

トラフグのポストゲノム解析に関する基礎研究

Post-sequencing functional studies on the pufferfish (*Takifugu rubripes*) genome

渡部 終五 (Watabe Shugo)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



研究の概要

本研究はトラフグ全ゲノム解析によって得られた膨大な遺伝子情報をもとに、そのコンパクトなゲノムサイズの利点を最大限に活用することを目的とした。具体的には筋特異的遺伝子と免疫関連遺伝子をターゲットに、トラフグ・ゲノムへの生物学的意味のアノテーションを行った。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード
生物系／農学・水産学・水産化学／生物学

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) トラフグ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、脊椎動物ゲノムのモデルとして全配列が解読、公開された。
- (2) 人工飼育が困難なことから、ゲノム情報を実際のトラフグ研究に活用した研究は皆無であった。

2. 研究の目的

- (1) トラフグ飼育技術およびゲノム情報を最大限に活用し、筋特異的遺伝子、筋分化制御因子、免疫関連遺伝子の解析を行う。
- (2) 各遺伝子の発生段階、組織特異的な発現変動の解析を行い、筋発生、筋細胞および免疫担当細胞の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) トラフグの人工授精および経時的なサンプリング。
- (2) 筋特異的および免疫関連遺伝子の *in silico* クローニング。
- (3) 当該遺伝子のゲノム構造解析および分子系統解析。
- (4) cDNA クローニングによるスプライシングバリエーションの探索 (ジェネティックアナライザ、ABI PRISM® 3100 を購入)。
- (5) reverse transcriptase (RT)-PCR および *in situ* hybridization による時空間的な発現変動解析。
- (6) タンパク質の精製および生化学的解析 (プロテインシーケンサ、ABI Procise 492HT を購入)。

4. 研究の主な成果

- (1) 成魚および稚魚トラフグの 15 組織から 24,398 expressed sequence tag (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。
- (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

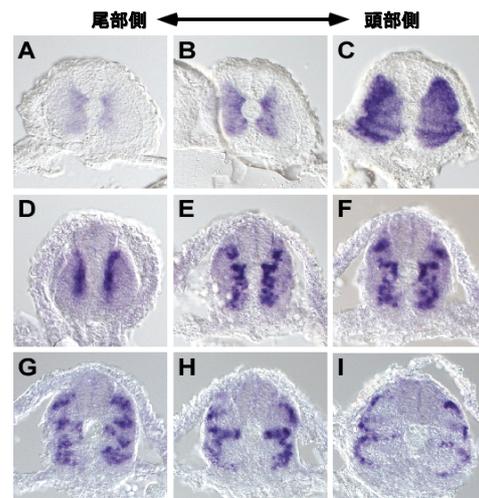


図 1. 速筋型(A-C)および遅筋型(D-I)ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) の発現解析。速筋型は体幹深部に発現するが、遅筋型は発生が進むにつれて深部から表層部に発現部位が移動している。

〔4. 研究の主な成果 (続き)〕

筋分化制御因子 MyoD ファミリーの *MyoD* および *myogenin* などを探査した。これら遺伝子の cDNA クローニングを行うとともに、RT-PCR および *in situ* hybridization で時空間的な発現変動を解析した (図 1)。

その結果、発生初期で速筋型および遅筋型 *MYH* はいずれも脊索に隣接する adaxial cell から発現が始まった。速筋型 *MYH* は発現部位が体幹部全体へと徐々に拡大したが、遅筋型は体幹部表層へと移動した (図 1)。

(3) 哺乳類では 6 種類の速筋型 *MYH* がゲノム上 1 箇所ですべて形成しているのに対し、トラフグ *MYH* は 5 箇所に分散し、その中、3 箇所でクラスターを形成していることが明らかとなった。クラスターを形成していない 2 箇所が哺乳類の *MYH* 局在領域に対応していることから、硬骨魚類と哺乳類の *MYH* クラスターは両者の共通祖先が分岐した後、独自の進化を遂げて形成されたことが示唆された (図 2、論文投稿準備中)。

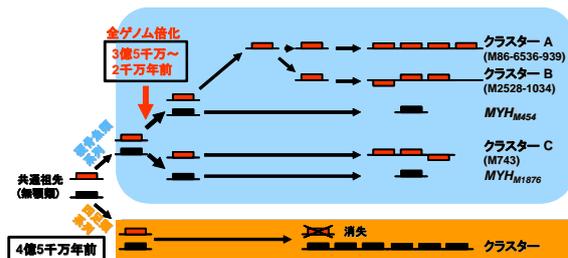


図 2. 硬骨魚類と哺乳類の速筋型ミオシン重鎖遺伝子クラスターの推定形成過程。

(4) 生体防御 (免疫系) 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) 遺伝的に優良な品種を確立することを目的として、マイクロサテライトマーカーを用いてトラフグ連鎖地図を作成した。確立した 66 マーカー中、41 マーカー座で遺伝子型が決定でき、この結果を基に雌では 10 連鎖群上に 26 マーカーを、雄では 9 連鎖群上に 19 マーカーからなる連鎖地図を作成することができた。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

トラフグ・ゲノムをヒトを理解するためのモデルとしてではなく、水産最重要魚種のゲノムとして世界で初めて機能解析を行った。現在、水産学でゲノムを用いた研究が興隆しているが、本研究はその先駆けとなった。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. **Watabe S** and Ikeda D: Diversity of the pufferfish *Takifugu rubripes* fast skeletal myosin heavy chain genes. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* **1**, 28-34 (2006).
2. Bei JX, Suetake H, Araki K, Kikuchi K, Yoshiura Y, Lin HR and Suzuki Y: Two Interleukin (IL)-15 homologs from two distinct origins in fish. *Mol. Immunol.* **43**, 860-869 (2006).
3. Fernandes JM, Mackenzie MG, Elgar G, Suzuki Y, **Watabe S**, Kinghorn JR and Johnston IA: A genomic approach to reveal novel genes associated with myotube formation in the model teleost, *Takifugu rubripes*. *Physiol. Genomics* **22**, 327-338 (2005).
4. 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.* **70**, 620-628 (2004).
5. 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.* **6**, S462-S467 (2004).
6. 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).

ホームページ等

<http://park.ite.u-tokyo.ac.jp/suikou/>