



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	乙第1893号
学位記番号	論 第13号
氏名	孫 壺
授与年月日	平成 30 年 6 月 1 日
学位論文の題名	脊椎動物ミトコンドリア mRNA におけるポリアデニル化サイトの網羅的探索と分子進化
論文審査担当者	主査： 熊澤 慶伯 副査： 湯川 泰, 櫻井 宣彦, 大島 一彦

博士論文審査結果の要旨 ㊦

論文提出日	平成 30 年 1 月 17 日
学位試験日	平成 30 年 4 月 9 日

論文提出者	孫 焄			
博 士 論 文 審 査 結 果				
学 位 審 査 委 員	主 査	熊澤 慶伯	副 査	湯川 泰、櫻井 宣彦、大島 一彦 (長浜バイオ大学)
主論文題目	脊椎動物ミトコンドリア mRNA におけるポリアデニル化サイトの網羅的探索と分子進化			
論文審査の結果の要旨				
<p>本博士論文の提出者は、大量シーケンス技術による RNA シーケンシング (RNA-Seq) を用いて、ミトコンドリア mRNA (mt-mRNA) のポリアデニル化サイトを網羅的に同定する新しい手法を開発した。また、この手法を駆使して、脊椎動物の様々な種で mt-mRNA のポリアデニル化サイトの情報を取得して比較し、脊椎動物における mt-mRNA ポリアデニル化サイトの多様性を初めて示すとともに、その分子進化メカニズムの一端を合理的に説明する考察を行った。</p> <p>本論文では、序章においてミトコンドリア DNA (mtDNA) からの遺伝情報発現系の特徴、mRNA へのポリアデニル化の機構と機能、大量シーケンス技術の登場による近年の生物学研究の革新などについての確かな導入が行われるとともに、過去の研究成果を踏まえて本研究でどのような目標設定が行われたのかについて明確に述べられている。第二章では、ニホンカナヘビの個体を用いた実験手法や、RNA-Seq データから mt-mRNA のポリアデニル化サイトの同定と 5' 末端位置の推定を行った手法について詳細に記述されている。第三章の結果と第四章の考察では、ヒト及びニホンカナヘビを題材にして本研究で考案した手法の妥当性を示すとともに解析条件の最適化を行ったことが述べられている。また、合計 60 種の脊椎動物とナメクジウオのデータ比較をもとに、脊椎動物 mt-mRNA の構造多様性とその進化について解明した結果及び考察が秩序立てて述べられている。これに続く結論では、本研究の成果のまとめと将来への展望が簡潔に述べられている。</p> <p>本研究の主要な成果としては、1) RNA-Seq データから mt-mRNA の 3' 末端ポリアデニル化サイトを簡便かつ俯瞰的に同定する新しい手法を開発したこと、2) 脊椎動物の幅広い分類群における mt-mRNA 構造の比較を初めて行い、脊椎動物 mt-mRNA 構造の可塑性と進化のパターンを明らかにしたこと、3) mtDNA 上の遺伝子配置変動や遺伝子オーバーラップの出現、偶然の突然変異による RNA 切断酵素認識部位の出現などがポリアデニル化サイトの進化を促したとの進化メカニズムを合理的に提示したこと、などがある。</p> <p>ミトコンドリアゲノムの遺伝子構造の分子進化を研究した事例は数多く報告されているが、mRNA レベルでの構造進化を扱った報告はほとんどない。本研究には、このような研究が可能であることを示した意義に加え、mt-mRNA の構造・安定性とミトコンドリア病との関係など未知の研究課題に取り組むための研究手段を提示した意義が認められる。</p> <p>以上を総合的に審査し、提出された学位論文は、博士の学位を与えるにふさわしい内容であると判断する。</p>				

学位論文内容要旨 (1/2)

氏名	孫 壺	提出年月日	平成30年 1月 17日
主論文名	脊椎動物ミトコンドリア mRNA におけるポリアデニル化サイトの網羅的探索と分子進化		
<p>真核生物は、細胞内小器官ミトコンドリアの中に母性遺伝する約17kbpの小型環状ゲノムを持ち、このゲノムにコードされる遺伝子の発現を行うために、独自のタンパク質合成系を備えている。脊椎動物のミトコンドリアゲノムには、通常2個のrRNA遺伝子、22個のtRNA遺伝子、13個のタンパク質遺伝子がコードされる。これら37個の遺伝子および複製や転写を制御する主要非コード領域がゲノム上にコードされる配置は多くの種で保存されているが、一部の種には遺伝子配置の変動が見られる。</p> <p>これらの遺伝子の発現様式、とりわけRNAの転写やプロセッシングに関わる機構及びその進化には、未解明の点が多い。20世紀後半、ヒト培養細胞を用いて、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の遺伝子発現に関する研究が行われた。ヒトmtDNAの両鎖(軽鎖と重鎖)からの転写は、主要非コード領域内から両方向にmtDNAをほぼ一周するように進む。生成したポリシストロニックRNAは、散在する22個のtRNAの5'及び3'末端において切断を受ける。切り出されたmRNAの5'末端にはキャップ構造は付加されず、ND6以外のmRNAの3'末端には比較的短い(50塩基以下)polyA配列が付加される。しかし、同様の研究はヒト以外の動物種でほとんど行われておらず、こうした機構が脊椎動物一般においてどの程度保存されているかは分かっていない。また、ミトコンドリアRNAへのポリアデニル化の意義(RNAを安定化するのかあるいは分解するシグナルとなるのか)といった基本的な問題にもまだ結論が出ていない。</p> <p>本研究では、ニホンカナヘビを題材として、次世代シーケンスにより取得したRNAシーケンシング(RNA-Seq)データからミトコンドリアmRNA(mt-mRNA)のポリアデニル化サイトを網羅的に同定し、mt-mRNAの5'末端のおおよその位置も推定する手法を確立した。さらに、同様の手法で脊索動物の様々な系統を代表する61種(トカゲ類10種、ヘビ類4種、カメ類4種、ワニ類1種、鳥類8種、哺乳類13種、両生類12種、魚類8種及びナメクジウオ1種)のRNA-Seqデータを解析し、種間におけるポリアデニル化サイトの多様性の検出を試みるとともに、その分子進化様式についても解明を試みた。</p> <p>バイオインフォマティクス的手法で、mtDNA由来のcDNA断片からoligoAを含有するreadを同定した。それらをmtDNA上にマッピングすることで、主要なpolyA付加サイトをゲノムワイドに同定した。その結果、ほとんど全ての主要polyA付加サイトが重鎖由来の転写物上に存在することが分かった。軽鎖由来の転写物上の主要polyA付加サイトは、鳥類と有袋類のND6 mRNAの3'末端にわずかに認められたのみであった。mt-mRNAの3'末端へのpolyAの付加位</p>			

学位論文内容要旨(2/2)

氏名	孫 壺	提出年月日	平成30年 1月 17日
主論文名	脊椎動物ミトコンドリア mRNA におけるポリアデニル化サイトの網羅的探索と分子進化		
<p>置は、32種(ヒトを含む)においてはヒトと共通していた。残りの29種(トカゲ類6種、カメ類3種、ワニ類1種、鳥類8種、哺乳類4種、両生類5種、魚類1種及びナメクジウオ1種)においては、ヒトとは異なるポリアデニル化サイトが見つかった。</p> <p>例えば、ヒトND5 mRNAでは、ND5終止コドンの約600塩基下流にあるCYTB遺伝子の5'末端の位置でpolyAが付加される。ニホンカナヘビでは、終止コドンの113塩基下流に新たなポリアデニル化サイトの存在が示唆され、そのことは3'RACE法を用いた実験によって証明された。ND5 mRNAの3'非翻訳領域の大幅な短縮は、ニホンカナヘビ以外の6種でも独立に生じていることが分かった。また、鳥類と有袋類では、軽鎖由来のND6 mRNAの3'末端にpolyA付加が見られることが分かった。曲頸亜目のクリイロハコヨコクビガメでは、ATP8/ATP6 mRNAのポリアデニル化サイトが消失しており、ATP8、ATP6、CO3の3つのコード領域を含むトリシストロニックmRNAの存在が示唆された。さらに、一部の鳥類あるいはトカゲ類においては、ND1 mRNAやCYTB mRNAにおいてもポリアデニル化サイトの変化が認められた。</p> <p>これらの結果から、mt-mRNAの構造は脊椎動物の進化の過程で厳密に保存されておらず、様々に変化しうることが初めて示された。鳥類のND6 mRNAやトカゲ類のND1 mRNAの事例のように、mtDNA遺伝子配置が変化したことが原因でポリアデニル化サイトが合理的に変化したと推測できるケースもあった。また、一部の鳥類のND1 mRNAやクリイロハコヨコクビガメのATP8/ATP6/CO3 mRNAの事例のように、隣接する遺伝子がオーバーラップすることと連動してポリアデニル化サイトが変化したと推測できるケースもあった。一方で、ニホンカナヘビなど7種におけるND5 mRNAや有袋類のND6 mRNAの事例のように、ポリアデニル化サイトの変化を引き起こす原因を容易に見出せないものもあった。</p> <p>本研究では、脊椎動物のmt-mRNA構造の可塑性が見出された一方で、ヒト型のmt-mRNA構造が真獣類7種、爬虫類9種、両生類7種、魚類7種で共通に見られることも示された。無顎類やナメクジウオ類でも、mtDNA遺伝子配置変動に伴い一部のmt-mRNAのポリアデニル化サイトに変化が見られたものの、ほとんどのmt-mRNAの構造はヒトのものと類似していた。すなわち、ヒト型のmt-mRNA構造は脊椎動物の進化の初期段階ですでに成立していたことが示唆された。RNA-Seqを用いてmt-mRNAの構造を効率的かつ俯瞰的に調べる手法を確立したことにより、mt-mRNAの構造や存在量が様々な要因(加齢、疾病、栄養状態など)によりどう変化するかという応用研究への門戸を開くこともできた。</p>			