

Title	ヨーロッパカブトエビにおける発生時期特異的なsmall RNAの解析
Sub Title	
Author	広瀬, 友香(Hirose, Yuka) 富田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012-03
Jtitle	研究会優秀論文
JaLC DOI	
Abstract	真核生物におけるsmall RNAは遺伝子発現調節を行う分子であり、様々な生命現象に関与していることからその重要性が認知されている。20塩基前後からなるmicro RNA(miRNA)は形態や組織の形成、30塩基前後からなるpiwi-interacting RNA(piRNA)は生殖細胞の発達に必要な分子であることを始めとして、small RNAが発生に密接に関わっている様々な事例が報告されている。しかし、先行研究ではモデル生物や特定の種類のsmall RNAに焦点をあてたものが多く情報に偏りがあり、生体内には未だ同定されていないsmall RNAが存在する可能性がある。そこで、本研究では幼生期に短期間で劇的に形態が変化するヨーロッパカブトエビを対象とし、発生時期特異的に発現するsmall RNAを同定することをsmall RNAと発生の関わりについての新規知見を得ることを目的として研究を進めている。まず、次世代シーケンサーによってカブトエビの各発生段階(卵、幼生1-4令、成体)における12-45塩基の配列情報を約4,700万本取得し、piRNAが含まれる分画である25-45塩基長のsmall RNAについての解析を行った。情報学的手法による他種で同定されたncRNAとの配列比較解析の結果、他種のncRNAと85%以上の配列類似性を持つカブトエビsmall RNAは2,200本存在した。そのうちtransfer RNA(tRNA)の一部に対して配列類似性を持つもの575本の中には、発生過程の1ステージ特異的に発現量(次世代シーケンサーによって得られたリード数)が高いものが8種存在しており、non-coding RNA(ncRNA)の断片様の配列が発生時期特異的に発現している可能性が見いだされた。また、遺伝子錠によって昆虫細胞にGFP発現ベクターを導入することで、small RNAの機能解明に向けたカブトエビへの遺伝子導入系の基盤を整えた。今後カブトエビを対象とした遺伝子導入系が確立しsmall RNA候補の機能を考察することが可能となれば、small RNAと発生との関連性についての議論を深めることができると期待される。
Notes	先端生命科学プロジェクト 富田勝研究会2011年度秋学期
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0654">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0654</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究会優秀論文

司

# 一口ッパカブトエビにおける 発生時期特異的なsmall RNAの解析

2011年度 秋学期

AUTUMN

## 研究会優秀論文推薦のことば

カブトエビは節足動物門甲殻綱鰓脚目に属し、約 2 億年前からほとんど形態をえていないことから”生きた化石”と呼ばれている。本卒業論文では山形県酒田市で採取可能なヨーロッパカブトエビを対象とし、カブトエビの幼生の発生初期に観察される劇的な形態変化に関わる small RNA の同定を目指している。small RNA による遺伝子発現調節機構は幅広い生物種に存在し多様な細胞プロセスに関与しているため、近年大変注目されている。RNA が生命に及ぼす影響の一端を理解するために重要な研究対象である small RNA に着目し、ヨーロッパカブトエビの発生時期特異的な small RNA の同定に向けて着実に成果を得ていることから、本卒業論文を研究会優秀論文として推薦する。

慶應義塾大学  
環境情報学部教授  
富田 勝

2011 年度 卒業論文

ヨーロッパカブトエビにおける  
発生時期特異的な small RNA の解析

慶應義塾大学 環境情報学部 4 年  
広瀬 友香

# 論文要旨

真核生物における small RNA は遺伝子発現調節を行う分子であり、様々な生命現象に関与していることからその重要性が認知されている。20 塩基前後からなる micro RNA (miRNA) は形態や組織の形成、30 塩基前後からなる piwi-interacting RNA (piRNA) は生殖細胞の発達に必要な分子であることを始めとして、small RNA が発生に密接に関わっている様々な事例が報告されている。しかし、先行研究ではモデル生物や特定の種類の small RNA に焦点をあてたものが多く情報に偏りがあり、生体内には未だ同定されていない small RNA が存在する可能性がある。そこで、本研究では幼生期に短期間で劇的に形態が変化するヨーロッパカブトエビを対象とし、発生時期特異的に発現する small RNA を同定することで small RNA と発生の関わりについての新規知見を得ることを目的として研究を進めている。

まず、次世代シーケンサーによってカブトエビの各発生段階（卵、幼生 1-4 令、成体）における 12-45 塩基の配列情報を約 4,700 万本取得し、piRNA が含まれる分画である 25-45 塩基長の small RNA についての解析を行った。情報学的手法による他種で同定された ncRNA との配列比較解析の結果、他種の ncRNA と 85%以上の配列類似性を持つカブトエビ small RNA は 2,200 本存在した。そのうち transfer RNA (tRNA) の一部に対して配列類似性を持つもの 575 本の中には、発生過程の 1 ステージ特異的に発現量（次世代シーケンサーによって得られたリード数）が高いものが 8 種存在しており、non-coding RNA (ncRNA) の断片様の配列が発生時期特異的に発現している可能性が見いだされた。また、遺伝子銃によって昆虫細胞に GFP 発現ベクターを導入することで、small RNA の機能解明に向けたカブトエビへの遺伝子導入系の基盤を整えた。今後カブトエビを対象とした遺伝子導入系が確立し small RNA 候補の機能を考察することが可能となれば、small RNA と発生との関連性についての議論を深めることができると期待される。

Keywords: small RNA, 発生, 時期特異的な発現, ヨーロッパカブトエビ, 遺伝子銃

# 目次

論文要旨 .....	2
目次 .....	3
図表リスト .....	5
第 1 章 序論 .....	6
1.1 RNA 研究の重要性 .....	6
1.2 small RNA の多様性と発生との関わり .....	7
1.3 本研究の着眼点と研究意義 .....	10
第 2 章 対象と手法 .....	13
2.1 新規 small RNA 候補の抽出に向けた情報学的解析 .....	13
2.2.1 各発生段階でのヨーロッパカブトエビの回収 .....	13
2.2.2 次世代シーケンサーによる配列情報の取得 .....	13
2.2.3 次世代シーケンサーで得られた配列情報の解析 .....	13
2.2.4 他種の ncRNA との配列類似性の解析 .....	14
2.2.5 発現パターン解析 .....	15
2.2 遺伝子錠による遺伝子導入法の検討 .....	17
2.2.1 GFP 発現ベクターの構築 .....	17
2.2.2 <i>Drosophila</i> S2 細胞の培養と継代 .....	19
2.2.3 Cellfectin 試薬を用いた <i>Drosophila</i> S2 細胞へのトランسفェクション .....	19
2.2.4 遺伝子錠を用いた <i>Drosophila</i> S2 細胞へのトランسفェクション .....	20

第 3 章 結果と議論 .....	21
3.1 情報学的解析による新規 small RNA 候補の抽出 .....	21
3.1.1 次世代シーケンサーによって出力された配列情報のプロファイル .....	21
3.1.2 様々な ncRNA の断片が存在する可能性とその特徴 .....	23
3.1.3 ncRNA-like fragment の発現パターンの変化 .....	29
3.1.4 発生時期特異的に働く機能性 small RNA 候補の抽出 .....	31
3.2 遺伝子銃による GFP 発現ベクターの導入 .....	35
3.2.1 Cellfectin による GFP 発現ベクターの導入 .....	35
3.2.2 遺伝子銃による <i>Drosophila</i> S2 細胞への DNA 導入法の確立 .....	35
第 4 章 結論 .....	38
謝辞 .....	40
参考文献 .....	42
付録 .....	47

# 図表リスト

図 1: ヨーロッパカブトエビの発生過程における形態変化.....	12
図 2: 次世代シーケンサーのデータ解析のフローチャート .....	16
図 3: hrGFP 発現ベクターの構築 .....	18
図 4: 遺伝子銃 IDERA GIE-III .....	20
図 5: 他種で同定された ncRNA と類似性の高い small RNA のプロファイル .....	26
図 6: tRNA-like fragment がアライメントされた部位とその数 .....	28
図 7: tRNA-like fragment の発現プロファイル .....	30
図 8: 既知の ncRNA との類似性のない small RNA の発現プロファイル .....	33
図 9: <i>Drosophila</i> S2 細胞への GFP 発現ベクターの導入 .....	37
表 1: hrGFP 遺伝子増幅に用いたプライマー配列 .....	18
表 2: 次世代シーケンサーで得られた配列のスクリーニングにおける配列数.....	22
表 3: 既知の ncRNA と類似した配列の正規化された総リード数上位 50 種 .....	27
表 4: 1 ステージで特異的に発現する small RNA の候補.....	34

# 第 1 章 序論

## 1.1 RNA 研究の重要性

一部のウイルスを除く、現存する全ての生物では共通した遺伝情報伝達の行程を有している。この行程はセントラルドグマと呼ばれ、遺伝情報が DNA, RNA, タンパク質という順序で伝えられることを指す。生命が誕生してからおよそ 35 億年の間に生物は進化を繰り返し、今現在も多種多様な生物が様々な環境下で生存しているが、形態や生活環境が全く異なる生物であっても同様の遺伝情報伝達システムを有しているということは、生物の進化、そして生きる仕組みを理解する上で非常に興味深い事実である。

セントラルドグマの中心的存在である DNA の構造は 1953 年にワトソンとクリックによって解説され、4 種類の塩基 (A, T, G, C) が DNA を構成している一要素であることが明らかとなった (Watson and Crick., 1953)。膨大な情報量を持つ DNA は遺伝情報の設計図として全ての細胞に存在し、時期や組織に応じて必要な情報のみが転写されて機能している。その転写産物が RNA である。

RNA も DNA と同様に 4 種の塩基 (A, U, G, C) で構成され、RNA の一種である messenger RNA (mRNA) はコドンと呼ばれる 3 つの塩基が一つのアミノ酸に対応するように配置されることで、タンパク質の構成成分であるアミノ酸の組成を表している (Crick, 1968)。mRNA 上のコドンを transfer RNA (tRNA) が認識し、対応するアミノ酸を ribosomal RNA (rRNA) と ribosomal protein の複合体であるリボソームに運搬することでタンパク質が合成される。mRNA はタンパク質に翻訳されることから protein coding gene, tRNA や rRNA はタンパク質に翻訳されずに機能していることから、non-coding RNA (ncRNA) と呼ばれている。

RNA はタンパク質合成に必要不可欠な分子であると共に、1980 年代に RNA 自身が酵素活性を有する例が発見されたことから (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983), "RNA こそが生命的起源である"と提唱する、RNA ワールド仮説が世に広まった (Gilbert, 1986)。また、ゲノムプロジェクトの台頭により高等真核生物のゲノムでは全体の 70% 以上が転写されていることが明らかとなり (Carninci *et al.*, 2005), RNA は DNA とタンパク質翻訳の架け橋としての役割のみではないことが示唆されるようになった。更に、2000 年代には 20-30 塩基程度から成る ncRNA が遺伝子発現制御を行う例が多々発見された (Lau *et al.*, 2001)。真核生物ではこの他にも多くの ncRNA が同定され、ncRNA が生体内で重要な役割を担っていることは周知の事実となった。こうした背景から、RNA の機能、生合成経路の探索を行うことは、生命の進化や生命活動のメカニズムの解明に多いに役立つものだと考えられる。

## 1.2 small RNA の多様性と発生との関わり

先に示したように、真核生物では多種の ncRNA が数多く同定されている。中でも tRNA と rRNA はタンパク質合成に直接的に関わる物質であるがゆえに、生体内の RNA 量の多くを占めている。その他にもスプライシングに関与する small nuclear RNA (snRNA) や ncRNA の修飾を行う機構に寄与する small nucleolar RNA (snoRNA)，そして遺伝子の発現制御を行う small RNA が生体内で重要な役割を果たしていることが知られている。

small RNA 研究が注目を集める先駆けとなったのは 1998 年の RNA interference (RNAi) の発見であった (Fire *et al.*, 1998)。RNAi とは外来から導入した二本鎖の RNA が遺伝子の発現を制御する機構のことであり、後に二本鎖の RNA は細胞内で 21 塩基前後の RNA に切り取られ、標的の mRNA に結合することで mRNA の遺伝子発現制御を行っていることが明らかとなった (Hutvágner *et al.*, 2001; Tijsterman and Plasterk, 2004)。そもそも遺伝子の発現は組織や時期、環境ストレスに対応するために厳密に制御されなければならない、遺伝子の発現調節のためには多くの転写制御因子が関わっている。その中で、遺伝子発現制御という重要な機構の一部を ncRNA でも最も小さいクラスの RNA が担っているという事実は多くの研究者の関心を集めた。これまでに幅広い生物種で多種の small RNA の同定が進み、その標的への結合様式や生合成経路の特徴によって複数のタイプの small RNA が存在することが明らかとなってきた (Lin He and Hannon, 2004; Jinek and Doudna, 2009)。

の中でも最も情報が蓄積しているのは、micro RNA (miRNA) である。miRNA は 18-24 塩基から構成される small ncRNA で、RNAi 機構が発表される前の 1993 年に線虫において *lin-4* という miRNA が初めて同定された (R. C. Lee *et al.*, 1993)。miRNA は複数のプロセッシング過程を経て mature miRNA となり (Y. Lee *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003; Hutvágner *et al.*, 2001)，RISC 複合体に取り込まれることで標的の mRNA に結合し、標的 mRNA の翻訳抑制や分解を行う (Lin He and Hannon, 2004; Wienholds and Plasterk, 2005)。miRNA は seed 配列と呼ばれる 5' 末端から 8 塩基程度の配列が mRNA への結合に重要であることがわかっており、コンピューターを用いた標的予測も広く行われている (David P Bartel, 2004)。同時に、実験的な検証も含めた多くの研究成果により、miRNA が生体内で時期・組織特異的に発現し、細胞分化、形態発達、ウイルスからの生体防御、腫瘍形成、代謝などの多くの細胞プロセスに関与していることが明らかとなってきた (David P Bartel, 2004; Wienholds and Plasterk, 2005; Esquela-Kerscher and Frank J Slack, 2006; Takane and Kanai, 2011; H. Zhu *et al.*, 2011)。

一方で、RNA 研究の中でも近年注目を集めている分子の一つである piwi-interacting RNA (piRNA) は生殖細胞特異的に発現する RNA 分子であり、2006 年に同定された (M. C. Siomi *et al.*, 2011; Girard *et al.*, 2006)。piRNA の塩基長は miRNA よりも少し長い、24-31 塩基程度であり (Lin,

2007), Argonaute のサブファミリーである PIWI タンパク質に結合することが知られている (H. Siomi and M. C. Siomi, 2009). 興味深いのは, piRNA がトランスポゾンの一種であるレトロトランスポゾンの抑制に関わっているという点である (Lin, 2007). トランスポゾンはヒトのゲノム中の約 45%, マウスは約 40%, ショウジョウバエは約 15~22% も存在すると言われており (Biémont and Vieira, 2006), 生殖細胞におけるトランスポゾンの抑制機構は子孫を残すための極めて重要な戦略と言える.

これまでに多くの piRNA はヒト, マウス, ラット, ショウジョウバエ, ゼブラフィッシュ等の有性生殖を行う生物において同定されている (Girard *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2006; Houwing *et al.*, 2007). 更に, 雌雄同体である線虫では 21U RNA と称される, U から始まる 21 塩基の RNA が PIWI サブファミリーの PRG-1 と相互作用し, 生殖細胞で発現していることが報告され (Ruby *et al.*, 2006; G. Wang and Reinke, 2008; Batista *et al.*, 2008), これまでに定義されていた piRNA の塩基長の特徴とは異なる分子が生殖細胞の発達に関与している可能性が示唆されるようになった. 線虫では後に, 26G endo-siRNA と呼ばれる, G から始まる 26 塩基の配列が接合子の発達や精子形成時に発現していることも明らかとなった (T. Han *et al.*, 2009). 未だ機能未知の piRNA に関与するタンパク質群もあることもふまると, これから piRNA 研究の飛躍が期待される.

他にもヘテロクロマチン化を誘導する small RNA 等が発見されたことにより (D. H. Kim *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2008), small RNA は標的への結合による翻訳の制御や標的の分解, クロマチンの状態の変化など, 多面的なメカニズムを通して遺伝子発現制御を行っている可能性が示唆されるようになった (Chapman and Carrington, 2007; Farazi *et al.*, 2008). 更に small RNA が作用する細胞プロセスも多岐に渡ることから, small RNA が様々な生命現象の一環を担っていると言っても過言ではない.

動物にとって極めて重要な生命現象のひとつと言える発生とは受精卵の細胞分割, 分化, 形態形成といった生物が成体へ成長するまでの一連の過程をさす. small RNA が様々な細胞プロセスに関与していることは上述した通りであるが, その一つが”発生”である (Sun and Tsao, 2008; Stefani and Frank J Slack, 2008).

これまでに無脊椎動物における発生との関連を示した研究は, 線虫やショウジョウバエといったモデル生物を中心に行われてきた. 例えば, *let-7* という miRNA は線虫の発生ステージが進むにつれて発現量が増加することが知られており, *let-7* を欠損した線虫では Larva 3 と Larva 4 を繰り返し成体になることができない (Reinhart *et al.*, 2000). 一方で, 発生過程に関わるタンパク質である LIN28 の発現量は発生ステージが進むにつれて減少することが報告されている (Reinhart *et al.*, 2000). *Let-7* と LIN28 の発現量の変化は *let-7* の *daf-12* 翻訳制御を介した LIN28 の発現制御と LIN28 の結合による pre-*let-7* の分解の促進によって引き起こされると言われており, この 2 つ

の分子によるネガティブフィードバックループが発生を制御している一つの例である (Viswanathan *et al.*, 2008; Piskounova *et al.*, 2008; Rybak *et al.*, 2008; Heo *et al.*, 2008; Resnick *et al.*, 2010). その他にも、線虫では発生初期に発現する *lin-4* や神経の左右対称性に関わる *miR-273* が同定されている (Wienholds and Plasterk, 2005; Resnick *et al.*, 2010). 更に、ショウジョウバエやゼブラフィッシュにおいても発生に関わる複数の miRNA が存在する (Aravin *et al.*, 2003; Wienholds and Plasterk, 2005). このように、モデル生物の発生過程では様々な miRNA が機能していることが報告されている.

miRNA 以外にも piRNA は生殖細胞の発達に必要であることや (Klattenhoff and Theurkauf, 2008), small modulatory double strand RNA (smRNA) は神経の発達に必要な遺伝子を転写レベルで制御していることが報告されたことから (Kuwabara *et al.*, 2004; 2005), small RNA が発生において重要な役割を担っていることは明らかである. 一方で、先行研究はモデル生物を対象としているものや特定の種類の small RNA, 特に miRNA に焦点をあてたものが多い. そのため、既知の知見は発生に占める small RNA の役割を網羅していない可能性があり、発生における機能性 small RNA の包括的な理解が望まれている.

### 1.3 本研究の着眼点と研究意義

本研究では非モデル生物であり, “生きた化石”と呼ばれる, ヨーロッパカブトエビ *Triops cancriformis* (*T. cancriformis*) の発生時期特異的に働く機能性 small RNA を同定することを目的とした。カブトエビは節足動物門甲殻綱鰐脚目に属する生物であり, 化石の形態から約 2 億年前から現在まで形質がほとんど変化していないと推測されることや卵が乾燥体制を持っていることなど, ユニークな特徴を有している。また, カブトエビの幼生期では短時間で劇的な形態変化が起こることが知られている(図 1)。1 令から 4 令まではわずか 26 時間程度で成長し, 体長も約 2 倍になる。尾鞭の変化も著しく, 幼生初期に観察されるノーブリウス眼が後期にかけて退化するに従って複眼の形成が行われることも例として挙げられる(図 1)。前述したように既に形態や組織の形成に関連した small RNA の存在が報告されていることからすると, 発生過程で形態が劇的に変化するカブトエビでは small RNA がダイナミックかつ巧妙に発生, 特に形態形成に関与する遺伝子群を制御している可能性があると考えられる。よって, カブトエビの発生時期特異的に発現する small RNA を同定することで, 発生に関与する small RNA の新規知見を得られると期待される。更にこの時に, これまでに形態形成との因果関係がよく知られている miRNA よりも配列長が長い small RNA を対象とすることで, 新規機能性 small RNA を同定できるのではないかと考えている。

ヨーロッパカブトエビの発生時期特異的に発現する機能性 small RNA を同定するためには, 機能性 small RNA 候補の選定と候補配列の発現確認と機能の推定が必要であると考えられる。近年, small RNA の同定に向けたステップとして次世代シーケンサーのデータを用いた配列解析が頻繁に行われている。次世代シーケンサーによる解析は ncRNA の配列情報を得ることができる上にデータ量も多いことから機能性 small RNA 候補を選定するための手法として適している。更に, 発生段階毎の次世代シーケンサーによるデータを取得することができれば, 正規化された配列の本数の比較によっておおよその発現量の変化を追うことができる。情報学的手法による他種の ncRNA との比較解析結果やリード数の変動を指標として, カブトエビの機能性 small RNA 候補を絞ることが可能となると考えられる。

情報学的手法により予測された small RNA が実際に生体内で機能しているかを明らかにするためには更にいくつかのステップを経る必要であると考えられる。まず, 予測された small RNA が生体内で発現しているのかを確認する。RNA の発現を確認する方法としては Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) やノザンプロット法が広範的に用いられている。両者の実験を行うことで, 予測された RNA の配列や塩基長の確認や発現量の定量が可能となる。本研究の目的である時期特異的に発現する small RNA を同定するためには, 発生時期ごとに抽出した total

RNA を用いてステージ間での発現量の変動を追う必要があるため、これらの手法は有用である。

発現が確認された後に着目すべきは small RNA の機能性である。遺伝子の機能を知るためにには、目的の遺伝子の発現を増加、もしくは減少させた後に、細胞や組織の表現型の変化の観察や他の遺伝子の発現量を定量して比較するといった手法がとられる。ここで、将来的にカブトエビにおいて発現が確認された新規 small RNA 候補がどのような機能を有しているかを考察するためには、外来からの遺伝子導入系を構築し、small RNA の発現を変化させる必要がある。そこで私は遺伝子導入法の中でも遺伝子導入装置（遺伝子銃； gene gun）を用いた遺伝子導入に着目した。遺伝子銃による遺伝子導入系を確立することが出来れば、機能性 small RNA 候補の発現量を増減させた時のカブトエビの表現型を追うことにより、発生時期特異的に発現する small RNA 候補の生体内での役割について議論することが可能である。

本研究ではヨーロッパカブトエビにおける発生時期特異的に働く small RNA を同定するために、上述した研究方法のうち次世代シーケンサーによって得られた配列の解析と遺伝子銃による遺伝子導入系の基盤の構築を試みた。本卒業論文では結果の 3.1 にて情報学的手法を用いた発生時期特異的に働く small RNA 候補の抽出について、3.2 にて遺伝子銃を用いた遺伝子導入系の構築に向けて行った実験結果を報告し、発生における small RNA の機能の可能性について議論したい。

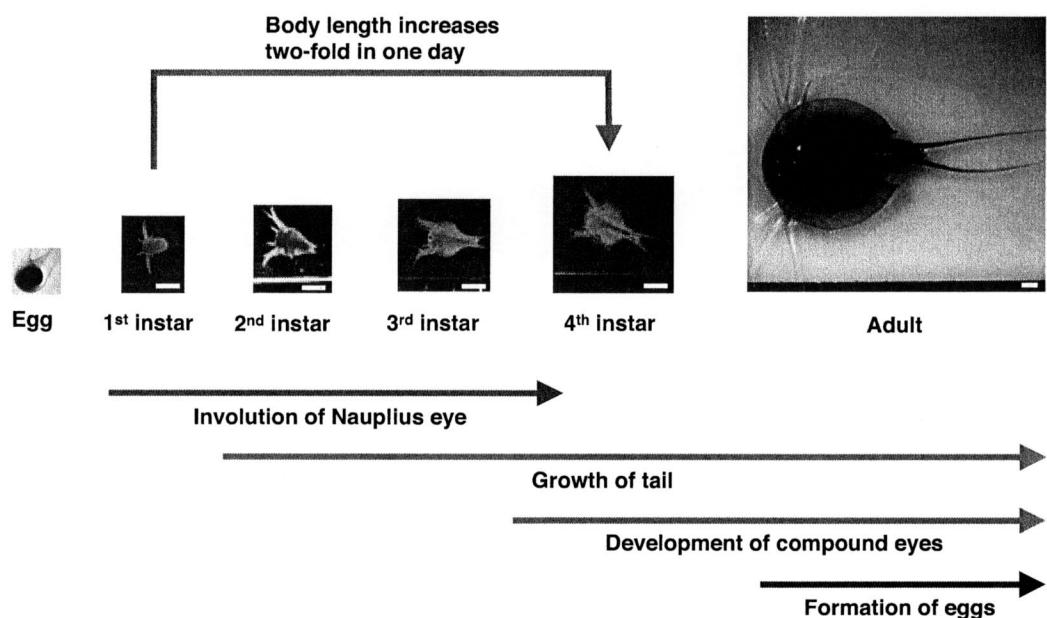


図 1: ヨーロッパカブトエビの発生過程における形態変化

ヨーロッパカブトエビの発生過程 (卵, 幼生 1-4 令, 成体) の撮影写真と発生過程で観察される形態変化の一例を示した。幼生時の写真における白いバーは 100  $\mu\text{m}$ , 成体の写真における黄色いバーは 500  $\mu\text{m}$  を表している。

## 第 2 章 対象と手法

### 2.1 新規 small RNA 候補の抽出に向けた情報学的解析

#### 2.2.1 各発生段階でのヨーロッパカブトエビの回収

ヨーロッパカブトエビは山形県酒田市で採取し、水温 20°C、ライトを 14.5 h/day 照射して飼育した。次世代シーケンサー用のサンプルとして、卵を約 1000 個、幼生 1-4 令をそれぞれ 500 匹、成体を 2 匹回収した。本解析に用いた成体サンプルのシーケンスデータ取得前に行った実験結果では、本来昆虫綱双翅目に属する生物のみが持つとされる 2S rRNA がカブトエビ体内にも蓄積しており、それはエサの赤虫（ユスリカの幼虫であり、昆虫綱双翅目に属する）由来のものである可能性が示唆された（付録 1）。更にこの small RNA の発現量はエサを与えてからの時間の経過と共に減少していく様子が観察された（付録 1）。先行研究では線虫の RNAi 法の一つとして特定の RNA を高発現させた大腸菌をエサとして線虫に与える手法が確立されていること（Timmons *et al.*, 2001）や生体内に取り込んだ食物の miRNA が宿主の mRNA に作用する例が報告されていることからも（L. Zhang *et al.*, 2011），エサ由来の small RNA は研究や食物を取り込んだ生物にとって有用であることもあるが、本研究では、カブトエビ由来の RNA を出来る限り精度良くシークエンスするため、幼生 1-4 令はエサを与えていない個体、成体に関してはエサを与えてから約 19 時間後の個体を対象とした。

#### 2.2.2 次世代シーケンサーによる配列情報の取得

回収した個体は TRIzol (Invitrogen 社) を使用して、total RNA を調製し、次世代シーケンサーによる解析は外注した。配列取得までは、1) 12-45 塩基の分画の RNA を精製、2) RNA の 5'末端と 3' 末端にタグ配列を連結し、逆転写反応によって cDNA ライブライマーを作成、3) Genome Analyzer IIx (GAIIX) によって配列決定を行う、という手順で進められた。なお、個体の回収と total RNA の調製は慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 博士課程の高根香織氏が行ったサンプルを用いた。

#### 2.2.3 次世代シーケンサーで得られた配列情報の解析

次世代シーケンサーにより得られた配列情報から発生時期特異的に働く small RNA 候補を絞るためにあたり、まず配列のクオリティーの低いものやリード数の少ないものを除去した（図 2, step 1-1, 1-2）。配列のクオリティーは GAIIX の解析出力ファイルのひとつである FASTQ ファイルの情報

を元に算出した (Cock *et al.*, 2010). この時, クオリティーが 20 未満のものと, 配列中にシーケンスエラー (N) が含まれているものを除去した. 次に, リード数が 10 未満の配列を除去した. 同時に, 本研究で対象としている 25-45 塩基の分画に含まれる配列を抽出し (図 2, step2), 今後の解析の対象とした.

次世代シーケンサーによって読まれたリードには, 分解途中の産物やシーケンスエラーによって本来の配列と末端の塩基が異なる isoform が大量に存在していると予想される. そこで, 配列間の配列類似性によって isoform のグループ化を行った. *sssearch* (Pearson, 2000) を用いて全配列を総当たりでアライメントし, 配列間の類似性が 90%以上であるものを同一グループと見なした. なお, 本研究の全てのマッピング解析は次世代シーケンサーによって得られたリードの 3'末端がシーケンスエラーである可能性を考えて, 3'末端の 1 塩基のミスマッチは類似性の算出から除くこととした.

ヨーロッパカブトエビはゲノムが解読されていないが, expressed sequence tag (EST) や mitochondria DNA, rRNA の情報の一部が National Center of Biotechnology Information (NCBI) にて公開されている. 更に, これまでに自らクローニング, シーケンスして, ヨーロッパカブトエビの internal transcribed spacer (ITS) 領域の配列情報を得ている. そこで, 取得可能なヨーロッパカブトエビの配列情報にマッピングされたリードを除去することで, 得られた配列中に含まれる mRNA や ncRNA の分解産物を除こうと考えた. NCBI から取得した配列は計 4,553 種であり, そこに ITS の配列情報を加えた全 4554 本をマッピングの対象とした. マッピングする際はまず全リード (図 2, step2) をクエリーとして BLAST (*blastn*) によるローカルアライメントを行い, リファレンス配列に 90%以上あたっているリードを除いた. この時に 90%に達しなかったリードについてはリファレンスのマッピング部位の上流・下流, 50 bp を含む配列と共に ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) によるアライメントを実行し, 90%以上マッピングされたものを更に除去した (図 2, step 3). マッピングされたものを除く際には, isoform のグループ情報参照し, そのリードの isoform も同時に除くことで配列数の絞り込みを行った.

これより以降は機能性 small RNA 配列候補を絞るために, グループ化した isoform の中から最もリード数の高いものを代表配列として解析に用いた.

#### 2.2.4 他種の ncRNA との配列類似性の解析

次に, これまでに選別した small RNA 候補の性状解析を行うため, 他種で同定されている ncRNA との配列の類似性を調べた (図 2, step 4). 近年, 様々な ncRNA から由来した small RNA が遺伝子制御を行っていることが報告され (Röther and Meister, 2011), 配列の類似性を元に抽出した ncRNA の断片候補が機能性 small RNA である可能性がある. 更に, pre-miRNA と類似した配列は pre-miRNA から mature miRNA へのプロセッシングの過程で生成された miRNA の isoform である

可能性が高い。本研究では miRNA とは異なる発生に関わる small RNA を見つけることが一つの目的でもあるため、miRNA の isoform を区別するという意味でもこの解析は有用である。

解析においてリファレンス配列とした既知の ncRNA のデータは functional RNA database 3.0 より取得した (Mituyama *et al.*, 2009)。取得した配列は合計 510,055 本であり、内訳は、piRNA が 166,373 本、tRNA が 28,482 本、rRNA が 26,524 本、precursor miRNA が 4,610 本、mature miRNA が 2241 本、snoRNA が 4,984 本、snRNA が 3,951 本、その他の RNA は 272,890 本であった。研究ではこれらを既知の ncRNA として扱った。その後、*sssearch* (Pearson, 2000) を用いて、全リードを既知の ncRNA に対してアライメントした。85%の類似性を持つものを本研究における”既知の ncRNA と類似性のある配列”と見なし、85%未満のものは”類似性のない配列”と見なした。また、fRNAdB によって登録されている Sequence Ontology (SO) を指標として small RNA をアライメントされた RNA 種によって分類した。この時、small RNA が複数のリファレンスにアライメントされた場合は、1) 配列の類似率が最も高いものを選択する、2) 最も多くアライメントされていた SO (アライメントされた数をその SO で登録されている RNA の総数で割った値が高いもの) を選択する、という 2 つの基準によって、カブトエビ small RNA に類似している ncRNA を決定した。

また、tRNA に類似した配列の特徴解析として、アライメントされた tRNA 配列から二次構造を予測し、small RNA がアライメントされた部分が tRNA の二次構造のどの部分で切断された可能性があるのかを調べた。tRNA の二次構造予測には tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) を用い、データセットの生物種が真核生物のみにとどまらないことから、general tRNA model を使用して予測を行った。

## 2.2.5 発現パターン解析

small RNA の発現パターンを予想するために、正規化したリード数を用いて変動パターンの可視化を行った (図 2, step 5)。各発生段階で得られたリード数を配列情報に信頼性のある配列数 (step 1) で割った数値を正規化した値とした。正規化したリード数を全発生段階での正規化したリード数の合計値で割ることで、各ステージにおけるリードが全体に占める値を算出した。この値の変動を Cluster 3.0 (de Hoon *et al.*, 2004) によるクラスタリング後に、JAVA Tree view (de Hoon *et al.*, 2004) でヒートマップを作成することで可視化した。なお、Cluster 3.0 のクラスタリングは Average 法を用いた。

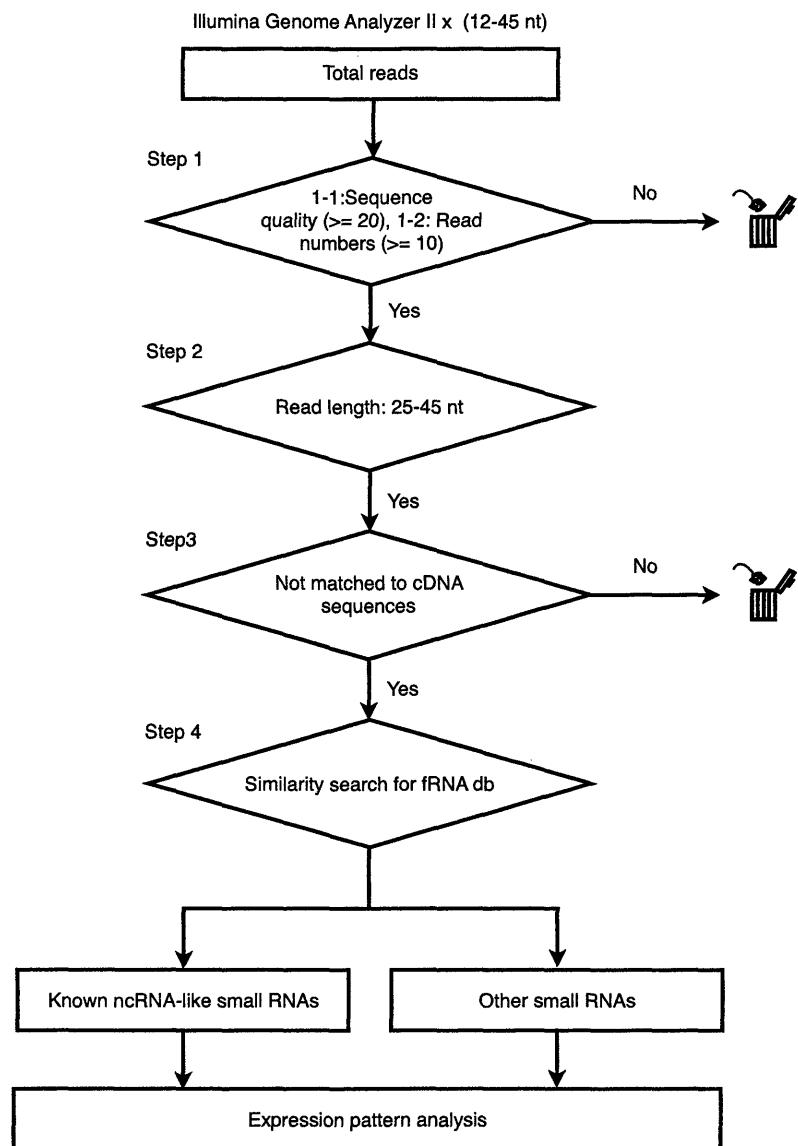


図 2: 次世代シーケンサーのデータ解析のフローチャート

Step 1-1 にてクオリティーの低いもの (< 20), 1-2 にてリード数の少ないもの (< 10) を除去することで信頼性のある配列を抽出し, Step 2 では 25-45 nt のみを選別した. その後, Step 3 では isoform のグループ化と cDNA にあたる配列を含むグループを除去して, 残ったグループの代表配列をその後の解析に用いた. Step 4 で既知の ncRNA に配列が類似しているか否かによって配列の特徴を分類し, step 5 ではそれぞれにおいてリード数を元にした発現パターン解析を行った.

## 2.2 遺伝子録による遺伝子導入法の検討

### 2.2.1 GFP 発現ベクターの構築

ほ乳類細胞での発現ベクターである phrGFP vector (Agilent Technologies 社) を鋳型に, hrGFP 遺伝子を PCR にて増幅した. この時に用いた Forward, Reverse プライマーはそれぞれに *Eco*RI サイトと *Xho*I サイトを含むように設計した (表 1). その後, SUPREC<sup>TM</sup>-02 (TaKaRa 社) にて PCR 産物を精製した.

また, hrGFP を組み込む発現ベクターには pAc5.1 / V5-His A (Invitrogen 社) を採用した. このベクターは *Drosophila* のアクチンプロモーターが組み込まれた, 恒常的なタンパク質発現ベクターであり, プロモータ下流に複数の制限酵素サイトが存在する.

hrGFP 遺伝子を pAc5.1 / V5-His A ベクターに組み込むために, *Eco*RI と *Xho*I にて hrGFP の PCR 産物と pAc5.1 / V5-His A ベクターの制限酵素処理を行った. 両サンプルを 1% Agarose gel で電気泳動し, 目的の産物が含まれると予想されるバンドをゲルから切り出して GFX column (GE Healthcare 社) を用いてゲルから DNA を精製した. 次に, Ligation Kit Ver.2 solution I (TaKaRa 社) と二つの精製産物を混合することで双方をライゲーションし, hrGFP を組み込んだ発現ベクターを構築した. この hrGFP 発現ベクターを大腸菌コンピテントセルである, DH5 $\alpha$  株 (TaKaRa 社) にトランスフォーメーションし, 培養した. その後, QIAprep MiniPrep Kit (QIAGEN 社) にてプラスミド DNA を精製し, *Eco*RI と *Xho*I を用いた制限酵素処理と ABI3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) によるインサートの確認を行った. 最後に, 遺伝子導入に用いるサンプルを大量に取得するために, hrGFP が挿入されていることが確認されたプラスミドと pAc5.1 / V5-His A ベクターをそれぞれ DH5 $\alpha$  株にトランスフォーメーション, 培養し, QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した. 構築したベクターの全体図を図 3 に示す.

表 1: hrGFP 遺伝子増幅に用いたプライマー配列

Forward プライマーの太字で記された塩基は *Eco*RI, Reverse プライマーの太字部分は *Xho*I 認識サイトを示している。制限酵素認識サイトより下流が hrGFP 遺伝子にアニールする部位に相当する。

プライマーの種類	プライマー配列
Forward	5'- CGCGAATT <big>A</big> TGAGCAAGCAGATCCTGAA -3'
Reverse	5'- ATACTCGAGTTACACCCACTCGTGCAGGCTGC -3'

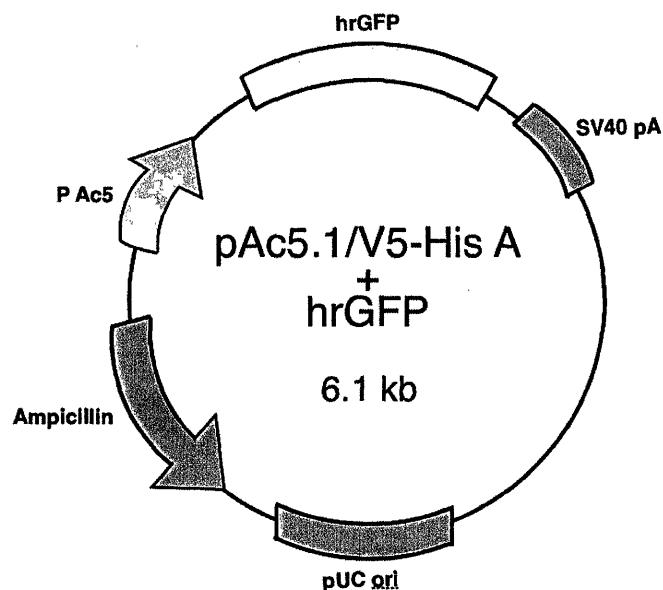


図 3: hrGFP 発現ベクターの構築

phrGFP vector より hrGFP 遺伝子をクローニングし, pAc5.1 / V5-His A ベクターとライゲーションを行った. hrGFP の上流には *Drosophila* 由来のアクチンプロモーターが存在する.

### 2.2.2 *Drosophila S2* 細胞の培養と継代

構築したベクターを導入することによって GFP 蛍光を観察することができるのかを検証するために, *Drosophila Schneider 2 (S2)* 細胞 (Invitrogen 社) を用いた. *Drosophila S2* 細胞は *Drosophila melanogaster* の胚の初代培養から由來した培養細胞株であり (Schneider, 1972), CO<sub>2</sub> を必要とせず, R.T. で培養が可能である.

培地は Schneider's *Drosophila* Medium (SD medium, Invitrogen 社) とウシの血清である, Heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen 社) を 10% FBS になるように混合し, フィルタ一滅菌したものを使用した. 液体窒素下で凍結していた *Drosophila S2* 細胞は 37°C でライセートを半分程度融解した上でフラスコ中の培地に広げた. その後は, 80% コンフルエンスになるタイミング (約 2~3 日の間隔) で継代を行った. 継代の 2 回目以降は SD medium+10% FBS に静菌性抗生素である Penicillin/Streptomycin を全体の 0.5% になるように加えた培地で培養を行った. また, 継代時には血球計算盤を用いて細胞数を測定した. この時, 細胞を Trypan Blue Strain 0.4% (GIMBO 社) で染色することで, 生細胞のみのカウントを可能にした. 細胞数が 0.5~5.0×10<sup>6</sup> 個/ml になるまで R.T. で培養を行った.

### 2.2.3 Cellfectin 試薬を用いた *Drosophila S2* 細胞へのトランスフェクション

まず始めに, 構築したベクター由来の GFP の発現を *Drosophila S2* 細胞で確認するため, Cellfectin II Reagent (Invitrogen 社) を用いたトランスフェクションを行った. Cellfectin 試薬は陽イオン性の脂質分子で, Cellfectin と DNA を混合し DNA 脂質複合体を形成することによって DNA が細胞へ取り込まれやすくなる. また, Cellfectin 試薬は昆虫細胞へのトランスフェクションに広範的に用いられている.

導入対象である *Drosophila S2* 細胞は 3.0×10<sup>6</sup> 個/ml に培養された状態で 6 well plate に分注した. 導入するプラスミドは 3.2.1 で構築した GFP 発現ベクターと, コントロールとして hrGFP 遺伝子が組み込まれていない pAc5.1 / V5-His A ベクターを用意した. トランスフェクションは Cellfectin II Reagent のプロトコルを参照し, プラスミドと Cellfectin の混合物 (DNA 脂質複合体) を静かに培地にかけ, R.T. で 5 時間インキュベートした. その後, SD medium+10% FBS を加えて, R.T. で培養を続けた. この時点を 0 時間として, 24 時間, 48 時間, 72 時間後に細胞を 50 ml とて, Axiovert 200 にて GFP 蛍光を観察した.

#### 2.2.4 遺伝子銃を用いた *Drosophila S2* 細胞へのトランスフェクション

遺伝子銃はパーディクルガンとも呼ばれ、金粒子の周りに DNA コーティングしたサンプルをヘリウムの圧力を用いて対象に遺伝子を導入することができる装置である。遺伝子銃による遺伝子導入は、エレクトロポレーションなどによる遺伝子導入が難しいとされる、植物への遺伝子導入の例が多い一方で、動物や微生物への応用も期待されている。*Drosophila S2* 細胞に遺伝子銃を用いて遺伝子導入した例は報告されていないため、カブトエビを対象とした実験を行う前にまずは遺伝子銃を用いた *Drosophila S2* 細胞へのトランスフェクションにおいても Cellfectin 試薬利用時と同様の GFP 蛍光が観察されるかを検証した。

導入対象である *Drosophila S2* 細胞は  $3.1 \times 10^6$  個/ml に培養された状態で 35 mm plate に分注した。導入するプラスミドは 2.2.3 と同様に GFP 発現ベクターとコントロールベクターを用いた。遺伝子銃は IDERA GIE-III (株式会社 タナカ) を使用した (図 4)。まず、金粒子 1.0 mm (BIORAD) は 100% EtOH 存在下で超音波破碎したものを用意し、サンプルとコントロールベクターを 20% PEG6000/2.5 M NaCl と共に混合した。その後、20 分以上氷冷し、スピンドラウンして上清を除き 100% EtOH を加えて、打ち込み用の DNA 溶液を作成した。遺伝子銃による遺伝子導入はヘリウム噴出時間を 0.025、ヘリウム圧を 0.343 MPa、チャンバー内の減圧度を -82.6 kPa に設定し、培養細胞のまかれたプレートを設置するステージは 4 段目にセットした。以上の条件で作成した DNA 溶液を導入し、導入後に SD medium+10% FBS+0.5% Penicillin/Streptomycin を加えて R.T. で培養した。この時点を 0 時間として、48 時間、72 時間後に細胞を 50 ml とて、Axiovert 200 にて GFP 蛍光を観察した。

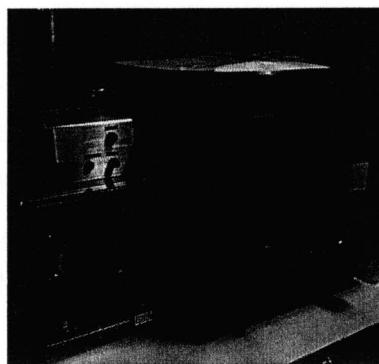


図 4: 遺伝子銃 IDERA GIE-III

## 第3章 結果と議論

### 3.1 情報学的解析による新規 small RNA 候補の抽出

#### 3.1.1 次世代シーケンサーによって出力された配列情報のプロファイル

次世代シーケンサーによって出力された配列は卵で約 1,580 万リード, 1 令は 340 万リード, 2 令は 480 万リード, 3 令は 570 万リード, 4 令は 440 万リード, 成体は 1,250 万リードで, 合計すると 4,660 万リードであった (表 2). クオリティーが 20 未満, リード数が 10 未満のものを除いた後に, 全発生段階の配列情報の塩基長の分布傾向を見た (付録 2). どのステージでも傾向はほぼ同じで, 全リード数に着目すると 22 塩基と 26-27 塩基にピークが見られ, 配列種では 27 塩基のものが多かった. 22 塩基の配列は miRNA 分画に相当し, 他の真核生物と同様にカブトエビにおいても様々な miRNA が存在する可能性がある. 更に, 26-27 塩基の配列は既知の知見によると piRNA 分画に相当する. 前述した通り, piRNA は生殖細胞特異的に発現していることが知られているが (M. C. Siomi *et al.*, 2011), 近年, piRNA 様の small RNA が体細胞組織においても発現している例が報告されたため (Yan *et al.*, 2011), 本解析で対象している 26-27 塩基の配列中にも piRNA が存在し得るかもしれない. カブトエビは環境によって單一生殖と有性生殖を使い分けているため, どのような piRNA を有しているのか, 非常に興味深い. また, 26-27 塩基の配列はリード数が多いだけでなく, 配列種も多く存在するため (付録 2), piRNA のようにクラスターから様々な配列が由来している small RNA もしくは mRNA や ncRNA の断片が存在することによって配列種がバラエティーに富んでいる可能性がある.

その後, スクリーニングの過程を経て, 各発生段階において 1~2 万の配列種に絞ることができ, 全ステージでは 68,459 種の配列に絞ることができた (表 2). これは全体の 0.8% にあたり, 全リード数は全体の 17.1% にあたる 7,966,706 本となった (表 2). これらを対象とし, 既知の ncRNA の配列類似性解析と発現パターン解析を行った.

表 2: 次世代シーケンサーで得られた配列のスクリーニングにおける配列数

A: Number of all reads

	Egg	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>nd</sup> instar	3 <sup>rd</sup> instar	4 <sup>th</sup> instar	Adult
All	15,781,859	3,420,862	4,760,840	5,743,096	4,413,933	12,489,894
Step 1-1	15,433,168 (97.8%)	3,406,457 (99.6%)	4,739,531 (99.6%)	5,724,859 (99.7%)	4,398,923 (99.7%)	12,212,555 (97.8%)
Step 1-2	10,064,308 (63.8%)	1,818,632 (53.2%)	2,652,443 (55.7%)	3,495,159 (60.9%)	2,579,915 (58.4%)	9,040,728 (72.4%)
Step 2	6,502,668 (41.2%)	1,464,803 (42.8%)	1,479,616 (31.0%)	2,185,833 (38.0%)	1,468,899 (33.3%)	5,712,481 (45.7%)
Step 3	1,574,140 (10.0%)	650,701 (19.0%)	693,162 (14.6%)	880,046 (15.3%)	598,209 (13.6%)	1,884,202 (15.1%)
Total				7,966,706 (17.1 %)		

B: Number of unique reads

	Egg	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>nd</sup> instar	3 <sup>rd</sup> instar	4 <sup>th</sup> instar	Adult
All	3,879,337	1,075,510	1,420,038	1,520,162	1,267,942	2,179,420
Step 1-1	3,658,274 (94.3%)	1,069,714 (99.5%)	1,410,975 (99.4%)	1,512,797 (99.5%)	1,262,513 (99.6%)	2,059,230 (94.5%)
Step 1-2	163,103 (4.2%)	36,676 (3.4%)	50,400 (3.5%)	52,458 (3.4%)	39,529 (3.1%)	87,348 (4.0%)
Step 2	117,721 (3.0%)	32,887 (3.1%)	39,031 (2.7%)	45,589 (3.0%)	31,039 (2.4%)	68,603 (3.1%)
Step 3	28,400 (0.7%)	13,672 (1.3%)	15,433 (1.1%)	17,441 (1.1%)	11,247 (0.9%)	21,435 (1.0%)
Total				68,459 (0.8%)		

### 3.1.2 様々な ncRNA の断片が存在する可能性とその特徴

信頼性の高いリードとして抽出した 68,459 種の配列を fRNAdb に登録されている約 50 万本の ncRNA に対してアライメントした。この時、85%以上配列の類似性があったものを ncRNA の断片である可能性のある small RNA (以下、ncRNA-like fragment もしくは ncRNA-like small RNA と呼ぶ) と見なしたところ、2200 種が既知の ncRNA と類似性のある配列として分類された。これは全体の 3.3%にあたる (図 5 A)。また、リード数の総和は全体の 20.2%を占めていた (図 5 B)。更に、small RNA がアライメントされたリファレンス配列の RNA 種を分類した結果、tRNA が 26%の 575 本、rRNA がおよそ 17%の 365 本、pre-miRNA がおよそ 3%の 58 本であった。また、25-45 塩基の分画に含まれる代表的な RNA である piRNA は約 1%の 19 本であり、全体の半数はその他の long ncRNA にあたるものだった (図 5 C)。

スクリーニングによって抽出された配列のうち、ncRNA に類似性のあった small RNA 数は少なかったが (図 5 B)、その中には比較的リード数が高いものが存在していた。これらの中から全ステージでの正規化されたリード数が高いもの 50 種を抽出すると、ほとんどが tRNA-like fragment であった (表 3)。tRNA はタンパク質合成に必要な分子であるため、生体内の total RNA の中でも非常に存在量が多く、そのために分解産物も大量に存在すると考えられる。rRNA も tRNA と同じように翻訳系に必須の分子であるため、存在量が多い。しかし本解析ではヨーロッパカブトエビの 5.8S、18S、28S rRNA にマップされるリードを除去しているために (図 2、step 3)、5S rRNA の断片候補が抽出されたものだと考えられる。

また、その他にも pre-miRNA の存在が確認された (表 3)。この中には、*Ixodes scapularis* の pre-miR-96 に類似している *tcf-66825* や *Bombyx mori*, *Daphnia Duplex*, *Drosophila melanogaster* の pre-miR-263a に類似している *tcf-1726* がリード数の多い配列として含まれていた。これらは成熟した miR-96 や miR-263a の 3'末端に 3~4 塩基が付加された配列であり、更に pre-miRNA に類似したカブトエビ small RNA の塩基長の分布を見てみてみると 25 塩基長のものが非常に多いことから (図 5 D)、これらは mature miRNA の isoform である可能性が高い。miRNA 配列は種間で高く保存されていることが知られていることからも precursor miRNA 中で mature miRNA の領域を含む配列と類似していたカブトエビ small RNA は miRNA の isoform であると考えられる。

一方でカブトエビ small RNA の中で piRNA に類似した small RNA (既知の知見による piRNA の塩基長を考慮すると分解産物である可能性は低いので piRNA-like small RNA と呼ぶ) は 19 本と非常に数が少なかった (図 5 B)。そもそもは乳類では piRNA が生成されるクラスターが生物種間で保存されているものの、配列ごとの保存性は低いことが報告されており (Girard *et al.*, 2006), piRNA に類似した配列が少なかった原因の一つと考えられる。よってカブトエビの piRNA-like fragment が piRNA であるかは未知であるが、piRNA は本研究の対象とした 25-45 塩基に含まれる既知の small RNA の代表格として今後着目していきたいと考えている。

近年の研究成果では、遺伝子発現制御を行う small RNA は miRNA のように primary miRNA (pri-miRNA) として転写された後にプロセッシングの過程を経て機能するものばかりでなく、成熟した ncRNA から切り出されて生成されるものが多数存在することが報告されており (Ender *et al.*, 2008; Röther and Meister, 2011), ncRNA の断片の生成過程やその機能性は非常に興味深い。特に tRNA fragment に関する情報は近年次々に明らかとなっている。tRNA はその三次構造の特徴からアンチコドンループで切断されやすく、更に、ストレス環境下では mature tRNA のアンチコドンループが切断が促進され、5' tRNA fragment と 3' tRNA fragment が生成されやすいことが知られている (D. M. Thompson and Parker, 2009)。その他にもストレス環境下で活性化する Angiogenin というリボヌクレアーゼが tRNA を分断化し、生成された 5' tRNA fragment がキャップ結合複合体である eIF4G に作用することにより翻訳制御を行っていることや (Ivanov *et al.*, 2011)，細胞増殖に関する 19-22 塩基の tRNA fragment は mature tRNA の 5'末端、3'末端や、pre-tRNA の 3'末端から生成されて機能していることが報告されている (Y. S. Lee *et al.*, 2009)。また、tRNA 由来の 20 塩基程度の fragment は一度アンチコドン部分で切断された後に、D ループや T ループで再度切断を受けて生成される可能性も示唆されているが (Sobala and Hutvagner, 2011)，既知の機能性 tRNA fragment の一般的な傾向は明らかになっていない。

本研究において発見された tRNA-like fragment の特徴についても解析してみると、まず tRNA-like fragment は pre-miRNA-like fragment のように特定の塩基長の small RNA がアライメントされている傾向は見られず、様々な塩基長の断片が存在していることがわかった (図 5 D)。これは一見、fragment の一般的傾向が明らかとなっていないという既知の知見と合致する結果のように感じられるが、一方でカブトエビの tRNA-like fragment がアライメントされた部位を調べてみると、mature tRNA の 5'末端から由来した可能性のある small RNA が最も多いことがわかった (図 6)。これは構造面からすると最も切断されやすいアンチコドンループで切断された断片が意外にも少ないと興味深い結果であり、これに関しては 3 つの側面から考察することが可能である。ひとつは、"生体内では実際にアンチコドンで切断される断片が多いが、次世代シーケンサーの配列解析には本来の様相が反映されていない可能性がある"という観点である。tRNA は生体内で様々な修飾を受けることが知られているために断片化された tRNA もその修飾が残っていると予想される。もしもアンチコドンで切断された断片や 3'末端から由来した断片がクローニングされにくい、もしくはシーケンスされにくい特徴を有しているなら、それに起因した結果だと考えられる。2 つ目は、"tRNA fragment は mature tRNA の様々な部位から切り取られている"という可能性から見た側面である。既知の知見では tRNA fragment の塩基長や切断部位は様々であり、本研究で発見された tRNA-like fragment も 5'末端から D-stem と Anticodon-stem の部分で切断されるものは他に比べて多いが (図 6)，塩基長の特徴はなかった (図 6 D)。これらをふまえると、mature tRNA はアンチコドン部分で切断されやすいとしても、その後に再度プロセッシングされて短い断

片が生成されている可能性がある。短い断片が生成される意義として機能性 small RNA の生成が関与しているならば非常に面白く、5'末端から由来したと考えられるカブトエビ fragment が生成される生物学的意味の解明も望まれる。最後に、”真核生物における tRNA の 3'末端への CCA の付加を考慮する必要性”が挙げられる。真核生物では pre-tRNA からリーダー配列が切断された後に 3'末端に CCA が付加することによって mature tRNA が生成されることが知られている (Sobala and Hutvagner, 2011)。それゆえに真核生物のゲノム中には mature tRNA の 3'末端にあたる CCA はコードされておらず、fRNAdb に登録されている真核生物の tRNA 遺伝子の 3'末端にも CCA は存在していない。本解析では類似性の評価を 85% としているが、カブトエビ small RNA の 3'末端の CCA がアライメントされないことによって類似率が低下し tRNA-like fragment として抽出されなかつた small RNA が存在する可能性がある。よって、その点を考慮して解析を行うことで tRNA の切断についてより深い議論を行うことが今後の課題である。

以上のように ncRNA と類似した配列中には ncRNA の断片と miRNA に代表される 25 塩基よりも短い small RNA の isoform が存在している可能性があることがわかり、更に tRNA と類似した配列に関してはそのアライメント部位から複雑な生成過程が考察された。tRNA fragment 以外にも様々な生物種において rRNA (D. M. Thompson and Parker, 2009) や snoRNA 由来の断片の存在も確認されており (Smalheiser *et al.*, 2011)，本研究においてもその候補配列が見つかった。これらの知見から、カブトエビにおいて発見された ncRNA-like fragment に着目する意義は大きいと考えられ、特に ncRNA の中でも種間で配列が高く保存されている tRNA や rRNA と類似しているカブトエビ small RNA はアライメントされた RNA 種から由来した可能性が高いことが予想される。そこで本研究では発生時期特異的に働く機能性 ncRNA-like fragment の候補として、他種の tRNA, rRNA に類似した small RNA、そして 25-30 塩基長の small RNA として代表的な piRNA に類似した small RNA に焦点を絞って発現パターンの解析を行うこととした。また、pre-miRNA 類似配列は前述した通り、プロセッシング過程で生成された miRNA の isoform を含む可能性が高いと考えられるため、機能性 small RNA 候補からは除外した。

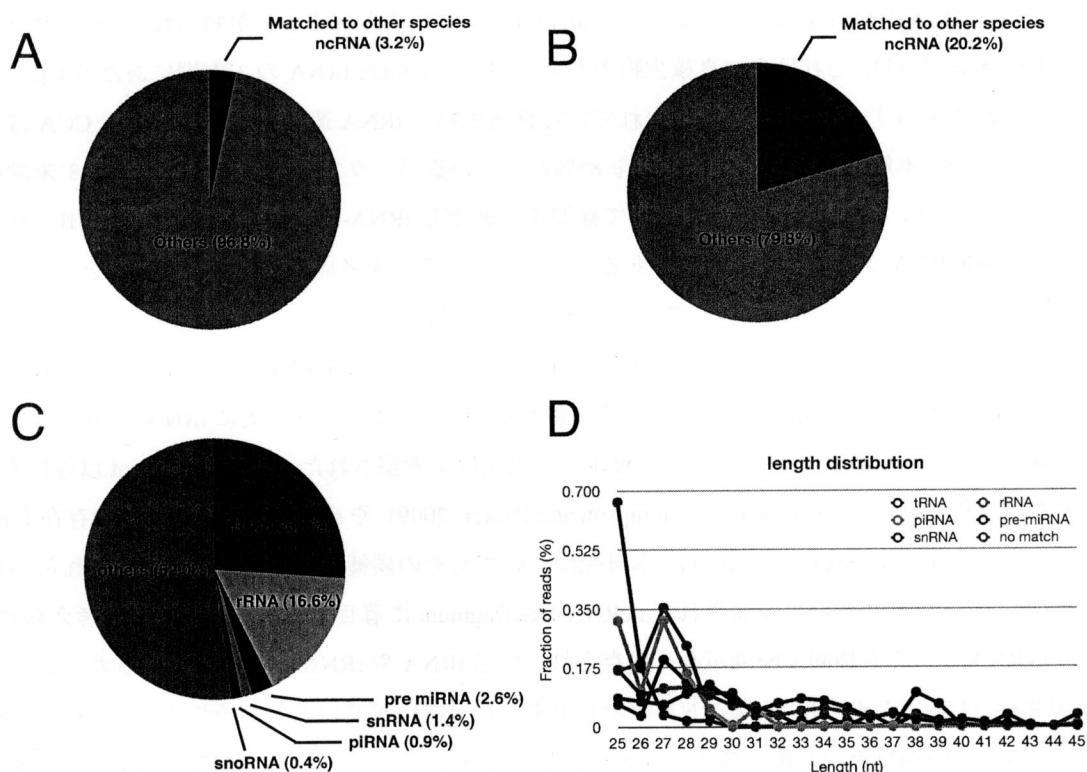


図 5: 他種で同定された ncRNA と類似性の高い small RNA のプロファイル

既知の ncRNA と配列の類似性があったカブトエビ small RNA の数 (A) とそのリード数 (B) が全体に示す割合を円グラフで表した. C:他種の ncRNA と類似性があったカブトエビ small RNA の RNA の種類による分類. "others" には tRNAdb に登録されている long ncRNA 等が含まれている. D: RNA のタイプ別にカブトエビ small RNA の長さと存在量の分布を表した. 存在量は各 RNA 種ごとに発見された small RNA の総数によって正規化した値をプロットした.

表 3: 既知の ncRNA と類似した配列の正規化された総リード数上位 50 種

eq	f	all RN	en					im	ty	To	rm	Hz
			CI	RN	KI	)	(%)					
ref-31363	TCGGGTATGGCTAGTGGTAGGATA	26	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				96.15	168290	0.033794		
ref-8707	GCATCGA TTCAGTGTAGAATGCTGGCTGC	34	tRNA	Eucarya (Nematoda, Arthropoda)				96	60299	0.014814		
ref-8706	GCATCGA TGGTTCACTGGCTCGCT	32	tRNA	Eucarya (Nematoda, Arthropoda)				100255		0.014240		
ref-8659	GCACGTGTAGTCAATGGTAGAATTCT	27	tRNA	Eucarya (Chordata)				88.89	130909	0.013872		
ref-8660	GCACGTGTAGTCAATGGTAGAATTCTCG	29	tRNA	Eucarya (Chordata)				89.66	157860	0.012940		
ref-31010	TCCCATATTGCTTAGTGGTAGGATATC	28	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				100.00	152657	0.012423		
ref-9269	GGCTGTGGTCTAGGGGTATGATT	25	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	46271	0.010793		
ref-8691	GCACGTGTGGCTAGTGGTAGAAGCT	25	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	35830	0.007272		
ref-4227	CACCGGGAGACCGGGGTCTGATTCCCGTCGGGAGCCA	40	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				90.00	30338	0.007057		
ref-8661	GCACGTGTAGTCAATGGTAGAATTCTCGCT	35	tRNA	Eucarya (Chordata)				88.57	40725	0.004675		
ref-8789	GCGCTGTAGCTAGTGGTAGAGCATGAGACTC	34	tRNA	Eucarya (Chordata)				100.00	24723	0.004238		
ref-9678	GTCACCGGGAGACCGGGGTCTGATTCCCGTCGGGAGCCA	42	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				90.48	15969	0.004085		
ref-31590	TCCTCGATAATAGTGGTAGTATCCC	28	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				96.43	40150	0.003465		
ref-8751	GCGCGCTAGCTAGTGGTAGAGCATGAGACTC	34	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	32295	0.003381		
ref-58274	TTCTCGAGACATTCTCTTCAACTT	27	group I intron	Eucarya (Magnoliophyta)				85.19	13225	0.002825		
ref-31591	TCCTCGATAGTATAGTGGTAGTATCCCC	29	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				96.55	31433	0.002772		
ref-8750	GCCCCGCTAGCTAGTGGTAGAGCATGAG	30	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	14446	0.002691		
ref-8869	GCGGGAGACCGGGGTCTGATTCCCGTCGGGAGCCA	37	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				89.19	31740	0.002636		
ref-9527	GGTTTATGGTAAATGGTAGCAGACTG	29	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	11544	0.002409		
ref-8825	GCGATGTGGTATAGTGGTAGATGGATG	30	tRNA	Eucarya (Chordata)				90.00	15227	0.002238		
ref-31592	TCCTCGATAGTATAGTGGTAGTATCCCC	32	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				96.88	17584	0.002014		
ref-9368	GGGGGTGTAGCTAAATGGTAGAGC	25	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Magnoliophyta)				96.00	8292	0.001745		
ref-7933	GACGAGGTGGCCAGTGGTAAGCTTGGATTGC	35	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				94.29	7279	0.001732		
ref-9270	GCGCTGTGGCTAGGGTAGATCTC	28	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				100.00	8243	0.001646		
ref-4172	CACCAAGAGGGCTGGGTGATCCCGGTATGGGAACCA	40	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				90.00	6769	0.001613		
ref-31593	TCCCTCGATAGTATGTGGTAGTATCCCC	33	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				96.97	15292	0.001446		
ref-9360	GGGGCTGTAGCTAGTGGTAGAGCACC	29	tRNA	Bacteria, Eukarya (Euglenozoa)				96.55	19313	0.001284		
ref-8776	GCCGTGATCGTCACTGGTAGGACCT	28	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				100.00	10489	0.001177		
ref-7932	GACGAGGTGGCCAGTGGTAAGCTTGGATTG	33	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				93.94	5630	0.001140		
ref-8824	GCGATGTGGTATAGTGGTAGCATGGA	28	tRNA	Eucarya (Chordata)				92.59	9358	0.001058		
ref-31066	TCCCTGATAGCTAGTGGTAGAGCGGAGACT	33	tRNA	Bacteria				100.00	13312	0.001026		
ref-66825	TTTGGCACTAGCACATTTTGTGTT	25	pre-miRNA	Eucarya (Chordata)				92.00	4460	0.001010		
ref-8026	GACTGCGGATCAGAAGATTCCAGGTTGGCTCTGGCAGG	40	tRNA	Eucarya (Arthropoda, Chordata)				95.00	3545	0.000916		
ref-42828	TGATATCTCGAACGGGTTCTG	26	tRNA	Eucarya (Ascomycota)				88.00	3986	0.000892		
ref-9290	GGCTTGTAGCTAGTGGTAGACCTCTG	32	pre-miRNA	Eucarya (Chlorophyta)				87.50	4916	0.000890		
ref-39236	TGAAACACAGTGGTGTATCTG	25	miRNA	Eucarya (Arthropoda)				100.00	5321	0.000876		
ref-3757	ATTGAGGGCTGGGGTATCCCAACTTCT	30	tRNA	Eucarya (Chordata, Magnoliophyta, Marchantiophyta)				86.67	4089	0.000859		
ref-8027	GACTGCGGATCAGAAGATTCCAGGTTGGCTCTGGCAGG	41	tRNA	Eucarya (Chordata)				95.12	2755	0.000803		
ref-9429	GGTCCTTGTAGTTAATGGTACGACTT	29	tRNA	Eucarya (Chordata)				96.55	4016	0.000763		
ref-8752	GCCCCGTTAGCTCAGTGGTAGAGC	25	tRNA	Eucarya (Nematoda, Chordata)				100.00	4125	0.000746		
ref-6682	CGTGATCGCTAGTGGTAGGACCT	26	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				100.00	8304	0.000717		
ref-7900	GACCTGTGGCTTAATGGATAAGGGCTCG	29	tRNA	Eucarya (Arthropoda)				96.55	3744	0.000681		
ref-8864	GCGGGCTGTAGCTCAGCTGGATAGAGTCTTGGC	33	tRNA	Bacteria				96.97	9217	0.000605		
ref-5922	CGATAAGGGCTGGGGTATATCCCACTTCT	32	tRNA	Eucarya (Magnoliophyta)				93.75	2476	0.000581		
ref-6106	CGCGGGCGGGCCGGGTTCTGTTCCCGCTGAT	32	tRNA	Eucarya (Nematoda)				96.88	2285	0.000561		
ref-9367	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCACTGACTGC	34	tRNA	Eucarya (Nematoda, Arthropoda, Chordata)				97.06	2352	0.000499		
ref-9769	GTGATCGTCTAGTGGTAGACCT	25	mature transcript	Eucarya (Arthropoda)				100.00	2849	0.000492		
ref-1726	AATGGCACTGGAAGAACTCACGGGT	25	pre-miRNA	Eucarya (Arthropoda)				100.00	2271	0.000443		
ref-9366	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCACTGACTG	33	tRNA	Eucarya (Nematoda, Arthropoda, Chordata)				96.97	2422	0.000436		
ref-8865	GCGGGCTGTAGCTCAGCTGGATAGAGTCTGGCT	34	tRNA	Bacteria				97.06	5765	0.000402		

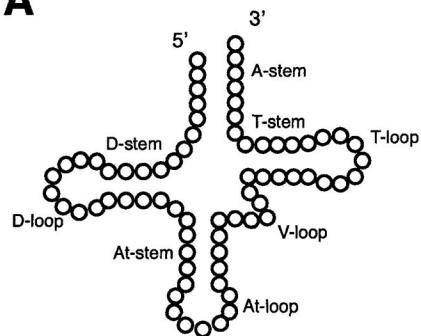
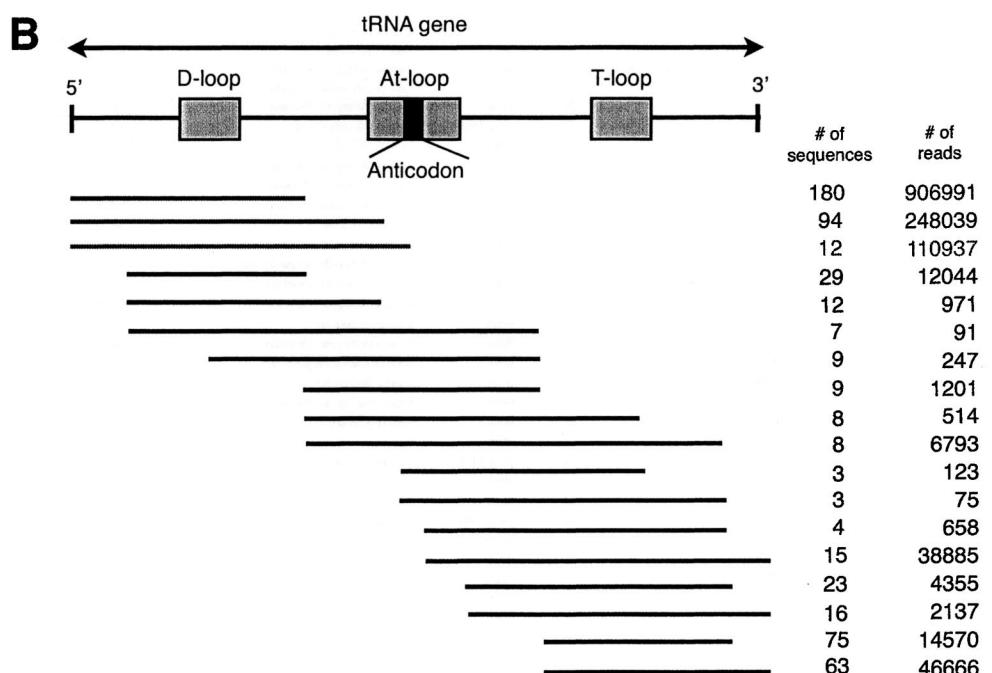
**A****B**

図 6: tRNA-like fragment がアライメントされた部位とその数

A: tRNA の二次構造と各ステムループの名称をまとめた。B: 上部に mature tRNA が二次構造をとった際のループ部位とアンチコドン部位を一次配列の模式として表した。下部に small RNA がアライメントされたパターンを線にて表し、右にアライメントされた配列数とそのリード数の合計値を記した。全てのパターンの中から、最もリード数が多いものを赤、2 番目を青、3 番目を黄緑で表現した。なお、図には 2 本以上の配列がアライメントされた部位のみを表記している。

### 3.1.3 ncRNA-like fragment の発現パターンの変化

本研究の目的である発生時期特異的な機能性 small RNA 候補を得るために、3.1.2において分類した ncRNA-like fragment の発現パターンの解析を行った。その結果、興味深いことに多くの ncRNA-like fragment が発生時期特異的に発現変動している可能性が示唆された。

まず、tRNA-like fragment の正規化されたリード数が高い上位 50 種の中には 1 ステージで特異的に発現するもの、複数のステージで連続的に発現しているもの、複数のステージで断続的に発現しているもの、が存在していた（図 7）。例えば、*tcf-8707* は幼生の 1 令の特異的、最も発現量の高い *tcf-31363* はカブトエビ幼生の 2-4 令に特異的に発現する分子である可能性が示唆された。更に、rRNA-like fragment のうち総リード数の多いもの 50 種、piRNA-like small RNA についてはアライメントされた全てのカブトエビ small RNA について発現パターンを見てみると、時期特異的な発現が示唆される small RNA が存在していた（付録 3）。piRNA-like small RNA に着目すると卵と成体期にリード数が高い配列が半分以上を占めていた（付録 3）。piRNA は生殖系列で高発現していることが知られているため、産卵可能な状態の成体や孵化前の卵に発現している可能性が考えられる。

以上の結果より、カブトエビの様々な ncRNA-like fragment/small RNA が発生時期特異的に発現している可能性があることがわかった。線虫において ncRNA fragment の数が老化と共に増大することが明らかとなっているが、発生段階でどのような機能を有しているのかは報告されておらず（Kato *et al.*, 2011），非常に興味深い知見である。また、先に説明した *tcf-8707* は *Bombyx mori* や *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* の tRNA<sup>Gly</sup> の 5'末端からアンチコドンの 2 塩基目にあたる 34 塩基まで配列が類似した断片であり、*tcf-31363* は *Bombyx mori* の tRNA<sup>Glu</sup> の 5'末端から D-loop と Anticodon-loop の間にあたる 26 塩基まで配列が類似しているように、どちらも 5'末端由来の fragment であった。更に、*tcf-8661* はアンチコドンで切断されている fragment であり、幼生の 1 令と成体特異的に発現する small RNA 候補である（図 7）。これらに代表される mature tRNA のアンチコドンで切断された 5'末端由来の fragment や D-loop から Anticodon-loop にかけて切断された 5'末端由来の fragment は先行研究においても翻訳制御を行う例が報告されていることから、有力な機能性 small RNA 候補と言えると考えられる。今後はカブトエビ tRNA の cDNA ライブライマーの構築とシーケンシングによる配列決定も行いカブトエビ tRNA の配列情報と照らし合わせることで、信頼性の高い議論を行いたいと考えている。

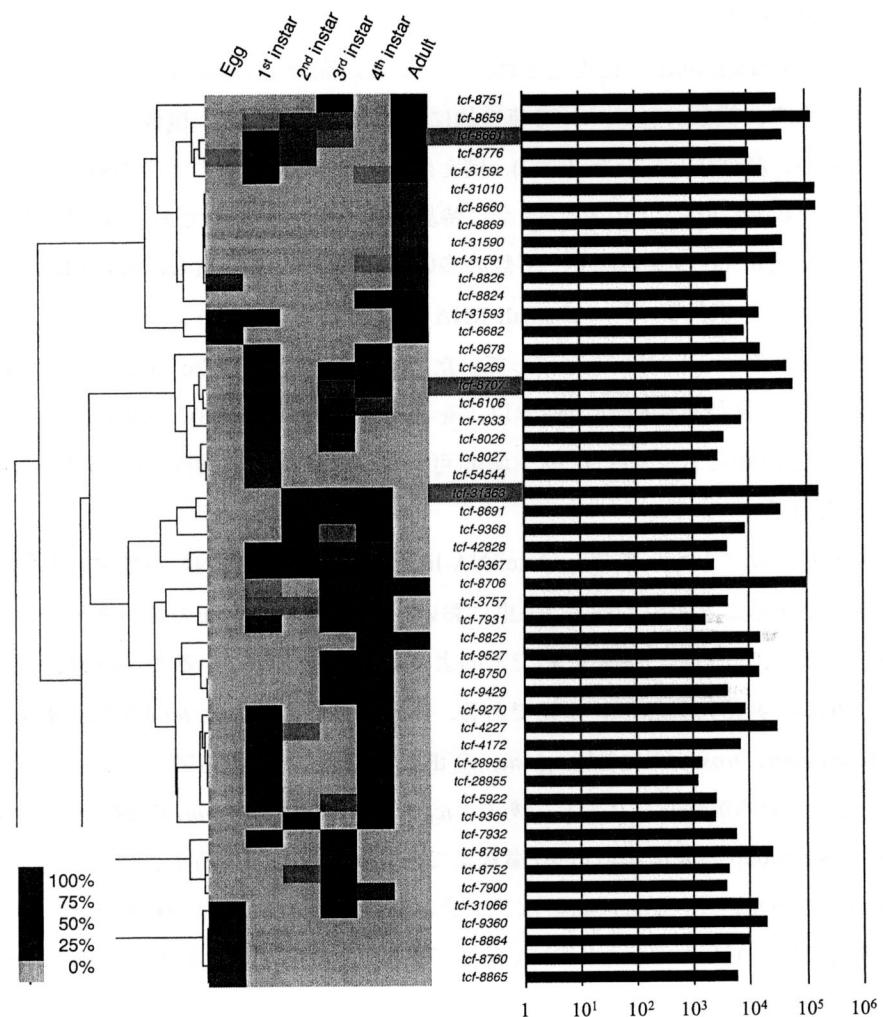


図 7: tRNA-like fragment の発現プロファイル

tRNA-like fragment の中から、正規化されたリード数上位 50 種の発現パターンをヒートマップにて表した。左から卵、幼生 1-4 令、生体のサンプルを示しており、縦に small RNA 種の名称を記した。右側には各 small RNA のリード数をプロットした。3.1.3において考察した *tcf-31363* と *tcf-8707* については濃い灰色のマーカーで塗られている。

### 3.1.4 発生時期特異的に働く機能性 small RNA 候補の抽出

ここまで ncRNA-like fragment に着目してきたが、既知の ncRNA に類似していない配列も本研究において対象とすべき分子である。piRNA のように種間での保存性が低い small RNA や他種では発現レベルが低いことによって、これまで発見にはいたらなかった small RNA が存在し得るためである。また、この中には mRNA の分解産物も大量に含まれていると考えられるが、2011 年にヒトにおいて protein coding gene やイントロン、mRNA の 3' UTR から由來した small RNA が RNAiにおいて遺伝子発現制御を行う中心的存在である Argonaute (AGO) タンパク質と相互作用していることが発見され (Valen *et al.*, 2011)，mRNA から由來した RNA の中に機能性の small RNA が存在すれば非常に興味深い。以上の背景から、既知の ncRNA と配列の類似性の低い small RNA についても 3.1.3 と同様の発現パターン解析を行い、発生時期特異的に発現する small RNA の存在を議論しようと試みた。

既知の ncRNA と配列類似性の低い small RNA は 66,259 種存在するが、その中で正規化されたリード数上位 100 種の発現パターンを観察した (図 8)。その結果、既知の ncRNA と類似性の低いカブトエビ small RNA の中にも 1 つのステージで高い発現を示すもの、複数のステージで連続的に発現するもの、複数のステージで断続的に発現するものが存在していた。一方で ncRNA-like fragment よりも 1 つのステージで高いリード数を有するものが比較的少ない傾向にあり、幼生期に恒常に発現しているものが多かった (図 8)。ここで、各 small RNA 配列において 1 つのステージで総リード数の 90% のリード数を占めているものを ”1 ステージ特異的に発現する small RNA 候補” と定義すると、既知の ncRNA と配列類似性の低い small RNA のうち、約 52% の 34,657 種が 1 ステージで特異的に発現する small RNA 候補であった。この中で全ステージでの合計リード数が 100 リード以上のものを抽出すると、その数は 687 種 (約 1%) と非常に少なかった。tRNA-like fragment においては約 69% にあたる 396 種が 1 ステージで特異的に発現する small RNA 候補であり、その中で 100 リード以上のものは 64 種 (約 11%) であることからしても、リード数の高い既知の ncRNA と類似性の低い small RNA の中には 1 ステージ特異的に発現する small RNA 候補が少ない傾向にあると考えられる。

これまでの結果をふまえると ncRNA-like fragment と既知の ncRNA と類似性の低い small RNA の中にはカブトエビの発生期間内で様々な発現パターンを有することがわかった (図 7, 8)。本研究では発生時期特異的に発現する small RNA がカブトエビの発生、特に形態や組織の形成に関与していると仮説をたてており、1 ステージで特異的に発現している small RNA の中にはそのステージにおける特徴的な形態変化や組織形成に関わっているものが存在する可能性がある。そこで、1 ステージで特異的に発現している small RNA 配列を RT-PCR やノザンプロット法による small RNA の発現確認、遺伝子導入による small RNA の機能推定をするための一候補にすることとした。ここでは tRNA-like fragment と piRNA-like small RNA、既知の ncRNA と類似性のない small RNA

に対して、ある 1 ステージでのリード数が全リード数の 90%以上を占めるものを ”1 ステージ特異的に発現する small RNA 候補” とし、その中でも 1,000 リード以上のものを抽出して表 4 にまとめた。なお、類似性解析にはリファレンス配列としてバクテリアの ncRNA 情報も使用しており、バクテリアの ncRNA にアライメントされたものはカブトエビの腸内細菌やコンタミネーションである可能性が高いとして機能性 small RNA 候補からは除いた。よって、tRNA-like fragment と piRNA-like small RNA に関しては真核生物の tRNA, piRNA にアライメントされたもののみを信頼性のある候補とした。その結果、1,000 リード以上の候補の中には卵で高発現をしているものが最も多く、成体特異的に発現している可能性のあるものが次に多いことがわかった（表 4）。また、tRNA-like fragment が mature tRNA から由来した部位も様々であり、5'末端由来のものを 4 種、3' 末端由来のものを 3 種含んでいた（表 4）。

カブトエビの卵は乾燥耐性を持っており、次世代シーケンサーで解析したサンプルも産卵後に乾燥させて保存している卵であった。カブトエビの卵は産卵後に胚発生が進行し後期原腸胚になった時の水や酸素量によって孵化するか乾燥状態で休眠するかが決定されると言われている。乾燥状態の卵において small RNA の発現制御が行われているかは非常に興味深いポイントであり、卵のステージ特異的な small RNA の発現量を減少させた際に卵の孵化率が変化するかを調べてみたい。また、本研究において定義している成体とは産卵可能になった個体を指しており、成体で高発現を示す small RNA は生殖系列の発達に関連するものである可能性がある。幼生 1-4 令で特異的に発現する small RNA も眼や尾の形成や体長の増加に関わっていれば非常に面白く、抽出した候補配列の発現確認と次に述べる遺伝子錠を用いた目的配列の knockdown/overexpression による機能の検証が今後の課題となる。

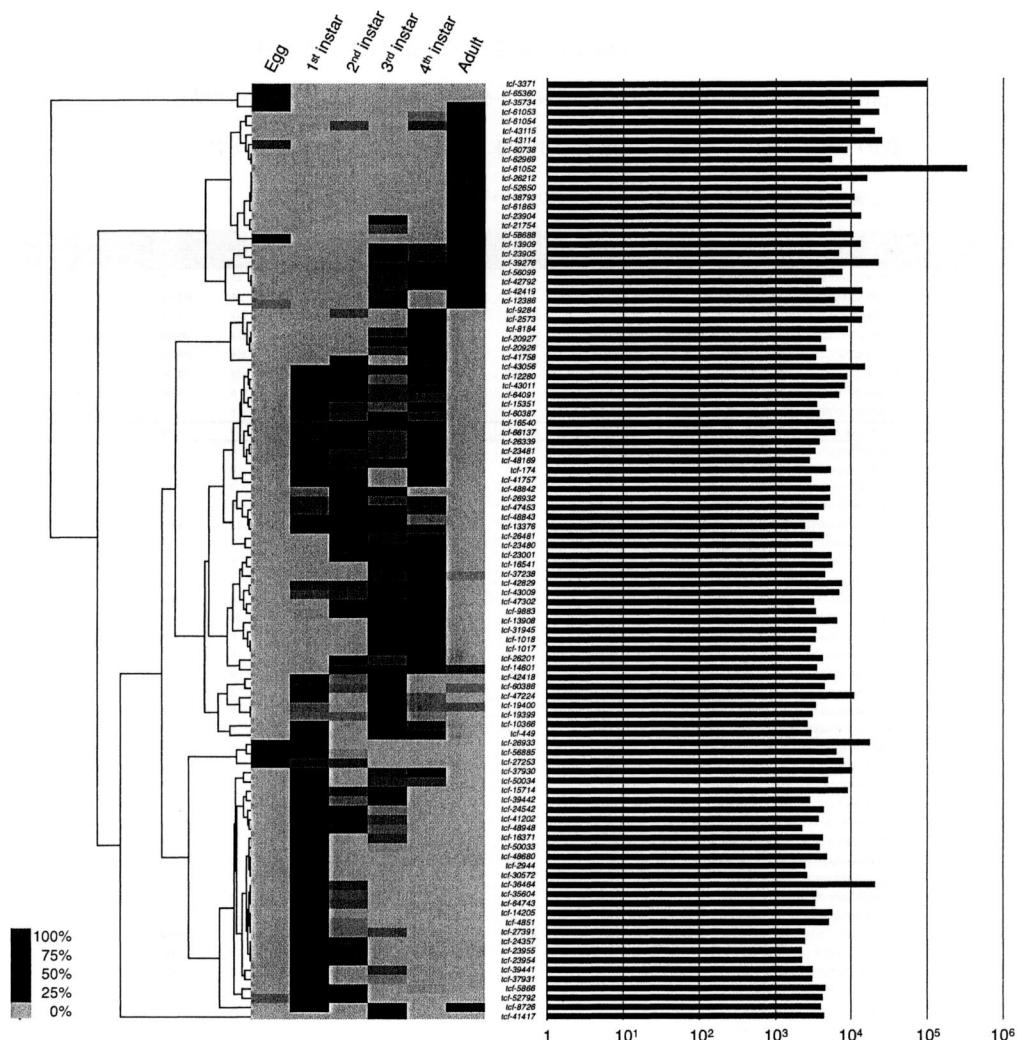


図 8: 既知の ncRNA との類似性のない small RNA の発現プロファイル

既知の ncRNA と類似性のない small RNA の中から、正規化されたリード数上位 50 種の発現パターンをヒートマップにて表した。図の説明は図 7 と同様。

表 4: 1 ステージで特異的に発現する small RNA の候補

tRNA-like fragment と piRNA-like small RNA, 既知の ncRNA と類似性の低い small RNA の中から 1 ステージで全ステージの合計リード数の 90%以上を占め, 総リード数が 1,000 リード以上のものをリストにした. それぞれの small RNA につき, 最も発現量が高いと予想されるステージのリード数を太字で記している.

Category	Sample	Sequence	Length	Number of Reads	1' End	3' End	Median	SD	IRNA alignment position
tRNA-like fragment	tcf-8027	GACTGCGGATCAGAAAGATCCAGGTTCGGCTCTGGCAGGC	0	2696	0	36	23	0	D/At-stem A-stem
	tcf-8660	GCACCGTGTAGTCATCTGGAAATTCTCG	4547	69	124	662	0	152458	5' end D/At-stem
	tcf-8789	GCCCTGGCTAGCTCAGTCGAGAGCATGAGACTC	128	165	142	23927	243	1118	5' end At-loop
	tcf-8869	GCGCGAGACCGGGATCCCCGTCGGGGAGCCA	371	47	34	61	158	31069	V-loop/T-stem 3' end
	tcf-31010	TCCCTCGATTTGTCAGTGGTAAAGGATATC	11389	16	36	904	176	140136	5' end D/At-stem
	tcf-31590	TCCCTCGAGTAGTATACTGGTGTAGTATCCC	702	216	111	99	828	38194	5' end D/At-stem
	tcf-36913	TCTAAAGGTCCTCGATCCCCGGTTTCGGCACCA	20	0	0	0	0	2748	V-loop/T-stem 3' end
	tcf-54544	TTAACATCTAGGGTGTGGGTCGGGGCCACCGTGGGGCCA	0	1124	0	0	0	0	anticodon 3' end
piRNA-like small RNA	tcf-5424	CCGGCCTGGGACACCGGGGTGCTTGTGGCTT	58	0	0	0	0	1075	-
Others	tcf-168	AAACGATCTACTAAGTGTGGGACT	1483	0	0	0	0	0	-
	tcf-1274	AAAGCCGCTGAGTTGCACTCCAGGGCAACCA	0	0	0	0	0	1457	-
	tcf-1290	AAAGCCGCTTGAAGAAAATCTGGAAAG	1925	0	0	0	0	19	-
	tcf-1877	ACACCGATGTTGAAACCGGTATCATCTTGCCT	2050	0	0	0	0	0	-
	tcf-2962	AGGGGTCCGGAGTTCTGATCTCTGTGCGGGCACCA	246	0	0	0	18	2887	-
	tcf-3371	ATCGGAAGTGGTTCAGAAAAGCCT	98410	0	0	0	13	35	-
	tcf-3386	ATCGTAGTCCGGATTTGTAATCTGCACTCGACTA	2280	0	0	0	0	0	-
	tcf-3464	ATGAGATATACAGAACCTAACGAGCAC	1537	0	16	0	0	36	-
	tcf-3651	ATGTTCTGTGAAAGAAAAAACTTAACTGAGGCTT	226	0	0	0	0	3476	-
	tcf-4094	CAATAAACAGTGTAAAGAAATGCGATT	351	0	0	0	14	3419	-
	tcf-4782	CAGGCAAACTGACTCTCTGTTAAATAACCT	104	0	0	0	0	1770	-
	tcf-5078	CATCGATGGGCCCCGGGTTGATCTCCGGGACACCA	1152	0	0	0	0	0	-
	tcf-5146	CATGTAACAAAAGGTAAGACT	1278	0	0	0	0	0	-
	tcf-5497	CCGGATAGCCGGTGTATTGGCAGC	64	0	0	0	0	1970	-
	tcf-5570	CCTAAGOTAGCGAAATTCTTGTGGGT	2113	0	0	0	0	0	-
	tcf-6239	CGACGACAAAACCGGGTCTGATCCCGTACGGGCTACC	4033	0	0	0	0	0	-
	tcf-6589	COTAAATGGTGGAAACCTAAGGGAGACTGCC	4792	0	0	0	0	58	-
	tcf-7331	CTGTTGGATATGTTGTTGCAAGCT	1068	0	0	0	0	0	-
	tcf-7476	CTTGTATGGCGGAAATTGTAATGTTAGG	5028	0	0	0	0	0	-
	tcf-8568	GATGTCGGCTCATCACATCTGGGGCT	1695	0	0	13	0	0	-
	tcf-8664	GCACCTGGAGGACCAACCCACTAAT	1649	0	0	0	0	0	-
	tcf-8937	GCTCGGTGCGAACCTCGAACGGTGGCT	0	0	0	0	0	1674	-
	tcf-8999	GOAAGAAAACGCGTGAACCTTAAACAGCTT	1092	0	0	0	0	0	-
	tcf-9399	GTACGAAAAGTAGGACATAGTGTGATCC	3605	0	0	0	0	0	-
	tcf-10589	TAACATGAAAGGTTGATCTGGCT	1698	0	0	0	0	0	-
	tcf-11778	TAACCCATGACACGGGCTCAGAAAACCT	89	10	0	0	0	2483	-
	tcf-14997	TAATTCCGTCCTGACACCTTGTAAATG	168	0	0	0	0	1668	-
	tcf-19663	TAGACCGAGTCGTAGTAAGCTGGCT	179	0	0	0	0	1422	-
	tcf-23937	TAGTAGTTCTCTCACTGACTGAGA	61	0	0	0	0	1019	-
	tcf-24265	TAGTCGCTGGTTAGAACAAATATGCC	241	0	0	18	13	3723	-
	tcf-24567	TAGTTCCAATTTCGGCACTACGGGTT	43	0	0	1098	29	0	-
	tcf-23375	TATCGAAATCTGGGTATGCACTACAAA	34	0	30	70	1014	25	-
	tcf-26212	TATGTAAAACCTTCTACGTACCCGATA	1129	0	10	10	0	14791	-
	tcf-27196	TATGTAATGCCAAGGAAAATCTGACT	944	0	0	0	0	66	-
	tcf-28801	TCACTCGAATCTAAATTCTATTGTCCT	153	0	0	0	0	1409	-
	tcf-33903	TCGGAATATTCCCACTGGCTAGGCCACT	15	0	22	0	11	1229	-
	tcf-33202	TCGGCTTGGCTCTCTGGCACT	1032	0	0	0	0	70	-
	tcf-40591	TGACGATGAGTCCACCATGAAACGCC	77	0	16	19	16	2196	-
	tcf-42932	TGATCAAACCGCGGGTAAATAGCGCCT	28	0	0	0	14	1080	-
	tcf-45916	TGGCTGATCTGCCAACGAATTCAA	286	18	12	10	15	4353	-
	tcf-52043	TGTGTCGACCTCTCGGGACTGATA	1144	0	0	0	0	0	-
	tcf-52650	TGTATAGTGTCTACGGCCCATCCAAAG	16	0	0	75	26	7148	-
	tcf-60565	TGGAATGAGTTGTTCTCAGTGTGCGC	13	0	0	1111	30	45	-
	tcf-61316	TGGAACCGGAAACGAAATTGAGATGTC	69	0	0	0	0	1588	-
	tcf-64348	TGTTAATTAAAGAAGACTTTTGCT	76	0	0	0	0	1401	-
	tcf-65360	TTAAATAGTAAACCGGTTGGAAACTCC	22826	0	0	0	0	0	-

## 3.2 遺伝子銃による GFP 発現ベクターの導入

### 3.2.1 Cellfectin による GFP 発現ベクターの導入

Cellfectin II Reagent によって GFP 発現ベクターを *Drosophila* S2 細胞にトランスフェクションした。Cellfectin は昆虫細胞のトランスフェクションに広く用いられている上に、導入したベクターのプロモーターは *Drosophila melanogaster* 由来のものを使用しているため、構築したベクターで GFP が発現するかどうかを確認するためには有用な実験である。

導入後に細胞を観察した結果、Cellfetin と混合したプラスミドを培養細胞にまいてから 24 時間後はコントロールを導入した細胞と GFP 発現ベクターを導入した細胞とでは差が見られなかつたが、48 時間後以降に GFP 発現ベクター導入細胞では GFP 用励起光を照射した時に依存して緑色の蛍光が観察された。更に、72 時間後では蛍光を発する細胞がより鮮明に観察できるようになつた (図 9 A, 付録 4A)。48 時間、72 時間後のどちらの結果においてもコントロールベクター導入株では蛍光は観察されなかつた (図 9 A, 付録 4A)。

以上より、本研究において構築した GFP 発現ベクターが *Drosophila* 細胞内で発現し、GFP 用励起光依存的な緑色蛍光を発することが確かめられた。

### 3.2.2 遺伝子銃による *Drosophila* S2 細胞への DNA 導入法の確立

これまでに行った Cellfectin による遺伝子導入は昆虫細胞に対して一般的に用いられる手法であるが、*Drosophila* S2 細胞に遺伝子銃を使用して遺伝子導入を行つた実験例はない。そこで、遺伝子銃による DNA 導入が可能かどうかを *Drosophila* S2 細胞において検証した。打ち込んだベクターは 3.2.1 で使用したものと同様のものであるため、遺伝子銃を用いて細胞内にベクターが運びこまれれば GFP 用励起光依存的な蛍光が見られるはずである。

その結果、48 時間、72 時間後の GFP 発現ベクター導入株では共に、Cellfectin 利用時と同様の GFP 蛍光が観察された (図 9 B, 付録 4B)。また、コントロールベクター導入株では緑色蛍光は見られなかつた (図 9 B, 付録 4B)。なお、既に Cellfectin を使用してベクターを導入した細胞において、導入後 24 時間では蛍光が観察されなかつたために、24 時間後には観察を行わなかつた。

一方で、72 時間後のサンプルを Cellfectin 利用時のものと比較してみると、遺伝子銃を用いて遺伝子導入した株の方が蛍光を発する細胞数が少ないように見て取れた (図 9)。ここから、遺伝子銃を用いた遺伝子導入の効率は Cellfectin 試薬によるものよりも低い可能性が考えられる。予想される原因として、遺伝子銃での導入は、1) DNA が行き渡る範囲が狭いこと、2) 導入対象に適した条件を確立が必要であること、が挙げられる。Cellfectin は DNA 脂質複合体を細胞にかけた後に培地を静かに揺らして混合することで、導入したい DNA を多くの細胞に行き渡らせることが可能である。しかし、遺伝子銃を用いると DNA 溶液を噴射した瞬間の培養液中の細胞の位置

取りによって DNA が導入されない細胞も出てくるため、Cellfectin を用いたサンプルよりもベクターが導入された細胞自体が少なかった可能性がある。また、遺伝子銃を用いた実験例はまだ少ないために、対象に見合った遺伝子導入時のヘリウム噴出時間、ヘリウム圧、チャンバー内の圧力やステージの位置の条件を探索することが必要である。よって、条件を最適化することができれば、結果として今回の結果よりも GFP 用励起光に依存した緑色蛍光を発する細胞が増えるのではないかと考えられる。

この実験によって、*Drosophila S2* 細胞を対象とした遺伝子銃による遺伝子導入系を確立することができた。更に今後は上述した点に留意してカブトエビに遺伝子導入を試みる必要があることがわかった。

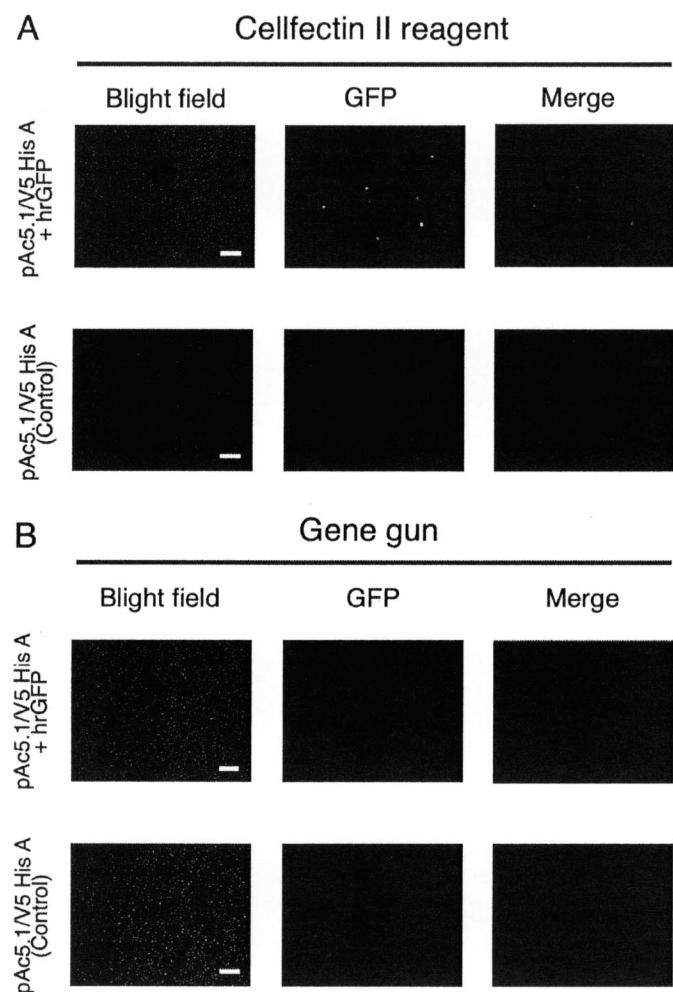


図 9: *Drosophila* S2 細胞への GFP 発現ベクターの導入

Cellfectin II Reagent (A), 遺伝子銃 (B) を用いてベクターを導入してから 72 時間後の *Drosophila* S2 細胞の顕微鏡写真 (100 $\times$ )。上段は GFP 発現ベクター、下段がコントロールベクターを導入した細胞を示している。また、"Blight field"は GFP 用励起光を照射しないもの、"GFP"は GFP 用励起光を照射したものの、"Merge"は双方を重ね合わせたものである。白いバーは 20  $\mu$ m を表している。

## 第 4 章 結論

本研究ではヨーロッパカブトエビにおいて発生時期特異的に発現する機能性 small RNA の同定を目指し、情報学的手法を用いた配列情報解析と発現パターン解析による機能性 small RNA 候補の抽出と small RNA 候補の機能解明に向けた実験系の基盤を整えた。まず、ヨーロッパカブトエビの 6 つの発生段階（卵、幼生 1-4 令、成体）における次世代シーケンサーによって取得した配列情報、約 4,700 万本のうち、25-45 塩基の配列に着目して解析を行った。配列に信頼性のあるリードの抽出や isoform のグループ化によって得られた配列種、計 68,459 本に対して他種で同定された既知の ncRNA との配列比較解析を行った結果、2,200 種の配列が既知の ncRNA と 85% 以上の配列類似性を持つものであった。この中でも tRNA に類似したカブトエビ small RNA 575 本や piRNA に類似したカブトエビ small RNA 19 本に着目すると、発生段階でリード数の変動があるものが多数存在していることがわかった。また、既知の ncRNA と類似性のない small RNA に関しても同様に発生時期によってリード数が変化しているものが存在しており、カブトエビの ncRNA-like fragment やそれ以外の small RNA が発生時期特異的に発現している可能性が示唆された。そこで、tRNA-like fragment, piRNA-like fragment, 類似性のない small RNA に特化し、1 ステージで全体の 90% 以上のリード数を有する配列 55 種を 1 ステージ特異的に発現する可能性のある small RNA として抽出し、実験学的に small RNA の発現と機能を検証する候補とした。1 ステージ特異的に発現する small RNA 候補の中には mature tRNA の 5' 末端から由來したと考えられる tRNA-like fragment が 4 種、3' 末端由来と考えられるものが 3 種存在し、既に先行研究において mature tRNA の 5' 末端や 3' 末端から由來した 20-35 塩基の fragment が翻訳制御を行っていることが報告されていることから、これらは機能性 small RNA の有力な候補であり、ncRNA の fragment が発生時期特異的な機能を有しているのかという点についても非常に興味深い結果である。

更に、small RNA の機能を推定するために用いる予定である遺伝子銃によるカブトエビへの遺伝子導入系を構築する基盤を整えるために、まずは遺伝子銃によって *Drosophila* S2 細胞に GFP 発現ベクターが導入可能かを検証した。その結果、昆虫細胞への遺伝子導入に一般的に使用される Cellfectin 試薬を用いた GFP 発現ベクターの導入時と同様に、GFP 用励起光依存的な緑色蛍光が観察され、遺伝子銃を用いた遺伝子導入に成功した。

近年の研究においては様々な ncRNA fragment の存在が確認されているが、それらが発生段階特異的に発現し、発生過程に重要な細胞プロセスの制御を行っている例は報告されておらず、本研究において発見された発生時期特異的に発現する ncRNA-like fragment の発現と機能の解明が

望まれる。更に、既知の ncRNA に類似性の少ない small RNA 候補についても mRNA の断片やカブトエビ特有の small RNA として発生時期に機能している可能性がある。これらの分子の発現と機能の解析を実験学的に検証していくことによって、small RNA と発生の関わりについての新しい議論を展開できると期待される。

## 謝辞

とても短く感じた4年間でしたが、本当に多くの人に支えて頂きながら過ごしてきました。本研究を進めるにあたり、慶應義塾大学先端生命科学研究所の金井昭夫教授には研究を全面的にサポートして頂きました。研究の方針から実験の指導をして頂くと同時に、たくさんの激励の言葉をかけて下さり、どんな時でも前向きに研究に取り組む姿勢を教えて頂きました。また、数々のあだ名付けや会話に盛り込んだギャグによって、いつも楽しませて頂きました。本当に感謝しています。アドバイザーである同大学大学院 博士課程の高根香織氏はどんな時でもお時間をとって下さり、やさしく丁寧にご指導して頂きました。私が学部3年の時にRNAグループに所属することになったのもカブトエビの研究を始めることになったのも高根さんとお話させて頂いたことがきっかけであり、スマートに物事をこなす姿をとても尊敬しています。私生活でもたくさんお世話になり、鶴岡生活がとても楽しいものになりました。技術員の野呂絵美子氏には実験の指導やカブトエビの世話を始めとして、大変お世話になりました。野呂さんのお仕事熱心な姿は本当に尊敬しています。カブトエビの世話や様々な情報を教えてくださった五十嵐敬司氏、平岡桐子氏にもとても感謝しています。これからたくさんカブトエビを育てていけるよう努力していきます。鶴岡南高校の五十嵐光氏も熱心にカブトエビの観察をしてくれてカブトエビの形態形成の面白さを共有することができました。RNAグループの方々にも大変お世話になりました。曾我朝子氏には実験のご指導を、池田幸樹氏には研究の要所要所でアドバイスを頂きました。松井求氏にはインフォマティクスの解析において基礎的な知識からご教授頂きました。わかりやすい言葉でしっかりと要点をとらえて説明して頂いたおかげで解析をスムーズに進めることができました。浜島聖文氏は隣のデスクで研究のアドバイスをして下さる同時に色々な場面で気を使って頂きました。また、車で外へ連れ出して下さったおかげで、楽しい鶴岡生活を送ることができました。この卒業論文の体裁を整えることができたのもword技術を教えてくださったおかげです。村上慎之介氏にはtRNAに関する知識をご教授頂き、感謝しております。また、SFCで過ごした2年間、アンチセンスRNAグループの首長である斎藤輪太郎氏、村田真也氏、玉木聰志氏、野崎慎氏、新土優樹氏にも大変お世話になりました。教えて頂いた様々な知識をこれからのお仕事に活かしていきたいと思います。

学部3年時に参加したバイオキャンプでは楽しい思い出がたくさん出来ました。みんなでスキーに行つたことや海で叫んでビールかけをしたこと、英語プレゼンの前日は朝までみんなセンター棟にいたこと、後輩がハロウィンパーティー兼誕生日会を開いてくれたこと、本当にたくさんのかけがえのない思い出を作ることができました。遊ぶだけではなく熱心に研究を行う同期は切

磋琢磨できる非常に貴重な存在でした。同期の長谷部百合子氏、関口いずみ氏、佐田みづき氏、下英恵氏にもらった数々のものとセンター棟で過ごした思い出はいつも心を癒してくれました。そして小川真菜氏を含むこの5人は悩みを相談できる友人たちであり、SFCに帰った時も変わらず仲良くしてくれていつも楽しい時間を送ることが出来ました。鶴岡にいる時もよく電話をくれて、その度に気持ちが明るくなりました。また、慶應義塾大学大学院 博士課程の河野暢明氏は度々飲みにつれて行って下さり、すごく楽しく、また嬉しかったです。ありがとうございました。その他にも RNA グループのメンバーである今井淳之介氏や臼居優希氏や海老敬行氏を始めとした方々と交流できたおかげで楽しい鶴岡生活を送ることができました。

また、いつも変わらぬ愛情を持って見守ってくれた父と母、姉、祖母には優しく厳しく接してくれたこと、やりたいことを自由にやらせてくれたことに心から感謝しています。

最後になりましたが、このような素晴らしい環境を与えてくださった慶應義塾大学 環境情報学部教授の富田勝氏に心よりお礼申し上げます。

## 参考文献

- Aravin,A.A., Lagos-Quintana,M., Yalcin,A., Zavolan,M., Marks,D., Snyder,B., Gaasterland,T., Meyer,J., and Tuschl,Thomas (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, **5**, 337-50.
- Bartel,David P (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-97.
- Batista,P.J., Ruby,J.G., Claycomb,J.M., Chiang,R., Fahlgren,N., Kasschau,K.D., Chaves,D.A., Gu,W., Vasale,J.J., Duan,S., *et al.* (2008) PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*. *Mol cell*, **31**, 67-78.
- Biémont,C. and Vieira,C. (2006) Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, **443**, 521-4.
- Carninci,P., Kasukawa,T., Katayama,S., Gough,J., Frith,M.C., Maeda,N., Oyama,R., Ravasi,T., Lenhard,B., Wells,C., *et al.* (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, **309**, 1559-63.
- Chapman,E.J. and Carrington,J.C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 884-96.
- Cock,P.J.A., Fields,C.J., Goto,N., Heuer,M.L., and Rice,P.M. (2010) The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res*, **38**, 1767-71.
- Crick,F.H. (1968) The origin of the genetic code. *J Mol Biol*, **38**, 367-79.
- Ender,C., Krek,A., Friedländer,M.R., Beitzinger,M., Weinmann,L., Chen,W., Pfeffer,S., Rajewsky,N., and Meister,G. (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*, **32**, 519-28.
- Esquela-Kerscher,A. and Slack,Frank J (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 259-69.
- Farazi,T.A., Juranek,S.A., and Tuschl,Thomas (2008) The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, **135**, 1201-14.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C C (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-11.
- Gilbert,W. (1986) Origin of life: The RNA world. *Nature*, **319**, 618-618.
- Girard,A., Sachidanandam,R., Hannon,G.J., and Carmell,M.A. (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, **442**, 199-202.

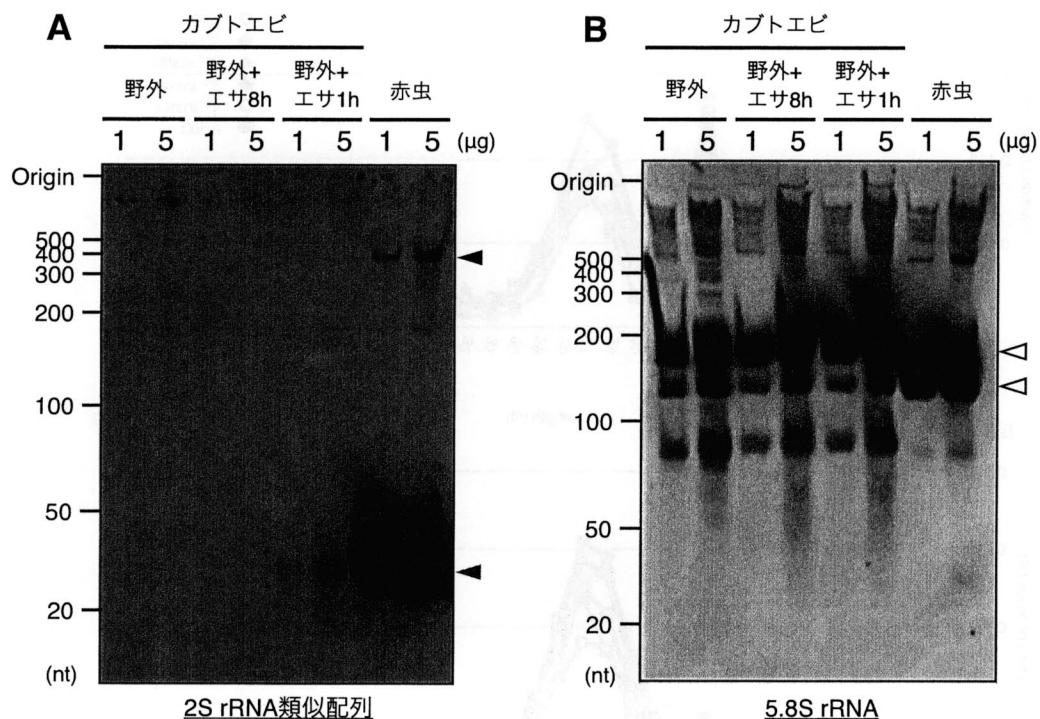
- Guerrier-Takada,C., Gardiner,K., Marsh,T., Pace,N., and Altman,S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-57.
- Han,T., Manoharan,A.P., Harkins,T.T., Bouffard,P., Fitzpatrick,C., Chu,D.S., Thierry-Mieg,D., Thierry-Mieg,J., and Kim,J.K. (2009) 26G endo-siRNAs regulate spermatogenic and zygotic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 18674-9.
- He,Lin and Hannon,G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-31.
- Heo,I., Joo,C., Cho,J., Ha,M., Han,J., and Kim,V.N. (2008) Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell*, **32**, 276-84.
- de Hoon,M.J.L., Imoto,S., Nolan,J., and Miyano,S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics*, **20**, 1453-4.
- Houwing,S., Kamminga,L.M., Berezikov,E., Cronembold,D., Girard,A., van den Elst,H., Filippov,D.V., Blaser,H., Raz,E., Moens,C.B., *et al.* (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, **129**, 69-82.
- Hutvágner,G., McLachlan,J., Pasquinelli,A.E., Bálint,E., Tuschl,T., and Zamore,P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **293**, 834-8.
- Ivanov,P., Emara,M.M., Villen,J., Gygi,S.P., and Anderson,P. (2011) Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol Cell*, **43**, 613-623.
- Jinek,M. and Doudna,J.A. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, **457**, 405-12.
- Kato,M., Chen,Xiaowei, Inukai,S., Zhao,H., and Slack,Frank J (2011) Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA*, **17**, 1804-20.
- Kim,D.H., Villeneuve,L.M., Morris,K.V., and Rossi,J.J. (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 793-7.
- Klattenhoff,C. and Theurkauf,W. (2008) Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, **135**, 3-9.
- Kruger,K., Grabowski,P.J., Zaugg,A.J., Sands,J., Gottschling,D.E., and Cech,T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, **31**, 147-57.
- Kuwabara,T., Hsieh,J., Nakashima,K., Taira,K., and Gage,F.H. (2004) A Small Modulatory dsRNA Specifies the Fate of Adult Neural Stem Cells. *Cell*, **116**, 779-793.

- Kuwabara,T., Hsieh,J., Nakashima,K., Warashina,M., Taira,K., and Gage,F.H. (2005) The NRSE smRNA specifies the fate of adult hippocampal neural stem cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, **49**, 87-8.
- Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H., Valentin,F., Wallace,I.M., Wilm,A., Lopez,R., *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-8.
- Lau,N.C., Lim,L.P., Weinstein,E.G., and Bartel,D P (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 858-62.
- Lee,R.C., Feinbaum,R.L., and Ambros,V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, **75**, 843-54.
- Lee,Y.S., Shibata,Y., Malhotra,A., and Dutta,A. (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev*, **23**, 2639-49.
- Lee,Y., Ahn,C., Han,J., Choi,H., Kim,J., Yim,J., Lee,J., Provost,P., Rådmark,O., Kim,S., *et al.* (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-9.
- Lin,H. (2007) piRNAs in the germ line. *Science*, **316**, 397.
- Lowe,T.M. and Eddy,S.R. (1997) tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 0955-964.
- Mituyama,T., Yamada,K., Hattori,E., Okida,H., Ono,Y., Terai,G., Yoshizawa,A., Komori,T., and Asai,K. (2009) The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotation of functional RNAs. *Nucleic Acids Res*, **37**, D89-92.
- Pearson, W. (2000) Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol*, **132**, 185-219.
- Piskounova,E., Viswanathan,S.R., Janas,M., LaPierre,R.J., Daley,G.Q., Sliz,P., and Gregory,R.I. (2008) Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol chem*, **283**, 21310-4.
- Reinhart,B.J., Slack,F J, Basson,M., Pasquinelli,A.E., Bettinger,J.C., Rougvie,A E, Horvitz,H.R., and Ruvkun,G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-6.
- Resnick,T.D., McCulloch,K.A., and Rougvie,Ann E (2010) miRNAs give worms the time of their lives: small RNAs and temporal control in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*, **239**, 1477-89.
- Ruby,J.G., Jan,C., Player,C., Axtell,M.J., Lee,W., Nusbaum,C., Ge,H., and Bartel,David P (2006) Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, **127**, 1193-207.

- Rybak,A., Fuchs,H., Smirnova,L., Brandt,C., Pohl,E.E., Nitsch,R., and Wulczyn,F.G. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol*, **10**, 987-93.
- Röther,S. and Meister,G. (2011) Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie*, **93**, 1915-1905.
- Saito,K., Nishida,K.M., Mori,T., Kawamura,Y., Miyoshi,K., Nagami,T., Siomi,H., and Siomi,M.C. (2006) Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome. *Genes Dev*, **20**, 2214-22.
- Schneider,I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol*, **27**, 353-65.
- Schwartz,J.C., Younger,S.T., Nguyen,N.-B., Hardy,D.B., Monia,B.P., Corey,D.R., and Janowski,B.A. (2008) Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 842-8.
- Siomi,H. and Siomi,M.C. (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, **457**, 396-404.
- Siomi,M.C., Sato,K., Pezic,D., and Aravin,A.A. (2011) PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 246-58.
- Smalheiser,N.R., Lugli,G., Thimmapuram,J., Cook,E.H., and Larson,J. (2011) Endogenous siRNAs and noncoding RNA-derived small RNAs are expressed in adult mouse hippocampus and are up-regulated in olfactory discrimination training. *RNA*, **17**, 166-81.
- Sobala,A. and Hutvagner,G. (2011) Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **2**, 853-62.
- Stefani,G. and Slack,Frank J (2008) Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 219-30.
- Sun,B.K. and Tsao,H. (2008) Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*, **59**, 725-37; quiz 738-40.
- Takane,K. and Kanai,A. (2011) Vertebrate virus-encoded microRNAs and their sequence conservation. *Jpn J Infect Dis*, **64**, 357-66.
- Thompson,D.M. and Parker,R. (2009) Stressing out over tRNA cleavage. *Cell*, **138**, 215-9.
- Tijsterman,M. and Plasterk,R.H.A. (2004) Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*, **117**, 1-3.
- Timmons,L., Court,D.L., and Fire,A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **263**, 103-12.

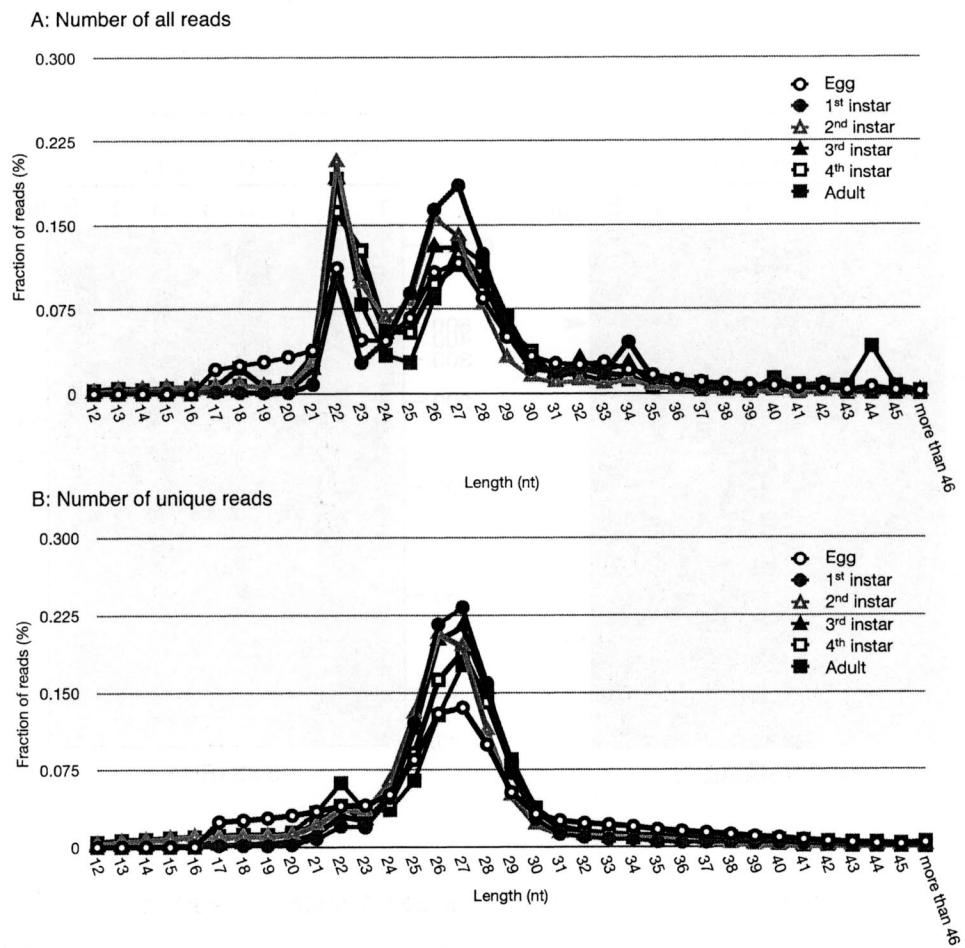
- Valen,E., Preker,P., Andersen,P.R., Zhao,X., Chen,Y., Ender,C., Dueck,A., Meister,G., Sandelin,A., and Jensen,T.H. (2011) Biogenic mechanisms and utilization of small RNAs derived from human protein-coding genes. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 1075-1082.
- Viswanathan,S.R., Daley,G.Q., and Gregory,R.I. (2008) Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*, **320**, 97-100.
- Wang,G. and Reinke,V. (2008) A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr Biol*, **18**, 861-7.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-8.
- Wienholds,E. and Plasterk,R.H.A. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, **579**, 5911-22.
- Yan,Z., Hu,H.Y., Jiang,X., Maierhofer,V., Neb,E., He,Liu, Hu,Y., Hu,H., Li,N., Chen,W., *et al.* (2011) Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Res*, **39**, 6596-6607.
- Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G., and Cullen,B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-6.
- Zhang,L., Hou,D., Chen,Xi, Li,D., Zhu,L., Zhang,Y., Li,J., Bian,Z., Liang,X., Cai,X., *et al.* (2011) Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, **22**, 107-126.
- Zhu,H., Shyh-Chang,N., Segrè,A.V., Shinoda,G., Shah,S.P., Einhorn,W.S., Takeuchi,A., Engreitz,J.M., Hagan,J.P., Kharas,M.G., *et al.* (2011) The Lin28/let-7 Axis Regulates Glucose Metabolism. *Cell*, **147**, 81-94.

## 付録



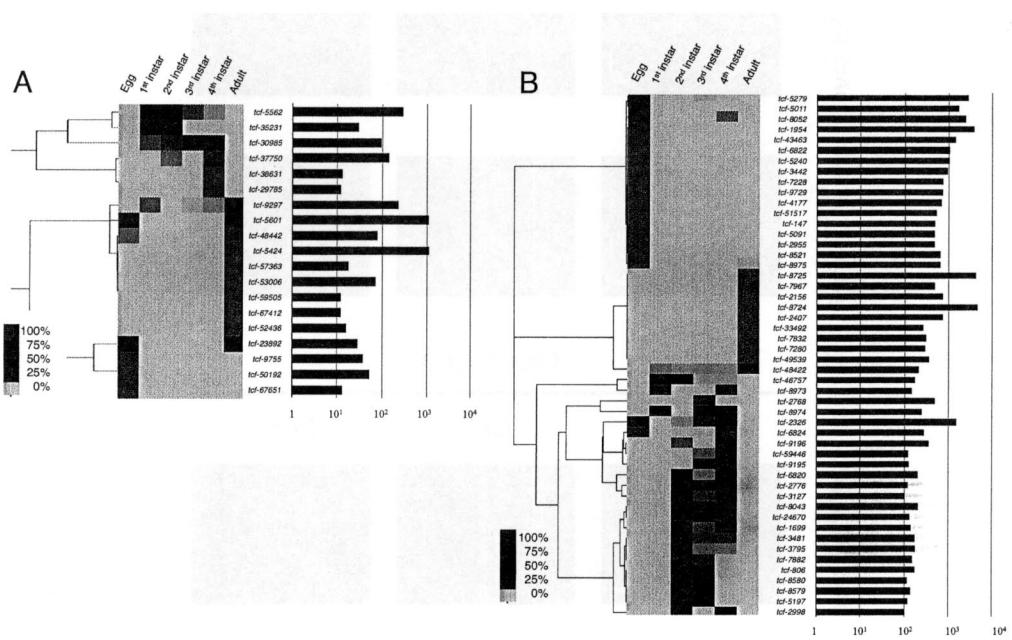
付録 1: ノザンプロット法を用いた 2S rRNA 類似配列の発現確認

A: 2S rRNA 類似配列の一部をプローブとして用いたノザンプロット解析の結果。左のレーンから、野外採取の成体、野外採取の成体にエサを与えてから 8 時間後、1 時間後の成体、エサとして与えた赤虫の total RNA を用いた結果を表している。赤のやじりは 2S rRNA と考えられる約 30 塩基のバンド、黒のやじりはその前駆体と考えられる約 400 塩基のバンドを示す。なお、2S rRNA 類似配列はエサとして赤虫を与えてから 2 時間後のサンプルを次世代シーケンサーで解析した際に得られた配列（ユスリカの 2S rRNA に 100% の配列類似性を持つ）であり、本結果からは 2S rRNA であるかを判断することができないため、類似配列と名付けている。B: 5.8S rRNA の発現確認の結果。カブトエビの internal transcribed spacer (ITS) 領域をシーケンスした際に予測された 5.8S rRNA 配列の一部をプローブとして設計した。白いやじりは生物種に応じた 5.8S rRNA 配列と予想されるそれぞれ 160 塩基、130 塩基ほどの配列をさしている。



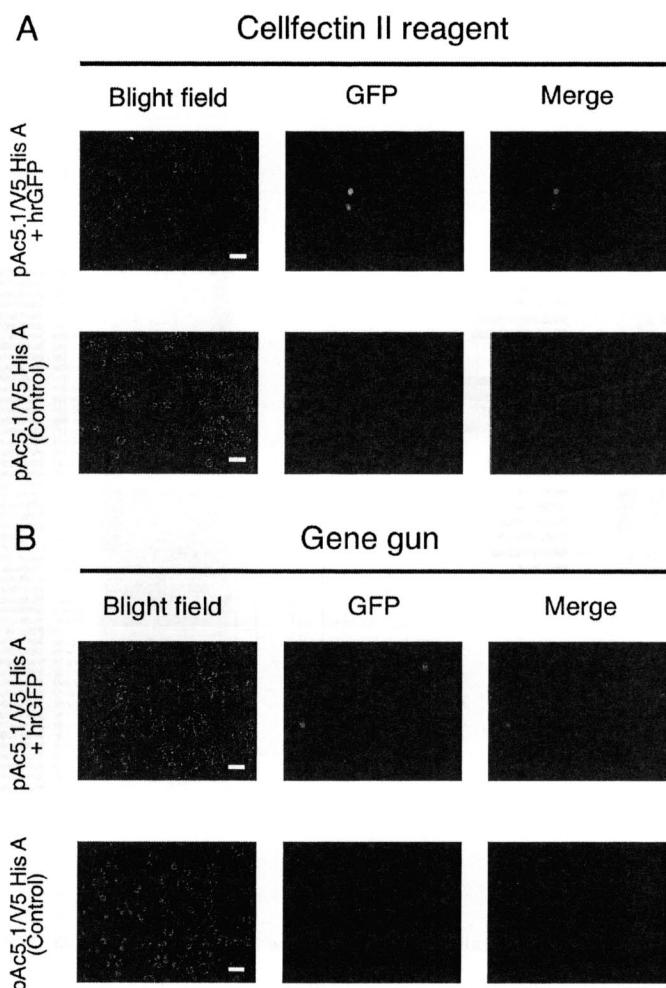
付録 2: 次世代シーケンサーによって得られた配列の塩基長の分布

全リードの総数 (A), 配列種の数 (B) を塩基配列長ごとにカウントし, 結果をグラフに表した.



付録 3: piRNA-like small RNA と rRNA-like fragment の発現プロファイル

piRNA-like small RNA (A) と rRNA-like fragment (B) の発現プロファイルをヒートマップにて表した。図の説明は図 7 と同様。なお、rRNA-like fragment は正規化された総リード数の上位 50 種のみの発現パターンを可視化している。



付録 4: *Drosophila S2* 細胞への GFP 発現ベクターの導入

Cellfectin II Reagent (A), 遺伝子銃 (B) を用いてベクターを導入してから 72 時間後の *Drosophila S2* 細胞の顕微鏡写真 (400 $\times$ )。写真的説明は図 9 と同様。白いバーは 100  $\mu$ m を示す。

ヨーロッパカブトエビにおける  
発生時期特異的な small RNA の解析

---

---

2012年3月30日 初版発行

著者 広瀬友香

監修 先端生命科学研究所 (金井・富田・曾我・板谷・内藤・佐野)

---

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会  
〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322  
TEL:0466-49-3437

---

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

---

SFC-SWP 2011-A-002

