

【審査結果の要旨】

本研究は、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ている。即ち、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し、この導入配列が発現すると新たに転写能（プロモーター）を獲得したとみなして、誕生直後の遺伝子の姿をゲノムワイドに明らかにすることで新しい人工進化実験が可能となることを検証している。

序論では、本研究の背景、意義、目的を述べている。進化の過程で新しく生まれた遺伝子配列は、どのように転写されるようになったのかについて、過去の研究手法を調査している。遺伝子進化の研究は、比較ゲノム学的手法を中心に進められてきた。近縁種のゲノムやトランスクリプトームを比較解析し、進化的に「若い」遺伝子を探し出し、その特徴から、ゲノム中に新しく生まれた遺伝子は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、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おり、これ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かった。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）の獲得について検討し、「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た。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し、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。

2章では、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のために、効率的な形質転換システムの作出を試みた。その結果、シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いて、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系を開発することに成功している。

3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を示している。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。

4章では、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。

5章では、3章、および4章で用いた培養細胞が変わって、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。

本論文は、人工進化実験を用いた「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、培養細胞による実験系から、新しいタイプの転写活性化機構「*de novo* 転写」を発見している。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ている。*de novo* 転写の活性化メカニズムとその遺伝的挙動を追究することで、今後は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。以上のことから、本論文は博士学位論文として価値あるものと判断した。

6 最終試験の結果の要旨

令和3年8月5日13時より、稲盛記念会館104室において、博士学位論文発表会を公開で行った。口頭発表後、質疑応答が行われた。質問は、人工進化実験における技術的な内容として、ゲノムへ導入したベクターとORFの構造、ゲノムへ導入後のボーダー配列および転写開始点周辺域の構造上の特徴について、などであった。また、転写上流域が100bpとなる理由について、*de novo* 転写の発現レベル、形質転換植物を用いた場合の後代の発現量の変化、*de novo* 転写に関する分子機構に関する質問など、多岐にわたってなされた。申請者は全ての質問に対し、適切に回答を行った。以上より、最終試験の結果について審査員全員一致で合格とした。