

学位論文審査の結果の要旨

氏名	永田 博基	
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	甲 第 1847 号	※論文博士は乙
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 21 日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当 ※論文博士は第4条第2項	
学位論文題目	Temporal Changes in Transcripts of Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements during Rice Endosperm Development	
主指導教員	木下 哲	
論文審査委員	(主査) 川浦 香奈子	准教授
	(副査) 嶋田 幸久	教授
	(副査) 辻 寛之	准教授
	(副査) 持田 恵一	客員教授

論文内容の要旨

トランスポゾンとはゲノム中を移動する因子として、トウモロコシの胚乳を含む組織である穀粒を用いた研究が歴史的に盛んに行われてきた。トランスポゾンの遺伝子内への挿入は、その遺伝子機能を破壊してしまうことから宿主に有害であるとされる。このため、多くの場合、宿主はDNAメチル化などのエピジェネティックな制御によりトランスポゾンの不活性化する。宿主には有害であるとされるトランスポゾンであるが、ここ数十年の研究では、挿入された近傍遺伝子の発現制御や、小分子RNAを介した制御によりエポックメイキングな役割を進化の過程で果たした可能性が次々と報告されている。

植物の胚乳は、歴史的にもトランスポゾンの研究例が多く、近年の解析ではトランスポゾンの不活性化を担うDNAメチル化が胚乳において低下することが明らかとなっており、トランスポゾンの挙動やその機能を解析するうえで格好の材料を提供している。本学位論文では、イネの胚乳発生過程を通じて、トランスポゾンの転写産物を網羅的に解析することが試みられている。第一章では、マイクロアレイを用いた解析により、次世代シーケンサーでは見落とされがちであるMITE (Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements) と呼ばれる小さなトランスポゾンからの転写産物が、特徴的な発現パターンを示すことを明らかにしている。MITEトランスポゾンからの転写産物に関しては殆ど報告がないが、近傍遺伝子の転写産物と共転写されることが知られていた。MITEは、200bpから600bp程の短

いトランスポゾンである特徴から、ゲノム中の遺伝子近傍にランダムな向きに挿入されている。興味深いことに、Yourenを含む多くのMITEは、トランスポゾンに順向きの転写がなされることが明らかとなった。本学位論文ではさらに、Yourenの順向きに転写される原因が検証されている。Yourenを含むMITEは、トランスポゼースが結合する末端反復配列 (Terminal Inverted Repeat) を持つ。Yourenの配列上のシスエレメントを検索した結果、末端反復配列を含む位置にCCAATモチーフが保存されていることが明らかになった。さらに発現変動するYourenとそうでないYourenの比較から、このモチーフは発現変動するYourenにより高度に保存されていることが明らかとなった。CCAATモチーフは、動植物で保存されるNF-Y (Nuclear Factor Y) 三量体が結合する配列として良く知られている。近年のシロイヌナズナなどの研究からも、NF-Yの多くがパイオニア転写因子としての機能を持つことが明らかになっている。パイオニア転写因子は、クロマチン転写環境に関して、活性化領域であろうと、不活性化ヘテロクロマチン領域であろうと関係なく、DNAに結合できる作用機序を持つ。こうしたパイオニア転写因子の結合サイトを遺伝子近傍領域に散在するYourenが持つことは、胚乳発生時の転写ネットワークを考える上で興味深い知見を提供するものである。なお、本論文の第一章の内容は、植物の中核雑誌であるPlant Journal誌 (Q1, IF6.417) から出版され、2022年3月号の研究ハイライトにも選ばれている。

第二章では、次世代シーケンサーを用いて、同様にイネ胚乳発生過程におけるトランスポゾンの挙動をトランスクリプトーム解析から明らかにしている。ここでも多くのトランスポゾンは、ダイナミックに発現変動を示すことが示された。発現変動を示すトランスポゾンをk-meansクラスタリング解析によって、それらの発現パターンを分類した。幾つかのクラスターの中に、類似したサブファミリーが濃縮されていることから、トランスポゾンはその配列の類似性に基づいた、共通の転写制御があることが伺えた。さらに、濃縮度が高いMULE/MUDRスーパーファミリーに属するMERMITE18Bの転写に着目して解析を進めた。その結果、発現変動するMERMITE18Bファミリーは低メチル化を受けており、21塩基長の小分子RNAの蓄積が見られた。一方で発現変動しないMERMITE18Bは、高メチル化状態であり小分子RNAの蓄積も見られなかった。そこで、この小分子RNAの機能を検索する上で、小分子RNAと会合しうる転写領域をイネゲノム上から検索した結果、スクロース加水分解酵素をコードする *VINV* 遺伝子が見いだされた。*VINV1* 遺伝子の領域内に21塩基長の小分子RNAの結合サイトがあり、さらにその近傍には24塩基長の二次的と予想される小分子RNAの蓄積が見られるとともにゲノム領域にCHHメチル化の蓄積が見られた。これらの結果から、*VINV* 遺伝子の転写産物がMERMITE18Bの標的となり結合部位でmRNAの切断が起こっている可能性が浮上している。また、この可能性は内在のmRNAを用いたRT-PCRの結果からも支持された。

論文審査結果の要旨

本学位論文の審査は、提出学位論文の内容、博士論文発表会での発表内容、口頭試問の質疑応答にもとづき、4名の審査員（主査：川浦香奈子准教授、副査：嶋田幸久教授、辻寛之准教授、持田恵一客員教授）により、令和4年3月29日に実施された。口頭試問は専門分野の学識、学位研究に関する学識、一般的な科学分野の学識に関して試問された。これらの審査内容を考慮し、同日に開かれた審査委員会にて博士号に相応しいかどうか検証した。

学位申請者は、イネの胚乳を材料としてトランスポゾンの転写を次世代シーケンサーならびにマイクロアレイを用いて時系列解析を行ったことを報告した。単一の組織から時系列を追ったトランスポゾンのトランスクリプトーム解析は、これまでに実施された例は少ない。申請者の解析からトランスポゾンからの転写産物は胚乳発生を通じて、大きく変動していることなどが明らかになっている。

辻委員からは、同定しているMERMITE18Bトランスポゾンの解析方法に関する試問がなされた。発現変動を指標にするのではなく、発現の程度を指標に場合別けした方が今回の解析目的に合致しているのではないかの指摘があった。また、マイクロアレイではPol IIが読み取った結果付与されるPoly(A)を活用したラベリングがされているはずで、トランスポゾンの中にはPoly(A)を持たないものもあり、実験系によるバイアスの可能性が指摘された。これらの技術的なコメントに対しては、前者は今後解析を試みることで、後者はバイアスの可能性も残ることから、20塩基超長のシーケンスが可能になっている一分子シーケンサーの導入など、今後さらなる技術的な改善も必要であることを回答した。さらに、MITEのsense方向の発現以外にも、少ないながらもanti-sense方向の発現が検出されるが、その解釈に関して問われた。これに対しては、anti-sense方向の転写は、確認したところ遺伝子からの転写に含まれる、いわゆるリードスルーと呼ばれるタイプの転写でありトランスポゾン自身の転写ではないことを解答した。また、関連する学術領域への質問として、胚乳における生殖隔離に機能する可能性に関して問われ、作業的なモデルを提示しつつ議論を展開した。

持田委員からは、マイクロアレイのデザイン方法の試問がなされた。Oryza Repeatデータベースの情報を元に重複がないように設計がなされている旨回答した。ゲノム中のトランスポゾンに対して、どの程度の情報が扱えているのかに関して試問があり、MITEに関してはイネゲノムの中で最も多い約15万コピーが存在し、重複を排除すると3万コピー程度であること、マイクロアレイではそのうちの1万9千コピーほどを扱っていることを回答

した。口頭発表ではその詳細が触れられていなかった、*VIN1*遺伝子に着目する過程に関して質問が及び、適確な回答があった。さらに、こうしたトランスポゾンを紹介した転写制御には、どのような生物学的な意義があるのか、一般的な知識を問う試問に対しては、哺乳動物においては、レトロエレメントからの転写がインターフェロン関連遺伝子の制御を介して寄与していることなど、各論ではあるが個別の事例を回答した。

嶋田委員からは、MITEトランスポゾンのYourenの5'端に存在するCCAATモチーフに結合しうるNF-YB転写因子に関して試問があった。研究目的としては、いつ、どこでトランスポゾンが発現するかを目的としていたが、アリューロン層と内部の胚乳細胞でトランスポゾンの発現が違ふ可能性が試問された。また、NY-YBによるYourenの活性化はそうした胚乳組織の分化も説明出来るか否か問われた。これに関しては、今回の解析では、アリューロン層と内部胚乳を別けてサンプリングしていないため、今後の課題である旨回答された。また、実験データに関して、SZ-43_LTRとMERMITE18Bのエンリッチメント解析はどのような手法がとられたか試問があり、発現変動があったトランスポゾンを母集団として、それぞれがエンリッチメントされている統計的検証は超幾何学検定で行い、BH (Benjamini-Hochberg) 法で多重検定補正をかけていることを回答した。

川浦委員からは、発現変動があるYourenトランスポゾンと変動がないトランスポゾンとでCCAATモチーフの保存性に大きな違いがあるが、その外側近傍配列は高度に保存されていることへの考察を試問された。進化学的な議論はやや物足りないものの、CCAATモチーフが末端反復配列を跨ぐ形で存在するため、反復配列が保存されていることなどを説明した。またDNAメチル化に関しても質問が及び、発現変動があるトランスポゾンは低メチル化されていることは明らかであるが、時系列解析に関しては今後詰めて行く必要があることが回答された。さらには、*VIN1*遺伝子の発現制御に関して、MERMITE18B由来の小分子RNAによる転写後制御があるとの作業仮説に対して、なぜそのような複雑な制御があるのか試問された。進化学的な観点からの回答、作業仮説に関しては、まだイネゲノムを用いた検証を行っていないことから、明確な結論は得られていないと回答した。しかしながら、*VIN1*は重複遺伝子として*VIN2*を持つため、*VIN2*とは異なる発現制御が可能であり、進化的により複雑な制御を許容した可能性を指摘した。

以上のように、申請者自身が見いだした実験結果の将来展望や、現状の専門分野における位置づけに関してはやや物足りない部分もあるものの、研究成果に関しては素晴らしく博士の学位に十分であると全審査員が結論づけた。