

(別紙様式博 5)

学位論文要旨

学位授与申請者

畑 貴之

題目: Molecular Mechanisms and Genetic Behavior of *De novo*-activated Transcriptions in the *Arabidopsis* Genome

(シロイヌナズナゲノム中での新規転写活性化現象の分子メカニズム、およびその遺伝的挙動について)

新しい遺伝子の誕生は、生物の進化や多様化において中心的役割をもつ。これまで、遺伝子の誕生過程については、比較ゲノム解析を中心とした、進化的に「若い」遺伝子の特徴解析から研究されてきた。一方本研究では、植物ゲノムの中で機能遺伝子の誕生を実験的に引き起こし、それらを詳細に調べることで、「生まれたばかり」の遺伝子の姿を明らかにすることを目的とした。本研究で得られた知見は、遺伝子進化研究だけでなく、分子生物学や遺伝学といった幅広い学問分野に新機軸を与えるものである。

Chapter 1 : General introduction (序論)

遺伝子は、発現しない限り遺伝子とはいえない。では、進化の過程で新しく生まれた遺伝子配列は、どのようにして転写されるようになったのだろうか。このような遺伝子進化の研究は、比較ゲノム学の手法を中心に進められてきた。つまり、近縁種のゲノム・トランスクリプトームを比較解析し、進化的に「若い」遺伝子を探し出す。核酸解析に飛躍的向上をもたらした次世代シーケンサーは、この比較ゲノム研究の発展に大きく寄与した。発見された「若い」遺伝子の特徴から、ゲノム中に新しく生まれた遺伝子は、遺伝子重複や突然変異によってプロモーター配列を獲得し、転写されるようになったと考えられてきた。しかし、「若い」とは言っても、比較する生物種の分岐年代より「若い」だけにすぎない。報告されているなかで最も「若い」遺伝子でさえ、誕生から数十万年の時間を経ている。これら「若い」遺伝子が、生まれたばかりの遺伝子の姿を真に反映しているかは定かではない。

本章では、比較ゲノム研究から得られた知見をもとに、新しい遺伝子の誕生プロセスについて、コード配列と転写能（プロモーター）の獲得に焦点をあて概説している。また、真核生物のプロモーターについて概説するとともに、本研究での定義となるプロモーターの考え方を説明している。その上で、「誕生直後の遺伝子配列がどのようにして転写能を獲得するのか」という本研究の核心的問いに対し、遺伝子の誕生過程を模した人工進化実験系 (=プロモータートラ

ップ実験)によるアプローチを提案している。つまり、プロモーター配列を欠く構造遺伝子配列を核ゲノムに導入することで、新しく誕生した構造遺伝子配列のモデルとする。この導入配列が発現したならば、新たに転写能(プロモーター)を獲得したとみなせる。このプロモータートラップ実験系を次世代シーケンサーによるハイスループット解析と組み合わせることで、誕生直後の遺伝子の姿をゲノムワイドに明らかにする新しい人工進化実験が可能となることを提案している。

Chapter 2 : Preculture in an enriched nutrient medium greatly enhances the *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in *Arabidopsis* T87 cultured cells (シロイヌナズナ T87 培養細胞のアグロバクテリウムによる形質転換の効率は、富栄養培地での前培養によって大幅に向上する)

遺伝子の誕生過程をゲノムワイドに大量解析できる人工進化実験系の確立には、大量かつ多様な形質転換システムの作出が必要である。そこで本研究では、シロイヌナズナ T87 培養細胞の高効率な形質転換手法の確立を行った。本章では、形質転換操作時の培地成分の検討により、従来法と比較して 100 倍以上の形質転換効率を安定して得られることを示している。

Chapter 3 : Plant genome response to the incoming coding sequences: stochastic transcriptional activation independently of the integration loci (植物ゲノムに挿入されたコード配列は、ゲノム上の座位とは無関係に確率的に転写活性化される)

本章では、プロモータートラップ実験系を基に確立した人工進化実験から、植物の核ゲノム中に新たに生まれたコード配列がどのような様式・頻度で転写活性化されるかのゲノムワイド解析の結果について述べた。導入したプロモーター配列を欠くコード配列の発現は、これまで、核ゲノム中の既存のプロモーターの働きによると理解されてきた。しかし、本研究の結果から、そのようなケースは稀であり、むしろ、挿入配列の発現のほとんどは、全く異なる新しい転写活性化様式によることを明らかにした。この活性化は、挿入配列のゲノム上の座位に関わらず、コード配列が挿入されるというイベントに対して一定の頻度で生じていた。この結果は、植物の核ゲノムに、新たに獲得したコード配列に転写能を賦与する未知のメカニズムが存在することを示唆している。その分子メカニズムの性質、および、植物ゲノムの進化への寄与についても考察している。

Chapter 4 : Kozak-sequence acts as a negative regulator for *de novo* transcription initiation of newborn coding sequences in the plant genome (植物ゲノム中で新たに誕生したコード配列の

転写開始点は、Kozak 配列を避けて分布する)

本章では、第 3 章で述べた植物ゲノムの新しい転写活性化機構について、そのプロモーター構造の詳細を解析するための転写開始点解析について述べている。挿入コード配列の転写開始点を 1 塩基レベルで高精度に決定したことで、コード配列の挿入に伴って起こる新規転写 (*de novo* 転写) の姿が明らかとなった。*De novo* 転写は、mRNA と同様に RNA polymerase II によって転写されていた。共通した *cis* 配列が見受けられなかった一方で、その転写開始位置は、挿入コード配列の上流 100 塩基の位置に集中していた。さらに、その転写開始点は、翻訳開始シグナルの Kozak 配列を持つ ORF (open reading frame) を避けるように分布していた。これらの結果は、*de novo* 転写が基底レベルで生じる転写ノイズではないことを示唆している。本章ではさらに、*De novo* 転写と既存遺伝子との比較から、新規に誕生したコード配列が転写活性化され、機能遺伝子へと成熟していく初期プロセスについてのモデルを提案している。

Chapter 5 : *De novo* activated transcription of inserted foreign coding sequences is inheritable in the plant genome (*de novo* 転写現象によって活性化された転写は、次世代に遺伝する)

第 3、および第 4 章で用いた培養細胞は無性的な細胞分裂しか経験しないために、この実験系では、新しく生まれた遺伝子が世代交代を通じて伝搬・変異・成熟していく過程を知ることはできない。本章では、シロイヌナズナの植物体を利用した人工進化実験から、*de novo* 転写が培養細胞に特異的な現象ではなく、植物体で次世代に遺伝することを述べている。この結果は、ゲノム上に出現した新規コード配列が転写能を獲得して新たな遺伝子となる段階で、*de novo* 転写が転写能賦与の初発的メカニズムとなり得る可能性を示している。

Chapter 6: General discussion (総括)

本研究では、人工進化実験から「生まれたばかり」の遺伝子の姿を明らかにすることを試みた。培養細胞を用いた実験系から、新しいタイプの転写活性化機構「*de novo* 転写」を発見した。さらに、植物体による実験からこの *de novo* 転写は次世代に遺伝することを明らかにした。この *de novo* 転写の活性化メカニズム、そして遺伝的挙動をさらに追って研究することで、誕生直後の遺伝子配列が、ゲノムに固定され成熟していく過程の解明につながることを期待される。