

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Comparative analysis of genome and epigenome between two polymorphic medaka populations

(2種の多型メダカ集団におけるゲノム・エピゲノム比較解析)

氏名 宇野絢子

#### <序論>

CpG サイトのシトシンにおける DNA メチル化は、脊椎動物における基本的なエピジェネティック修飾の一つである。遺伝子のプロモーターのメチル化は遺伝子の長期的抑制に関わることが知られる。脊椎動物ではゲノムの大部分がメチル化されている一方で、ごく一部の領域は低メチル化 CpG が連続して並ぶ DNA 低メチル化ドメイン (HMD) となっている。HMD の多くはプロモーターに存在し、ヒストン修飾を伴って近傍の遺伝子の発現を制御する。よって、HMD の位置がどのようにして決まっているのかを理解することは重要な課題であると言える。先行研究により DNA メチル化のパターンはその DNA 配列に規定されることが示されていたが、HMD を規定するコンセンサス配列については知見が乏しかった。

私は、HMD を規定するコンセンサス配列を同定する上で、近縁なメダカ2種の近交系である Hd-rR、HNI が有用なモデルであると考えた。これら2種は類似した表現型を示し、2種間で交配も可能であるが、2種間で高い配列多様性を示す(一塩基差異、3%程度)と報告されている。本研究では、このような2種間のゲノム配列の差異を利用して HMD を規定するコンセンサス配列を同定することを目指し、2種間で DNA メチル化パターンや DNA 配列の比較をゲノムワイドに行った。本研究では特に、分化後においてもその大部分が保存されているという点から、これら2種のメダカの胞胚期における HMD の比較解析を行った。

## <結果>

第 1 章では、Hd-rR、HNI の胞胚期 HMD の DNA 配列を他方の種のゲノムへとマッピングし、マップされた領域のメチル化パターンと比較することにより、マップされた HMD (全体の 70%以上) のうち 90%以上が 2 種間で共通して見られることを示した (図 1)。さらに、これらの種間で共通している HMD の大部分がプロモーター領域に存在する一方で、種特異的な HMD の大部分はプロモーター以外の領域に存在することを明らかにした。また、HNI 胞胚期において RNA-seq を行い、先行研究により得られている d-rR 系統 (Hd-rR が由来するメダカ集団) の胞胚期の RNA-seq データと併せて解析することにより、プロモーターに存在する種特異的な HMD が種特異的な遺伝子発現に影響していることを示した。さらに、2 種間のゲノム配列の差異を見てみると、種間で共通の HMD では、メチル化領域とほぼ変わらないレベルでゲノム配列の差異が見られた。しかしながら、その中でも特定の DNA 配列が保存されており、また多く存在しているということが明らかとなった (図 2)。これらの配列の一部は転写因子の結合配列と類似していた。

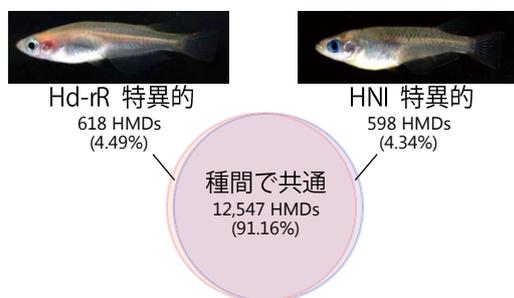
機能的な領域は開いたクロマチン構造を取るという知見から、第 2 章では、開いたクロマチン領域の指標となる DNase-seq のデータ (d-rR 胞胚期データ、当研究室、未発表) を用い、同定した各 DNA 配列の近傍における DNase-seq シグナルのパターンを解析した。その結果、一部の配列の周囲で DNase-seq シグナルが最大値を示し、さらにはその周辺で DNase-seq シグナルが約 200 bp 間隔の周期的なピークを示すことを明らかにした。このピークとヌクレオソーム構造との関連を調べるため、先行研究により得られている Hd-rR 胞胚期の MNase-seq データを解析することにより、DNase-seq シグナルのピークの位置とヌクレオソームコア部分 (中心領域) の存在確率の谷の位置が一致することを示した。これより、同定した DNA 配列の一部は HMD 内で 200 bp 間隔で並んだヌクレオソームのリンカー DNA 部分に特異的に存在していると結論した。さらに、この特定の DNA 配列のリンカー特異的な局在の多くが、その DNA 配列を構成する塩基組成を反映しているわけではないことを示した。これにより、これらの DNA 配列はメダカゲノムにおけるヌクレオソームの位置決定にモチーフとして機能することにより、HMD 形成に機能する可能性を示した。

第 3 章では、メダカ 2 種間のゲノム配列の差異が 2 種間のメチル化パターンの差異に寄与するかを調べるため、同定した HMD の配列とその周囲のゲノム領域を含むトランスジェニック (Tg) メダカを作製し、F1 もしくは F2 の胞胚期ゲノムについて HMD における DNA メチル化パターンを解析した。その結果、期待に反して、Tg メダカでは導入配列への DNA メチル化は、内在配列における DNA メチル化レベルにかかわらず部分的にしか起きていないことが明らかとなった。更なる解析により、導入配列への不完全なメチル化は、当研究室で長期にわたり維持されている他の Tg メダカ (zicTg) の胞胚期や、作製した Tg や zicTg の他の細胞種 (肝臓細胞) にも共通していることを示し、導入配列がゲノム内に導入されたからの経過時間や解析した細胞種によらないことを確認した。

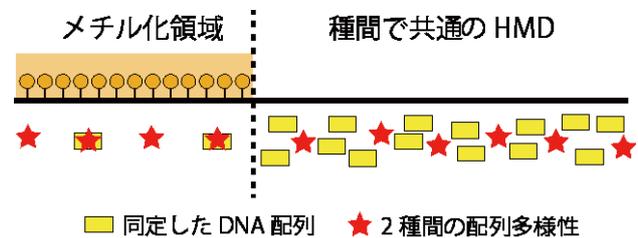
### <考察>

本研究は、2種のメダカゲノム間における配列多様性の高さを利用して、ゲノム配列およびDNAメチル化パターンにおけるゲノムワイドな比較を行うことで、種間で共通したHMDに見られるコンセンサスDNA配列を同定することに成功した。本論文では、これにより同定したDNA配列の一部が転写因子の結合配列と類似することを明らかにした一方で、別の一部配列がHMD内でリンカー領域に局在することを明らかにした。これは、HMDの規定メカニズムについて、転写因子との関連を支持する一方で、ヌクレオソームの位置決定がHMD形成や維持に関わるという新たな可能性を示すものである。さらにメダカで導入配列がその由来にかかわらず低メチル化状態または不完全なメチル化状態となっていることは、内在部位と導入部位でのメチル化パターンの高い相関を示したマウス幹細胞での先行研究との明らかな差異を示しており、このような差異の原因については今後さらに検証していく必要があると考える。

このように本研究を通じて、いくつかのユニークな結果が得られたことより、エピジェネティック研究におけるメダカの有用性を示すことができたと考える。現在日本では10以上の近交系メダカが維持されており、他の近交系を用いたさらなる比較解析は、ゲノム配列がどのようにしてエピジェネティック情報として解釈されるかを理解する上で、更なる知見を与えてくれるものと期待できる。



**図 1. メダカ近交系と胞胚期 HMD**  
他方のゲノムへマップされた胞胚期 HMD の大部分が種間で共通していた。



### 図 2. 保存配列と配列多様性

種間で共通して見られる HMD では、メチル化領域と同程度の配列多様性が見られるが、特定の DNA 配列が保存され、かつ多く存在していた。