



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 |

名古屋市立大学 博士学位論文

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

2018 年

孫 垚

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

要旨

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。

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。

本研究で私は、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。

バイオインフォマティクスの手法で、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。

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ンストロニック 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。

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、様々に変化しうるという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。

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。

用語集

mRNA:

伝令 RNA (messenger RNA) の省略形。二本鎖 DNA 上のタンパク質を合成する遺伝情報を一本鎖 RNA に写しとったもの。翻訳の過程で、コドンと呼ばれる三つ組塩基が、遺伝暗号表に従ってタンパク質を構成するアミノ酸に変換される情報を含む。

転写:

デオキシリボ核酸 (DNA) の遺伝情報がリボ核酸 (RNA) に写し取られること。RNA ポリメラーゼにより、二本鎖 DNA の一方の鎖の塩基配列に基づき、それと対合関係にある相補的な RNA 塩基配列が生成する。ただし DNA のチミンに対して RNA ではウラシルが使われる。

プロセッシング:

転写後の RNA に切断や化学修飾などが行われることで機能型の RNA に変換されること。mRNA の場合は、5' 末端へのキャップ構造の付加や 3' 末端への polyA 配列の付加などを受けることがある。tRNA の場合は、3' 末端への CCA 配列の付加や特定位置の塩基に化学修飾を受けることがある。

呼吸鎖複合体:

酸素呼吸を行う生物は、細胞膜上やミトコンドリア内膜上の呼吸鎖複合体で電子伝達を行うことで作られた膜内外のプロトン濃度勾配を駆動力として、アデノシン 3 リン酸 (ATP) の合成を行う。呼吸鎖複合体には、複合体 I から複合体 V までがあり、複合体 I は NADH:ユビキノン還元酵素、複合体 II はユビキノン、複合体 III はユビキノール-シトクロム c レダクターゼ、複合体 IV はシトクロム酸化酵素、複合体 V は ATP 合成酵素の機能を担っている。ミトコンドリア内膜上では、電子伝達を行うため、複合体 I ~ IV が順に並んでいる (複合体 II がない場合もある)。複合体 II だけは核遺伝子由来のタンパク質サブユニットで構成されるが、残りの複合体はミトコンドリア DNA から発現したタンパク質のサブユニットを含んでいる。

次世代シーケンス:

何百万-何千万もの DNA 分子の塩基配列を同時並行的に決定できる先端技術。複数サンプルに由来する大量の塩基配列を高速に決定できることから、学術研究のみならず、製薬や医療などの応用科学分野に変革をもたらしている。

BLAST 検索:

クエリー (検索配列) としての塩基配列 (またはタンパク質のアミノ酸配列) に対して、ある閾値以上のスコアで類似する塩基配列 (またはアミノ酸配列) を、データベース上の配列から探索すること。

DNA マッピング:

実験などで得た大量の短鎖塩基配列のそれぞれを、塩基配列の相同性に基づき、参照 DNA 塩基配列の対応する位置に対して貼付けること。

目次

| | |
|--|----|
| 第一章. 序論..... | 1 |
| 第二章. 材料と方法..... | 9 |
| 2.1 サンプル..... | 9 |
| 2.2 RNA シーケンシング..... | 9 |
| 2.3 3' RACE..... | 10 |
| 2.4 ミトコンドリア DNA シーケンシング..... | 11 |
| 2.5 RNA-Seq データからの mtDNA 塩基配列の推定..... | 11 |
| 2.6 ポリアデニル化サイトの決定..... | 15 |
| 2.7 mRNA の 5' 末端位置の推定..... | 18 |
| 2.8 未成熟転写産物の相対量比の評価..... | 19 |
| 第三章. 結果..... | 21 |
| 3.1 ニホンカナヘビの mtDNA と RNA-Seq..... | 21 |
| 3.2 ニホンカナヘビ mt-mRNA の polyA 付加サイト..... | 22 |
| 3.3 ニホンカナヘビの mt-mRNA 構造の推定..... | 28 |
| 3.4 他種の mt-mRNA における polyA 付加サイト..... | 29 |
| 3.4.1 トカゲ類..... | 29 |
| 3.4.2 ヘビ類..... | 32 |
| 3.4.3 カメ類..... | 33 |
| 3.4.4 ワニ類..... | 35 |
| 3.4.5 鳥類..... | 37 |
| 3.4.6 哺乳類..... | 38 |
| 3.4.7 両生類..... | 41 |
| 3.4.8 魚類..... | 43 |
| 3.4.9 ナメクジウオ類..... | 44 |
| 3.5 未成熟転写産物の相対量比の評価..... | 45 |
| 第四章. 考察..... | 48 |
| 4. 1 RNA-Seq を用いたミトコンドリア転写物の解析..... | 48 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 4. 2 mt-mRNA ポリアデニル化の進化 | 51 |
| 4.2.1 ND5 mRNA の polyA 付加サイトの進化..... | 51 |
| 4.2.2 ND6 mRNA の polyA 付加サイトの進化..... | 54 |
| 4.2.3 ND1 mRNA の polyA 付加サイトの進化..... | 56 |
| 4.2.4 その他の mRNA の polyA 付加サイトの進化..... | 58 |
| 4. 3 mt-mRNA 構造の進化..... | 63 |
| 結論..... | 67 |
| 謝辞..... | 68 |
| 参考文献 | 69 |
| 発表論文 | 75 |
| 学会等での発表..... | 75 |
| 補遺..... | 76 |
| 1. polyA_seq.pl script | 76 |
| 2. 相補鎖の塩基配列に変換する script | 78 |
| 3. mt-mRNA の方向と範囲 | 80 |

第一章. 序論

ミトコンドリアは真核細胞の細胞質に存在している細胞内小器官で、細胞のエネルギーを供給する役目を持っている。ミトコンドリアは独自の DNA とリボソームを持ち、そのタンパク質合成系においては、標準暗号とは一部で異なる遺伝暗号を使っている(Anderson et al., 1981; Wolstenholme, 1992)。ミトコンドリア DNA (mtDNA) は各細胞内に多数のコピーがあり、メンデル法則に従わずに、母系遺伝による細胞質遺伝をしている(Wolstenholme, 1992)。

典型的な脊椎動物の mtDNA は約 17 キロ塩基対の環状二本鎖 DNA で、イントロンを持たない 37 個の遺伝子(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、複製と転写の調節機能を持つ主要非コード領域(major

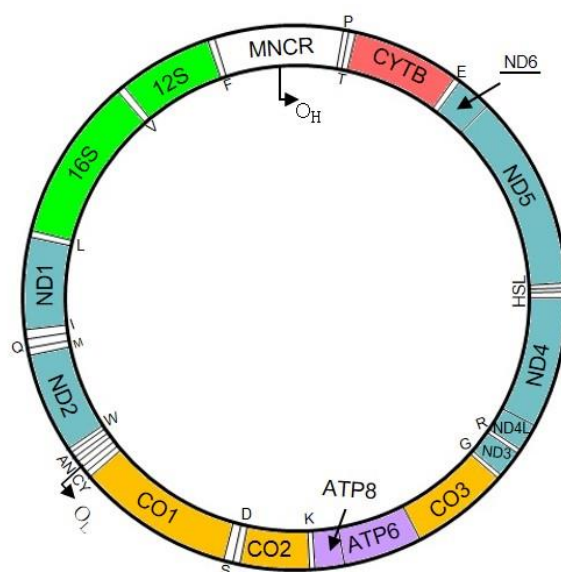


図1 ヒトのミトコンドリア DNA の遺伝子配置

内側は軽鎖で、外側は重鎖を示す。各遺伝子名の略号は以下の通りである。12S及び 16S (緑色):12S 及び 16S rRNA 遺伝子;CO1-3(黄色): シトクロム c オキシダーゼサブユニット 1-3 遺伝子; ND1-6 及び 4L(青色): NADH デヒドロゲナーゼサブユニット 1-6 及び 4L 遺伝子;ATP8 及び ATP6(紫色):ATP アーゼサブユニット 8 及び 6 遺伝子; CYTB(赤色):シトクロム b 遺伝子。2 個の rRNA 遺伝子、13 個のタンパク質遺伝子のうち、ND6 のみが軽鎖にコードされる遺伝子である。tRNA 遺伝子に対応するアミノ酸の 1 文字で表記し、重鎖コードの tRNA 遺伝子を内側に、軽鎖コードの tRNA 遺伝子を外側に表す。MNCR:主要非コード領域。O_H:重鎖複製起点; O_L:軽鎖複製起点。

noncoding region: MNCR)とともに、ぎっしりと並んでコードされている (図 1; Anderson et al., 1981; Bernt et al., 2013)。mtDNA の二本の鎖は、GC 含有率の違いに起因する浮遊密度の違いにより分離できる。この重い方の鎖を重鎖(heavy strand)、軽い方の鎖を軽鎖(light strand)という。2 個の rRNA 遺伝子、14 個の tRNA 遺伝子、及び ND6 遺伝子以外の 12 個のタンパク質遺伝子が重鎖にコードされている。残りの遺伝子は軽鎖にコードされている。

mtDNA の複製には、核 DNA と違う特徴がいくつかある。複製は細胞分裂期に必ず1回起きるわけではない。複製に関わる酵素類の遺伝子は核ゲノムにコードされ、それらの発現産物はミトコンドリアに移入される。1980 年代、「The strand-asymmetric replication model」と呼ばれる複製機構が提出された(図 2A; Clayton and Tapper, 1981)。このモデルでは、mtDNA の二つの複製開始点 (O_H と O_L) から異なったタイミングで DNA 合成が始まる。 O_H は MNCR 内にあり、その内部にいくつかの複製に関与すると考えられる保存配列 (conserved sequence block; CSB I, CSB II, CSB III、ETAS) が含まれている。

軽鎖を鋳型にした重鎖の複製では、 O_H 付近で、HSP (Heavy Strand Promoter) から、まず RNA プライマーが合成され、次に DNA ポリメラーゼによって、500 塩基ほどの伸長鎖が伸びる。これが、元の重鎖を置換して、いわゆる D-loop が形成される。続いて、5' → 3' 方向に重鎖の複製が再開し、伸長鎖が O_L に達すると、5' → 3' 方向に軽鎖の複製が始まる(図 2 A)。このモデルには複製の終結機構について、まだ不明点がある。

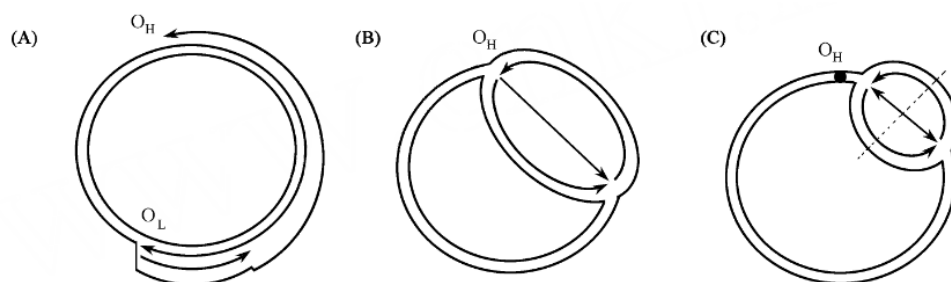


図 2 哺乳類 mtDNA の複製モデル

(A) The strand-asymmetric replication model; (B) Strand-coupled unidirectional replication model; (C) Strand-coupled bidirectional replication model。Bowmaker et al. (2003)より改変。

今世紀に入って、「The strand-symmetric replication model」が提出された(図 2 B と 2C; Bowmaker et al., 2003)。これらのモデルの一つ目は、mtDNA の両鎖の複製が O_H から始まり、一周するように進んで O_H に達すると、複製が終了する(図 2B; Strand-coupled unidirectional replication model)。二つ目は、 O_H の下流(CYTb, ND5, ND6 遺伝子の内部)で複製が始まり、初めは軽重鎖を問わず両方向で進行し、片方の複製が O_H に達すると、その方向への複製が停止される(図 2C; Strand-coupled bidirectional replication model)。どちらの考えにおいても、岡崎フラグメントが形成される。これらの 3 モデルのどれが正しいか、まだ決着していない。

20 世紀末、少数のモデル動物(ヒト、マウスなど)を用いて、脊椎動物 mtDNA 遺伝子発現に関する研究が行われた。mtDNA の MNCR 内に重鎖、軽鎖の転写プロモーター(HSP1, HSP2 と LSP: Light Strand Promoter)が存在する。mtDNA の転写は、MNCR の転写開始点(HSP2 または LSP)から両方向に mtDNA を一周するように進む(図 3; Montoya et al., 1982)。Ojala らは、ヒト mtDNA の転写で生じたポリシストロニック RNA が、散在している tRNA を目印にして切断を受けるとの tRNA punctuation model を提出した(Ojala et al., 1981)。初期転写物のプロセッシングの際

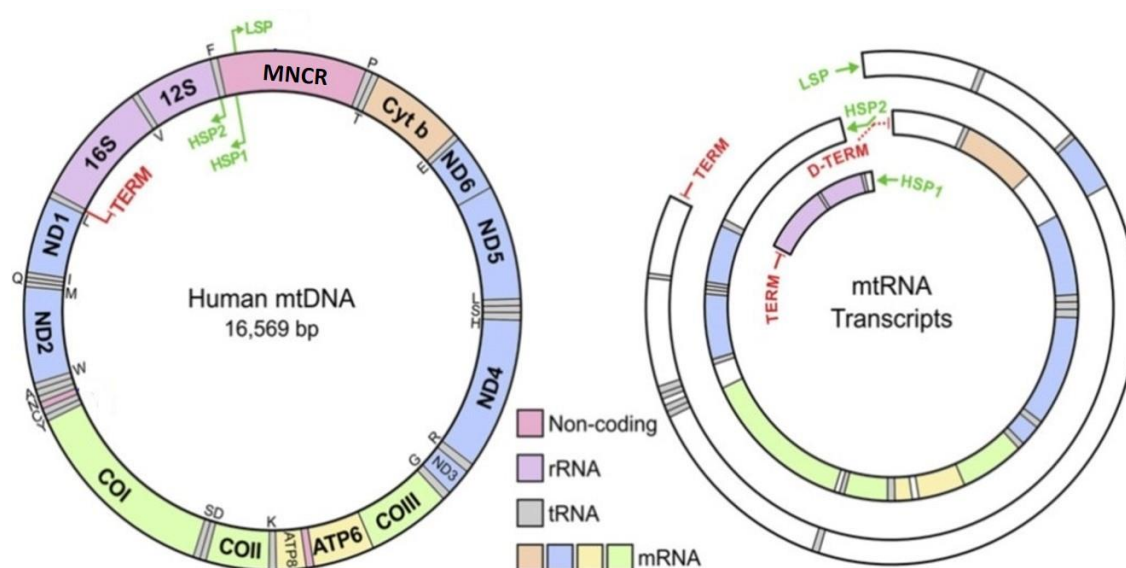


図 3 ヒト mtDNA の転写

左側はヒトの mtDNA 遺伝子配置、右側は転写様式を示す。HSP1 および HSP2: 重鎖の転写開始点 1 及び 2; LSP: 軽鎖の転写開始点。TERM は LSP と HSP1 からの転写終結点。D-TERM は HSP2 からの転写終結点であるが、MNCR 中の正確な位置は不明。遺伝子の略号は図 1 参照。Guja and Garcia-Diaz(2012)より改変。

には、tRNA の前後(5' 末端及び 3' 末端)で切断が起こる。続いて、mRNA の 3' 末端にポリアデニル化が行われ、tRNA の 3' 末端に CCA 配列が付加される (Anderson et al., 1981)。ミトコンドリアの mRNA は核の mRNA と違い、5' 末端にキャップ構造が存在しない(Temperley et al., 2010)。5' 末端の非翻訳領域も核コードの mRNA より短く、数塩基程度であることが多い(Anderson et al., 1981; Temperley et al., 2010)。

tRNA punctuation model によれば、一次転写産物の切断によって生じる RNA はほぼ同量であると予想されるが、実際には、哺乳類ミトコンドリアにおいて、二つの rRNA の存在量は全体の転写物の約9割以上になっている。重鎖の転写開始点は、tRNA^{Phe} 遺伝子の内部(HSP2)及びその上流 20 ヌクレオチド付近(HSP1)に存在する (Clayton, 1984)。tRNA^{Phe} 遺伝子の内部(HSP2)から始まる重鎖の転写は、mtDNA 全体にわたって進行する。その後、RNA プロセッシングにより、個々の成熟した mRNA(図 4)、rRNA 及び tRNA が生じる。もう一つの開始部位(HSP1)から始まった転写物の場合、16S rRNA 末端付近のアテニューエーターにより、そこで転写が終了する。この二つの開始部位を比べると、後者の方が主要な開始点であり、結果的に rRNA の発現量は他の mRNA や tRNA のものより多くなる(Guja and Garcia-Diza, 2012)。一方、軽鎖の転写は、重鎖の複製起点上流 200 ヌクレオチド付近(LSP)のみから始まり、mtDNA 全体にわたって進む(Clayton, 1984)。

mRNA のポリアデニル化は遺伝子発現の大切な一過程である。真核生物において、polyA tail は mRNA を安定化し、核から細胞質へ移行する信号を付与され、翻訳の開始を促進する(Zhao et al., 1999; Rorbach and Minczuk, 2012)。ヒトの mtDNA にコードされる遺伝子の mRNA においても、核コード mRNA に付加される polyA よりも短いものの、45 塩基程度の polyA 配列が、3' 末端に付加されることが分かっている(Temperley et al., 2010)。例外として、ヒトの ND5 mRNA の polyA 配列は更に短くなり(10 塩基未満)、ND6 mRNA の 3' 末端に polyA は付加されない (Slomovic et al., 2005; Temperley et al., 2010; Mercer et al., 2011)。

mtDNA コードのタンパク質遺伝子は、その終止コドンが mtDNA 上にコードされていないケースが多い(Anderson et al., 1981)。この場合、3' 末端に polyA が付加されることによって、UAA などの終止コドンが生じ、タンパク質合成の終止が正しく

行われる。ミトコンドリア mRNA(mt-mRNA)のポリアデニル化に関わる酵素やその分子機構については、最近の研究により徐々に解明されつつある。例えば、Schuster と Slomovic (2008)は、RNA 干渉技術を利用してポリヌクレオチドホスホリラーゼやミトコンドリアポリ A ポリメラーゼなどの酵素の働きを抑制すると、polyA 付加に障害が生じることを示した。ただし、ミトコンドリア mRNA のポリアデニル化にはいろいろな酵素が関わっていると思われ、その機構は現在も完全に解明されていない(Nagaike et al., 2005; Chang and Tong, 2012; Rorbach and Minczuk, 2012; Levy and Schuster, 2016)。また、mt-mRNA に付加した polyA 配列の短縮により、疾患が生じる報告もある(Xiao et al., 2006; Crosby et al., 2010; Chartier et al., 2015)。これらの疾患はミトコンドリアポリ A ポリメラーゼおよびポリ A 結合タンパク質の機能不全に関連すると考えられている。

ヒト mt-mRNA の構造は 1981 年、Micrococcal nuclease 処理した Hela 細胞ミトコンドリアから注意深く単離した polyA RNA 分子種に対して、分子生物学的実験を行うことにより決定された(図 4)。単離した polyA RNA 分子種をそれぞれ 5' 末端 [P³²]放射線ラベルし、塩基特異的に切断する RNase で切断した産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動する Donniss-Keller 法を用いて 5' 末端の同定が行われた(Montoya et al., 1981)。一方、mt-mRNA の 3' 末端は、[P³²]放射線ラベルした oligo(dT)-dN(A,G,C)プライマーを用いて各 polyA RNA 分子種から逆転写反応を行う際に、dNTP4種類のうち一つを抜いた反応を行ってポリアクリルアミドゲル電気泳動することで決定された(Ojala et al., 1981)。これらの分子生物学的実験の結果をヒト mtDNA 塩基配列と照合することで、それぞれのタンパク質遺伝子に対応する成

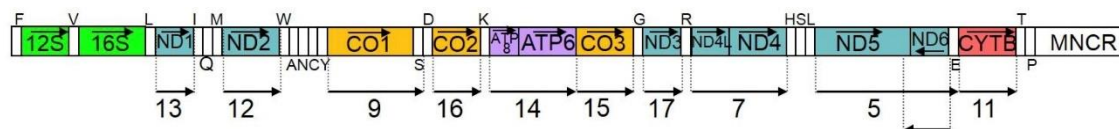


図 4 ヒトミトコンドリア mRNA の方向と範囲

ヒト mtDNA の遺伝子配置(Anderson et al. 1981)を線状に示す。タンパク質遺伝子及び rRNA 遺伝子がコードされる方向をカラム内の矢印で示す。実験的に解明されたミトコンドリア mRNA の方向及び範囲を、原著論文で用いられた番号と矢印で示す(Montoya et al. 1981; Ojala et al. 1981)。軽鎖から転写された ND6 mRNA はポリアデニル化されないが(Mercer et al. 2011)、その範囲も逆向きの矢印で示す。

熟型 mRNA の方向と範囲が決定された(図 4)。しかし、私が知る限りにおいて、ヒト以外の脊椎動物において同様の分子生物学的実験はほとんど行われていない。従って、ヒトで解明された mtDNA 転写や RNA プロセッシングの仕組みが、脊椎動物において保存的に広く用いられているかどうかは不明である。

ヒトなどで見られる脊椎動物の典型的な mtDNA 遺伝子配置(図 1)は、魚類、両生類、爬虫類、哺乳類の多数の種で保存されているが、遺伝子が配置変動を起こした例や MNCR が mtDNA 上で重複した例も様々な種で報告されている(Boore, 1999; Bernt et al., 2013; Kumazawa et al., 2014)。例えば、ヘビ亜目のメクラヘビ類を除く種では、MNCR が mtDNA 上に 2 箇所重複して存在する(Kumazawa et al., 1996)。トカゲ亜目のアガマ科とカメレオン科では、ND1 遺伝子の下流の tRNA 遺伝子クラスターが IQM(下線付きの tRNA 遺伝子は軽鎖にコードされていることを示す)から QIM に変換されている (Macey et al., 1997)。また、鳥類では、タンパク質遺伝子や tRNA 遺伝子を巻き込んだ遺伝子配置変動が存在し、種によっては MNCR の重複も見られる(Desjardins and Morais, 1990; Boore, 1999)。このように mtDNA 遺伝子配置が様々に変化した種においても、ヒトと類似した mt-mRNA 構造が保存されているのだろうか?このような観点から、動物 mtDNA の遺伝子発現様式の多様性と進化を研究した事例は、私の知る限り全くない。

脊椎動物ミトコンドリアの遺伝情報発現機構の研究は、これまで主にヒト(一部マウス)の培養細胞を用いて、対象とする遺伝子を絞って分子生物学的な解析を加える手法で行われてきた(Montoya et al., 1981; Ojala et al., 1981; Clayton, 1992; Campbell et al., 2012; Rorbach and Minczuk, 2012)。この方法は確実だが、一度に研究できる対象遺伝子の範囲が狭く、実験にも時間を要していた。しかし、近年開発された次世代シーケンサーを用いれば、これらの研究における技術的な制限が緩和され、オルガネラゲノム転写物の網羅的解析が可能であると考えられる。

次世代シーケンサーを利用して、大量の cDNA 塩基配列データを取得する RNA シーケンス(RNA-Seq)は、トランスクリプトーム解析や転写物の定量解析などの目的に利用される手法である (Schuster, 2008)。ライブラリー調製やシーケンシングの方法により、次世代シーケンスの種類もいくつかある。Roche 社の Roche FLX Titanium 型次世代シーケンサーでは、エマルジョン PCR により増幅した塩基配列を

ルシフェラーゼによるピロシーケンス発光反応で網羅的に検出できる。この方法では、読める長さが比較的大きいが、エラーが出る確率も高い。特に、特定の塩基が複数回繰り返すホモポリマーサイトにおいて、カウントミスを高頻度で生じることが知られている(Gilles et al., 2011; Quail et al., 2012)。PacBio RS II/Sequel システムは一分子レベルでリアルタイムに塩基を読み取ることができ、ほかのどの技術よりもはるかに長いリード(平均 10,000bp)が出力されるが、更に高頻度でエラーがでやすいことが知られている(Quail et al., 2012)。一方、Illumina 社の HiSeq/MiSeq 型次世代シーケンサーでは、ブリッジ PCR により増幅した塩基配列をシーケンス・バイ・シンセシスの蛍光検出法で読み取る。その結果、read 長が相対的に短くなるが、エラー率も少なくなる(Quail et al., 2012)。現時点においては、次世代シーケンスにおいては、Illumina 社の次世代シーケンサーが最もよく用いられている。

本研究では、Illumina 次世代 RNA シーケンスから得られたデータを用いて、mt-mRNA の構造多様性を網羅的に解析することを試みた。また、その結果に基づき、mt-mRNA の転写やプロセッシングに関する分子機構や分子進化について、洞察を得ることを試みた。次世代 RNA-Seq 技術を後生動物の mt-mRNA の網羅的解析に用いた研究は、ヒト(Mercer et al., 2011)、ヨーロッパヤチネズミ(Marková et al., 2015)、タラ(Coucheron et al., 2011)及び双翅昆虫類(Torres et al., 2009; Neira-Oviedo et al., 2011)での例を除き、私の知る限りほとんどない。しかも、これらの先行研究は、特定の種に関するものであり、得られたデータを用いて、mt-mRNA の構造の多様性や進化に迫った研究例は全くない。

本研究で私は、RNA レベルの研究が殆ど行われていない爬虫類からニホンカナヘビ(爬虫綱、有鱗目)を題材に取り上げ、RNA-Seq データから mt-mRNA の polyA 付加地点の網羅的検出を行い、その結果を他の脊椎動物のものと比較した。この結果に基づき、爬虫類から鳥類、哺乳類、両生類、魚類、ナメクジウオ類までの脊索動物全般(図 5)の対象に対し、mt-mRNA の構造多様性と分子進化について論じた。

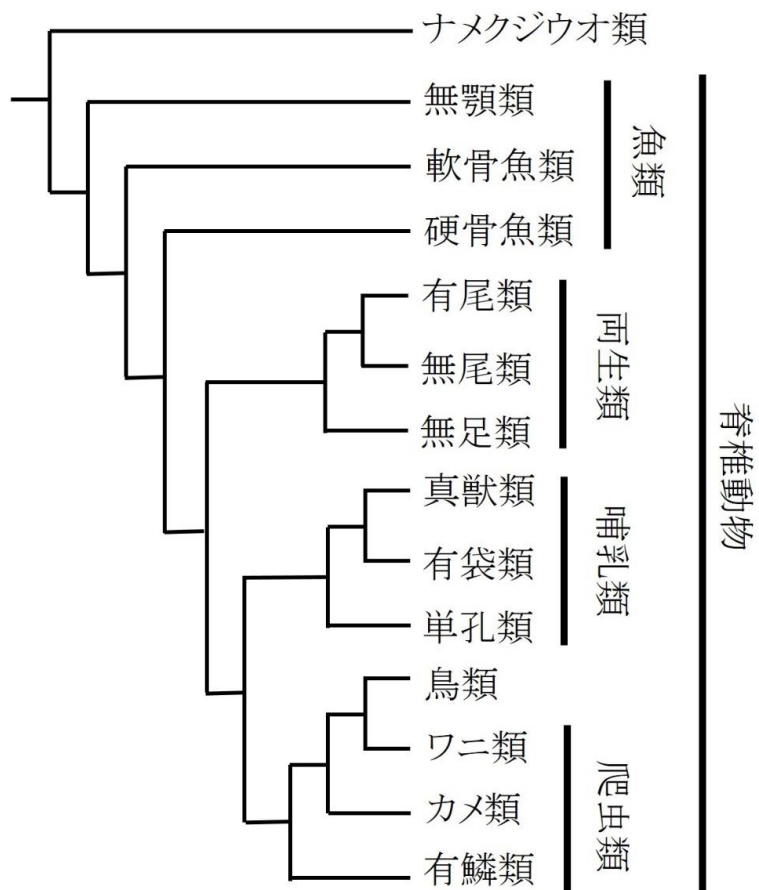


図5 脊索動物の主要グループ間の系統関係
 系統関係は Hedges and Kumar (2009)より改変。

第二章. 材料と方法

2.1 サンプル

ニホンカナヘビ(*Takydromus tachydromoides*)のサンプルは名古屋市千種区で採集した。本研究室の動物生体を用いた実験は、名古屋市立大学動物実験委員会より認められた名古屋市立大学動物実験計画 No.H21N-02 に準拠して行った。また本研究の DNA 組換え実験は、名古屋市立大学遺伝子組換え実験計画 No.08-301 と No.13-301 に準拠して行った。

2.2 RNA シーケンシング

ニホンカナヘビの RNA 抽出には、mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies)を用いた。生体を屠殺した後、氷上で滅菌済みハサミとピンセットで肝臓を取り出し、細かく切断した。それを Matrix D ビーズ入りのヌクレアーゼフリー2ml チューブに入れ、迅速に組織の質量を測定した。これに組織の 10 倍量の Lysis/Binding buffer を加えて、Tomy Micro Smash を用いて、5000rpm で 20 秒かけて組織を破碎した。これを 12,000rpm で 10 分間、4°Cで遠心し、ヌクレアーゼフリー 1.5ml チューブに上清を移した。そこに 1/10 量の Homogenate Additive を加え、ボルテックスでよく混合し、数回反転させた。氷上に 10 分間静置し、溶液と等量の acid-Phenol:CHCl₃を加え、30 秒間ボルテックスした。14,000rpm で 5 分間、室温で遠心し、上層の水層を回収し、体積を測定した。回収した水相の体積に対して 1.25 倍容の室温においたエタノールを加え、フィルターカートリッジ上に移した。10,000rpm で 30 秒間、室温で遠心し、更に 10,000rpm で 15 秒間、室温でスピンドウンした。フロースルー画分を捨て、カートリッジを全溶液が通過するまで遠心を繰り返した。フィルターカートリッジに 700 μ lの室温に戻した miRNA Wash Solution 1 を加え、10,000rpm で 10 秒間、室温で遠心し、フロースルー画分を捨てた。フィルターカートリッジに 500 μ lの室温に戻した miRNA Wash Solution 2/3 を加え、10,000rpm で 10 秒間、室温で遠心し、フロースルー画分を捨てた。再び 500 μ lの室温に戻した miRNA Wash Solution 2/3 を加え、10,000rpm で 10 秒間、室温で遠心し、フロー

スルー画分を捨てた。更に、10,000rpm で 1 分間、室温で遠心し、フィルター上に残った液を除去した。フィルターカートリッジを新しい 1.5ml チューブ上に移し、100 μ l の 95°C でプレヒートした 0.1mM EDTA を含む Elution Solution を加えた。10,000rpm で 30 秒間、室温で遠心し、そのうちの 2 μ l を用いて分光光度計 Nanodrop を用いて濃度を測定した。

次世代シーケンス用ライブラリーの調製は、イルミナ社 TruSeq RNA Sample kit を用いて行った。簡単に述べると、total RNA 画分からオリゴ-dT ビーズを用いて polyA RNA の濃縮を行い、大過剰に存在している rRNA、tRNA、及び DNA を除去した。polyA RNA を重金属と熱処理でランダムに切断した後、ランダムヘキサマーからの 1st strand cDNA 合成及び 2nd strand cDNA 合成を行った。二本鎖 DNA 末端の修復の後、index adaptor 配列を両端に付加し、Bridge PCR 増幅した後、AMPure XP ビーズによって低分子 DNA の除去を行った。調製したライブラリーを、Illumina HiSeq 型次世代シーケンサーにかけ、Paired-End 法で、101 塩基の read 塩基配列を多数取得した。RNA-Seq による read の取得は北海道システムサイエンス(株)に委託して行った。

2.3 3'RACE

SMARTerTMRACE cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いて、cDNA の 3' 末端の塩基配列を特異的に増幅した。増幅した産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、MinElute Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて増幅産物を回収した。Mighty TA-cloning Kit(TAKARA)を用いて、回収した産物を pMD20-T ベクターにライゲーションした。NEB 10-beta competent cells (NEB)に、連結されたベクターを導入し形質転換を行った。約 12 時間後にコロニーを目視で確認した。コロニーをつまようじで軽くつつき、0.2ml チューブ中で作成した 10 μ l スケール PCR 反応液に軽く浸した。M13 プライマー-M4 と M13 プライマー-RV を用いて通常の PCR を行い、産物を 1%アガロースゲル電気泳動で確認し、ExoSAP-IT(Amersham)処理を行った。処理された産物に対して、big dye terminator version 3.1 cycle sequencing ready reaction kit(Life Technologies)を用い、ダイターミネーション反応を行った。その後、Applied

Biosystems Genetic Analyzer 3500 の standard run (約 2 時間)を行ない、塩基配列を解読した。解読した塩基配列は、Sequencher ver 4.8 (Gene Codes)を用いて編集した。

2.4 ミトコンドリア DNA シーケンシング

RNA-Seq に用いたニホンカナヘビ個体からの DNA 抽出は、DNeasy Tissue Kit(Qiagen)を用いて行った。筋肉組織から抽出した DNA を鋳型にして、種特異的プライマー(表 1)を組み合わせることで、約 1.5kbp の DNA 断片 18 個を増幅した。PCR は、Thermal Cycler Dice (Takara)を使用し、融解温度 98°Cで 5 sec、アニーリング温度 55°Cで 15 sec、伸長温度 72°Cで 20 sec を 30 サイクルの設定で行った。SpeedStar HS DNA polymerase (Takara)を耐熱性 DNA ポリメラーゼとして使用した。ExoSAP-IT(Amersham)処理した PCR 産物に対し、big dye terminator version 3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Life Technologies)を用い、ダイターミネーション反応を行った。エタノール沈殿した反応物を Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 の standard run にかき、塩基配列を決定した。Sequencher ver 4.8 (Gene Codes)を用いて、決定した塩基配列の編集とアセンブルを行い、mtDNA 塩基配列を得た。

2.5 RNA-Seq データからの mtDNA 塩基配列の推定

ニホンカナヘビ以外の様々な脊椎動物の RNA-Seq データ(表 2)を、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)からダウンロードした。これらの RNA-Seq データのうち、イボヨルトカゲ、ヤシヤモリ、シナワニトカゲ、ロージーボアの4種に関するものは、当研究室で次世代シーケンサーMiSeq を用いて取得され、データ公開したものである。入手した sra ファイルを、NCBI SRA toolkit の fastq-dump コマンドにより、FASTQ 形式に変換した(ペアエンド read の場合は、--split-files オプションを付け、forward と reverse の read に分けた)。続いて、Cutadapt (Martin, 2011)を用いてデフォルト条件で残存するアダプター配列

表1. ニホンカナヘビのmtDNA全塩基配列決定に用いたプライマー

| Name of primer | Sequence (5' to 3') | Length |
|----------------|---------------------|--------|
| Ttac-1L | CAGACAACAGCTTTGGT | 17 |
| Ttac-1H | CTATCACCAAGCTCGGT | 17 |
| Ttac-2L | ACCTCTTGCATCATGG | 16 |
| Ttac-2H | AGACTAACTGGTGGCA | 16 |
| Ttac-3L | TAGTGCAGCCGCTATT | 16 |
| Ttac-3H | TTGAAGTCCCAGGTGT | 16 |
| Ttac-4L | CCAGTTAATGCACCTGT | 17 |
| Ttac-4H | TCTTAAGCAGAACCTAG | 17 |
| Ttac-5L | ATGACGATTTAAGCCCA | 17 |
| Ttac-5H | GGGCTCAAACAATGAA | 16 |
| Ttac-6L | CGATCGTAACTTGAACA | 17 |
| Ttac-6H | CAGTATCATTGGTGAC | 16 |
| Ttac-7L | GTGCCCTAGTAGTTTA | 16 |
| Ttac-7H | ATTTCTAAGCATGTCAG | 17 |
| Ttac-8L | TTCTCCAGAAGGCAC | 16 |
| Ttac-8H | TGCGCGAGGTTAACAGC | 17 |
| Ttac-9L | AGTCAGCTTTTACTAC | 17 |
| Ttac-9H | AGATGCGAATAAGTCC | 16 |
| Ttac-10L | TACTGTGTATGAGCTC | 16 |
| Ttac-10H | TACTTGAAGAACCGGC | 16 |
| Ttac-11L | GGCATAGAAGCTTCTA | 16 |
| Ttac-11H | ATAATAACTGCGCCA | 16 |
| Ttac-12L | AGCCCTGTTACTTACGC | 17 |
| Ttac-12H | CAGCCGTGTTGTACATC | 17 |
| Ttac-13L | CGCTGTTGTACTTCAA | 16 |
| Ttac-13H | CTTAAGCTACGTAGGAC | 17 |
| Ttac-14L | GCATACGCAATTCTCCG | 17 |
| Ttac-14H | TATCCGTGAGGATGAG | 16 |
| Ttac-15L | AATGCCGCCTTACGCGA | 17 |
| Ttac-15H | GCATAGCAAGACGTCCG | 16 |
| Ttac-16L | CTCACGTGAGAATCATC | 17 |
| Ttac-16H | CAGGACCAAAGCTGTTGT | 18 |
| Ttac-17H | AGACAGGTCTCTAGTCA | 17 |
| Ttac-18L | GAGATGCATCCAATTCA | 17 |
| Ttac-18H | ATGAAGCAGGCTATTGA | 17 |

表2. 本研究で取り扱ったRNA-Seqデータの概要

| 分類群 | 科 | 科学名 | 和名 | 組織 | RNA-Seq クセクション番 号 | 別個体のmtDNA アクセッション番号 | read長 (bp) ² | RNA-Seq 総read数 | mtDNA由来 のread数 | 主要な polyA含有 readの数 ³ |
|--------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------|------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 爬虫類 | Lacertidae | <i>Takydromus tachydromoides</i> | ニホンカナヘビ | 肝臓 | DRR072216 | LC101816 | 101 | 53,655,734 | 3,627,027 | 8,795 |
| | | | ホクベイスベトカゲ | 肝臓 | SRR629642 | KU046826 | 100 | 91,047,166 | 5,473,971 | 3,035 |
| へび類 | Xantusiidae | <i>Lepidophyma flavimaculatum</i> | イボエルトカゲ | 肝臓 | DRR034613 | AB162908 | 151 | 40,701,034 | 1,764,845 | 665 |
| | | | ヒョウモントカゲモドキ | 肝臓 | SRR629643 | AB738955 | 100 | 70,002,306 | 4,146,912 | 2,889 |
| | Gekkonidae | <i>Gekko vittatus</i> | ヤシヤモリ | 肝臓 | DRR034339 | AB178897 | 201 | 17,544,514 | 1,063,162 | 947 |
| | | | シナワニトカゲ | 肝臓 | DRR034612 | AB080274 | 151 | 19,549,612 | 1,374,172 | 1,280 |
| | Varanidae | <i>Varanus acanthurus</i> | トゲオオトカゲ | 肝臓 | SRR3901711 | AB980996 | 101 | 34,624,502 | 2,677,058 | 1,689 |
| | | | フトアゴヒゲトカゲ | 肝臓 | SRR629641 | AB166795 | 100 | 87,625,132 | 8,515,182 | 6,198 |
| | Agamidae | <i>Phrynocephalus przewalskii</i> | ブシハルスキーガマトカゲ | 混合組織 | SRR1298770 | NC_022719 | 100 | 111,576,922 | 8,671,591 | 2,155 |
| | | | カキネハリトカゲ | 肝臓 | SRR629640 | AB079242 | 100 | 71,604,846 | 4,067,660 | 3,333 |
| | Viperidae | <i>Agkistrodon piscivorus</i> | ヌママムシ | 肝臓 | SRR629645 | DQ523161 | 100 | 75,023,884 | 8,161,006 | 3,236 |
| | | | コーンスネーク | 混合組織 | ERR216308 | AM236349 | 100 | 27,504,812 | 999,617 | 700 |
| カメ類 | Boidae | <i>Lichanura trivirgata</i> | ロージーボア | 肝臓 | DRR034614 | GQ200695 | 151 | 39,240,298 | 4,877,166 | 2,854 |
| | | | サンビームヘビ | 肝臓 | SRR629647 | AB179620 | 100 | 89,792,506 | 5,340,226 | 2,728 |
| 鳥類 | Chelydridae | <i>Chelydra serpentina</i> | カサツキガメ | 肝臓 | SRR629521 | EF122793 | 100 | 67,455,518 | 2,811,802 | 1,026 |
| | | | カロリナハコガメ | 肝臓 | SRR629650 | - | 100 | 88,575,286 | 6,905,832 | 4,410 |
| | Kinosternidae | <i>Sternotherus odoratus</i> | ミシッピニオイガメ | 肝臓 | SRR629648 | NC_017607 | 100 | 95,375,174 | 2,977,994 | 1,985 |
| | | | クリイロハコエヨコビガメ | 肝臓 | SRR629649 | KC692463 | 100 | 90,326,648 | 8,875,110 | 4,853 |
| | Pelomeducidae | <i>Pelusios castaneus</i> | アメリカアリゲーター | 肝臓 | SRR629636 | Y13113 | 100 | 72,260,274 | 3,303,351 | 4,719 |
| | | | ダチョウ | 精巢 | SRR1619459 | Y12025 | 101 | 32,268,702 | 848,674 | 1,957 |
| | Struthionidae | <i>Struthio camelus</i> | ニフトリ | 肝臓 | ERR348573 | X52392 | 100 | 110,458,976 | 20,095,817 | 1,182 |
| | | | ヤツガシラ | 目及び蝸牛 | SRR3203224 | KT356220 | 126 | 90,142,570 | 4,448,201 | 1,550 |
| | Upupidae | <i>Upupa epops</i> | チョウゲンボウ | 目及び蝸牛 | SRR3203231 | NC_011307 | 126 | 100,655,654 | 6,448,806 | 1,403 |
| | | | ホシムグドリ | 肝臓 | SRR3990507 | KT946691 | 126 | 15,377,119 | 2,578,895 | 2,172 |
| Falconidae | <i>Falco tinnunculus</i> | クロハガワシ | 目及び蝸牛 | SRR3203236 | KF682364 | 126 | 95,683,290 | 5,999,094 | 1,818 | |
| | | ミナミツミ | 目及び蝸牛 | SRR3203234 | KJ699124 | 126 | 93,373,864 | 4,664,865 | 1,277 | |
| Accipitridae | <i>Accipiter virgatus</i> | コノズク | 目及び蝸牛 | SRR3203230 | KT340630 | 126 | 95,561,164 | 4,397,336 | 1,485 | |
| | | ハンデイクート | 肝臓 | SRR3901713 | KJ868116 | 101 | 19,499,508 | 3,473,071 | 1,869 | |
| Strigidae | <i>Otus scops</i> | カンガルー | 肝臓 | SRR3901717 | KJ868141 | 101 | 19,694,753 | 1,857,095 | 307 | |
| | | ミンク | 肝臓 | SRR3901714 | AB241054 | 101 | 16,856,502 | 2,796,074 | 3,346 | |
| Peramelidae | <i>Isoodon obesulus</i> | タスマニアデビル | 未精単核細胞 | SRR5420458 | FN666604 | 100* | 82,254,904 | 1,463,129 | 666 | |
| | | ヒト | 脳 | SRR611068 | NC_012920 | 101 | 80,651,654 | 8,716,424 | 49,201 | |
| Macropodidae | <i>Petrogale xanthopus</i> | ハツカネズミ | 心臓と腎臓 | SRR3655009 | NC_005089 | 151 | 34,241,696 | 4,141,929 | 770 | |
| | | | | | | | | | | |

表2. (続き)

| 分類群 | 科 | 科学名 | 和名 | 組織 | RNA-Seq クセクション番号 | 別個体のmtDNA アクセッション番号 ¹⁾ | read長 (bp) ²⁾ | RNA-Seq 総read数 | mtDNA由来のread数 | 主要な polyA 含有 readの数 ³⁾ |
|-------|------------------|----------------------------------|-------------|------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------------|---------------|-----------------------------------|
| | Elephantidae | <i>Elephas maximus</i> | アジアゾウ | 血液 | SRR2911072 | DQ316068 | 100 | 70,104,696 | 2,570,995 | 1,531 |
| | Bovidae | <i>Bos taurus</i> | ウシ | 肝臓 | SRR3168807 | AF492351 | 100* | 48,278,779 | 2,277,754 | 5,086 |
| | Dasypodidae | <i>Dasyapus novemcinctus</i> | コノオビアルマジロ | 肝臓 | SRR494778 | Y11832 | 101 | 32,105,075 | 3,515,231 | 445* |
| | Dasypodidae | <i>Dasyapus novemcinctus</i> | コノオビアルマジロ | 肝臓 | SRR494766 | Y11832 | 101 | 31,705,473 | 3,461,772 | |
| | Suidae | <i>Sus scrofa</i> | イノシシ | 肝臓 | SRR3160059 | KF767444 | 100 | 33,985,487 | 2,074,364 | 894 |
| | Hipposideridae | <i>Hipposideros armiger</i> | コウモリ | 肝臓 | SRR1657904 | JN980966 | 101 | 35,073,737 | 4,498,222 | 751 |
| | Rhinocerotidae | <i>Ceratotherium simum</i> | シロサイ | 血液 | SRR5647986 | Y07726 | 100 | 40,907,398 | 1,283,760 | 732 |
| | Leporidae | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | アナウサギ | 大動脈 | SRR1786001 | AJ001588 | 101 | 38,318,392 | 5,791,499 | 725 |
| 両生類 | Ichthyophiidae | <i>Ichthyophis bannanicus</i> | バンナアシナシイモリ | 混合組織 | SRR1693776 | AY458594 | 90 | 71,686,223 | 29,655,091 | 929 |
| 有尾類 | Ambystomatidae | <i>Ambystoma mexicanum</i> | メキシコサンショウウオ | 神経細胞 | SRR2885289 | AY659991 | 100 | 35,542,317 | 368,638 | 513 |
| | Salamandridae | <i>Salamandra salamandra</i> | ファイアサラマンダー | 尾 | SRR1693191 | KX094979 | 101* | 59,951,775 | 2,318,520 | 1,480 |
| | Salamandridae | <i>Lissotriton vulgaris</i> | スベイモリ | 肝臓 | SRR3303057 | EU880339 | 100 | 36,296,019 | 3,374,445 | 448 |
| | Salamandridae | <i>Tylotriton wenxianensis</i> | ミナスイボイモリ | 不明 | SRR2985020 | EU880341 | 101 | 71,969,425 | 6,551,127 | 6,414 |
| 無尾類 | Bombinatoridae | <i>Bombina orientalis</i> | チョウセンゴケガエル | 不明 | ERR632225 | AY585338 | 101 | 46,932,624 | 1,601,935 | 1,110 |
| | Rhacophoridae | <i>Rhacophorus dennysi</i> | アオガエル | 皮膚 | SRR3418418 | KM035412 | 100 | 34,471,587 | 1,242,100 | 676 |
| | Dicroglossidae | <i>Quasipaa boulengeri</i> | - | 皮膚 | SRR2962603 | KC686711 | 100 | 38,445,924 | 1,059,243 | 357 |
| | Dicroglossidae | <i>Hoplobatrachus rugulosus</i> | ハシトラアマガエル | 腎臓 | SRR1554309 | KC196066 | 100 | 29,385,155 | 5,724,530 | 962 |
| | Ranidae | <i>Pelophylax nigromaculatus</i> | トノサマガエル | 皮膚 | SRR3418422 | AB043889 | 100 | 32,146,280 | 1,798,213 | 2,098 |
| | Megophryidae | <i>Leptobranchium boringii</i> | - | 皮膚 | SRR3418420 | KJ630505 | 100 | 30,103,264 | 1,512,365 | 1,648 |
| 魚類 | Pipidae | <i>Xenopus tropicalis</i> | ネッタイツメガエル | 脳 | SRR1189558 | NC_006839 | 101 | 31,605,646 | 1,092,532 | 706 |
| | Latidae | <i>Lates calcarifer</i> | バラマンディ | 脾臓 | SRR3170703 | DQ010541 | 100 | 40,801,246 | 1,444,712 | 1,811 |
| | Ictaluridae | <i>Ictalurus punctatus</i> | アメリカナマズ | 皮膚 | SRR3570111 | AF482987 | 101/99 | 34,367,119 | 2,983,038 | 109 |
| | Salmonidae | <i>Salmo trutta</i> | ブラウントラウト | 肝臓 | SRR1532782 | LC011387 | 100 | 33,566,718 | 1,823,278 | 962 |
| | Gadidae | <i>Gadus morhua</i> | タイセイヨウダラ | 肝臓 | SRR2045420 | X99772 | 100 | 18,943,673 | 837,438 | 614 |
| 軟骨魚類 | Sphyrnidae | <i>Sphyrna mokarran</i> | ヒラシユククザメ | 心臓 | SRR3213610 | KY464952 | 101 | 64,946,935 | 4,574,456 | 1,952 |
| | Scyliorhinidae | <i>Scyliorhinus canicula</i> | ハナカケトラザメ | 肝臓 | SRR1514129 | Y16067 | 101 | 32,106,318 | 2,479,623 | 2,693 |
| | Rajidae | <i>Leucoraja erinacea</i> | ガンギエイ | 肝臓 | SRR5172152 | NC_016429 | 150 | 21,685,008 | 1,517,782 | 1,502 |
| 無顎類 | Geotriidae | <i>Geotria australis</i> | フクロヤツメ | 目 | SRR2146917 | KT185629 | 101 | 25,891,639 | 6,517,173 | 4,759 |
| 頭索動物類 | Branchiostomidae | <i>Branchiostoma floridae</i> | - | 不明 | SRR1952655 | AF098298 | 101 | 50,953,181 | 7,243,863 | 543 |

¹⁾ ヒホンカナヘビは、RNA-Seqを行ったものと同じ個体のmtDNA塩基配列、それ以外の種はINSIDデータベースから得られた同種/同属の別個体のmtDNA配列である。「-」は、本研究で得た同種の個体の未発表のmtDNA塩基配列を使用したことを示す。

²⁾ 多くのRNA-Seq readはpair-endで取られたが、「*」が付いているのはsingle-endである。

³⁾ 独立したpolyA含有read数(同一のcDNA断片由来のreadを統合したもの)を示す。「*」はコノオビアルマジロの同じ個体由来のRNA-Seqを統合した値である。

の除去を行った。

RNA-Seq データ由来の同一個体の mtDNA 塩基配列の推定は、RNA 編集によってミトコンドリア RNA に系統的な塩基配列の変化が起こらないという仮定の下で行った。実際、脊椎動物においては、いくつかのミトコンドリア tRNA における RNA 編集の存在が知られているものの(Yokobori and Pääbo, 1995; Börner et al. 1996)、mt-mRNA における RNA 編集は報告されていない。類似の方法による mtDNA 塩基配列の推定は他の研究者によっても鳥類や藻類などで行われている(Nabholz et al., 2010; Tian and Smith, 2016)。

最初に、INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration)データベースから、同種別個体または同属別種の mtDNA 塩基配列(アクセッション番号は表 2 参照)をダウンロードした。Bowtie 1.1.2 (Langmead et al., 2009)を用いて、アダプター配列を除去された RNA-Seq の全 read をこれらの mtDNA 塩基配列に対してデフォルト条件(2 塩基までのミスマッチを許容)でマッピングし、SAMtools(Geeknet, Inc.; Li et al., 2009)により、マップされた read のコンセンサス配列を取得した。このコンセンサス配列を、RNA-Seq 個体について推定された mtDNA 全塩基配列とした。まれに rRNA 遺伝子や MNCR の中に、マッピングされていない領域が存在した。その領域の塩基配列は、同種または同属別種の mtDNA 塩基配列で置き換えた。

2.6 ポリアデニル化サイトの決定

ミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイトを決定するために、二つの方法のいずれかを用いた。1 つ目の方法の概要を図 6 に示す。アダプター配列が除去された RNA-Seq の read に対して、polyA_seq.pl script(補遺 1)を用いて、oligoA 含有 read を検索した。polyA_seq.pl では、3' 末端に A が 7 つ以上連続するか、または 5' 末端に T が 7 つ以上連続する read を検索する。また、次世代シーケンサーのエラーにより、これらのホモポリマー配列の後に余分の塩基が付加される可能性を考慮し(Quail et al., 2012)、連続した A または T の塩基配列の後に一つの別塩基の出現が許される条件に設定した。polyA_seq.pl で検出された oligoA/oligoT 含有 read

をデータベースにし、同一個体の mtDNA の塩基配列をクエリーにした blastn 検索を行った。この操作は BlastStation-Local 64 (TM Software, Inc.)を用いて、E-value e^{-5} で行った。条件に合致した read に対して、Bowtie 1.1.2 を用いて、ミスマッチ許容なしの条件で、同一個体 mtDNA 塩基配列にマップした。この条件で、mtDNA にマップされた read は、もともと mtDNA 上にホモポリマーとして存在した oligoA/oligoT を含むものと判断されるため、全て除去した。マッピングされない read のみを取り出し、Sequencher ver 4.8 を使って、Minimum Match Percentage 80%、Minimum Overlap 20 の条件でアセンブルを行った。その後、5' 末端に oligoT を含むコンティグは相補鎖に変換した。得られたコンティグ配列の 3' 末端の oligoA 配列直前の 20 塩基の領域を mtDNA 軽鎖の塩基配列と照合した。mtDNA 配列中の対応する部位の下流に A が連続する場合、このコンティグは、もともと mtDNA 上に存在した oligoA 配列を持つものと判断できる。これらのコンティグを除去し、残りのコンティグに含まれる read を polyA 含有 read と認めた。この中で同一の cDNA 断片由来のペアエンド read は同じ ID 番号を持つため、これらを Sequencher ver 4.8 上で統合した。残った polyA 含有 read の mtDNA 上へのマッピング位置に基づいて、ポリアデニル化部位を決定した(図 6)。

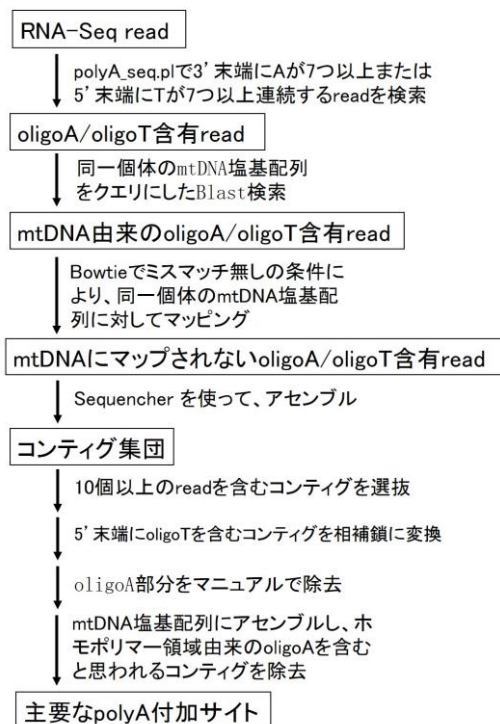


図 6 ミトコンドリア RNA の主要な polyA 付加サイトの決定手順 1

ポリアデニル化部位は、連続した A が始まる直前の mtDNA 上の塩基として同定された。しかし、隣接する tRNA の範囲に基づき、プロセシング位置が明確に特定できる場合は、これらの情報も利用してポリアデニル化部位を特定した。本研究では、同一部位に 10 個以上の polyA 含有 read が対応する地点を主要な polyA 付加サイトとした。全 RNA-Seq read における mtDNA 由来の read の割合や polyA 含有 read の割合は、種間でかなり不均一であり(表 2)、主要な polyA 付加サイトを決定するにあたり、全 read 数などで規格化する基準は用いなかった。

mt-mRNA のポリアデニル化サイトを決定するために用いたもう一つの方法の概要を図 7 に示す。アダプター配列が除去された RNA-Seq read に対し、polyA_seq-A.pl と polyA_seq-T.pl の 2 種類の script を使用し、oligoA 含有 read と oligoT 含有 read を別々に取得した。これらの script は基本的に polyA_seq.pl と同一の条件で動作するが、3' 末端に A が 7 つ以上連続する read と 5' 末端に T が 7 つ以上連続する read を個々に取得する点が異なっている。次に、それぞれで検出

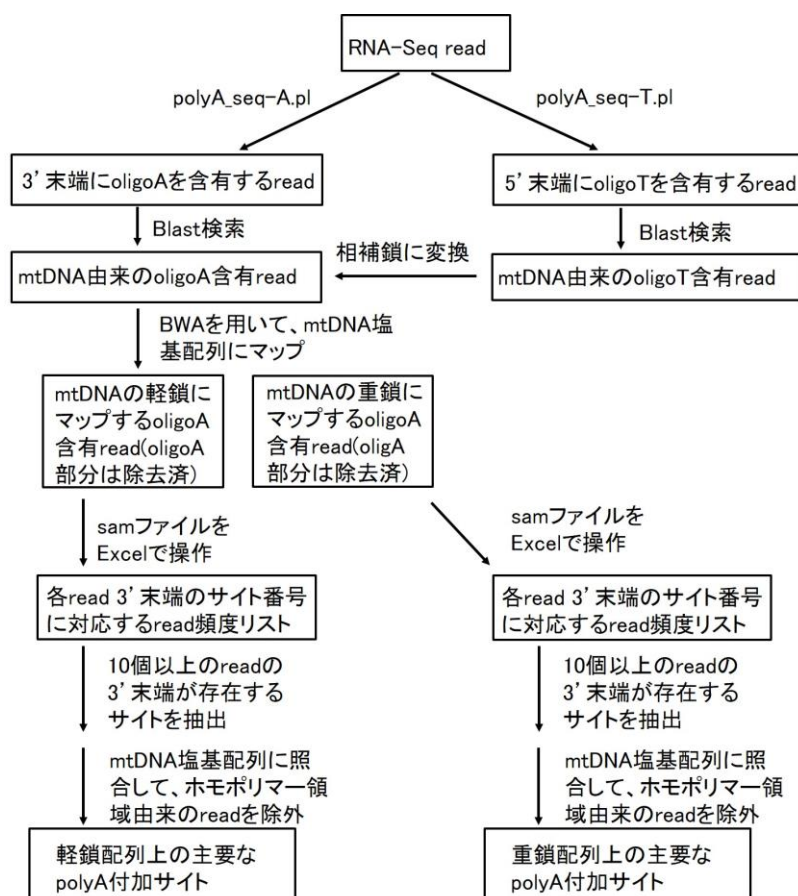


図 7 ミトコンドリア RNA の主要な polyA 付加サイトの決定手順 2

された read をデータベースにし、同一個体の mtDNA の塩基配列をクエリーにした blastn 検索を行い、mtDNA 由来の read を特定した。更に、mtDNA 由来の oligoT 含有 read を自作の script (polyA_seq.pl;補遺 2)を用いて相補鎖の塩基配列に変換し、mtDNA 由来の oligoA 含有 read と統合した。BWA 0.7.15 を用いて、統合した read を mtDNA の軽鎖塩基配列と重鎖塩基配列の両方にマップした。BWA も Bowtie と同様のマッピングソフトウェアであるが、Bowtie より多くのミスマッチを許容できること、末端のミスマッチ塩基配列(例えば oligoA 配列)が除去された状態でマップされるという点が異なっている。この際、oligoA などの末端のミスマッチ塩基は原則として BWA プログラムにより削られる。5' 末端に oligoT を持つ read を相補鎖に変換しておくのは、BWA 0.7.15 によりマップされた後に、oligoA(又は oligoT)部分の位置が不明確になるためである。得られた sam 形式のデータファイルから、軽鎖にマップされた read と重鎖にマップされた read を選別した。

続いて、Excel(Microsoft, Inc)を用いて、軽鎖と重鎖のそれぞれにマップされた read データを解析した。マップされた read の 3' 末端のサイト番号を軽鎖及び重鎖の mtDNA 塩基配列に対応させ、10 個以上の read の 3' 末端が存在するサイトを選抜した。これらのサイトの直下の塩基配列を mtDNA 塩基配列と照合して、A のホモポリマー領域に由来したものをマニュアルで除去した。同じ cDNA 断片由来の read(read ID が同一)を統合した後に、なお 10 個以上の polyA 含有 read によって支持されるサイトを主要な polyA 付加サイトと認めた。

ポリアデニル化サイト周辺(polyA 付加サイトの前後 100 塩基)の二次構造の推定は、DNASIS-Mac ver 3.5 (Hitachi) 及び RNAstructure (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/>)を用いて、デフォルト条件で行った。

2.7 mRNA の 5' 末端位置の推定

本研究では、RNA-Seq read のマップ情報から、各 mRNA の 5' 末端についてのおおよその位置を推定することを行った。アダプター配列を除去された RNA-Seq read (forward read と reverse read 両方)に対して、SolexaQA (Cox et al., 2010)を用いてクオリティー値(Ewing et al., 1998)が 10 より低い配列を除き、鎖長が 20 塩基よ

り短い read を削った。残った read をデータベースにして、同一個体の mtDNA の全塩基配列をクエリーにした blastn 検索 (E-value e^{-5}) を Blast+ のプログラムを用いて行った。条件に合致した read の Sequence ID に基づき、mtDNA 由来の read 配列を fasta 形式で取得した。続いて BWA 0.7.15 を用いて、これらの mtDNA 由来 read を、同一個体の mtDNA 塩基配列に対してデフォルト条件でマッピングした。BWA 0.7.15 からアウトプットされたマッピング情報が含まれた sam ファイルを Samtools (Geeknet, Inc.; Li et al., 2009) により bam 形式に変換した。さらに Bedtools (Quinlan and Hall, 2010) を用いて、mtDNA の各塩基サイトに対して、マップされた read の頻度データを得た。マップされた RNA-Seq read の頻度データを Excel (Microsoft, Inc) に読み込み、あるサイトにおける read 頻度とその 10 塩基上流のサイトにおける read 頻度とを較べ、後者に対する前者の比を、両サイトの中間のサイト番号に対してプロットした。この比の値 (すなわち read 頻度の傾き) が大きく上昇し、1.5 倍またはそれ以上 (鳥類の ND6 mRNA に対しては、0.67 またはそれ以下: 後述) を超えるサイトを、mRNA の 5' 末端の候補とした。Read 頻度の低い領域では、頻度がゆらぎによって少し増えたり減ったりするだけで、read 頻度の傾きが大きく変化し、誤ったシグナルを与えることがあった。そこで、上記の mRNA の 5' 末端の候補のうち、マップされた read 頻度が 1500 を下回る地点は候補から外した。

2.8 未成熟転写産物の相対量比の評価

mtDNA 由来の RNA-Seq read をデータベースにし、mtDNA 重鎖にコードされる各タンパク質遺伝子 (ATP8 と ATP6 の遺伝子はオーバーラップしているため、一つのユニットとみなす。ND4L と ND4 も同様に一つのユニットとみなす) のコード領域の塩基配列をクエリーとして、blastn 検索 (E-value e^{-5}) を行い、条件に合致した read の Sequence ID に基づき read 数をカウントした。read 数を各遺伝子の長さで次世代シーケンサーで読まれた read の総数で規格化した値である RPKM (Mortazavi et al., 2008) を計算した。さらに、tRNA 遺伝子クラスター領域 (IQM, WANCY 及び HSL) に対応する RPKM も計算した。一般的に行われる RNA-Seq の実験上の制約により、100 塩基以下の短い DNA 断片を含む construct はライブラリーからほぼ除

かされている。成熟型のミトコンドリア tRNA 分子の場合、その鎖長は 80 ヌクレオチド以下である。また、その末端に polyA 配列が付いていないため、oligo-dT カラムへも吸着しないことから、実験の初期段階において、polyA RNA 画分から除外される。従って、成熟型のミトコンドリア tRNA 分子に由来する RNA-Seq read は、殆ど検出されないはずである。従って RNA-Seq において、ミトコンドリア tRNA 遺伝子領域に相当する read があれば、それはより長鎖の未成熟型ミトコンドリア RNA に由来するものと合理的に仮定できる。そこで、この 3 つの tRNA 遺伝子クラスター領域の RPKM の平均値を計算し(ただし tRNA 遺伝子クラスター領域に主要な polyA 付加サイトが出現した場合、隣接する mRNA のポリアデニル化サイトとなっている可能性があるため、その領域に対応する RPKM 値を含めない)、各 mRNA に対応する RPKM の平均値と比較し、未成熟転写産物の相対量比を推定した。

第三章. 結果

3.1 ニホンカナヘビの mtDNA と RNA-Seq

ニホンカナヘビ実験個体の筋肉から DNA を抽出し、種特異的なプライマー (表 1) を用いて約 1.5kbp の DNA 断片を増幅し、シーケンシングを行った。得られた配列をアセンブルし、ほぼ完全長のミトコンドリア DNA 塩基配列(17,923 塩基対)を決定した(INSID アクセション番号:LC101816)。MNCR の 5' 末端において、65 塩基のリピート配列が少なくとも 10 回繰り返しており、この領域の配列を正確に決定するのが難しかったため、mtDNA 全塩基配列を決定することはできなかった。この mtDNA 塩基配列において、ヘテロプラズミー(同一個体内の塩基多型)を示すサイトは存在しなかった。決定した mtDNA 塩基配列における遺伝子の配置(図 8)は、別個体のニホンカナヘビで報告された配置(Kumazawa, 2007)、及びヒト(Anderson et al., 1981)とマウス(Bibb et al., 1981)の配置と同じであった。

HiSeq 型次世代シーケンサーを用いて、同一個体のニホンカナヘビ肝臓由来の cDNA 断片塩基配列を、ペアエンドで両側より 101 塩基ずつ読み取った(合計 53,655,734 reads; DDBJ Sequence Read Archive アクセション番号 DRR072216)。全ての読み取った read をデータベースにし、同一個体の mtDNA 塩基配列をクエリーにして、blastn 検索を行った。その結果、3,627,027 個(6.8%)(表 2)のミトコンドリア RNA 由来の cDNA 断片 reads(DDBJ Sequence Read Archive アクセション番号 DRZ007676)が見つかった。すなわち RNA-Seq 全リードのうち 7%程度が mtDNA からの転写物に由来することが示された。

次に、bowtie 1.1.2 を用いて、cDNA 断片の read 配列を同一個体の mtDNA 塩基配列にマッピングして、マップされた read のコンセンサス配列を取得した。その結果、本研究で用いたニホンカナヘビ個体の 2 個の rRNA 遺伝子と 13 個のタンパク質遺伝子の塩基配列と RNA-Seq 由来の cDNA 塩基配列は完全に一致することが分かった(data not shown)。また、Samtools による一塩基多型の検出限界(25%)以上の頻度での一塩基多型も見られないことが分かった。すなわち、これらの RNA には RNA 編集が検出されなかった。

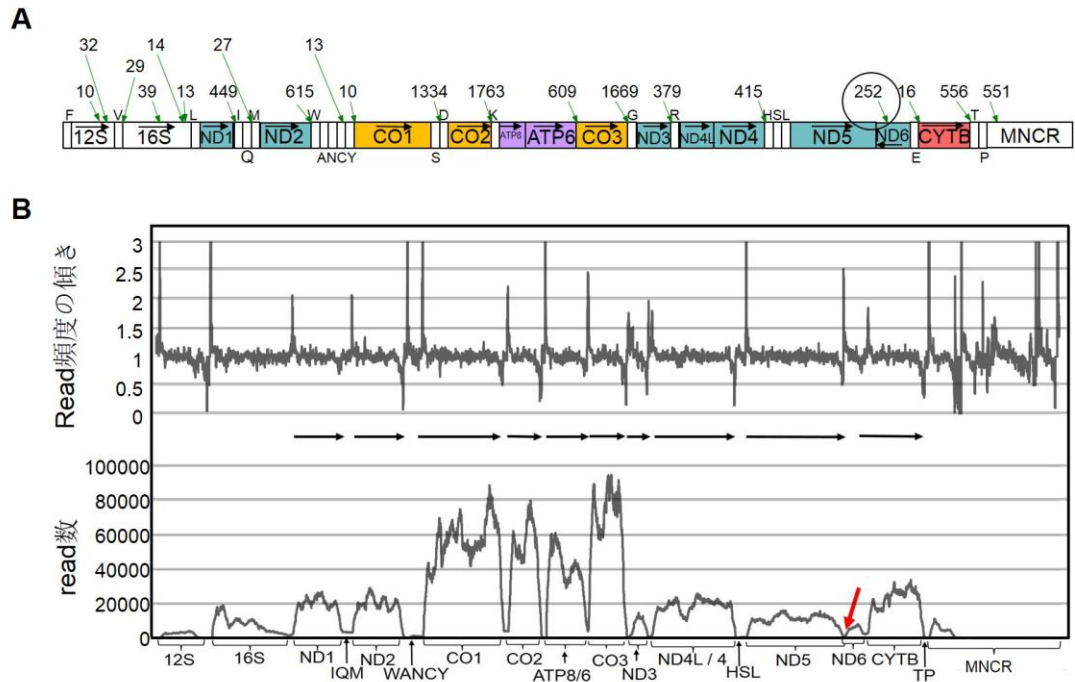


図8 ニホンカナヘビミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト

A. ニホンカナヘビの mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。軽鎖配列上の polyA 付加地点を下向きの矢印で、重鎖配列上の polyA 付加地点を上向きの矢印で示す(ニホンカナヘビでは、重鎖上の主要な polyA 付加サイトは検出されなかった)。10 個以上の独立の polyA 含有 read で支持された地点を主要な polyA 付加サイトとした。本文中で言及したヒトと異なる主要な polyA 付加サイトを丸枠で強調して表示する。B. ニホンカナヘビの RNA-Seq データを mtDNA 塩基配列へマッピングした結果を示す。下部にはニホンカナヘビの mtDNA 配列各サイトに対して、マップされた read の数を表示する。赤い矢印は ND5 mRNA の新規 polyA 付加サイトに対応する。上部は各サイトの read 頻度の傾き(第二章第七節を参照)を示し、中段の矢印は推定された mt-mRNA の方向と範囲を表す。遺伝子の略号などの説明は図 1 に準ずる。

3.2 ニホンカナヘビ mt-mRNA の polyA 付加サイト

図 6 に示す方法に基づき、polyA-Seq.pl script を用いて、ニホンカナヘビミトコンドリア RNA 由来の read のうち、polyA を含む read(9,753 個)を同定した。さらに、10 個以上の独立した polyA 含有 read によって polyA 付加が支持された地点を主要な polyA 付加サイトとして同定した(図 8)。合計 8,795 個の独立した polyA 含有 read が、これら主要な polyA 付加サイトにマップされた。残りの polyA 含有 read(958 個)に対応する polyA 付加地点は、10 個未満の read を伴って polyA が付加された

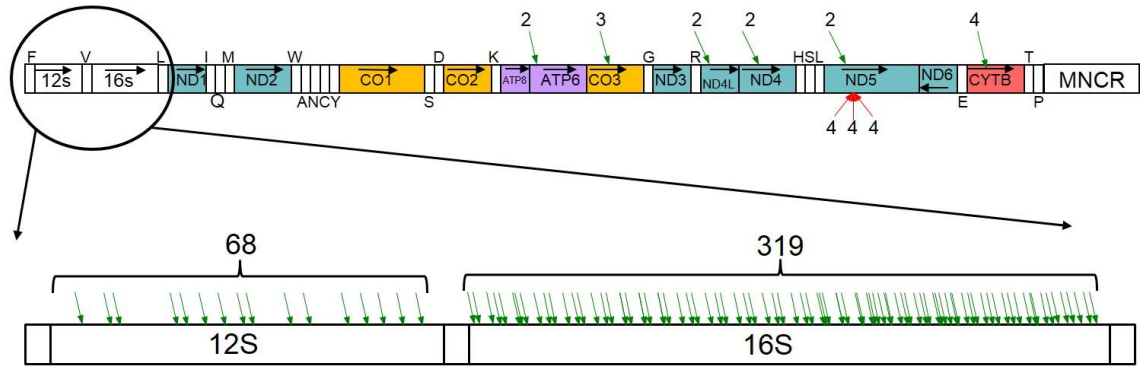


図9 ニホンカナヘビミトコンドリア RNA のマイナー polyA 付加サイト
2-9 個の polyA 含有 read によって支持された polyA 付加地点(マイナー polyA 付加サイト)
を read 数と共に示す。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

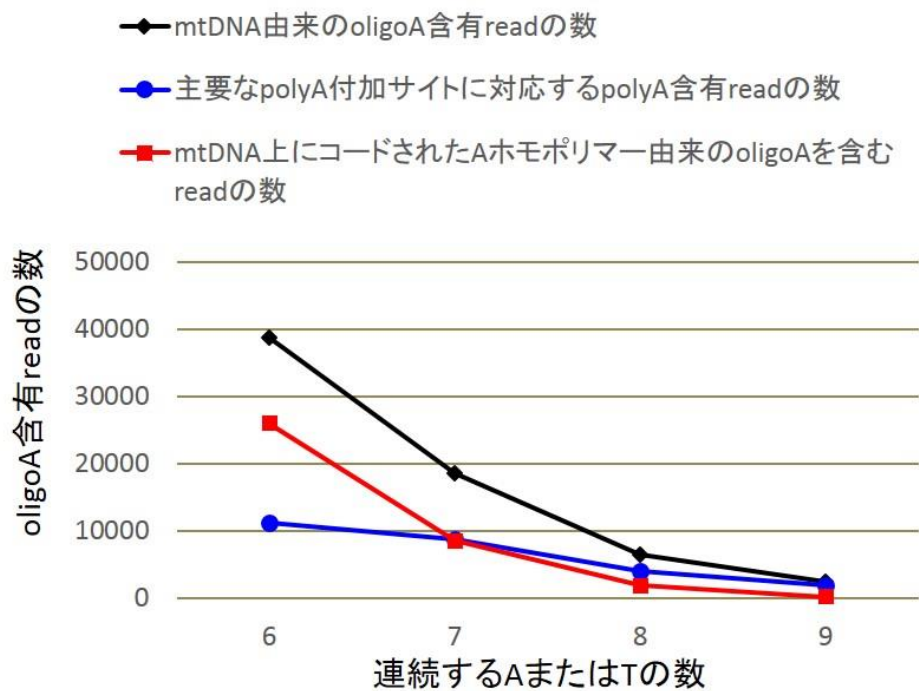


図10 異なる条件で polyA_seq.pl プログラムを使用して得られた read 数
ニホンカナヘビの RNA-Seq データを用いて、連続する A または T の数が異なる条件で、
polyA_seq.pl プログラムを動かした。得られた mtDNA 由来 oligoA 含有 read の数を黒色の
プロットで示した。青プロットは主要な polyA 付加サイトに対応する polyA 含有 read の数。赤
プロットはもともと mtDNA 上に含まれる A のホモポリマーを含むため、ノイズとして除去され
るべき oligoA 含有 read の数。

マイナーpolyA 付加サイト (図 9)及び単独の read がマップされたサイトであった。

この操作に先立ち、polyA-Seq.pl script における A または T の連続数を 7 以外に設定する条件検討を行った(図 10)。A または T の連続数を 7 より小さく(例えば 6 に)すると、検出された mtDNA 由来の oligoA 含有 read に含まれるノイズの read(もともと mtDNA 上にコードされるホモポリマー由来の oligoA を含む read)の割合が多くなってしまい、polyA RNA に由来する read を正しく同定する操作が非常に煩雑となった。一方、A または T の連続数の設定を 7 より高く(たとえば 8 または 9 に)すると、検出できる polyA 含有 read の数が大幅に減ってしまうことが分かった(図 10)。従って、A または T の連続数を 7 に設定するのが最適であると判断し、他種に関する同様の操作はこの条件で行うことにした。

ニホンカナヘビにおいて同定された主要な polyA 付加サイト(図 8A)では、すべて軽鎖の塩基配列(重鎖を鋳型にして転写されたもの)の 3' 末端に polyA が付加しており、重鎖の塩基配列に対する主要な polyA 付加サイトは 1 つも見出されなかった。その結果、重鎖から転写された 10 個の mt-mRNA(ATP8/ATP6 および ND4L/ND4 の mRNA はジストロニック mRNA であるため、それぞれ一つの mRNA ユニットである)に対応する主要な polyA 付加地点が同定された(図 8)。

2 個から 9 個までの read が対応するマイナーpolyA 付加地点(図 9)のうち、12S rRNA 及び 16S rRNA における多数の polyA 付加地点を除いて、9 個の polyA 付加地点が見られた。そのうち、6 個の polyA 付加地点が軽鎖の塩基配列にあり、残りの 3 個が重鎖の塩基配列にあった。前者の 6 個の polyA 付加地点はタンパク質遺伝子のコード領域の途中にあり、各 mRNA の 3' 末端とかなり離れていた。一方、後者の 3 個の polyA 付加地点は、ND5 遺伝子アンチセンス鎖上の近接した地点に見出された。これらのマイナーpolyA 付加地点に対応する polyA 含有 read の数が比較的少数であったことも併せると、これらの地点への polyA 付加が遺伝的にプログラムされたものであると考える確かな証拠は得られなかった。

重鎖にコードされる 12 個のタンパク質遺伝子のうち 6 個では、完全な終止コドンが mtDNA 上にコードされておらず、polyA 付加されることにより UAA 終止コドンが生じる(表 3)。ND1 遺伝子では、ND1 遺伝子の終止コドン(TAA)が mtDNA 上にコードされており、その直後(すなわち tRNA^{leu} 遺伝子の直前)に 449 個の polyA 含

| mRNA | 終止 コドン ¹ | コード領域の 鎖長 (bp) | マップされ たread数 | RPKM |
|-----------|------------------------|-------------------|-----------------|--------|
| ND1 | UAA | 972 | 198,888 | 3,814 |
| ND2 | U | 1,033 | 209,267 | 3,776 |
| CO1 | AGG | 1,545 | 918,138 | 11,075 |
| CO2 | U | 688 | 350,968 | 9,507 |
| ATP8/ATP6 | UA | 832 | 341,426 | 7,648 |
| CO3 | U | 784 | 533,251 | 12,677 |
| ND3 | U | 346 | 33,884 | 1,825 |
| ND4L/ND4 | U | 1,671 | 318,186 | 3,549 |
| ND5 | UAA | 1,827 | 225,394 | 2,299 |
| CYTB | UAA | 1,143 | 271,205 | 4,422 |
| 計 | | - | 3,400,607 | 60,592 |
| IQM | - | 209 | 9,913 | 884 |
| WANCY | - | 373 | 4,456 | 223 |
| HSL | - | 204 | 1,781 | 163 |

¹終止コドンがmtDNA上にコードされていない場合、polyA付加により完全な終止コドンを生じる

有 read が見つかった(図 8A)。また、ND2 遺伝子の 3' 末端の塩基は T で、直下のプロセッシング切断地点に polyA が付加することにより、終止コドン UAA を生じる。この位置に polyA 付加された read は 615 個が見つかった。そのほか、CO1 遺伝子では tRNA^{Asp} 遺伝子の直前に 1334 個の polyA 含有 read が見つかった。CO2、ATP8/ATP6、CO3、ND3、ND4L/ND4、CYTB の各遺伝子では、それぞれの遺伝子の読み枠の直下の位置に、図 8A に示す数の polyA 含有 read が見つかった。

一方、ND5 遺伝子の下流には、2 箇所の polyA 付加地点が見つかった(図 8A)。1つは、ヒト(Ojala et al., 1981)と同じ位置で、CYTB 遺伝子の直前に 16 個の polyA 含有 read が存在した。もう一つは、ND5 遺伝子の終止コドンの 113 塩基下流(ND6 遺伝子のアンチセンス鎖上)で、252 個の polyA 含有 read が見つかった。3' RACE 法による実験的検証を行ったところ、ニホンカナヘビ ND5 mRNA の主要な polyA 付加地点は後者の位置であることが確認された(図 11)。一方、軽鎖にコードされる ND6 遺伝子のストップコドンの 3' 末端直下あるいは、その下流に主要な polyA 付加サイトは見つからなかった(図 8A)。このことは過去のヒトでの知見(Temperley et al., 2010; 図 4)と整合的である。ニホンカナヘビにおいても、軽鎖から転写された ND6 mRNA には、ほとんど polyA 付加が行われていないと考えられる。

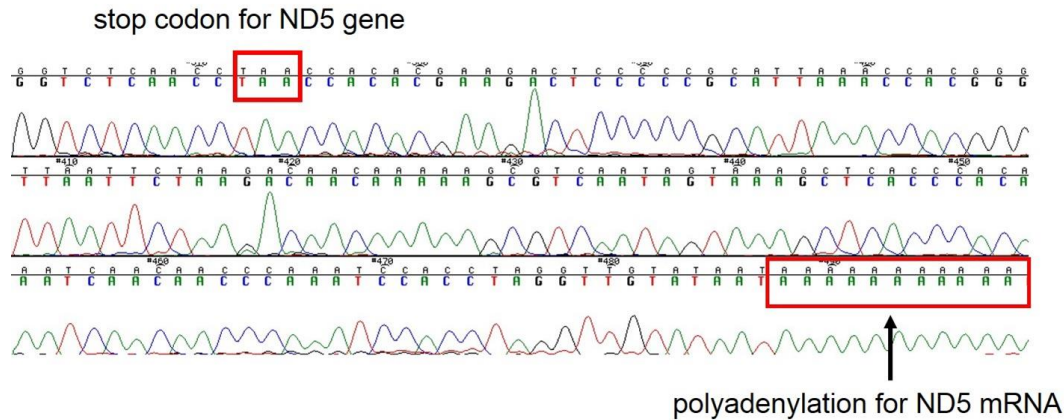


図 11 3' RACE 法を用いたニホンカナヘビ ND5 mRNA の polyA 付加サイトの検証
種特異的なプライマーを使って、ND5 mRNA の 3' 末端の塩基配列を増幅する RT-PCR を
行った。増幅した産物をクローニングして、24 個のコロニーから得られた塩基配列(すべて
同一)をエレクトロフェログラムの画像と共に示す。上の赤枠は mtDNA 上にコードされた
ND5 遺伝子の終止コドンを表す。下の赤枠は付加された polyA 塩基配列の一部を示す。

全ての主要な polyA 付加サイトが mRNA の 3' 末端直下に存在している訳ではなかった(図 8A)。例えば、rRNA 遺伝子の領域内の 6 箇所でも、主要 polyA 付加サイトが見つかったが、それぞれのサイトにおける read の数は 10 個から 39 個と比較的少なかった。さらに、551 個の polyA 含有 read が、MNCR 中の 65 塩基からなる repeat 配列の内部に見つかった。この繰り返し配列は少なくとも 10 回繰り返しており、何番目の繰り返し単位に polyA 付加されているのかは、利用できるデータから判断できなかった。この点に関して、MNCR 内の塩基配列でポリアデニル化された比較的長い非コード RNA (375nt) の存在が魚類のタラで報告されている(Jørgensen et al., 2014)。この非コード RNA の機能はまだよく分かっていないが、両方の鎖からの転写を調節する役割があるのではないかと考えられている(Jørgensen et al., 2014)。

「IQM」と「WANCY」の tRNA 遺伝子クラスター中にも主要な polyA 付加サイトが存在した(図 8A)。「IQM」内では、27 個の polyA 含有 read が tRNA^{Met} 遺伝子の直前に付加された。これら 27 個の polyA 含有 read と同じ cDNA 断片由来のペアエンド read の 5' 末端の位置を調べたところ、8 個の断片については、ND1 遺伝子のコード領域内に同定された(図 12 A)。すなわち、これら 8 個の read が由来したミトコンドリア RNA は、ND1 コード領域中から tRNA^{Met} 遺伝子の直前まで伸びていたことが示された。このことから、IQM 領域中に polyA 付加したミトコンドリア RNA は、

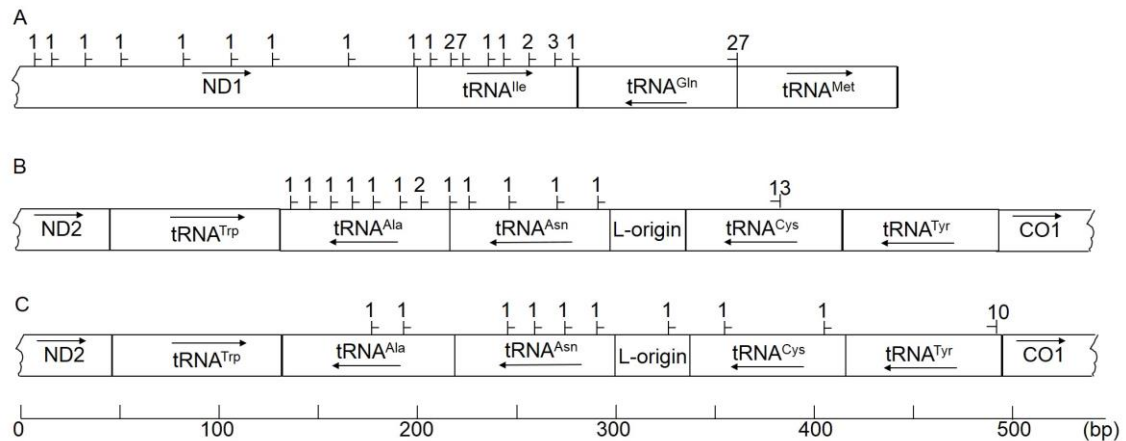


図 12 ニホンカナヘビ tRNA 遺伝子クラスター中に発見された主要 polyA 付加サイトに対応する cDNA 5' 末端のマッピング

各 read の 5' 末端の位置を“+”で表示し、その位置に対応する read の数を数字で示す。A) tRNA^{Gln} 遺伝子中に発見された 27 個の polyA 含有 read に対応する cDNA 断片の 5' 末端の位置。B) tRNA^{Cys} 遺伝子中に発見された 13 個の polyA 含有 read に対応する cDNA 断片の 5' 末端の位置。C) tRNA^{Tyr} 遺伝子中に発見された 10 個の polyA 含有 read に対応する cDNA 断片の 5' 末端の位置。この 10 個の read のうちの 1 つでは、5' 末端マッピングができなかった。

ND1 mRNA の機能を持つ可能性があるかと推測される。一方、ND1 遺伝子コード領域の直下(tRNA^{Ile} 遺伝子の直前)にも、449 個の polyA 含有 read が存在していることから、ND1 mRNA はこの地点に polyA 付加されると考えられる。それに加えて、tRNA^{Met} 遺伝子の直前にも二次的な polyA 付加サイトを持つのかかもしれない。もう一つの可能性は、後者が何等かのプロセッシング中間体に由来すると考えるものであるが、これらの可能性を区別することは現時点では難しい。

一方、「WANCY」には 2 か所の主要 polyA 付加サイトが見つかった。1 つは tRNA^{Cys} 遺伝子のアンチセンス鎖上に 13 個の polyA 含有 read を伴って存在した。もう一つは tRNA^{Tyr} 遺伝子のアンチセンス鎖上に、10 個の polyA 含有 read を伴って存在した。これらの polyA 付加地点に対して、ペアエンド read の 5' 末端の到達地点を調べたところ、ND2 遺伝子コード領域にまで伸びるものは一個もなかった(図 12 B,C)。ただし、RNA-Seq で解析される cDNA 断片が比較的短いことを考慮すると、対応するミトコンドリア RNA が ND2 コード領域から伸びている可能性を完全に否定することは困難である。これらの結果より、WANCY 領域内のポリアデニレーションサイトに対応する RNA がどのような構造及び機能を持つのかについては判断する証拠が得られなかった。

3.3 ニホンカナヘビの mt-mRNA 構造の推定

ニホンカナヘビ mt-mRNA の 3' 末端の位置は、前述のように主要 polyA 付加サイトの位置からほぼ正確に決定できた。もし、これらの mt-mRNA の 5' 末端の位置に関する情報も得られれば、個々の mt-mRNA の方向と範囲を知ることができる。この目的のため、ニホンカナヘビの mtDNA 由来 RNA-Seq read を同一個体の mtDNA 塩基配列へマップして、各サイトに対してマップされた read の数を数えた(図 8B)。その結果、tRNA 遺伝子領域や MNCR 内では、マップされた read 数が比較的少なかったのに対し、タンパク質のコード領域内にマップされた read 数は多いことが示された(図 8B)。その理由としては、ライブラリー調製の際に、polyA 付加のない RNA が oligo-dT ビーズに付着せず除かれているはずであること、100 塩基以下の RNA(例えば tRNA)に由来する construct を除去する過程があること、が考えられる。一方、mRNA 領域では、検出される read 数が急激に増加することになるため、read 頻度が大きく(本研究では 1.5 倍以上と設定)上昇する地点が mRNA の 5' 末端付近に存在すると予測される。この仮定をもとに、ニホンカナヘビ mt-mRNA の 5' 末端のおおよその位置を推定した(図 8B)。

例えば、CO1 遺伝子のコード領域に対してマップされた read は、CO1 コード領域の開始位置(tRNA^{Phe} 遺伝子からカウントして、5,285 番目の塩基)付近から急増し、終止コドンを超えても大きく減少せず、CO1 mRNA の polyA 付加サイト(tRNA^{Asp} 遺伝子直前の 6,898 番目塩基)付近で急減した。これらのことから CO1 の成熟型 mRNA は 5,290 番(read 数の頻度の変化が 1.5 倍を超える位置)付近から 6898 番までと推定された(図 8B)。この両末端の位置は哺乳類でこれまでに同定されている CO1 mRNA のもの(tRNA punctuation model から予想される範囲)とほぼ同じである(Montoya et al., 1981; Ojala et al., 1981; Mercer et al., 2011; Marková et al., 2015)。同様に、ND1、ND2、CO2、ATP8/6、CO3、ND3 及び CYTB 遺伝子の成熟型 mRNA は、それぞれの開始コドン周辺から主要 polyA 付加地点までと推定された(図 8B)。

ただし、この方法は mt-mRNA の 5' 末端を 1 塩基レベルの精度で正確に同定するものではない。これらの mt-mRNA について推定された 5' 末端の位置は、各 mt-mRNA コード領域の開始位置より 5~24 塩基(平均 16 塩基)下流に存在した

(data not shown)。これは、mRNA の 5' および 3' 末端付近に由来する RNA-Seq read が、比較的少なくなる(Levin et al., 2010; Brown and Goecks, 2015)ことに1つの原因がある。さらに、ミトコンドリア転写物の場合、未成熟ポリシストロニック転写物が、成熟型 mt-mRNA よりもはるかに少ない量ではあるが(第四章第一節参照)、一定割合で存在する。このため、未成熟転写物由来の RNA-Seq read の混在が、成熟 mt-mRNA の 5' 末端の位置同定を不明瞭にするという要因も考えられる。

polyA 付加のない ND6 mRNA は、そもそも RNA-Seq read 中に現れないので、RNA-Seq read をもとに ND6 mRNA の 5' 末端を推定することは困難であった。

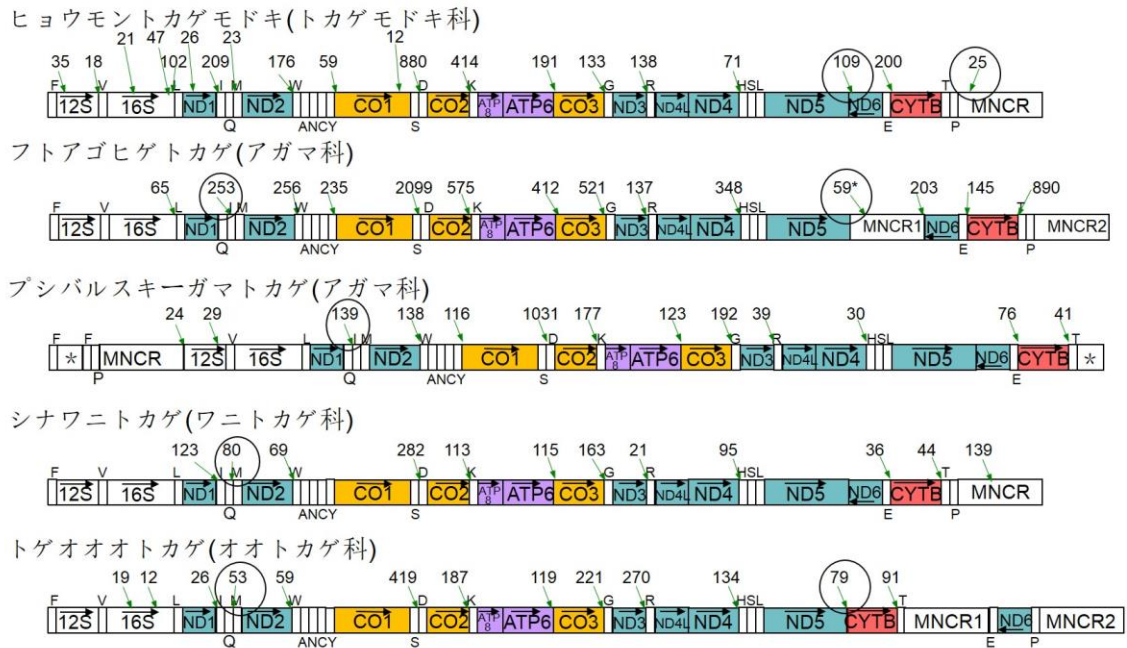
3.4 他種の mt-mRNA における polyA 付加サイト

ニホンカナヘビと同じ方法を用いて、他の 60 種(表 2)におけるミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイトをゲノムワイドで同定するとともに、各 mt-mRNA の方向と範囲を同定した(補遺 3)。その結果、mt-mRNA に対する polyA 付加の位置及び mt-mRNA の方向と範囲は、32 種(ヒトを含む)においてヒトと共通であることが示された。一方、残りの 29 種(トカゲ類 5 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、ヒトと異なる点があることが分かった。

3.4.1 トカゲ類

本研究では、ニホンカナヘビ以外に 9 種のトカゲ類を調べた。そのうちの 4 種(ホクベイスベトカゲ、カキネハリトカゲ、イボヨルトカゲ、ヤシヤモリ)はヒトと類似した mt-mRNA の polyA 付加サイトを持っていたが(図 13B)、他の 5 種ではヒトと異なるサイトが見られた(図 13A)。ヤモリ類のヒョウモントカゲモドキは典型的な mtDNA 遺伝子配置を持つが、ND5 及び CYTB mRNA の polyA 付加サイトがヒトとは異なっていた。ND5 mRNA では、ニホンカナヘビと同様に、2 箇所の polyA 付加地点が見つかった。1つは、CYTB 遺伝子の直前で、200 個の polyA 含有 read が対応した。もう一つは、ND5 遺伝子の終止コドンの 79 塩基下流(ND6 遺伝子のアンチセンス鎖

A



B

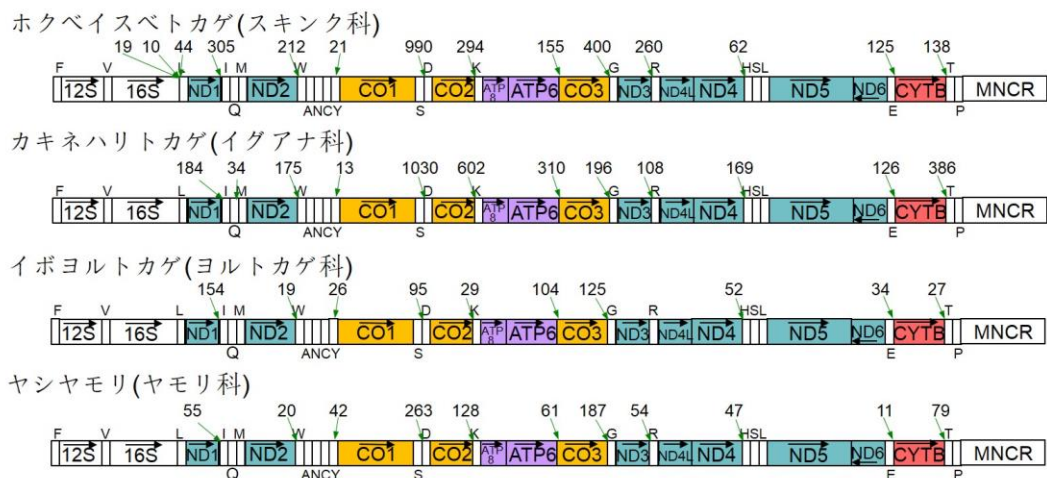


図 13 トカゲ類ミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト

A. ヒトと異なった polyA 付加サイトが存在した種。B. ヒトと似通った polyA 付加サイトを持つ種。フトアゴヒゲトカゲの MNCR1 に表示された polyA 付加サイト(*で示す)は、MNCR1 のものか MNCR2 のものか不明である。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

上)に 109 個の polyA 含有 read を伴って見つかった(図 13A)。

一方、CYTB 遺伝子の終止コドンの直後には polyA 付加サイトが見つからず、MNCR の繰り返し領域に 25 個の polyA 含有 read を伴った主要 polyA 付加サイト

が発見された。ヒトの CYTB mRNA の polyA 付加サイトは、tRNA^{Thr} 遺伝子の 5' 末端に存在する(図 4; Ojala et al., 1981)。しかし、ヒョウモントカゲモドキでは、この polyA 付加サイトが完全に消失していた。ヒョウモントカゲモドキにおける RNA-Seq read のマッピング結果(図 14)を見ると、CYTB 遺伝子の終止コドン付近に read 頻度の低下が認められず、このことは CYTB mRNA の polyA 付加サイトが MNCR 内へ伸長したことを示唆する。MNCR 内に発見された主要 polyA 付加サイトは、62 塩基の繰り返し配列内に位置し、何番目の繰り返し単位においてポリアデニル化が起きているかを特定することは困難であった。

アガマ科の 2 種(フトアゴヒゲトカゲとプシバルスキーガマトカゲ)では、ND1 遺伝子下流の「IQM」tRNA 遺伝子クラスターに配置変動があり、IQM の遺伝子配置は QIM になっている。これらの種では、ND1 mRNA の polyA が、ND1 遺伝子の直下に付加されず、移動した tRNA^{Ile} 遺伝子の 5' 末端の直前に付加されていた(図 13A)。また、フトアゴヒゲトカゲでは、ND5 遺伝子の下流に重複した MNCR が位置

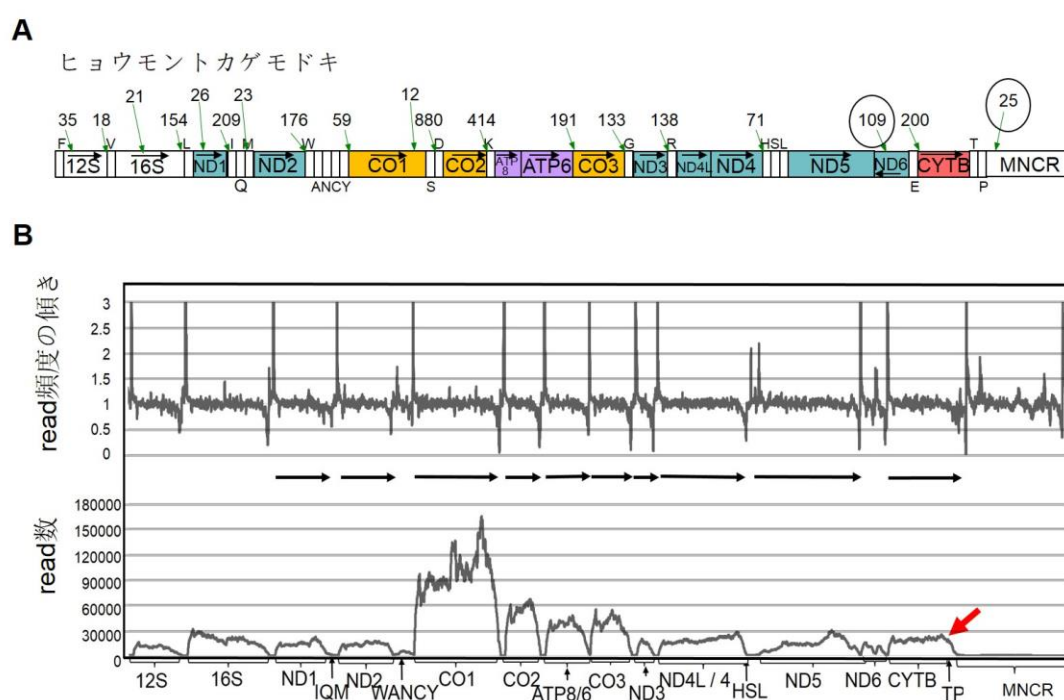


図 14 ヒョウモントカゲモドキミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト
A. ヒョウモントカゲモドキの mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。B. ヒョウモントカゲモドキの RNA-Seq データを mtDNA 塩基配列へマッピングした結果を示す。赤い矢印は CYTB 遺伝子の終止コドンの位置を示す。図の説明の詳細は図 8 に準ずる。

し、ND5 遺伝子の終止コドンの下流 355 塩基に 59 個の polyA 含有 read を伴う新しい polyA 付加サイトが見つかった。但し、MNCR は重複して 2 箇所が存在し、これらの塩基配列はほぼ同一であるため、どちらの MNCR に対する polyA 付加なのかは厳密に決定できなかった。

オオトカゲ科のトゲオオトカゲでは、大規模な mtDNA 遺伝子配置変動があり、ND5 遺伝子の直下に CYTB 遺伝子が位置し、tRNA^{Thr} 遺伝子、MNCR、tRNA^{Glu} 遺伝子、逆鎖にコードされる ND6 遺伝子が続いている。この種では、CYTB 遺伝子の直前に、79 個の polyA 含有 read を伴う主要 polyA 付加サイトが見つかった(図 13A)。この polyA 付加サイトは ND5 mRNA のものと考えられる。一方、トゲオオトカゲとシナワニトカゲの「IQM」tRNA 遺伝子クラスター領域には、遺伝子配置変動がないにもかかわらず、tRNA^{Met} 遺伝子の直前に新たな主要 polyA 付加サイトが生じていた。これらの polyA 付加サイトは ND1 mRNA のものである可能性があるが、両種では tRNA^{Leu} 遺伝子の直前にも主要 polyA 付加サイトが存在しており、これらが主に機能しているものと考えられる(図 13A)。

3.4.2 ヘビ類

本研究では 4 種のヘビ類(ヌママムシ、コーンスネーク、ロージーボア、サンビームヘビ)を調べた(表 2)。これらのヘビ類の mtDNA では、tRNA^{Leu} 遺伝子が配置変動を起こして ND1 遺伝子の 5' 側から 3' 側へ転位し、IQM 領域内にもう一つの制御領域が存在することが知られている(Kumazawa et al., 1996)。また、これら重複した制御領域はほとんど同じ塩基配列を持つことも分かっている。これら 4 種のヘビの mt-mRNA に対する polyA 付加サイトは、ヒトと類似した位置に同定された(図 15)。また、重鎖から転写された各 mRNA の方向と範囲もヒトで同定されているもの(図 4)とほぼ一致することが分かった(補遺 3:11-14)。

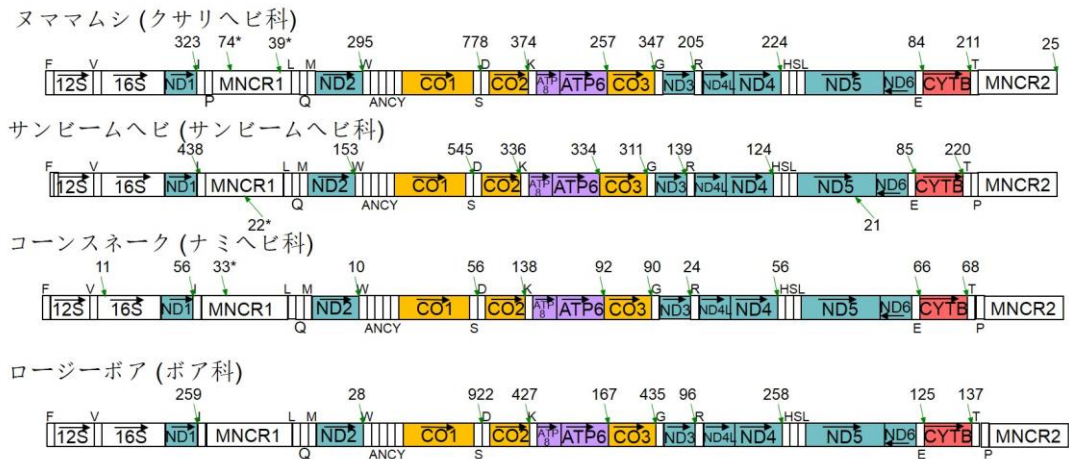


図 15 ヘビ類ミトコンドリア mRNA の主要 polyA 付加サイト

本研究で取り上げたヘビ類の mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。全種でヒトと似通った polyA 付加サイトが見られた。但し、MNCR1 に表示された polyA 付加サイト(*で示す)は、MNCR1 のものか MNCR2 のものか不明である。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

3.4.3 カメ類

今回調べた 4 種のカメ類(表 2)は、ヒトと同じ mtDNA 遺伝子配置を持つ(図 16)。このうち、ミシシッピニオイガメでは、mt-mRNA の polyA 付加サイトがヒトと類似していたが(図 16B)、3 種(カミツキガメ、クイロハコヨコクビガメ、カロリナハコガメ)では異なる点があった(図 16A)。まず、これら 3 種の ND5 mRNA の polyA 付加サイトは、CYTB 遺伝子の直前の位置ではなく(この地点に対応する polyA 含有 read はなし)、もっと上流に移動していた(図 16A)。カミツキガメでは、ND5 遺伝子の終止コドンの 287 塩基下流(ND6 遺伝子のアンチセンス鎖上)に 28 個の polyA 含有 read が見つかった。カロリナハコガメでは、ND5 遺伝子の終止コドンの 70 塩基下流(ND5 遺伝子と ND6 遺伝子の境界にあるスパーサー上)に 646 個の polyA 含有 read が見つかった。クイロハコヨコクビガメでは、ND5 遺伝子の終止コドンの 11 塩基下流(ND5 遺伝子と ND6 遺伝子の境界にあるスパーサー上)に 110 個の polyA 含有 read が見つかった。クイロハコヨコクビガメの RNA-Seq read のマッピング結果を見ても(図 17)、ND5 コード領域の直後に大きな read 頻度の低下が見られ、ND6 遺伝子のコード領域全域にわたって read 頻度は低レベルであった。この観察結果は、ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域の大幅な短縮と整合的である。

また、クリイロハコヨコクビガメの ATP6 遺伝子の 3' 末端直後に、主要 polyA 付加サイトが見つからなかった(図 16-17)。Read 頻度のプロット結果をみても、ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の境界(図 17 B の赤矢印地点)に read 頻度の変化が一切見えなかった。本研究で調べた他の脊椎動物では、ATP6 遺伝子の直後に read 頻度の低下が見られたことから(補遺 3 参照)、クリイロハコヨコクビガメでは、ATP8/ATP6 mRNA と CO3 mRNA の構造に大きな変化が生じていると思われる(第四章第二節第四項に後述)。

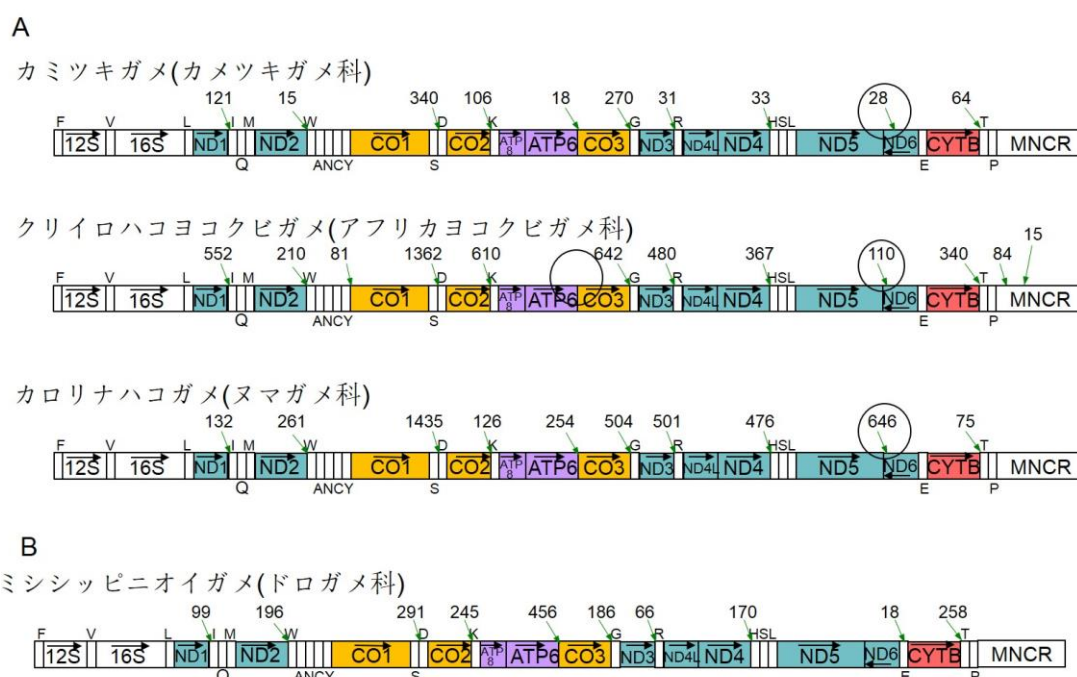
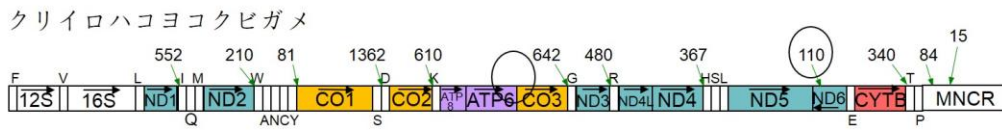


図 16 カメ類ミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト
 本研究で取り扱ったカメ類の mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。A.ヒトと異なった polyA 付加サイトが存在した種。B.ヒトと似通った polyA 付加サイトを持つ種。
 図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

A



B

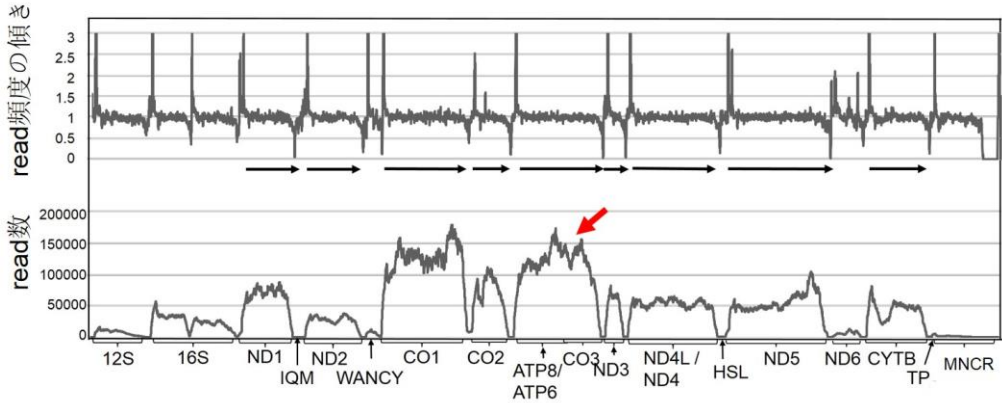


図 17 クライロハコヨコクビガメミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト
 A. クライロハコヨコクビガメの mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。B. クライロハコヨコクビガメの RNA-Seq データを mtDNA 塩基配列へマッピングした結果を示す。赤い矢印は ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の境界の位置に対応する。図の説明の詳細は図 8 に準ずる。

3.4.4 ワニ類

ワニ類からはアメリカアリゲーターの RNA-Seq データの解析を行った。本種の mtDNA では、HSL tRNA 遺伝子クラスターの SHL への変化が見られる(Kumazawa and Nishida, 1995)。また、tRNA^{Phe} 遺伝子が MNCR の 5' 側へ転位した遺伝子配置変動も存在する(Quinn and Mindell, 1996; Janke and Arnason, 1997)。本種では、ND4 mRNA の 3' 末端に位置する 970 個の polyA 含有 read に加え、ND4 遺伝子の途中(ND4L 遺伝子の終止コドンの 647 塩基下流)に 133 個の polyA 含有 read が発見された(図 18A)。RNA-Seq read のマッピング結果(図 18B)をみると、後者の polyA 付加地点で read 頻度の部分低下がみられたが、read 頻度はこの地点で完全にゼロになってはいなかった。このことから、ND4L/ND4 mRNA は他種同様に ND4 コード領域の直下(tRNA^{Ser} 遺伝子の直前)に polyA 付加されるものの、ND4 コード領域の途中に polyA 付加される ND4L mRNA も部分的に存在するものと考えられる。

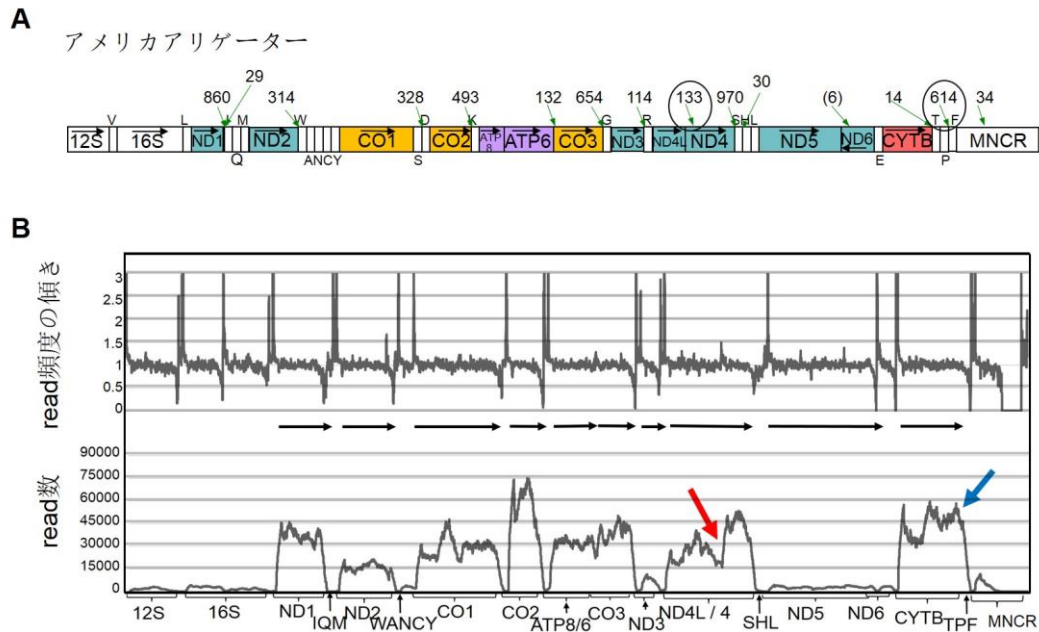


図 18 アメリカアリゲーターミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト
 A. アメリカアリゲーターの mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。B. アメリカアリゲーターの RNA-Seq データを mtDNA 塩基配列へマッピングした結果を示す。赤い矢印は ND4 遺伝子の途中に現れた主要 polyA 付加サイトに対応する。青い矢印は CYTB 遺伝子の終止コドンの位置に対応する。(6)と表示された位置は、6 個の polyA 含有 read で支持されるマイナー polyA 付加サイト(ND5 mRNA の polyA 付加サイトと思われる)を示す。図の説明の詳細は図 8 に準ずる。

CYTB mRNA の polyA 付加サイトは、ヒトでは tRNA^{Thr} 遺伝子の直前に位置しているが、アメリカアリゲーターでは、この位置に付加する polyA 含有 read が 14 個しかなく、tRNA^{Phe} 遺伝子の 5' 側に 614 個の polyA 含有 read が見られた(図 18A)。この 614 個の read のうち、約 4 割の read は由来する cDNA 断片の 5' 末端を CYTB コード領域内まで伸ばしていることを確認した(data not shown)。従ってアメリカアリゲーターの CYTB mRNA は、tRNA^{Phe} 遺伝子直前の polyA 付加サイトまで続くものが主であると考えられる。最後に、アメリカアリゲーターの ND5 遺伝子の終止コドンの 242 塩基下流(ND6 遺伝子のアンチセンス鎖上)に 6 個の polyA 含有 read を伴うマイナー polyA 付加サイトが見つかった(図 18A)。それに対し、CYTB 遺伝子の直前位置には polyA 含有 read が全く見つからなかった。本種 ND5 mRNA の polyA 付加地点は、このマイナー polyA 付加サイトである可能性が高いと思われる。

3.4.5 鳥類

鳥類の mtDNA では、ND6 遺伝子及び tRNA^{Glu} 遺伝子の位置が MNCR 付近に変化する遺伝子配置変動が報告されている(Desjardins and Morais, 1990)。すなわち鳥類では、ND5 遺伝子の直下に CYTB 遺伝子が位置する。本研究で調査した 8 種の鳥類ではいずれも、CYTB 遺伝子の直前に主要な polyA 付加サイトが見つかった(図 19)。これらは ND5 mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。

鳥類 mt-mRNA の polyA 付加プロフィールで最も特徴的なことは、ND6 mRNA の polyA 付加サイトの発見である。フクロウ目のコノハズク以外の 7 種の鳥類では、軽鎖にコードされる ND6 遺伝子の終止コドンの直後に、ND6 mRNA のものと考えられる polyA 付加サイトが見つかった(図 19)。コノハズクの該当箇所では、polyA 含有 read が一切存在せず(data not shown)、本種においてはこの位置への polyA 付加の証拠が全く得られなかった。鳥類 mtDNA に生じた遺伝子配置変動の影響で、軽鎖コードの ND6 遺伝子の直下に tRNA^{Pro} 遺伝子が位置しており、軽鎖の転写物が tRNA^{Pro} の 5' 末端でプロセッシングを受けた後に、polyA 付加が行われたものと判断された。後述するように、本研究の対象種のうち、有袋類の種でも ND6 mRNA の下流に polyA 付加サイトが見つかったが、polyA 付加される位置が異なっていた。それ以外の生物種においては、ND6 mRNA に対する polyA 付加は全く検出されなかった。

一方、鳥類の 8 種のうち、ヤツガシラ、クロハゲワシ、ミナミツミ、ホシムクドリの 4 種では、ND1 遺伝子の直下(tRNA^{Leu} 遺伝子の直前)の主要 polyA 付加サイトが消失し、tRNA^{Met} 遺伝子の 5' 末端直前に移動していた(図 19)。残りの 4 種の鳥類では、他のほとんどの種と同じように、tRNA^{Leu} 遺伝子の直前に polyA が付加されていた。

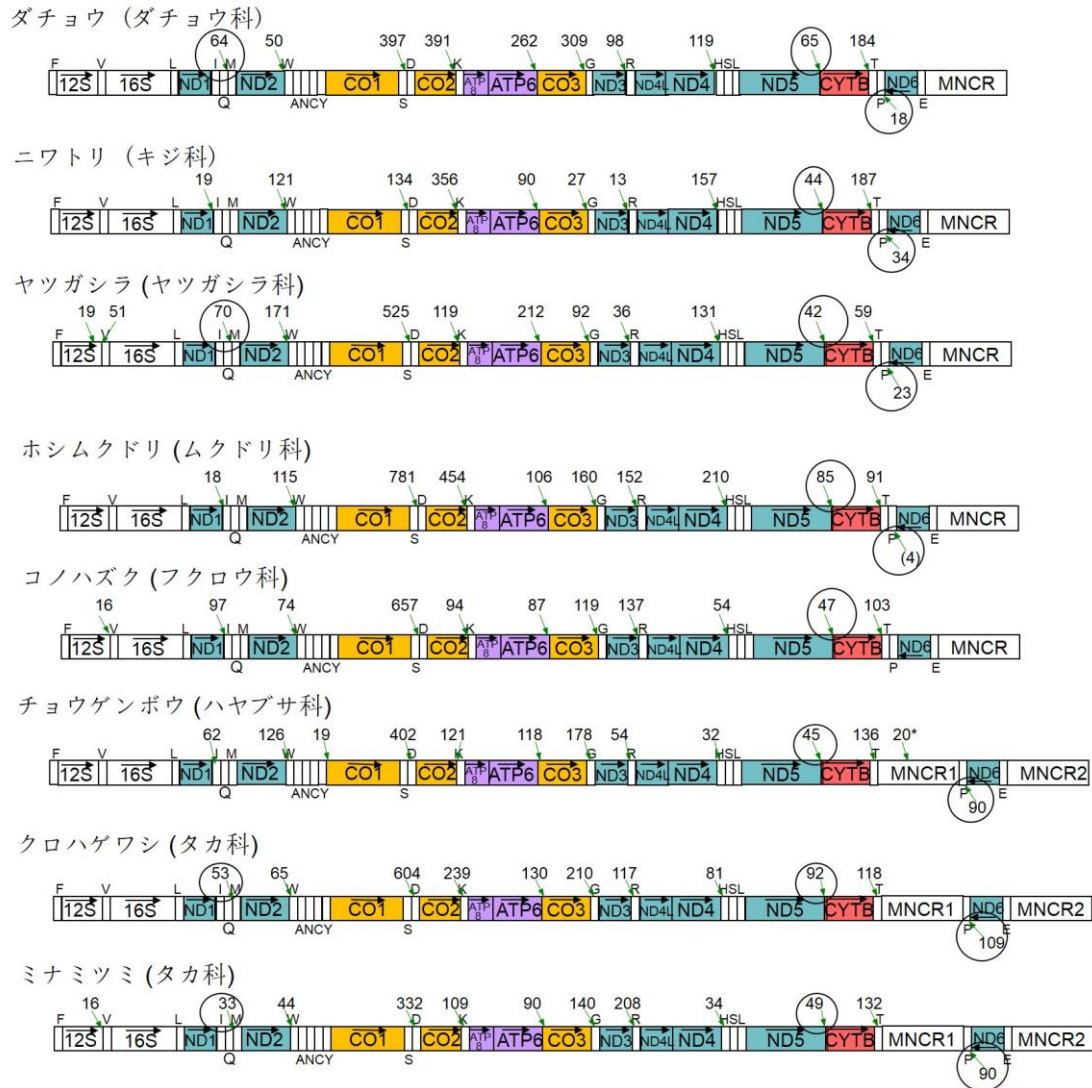


図 19 鳥類ミトコンドリア RNA の主要な polyA 付加サイト

全ての種で、ヒトと異なった主要 polyA 付加サイトが見られた。ホシムクドリの ND6 mRNA の polyA 付加サイトは、tRNA^{Pro} 遺伝子の直前であると考えられるが、この位置に対応する polyA 含有 read は 4 個しかなかった。チョウゲンボウの MNCR1 に表示された polyA 付加サイト(*で示す)は、MNCR1 のものか MNCR2 のものか不明である。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

3.4.6 哺乳類

本研究では、13 種の哺乳類(真獣類 9 種、有袋類 4 種)を調査した。単孔類の代表種については、適切な RNA-Seq データがデータベース上に見つからなかった。有袋類 4 種の mtDNA では、ND2 遺伝子下流の「WANCY」 tRNA 遺伝子クラスターで配置変動があり、WANCY から ACWNY に変化している(Pääbo et al.,

1991)。この変化に対応して、ND2 mRNA のポリアデニル化は、ND2 遺伝子の直下に行われず、tRNA^{Trp} 遺伝子の 5'末端の直前に付加されていた(図 20A)。5 つの tRNA 遺伝子のうち、tRNA^{Trp} 遺伝子のみが重鎖にコードされているため、この遺伝子の 5'末端でプロセシングが生じて polyA 付加するというメカニズムは不変と考えられる。

さらに、本研究で調べた 4 種の有袋類では、軽鎖にコードされる ND6 遺伝子の終止コドンの下流(ND5 遺伝子のコード領域のアンチセンス鎖)に主要な polyA 付加サイトが見つかった(図 20A)。これらは ND6 mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。但し、鳥類と異なり、有袋類の ND6 遺伝子の付近には、遺伝子配置変動が存在せず、この 4 種の polyA 付加位置も一部異なっていた(カンガルーでは ND6 遺伝子終止コドン 154 塩基下流に、ミンクとバンディクートでは ND6 遺伝子の終止コドン 156 塩基下流に、タスマニアデビルでは ND6 遺伝子の終止コドン 544 塩基下流に存在した)。RNA-Seq read のマッピング結果(補遺 3:28-31)をみると、有袋類の ND6 コード領域の read 頻度は ND5 コード領域と同等かそれより若干多い傾向があった。ND5 mRNA の polyA 付加サイトは CYTB 遺伝子の直前に存在することから、ND6 コード領域では、重鎖コードの ND5 mRNA と軽鎖コードの ND6 mRNA がともに、read 頻度のカウントで重なっていると思われる。このため、有袋類 ND6 mRNA の 5'末端の位置を read 頻度の変化に基づいて決めることはできなかったが、tRNA punctuation model に基づけば、隣接する tRNA^{Glu} 遺伝子の直下にあると推定される。

このように有袋類においては、主要な polyA 付加サイトの変化が認められたが、真獣類 9 種においては、mtDNA 遺伝子配置の変動も、mt-mRNA の polyA 付加位置の変化も、さらには mt-mRNA の方向や範囲における変化も見られなかった(図 20B; 補遺 3:32-40)。

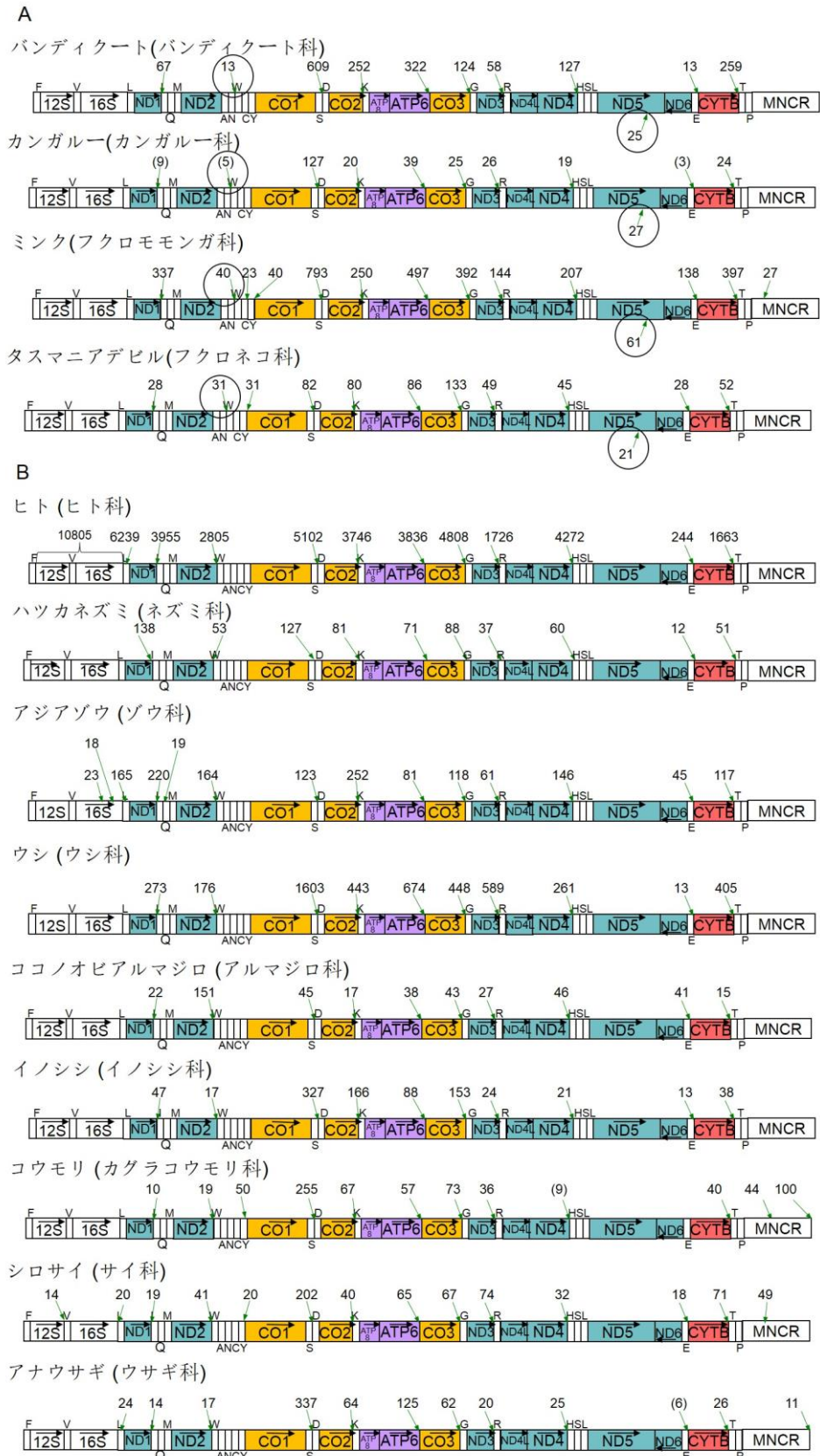


図 20 哺乳類ミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト
 A.ヒトと異なった polyA 付加サイトが存在した種。B.ヒトと似通った polyA 付加サイトを持つ種。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

3.4.7 両生類

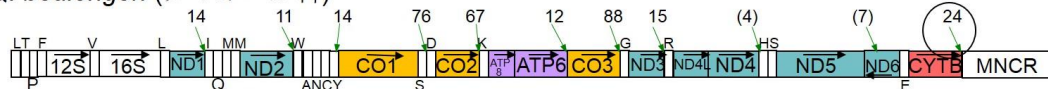
本研究では 12 種の両生類(無足類 1 種、有尾類 4 種、無尾類 7 種)を調査した。そのうち、無足類 1 種、有尾類 4 種、無尾類 2 種(チョウセンスズガエル、ネツタイツメガエル)では、ヒトで見られる mt-mRNA の polyA 付加サイトと同一の polyA 付加サイトが認められた(図 21B)。また、これらの mt-mRNA の方向や範囲も類似していた(補遺 3:41-46,52)。

4 種の無尾類(*Q. boulengeri*、トノサマガエル、アオガエル及びババトラフガエル)では、遺伝子配置変動が存在し、tRNA^{Thr} 遺伝子と tRNA^{Pro} 遺伝子が MNCR の 5' 側から転位している。従って CYTB 遺伝子の直下には、tRNA^{Thr} 遺伝子ではなく、MNCR が存在する(図 21A)。ババトラフガエルでは、MNCR の 5' 末端から 7 塩基下流に主要な polyA 付加サイトが見られた。一方、他の 3 種の無尾類では、MNCR の直前に主要な polyA 付加サイトが見られた。これらは、CYTB mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。また、アオガエルとババトラフガエルでは、MNCR の下流の遺伝子が、ND5 遺伝子、tRNA^{Thr} 遺伝子の順で並んでいる。これらの種では、tRNA^{Thr} 遺伝子の直前にそれぞれ 57 個と 86 個の polyA 含有 read で支持される主要 polyA 付加サイトが見つかった。これらは ND5 mRNA の polyA 付加サイトと考えられる。

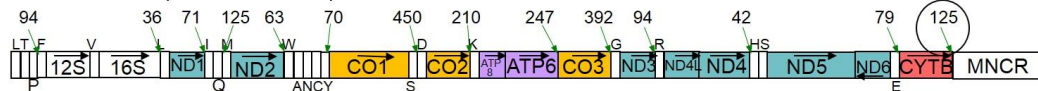
もう 1 種の無尾類(*L. boringii*)では、ND2 遺伝子の直下にある主要な polyA 付加サイトが消失し、CO1 遺伝子の 5' 末端の直前に移動していた(図 21A)。RNA-Seq read のマッピング結果(補遺 3:51)によれば、ND2 mRNA から ANCY tRNA 遺伝子クラスターまでの間に read 頻度の変化がなく、CO1 遺伝子直前の polyA 付加サイトは、ND2 mRNA のものと考えられた。

A

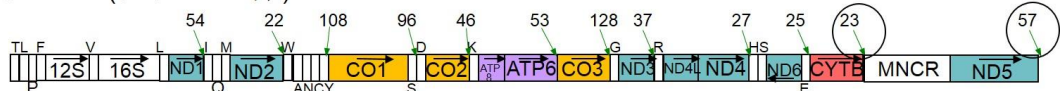
Q. boulengeri (ヌマガエル科)



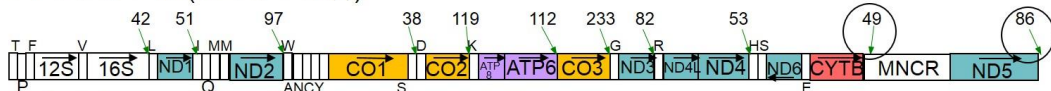
トノサマガエル (アカガエル科)



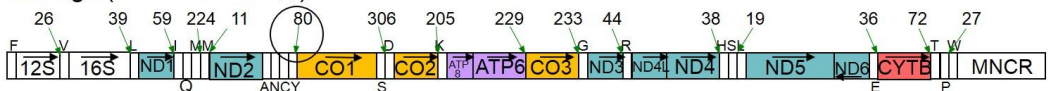
アオガエル (アオガエル科)



ババトラフガエル (ヌマガエル科)

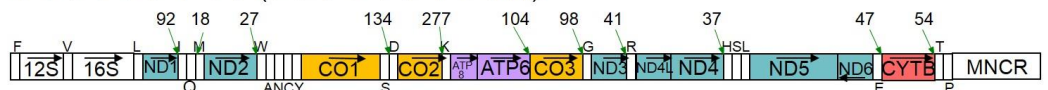


L. boringii (コノハガエル科)

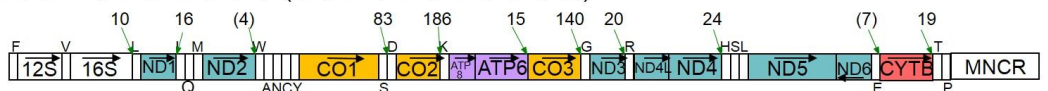


B

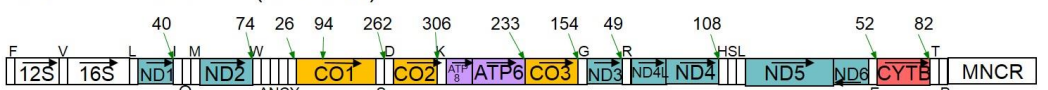
バンナアシナシイモリ (ヌメアシナシイモリ科)



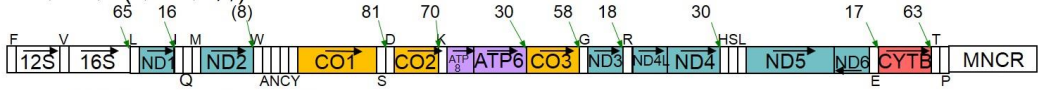
メキシコサンショウウオ (トラフサンショウウオ科)



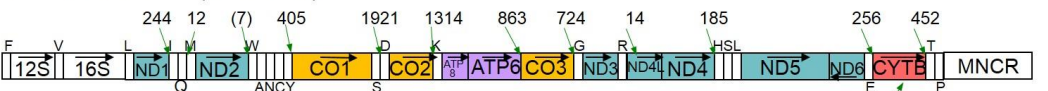
ファイアサラマンダー (イモリ科)



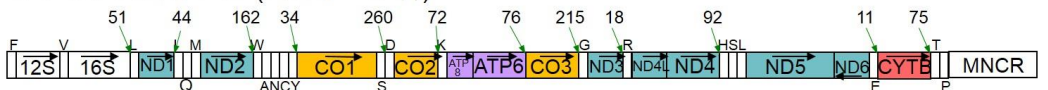
スベイモリ (イモリ科)



ミナミイボイモリ (イモリ科)



チョウセンスズガエル (スズガエル科)



ネットイツメガエル (ピパ科)

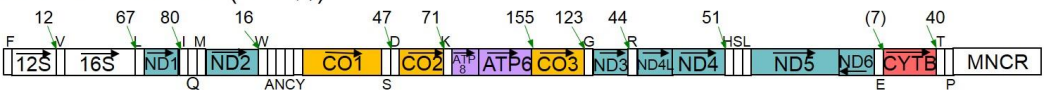


図 21 両生類ミトコンドリア RNA の主要 polyA 付加サイト

A. ヒトと異なった polyA 付加サイトが存在した種。B. ヒトと似通った polyA 付加サイトを持つ種。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

3.4.8 魚類

本研究では8種の魚類(無顎類1種、硬骨魚類4種、軟骨魚類3種)を調査した。4種の硬骨魚類と3種の軟骨魚類では、ヒトと同じ mtDNA 遺伝子配置を持っており、mt-mRNA の polyA 付加位置もヒトと一致した(図 22B)。RNA-Seq read のマッピング結果(補遺 3:53-59)に基づいて推定された各 mt-mRNA の方向と範囲も、ヒト mt-mRNA のもの(図 4)とほぼ同じであった。

一方、無顎類のフクロヤツメでは、遺伝子配置変動が見られた。CYTB 遺伝子

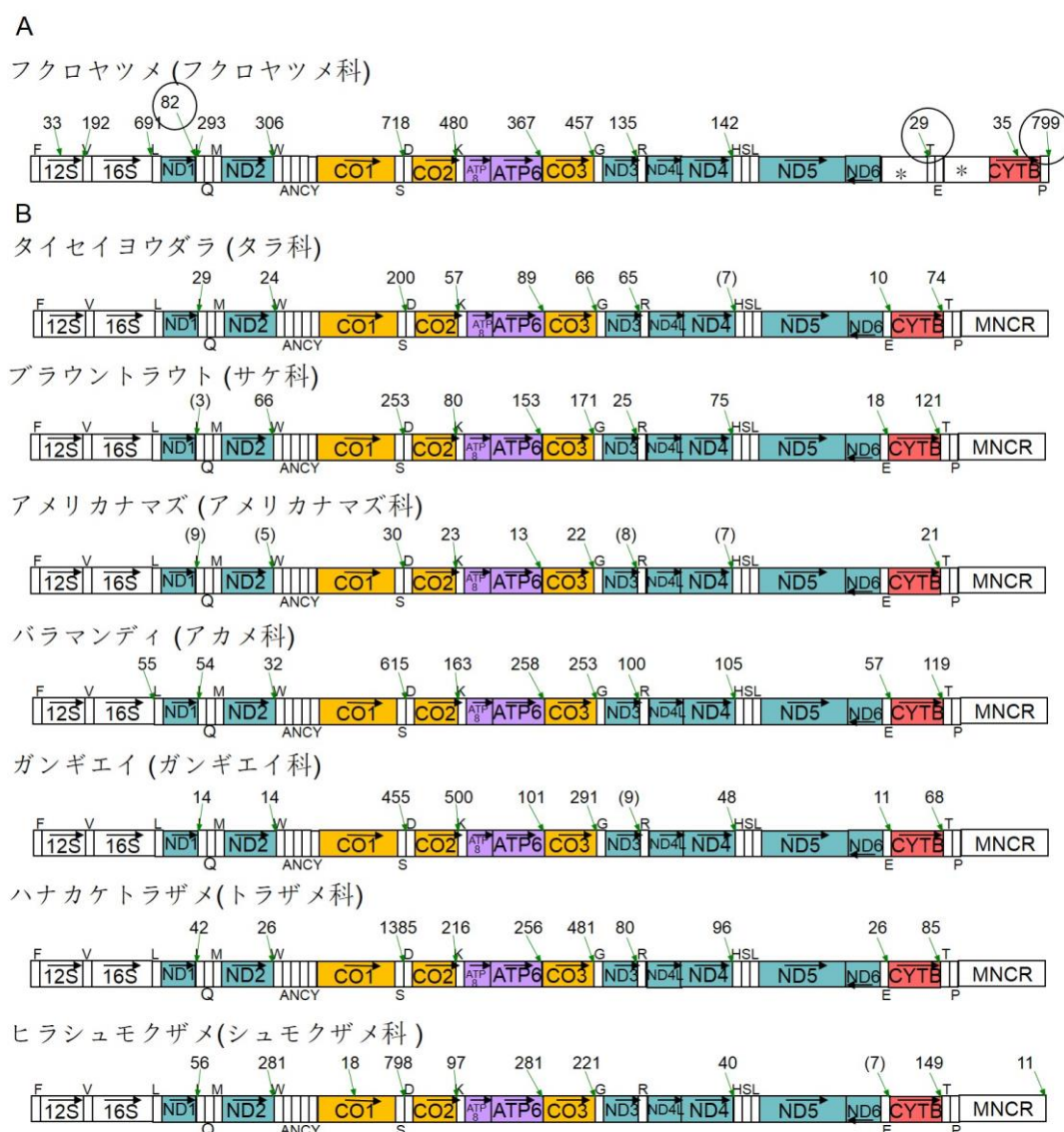


図 22 魚類ミトコンドリア RNA の主要な polyA 付加サイト

A.ヒトと異なった polyA 付加サイトが存在した種。B.ヒトと似通った polyA 付加サイトを持つ種。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

の 5' 側へ転位した tRNA^{Thr} 遺伝子の上流に約 900bp の非コード領域が存在している(図 22A)。本種では、tRNA^{Thr} 遺伝子の直前に、29 個の polyA 含有 read を伴った主要 polyA 付加サイトが見つかったが(図 22A)、これは ND5 mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。一方、tRNA^{Glu} 遺伝子と CYTB 遺伝子の間にも、約 600bp の非コード領域が存在する。tRNA^{Phe} 遺伝子の直前に 799 個の polyA 含有 read を伴う主要 polyA 付加サイトが見つかったが、これは CYTB mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。

また、本種では ND1 遺伝子と tRNA^{Leu} 遺伝子の間に約 42bp の非コード領域が存在する。この非コード領域において 2 つの主要な polyA 付加サイトが見られた。1 つ目は ND1 遺伝子の終止コドンの 9 塩基下流で、82 個の polyA 含有 read を伴っていた。もう一つは、tRNA^{Leu} 遺伝子の直前で 293 個の polyA 含有 read を伴っていた。RNA-Seq read のマッピング結果(補遺 3:60)に基づけば、ND1 遺伝子の終止コドンの 9 塩基下流付近において read 頻度の大きな変化が認められない。従って ND1 mRNA の主要な polyA 付加地点は、tRNA^{Leu} 遺伝子の直前の位置であると考えられた。また、ND5、CYTB、ND1 以外の mt-mRNA の両末端の位置は、ヒトでこれまでに同定されている位置(図 4)におおむね対応すると考えられた。

3.4.9 ナメクジウオ類

データベースに登録されているナメクジウオ類の RNA-Seq データのうち、本研究で用いた *B. floridae* のものだけで主要 polyA 付加地点の解析を行うことが可能だった。この種では、ヒトと比べて、mtDNA 遺伝子の配置にいくつかの変動がある。まずは ND2 遺伝子下流の tRNA 遺伝子クラスターの配置が「WANCY」から「NWACY」に変化している。これに伴い、ND2 遺伝子の直下には polyA が付加されず、tRNA^{Trp} 遺伝子の 5' 末端の直前に付加されるようになっていた(図 23)。また、重鎖にコードされる tRNA^{Gly} 遺伝子が、CO3 遺伝子と ND3 遺伝子の間(図 4)から ND5 遺伝子の直下に転位している。この遺伝子配置変動に伴い、tRNA^{Gly} 遺伝子の直前に 19 個の polyA 含有 read を伴う主要 polyA 付加サイトが見られた(図 23)。このサイトは、ND5 mRNA の polyA 付加サイトであると考えられる。

B. floridae (ナメクジウオ科)

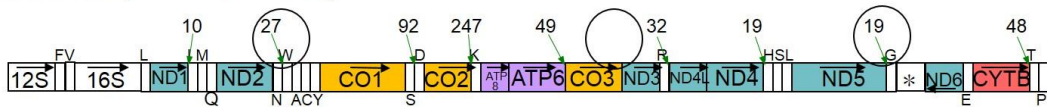


図 23 ナメクジウオミトコンドリア RNA の主要な polyA 付加サイト
ヒトと異なった主要 polyA 付加サイトが見られた。図の説明の詳細は図 8A に準ずる。

最後に、CO3 遺伝子の 3' 末端付近には、主要 polyA 付加サイト及びマイナー polyA 付加サイトが一切見られなかった(図 23 及び data not shown)。Read 頻度のプロット結果をみても、CO3 遺伝子と ND3 遺伝子の境界(補遺 3:61 の赤矢印地点)に read 頻度の低下が全く見えなかった。ナメクジウオ類の *B. floridae* では、tRNA^{Gly} 遺伝子の配置変動に伴い、CO3 mRNA と ND3 mRNA の構造に大きな変化が生じていると考えられる(第四章第二節第四項に後述)。これらの遺伝子配置変動に伴う変化を除き、ND2、ND5、CO3/ND3 以外の mt-mRNA の方向と範囲は、ヒトのものと同様であった(補遺 3:61)。

3.5 未成熟転写産物の相対量比の評価

ニホンカナヘビの RNA-Seq データから得られた mtDNA 由来の read をデータベースにし、12 個のタンパク質遺伝子(ATP8 と ATP6 は同じ mRNA を共用し、ND4L と ND4 も単一の mRNA となるので、これらは 2 つの遺伝子コード領域を併せてカウントした)の塩基配列をそれぞれクエリーにして、blastn 検索を行った。その結果、各遺伝子にマッチする read が検出され、それらの数を遺伝子の長さで次世代シーケンサーで読まれた read の総数で規格化した RPKM を算出し、その結果を表 3 に示した。

例えば、ニホンカナヘビの ND1 mRNA 由来の read 数は 198,888 個であり、RPKM は 3,814 となった(表 3)。タンパク質遺伝子の中では、CO3 の RPKM 値(12,677)が一番高く、次に CO1 (11,075)と CO2 (9,507)が続いた。ATP8/ATP6 も 7,648 で、比較的高かった。一方、NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット群及び CYTB では、概して低レベルの mRNA 存在量を示し、RPKM 値が 1,825 から 4,422 であった(表 3)。

表4. 24種の脊椎動物における重鎖コードmt-mRNA及びtRNA遺伝子クラスター領域のRPKM値

| mRNA | ニホンカナヘビ | ホクベカイ | ヒョウモンツカゲモドキ | シナワニトカゲ | フトアゴヒゲトカゲ | フシハルスキーガモトカゲ | カキネハリトカゲ | ヌママムシ | コーンスネーク | サンビームヘビ | カミツキガメ | カロリナハコガメ |
|--------------|------------|---------------------|-------------|---------|-----------|--------------|----------|--------|---------|---------|--------|-----------|
| ND1 | 3,814 | 3,337 | 2,044 | 8,899 | 4,388 | 6,718 | 2,496 | 10,524 | 3,623 | 6,498 | 3,773 | 1,519 |
| ND2 | 3,776 | 1,745 | 1,955 | 4,329 | 4,644 | 4,172 | 2,548 | 5,409 | 1,593 | 1,841 | 2,833 | 5,682 |
| CO1 | 11,075 | 16,333 | 14,748 | 6,920 | 17,265 | 15,055 | 12,666 | 24,238 | 4,963 | 8,906 | 7,788 | 15,960 |
| CO2 | 9,507 | 8,333 | 6,976 | 6,627 | 8,392 | 10,761 | 8,302 | 9,899 | 3,988 | 6,037 | 2,086 | 1,681 |
| ATP8/ATP6 | 7,648 | 1,865 | 4,839 | 8,707 | 12,293 | 7,570 | 4,637 | 10,253 | 3,453 | 4,926 | 2,635 | 8,349 |
| CO3 | 12,677 | 8,438 | 5,313 | 8,525 | 7,971 | 6,904 | 6,673 | 10,613 | 3,923 | 5,843 | 10,174 | 13,126 |
| ND3 | 1,825 | 2,232 | 1,694 | 1,397 | 1,815 | 2,289 | 960 | 3,468 | 390 | 1,422 | 1,928 | 7,135 |
| ND4L/ND4 | 3,549 | 1,593 | 2,711 | 3,428 | 4,004 | 4,721 | 2,544 | 5,639 | 1,499 | 3,717 | 2,225 | 9,045 |
| ND5 | 2,299 | 1,398 | 2,192 | 1,735 | 1,985 | 1,730 | 1,598 | 1,675 | 1,169 | 2,152 | 1,594 | 3,673 |
| CYTb | 4,422 | 3,345 | 2,862 | 2,856 | 10,933 | 4,685 | 6,993 | 10,798 | 2,728 | 6,809 | 1,868 | 1,402 |
| 計 | 60,592 | 48,619 | 45,334 | 53,422 | 73,689 | 64,604 | 49,416 | 92,516 | 27,330 | 48,152 | 36,904 | 67,570 |
| IQM (or QIM) | 884* | 370 | 220* | 910* | 373* | 491* | 177* | - | - | - | 23 | 30 |
| WANCY | 223* | 1,272* | 567* | 185 | 1,974* | 4,144* | 82* | 209 | 892 | 241 | 160 | 908 |
| HSL (or SHL) | 163 | 26 | 121 | 36 | 32 | 124 | 29 | 143 | 91 | 399 | 18 | 63 |
| mRNA | ミシシッピニオイガメ | クリイロハコクビガメ | アメリカアリゲーター | ニフトリ | ヤツガシラ | チウゲンボウ | クロハゲウシ | ヒト | ハツカネズミ | アジアゾウ | ウシ | アフリカツメガエル |
| ND1 | 1,494 | 7,620 | 5,085 | 1,685 | 2,709 | 4,179 | 2,518 | 6,205 | 9,798 | 2,487 | 2,810 | 1,798 |
| ND2 | 2,151 | 3,145 | 2,290 | 3,312 | 2,835 | 3,781 | 1,442 | 8,048 | 5,035 | 2,554 | 1,524 | 1,067 |
| CO1 | 3,372 | 14,967 | 4,310 | 18,388 | 6,868 | 9,294 | 10,145 | 11,537 | 19,494 | 4,760 | 12,343 | 5,207 |
| CO2 | 2,666 | 8,354 | 7,373 | 28,845 | 6,685 | 9,029 | 10,161 | 9,723 | 19,910 | 2,974 | 4,282 | 5,210 |
| ATP8/ATP6 | 3,572 | 13,694 [#] | 4,915 | 52,473 | 6,939 | 6,249 | 7,140 | 10,143 | 13,460 | 3,458 | 7,262 | 2,937 |
| CO3 | 3,646 | 7,244 | 5,515 | 31,815 | 6,824 | 9,611 | 8,615 | 9,508 | 14,622 | 2,836 | 4,857 | 4,413 |
| ND3 | 678 | 1,073 | 1,073 | 1,031 | 960 | 2,487 | 6,320 | 3,332 | 5,182 | 1,087 | 4,765 | 1,277 |
| ND4L/ND4 | 4,591 | 6,051 | 4,528 | 3,106 | 2,938 | 3,566 | 2,860 | 7,667 | 6,480 | 2,041 | 2,094 | 1,187 |
| ND5 | 455 | 6,518 | 440 | 3,348 | 2,336 | 2,137 | 3,256 | 1,527 | 4,625 | 1,228 | 468 | 459 |
| CYTb | 3,781 | 5,189 | 6,577 | 11,493 | 3,481 | 4,592 | 4,724 | 3,232 | 13,070 | 2,809 | 3,399 | 1,738 |
| 計 | 26,407 | 72,782 | 42,106 | 155,497 | 42,575 | 54,924 | 57,180 | 70,923 | 111,677 | 26,235 | 43,805 | 25,292 |
| IQM (or QIM) | 55 | 19 | 46* | 32 | 842* | 140 | 1,009* | 781 | 118 | 500* | 83 | 58 |
| WANCY | 110 | 576 | 256 | 17 | 135 | 371 | 42 | 386 | 260 | 505 | 184 | 37 |
| HSL (or SHL) | 23 | 502 | 85* | 19 | 71 | 151 | 25 | 161 | 189 | 48 | 130 | 13 |

「#」は、クリイロハコクビガメのATP8、ATP6、CO3の3遺伝子のコード領域を含むトリシストロニックmRNAとしてRPKM値を計算したことを示す。

「*」は、対応するtRNA遺伝子クラスター領域に主要なpolyA付加サイトが出現したことを示す。24種における3つのtRNA遺伝子クラスター領域のRPKMの平均値(188)は、「*」が付いていない領域のRPKMを用いて計算した。

「-」は、MNCR及びいくつかのtRNA遺伝子クラスター内に挿入されているため、対応するデータが得られなかったことを示す。

ニホンカナヘビの mtDNA 上には 3 つの tRNA 遺伝子クラスターが存在する (IQM, WANCY 及び HSL)。第二章第八節に述べた理由により、tRNA 遺伝子領域に相当する read があれば、それはより長鎖の未成熟型ミトコンドリア RNA に由来するものと仮定できる。そこで、この 3 つの tRNA 遺伝子クラスターに対応する RPKM 値の範囲から、未成熟のミトコンドリア RNA 存在量を概算した。表 3 において、tRNA 遺伝子クラスターに相当する RPKM 値で、最大は IQM 領域の 884、最小は HSL 領域の 163 であった。但し、IQM と WANCY の tRNA 遺伝子クラスター中には主要な polyA 付加サイトが存在するので (図 8)、隣接するタンパク質遺伝子の mRNA がこれらの領域内まで延びている可能性も否定できない。そのため、ニホンカナヘビに関しては、「HSL」 tRNA 遺伝子クラスターに対応する RPKM 値(163)のみを、未成熟転写産物の存在量の概算に利用した。同様な計算を他の 23 種についても行い、tRNA 遺伝子クラスター領域全体での RPKM 値の平均値(188)を算出した(表 4)。各 mRNA の RPKM と tRNA 遺伝子クラスターの RPKM の平均値を比較したところ、10 個の mRNA に対する平均 RPKM の 1.6-9.0%が未成熟転写産物の寄与であると示唆された。例えば、CO1 mRNA 由来として検出された read の約 98.4%が成熟型 mRNA に由来すると推定された。一方、ND5 mRNA 由来として検出された read の約 91%が成熟型 mRNA に由来すると推定された。

第四章. 考察

4.1 RNA-Seq を用いたミトコンドリア転写物の解析

第一章で述べたように、脊椎動物ミトコンドリアの遺伝情報発現機構の研究は、これまで主にヒトやマウスなどのモデル動物を用い、対象とする種や遺伝子を絞って分子生物学的な解析を加える手法で行われてきた。この方法は確実だが、一度に研究できる対象遺伝子の範囲が狭く、実験にも時間を要していた。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、ミトコンドリアゲノム全体を俯瞰するアプローチで研究を行った。このアプローチには、網羅的な手法で、効率的にデータを取得できる利点がある。

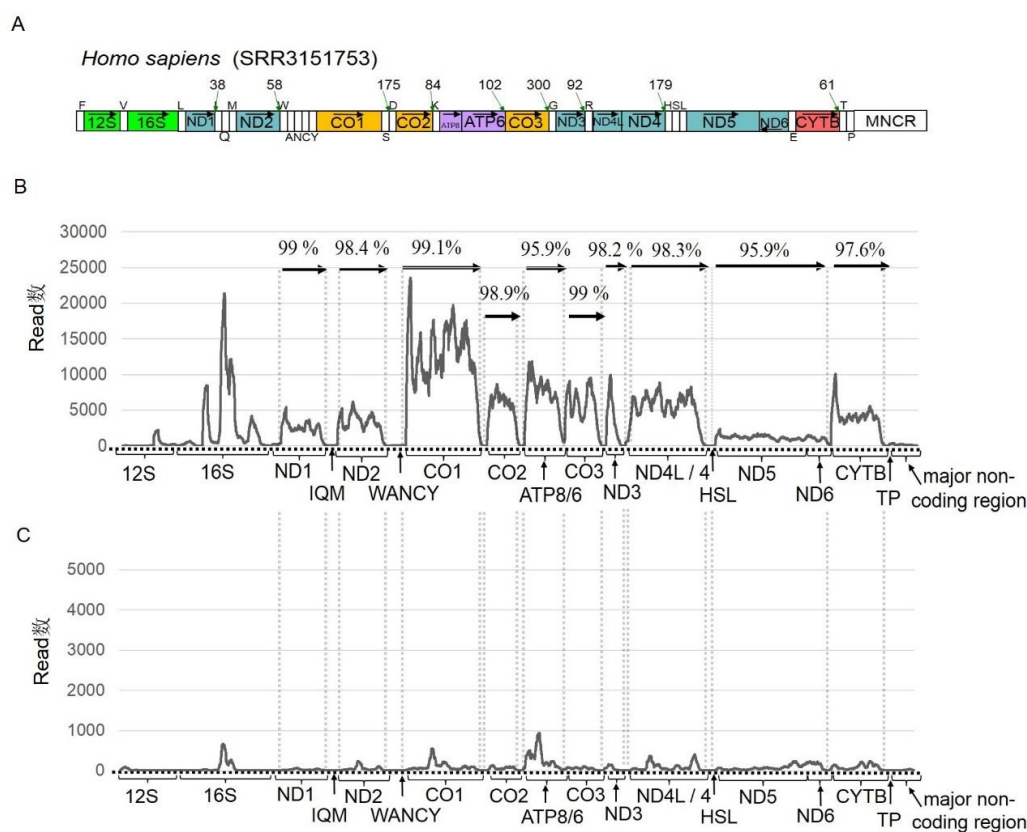


図 24 Directional RNA-Seq データから得られたヒト mtDNA 由来 read の分析
 A. ヒトの mtDNA 遺伝子配置及び主要な polyA 付加サイトを示す。B. センス鎖由来の read のうち、mtDNA 重鎖の転写物に相当する read の頻度分布。C. センス鎖由来 read のうち、mtDNA 軽鎖の転写物に相当する read の頻度分布。重鎖から転写された 10 個の mt-mRNA の範囲を水平の矢印で示す。その上の数字は、各 mRNA 領域においてマップされたセンス鎖由来の read のうち、重鎖からの転写物が占める割合(パーセント)を示す。図の説明の詳細は図 8 に準ずる。

ただし、この RNA-Seq を用いた方法では、RNA 分子を集団として解析し、また取得データは短鎖(約 100bp)の read データとしてアウトプットされるため、その結果の解釈において注意を要する点がいくつかある。まず、得られた read が成熟型 mRNA に由来するのか、未成熟転写物に由来するのか区別が難しいという問題がある。そのため本研究では、まず未成熟の RNA 産物がどの程度存在するかを見積もった。第三章第五節に記したように、重鎖コードの mt-mRNA 領域において検出された read のうち、1.6-9.0%が未成熟転写物由来であると考えられる。このことから、未成熟転写物の存在を完全に無視することはできないが、各 mRNA 領域にマップされた read の大多数は、成熟型 mRNA に由来するものと解釈してよいであろう。

また、各 mRNA 領域の read とされているもののうち、センス鎖に由来するものとアンチセンス鎖に由来するものが、それぞれどのくらいの割合で存在するかという疑問もある。なぜなら、現在実施されている RNA-Seq の大多数が、mRNA の+鎖と-鎖を区別しない方法で行われているからである。この問題を調べるために、RNA のセンス鎖とアンチセンス鎖を区別する Directional RNA-Seq の手法で得られたヒト RNA-Seq データ(Genbank SRA アクセッション番号 SRR3151753)を用いて、センス鎖由来の 29,236,394 個の read から mtDNA 由来の 703,613 個の read を同定した。そのうち、690,892 個(98.2%)の read は軽鎖にマップされ、重鎖の転写物に由来することが分かった(図 24)。一方、軽鎖の転写物に由来する read は 12,271 個(1.8%)のみであった。各 mt-mRNA 領域内での軽鎖由来転写物の割合を求めると、ND1 mRNA の範囲で 1.0%、ND2 mRNA の範囲で 1.6%などとなり、重鎖コードの 10 個の mRNA の範囲では、全て極めて低いレベルになった(図 24)。この結果は、重鎖にコードされる遺伝子のアンチセンス鎖の polyA RNA は細胞内に極めて少量しか存在しておらず、事実上無視できることを示している。従って、mRNA の鎖を区別しない方法で得られた RNA-Seq データであっても、その大部分は重鎖コードの mRNA に由来するものと解釈できる。この結果は、ミトコンドリア内での RNA が関わる機能において、必要とされない RNA 転写物は、仮に初期転写物の一部として生成したとしても、速やかに分解されてしまうことを示唆している。

三番目に、RNA-Seq データから得られた polyA 含有リードの同定とマッピングを行うために必要な mtDNA 塩基配列をどのように用意するかという問題がある。デ

ータベースからダウンロードした RNA-Seq データに関するかぎり、同一個体の mtDNA 塩基配列情報は通常付帯していない。同一種の別個体、あるいは同属別種の mtDNA 塩基配列が入手できるケースは多いが、同一個体の mtDNA 塩基配列との間には多くの塩基置換が存在し、polyA 含有リードの正確な同定とマッピングを阻害する要因となる。この問題を解決するために、私は RNA-Seq データを同種別個体（又は同属別種個体）の mtDNA 塩基配列にマッピングしてコンセンサス配列を取得することによって、同一個体の mtDNA 塩基配列を推定するという方法を用いた。こうして復元した mtDNA 塩基相列は、MNCR 中で同一個体由来の塩基配列を完全に復元できないことが多かったものの、タンパク質遺伝子のコード領域中の塩基配列はほぼ完全に復元することができた。このような方法は、鳥類(Nabholz et al., 2010) や藻類(Tian and Smith, 2016)で前例はあるものの、脊椎動物の広範な種に適用できることを示したのは本研究が初めてである。私が知る限り、脊椎動物のミトコンドリアタンパク質遺伝子において、RNA 編集は報告されていない。また、本研究で調べた限り、ニホンカナヘビにおいても、タンパク質遺伝子中の RNA 編集は存在していなかった(第三章第一節参照)。これらの事実は、RNA-Seq データを用いて同一個体 mtDNA 塩基配列を復元することの妥当性を支持するものである。

本研究では、合計 61 種の脊椎動物の RNA-Seq データを解析した。これらの RNA-Seq データは主に肝臓由来の RNA に基づくが、脳や血液、あるいは多臓器から採取した RNA を材料にしたものも一部含まれる(表 2)。実験に用いた細胞株の違いによって、mt-mRNA に付加された polyA の長さに違いが生じるとの報告も一部あるものの(Temperley et al., 2010)、臓器の種類によってミトコンドリア RNA のプロセシングの位置や安定性が異なることを明確に示した報告は、これまでのところ存在しない。本研究においては、解析する種数をなるべく多くする観点から、mt-mRNA の polyA 付加位置や方向、範囲などが、RNA-Seq に供されたサンプルの臓器、性別、年齢、個体の置かれた環境(栄養状態や疾病の有無など)によって変化しないとの前提で研究を行った。ただし、これらの要因が mt-mRNA の構造や安定性にどのような影響を与えるか、という問題は今後の重要な研究課題として残されている。また、近年ミトコンドリアの機能低下が、疾病や老化など様々な生理現象と密接に関係することが判明しつつあり(Cargal, 2017)、本研究で確立した mt-mRNA の効率的か

つ網羅的な構造推定手法は、こうした応用分野への門戸を開くものである。

4.2 mt-mRNA ポリアデニル化の進化

本研究では、脊椎動物の主要な分類群(図 5)から代表種を取り上げ、RNA-Seq データから、mt-mRNA の範囲と polyA 付加地点の同定を行い、ヒトで明らかにされている結果と比較した。その結果、合計 61 種の脊椎動物のうち 29 種において、ヒトとは異なる mt-mRNA のポリアデニレーションプロファイルが認められた。これらの脊椎動物の系統関係(Hedges and Kumar, 2009)を踏まえ、各 mRNA に対するポリアデニル化の進化を最節約原理に基づいて考察した。

4.2.1 ND5 mRNA の polyA 付加サイトの進化

本研究では、ヒトにおける ND5 mRNA のポリアデニレーションサイト(CYTB 遺伝子の 5' 末端に位置する)が変化した事例が 20 種で見つかった。そのうち 13 種(トゲオオオトカゲ、鳥類 8 種、アオガエル、ババトラフガエル、フクロヤツメ、*B. floridae*)は、ND5 遺伝子周辺の遺伝子配置変動が原因となって、polyA 付加サイトが合理的に変化したと推論できるものであった(図 25 の赤点線)。その以外の 7 種(ニホンカナヘビ、ヒョウモントカゲモドキ、クイロハコヨコクビガメ、カミツキガメ、カロリナハコガメ、アメリカアリゲーター、*Q. boulengeri*; 図 25 の赤実線)においては、明確に関連した遺伝子配置変動なしで、新たな polyA 付加サイトが生じていた。これらの種では、CYTB 遺伝子の 5' 末端における polyA 付加サイトが完全に消失するか、あるいは部分的に残った状態で、新たな polyA 付加サイトが、ND5 遺伝子と ND6 遺伝子の境界部、あるいは ND6 遺伝子コード領域のアンチセンス鎖内に生成していた。すなわち ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域の大幅な短縮が認められた。但し、アメリカアリゲーターと *Q. boulengeri* では、新規の polyA 付加サイトは 2-9 個の polyA 含有 read を伴うマイナー polyA 付加サイトとして検出されており、ND5 mRNA の polyA 付加サイトが明確に変化したとは言い切れない。残りの 5 種に対し、新規 polyA 付加サイトの相対位置を比較したところ、ニホンカナヘビ、ヒョウモントカゲモドキ、カミツキガメの 3 種における新規 polyA 付加サイトは、ND6 遺伝子コード領域アンチセンス

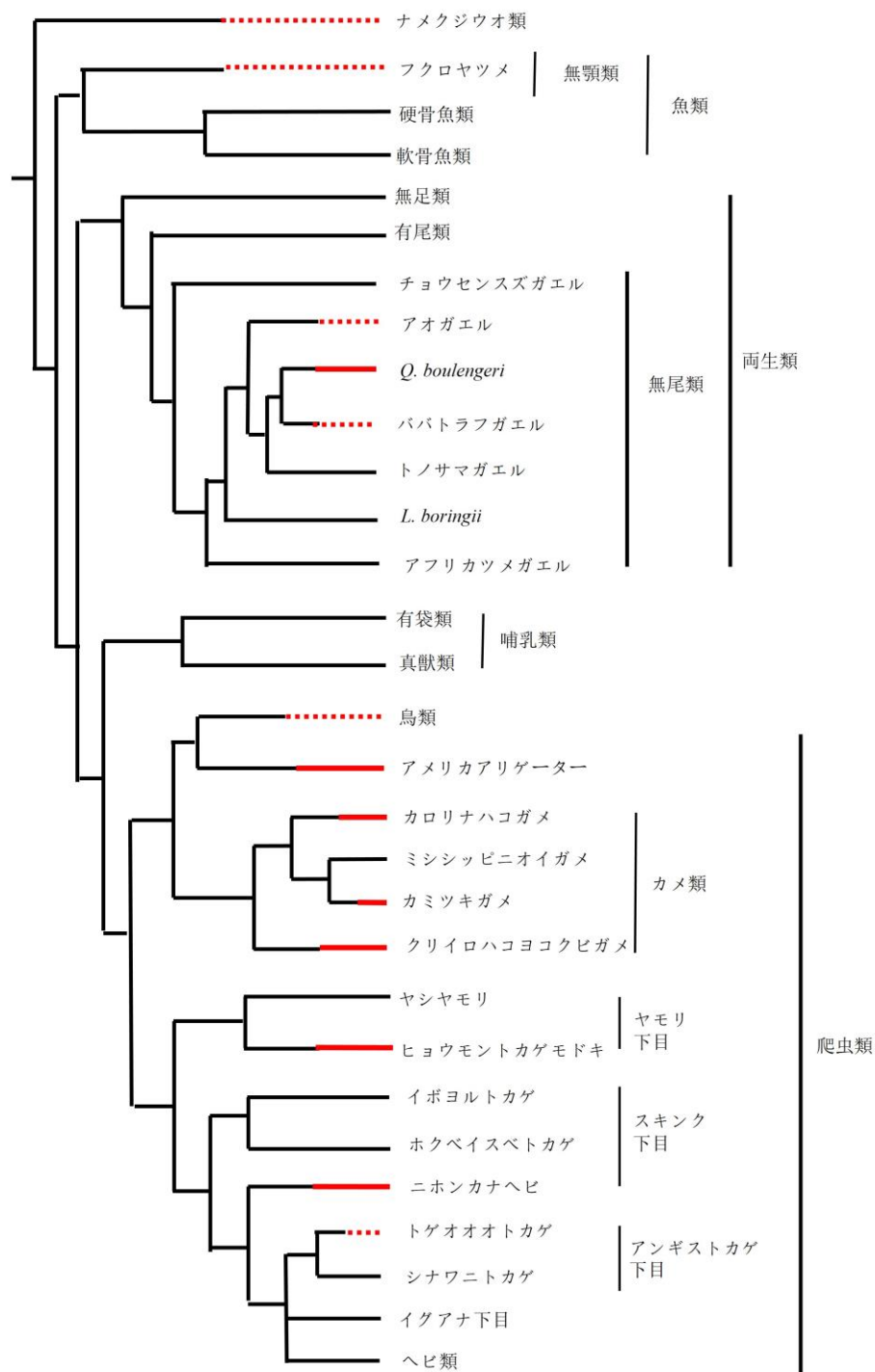


図 25 脊椎動物 ND5 mRNA における polyA 付加サイトの進化

系統関係は Hedges and Kumar(2009)に基づく。赤線(実線及び点線)は、ND5 mRNA におけるヒトと異なる polyA 付加サイトの存在を示す。このうち、赤点線は mtDNA 遺伝子配列変動が原因となって polyA 付加位置が合理的に変化したと考えられるものを示す。この図では、新規の polyA 付加サイトは、それを支持する polyA 含有 read の数が、ヒトと類似する polyA 付加サイトを支持する read の半分以上となったもののみを表示する。

鎖内の互いに遠く隔たった位置に存在した。すなわちこれらの新規ポリアデニレーションサイトの生成は独立したイベントであったと推定される(図 25)。ND5 遺伝子と ND6 遺伝子の境界部に新規ポリアデニレーションサイトが生成したカロリナハコガメとクリイロハコヨコビガメは共にカメ類であるが、一方が潜頸亜目、他方が曲頸亜目に属し系統的には相当離れている。従って、両種の新規ポリアデニレーションサイトが共通のイベントによって生じたと考えるより、独立のイベントとして生じたと考えるのが自然である。よって、全 5 種における新規ポリアデニレーションサイトの出現は、それぞれ独立した現象であったと思われる(図 25)。ちなみに、タラの ND5 mRNA にも短縮された 3' UTR の存在が報告されており(Coucheron et al., 2011)、魚類の一部においても類似の変化が起きたものと考えられる。このように ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域の短縮は脊椎動物の進化の過程で独立して何度も生じたことが示唆された。

哺乳類のミトコンドリアでは、ND5 ポリペプチドの合成と呼吸鎖複合体 I への組み込みを通じて、呼吸機能が制御されているとの見解が提示されている(Bai et al., 2000; Chomyn, 2001)。哺乳類などで ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域が極端に長くなっている理由は詳しく解明されていないが、この 3' 非翻訳領域が逆鎖の ND6 mRNA と相互作用する Long noncoding RNA として機能する可能性が指摘されている(Tullo et al., 1994; Rackham et al., 2011)。もしそうであるなら、ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域が大きく短縮された種では、ND5 mRNA の 3' 非翻訳領域と ND6 mRNA との相互作用が失われたか弱まり、複合体 I のタンパク質合成のメカニズムが多少異なっている可能性も考えられる。

これらの ND5 mRNA に対する新規ポリアデニレーションサイトが出現したメカニズムを探るために、新規 polyA 付加サイト周辺の RNA 塩基配列の二次構造を推定した。その結果、ニホンカナヘビにおいて、図 26 に示すような二次構造が見つかった。この二次構造では、tRNA のアクセプターステム(7 塩基対)と T ステム(4 塩基対)および T ループに類似した構造が保存されている。ミトコンドリア tRNA の 5' 末端及び 3' 末端を切断する RNase は、それぞれ RNase P 及び RNase Z である(Lopez Sanchez et al., 2011; Rossmannith, 2012)。バクテリアの両酵素と tRNA との複合体の結晶構造解析結果によると、これらの RNase は切断サイトのあるアクセプターステムの末端から、T アームまでの構造を認識しており、アンチコドンアームの部分は認

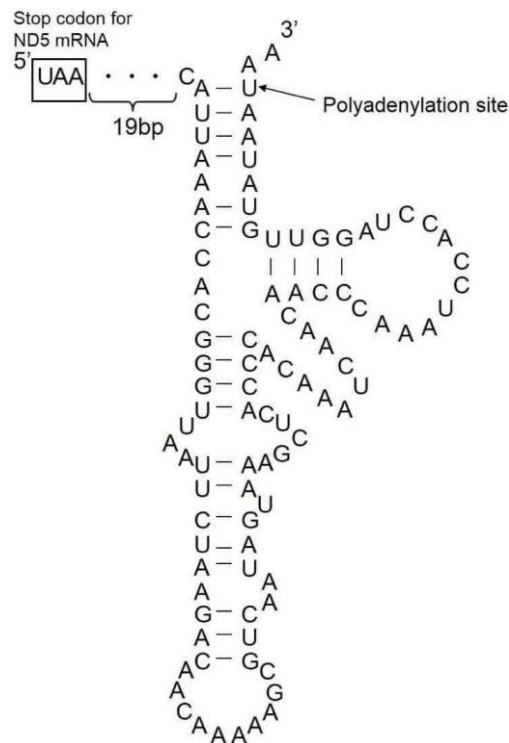


図 26 ニホンカナヘビ ND5 mRNA における新規 polyA 付加サイト周辺の軽鎖配列の二次構造

“-”は可能な塩基対を表す。矢印は、新規 polyA 付加サイトを示す。

識部位から外れている (Evans et al., 2006; Redko et al., 2007; Reiter et al., 2010)。

従って、突然変異によって RNaseZ の基質となる二次構造が偶然生じ、新しいサイトで ND5 mRNA が切断されるようになったため、新規のポリアデニレーションサイトが出現した可能性が考えられる。ただし、私が調べた限り、他の 4 種(ヒョウモントカゲモドキ、クイロハコヨコクビガメ、カミツキガメ、カロリナハコガメ)の新規ポリアデニレーションサイト近傍には、tRNA 様の二次構造は見つからなかった (data not shown)。

4.2.2 ND6 mRNA の polyA 付加サイトの進化

鳥類では、コノハズクを除く 7 種に共通して ND6 mRNA の 3' 末端(ND6 コード領域直下の tRNA^{Pro} 遺伝子の 5' 末端位置において)に、ポリアデニル化シグナルが

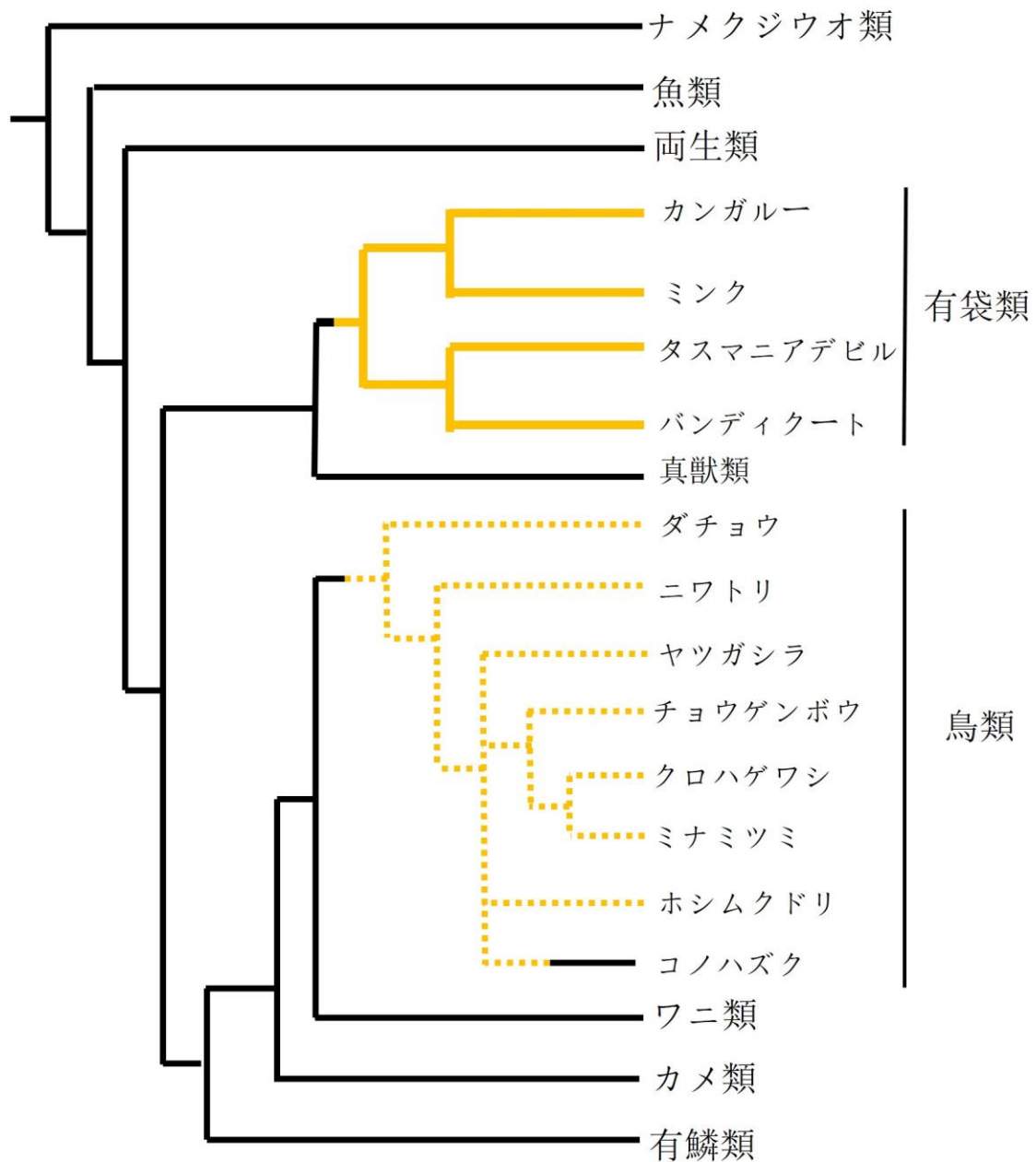


図 27 脊椎動物 ND6 mRNA における polyA 付加サイトの進化
 系統関係は Hedges and Kumar(2009)に基づく。黄色の実線は、mtDNA 遺伝子配置の変動なしで有袋類 ND6 mRNA に生じた新しい polyA 付加サイトの存在を示す。黄色の点線は、遺伝子配置変動に伴って鳥類 ND6 mRNA に生じた新しい polyA 付加サイトの存在を示す。

検出された(図 19)。哺乳綱の有袋類 4 種でも同様に、ND6 mRNA の 3' 末端にポリアデニル化シグナルが検出された(図 20)。これら以外の脊索動物の種では、ND6 mRNA への polyA 付加サイトは検出されなかった。脊椎動物の系統関係(Hedges and Kumar, 2009)を踏まえると、鳥類 ND6 mRNA の 3' 末端のポリアデニル化は、鳥類の共通祖先で獲得され、その後コノハズクの系統でのみ消失したと考えるのが最も合理的である(図 27)。鳥類 mtDNA では、ND6 遺伝子と tRNA^{Glu} 遺伝子が、MNCR 近傍へ配置変動しているが、これによって ND6 遺伝子の 3' 末端直下に tRNA^{Pro} 遺伝子が位置するようになった(Desjardins and Morais, 1990)。軽鎖からの初期転写物が tRNA^{Pro} の 5' 末端で切断されることと連動して、ND6 mRNA の 3' 末端に polyA 配列が付加されるようになったものと推定される。ただしコノハズクにおいても、ND6 コード領域の直下に tRNA^{Pro} 遺伝子が存在しており、この種において ND6 mRNA に polyA 付加サイトが同定されなかった理由は不明である。コノハズクの RNA-Seq データや mtDNA 塩基配列はデータベースからダウンロードしたものであり(表 2)、正確な再検証を行うためには、フクロウ類の近縁種も含めて自らデータ取得を行う必要があると考える。

鳥類と異なり、有袋類 4 種の ND6 遺伝子の付近には、遺伝子配置変動が存在しないにも関わらず、polyA 付加サイトが見つかった。第三章第四節第六項に記述したように、このうち 3 種(カンガルー、ミンク、バンディクート)の polyA 付加サイトは非常に近接した位置(ND6 遺伝子終止コドンの 154-156 塩基下流)に見つかった。一方、タスマニアデビルでは、これとはかなり隔たった位置(ND6 遺伝子終止コドンの 544 塩基下流)に見つかった。有袋類の共通祖先において、ND6 mRNA の下流に RNA 切断を受けうる二次構造が偶然生じ、ND6 mRNA へのポリアデニル化が獲得されたあとに、タスマニアデビルに繋がる系統ではさらに切断位置の移動が二次的に生じたのかもしれない(図 27)。

4.2.3 ND1 mRNA の polyA 付加サイトの進化

アガマ科の 2 種においては、ND1 mRNA のポリアデニレーションサイトが、ND1 ストップコドンの直後から、数十塩基下流に変化していた(図 13)。この変化は、IQM

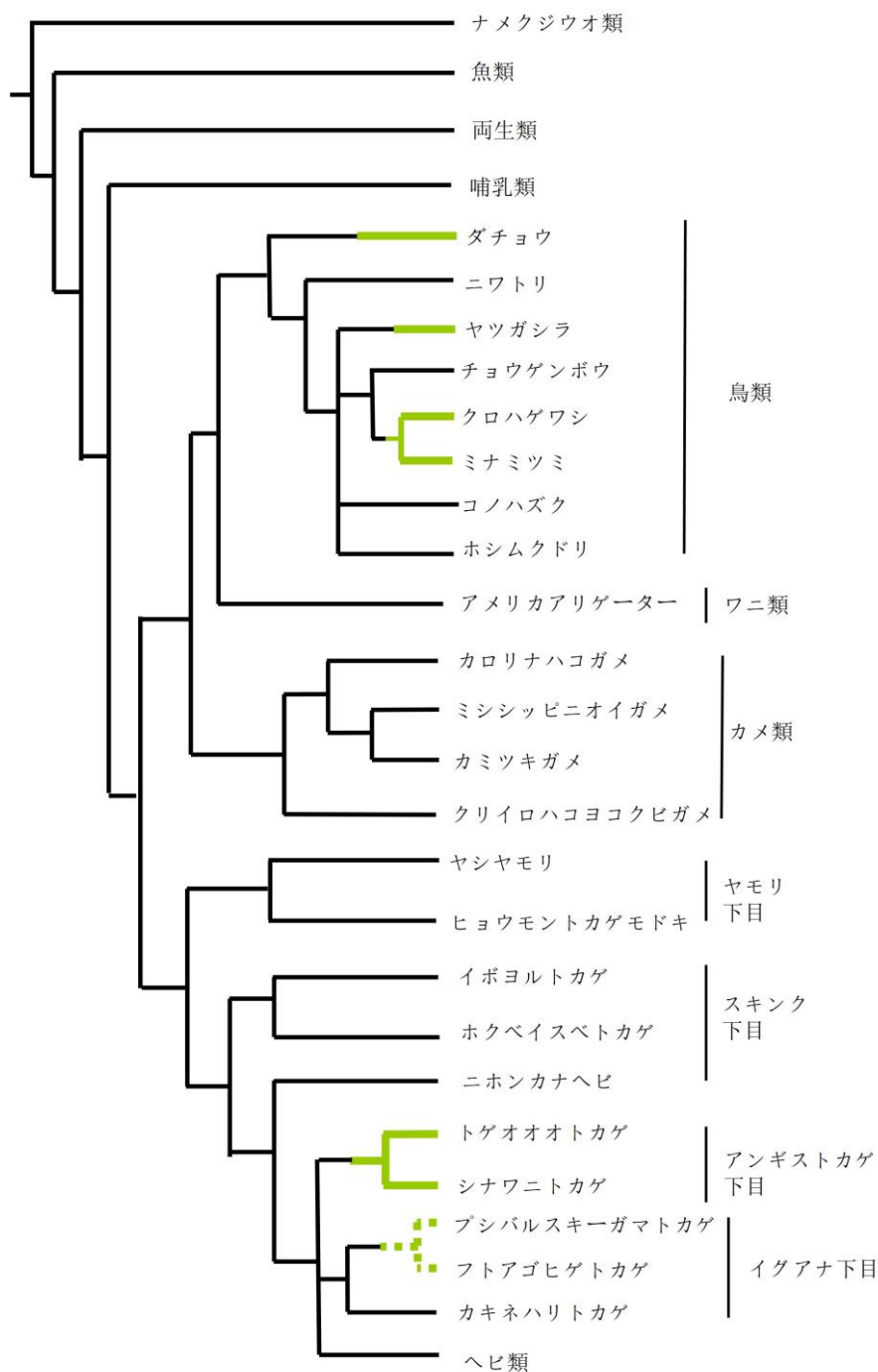


図 28 脊椎動物 ND1 mRNA における polyA 付加サイトの進化
 系統関係は Hedges and Kumar(2009)に基づく。緑色の実線は、mtDNA 配置の変動なしで ND1 mRNA のポリアデニル化サイトに変化が生じた系統を示す。緑の点線は、アガマ科とカメレオン科の共通祖先で生じた IQM→QIM の遺伝子配置変動を伴って生じた ND1 mRNA ポリアデニル化サイトの存在を示す。この図では、新規の polyA 付加サイトは、それを支持する polyA 含有 read の数が、ヒトと類似する polyA 付加サイトを支持する read の半分以上となったもののみを表示する。

→QIM の tRNA 遺伝子配置変動に連動して起きたと考えられる。なぜなら、tRNA^{Gln} 遺伝子は軽鎖にコードされているため、重鎖の転写産物においては、プロセッシングシグナルとして機能しない可能性が高いからである。従って、このポリアデニレーションサイトの変化は、配置変動を共有する(Macey et al., 1997)アガマ科とカメレオン科(本研究では取り上げていないが)の共通祖先で生じたと推定される(図 28)。IQM の遺伝子配置においても、QIM の遺伝子配置においても、重鎖コードの tRNA^{Ile} の 5' 末端でプロセッシングが起き、そこにポリアデニル化が生じるメカニズムは不変である。

一方、鳥類の一部の種では、IQM 領域に遺伝子配置変動がないにもかかわらず、ND1 mRNA のポリアデニレーションサイトが変化していた(図 19)。鳥類のダチョウ、ヤツガシラ、クロハゲワシ、ミナミツミでは、tRNA^{Met} の直前にポリアデニル化サイトが見出された(図 19)。ND1 遺伝子と tRNA^{Ile} 遺伝子の境界における塩基配列を調べたところ、このうち 3 種では(ダチョウ、ヤツガシラ、クロハゲワシ)、ND1 遺伝子と tRNA^{Ile} 遺伝子が 2 塩基オーバーラップしているのに対し、ポリアデニル化サイトの変化がない 4 種の鳥類及びミナミツミではオーバーラップがなかった(図 29)。私の現在の仮説は、このオーバーラップが、tRNA^{Ile} 遺伝子 5' 末端における polyA 付加サイトの消失と関連したと考えるものである。オーバーラップがある種では、tRNA^{Ile} 遺伝子の 5' 末端で RNA プロセッシングが起きると、ND1 mRNA の終止コドンが生じないと予想されるからである(図 29)。

一方、トカゲ類のシナワニトカゲとトゲオオトカゲでは、両遺伝子のオーバーラップがないものの、tRNA^{Ile} 遺伝子の 5' 末端と tRNA^{Met} 遺伝子の 5' 末端の両位置に、polyA 付加サイトが存在した(図 13)。これらの種における polyA 付加サイトの多様化の理由は不明であるが、ミナミツミにおいて遺伝子オーバーラップがなくても同様の polyA 付加サイトの変化が起きていることから、必ずしも遺伝子オーバーラップが必須であるという訳ではないようである(図 29)。

4.2.4 その他の mRNA の polyA 付加サイトの進化

曲頸亜目のクリイロハコヨコクビガメでは、ATP8/ATP6 mRNA のポリアデニレー

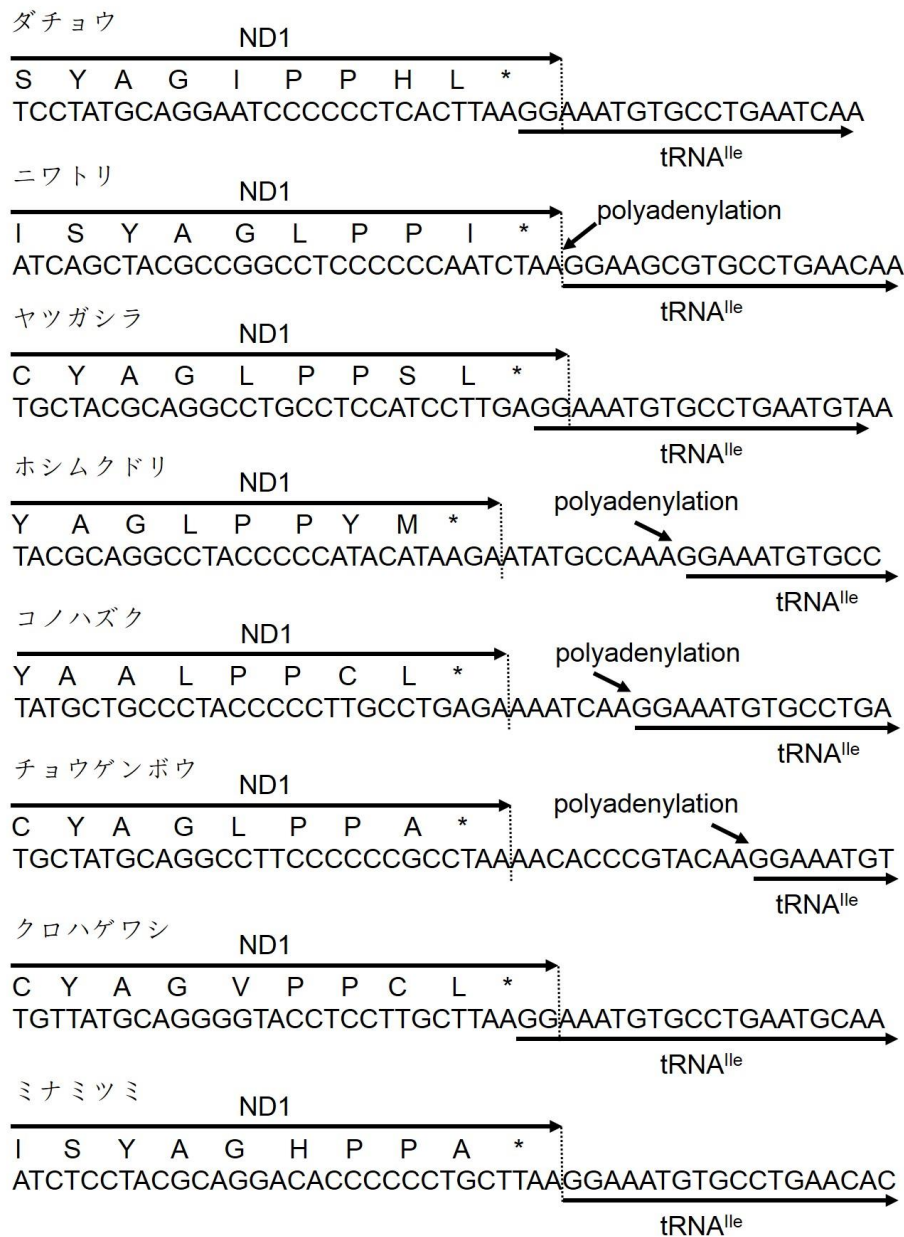


図 29 鳥類の ND1 遺伝子と tRNA^{le} 遺伝子の境界における塩基及びアミノ酸配列。アミノ酸を 1 文字で表記し、対応する 3 つの塩基の一つ目の位置で表す。「*」は終止コドンの位置を示す。横方向の矢印はタンパク質遺伝子または tRNA 遺伝子の方向を示す。

シオンサイトが消失していた。また、ATP8/ATP6 mRNA と CO3 mRNA に対応する read の分布を調べたところ、マップされた read 頻度は両者の境界部で大きく減少していなかった(図 17)。以上のことから、ATP8、ATP6、CO3 の 3 遺伝子のコード領域を含むトリストロニック mRNA の存在が示唆された(図 17)。このような変化は、私が調べた他のいかなる種にも存在していなかったことから、カメ類のクリイロハコヨコ

クビガメに繋がる系統において独自に生じたものと推定される(図 30)。その変化のメカニズムは、恐らく遺伝子の重複と関係している。ヒト mtDNA において、ATP8 遺伝子と ATP6 遺伝子のコード領域は、互いに 46bp 重複しており、ND4L 遺伝子と ND4 遺伝子のコード領域も同様に 4bp 重複している(Anderson et al., 1981)。これらの重複した遺伝子は、いずれもジシストロニック mRNA として翻訳に供されることが分かっている(Montoya et al., 1981)。すなわちタンパク質遺伝子のコード領域の重複と mRNA 分子の共用化は連動しているように思われる。コード領域がオーバーラップした遺伝子がジシストロニック mRNA として翻訳される例は、ミトコンドリアに限らず、タバコの葉緑体などにおいても見られる(Yukawa and Sugiura, 2008)。

クリイロハコヨコクビガメ mtDNA において、ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の境界領域の塩基配列を調べたところ、終止コドン部分を除いても、両遺伝子の間に 5bp のオーバーラップが認められた(図 31)。ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の間のオーバーラップは、他のカメ類の 3 種(図 31)を含め、私が調べた他の 60 種の脊索動物 mtDNA においては全く見られない現象であった(data not shown)。これらの種の mtDNA では、ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の間に tRNA 遺伝子は存在しないが、恐らく未知の RNA 二次構造が RNA プロセッシング酵素によって認識されて境界部が切断を受け、ATP8/ATP6 mRNA と CO3 mRNA に分離されると推定される(Ojala et al., 1981)。以上のことから、クリイロハコヨコクビガメの祖先系統において、切断酵素によって認識される二次構造が突然変異によって消失し、同時に遺伝子コード領域の重複が生じたことで、トリシストロニック mRNA が生成したと推定される。このような偶然の連鎖による変化は極めて稀にしか起こらないため、クリイロハコヨコクビガメ以外の種では見つからなかったと解釈される。

また、本研究では、ヒトにおける CYTB mRNA のポリアデニレーションサイト (tRNA^{Thr} 遺伝子の 5' 末端に位置する) が変化した事例が 7 種でみられた。そのうち 6 種(アメリカアリゲーター、*Q. boulengeri*、トノサマガエル、アオガエル、ババトラフガエル、フクロヤツメ)の事例は、CYTB 遺伝子周辺の遺伝子配置変動が原因となって、polyA 付加サイトが変化したと推測できるものであった(図 30 の紫点線の系統)。無尾類の *Q. boulengeri*、トノサマガエル、アオガエル、ババトラフガエルの 4 種では、同じように CYTB 遺伝子の直下に MNCR が位置し、MNCR の 5' 末端付近に

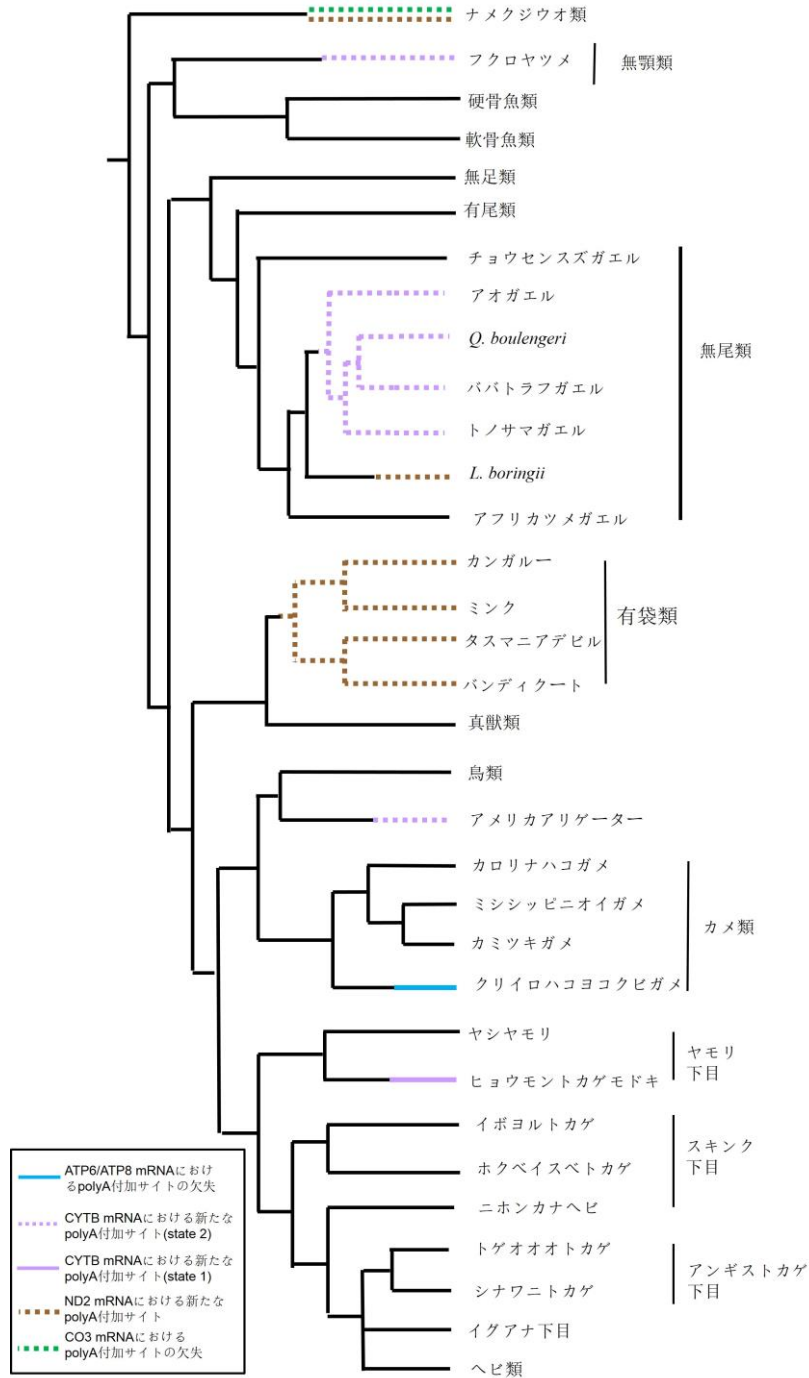


図 30 その他の mRNA における polyA 付加サイトの進化

系統関係は Hedges and Kumar(2009)に基づく。青色の実線は、ATP8/ATP6/CO3 のトリシストロニック mRNA の存在を示す。紫色の点線は、遺伝子配置変動に伴って CYTB mRNA に生じた新しい polyA 付加サイト(state 2)の存在を示す。紫色の実線は、mtDNA 遺伝子配置の変動なしで CYTB mRNA に生じた新しい polyA 付加サイト(state 1)の存在を示す。黄土色の点線は、遺伝子配置変動に伴って生じた ND2 mRNA のポリアデニル化サイトの变化を示す。緑色の点線は、tRNA^{Gly} 遺伝子の配置変動に伴って生じた CO3/ND3 のジシストロニック mRNA の存在を示す。この図では、新規の polyA 付加サイトは、それを支持する polyA 含有 read の数が、ヒトと類似する polyA 付加サイトを支持する read の半分以上となったもののみを表示する。

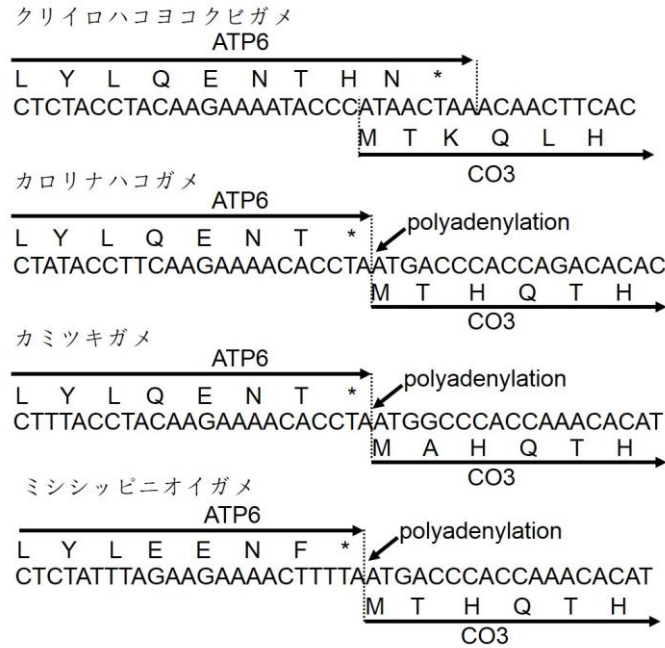


図 31 カメ類の ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子の境界における塩基及びアミノ酸配列図の説明は図 29 に準ずる。

polyA 付加サイトが見出された。おそらく、これら 4 種のカエルの共通祖先で生じた
と推定される(図 30 紫点線の系統)。一方、ヒョウモントカゲモドキの MNCR 内に発見
された CYTB mRNA の polyA 付加サイトは、遺伝子配置変動に伴って生じたもので
はなく、これら両生類との系統の隔たりも考慮すると、恐らく独立に獲得されたもので
あると考えられる(図 30 の紫実線の系統)。

さらに、6 種(有袋類 4 種、*L. boringii*、*B. floridae*)においては、ND2 遺伝子下流
の tRNA^{Trp} 遺伝子の配置変動が原因で、ND2 mRNA の polyA 付加サイトがそれぞ
れ合理的に変化した事例があった。有袋類の 4 種では、WANCY→ACWNY の配
置変動が有袋類の共通祖先で生じたと考えられていることから (Pääbo et al.,
1991)、ポリアデニル化サイトの変化は有袋類の共通祖先で一回生じたことが示唆さ
れる。また、有袋類における変化と、*L. boringii* における変化と *B. floridae* における
変化もそれぞれ独立に生じたものと考えられる(図 30)。

最後に、3.4.9 に述べたように、*B. floridae* の CO3 mRNA の 3' 末端のポリアデ
ニレーションサイトが消失していた。CO3 mRNA と ND3 mRNA に対応する read の
分布を調べたところ、マップされた read 頻度は両者の境界部で大きく減少していな
かった(補遺 3:61 の赤矢印地点)。以上のことから、CO3 と ND3 の 2 遺伝子のコー

ド領域を含むジシストロニック mRNA の存在が示唆された(補遺 3:61 の赤矢印地点)。その変化のメカニズムは、恐らく tRNA^{Gly} 遺伝子の転位と関係している。ヒト mtDNA の CO3 遺伝子と ND3 遺伝子の間には tRNA^{Gly} 遺伝子がコードされ、この tRNA^{Gly} の二次構造が RNA プロセッシング酵素によって認識されて境界部が切断を受け、CO3 mRNA と ND3 mRNA に分離される(図 4)。*B. floridae* では、遺伝子配置変動により tRNA^{Gly} 遺伝子が ND5 遺伝子の直下に転位している。これに伴って、CO3 mRNA と ND3 mRNA の間が分離されなくなり、CO3/ND3 ジシストロニック mRNA が生じたと思われる。なお、*B. floridae* における CO3 遺伝子と ND3 遺伝子の境界領域の塩基配列(DDBJ Sequence Read Archive アクセッション番号 AF098298)を調べたところ、両遺伝子の上にオーバーラップが見つからなかった(CO3 遺伝子の 3' 末端には TAA 終止コドンが mtDNA 上にコードされ、その直後の ATG が ND3 遺伝子の開始コドンとなっている)。この CO3 mRNA におけるポリアダニル化サイトの消失は、ナメクジウオ類の祖先系統で生じたと思われる(図 30)。

4.3 mt-mRNA 構造の進化

本研究では、脊索動物の主要系統を代表する 61 種について、mt-mRNA の構造を RNA-Seq データから推定して比較した。その結果、様々な系統において独立して何度も、ヒトで見られた mt-mRNA 構造(図 4)から変化したことが示唆された(図 25、図 27、図 28、図 30)。しかし一方で、ヒト型の mt-mRNA 構造は、9 種の真獣類のみならず(図 20B)、4 種のトカゲ類(図 13B)、4 種のヘビ類(図 15B)、1 種のカメ類(図 16B)、7 種の両生類(図 21B)、7 種の魚類(図 22B)で共通に見られることも分かった。無顎類のフクロヤツメやナメクジウオ類の *B. floridae* では、mtDNA 遺伝子配置変動に伴い、一部の mt-mRNA のポリアダニレーション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(図 22A; 図 23)。

これらの結果から、ヒト型の mt-mRNA 構造が脊索動物の進化の初期段階で既に成立していたことが強く示唆される。すなわち、脊索動物一般に関して、その成熟型 mt-mRNA は、一部の遺伝子オーバーラップがある mRNA(ATP8/ATP6 mRNA や ND4L/ND4 mRNA)を除いて、モノシストロニックな mRNA として存在していると考え

えられる。また、それら mt-mRNA の 5' 末端の非翻訳領域は共通に極めて短く(すなわちこの領域にリボソームへの結合部位が含まれる可能性は極めて低い)、3' 末端への polyA 付加は原則として tRNA punctuation model (Ojala et al., 1981)に基づいて行われるものと考えられる。これらの種において、初期転写物の生成メカニズムが、ヒトで解明されたものと同かどうかは現時点でもなお未解明であるものの、それらがプロセッシングを受ける際の特徴がいくつか示唆された。

一つは、逆鎖にコードされる tRNA 遺伝子は、プロセッシングシグナルとして機能しないということである。この特徴は、アガマ科トカゲ類における IQM→QIM 配置変動に伴う ND1 mRNA の polyA 付加サイトの変化(図 13A)、有袋類 4 種・両生類 *L. boringii*・ナメクジウオ類 *B. floridae* における WANCY 領域の配置変動に伴う ND2 mRNA の polyA 付加サイトの変化(図 20A; 図 21A; 図 23)などに現れている。もう一つの特徴は、機能的な tRNA 遺伝子が必ずしも存在しなくても、プロセッシングを受けて polyA が付加されるケースもあるということである。この特徴が例示されたケースとしては、鳥類の ND5 遺伝子と CYTB 遺伝子の境界に見出された ND5 mRNA の polyA 付加サイト(図 19)、ヒョウモントカゲモドキやババトラフガエルの MNCR 中に見出された CYTB mRNA の新規 polyA 付加サイト(図 14; 図 21A)、ニホンカナヘビや鳥類を始めとした多くの種で見られた ND5 mRNA の新規 polyA 付加サイト(図 8; 図 19)などがある。RNA 切断活性がある酵素は、tRNA の両末端を切断する酵素 (RNaseP と RNaseZ) だけではない。もしかすると、tRNA を基質としない RNase によって切断を受けた部位に polyA が付着する未解明の機構があるのかもしれないと考えている。

表 4 のデータからは、mt-mRNA の定常状態における存在量に関して、興味深い傾向が見られた。表 4 では、24 種の脊椎動物それぞれについて各 mt-mRNA に対する RPKM のデータを計算して示した。前述のように、これらの RPKM のうち 1.6-9.0%程度は、未成熟のポリシストロニック RNA に由来していると思われるが、それ以外の大部分は成熟型の mRNA に由来するものと考えてよい。従って、それらの RPKM は、成熟型 mRNA それぞれの定常状態におけるおおよその量比を表すと解釈できる。表 3 の結果によれば、ニホンカナヘビの CO1、CO2、CO3、ATP8/ATP6 の mRNA の割合は、ND1、ND2、ND3、ND4L/ND4、ND5、CYTB の存在量より多い

表5. 24種の脊椎動物における重鎖コードmt-mRNAの存在量の比較検定

| | CO1 | CO3 | CO2 | ATP8/ATP6 | CYTB | ND1 | ND4L/ND4 | ND2 | ND3 | ND5 |
|-----------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|----------|---------|---------|-----|
| CO1 | | ** | * | | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| CO3 | 0.00670 | | | | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| CO2 | 0.03251 | 0.30336 | | | ** | ** | *** | *** | *** | *** |
| ATP8/ATP6 | 0.13789 | 0.69154 | 0.79424 | | | | * | * | ** | ** |
| CYTB | 0.00000 | 0.00108 | 0.00111 | 0.05076 | | | | ** | ** | *** |
| ND1 | 0.00000 | 0.00376 | 0.00150 | 0.05081 | 0.26458 | | | ** | ** | *** |
| ND4L/ND4 | 0.00000 | 0.00125 | 0.00016 | 0.02223 | 0.07010 | 0.27229 | | * | ** | *** |
| ND2 | 0.00000 | 0.00023 | 0.00004 | 0.01052 | 0.00867 | 0.02202 | 0.02605 | | | ** |
| ND3 | 0.00000 | 0.00013 | 0.00001 | 0.00629 | 0.00302 | 0.00610 | 0.00316 | 0.16363 | | |
| ND5 | 0.00000 | 0.00001 | 0.00000 | 0.00216 | 0.00008 | 0.00024 | 0.00009 | 0.00608 | 0.12026 | |

対応関係のある検定により表4に示したRPKM値をmRNAごとにペアワイズで比較した。*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ 。灰色の比較は、CO1-3とCYTB、ND1-6及びND4L mRNAの比較を示す。

ことが示された。この結果はニホンカナヘビのみならず他の多くの種でも共通して見られた(表 4)。24 種の RPKM を用いて対応関係のある t 検定を行った結果、CO1、CO2、CO3 の mRNA 存在量は ND1、ND2、ND3、ND4L/ND4、ND5、CYTB の mRNA 存在量より有意に多いことが示された(表 5)。

「tRNA punctuation model」(Ojala et al., 1981)に基づけば、ポリシストロニックな一次転写産物の切断によって生じる mRNA はほぼ同量であると予想される。それにもかかわらず、mRNA によって定常状態の存在割合に違いが生じる要因としては、各 mRNA の安定性に差があるという解釈が考えられる。

牛心筋の呼吸鎖複合体 I ~IVについて、その存在比を実験的に測ったところ、おおよそ 1 対 1 対 3 対 7 対 3.5 と報告された(Schägger and Pfeiffer, 2001)。すなわち複合体 I に較べて、複合体IVと複合体Vは存在量が比較的多い。この結果は、mRNA の存在量として複合体IVを構成する CO1-3 や複合体Vを構成する ATP8/6 が多く、複合体 I を構成する ND1-5 が少なかった本研究の結果と非常に整合的である。つまり多く合成する必要があるタンパク質の mRNA の存在量を多くするという合目的的なメカニズムが働いていると言える。表 3、表 4 の結果は、このメカニズムに沿った mt-mRNA 量の調節が、進化の過程で保守的に働いていることを示唆している。mtDNA の遺伝子配置の変動は、こうした調節機構を本質的に壊すような影響を与えておらず、各 mt-mRNA の構造上の未解明の要因により、それぞれの mt-mRNA の安定性が決められていると推測される。

以上の考察から、脊索動物の進化の初期段階から、mt-mRNA の構造や存在

比を合理的に制御する機構が成立し、数億年間の長きに渡り保守的に保たれてきたことが示唆された。今後は、本研究と同様の手法を用いて脊索動物以外の動物分類群にも解析の対象を広げ、mt-mRNA 構造の進化パターンをより古くまでさかのぼって調べる研究が期待される。それによって、ヒト型 mt-mRNA との共通点や相違点を明らかにすることで、ミトコンドリア遺伝子発現系の進化についてさらに新しい知見が得られるであろう。

結論

本研究では、60種の脊椎動物及びナメクジウオの mt-mRNA 構造を比較した結果、ヒト型の mRNA 構造は脊椎動物の進化の初期段階で成立していたことが判明した。一方、調査したうちの 29 種では、ヒトと異なるポリアデニル化サイトが見られた。遺伝子配置変動によって必然的に変化したと考えられるサイトに加え、遺伝子配置変動なしで遺伝子重複などの原因で変化したと考えられるサイトも存在していた。特定の分類群の共通祖先で一回だけ生じたと推定されるポリアデニル化の進化もあったが、独立して複数回生じたと考えられる変化もあった。このように、mt-mRNA のポリアデニル化部位を効率的かつ俯瞰的に調べる新しい手法を確立したことにより、mt-mRNA のポリアデニル化部位の可塑性が初めて示され、その変化の一部に対して進化学的な解釈を与えることができた。

本研究で確立した手法を用いて、様々な要因(例えば、年齢、疾病、栄養状態など)がミトコンドリア mRNA の構造や存在量に与える影響を解明することが可能となった。本研究では、主に肝臓由来の RNA-Seq データを用いて解析したが、一部には心臓や腎臓など他の臓器から得たデータも利用した。本研究は、臓器の種類によって mt-mRNA の構造は変わらないという前提のもとに行われたが、厳密に言えばそれは証明されていない。この点に関しても新たな研究の方向性を示すことができた。また、肥満や視神経萎縮などの疾患により、ヒトの mt-mRNA に付加する polyA のサイズが減少しているという報告があり、疾患と mt-mRNA の構造の関係も将来しっかり調査されるべきである。本研究は脊椎動物を対象としたが、無脊椎動物では、転写のプロモーターが mtDNA 上に数カ所存在し、脊椎動物とは異なる転写調節機構を持つことが示唆されている。こうした無脊椎動物の mt-mRNA の構造を調べ、脊椎動物と比較することも興味深いと考えられる。

謝辞

博士課程から五年間に、周りの皆さんにご協力をいただきました。まずは指導教員である熊澤慶伯教授に私に親切にご指導を頂き、心から最大の感謝をいたします。先生には、研究に関する知識だけではなく、生活上、自分の成長まで多くのことを丁寧に教えて頂いて、日々励まされました。

大阪医科大学の橋口康之先生には、プログラミングに関する御助言及び御協力をいただき、自分の研究に大変助かりました。

生物多様性研究センターの村瀬幸雄さん、小木曾学さん、鈴木美恵子さんには、シーケンシングなどの実験に色々手伝って頂いて、ありがとうございました。

システム自然科学研究科の先生方には、色々な知識を教えて頂いて、自分の研究にアドバイスを提供して下さり、ありがとうございました。

北海道システム・サイエンス(株)の岡田宰博士には、次世代シーケンスデータの解析でいろいろ御協力頂いて、ありがとうございました。

RNA-Seq 実験で資料を提供して頂くとともに有益なご助言を頂いたイルミナ(株)に感謝の意を表します。

名東水園(株)リミックスペポニの八木厚昌氏には、動物の飼育に関して有用な情報を提供していただき、ありがとうございました。

研究室の栗崎政希さん、藤谷武史さん、ワーユ・エンドラ・クスマさん、ケン・ラティ・プロボサリさんには、毎日細かいことまで手伝って頂いて、幸せな雰囲気を作ってくれて下さり、どうもありがとうございました。

最後に、自国にいる両親たち、特にどんなときでも、私を支持し、明るく励まし続けてくれた妻 徐倩、誠にありがとうございました。

参考文献

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:457-465.

Bai Y, Shakeley RM, Attardi G. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol Cell Biol*. 2000;20:805-815.

Bernt M, Braband A, Schierwater B, Stadler PF. Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Mol Phylogenet Evol*. 2013;69:328-338.

Bibb MJ, Van Etten RA, Wright CT, Walberg MW, Clayton DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 1981;26:167-180.

Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1767-1780.

Börner GV, Mörl M, Janke A, Pääbo S. RNA editing changes the identity of a mitochondrial tRNA in marsupials. *EMBO J*. 1996;15:5949-5957.

Bowmaker M1, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003;278, 50961-50969.

Brown SM, Goecks J. RNA sequencing with next-generation sequencing. In: Brown SM, editor. *Next-generation DNA sequencing informatics*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. p. 285-318.

Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:921-929.

Cargal WL. *Your mitochondria: key to health and longevity*. Amazon Digital Services, LLC; 2017.

Chang JH, Tong L. Mitochondrial poly(A) polymerase and polyadenylation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:992-997.

Chartier A, Klein P, Pierson S, Barbezier N, Gidaro T, Casas F, Carberry S, Dowling P, Maynadier L, Bellec M, Oloko M, Jardel C, Moritz B, Dickson G, Mouly V, Ohlendieck K, Butler-Browne G, Trollet C, Simonelig M. Mitochondrial dysfunction

- reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet.* 2015; 11:e1005092.
- Chomyn A. Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33:251-257.
- Clayton DA, Tapper DP. Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *J Biol Chem.* 1981;256: 5109-5115.
- Clayton DA. Transcription of the Mammalian Mitochondrial Genome. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:573–594.
- Clayton DA. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol.* 1992;141:217-232.
- Coucheron DH, Nymark M, Breines R, Karlsen BO, Andreassen M, Jørgensen TE, Moum T, Johansen SD. Characterization of mitochondrial mRNAs in codfish reveals unique features compared to mammals. *Curr Genet.* 2011;57:213-222.
- Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:485.
- Crosby AH, Patel H, Chioza BA, Proukakis C, Gurtz K, Patton MA, Sharifi R, Harlalka G, Simpson MA, Dick K, Reed JA, Al-Memar A, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Cross HE, Lightowlers RN. Defective mitochondrial mRNA maturation is associated with spastic ataxia. *Am J Hum Genet.* 2010;87:655–660.
- Desjardins P, Morais R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J Mol Biol.* 1990;212:599-634.
- Evans D, Marquez SM, Pace NR. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31: 333-341.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8:175-185.
- Gilles A, Meglécz E, Pech N, Ferreira S, Malausa T, Martin J. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics.* 2011;12:245.
- Guja KE, Garcia-Diaz M. Hitting the brakes: Termination of mitochondrial transcription. *Biochimica Biophysica Acta.* 2012;1819: 939–947.
- Hedges SB, Kumar S, editors. *The Timetree of Life*. New York: Oxford University

Press; 2009.

Janke A, Arnason U. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (birds and crocodiles). *Mol Biol Evol.* 1997;14:1266-1272.

Jørgensen TE, Bakke I, Ursvik A, Andreassen M, Moum T, Johansen SD. An evolutionary preserved intergenic spacer in gadiform mitogenomes generates a long noncoding RNA. *BMC Evol Biol.* 2014;14:182.

Kumazawa Y. Mitochondrial genomes from major lizard families suggest their phylogenetic relationships and ancient radiations. *Gene.* 2007;388:19-26.

Kumazawa Y, Miura S, Yamada C, Hashiguchi Y. Gene rearrangements in gekkonid mitochondrial genomes with shuffling, loss, and reassignment of tRNA genes. *BMC Genomics.* 2014;15:930.

Kumazawa Y, Nishida M. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Mol Biol Evol.* 1995;12:759-772.

Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T. Gene rearrangements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. *Mol Biol Evol.* 1996;13: 1242-1254.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10:R25.

Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, Nusbaum C, Thompson DA, Friedman N, Gnirke A, Regev A. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nat Methods.* 2010;7:709-715.

Levy S, Schuster G. Polyadenylation and degradation of RNA in the mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1475-1482.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078-2079.

Lopez Sanchez MIG, Mercer TR, Davies SMK, Shearwood A-MJ, Nygård KKA, Richman TR, Mattick JS, Rackham O, Filipovska A. RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle.* 2011;10:2904-2916.

Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Papenfuss TJ. Evolutionary shifts in three major

- structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards. *J Mol Evol.* 1997;44:660-674.
- Marková S, Filipi K, Searle JB, Kotlík P. Mapping 3' transcript ends in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) mitochondrial genome with RNA-Seq. *BMC Genomics.* 2015;16:870.
- Martin M. Cutadapt removes adaptor sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal.* 2011;17:10-12.
- Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood A-MJ, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell.* 2011;146:645-658.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:7195-7199.
- Montoya J, Ojala D, Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature.* 1981;290:465-470.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008;5:621-628.
- Nabholz B, Jarvis ED, Ellegren H. Obtaining mtDNA genomes from next-generation transcriptome sequencing: a case study on the basal Passerida (Aves: Passeriformes) phylogeny. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;57:466-470.
- Nagaike T, Suzuki T, Katoh T, Ueda T. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J Biol Chem.* 2005;280:19721-19727.
- Neira-Oviedo M, Tsyganov-Bodounov A, Lycett GJ, Kokoza V, Raikhel AS, Krzywinski J. The RNA-Seq approach to studying the expression of mosquito mitochondrial genes. *Insect Mol Biol.* 2011;20:141-152.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature.* 1981;290:470-474.
- Pääbo S, Thomas WK, Whitfield KM, Kumazawa Y, Wilson AC. Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *J Mol Evol.* 1991;33:426-430.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison

of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.

Quinlan AR, Hall IM. BEDtools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010;26:841-842.

Quinn TW, Mindell DP. Mitochondrial gene order adjacent to the control region in crocodile, turtle, and tuatara. *Mol Phylogenet Evol*. 1996;5:344-351.

Rackham O, Shearwood AM, Mercer TR, Davies SM, Mattick JS, Filipovska A. Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *RNA*. 2011;17:2085-2093.

Redko Y, Li de la Sierra-Gallay I, Condon C. When all's zed and done: the structure and function of RNase Z in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:278-286.

Reiter NJ, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragón A. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*. 2010;468:784-789.

Rorbach J, Minczuk M. The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem J*. 2012;444:357-373.

Rossmannith W. Of P and Z: mitochondrial tRNA processing enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:1017-1026.

Schuster G, Slomovic S. Stable PNPase RNAi silencing: Its effect on the processing and adenylation of human mitochondrial RNA. *RNA*. 2008;14: 310–323.

Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*. 2008;5:16-18.

Schägger H., Pfeiffer K. Ratio of oxidative phosphorylation complexes I–V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*. 2001;276:37861-37868.

Slomovic S, Laufer D, Geiger D, Schuster G. Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6427-6435.

Temperley RJ, Wydro M, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Human mitochondrial mRNAs - like members of all families, similar but different. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797:1081-1085.

- Tian Y, Smith DR. Recovering complete mitochondrial genome sequences from RNA-Seq: a case study of *Polytomella* non-photosynthetic green algae. *Mol Phylogenet Evol.* 2016;98:57-62.
- Torres TT, Dolezal M, Schlötterer C, Ottenwälder B. Expression profiling of *Drosophila* mitochondrial genes via deep mRNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:7509-7518.
- Tullo A, Tanzariello F, D'Erchia AM, Nardelli M, Papeo PA, Sbisà E, Saccone C. Transcription of rat mitochondrial NADH-dehydrogenase subunits. Presence of antisense and precursor RNA species. *FEBS Lett.* 1994;354:30-36.
- Wolstenholme DR. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol.* 1992;141:173-216.
- Yokobori S, Pääbo S. tRNA editing in metazoans. *Nature.* 1995;377:490.
- Yukawa M, Sugiura M. Termination codon-dependent translation of partially overlapping *ndhC-ndhK* transcripts in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:19550-19554.
- Xiao QJ, Wu XL, Michal JJ, Reeves JJ, Busboom JR, Thorgaard GH, Jiang ZH. A novel nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase PAPP1 is a potential candidate gene for the extreme obesity related phenotypes in mammals. *Int J Biol Sci.* 2006;2:171-178.
- Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:405-445.

発表論文

Sun, Y., Kurisaki, M., Hashiguchi, Y., and Kumazawa, Y. (2017) Variation and evolution of polyadenylation profiles in sauropsid mitochondrial mRNAs as deduced from the high-throughput RNA sequencing. *BMC Genomics* 18: 665.

学会等での発表

1. 孫壺、栗崎政希、橋口康之、熊澤慶伯
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
第 19 回日本進化学会、京都大学、2017 年 8 月
2. 孫壺、栗崎政希、橋口 康之、熊澤慶伯
RNA-Seq を用いた竜弓類ミトコンドリア mRNA の polyA 付加サイトの網羅的解析
第 5 回 NGS 現場の会、仙台国際センター、2017 年 5 月
3. 孫壺、栗崎政希、熊澤慶伯
次世代シーケンサーを用いた爬虫類 mtDNA 遺伝子発現様式の解析
第 4 回 NGS 現場の会、つくば国際会議場、2015 年 7 月
4. 孫壺、栗崎政希、熊澤慶伯
有鱗類ミトコンドリア RNA における polyA 付加の多様性
第 16 回日本進化学会、高槻市高槻現代劇場、2014 年 8 月
5. 孫壺、栗崎政希、熊澤慶伯：
爬虫類ミトコンドリア RNA の構造多様性の網羅的探索
第 15 回日本進化学会、筑波大学、2013 年 8 月
6. 孫壺、栗崎政希、熊澤慶伯
爬虫類ミトコンドリアにおける転写物の網羅的解析
第 14 回日本進化学会、首都大学東京南大沢キャンパス、2012 年 8 月

補遺

1. polyA_seq.pl script

```
use strict;
use warnings;

my $continuous_A_base = 7;
my $bases_after_poly_A = 1;
my @seq_file_data = ();
my @output_seq = ();
my $raw_seq = "";
my $seq_name = "";
my $infile_line = "";
my $flag_infile = 0;

open (INFILE, "$ARGV[0]") || die "Cannot open file:$!";
while(<INFILE>) {
    push(@seq_file_data, $_);
}
close(INFILE);

while($infile_line = shift(@seq_file_data)) {
    chomp($infile_line);
    if($infile_line =~ />/) {
        if ($flag_infile == 0) {
            $seq_name = $infile_line . ".n";
            chomp($seq_name);
            $flag_infile = 1;
            next;
        } else {
            unshift(@seq_file_data, $infile_line);
            search_polyA($seq_name, $raw_seq);
            $raw_seq = "";
            $flag_infile = 0;
            next;
        }
    } else {
        $raw_seq .= $infile_line;
    }
}
}
```



```

search_polyA($seq_name, $raw_seq);

foreach(@output_seq) {
    print $_;
}

sub search_polyA {
my $seq_name = $_[0];
my $raw_seq = $_[1];
$seq_name = $seq_name . "\n";
$raw_seq = $raw_seq . "\n";
if ($raw_seq =~ /[A]{$continuous_A_base,}[ATGCN]{0,$bases_after_poly_A}\n/) {

    push(@output_seq, $seq_name);
    push(@output_seq, $raw_seq);
} elsif ($raw_seq =~
/^[ATGCN]{0,$bases_after_poly_A}[T]{$continuous_A_base,}[AGCN]{1,}/) {
    push(@output_seq, $seq_name);
    push(@output_seq, $raw_seq);
}
}
}

```

2. 相補鎖の塩基配列に変換する script

```
use strict;
use warnings;

my @seq_file_data = ();
my @output_seq = ();
my $raw_seq = "";
my $seq_name = "";
my $infile_line = "";
my $flag_infile = 0;

open (INFILE, "$ARGV[0]") || die "Cannot open file:$!";
while(<INFILE>) {
    push(@seq_file_data, $_);
}
close(INFILE);

while($infile_line = shift(@seq_file_data)) {
    chomp($infile_line);
    if($infile_line =~ /¥>/) {
        if ($flag_infile == 0) {
            $seq_name = $infile_line . "¥n";
            chomp($seq_name);
            $flag_infile = 1; #フラグ立てる
            next;
        } else {
            unshift(@seq_file_data, $infile_line);
            complete($seq_name, $raw_seq);
            $flag_infile = 0;
            next;
        }
    } else {
        $raw_seq .= $infile_line;
    }
}

complete($seq_name, $raw_seq);
foreach(@output_seq) {
    print $_;
}
sub complete {

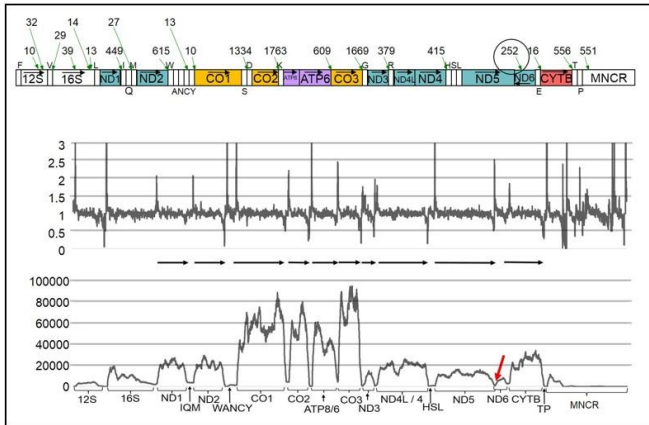
my $seq_name = $_[0];
my $raw_seq = $_[1];
```

```
$seq_name = $seq_name . "\n";
$raw_seq = $raw_seq . "\n";
my $revcomp = reverse($raw_seq);
## complement the reversed DNA sequence
$revcomp =~ tr/ACGTacgt/TGCAtgca/;
#$revcomp =~ tr/atgc/ATGC/;
print "$seq_name\n";
print "$revcomp\n";
}
```

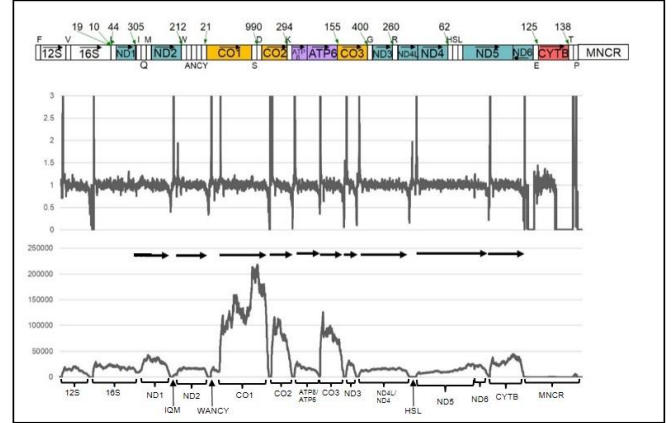
3. mt-mRNA の方向と範囲

本研究で取り扱った種の mt-mRNA の推定範囲と polyA 付加情報。図の説明は図 8 に準ずる。

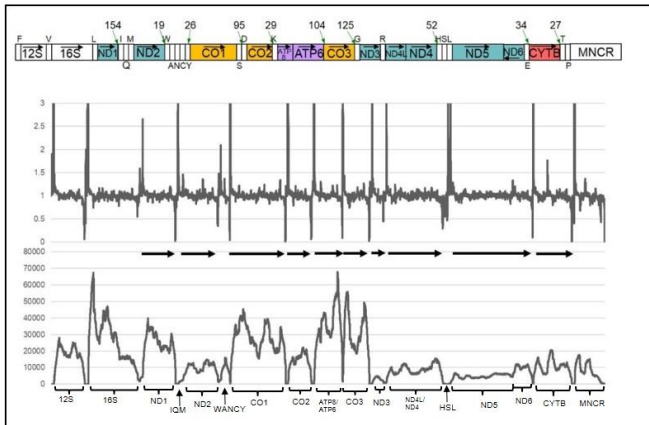
1. ニホンカナヘビ



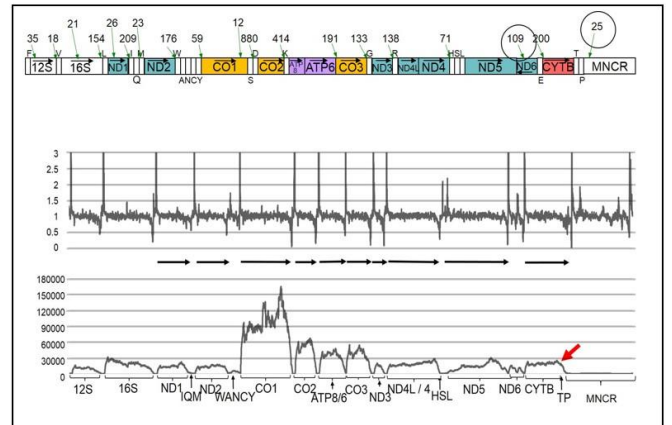
2. ホクベイスベトカゲ



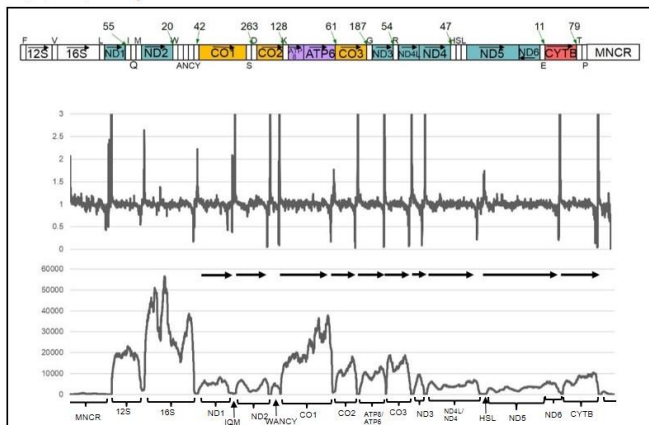
3. イボヨルトカゲ



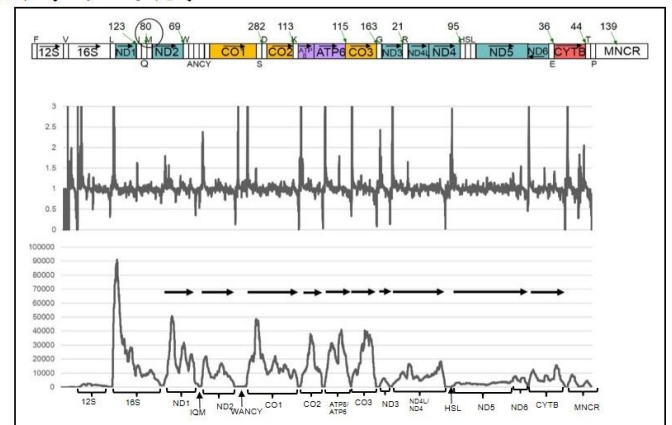
4. ヒョumontカゲモドキ



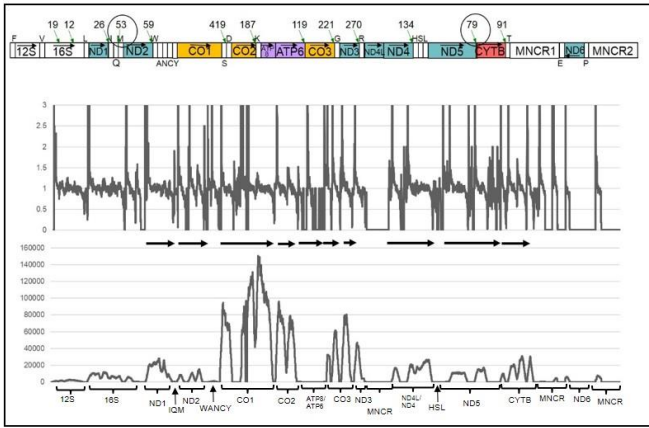
5. ヤシヤモリ



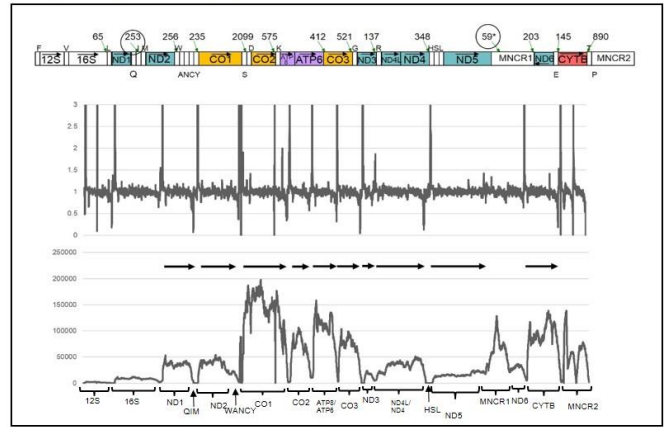
6. シナワニトカゲ



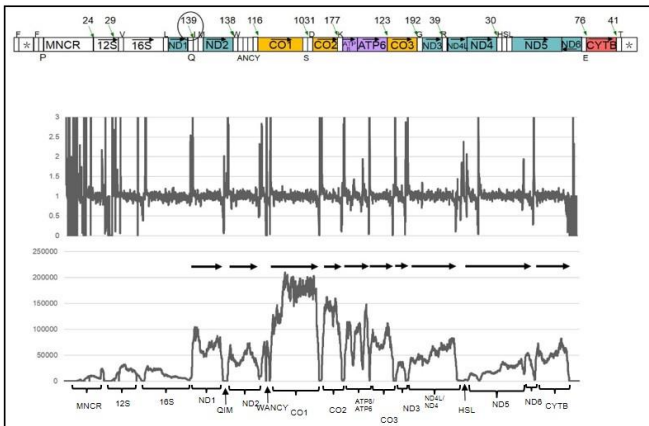
7. トゲオオトカゲ



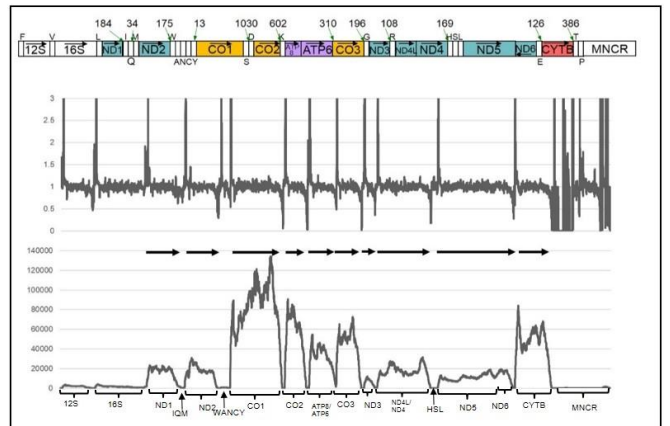
8. フトアゴヒゲトカゲ



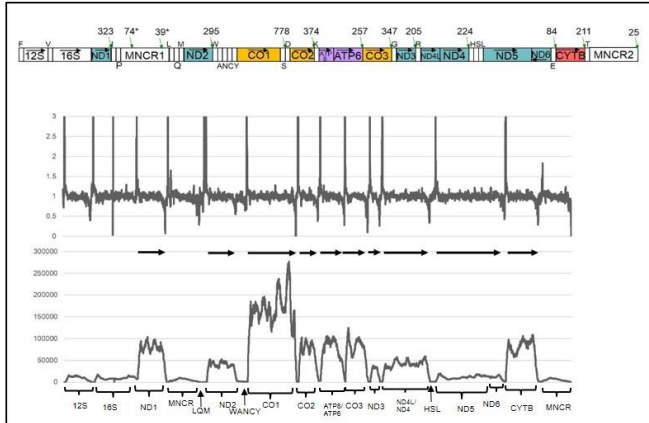
9. プシバルスキーガマトカゲ



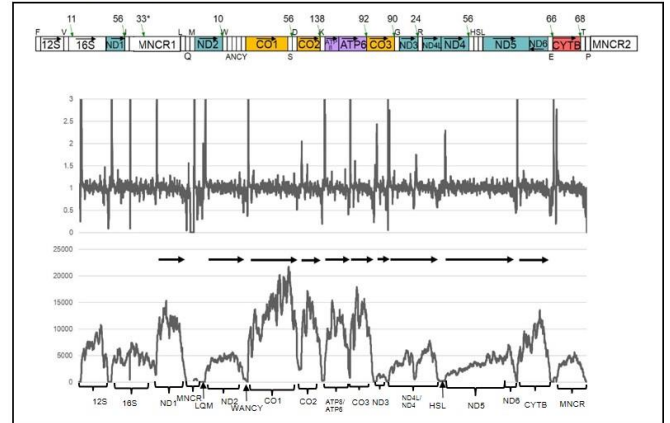
10. カキネハリトカゲ



11. ヌママムシ

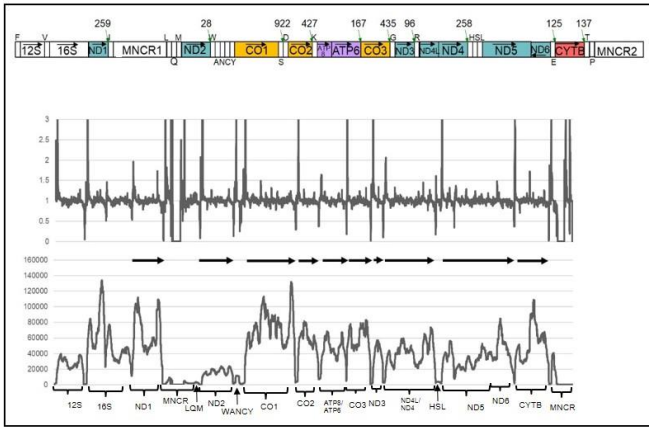


12. コーンスネーク

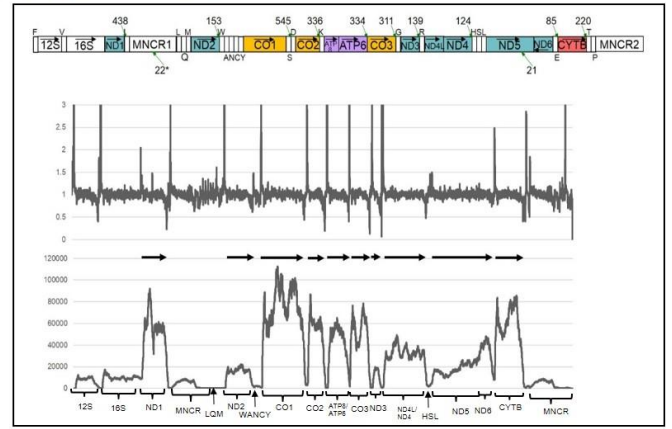


補遺 3(続き)

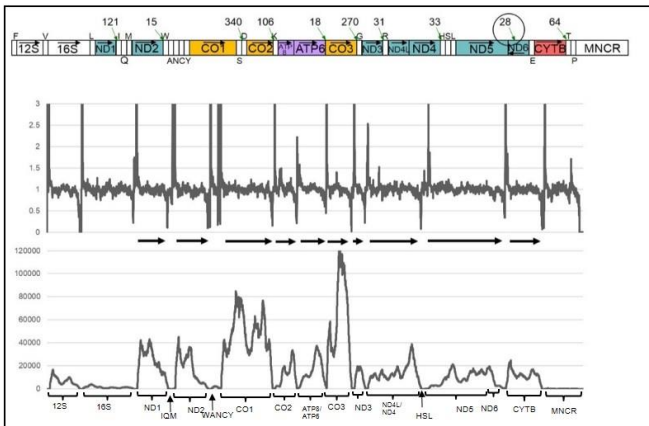
13. ロージーボア



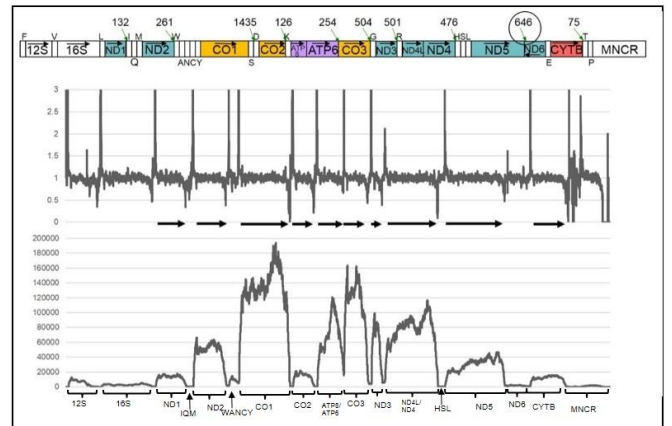
14. サンビームヘビ



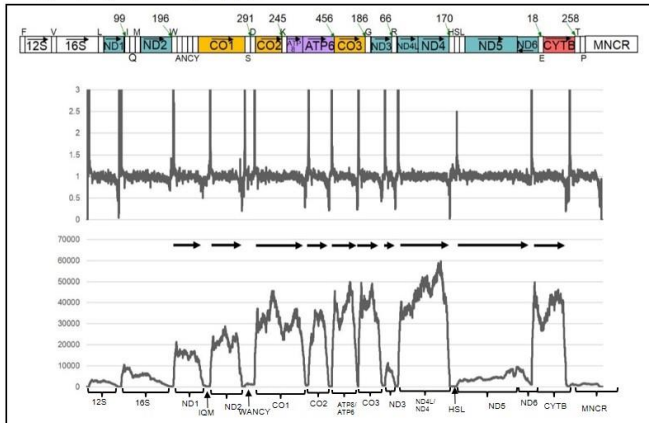
15. カミツキガメ



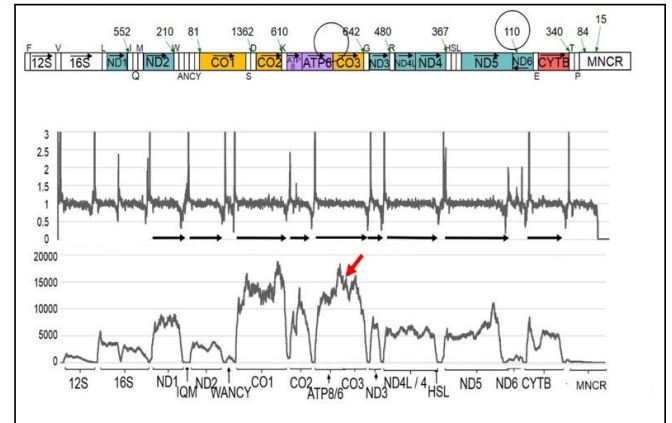
16. カリナハコガメ



17. ミシシッピニオイガメ

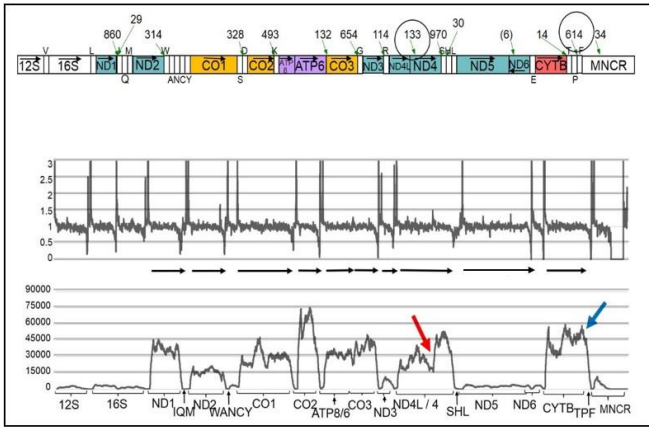


18. クリロハコヨコクビガメ

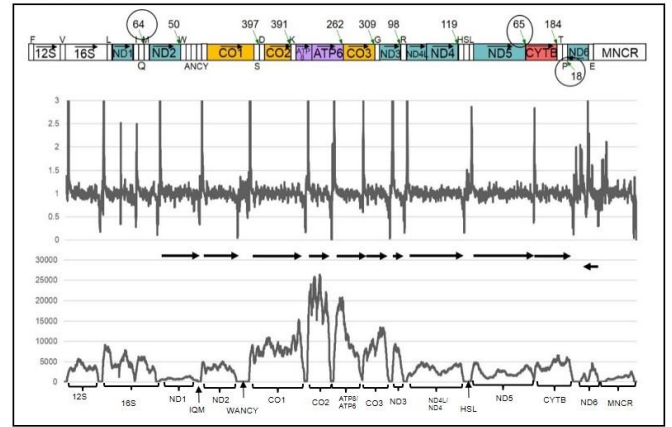


補遺 3(続き)

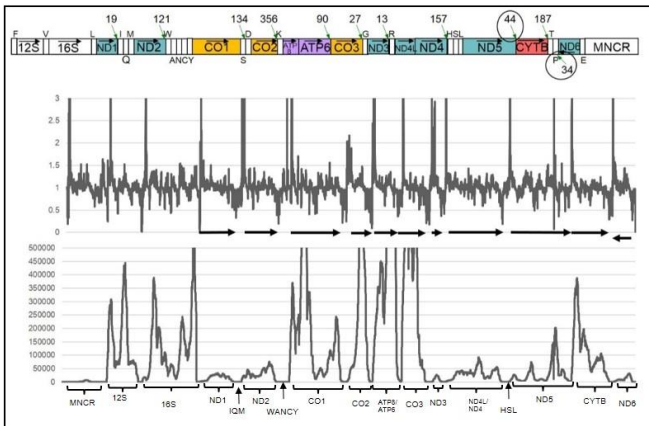
19. アメリカアリゲーター



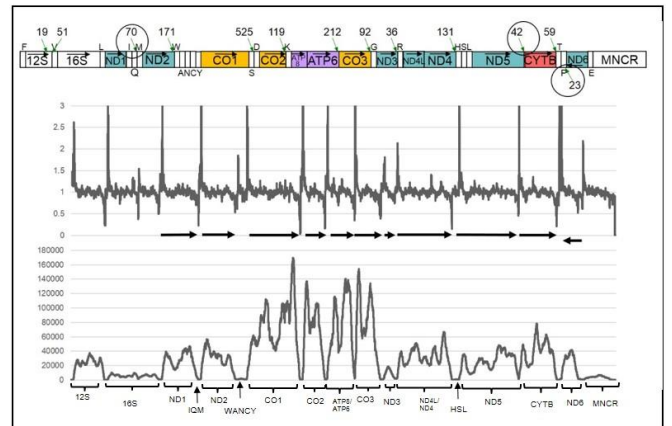
20. ダチョウ



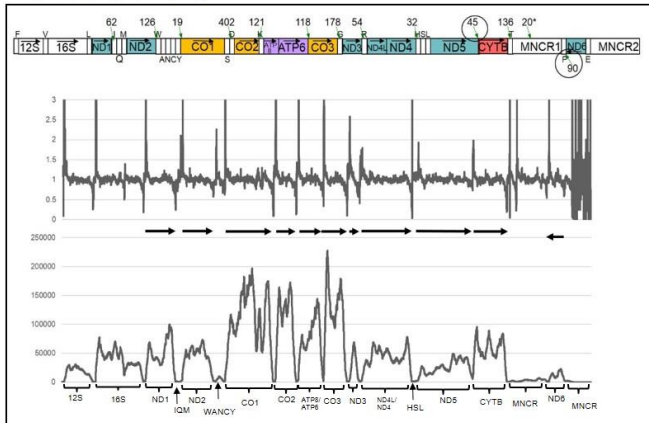
21. ニワトリ



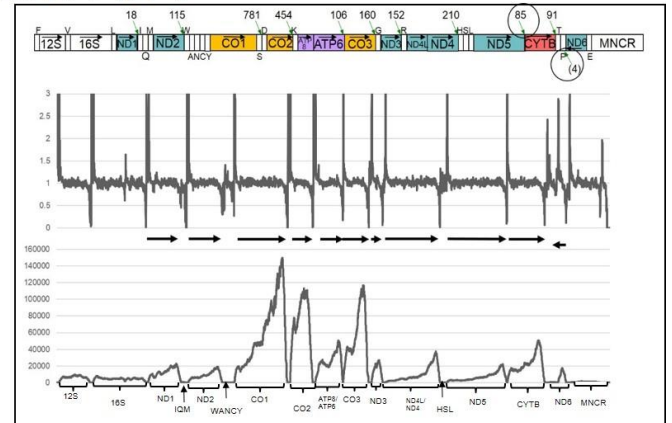
22. ヤツガシラ



23. チョウゲンボウ

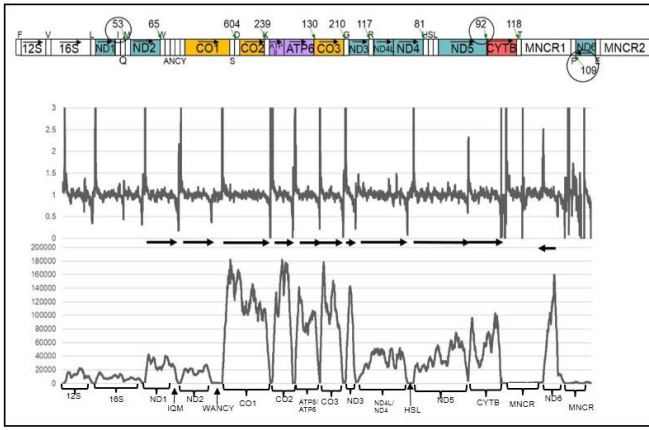


24. ホシムグドリ

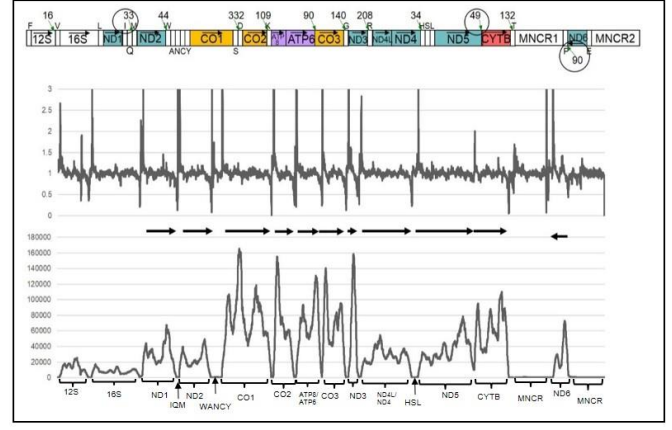


補遺 3(続き)

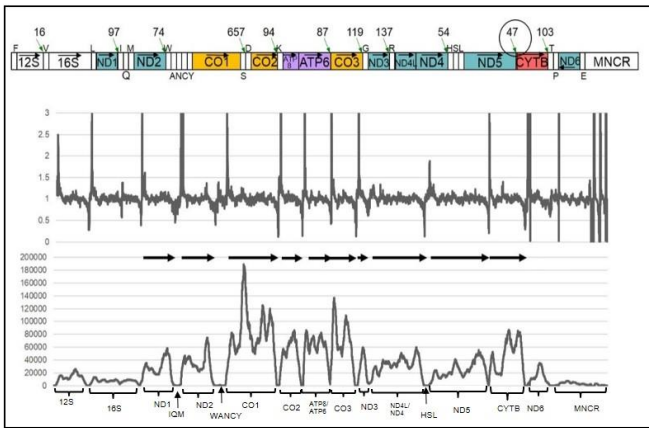
25.クロハゲワシ



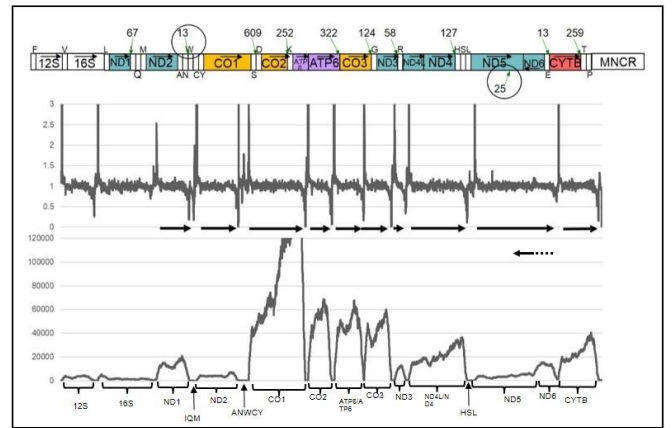
26.ミナミツミ



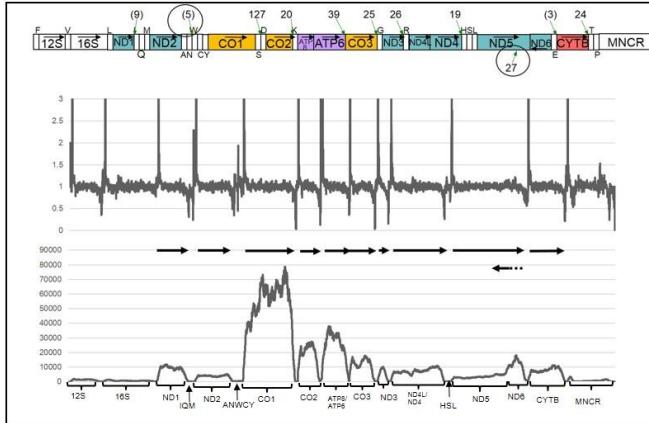
27.コノハズク



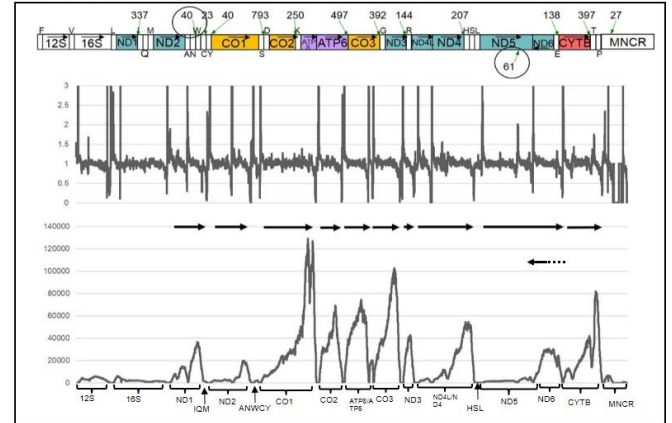
28.バンディクート



29.カンガルー

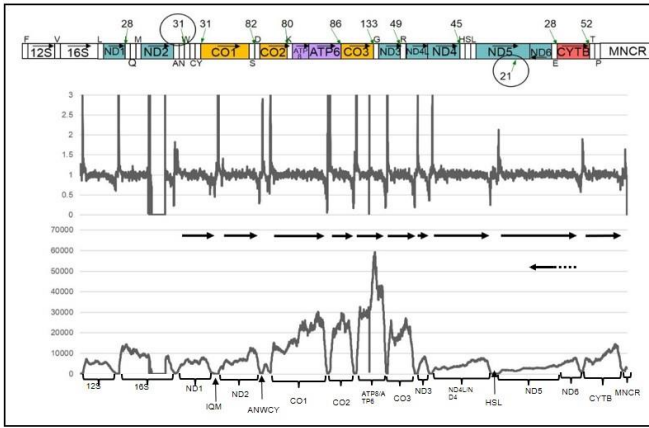


30.ミンク

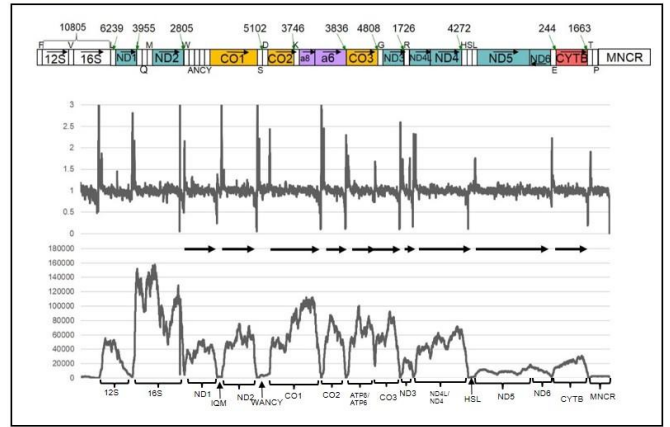


補遺 3(続き)

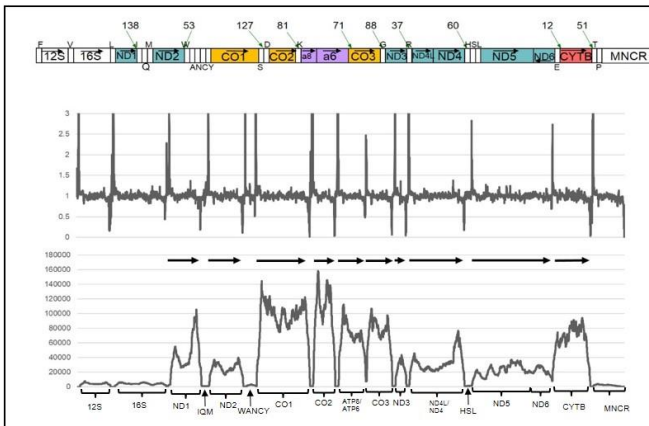
31.タスマニアデビル



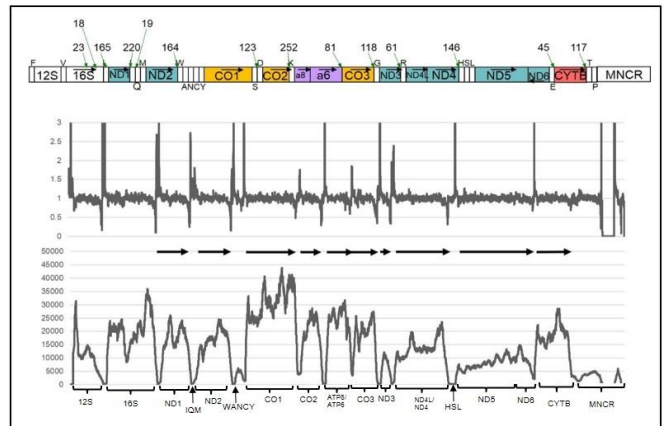
32.ヒト



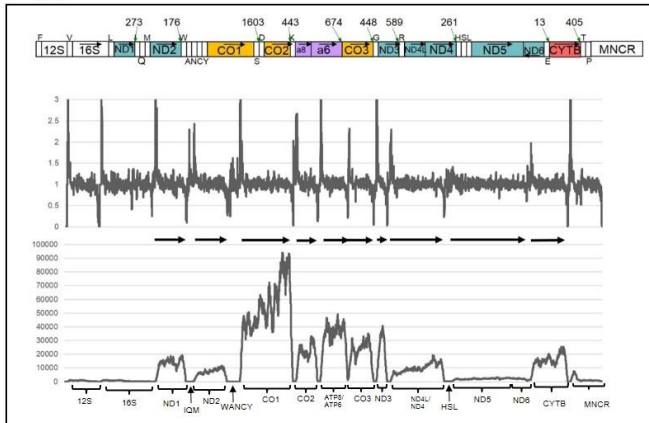
33.ハツカネズミ



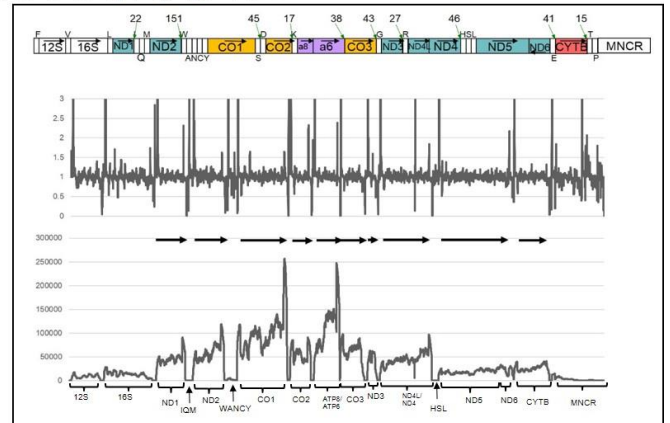
34.アジアゾウ



35.ウシ

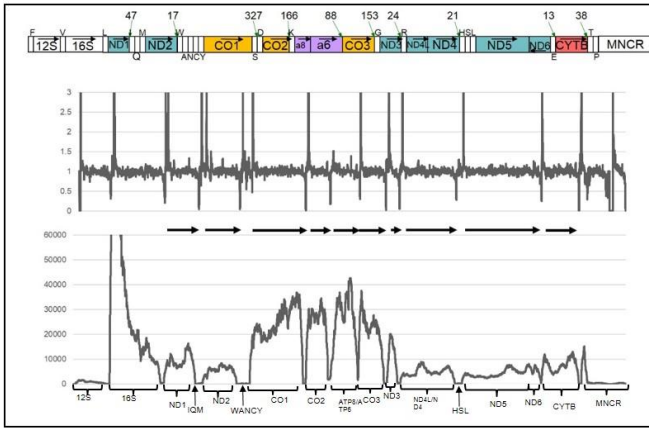


36.ココノオビアルマジロ

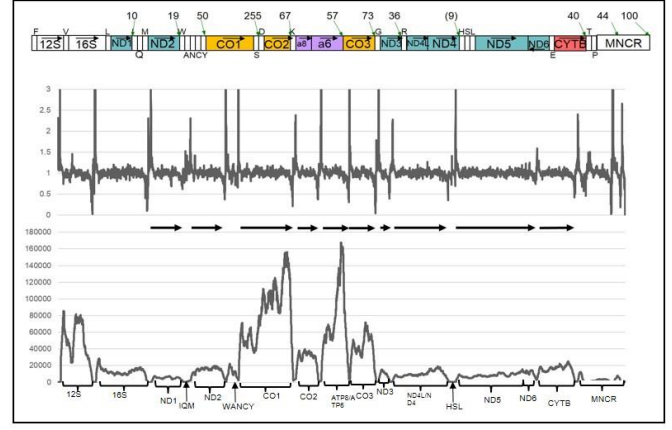


補遺 3(続き)

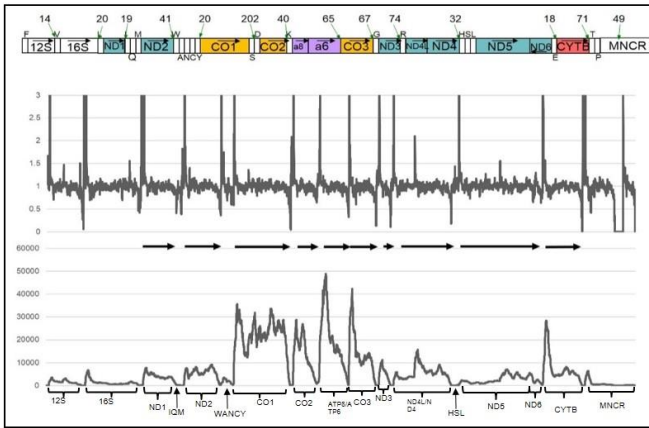
37.イノシシ



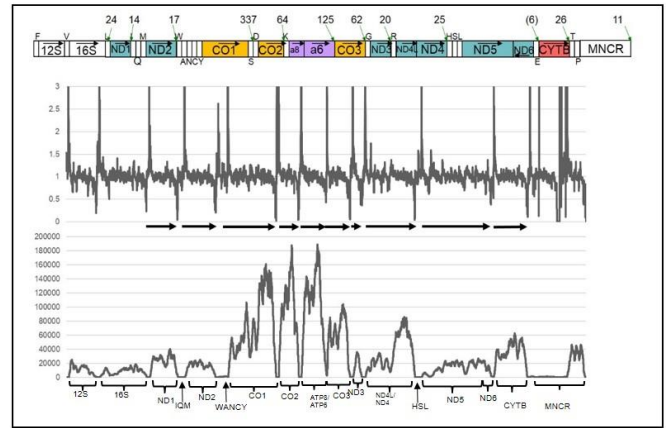
38.コウモリ



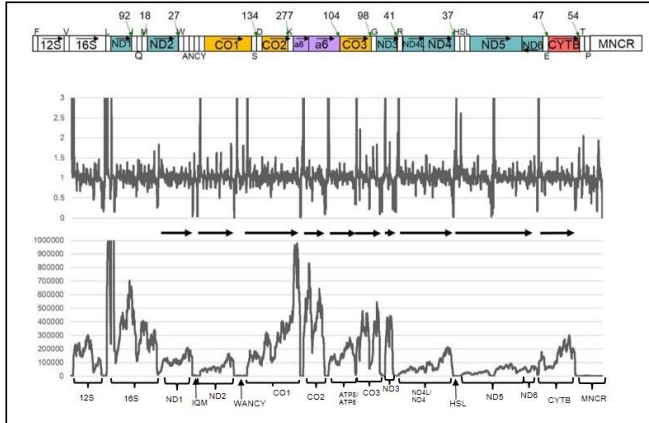
39.シロサイ



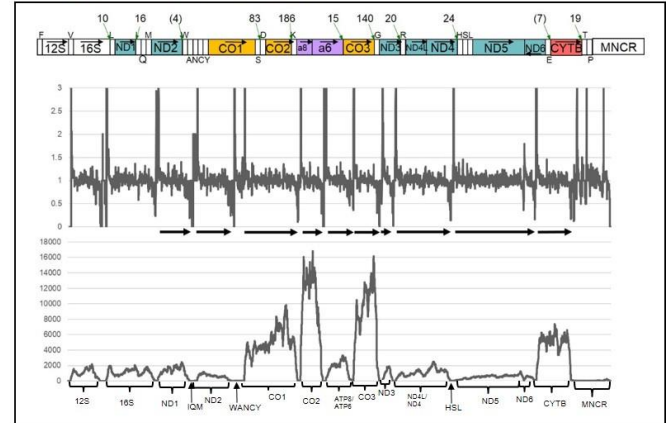
40.アナウサギ



41.バンナアシナシイモリ

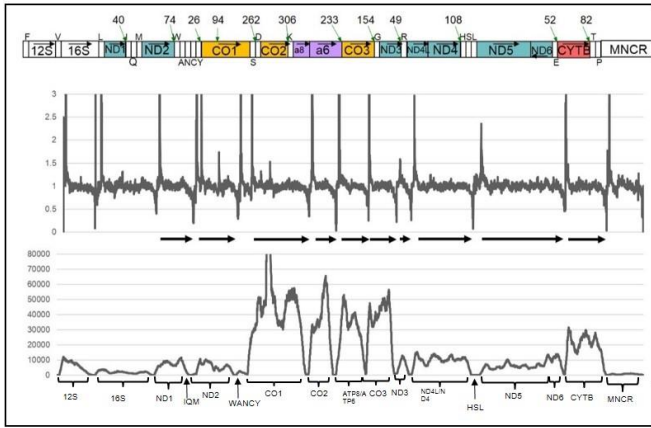


42.メキシコサンショウウオ

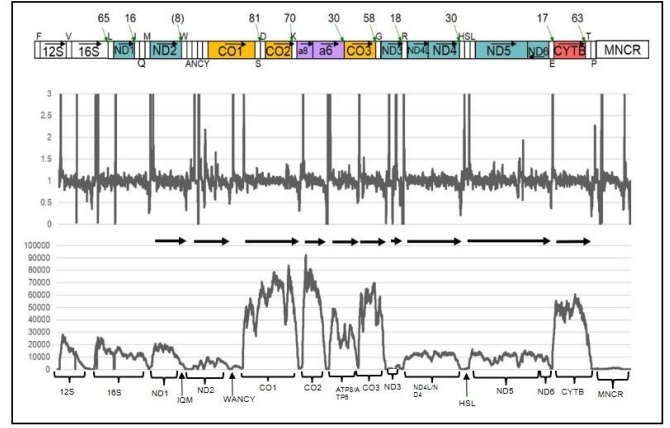


補遺 3(続き)

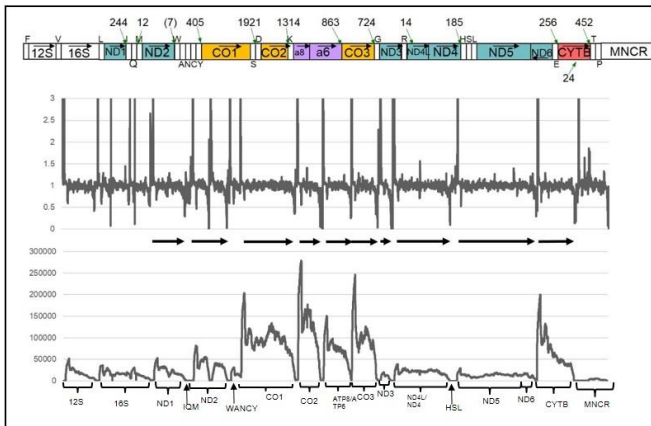
43.ファイアサラマンダー



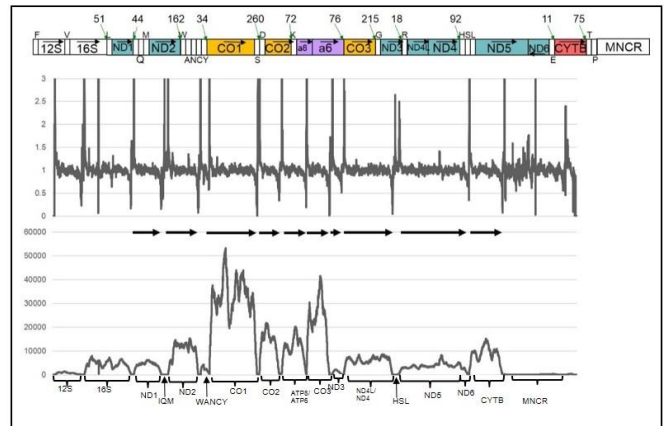
44.スベイモリ



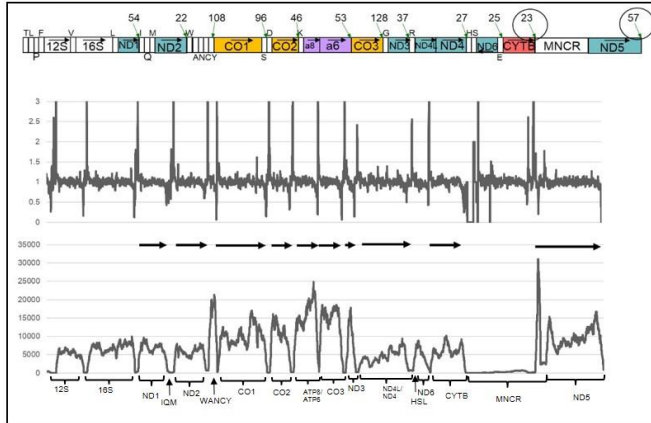
45.ミナマイボイモリ



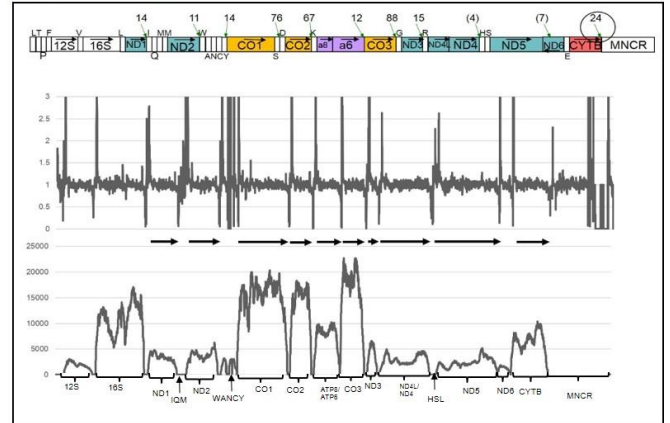
46.チョウセンスズガエル



47.アオガエル

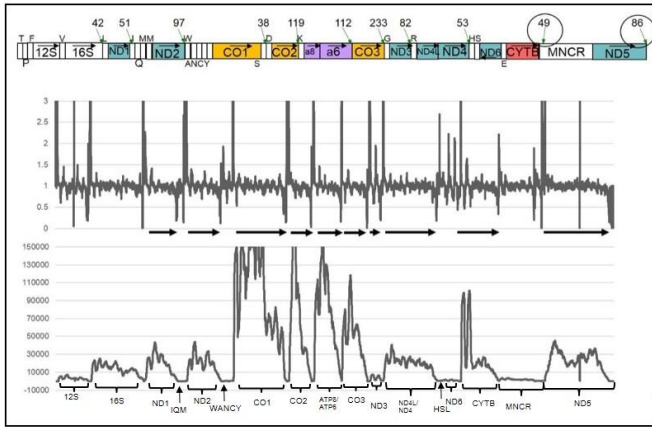


48. *Q. boulengeri*

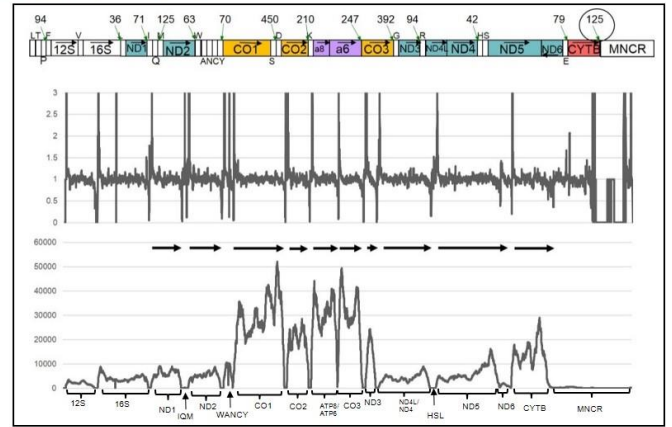


補遺 3(続き)

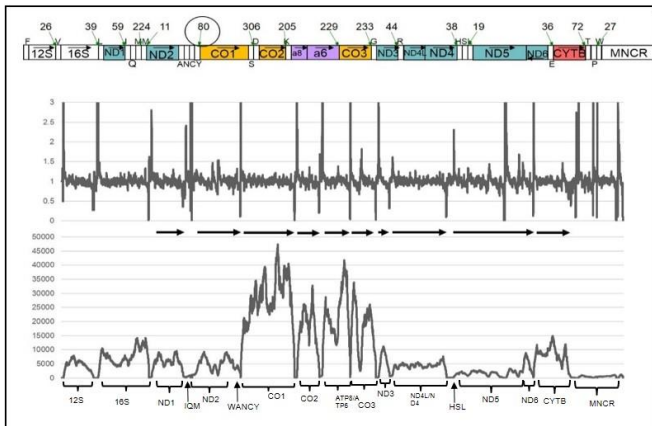
49.ババトラフガエル



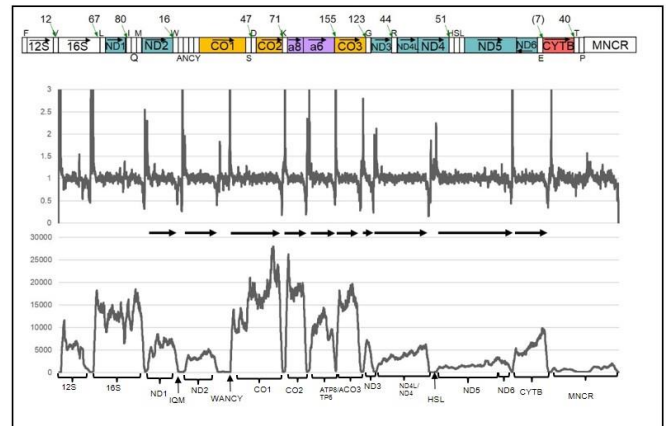
50.トノサマガエル



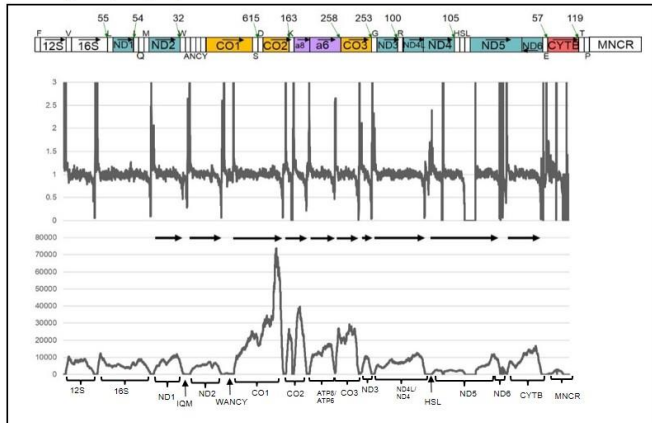
51. *L. boringii*



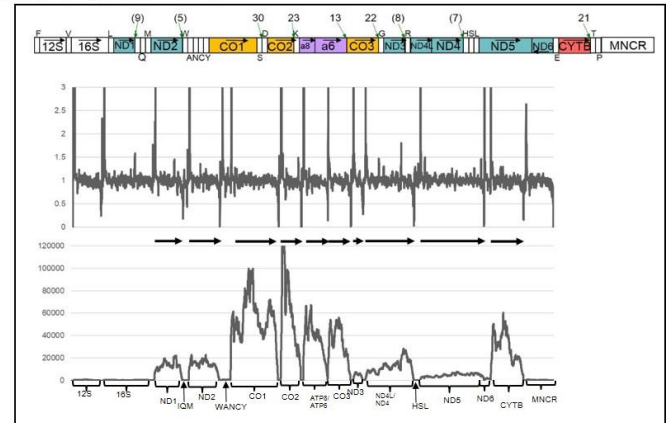
52. ネットイツメガエル



53. バラマンディ

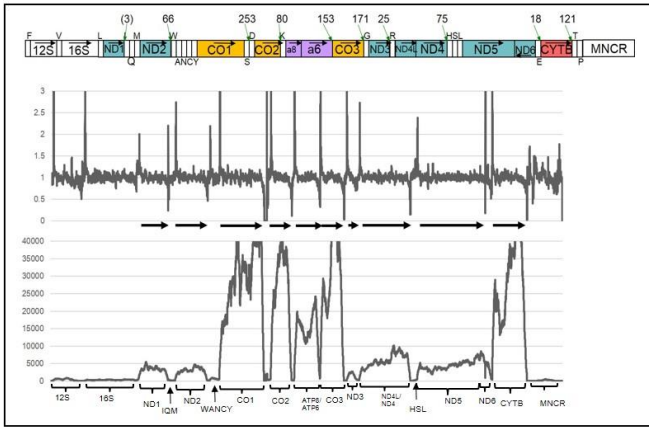


54. アメリカナマズ

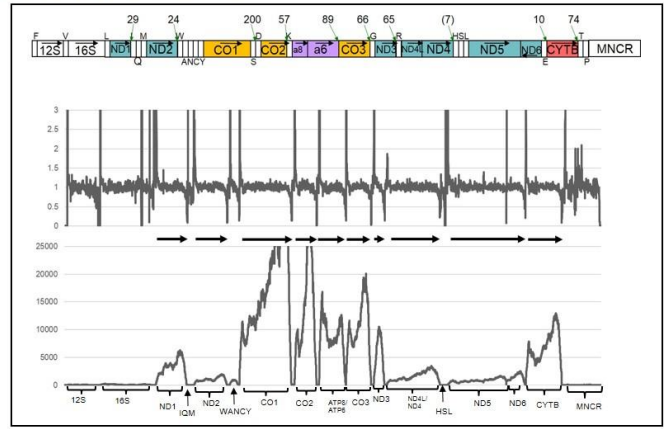


補遺 3(続き)

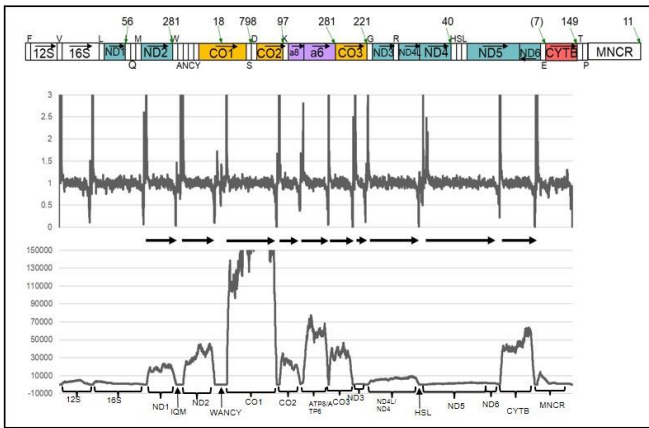
55. ブラウトラウト



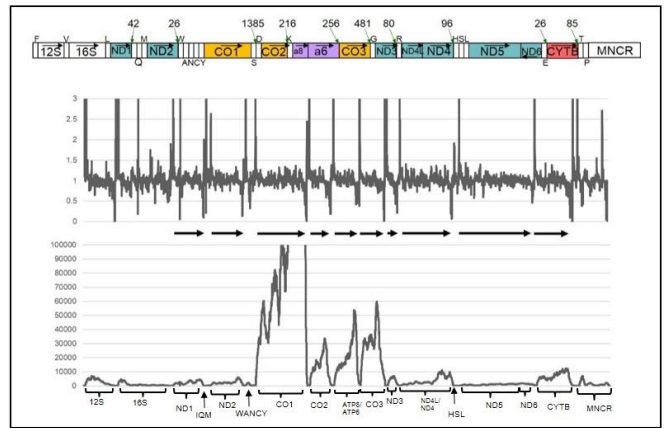
56. タイセイヨウダラ



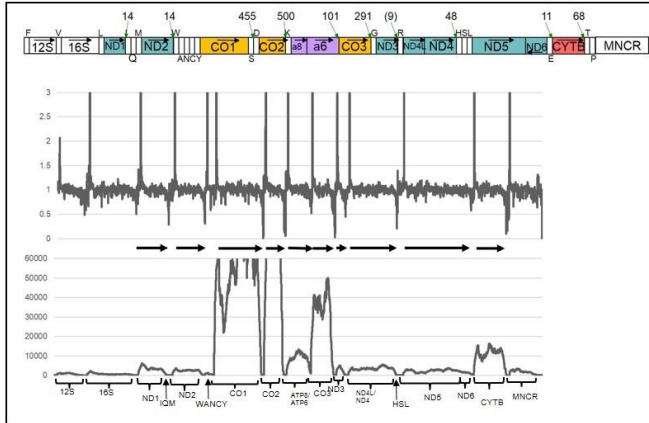
57. ヒラシュモクザメ



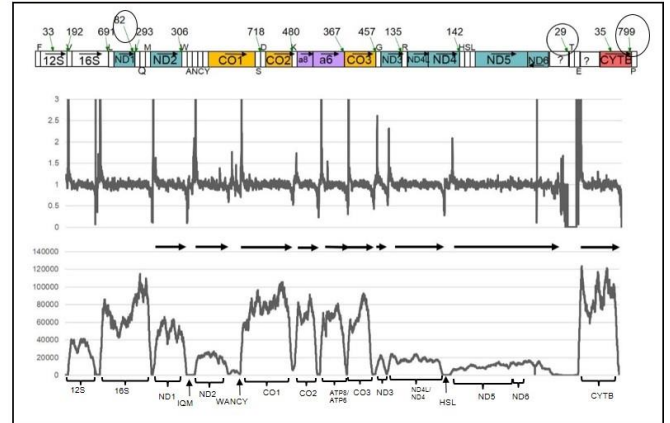
58. ハナカケトラザメ



59. ガンギエイ

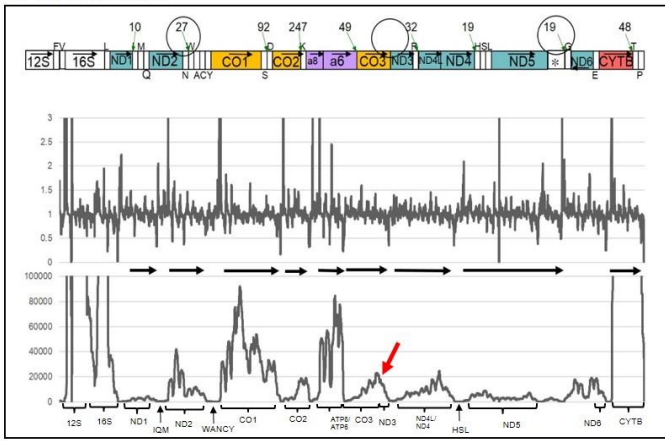


60. フクロヤツメ



補遺 3(続き)

61. *B. floridae*



補遺 3(続き)