

論文の内容の要旨

論文題目

Genome-wide negative feedback drives transgenerational DNA methylation dynamics in Arabidopsis

(シロイヌナズナの継世代的 DNA メチル化動態における
ゲノムワイドの負のフィードバック)

氏名 伊藤 佐 (指導教員 角谷 徹仁)

序

植物において、エピジェネティックな表現型の変化は、特にそれが DNA メチル化の変化に起因する場合、しばしば世代を超えて伝達される。しかしながら、世代を超えた DNA メチル化動態を制御する機構については未だ不明な点が多い。アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナにおいては、野生型系統で自殖を繰り返した際のゲノム全体の DNA メチル化動態が詳細に調べられており、この過程で自然に DNA メチル化の変化する領域があることが報告されている。ただし、これらは野生型系統における定常状態での結果に限られている。この背後に存在する DNA メチル化動態制御機構について知るためには、DNA メチル化パターンを乱すことがもたらす継世代的な影響を調べるのが有効と考えられる。

シロイヌナズナの *DDM1* (*DECREASE in DNA METHYLATION 1*) は、SWI2-SNF2 クロマチン再構成因子をコードし、変異体では反復配列での DNA メチル化が減少する。興味深い事に、*ddm1* 変異体は 1 世代目では比較的正常に生育するが、自殖を重ねる事で様々な発生異常を示す。発生異常の原因には、DNA メチル化の減少による遺伝子やトランスポゾンの脱抑制だけでなく、遺伝子配列における異所的なシトシンメチル化の増加も存在する。

本論文では、このような *ddm1* 変異体における継代的な DNA メチル化動態を調べる事を目的とし、全ゲノムでの DNA メチル化の比較により、*ddm1* 変異体の自殖系統における DNA メチル化状態の解析を行った。

結果と考察

1 世代目と後代の *ddm1* 変異体は異なった DNA メチル化パターンを示す。

全ゲノムでのバイサルファイトシーケンス法により、1 世代目と 9 世代目の *ddm1* 変異体における DNA メチル化を、野生型個体に対して比較した。その結果、1 世代目の *ddm1* 変異体はトランスポゾンにおいて、CG 配列、非 CG 配列ともに DNA メチル化の顕著な減少を示した。一方で 9 世代目の *ddm1* 変異体は 1 世代目との比較において、CG 配列の DNA メチル化の更なる減少と、非 CG 配列の DNA メチル化の増加という二つの傾向を示した。

まず、9 世代目の *ddm1* 変異体における CG 配列の DNA メチル化の更なる減少について調べた。1 世代目と 9 世代目の *ddm1* 変異体において、CG 配列の DNA メチル化が野生型個体に比べて減少している領域を検出し、これらの比較を行った。公開されているデータを用いて、野生型個体でのヒストン修飾の局在を調べた結果、1 世代目の *ddm1* 変異体で CG メチル化が減少する領域には、野生型個体においてヘテロクロマティックな修飾であるヒストン H3K9 のジメチル化が局在していることが分かった。一方で、9 世代目の *ddm1* 変異体においてのみ CG メチル化の減少が観察された領域では、ヒストン H3K9 のジメチル化の局在は低い水準にあった。つまり *ddm1* 変異は、ヘテロクロマチン領域での DNA メチル化だけでなく、長期的にはそれ以外の領域の DNA メチル化にも影響をもたらすことが明らかになった。

次に、9 世代目の *ddm1* 変異体における非 CG 配列の DNA メチル化の増加について調べた。驚くべき事に、非 CG 配列の DNA メチル化の増加は遺伝子配列とトランスポゾンの両方で見られた。この傾向は複数個体の自殖系統で見られ、さらに特定の領域においては、*ddm1* 変異体における DNA メチル化の増加は、再現性良く引き起こされる事が明らかになった。興味深い事に、1 世代目の *ddm1* 変異体ではこのような DNA メチル化の増加はほとんど観察されず、*ddm1* 変異体における DNA メチル化の増加は、自殖を重ねる事で引き起こされることが明らかになった。

遺伝子配列における非 CG 配列の DNA メチル化の増加に関しては、ヒストン H3K9 の脱メチル化酵素をコードする *IBM1* (*Increase in BONSAI Methylation 1*) の変異体においても起きる事が報告されている。そこで、1 世代目と 9 世代目の *ddm1* 変異体の間での DNA メチル化の変化を、*ibm1* 変異体での変化と比較した。その結果、自殖を重ねた *ddm1* 変異体での異所的な非 CG 配列の DNA メチル化は、*ibm1* 変異体に比べ遺伝子配列の 3'側に局

在している事が明らかになった。また、*ddm1* 変異体の複数の自殖系統間での比較の結果、遺伝子配列での DNA のメチル化は転写の方向の 3'側から 5'側に広がっていく傾向が見られた。

***ddm1* 変異による DNA メチル化の増加は反復配列での減少を介して間接的に起こる。**

自殖を重ねた *ddm1* 変異体での DNA メチル化の増加の原因は、*ddm1* 変異による直接的な影響なのか、それとも *ddm1* 変異により反復配列での DNA メチル化が減少した事による間接的な影響なのか。これらの可能性を検討するため、野生型 *DDM1* 背景における *ddm1* 由来の染色体の効果を検証した。材料には *ddm1* 変異体と野生型の間での、エピジェネティックな組み換え近交系 (epiRIL) を用いた。

まず、公開されている 123 系統の epiRIL での抗メチル化 DNA 抗体を用いたタイリングアレイの結果を用いて、ゲノム全体での DNA メチル化の減少の度合い (*ddm1* 由来の染色体の効果) と、自殖を重ねた *ddm1* 変異体で DNA メチル化が増加している遺伝子での野生型個体からの DNA メチル化変化を比較した。その結果、*ddm1* 由来の染色体の効果が大きい系統ほど、異所的な DNA メチル化の増加を示し、さらに DNA メチル化の増加は、野生型由来の染色体においても起きている事が明らかになった。

以上の結果は、epiRIL を用いた全ゲノムのバイサルファイトシーケンス法による結果でも確認され、ゲノム全体で DNA メチル化が減少している系統では非 CG 配列の DNA メチル化が野生型由来の染色体でも増加していた。

これらの結果は、*ddm1* 変異による DNA メチル化の増加は低メチル化された染色体の影響により間接的に起こることを強く示唆している。これは、植物のゲノムには DNA メチル化動態におけるゲノムワイドな負のフィードバック機構が存在することを意味する。

先行研究において、DNA メチル化におけるヒストン修飾や低分子 RNA などとの局所的な正のフィードバックの存在が報告されている。DNA メチル化動態においては、このような局所的な正のフィードバックとゲノムワイドな負のフィードバック機構が協調し、ゲノム全体のエピジェネティックな修飾状態の安定性に貢献していると推察される。さらに、このような機構は、反復配列の急速な増殖などゲノムの構造の変化に対する防御応答として有効に働きうると考えられる。

まとめ

全ゲノムでの DNA メチル化の比較により、*ddm1* 変異体の自殖系統における DNA メチル化状態が明らかになった。1 世代目と後代の *ddm1* 変異体は異なった DNA メチル化パタ

ーンを示すほか、*ddm1* 変異体での DNA メチル化の増加は、自殖を重ねる事で引き起こされることが明らかになった。さらにこの効果は反復配列での DNA メチル化の減少に対する応答である事が示された。本研究の結果は、DNA メチル化動態においてゲノムワイドで働く新奇の負のフィードバック機構の存在を強く示唆する。