

論文審査の結果の要旨

氏名 宇野 絢子

本論文は3章構成であり、要旨、全体の序論、第1章（序論、結果、考察）、第2章（序論、結果、考察）、第3章（序論、結果、考察）、方法、全体の考察、図表、文献、謝辞から構成され、異なる2種に分類されるメダカ近交系 Hd-rR、HNI 間でのゲノム配列、エピゲノム情報の比較解析から、胎胚期ゲノムにおける DNA 低メチル化ドメイン（HMD）の規定に関わる DNA 配列を探索したものである。

DNA メチル化は基本的なエピジェネティック修飾の一つであり、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。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）となっており、近傍の遺伝子の発現を制御する場として機能する。本論文では、近縁なメダカ2種の近交系 Hd-rR、HNI の持つ数々の利点に着目し、2種間でゲノム配列や DNA メチル化パターンの比較をゲノムワイドに行うことで、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た。本論文では、特にメダカ胎胚期の HMD に着目し解析を行っている。

第1章では、2種のメダカ胎胚期における HMD を他方の種のゲノムへとマッピングし、メチル化パターンを比較することにより、マップされた HMD のうち90%以上が2種間で共通して見られること、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、RNA-seq の解析により、プロモーターに存在する種特異的 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配列の差異が見られたが、特定の DNA 配列が保存されており、また高頻度に HMD 内に存在していた。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、さらに第2章では、1章で同定した保存されている DNA 配列と開いたクロマチン構造との関係を、各配列の近傍での DNase-seq データを解析した。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、さらにはその周辺領域で 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、先行研究における Hd-rR 胎胚期の MNase-seq データを解析した。その結果、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 形成に関与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 の胎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、予想に反して 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を明らかとなった。マウス幹細胞での先行研究との差異を指摘した上で、この原因について考察し、今後検証していく必要があると述べている。

本研究は、配列多様性は高いがアライメントが可能なゲノムを持っているという理由から 2 種のメダカに着目し、そのゲノムワイドな比較から HMD 形成に関与すると思われるコンセンサス配列を同定した。このような手法で重要配列を同定したアプローチは過去になく新しい。さらに、同定した DNA 配列による 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したという点でも意義深い。

なお、本論文のうち、第 1 章の HNI 系統の胎胚期における RNA-seq は東京大学鈴木穰博士、菅野純夫博士、曲薇博士との共同研究であり、第 2 章の DNase-seq、MNase-seq のデータを用いた解析は東京大学中村遼平博士との共同研究である。しかし、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

上記より、博士（理学）の学位を授与できると認める。