

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 佑

DNA のメチル化は、生物のエピジェネティック制御の基本システムであり、遺伝子発現やトランスポゾン制御を制御している。植物では、エピジェネティック制御である DNA メチル化パターンがしばしば世代をこえてメンデル遺伝しうることがわかっており、表現型進化や適応における重要性が注目されている。しかしながら世代をこえて継承される DNA メチル化パターンを制御する要因についてはほとんど探索されていなかった。DNA メチル化変化を数世代にわたり調べた報告があるが、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、その変化量が少ないために、これまでに明確な結論は得られていない。この世代をこえた 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攪乱し、攪乱がもたらす継代的な影響を調べるのが有効と考えられた。

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。この働きは脊椎動物のオーソログである LSH にまで保存されている。興味深い事に、シロイヌナズナの *ddm1* 変異体は 1 世代目では比較的正常に生育するが、自殖を重ねた後代で様々な発生異常が観察される。発生異常の 1 つは異所的な DNA メチル化上昇によることが先行研究でわかっていた。

これらの先行研究で得られた知見をもとに、本論文では、*ddm1* 変異体およびそこから派生した系統を用い、継代的な DNA メチル化動態とその背後にある制御機構の理解を目指して研究を行った。本論文は 5 章からなり、第 1 章では研究の背景がまとめられている。第 2 章では本研究で使われた材料と方法について記述されている。第 3、4 章は研究の結果とその考察であり、第 3 章では、*ddm1* 変異体の 1 世代目および 9 世代目のゲノム DNA の詳細な解析が、第 4 章では、*ddm1* 由来の染色体を野生型背景に交配で導入したことの効果が述べられている。研究全体の総括が第 5 章に記されている。

論文提出者は、バイサルファイトで処理した DNA をショットガンシーケンスすることにより、全ゲノムのシトシンメチル化を 1 塩基解像度で知るという強力な手法を用いて研究を進めた。まず、1 世代目と 9 世代目の *ddm1* 変異体における DNA メチル化を調べたところ、トランスポゾンのメチル化は、CG 配列、非 CG 配列ともに 1 世代目ですでに顕著な減少を示した。9 世代目では、CG 配列の DNA メチル化は更に減少するのに対して、非 CG 配列の DNA メチル化は増加という不思議な傾向を示した。そこで、公開データを用いて、野生型個体でのヒストン修飾の局在を調べた結果、1 世代目で CG メチル化が減少する領域には、野生型個体において抑制クロマチンの修飾であるヒストン H3 の第 9 リ

ジンのメチル化 (H3K9me) が存在していることがわかった。一方、9 世代目においてのみ CG メチル化の減少が観察された領域では、ヒストン H3K9me レベルは低かった。このことから、*ddm1* 変異は、抑制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 メチル化にも影響することが明らかになった。

次に、9 世代目における非 CG 配列の DNA メチル化の増加について解析した。このような異所的非 CG 配列メチル化の増加は 1 世代目ではほとんど観察されず、世代を経るにつれて、遺伝子配列の 3'側から、5'側にしだいに広がっていく傾向が観察された。この異所的非 CG 配列メチル化の増加が、*DDM1* 遺伝子の機能喪失による直接的効果か、あるいは、*ddm1* 変異により反復配列の DNA メチル化が低下したことによる間接的な効果かを検討するため、野生型 *DDM1* 背景における *ddm1* 由来の染色体の効果を調べた。その結果、野生型 *DDM1* 背景で *ddm1* 由来の染色体をもつ系統において、異所的メチル化がみつかった。また、*ddm1* 由来の染色体による低メチル化領域をゲノム内に多く含む系統ほど、異所的な DNA メチル化が増加していることがわかった。さらに、DNA メチル化の増加は、導入された *ddm1* 由来の染色体だけでなく、野生型由来の染色体においてもトランスに誘導されることが明らかになった。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支持した。この結果は、また、DNA メチル化制御において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強く示唆した。

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。したがって、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本研究で発見された、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考えられた。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た。*DDM1* の哺乳類オースログである *LSH* の変異体でも、ゲノム全体の低メチル化にともなう高メチル化のおこる配列が最近みつかっており、本研究で明らかになった負のフィードバックは、哺乳類を含む生物共通の原理である可能性が高く、そのようなパイオニア的な研究としても本研究は高く評価された。以上、本論文は独自のアプローチで新奇のゲノム制御機構を見いだした成果として高く評価された。

なお、本論文に記載された研究は樽谷芳明、藤泰子、Mohamed Kassam, Evelyne Duvernois-Berthet, Sandra Cortijo, 高嶋和哉、佐瀬英俊、豊田敦、藤山秋佐夫、Vincent Colot、角谷徹仁氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、ここに得られた結果の多くは新知見であり、いずれもこの分野の研究の進展に重要な示唆を与えるものであり、かつ本人が自立して研究活動を行うのに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、伊藤佑提出の論文は博士 (理学) の学位論文として合格と認める。