Minoshima S, Shimizu N and Watabe S: Multiple genes organaization of pufferfish *Fugu rubripes* tropomyosin isoforms and tissue distribution of their transcripts. *Gene* **331**, 41-51 (2004).
- Makoto Hirayama, Atsushi Kobiyama, Shigeharu Kinoshita, and Shugo Watabe: The occurrence of two types of hemopexin-like protein and spatiotemporal expression patterns of their transcripts. *J. Exp. Biol.* **207**, 1387-1398 (2004).
- Saha NR, Suetake H and Suzuki Y: Characterization and expression of the immunoglobulin light chain in the fugu: evidence of a solitaire type. *Immunogenetics* **56**, 47-55 (2004).
- Yoshiura Y, Kiryu I, Fujiwara A, Suetake H, Suzuki Y, Nakanishi T and Ototake M: Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics* **55**, 296-306 (2003).
- Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H and Suzuki Y: Lectins homologous to those of monocotyledonous plants in the skin mucus and intestine of pufferfish, *Fugu rubripes*. *J. Biol. Chem.* **278**, 20882-20889 (2003).
- Clark MS, Edwards YJ, Peterson D, Clifton S, Thompson AJ, Sasaki M, Suzuki Y, Kikuchi K, Watabe S, Kawakami K, Sugano S, Elgar G and Johnson SL: Fugu ESTs: new resources for transcription analysis and genome annotation. *Genome Res.* **13**, 2747-2753 (2003).
- Ikeda D, Toramoto T, Ochiai Y, Suetake H, Suzuki Y, Minoshima S, Shimizu S and Watabe S: Identification of novel tropomyosin 1 genes of pufferfish (*Fugu rubripes*) on genomic sequences and tissue distribution of their transcripts. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 83-90 (2003).
- 池田大介: 解読完了間近! フグゲノムの利用法. 化学と生物 **40**, 179-180 (2002).

学会発表

- 池田大介、Orhan Erdogan、金子元、渡部終五: トラフグ・ミオシン II 重鎖遺伝子クラスターの解析. 平成 16 年度日本水産学会大会、鹿児島、平成 16 年 4 月.
 - 古川聡史、武島弘彦、大高太郎、三星亨、白須邦夫、池田大介、金子元、西田睦、渡部終五: トラフグ遺伝子連鎖地図作成を目的としたマイクロサテライトマーカーの *in silico* スクリーニング. 平成 16 年度日本水産学会大会、鹿児島、平成 16 年 4 月.
 - Ikeda D, Clark MS, Elgar G and Watabe S: Expressional and genomic structural analysis of pufferfish class II myosin heavy chain genes. The 2nd International Symposium on Aquatic Genomics, Tokyo, September 2003.
 - Watabe S, Ikeda D and Toramoto T: Studies of muscle-related genes using *Fugu* genome database. The 2nd International Symposium on Aquatic Genomics, Tokyo, September 2003.
 - 中庭真基子、平山真、池田大介、渡部終五、平澤徳高、大高太郎、三星亨、白須邦夫: トラフグ Wap65 関連タンパク質の一次構造解析とその発現様式. 平成 15 年度日本水産学会大会、東京、平成 15 年 4 月.
 - Tsutsui S, Tasumi S, Suetake H, Kikuchi K, and Suzuki Y: Skin mucus lectin of pufferfish, *Fugu rubripes*. International Symposium of Developmental and Comparative Immunology. St Andrews Univ. June-July 2003.
 - 虎本拓也、池田大介、渡部終五: トラフグ Sox9 の cDNA クローニングとゲノムデータベースの利用. 平成 15 年度日本水産学会大会、東京、平成 15 年 4 月.
 - 池田大介、渡部終五: トラフグゲノムデータベースを利用したミオシン II 重鎖遺伝子の解析. 本アケノム研究会・第 7 回シンポジウム、東京、平成 15 年 3 月.
 - 虎本拓也、池田大介、落合芳博、渡部終五: トラフグ α -tropomyosin の cDNA クローニングとゲノムデータベースの利用. 平成 14 年度日本水産学会大会、奈良、平成 14 年 4 月.
 - 池田大介、虎本拓也、渡部終五、蓑島伸生、清水信義: トラフグ・ゲノムデータベースを利用した *in silico* クローニング. 平成 14 年度日本水産学会大会、奈良、平成 14 年 4 月.
- その他 26 編学会発表