

氏 名 金子 聡子

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1077 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Molecular Evolutionary and Population Genetics
Studies on Regulatory Makorin1-derived Processed
Pseudogenes

論文審査委員 主 査 教授 堀内 嵩
教授 颯田 葉子
助教授 高野 敏行
助教授 鈴木 仁（北海道大学）
教授 池村 淑道（長浜バイオ大学）

論文内容の要旨

Processed pseudogenes are produced from the reverse transcription of mRNA followed by integration into the genome. This process is mediated by enzymes encoded by retrotransposable elements such as *LINE-1* in mammals. In most cases, processed pseudogenes can not produce transcripts because of lacking functional promoter. Therefore, processed pseudogenes are treated as genomic 'fossil records'. However, recently, processed pseudogene has been shown to carry out biochemical function. In mice, the *Makorin1-p1* processed pseudogene regulates the mRNA stability of its homologous coding gene (*Makorin1*) by competitive interaction for degradation factors. In this thesis, molecular evolutionary and population genetics approaches are used to investigate the origin and evolution of *Makorin1*-derived processed pseudogenes.

It is shown that *Makorin1-p1* originated almost immediately before the *musculus* and *cervicolor* species groups diverged from each other some 4 million years ago and that the *Makorin1-p1* orthologs in various *Mus* species are transcribed. However, *Mus caroli* in the *cervicolor* species group transcribes not only *Makorin1-p1*, but also another older *Makorin1*-derived processed pseudogene, demonstrating the rapid generation and turnover of the pseudogenes in the subgenus *Mus*. Under this circumstance, transcribed processed pseudogenes of *Makorin1* evolve in a strictly neutral fashion even with an enhanced substitution rate at CpG dinucleotide sites. *Makorin1-p1* is divided into three regions by its function and the homology to *Makorin1*; region A has no homology with *Makorin1*, region B has homology with *Makorin1* and includes the target region of degradation factors, and region C has homology with *Makorin1* but has no relationship with its mRNA stability. In mouse *Makorin1-p1* orthologs, there is no difference at the nucleotide substitution rate between regions.

Extended analyses of *Makorin1*-derived processed pseudogenes in the genome database and genomic PCRs show that rats have their own *Makorin1*-derived processed pseudogene. Furthermore, RT-PCRs using testis total RNA demonstrate the

cotranscription of *Makorin1* and *Makorin1*-derived processed pseudogenes in rats. These results suggest that the rat specific *Makorin1*-derived processed pseudogene can take over the role of *Makorin1-p1* in the subgenus *Mus*. Extended analyses to other mammals (dogs, cows, chimpanzees and humans) using genome databases also shows that each species has its own *Makorin1*-derived processed pseudogenes, except for chimpanzees and humans. In dogs, they have three relatively recently originated *Makorin1*-derived processed pseudogenes, suggesting that *Makorin1*-derived processed pseudogenes are rapidly generated in dogs as in mice. Thus, there is a possibility that *Makorin1* mRNA stability has been maintained by its processed pseudogene in dogs. In cows, chimpanzees and humans, however, relatively recent *Makorin1*-derived processed pseudogenes do not exist. In cows, due to incompleteness of the genome database, such newly emerged sequences may not be identified. In humans and chimpanzees, seven *Makorin1*-derived processed pseudogenes exist, and all of them show the relatively old origin. For stability of *Makorin1* mRNA, the important feature is sequence similarity and transcription. RT-PCRs using testis total RNA demonstrate the cotranscription of *Makorin1* and *Makorin1*-derived processed pseudogenes in humans too. If humans and chimpanzees do not have relatively recent *Makorin1*-derived processed pseudogenes, preexisting pseudogenes must be prevented from accumulating detrimental mutations by negative selection on functionally related region (B region). In fact, comparison between human and chimpanzee orthologs reveals that the B region in two *Makorin1*-derived processed pseudogenes, *MKRN4* and *MKRNP1*, is conserved.

To examine whether this conservation is general in primate lineage and human populations, extended analyses to simian primates and human populations using genomic PCRs and genome database searches were carried out. Prosimians have their own specific *Makorin1*-derived processed pseudogenes. *Galagoides demidoff* (Demidoff's galago) has one *Makorin1*-derived processed pseudogene which has high homology with *Makorin1* in humans and mice, while *Galago moholi* (South African galago) and *Otolemur crassicaudatus* (thick-tailed bush baby) have two pairs of orthologous *Makorin1*-derived processed pseudogenes and one of them indicates the

conservation of the B region. New World monkeys and Catarrhini have orthologous pairs of human *Makorin1*-derived processed pseudogenes. Unlike rodents, *Makorin1*-derived processed pseudogenes occur rather infrequently in simian primates. Under this circumstance, it is hypothesized that preexisting transcribed processed pseudogenes must be prevented from accumulating detrimental mutations by negative selection. Comparison of *MKRN4* orthologous pairs shows that the conservation of the B region is limited to humans and chimpanzees. In contrast to *MKRN4*, comparison of *MKRNPI* orthologous pairs shows that the conservation of the B region is general, and especially, the strict conservation is observed in hominoids. In human populations, both *MKRN4* and *MKRNPI* show the reduction of the nucleotide diversity in the B region, compared with other-region.

From the above observation it is concluded as follows: 1) The transcription of *Makorin1*-derived processed pseudogene is not limited to mice. The phenomenon is rather general in mammals, 2) The rate of emergence of these pseudogenes is, however, different from species to species, and 3) The evolutionary rate and pattern of *Makorin1*-derived processed pseudogenes depend heavily on how frequently they are disseminated in the genome.

論文の審査結果の要旨

ヒトやマウスのゲノムには数千コピーに及ぶ processed 偽遺伝子があり、そのうちの数%は転写されている。*Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子、*Makorin1-p1* も転写される processed 偽遺伝子であるが、*Makorin1*mRNA との相同性からその分解を妨げ mRNA の安定性に関与していることが実験室系統のマウスを用いて示された。また、*Makorin1-p1* (1500bp) のうち、前半の 700bp 程度の領域 (B 領域) が mRNA の安定性に重要であることも示された。本論文は、このような processed 偽遺伝子とそれが関わるシステムの進化の特性を分子進化学、集団遺伝学の手法で明らかにすることを目的に、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ヒト、チンパンジー、アカゲザル等のゲノムデータベースとゲノム DNA および cDNA の PCR により *Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子を多数単離し解析を行った。

本論文は5つ章から構成されている。第1章はイントロダクションで、processed 偽遺伝子の一般的な特徴から、*Makorin1* の機能そして *Makorin1-p1* が *Makorin1*mRNA の安定性に関与する機構についての仮説の紹介等、processed 偽遺伝子に関する先行研究を幅広く紹介している。

第2章では *Makorin1-p1* の由来を実験室系統のマウスとその近縁種のゲノムから単離した processed 偽遺伝子の配列の解析により明らかにした。解析の結果、*Makorin1-p1* は今から 450 万年前に生じた。また、*Makorin1-p1* オーソログ間の塩基配列の比較解析では、どの領域にも均等に、平均的な偽遺伝子の進化速度で、塩基置換を蓄積していることが明らかになった。さらに 1200 万年前にマウスと分岐したラットのゲノムデータベースを探索したところ、*Makorin1* と相同性の高い processed 偽遺伝子が存在することが明らかになった。さらに、げっ歯類ではこれらの processed 偽遺伝子が精巢で発現していることが確認された。また近縁種である *Mus caroli* では、*Makorin1-p1* とは異なる *Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子の発現も *Makorin1-p1* の発現と共に確認された。

第3章では、*Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子の存在の一般性を調べるために、ウシ、イヌ、ヒト、チンパンジーのゲノムデータ配列を探索した。その結果、いずれの生物でも、*Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子がゲノム中に複数存在した。イヌではげっ歯類と同様に *Makorin1* との相同性の高い processed 偽遺伝子が見つかったが、ウシ、ヒト、チンパンジーでは、イヌやげっ歯類と比較するとその相同性の程度は低く、processed 偽遺伝子の起源が古いことを示している。また、ヒトの *Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子のうち6種類の精巢での発現を確認した。もしこのような processed 偽遺伝子が *Makorin1*mRNA の安定性に関与しているとしたら、B 領域とその他の領域で塩基置換の程度に違いが生じるだろうという仮説のもと、解析を行った。その結果、*MKRNA* と *MKRNP1* の2種類の processed 偽遺伝子で、B 領域での塩基置換の保存性がヒトとチンパンジーで他の領域に比べ高いことが観察された。

第4章では第3章の観察結果に基づき、B 領域の保存性がヒト、チンパンジー以外の霊長類で観察されるかどうか、またヒト集団の塩基多様性で観察されるかどうかを、様々な霊長類および、ヒトの民族集団の DNA サンプルを用いてゲノム PCR を行い調べた。その結果、*MKRNA* と *MKRNP1* の B 領域がヒト集団では保存される傾向にあり、類人猿間の比較から示唆された *MKRNP1* の保存性はヒト集団内でも確認された。

第5章は結論と今後の展開に関して述べている。特に、*Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子の機能についての議論と processed 偽遺伝子が *Makorin1*mRNA の分解を防ぐ分子機構について論じている。

この論文の結論は三つにまとめられる。1) *Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子は、調べた生物では全てに存在していて、マウス、ラット、ヒトでは発現も確認できた。*Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子はマウスにだけ特異的なことではない。2) この processed 偽遺伝子が作られる速さは生物種によりまちまちである。3) processed 偽遺伝子の進化の様相は、偽遺伝子が作られる速度の違いに応じた特性を持っている。

以上のように、本博士論文は *Makorin1* 由来の processed 偽遺伝子について様々な観点からの解析や実験が含まれており、また、周辺領域についても多くの知識を吸収したことが示されているので、博士（理学）の学位に十分値するものであると判断した。尚、本論文の第2・3章の内容については申請者を筆頭著者として国際学術誌である *Genetics* に論文が掲載された。