慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | miRNAの網羅的予測と存在パターンから辿る緩歩動物門の進化 |
| Sub Title | Identification and phylogenetic analysis of miRNAs in tardigrades |
| Author | 石野, 響子 |
| Publisher | 慶應義塾大学湘南藤沢学会 |
| Publication year | 2014 |
| Jtitle | 生命と情報 No.21 (2014. ) ,p.81- 88 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | クマムシは脱皮動物上門に属し,<br>独自で緩歩動物門を形成する無脊椎動物である。クマムシの起源は約5億5,000万年前に遡り, カンブリア爆発以降の化石からその存在が確認されている。すべての生物の中で最も多様性に富む動物である節足動物も緩歩動物門と同様に脱皮動物上門の共通祖先である工ディアカラ生物群から節足動物化されていき今日に至る。この進化の軌跡を辿ることはすなわち動物の起源に迫ることであり, 地球上の生命進化および発生と進化の可塑性を理解する上で非常に重要な礎となることが期待される。しかしながらクマムシは, 同じ上門に属する他の門との進化関係についての議論が今日においても未だ終結していない。なぜならば緩歩動物門は, 形態学的分類では節足動物門と有爪動物門をあわせた汎節足動物に帰属することが示唆されている一方で, 分子生物学的分類では線形動物門との共通祖先から分岐したと示唆されているからである。我々はこの謎を解明すべくmiRNAの存在パターンに着目して系統解析を試みた。ドゥジャルダンヤマクマムシ(Hypsibius dujardini), ヨコヅナクマムシ(Ramazzottius varoeornatus),<br>リヒテルスチョウメイムシ(Paramacrobiotus richtersi)の3種を対象とし,<br>ドゥジャルダンヤマクマムシにおいてはIllumina HiSeq 2000を用いてmiRNA配列を独自にシーケンシングした。抽出された配列と現存する緩歩動物の配列情報を用いてmiRDeep2によりmiRNA候補を予測したところ, ドゥジャルダンヤマクマムシからは81種, ヨコヅナクマムシからは174種, そしてリヒテルスチョウメイムシからは85種のmiRNAが予測された。さらにこれらの情報と左右相称動物におけるmiRNAの存在パターン情報をもとに最大節約法を用いて系統樹を作成したところ, 緩歩動物は節足動物と線形動物と共に単系統群を形成するような進化系統を示した。これは脱皮動物上門における系統進化が非常に短時間で引き起こされたことに由来すると考えられ, 議論の元である形態学的分類と分子生物学的分類の間で矛盾を示すことへの一つの解釈となると期待される。 |
| Notes | 慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2014年度学生論文集<br>卒業論文ダイジェスト |
| Genre | Technical Report |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000021-0081 |

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

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

# miRNAの網羅的予測と存在パターンから辿る緩歩動物門の進化

# Identification and phylogenetic analysis of miRNAs in tardigrades

環境情報学部4年
石野響子

## 要旨

クマムシは脱皮動物上門に属し，独自で緩歩動物門を形成する無脊椎動物である．クマムシの起源は約5億5,000万年前に遡り，カンブリア爆発以降の化石からその存在が確認されている．すべての生物の中で最も多様性に富む動物である節足動物も緩歩動物門と同様に脱皮動物上門の共通祖先であるエディアカラ生物群から節足動物化されていき今日に至る．この進化の軌跡を辿ることはすなわち動物の起源に迫ることであり，地球上の生命進化および発生と進化の可塑性を理解する上で非常に重要な礎となることが期待される．しかしながらクマムシは，同じ上門に属する他の門との進化関係についての議論が今日においても未だ終結していない．なぜならば緩歩動物門は，形態学的分類では節足動物門と有爪動物門をあわせた汎節足動物に帰属することが示唆されている一方で，分子生物学的分類では線形動物門との共通祖先から分岐したと示唆されているからである．我々はこの謎を解明すべくmiRNAの存在パターンに着目して系統解析を試みた．ドゥジャルダンヤマクマムシ (*Hypsibius dujardini*)，ヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varoeornatus*)，リヒテルスチョウメイムシ (*Paramacrobiotus richtersi*) の3種を対象とし，ドゥジャルダンヤマクマムシにおいてはIllumina HiSeq 2000を用いてmiRNA配列を独自にシーケンシングした．抽出された配列と現存する緩歩動物の配列情報を用いてmiRDeep2によりmiRNA候補を予測したところ，ドゥジャルダンヤマクマムシからは81種，ヨコヅナクマムシからは174種，そしてリヒテルスチョウメイムシからは85種のmiRNAが予測された．さらにこれらの情報と左右相称動物におけるmiRNAの存在パターン情報をもとに最大節約法を用いて系統樹を作成したところ，緩歩動物は節足動物と線形動物と共に単系統群を形成するような進化系統を示した．これは脱皮動物上門における系統進化が非常に短時間で引き起こされたことに由来すると考えられ，議論の元である形態学的分類と分子生物学的分類の間で矛盾を示すことへの一つの解釈となると期待される．

**キーワード：**カンブリア爆発，進化，緩歩動物，miRNA

# 1. 背景

形態学的分類と分子生物学的分類が異なることから脱皮動物上門における緩歩動物門の進化は未だに議論が終結しないが，近年miRNAの保存パターンを用いたアプローチ方法が注目を浴びている．というのも今まで系統が明らかとなっていなかった生物種，特にクマムシのように形態学的分類と分子生物学的分類の結果が異なるものにおいて大きな貢献をしていることが報告されたからである (Traver *et al.*, 2013)．緩歩動物におけるmiRNAの研究については，本卒業論文で何度か紹介しているが，Campbellらによるリヒテルスチョウメイムシ (*Paramacrobiotus richtersi*) のmiRNA情報を含む，8種の脱皮動物のmiRNA情報のデータセットとEST情報を用いて系統解析を行っている研究が挙げられる (Campbell *et al.*, 2011)．彼らは結果として緩歩動物は節足動物門や有爪動物門に近いと示唆している．さらにmiRNAでの検証では43種のmiRNAを予測しており，脱皮動物上門の中で線形動物門にのみ存在すると報告されている4つのmiRNA: miR-54, 63, 86, 239はリヒテルスチョウメイムシにからは確認されず，節足動物門でのみ存在すると報告されている4つのmiRNA: miR-275, 276, 305, iab-4のうちmiR-276が確認されたと報告しており，緩歩動物は汎節足動物へ属し，更にその分岐マーカーとしてmiR-276が保存されていることが重要であると示唆している．しかしながらDunnらやPhilippeらの分子生物学的データを用いた系統解析の報告によれば，クマムシは脱皮動物上門の中でも特に線虫に進化的に近いとされ，これはCampbellらの見解と矛盾する (Dunn *et al.*, 2008; Phillipe *et al.*, 2005)．この理由として，miRNA予測の確度が低い可能性が考えられる．そこで我々は複数種のゲノムデータやmiRNA-Seqデータを組み合わせてmiRNA予測をおこなうことによって，緩歩動物門におけるより確かなmiRNAの同定を試みた．本卒業論文の第2章ではドゥジャルダンヤマクマムシ (*Hypsibius dujardini*) を対象としてmiRNAシーケンシングをおこない，ドゥジャルダンヤマクマムシ，リヒテルスチョウメイムシ，ヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) の緩歩動物3種におけるmiRNA候補を予測した．さらに予測された緩歩動物のmiRNA情報に加え，他の門に属する生物のmiRNA情報をmiRBaseから取得しmiRNAの存在パターンから最大節約法を用いて系統樹を作成，さらにmiRNAの獲得/欠損を解析することによって分岐のマーカーとなるmiRNAを予測した．系統解析は緩歩動物が属する脱皮動物上門の生物を解析対象とし，脊索動物をアウトグループとして解析をおこなった．その結果，Campbellらの結果を一部では支持するものの，彼らの研究では発見されていなかった，miRNAの二次欠損を起こしやすい線形動物との関係を繋げるようなmiRNAが見つかったことから緩歩動物は節足動物，線形動物と共に単系統群を形成するというある種新しい可能性を示唆するものとなった．これらの結果について分岐のマーカーとなるmiRNAなどの情報を織り交ぜながら緩歩動物門の脱皮動物上門における進化について議論する．

# 2. 対象と手法

## 2.1. 対象生物とワークフロー

対象生物種は緩歩動物と同じ脱皮動物上門に属しmiRNAのデータベースmiRBaseに登録のある生物種である節足動物と線形動物とし，脊索動物をアウトグループとした．具体的には節足動物門からキイロショウジョウバエ (*Drosophila meranogaster*)，ミジンコ (*Daphnia pulex*)，コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*)，セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) の4種，線形動物門から*Ascaris suum*, *Brugia malayi*, *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis remanei*, *Haemonchus contortus*, *Pristionchus pacificus*の7種，脊索動物からは頭索動物のナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) と尾索動物のカタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の2種を対象とした．それぞれの生物種におけるmiRNAのmatureおよびprecursor配列データはmiRBase release 21から取得し (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014)，緩歩動物におけるmiRNAのデータは第2章の予測から得られたデータを使用した．まず対象とする生物種におけるmiRNAをmiRBaseの情報を用いてファミリーごとにクラスタリングした後，それらの有無情報を元にMEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) を用いて最大節約法で計算される系統樹を作成し，その系統樹からmiRNAの獲得/欠損を解析および分岐マーカーとなるmiRNAを取得するためCOUNT (Csurös, 2010) を用いて計算した．以下に対象生物種の詳細を示す (表1)．

**表1. 系統解析をおこなった対象生物種**

| Super-phylum | Phylum | Species | | | Number of miRNA mature sequences | Number of miRNA precursor sequences |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ecdysozoa | Tardigrada | *Hypsibius dujardini* | hdj | | 117 | 117 |
| | | *Ramazzottius varieornatus* | rva | | 107 | 107 |
| | | *Paramacrobiotus richtersi* | pri | | 98 | 98 |
| | Arthropoda | *Drosophila meranogaster* | dme | | 466 | 256 |
| | | *Daphnia pulex* | dpu | | 45 | 44 |
| | | *Tribolium castaneum* | tca | | 430 | 220 |
| | | *Apis mellifera* | ame | | 259 | 254 |
| | Nematoda | *Ascaris suum* | asu | | 189 | 97 |
| | | *Brugia malayi* | bma | | 107 | 115 |
| | | *Caenorhabditis briggsae* | cbr | | 163 | 175 |
| | | *Caenorhabditis elegans* | cel | | 434 | 250 |
| | | *Caenorhabditis remanei* | crm | | 182 | 157 |
| | | *Haemonchus contortus* | hco | | 195 | 188 |
| | | *Pristionchus pacificus* | ppc | | 550 | 354 |
| Chordata | Cephalo-chordata | *Ciona intestinalis* | cin | | 550 | 348 |
| | Tunicata | *Branchiostoma floridae* | bma | | 187 | 156 |

対象としている生物種はいずれも左右相称動物に属する生物である．左右相称動物は大きく分けて前口動物と後口動物の2つの上門に分けられ，これらは発生の仕方の違いによるところが大きい．発生の過程で原口が口になるのが前口動物，肛門になるのが後口動物であり，脱皮動物上門は前口動物，脊索動物は後口動物に属する．これらの上門は今日より約6億2,000万年～5億4,200万年前のエディアカラ紀に分岐したとされている．

## 2.2. MEGA6による系統樹とCOUNTによる獲得・欠損情報解析

本研究では系統解析ソフトとしてMEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) を用いた (Tamura *et al.*, 2013)．MEGAは様々なインプットデータに対応し，多彩な解析オプションを備え，今日分子進化系統解析において幅広く使われている統合配列解析環境のGUIソフトウェアである．系統予測方法は主に最大節約法 (Maximum Parsimony method)，近隣結合法 (Neighbor-Joining method)，最尤法 (Maximum Likelihood estimation) の3つがあり，MEGA6においても各予測方法を用いて解析することが可能であるが，本研究では最大節約法を採用している．最大節約法は共通祖先か

ら変異が生じたステップ数が最小となるように各ルートから伸びる枝であるトポロジーの長さ (Tree Length, TL) をそれぞれ計算し，進化系統樹の樹形を予測するアルゴリズムである (Swofford and Begle, 1993)．配列の置換速度が一定であると仮定するため，進化速度が異なる生物種や配列などで系統解析をおこなうとLong Branch Attraction (LBA) を起こして誤った系統樹を導く可能性がある．しかしながらその単純さからインプットとしてはある性質の有無などの二分法の値(羽の有無など)，あるいはゲノムの特定部位におけるDNA塩基や，タンパク質のアミノ酸残基などの幅広いデータに応用することが可能である．本研究では進化の過程で蓄積され，一度ネットワークに取り込まれると欠損しにくいことが分かっているmiRNAの有無情報を用いるため (Sempere *et al.*, 2006)，各miRNAの重み付けは均一なものとして最大節約法にて計算をおこなう．各トポロジーの計算には現在様々なヒューリスティック計算アルゴリズムが開発および実装されているが，本研究ではMax-mini Branch-and-bound法を用いて計算した．この計算方法は既に調べた系統樹よりもTLが長い樹形をすべて無視し，より短いTLの系統樹を決定するアルゴリズムである (Kumar *et al.*, 1993)．この方法は各トポロジーにおいてTLを計算するため比較的多くの計算時間を要求されるが，SPR (Subtree Pruning Regrafting) 法やTBR (Tree Bisection-Reconnection) 法のような系統樹の一部のみに注目しているヒューリスティックな検索方法よりも正確な系統樹を得ることができる．MEGA6における系統解析は塩基配列もしくはアミノ酸配列に対応しているため，miRNAの各ファミリーを1残基に置換し，有る場合はメチオニン (M)，無い場合はトリプトファン (W) それぞれのアミノ酸として表記し系統樹を作成した．系統樹の信頼性は，用いた配列データを無作為抽出し統計的に解析するBootStrap法を用い，試行回数は1,000回として計算した (Efron *et al.*, 1996)．より信頼性の高い系統樹を作成するため，算出されたBootStrap値0.5を閾値として区切り，それ以上の値のもののみでノードを構築した．さらに上記のパラメーターを割り振り，MEGA6によって系統樹を作成した後，その進化系統樹における分岐のマーカーとなっているmiRNAを観察するため，COUNT (Csurös, 2010) によってmiRNAの獲得/欠損を計算した．計算方法は，最大節約法のアルゴリズムと同じであるWagner parsimony法 (Farris, 1970) を用いておこなった．

## 3. 結果

### 3.1. miRNAの有無情報を用いた系統樹

前述したパラメーターによって系統樹を作成したところ，下図のような樹形を示した (図1)．

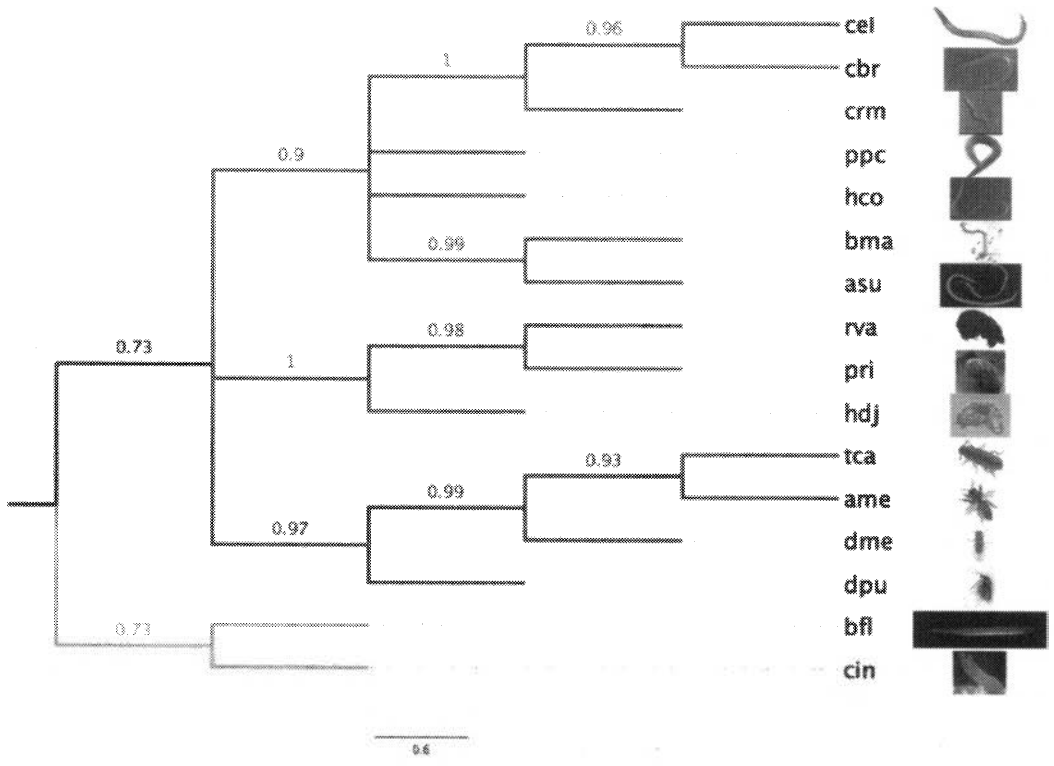


**図1. miRNAの有無情報を元に作成された系統樹**

各ノードに示されている数字はBootstrap検定 (試行回数1,000回) によって算出された値である．数字が記載されていないノードに関してはBootStrap値が0.5未満だったことを示す．赤色のノードが線形動物，紫色が緩歩動物，青色が節足動物，オレンジ色が脊索動物をそれぞれ示す．

### 3.2. miRNA獲得/欠損情報解析

前述したパラメーターおよび計算方法によって得られた系統樹を元にCOUNTを用いて獲得/欠損情報をWagner parsimony法によって解析したところ，各ノードの分岐マーカーおよび共通して保存されているmiRNAが以下のように抽出された (表2).

**表2. 各ノードの分岐マーカー候補となるmiRNA**

| Phylum | miRNA gains |
|---|---|
| Bilateria (or before) | **10**: (1, 206, 3571), (7, 3529), (10, 51, 99, 100, 125), (29, 83, 285, 746), (31, 72), (34, 449, 4933), (46, 47, 281), 71, 124, (133, 3582) |
| Arthropoda | **4**: 275, 317, 745, 965 |
| Nematoda | **1**: 86 |
| Tardigrada | **7**: (34, 449), 753, 2001, 2311, 2720, 3582, 6382 |
| Nematoda + Tardigrada | **2**: 245, 2227 |
| Arthropoda + Tardigrada | **3**: 12, 276, 315 |

## 4. 議論

### 4.1. miRNAによる進化系統解析の妥当性

まずmiRNAの存在パターンが進化系統解析をおこなうにあたり妥当かどうかを検証するため，系統関係が既知である線形動物と節足動物の分子生物学的な系統と本研究から示唆された系統を比較したところ，線形動物においては各クレード単位にまで正しく系統が分かれていた．一方で節足動物に関しては，分子生物学的な系統解析とmiRNAの存在パターンによる分類で一部異なる見解が示された．分子生物学的な分類では*D. pulex*がCrustaceaとして分岐した後，*A. mellifera*がHymenopteraに分岐し，さらに*T. castaneum*がColeoptera，*D. melanogaster*がDipteraにそれぞれ分岐するが，本研究で示唆されたmiRNAの存在パターンによる分類では，*D. pulex*が分岐した後に*A. mellifera*よりも先行して*D. melanogaster*が分岐していた．この問題についてはMarcoらが2010年に*T. castaneum*のmiRNAを予測した際に考察しており (Marco *et al.*, 2010)，彼らは*T. castaneum*から203種の新規miRNAを予測したが，それらは*D. melanogaster*で保存されているmiRNAの種類よりも15%ほど多く，さらにその保存性は3分の1ほどしかないと報告している．この保存性を*A. mellifera*と比較すると，*T. castaneum*におけるmiRNAの保存性は*D.melanogaster*のそれよりも*A. mellifera*との方が高いことを示唆している．さらに*T. castaneum*において全体の3分の2を占める*D. melanogaster*との保存性がないmiRNAのうち，18種においては脊椎動物にも共通して保存されていることが確認された．この原因として，昆虫はゲノムにおける進化速度が他の生物種と比較して非常に速いため，*Drosophila*がDipteraに分岐以降その内部で次々とゲノム進化が起こり，その結果としてmiRNAの種類も独自に進化している可能性が示唆されている．またWiegmannらのDipteransにおけるmiRNAの存在パターン解析の結果でも内部で次々とmiRNAが獲得および欠損している様子が伺え，この可能性を支持する (Wiegmann *et al.*, 2010)．これらのことから，ゲノムの進化速度が早い生物種においては妥当性が減少するものの，門および綱レベルでの分類ならば可能であることが示唆され，緩歩動物門の進化系統解析においては妥当であると考えられる．

## 4.2. 緩歩動物門の進化位置

上記の妥当性を踏まえた上で次に緩歩動物の進化位置に着目すると，BootStrap値を考慮しない場合，緩歩動物は脱皮動物上門から線形動物と節足動物が分岐した後に節足動物との共通祖先から分岐している樹形が示されたが，この分岐点におけるBootStrap値が0.49と低かったため，BootStrap値0.5を閾値で区切ると緩歩動物は節足動物と線形動物と同時に分岐するような樹形が示された．つまり緩歩動物門は節足動物と線形動物と共に単系統群を形成するような進化関係を示す．それぞれの動物門と関係づけるmiRNAを検証したところ，線形動物と緩歩動物を関係づけるmiRNAとしてmiR-245, 2227が，節足動物と緩歩動物を関係づけるmiRNAとしてmiR-12, 276, 315が示唆された．miR-245および2227は線形動物のシーケンシングから得られており，その詳細な機能は調べられていないため不明である (Wit *et al.*, 2009)．しかしながら線形動物はmiRNAの二次欠損を起こしやすいことが知られており (Sperling and Peterson, 2009)，その原因として線形動物は二次的に小型化しているように見えたり，ボディプランが確立された初期における構造や細胞のタイプが欠損している関係していると考えられている (Budd and Jensen, 2000)．そのため線形動物は特殊なmiRNAの保存パターンを示すので，線形動物との間で共通して保存されているmiRNAが存在することは緩歩動物の進化において必ずしも汎節足動物に属するわけではないという，本研究において汎節足動物への帰属を示唆するノードにおけるBootStrap値が低い原因を示唆している．

節足動物と共通して保存されているmiRNAとしては12，276，315が挙げられる．miR-12は前口動物で獲得されたのち，線形動物で欠損している可能性が示唆されているため (Traver *et al.*, 2013)，これらは汎節足動物で獲得されたとするよりも保存され続けていることが重要であると考えられる．またmiR-276はセイヨウミツバチにおいて脳で高頻度に発現しており，神経系の遺伝子を制御する役割があると示唆されており，このmiRNAは予測だけではなく実際に存在していることが実験によって明らかとなっている (Hori *et al.*, 2011)．さらにこのmiRNAはCampbellらが汎節足動物への帰属を示唆するマーカーとしているmiRNAでもあり，本研究においてもこのmiRNAが分岐マーカーとして抽出された．さらにmiR-315はショウジョウバエにおいて初期発生におけるシグナル伝達経路であるWingless伝達経路を活性化させている可能性が示唆されている (Silver *et al.*, 2007)．これらのことから3つの共通して保存されているmiRNAの中でもmiR-315はその生物の特徴である表現型に直接関わる遺伝子を制御しており，さらに生理学的にもその機能が証明されているため，マーカーmiRNAとして重要であることが考えられる．

## 4.3. 緩歩動物特異的に保存されているmiRNA

作成された系統樹をもとにmiRNAの獲得/欠損解析をおこなったところ，緩歩動物門特異的に保存されているmiRNAがmiR-34ファミリー，753，2001，2311，2720，3582，6382の全7種類あった．これらのうちmiR-3582はmiR-133とファミリーを形成する．miR-753はプラナリア (*Schmidtea mediterranea*)，miR-6382はマウス (*Mus musculus*)，miR-2720はイトゴカイ (*Capitella teleta*)，miR-2311はウシ (*Bos taurus*) からそれぞれディープシーケンシングによって存在が確認されているが，その詳細な機能については不明である (Friedländer *et al.*, 2009; Humphreys *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2009; Glazov *et al.*, 2009)．miR-2001は左右相称動物から共通して保存されているmiRNAである．しかしながら節足動物の中でも甲殻類と六脚類を合わせた単系統群である汎甲殻類と脊椎動物からはmiR-2001が確認されていないため，このmiRNAは独立に二次欠損を起こしていると推測されている (Wheeler *et al.*, 2009)．また本研究からは線形動物からもmiR-2001の存在は確認されない一方で，緩歩動物にはこのmiRNAが保存されている可能性が示唆されたことにより，miR-2001は左右相称動物で獲得された後脱皮動物上門へと分岐，そこから線形動物に分岐する際に一度，さらに汎節足動物，節足動物への分岐を経て汎甲殻類へと分岐する際に一度，それぞれ独立に二次欠損を起こしたのだと考えられる．またこのことからmiR-2001は脱皮動物上門において緩歩動物門の分岐マーカーとなりうると考えられる．miR-2001はいずれの報告も超並列シークエンサーによる大量のリードから予測したものであり，実際にこのmiRNAの働きなどについては報告されていない．

### 3.4.4. Campbellらとの進化系統比較

2011年にCampbellらが報告した225の遺伝子における49,023アミノ酸ポジションのExpressed sequence tag (EST) 配列情報による系統解析によれば，緩歩動物門の進化系統はEST情報による系統樹の時点で既に緩歩動物が節足動物と有爪動物を合わせた単系統群の汎節足動物に帰属することを示唆しており，線形動物との共通祖先から分岐しない要因としてLong Branch Attraction (LBA) の可能性を示していた．そしてさらに汎節足動物と共有しているmiRNAとしてmiR-276を挙げていた．これについてはBornerらが異論を唱えており，BornerらはDunnらやPhilippeらの先行研究に新たなシーケンスデータを加え，脱皮動物上門に属する65種の生物における189遺伝子，24,249アミノ酸ポジションのEST配列情報を用い

て進化系統解析をおこなっている．彼らはLBAの可能性を検証するため，EST情報からさらに全189種の遺伝子を進化速度が早いもの，中間のもの，遅いものによって各63遺伝子ずつ3つの集団に分けており，進化速度が早いものについては8,017箇所，中間のものについては8,530箇所，遅いものは7,702箇所のアミノ酸ポジションについてそれぞれ系統解析をおこなっている (Borner *et al.*, 2014)．その結果，緩歩動物門は進化速度が遅い遺伝子のEST情報を用いた系統解析でのみ汎節足動物へ帰属する結果が得られたが，その他の解析では線形動物に進化的に近いと示唆された．そのため今まで懸念されていたLBAは緩歩動物の進化位置にそれほど大きな影響を及ぼさないと述べている．

本研究の結果はCampbellらの結果を一部では支持するものの，彼らの研究では発見されていなかった，miRNAの二次欠損を起こしやすい線形動物との関係を繋げるようなmiRNAが見つかったことから，汎節足動物に属するのではなく，節足動物，線形動物と共に単系統群を形成しているという新しい見解を導いた．これはゲノム配列情報とmiRNA配列情報を組み合せることによってより網羅的にmiRNAを予測できたことに起因すると考えられる．しかしながら実際にはこれらが単系統群を形成しているのではなく，脱皮動物上門が誕生した当時における進化速度自体が非常に速く，系統進化が極めて短時間のうちに起きたために単系統群を形成しているように見えると考えられる．miRNAは本卒業論文でも述べてきたように発生など表現型に直接関係する遺伝子の転写後調節も担うことがあり，この解釈は長年議論されている形態学的分類と分子生物学的分類で矛盾が引き起こされているように見えてしまうこととも合致する．そのためこの可能性はある種の見解として提示できるだろう．miRNAの研究はここ20年ほどで目覚ましい発展を遂げてきた比較的若い分野のため，超並列シーケンサーの登場によってモデル生物以外の生物におけるmiRNA研究がなされるようになったとはいえ，情報量がまだ不足している状態である．そのためこの議論は今後も変化していく可能性がある．今後はヨコヅナクマムシをはじめとして様々なクマムシにおけるmiRNAシーケンシングをおこなうことで，現在よりもさらに正確な緩歩動物におけるmiRNA予測をし，そこからまた系統解析をおこなうことで進化系統を明らかにできるだろう．また脱皮動物上門における他の非モデル生物種におけるmiRNAに関する情報の蓄積もこの研究分野を助けるに違いない．またmiRNAの存在やmiRNAファミリーの分類をより確実なものとするために，各miRNAの機能が生理学的にもっと証明される必要がある．miRNAが進化系統を明らかにするより強固なツールになり得るよう，クマムシにおけるmiRNAの生理学的機能についても検証していきたい．

# 謝辞

本研究を行うにあたり，研究方針をはじめすべてにおいて熱心，的確そして丁寧にご指導してくださいました慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 荒川和晴特任准教授に心より御礼申し上げます．そして解析するにあたり，非常に重要となる先行研究に用いられていたリヒテルスチョウメイムシのmiRNA-Seqデータを快くくださりました，ダートマス大学 Kevin J. Peterson教授に心より感謝申し上げます．また毎週開催していたプログレスミーティングでは，それぞれが研究の進捗を発表し合い，活発な議論をしあうことで多くの刺激や助言をいただきました．各メンバーに感謝いたします．そして堀川大樹上席研究員をはじめG-languageグループのみなさまには，プログレスミーティング外でも日頃から大変お世話になりました．またクマムシゲノムプロジェクトは文部省特定領域研究「ゲノム」の助成によるものであり，東京大学大学院理学系研究科 國枝武和助教，ライフサイエンス統合データベースセンター 片山俊明特任助教との共同研究です．そして最後に，このような研究を行う素晴らしい機会を与えてくださった慶應義塾大学環境情報学部 冨田勝教授に大変感謝いたします．この場を借りて厚く御礼申し上げます．

# 参考文献

Andreas,M. and Dieter,W. (2001) Cambrian Derivatives of the Early Arthropod Stem Lineage , Pentastomids , Tardigrades and Lobopodians – An " Orsten " Perspective. *Zool. Anz.*, **240**, 451–459.

Bartel,D.P. (2004) MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *Cell*, **116**, 281–297.

Blaxter,M.L. *et al.* (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, **392**, 71–75.

Brennecke,J. *et al.* (2003) bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in Drosophila. *Cell*, **113**, 25–36.

Campbell,L.I. *et al.* (2011) MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 15920–15924.

Csurös,M. (2010) Count: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood. *Bioinformatics*, **26**, 1910–1912.

Degma,P. *et al.* (2014) Actual checklist of Tardigrada species (2009-2014 , Ver . 27 : 31-10-2014). *Checkl. Tardigrada*, 1–40.

Efron,B. *et al.* (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 7085–7090.

Evans,N.M. *et al.* (2008) Phylogenetic placement of the enigmatic parasite, Polypodium hydriforme, within the Phylum Cnidaria. *BMC Evol. Biol.*, **8**, 139.

Farris,J. (1970) Methods for computing Wagner trees. *Syst. Biol.*, **19**, 83–92.

Farris,J. *et al.* (1996) Parsimony jackknifing outperforms neigbor-joining. *Cladistics*, **12**, 99–124.

Friedlander R,M. *et al.* (2009) High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2–7.

Glazov,E. a *et al.* (2009) Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. *PLoS One*, **4**, e6349.

Griffiths-Jones,S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 109–111.

Guidetti,R. and Bertolani,R. (2005) Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa*, **845**, 2–46.

Hejnol,A. and Martindale,M.Q. (2008) Acoel development indicates the independent evolution of the bilaterian mouth and anus. *Nature*, **456**, 382–386.

Hilgers,V. *et al.* (2010) Drosophila microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. *PLoS Biol.*, **8**, e1000396.

Hodda,M. (2011) Phylum Nematoda Cobb 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, **2**, 63–95.

Humphreys,D.T. *et al.* (2012) Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function. *PLoS One*, **7**, e30933.

Jiang,J. *et al.* (2013) MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor ( EcR ) isoform B in the silkworm, Bombyx mori. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **43**, 692–700.

Kozomara,A. and Griffiths-Jones,S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, **42**, D68–73.

Kumar,S. *et al.* (2012) Toward 959 nematode genomes. *Worm*, **1**, 42–50.

Marco,A. *et al.* (2010) Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome Biol. Evol.*, **2**, 686–696.

Ori,S.H. *et al.* (2011) Original article Expression of two microRNAs , ame- mir-276 and -1000 , in the adult honeybee ( Apis mellifera ) brain. *Apidologie*, **42**, 89–102.

Osei-Amo,S. *et al.* (2012) Wolbachia-induced aae-miR-12 miRNA negatively regulates the expression of MCT1 and MCM6 genes in Wolbachia-infected mosquito cell line. *PLoS One*, **7**, e50049.

Regier,J.C. *et al.* (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, **463**, 1079–1083.

Satoh,N. (2003) The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 285–295.

Silver,S.J. *et al.* (2007) Functional screening identifies miR-315 as a potent activator of Wingless signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 18151–18156.

Smrt,R.D. *et al.* (2011) MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase Mind Bomb-1. *NIH-PA Author Manuscr.*, **28**, 1060–1070.

Sperling,E. a *et al.* (2009) MicroRNAs resolve an apparent conflict between annelid systematics and their fossil record. *Proc. Biol. Sci.*, **276**, 4315–4322.

Swofford,D.L. *et al.* (1993) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. *PAUP user Man. version 3.1.*

Tamura,K. *et al.* (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725–2729.

Werner,B. (1973) New investigations on systematics and evolution of the class Scyphozoa and the phylum Cnidaria. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, **20**, 35–61.

Wheeler,B.M. *et al.* (2009) The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol. Dev.*, **11**, 50–68.

Winter,J. *et al.* (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 228–234.

You,M. *et al.* (2013) A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, **45**, 220–225.

Zhang,Z. (2013) Animal biodiversity : An update of classification and diversity in 2013. *Zootaxa*, **3703**, 5–11.