

# 論文審査の結果の要旨

氏名 張 國鳴

CHEUNG KWOK MING

生物の遺伝情報はゲノム DNA の塩基配列 (A, G, C, T) に刻まれている。一方、遺伝情報を実現するための遺伝子発現は制御領域の塩基配列の他に、DNA のメチル化、DNA 鎖が巻き付くヌクレオソームを構成するヒストンたんぱく質に対する化学修飾によっても制御されている。これらの化学修飾は細胞分裂に伴って、娘細胞の DNA にも引き継がれることから、第二の遺伝情報ともよばれている。DNA メチル化は DNA 鎖に存在する CpG の配列の C にメチル基 (-CH<sub>3</sub>) が付加される反応である。遺伝子発現に影響を及ぼすことから、DNA メチル化のパターン (どの C がメチル化されるか、低メチル化や高メチル化の領域の決定) は、塩基配列などの遺伝情報によって厳密に制御されていると考えられている。しかし、これらの考えを具体的に支持する実験的証拠は限定的であった。本研究は、ゲノム解析に様々な利点を有する小型魚類メダカを用いて、DNA メチル化の配列依存性を解析したものである。

本論文は 2 章で構成されている。第 1 章ではメダカゲノム上の低メチル化と高メチル化領域の配列の傾向を機械学習を用いて明らかにした。その結果、低メチル化領域では特徴的な塩基配列の蓄積が見られた。すなわち、低メチル化領域では、連続した CG を含む繰り返し (特に 5'-CGCGCG-3') および CG を含まない特定の繰り返し配列 (CG 無し配列、AGCTAG, GCTAGC, TAGCTA など) が頻度高く存在する傾向が見い出された。これらの結果は、ゲノム上の特定の塩基配列がその領域のメチル化の程度を決めているというこれまでの説を支持している。

第 2 章では、第 1 章で示された DNA メチル化の配列依存性をメダカ胚を用いて検証した。まず、低メチル化領域に頻度高く存在する CGCGCG および CG 無し配列を、CRISPR-Cas9 技術を用いて、6 つ遺伝子座の低メチル化領域で欠失させ、その影響を F0 と F1 個体で調べた。しかし欠失を有するすべての遺伝子座において、予想に反して DNA メチル化への影響はなかった。

次に以下のいくつかの条件で、メダカゲノムから単離したゲノム断片をメダ

カの一細胞期胚へ導入して、挿入されたゲノム断片上での DNA メチル化の状態を胞胚期（受精後約 7 時間後、2000-4000 細胞期）で調べた。ゲノム断片はクローニングする過程で増幅するために内在の状態、即ち低または高メチル化領域に関わらず完全に DNA メチル化は失われる。まず、低メチル化領域の特徴である GC に富んだ DNA 断片を、非メチル化状態のままの、または導入前に DNA メチル化酵素により人工的にメチル化状態にした DNA 断片をランダムにメダカ胚ゲノムへ挿入した。その結果、挿入 DNA 断片の内在の状態（由来する元のゲノムの状態）にかかわらず、DNA メチル化は導入時の状態から変化することではなく、内在の状態へ復帰することはなかった。しかしこの実験は、ランダムに挿入が起きるため、挿入近傍の遺伝子や構造・配列の影響、つまり位置効果（position effect）を排除できていない。そこで、位置効果の少ない遺伝子密度が疎な領域（gene desert）の特定の一か所に、PhiC31 システムを用いてゲノム DNA 断片を挿入した。この実験では、11 個の低メチル化領域の DNA 断片を人工的に高メチル化状態にしてから、18 番染色体の一か所に挿入した。しかし、DNA 低メチル化領域由来のこれらのゲノム DNA 断片は、高メチル化状態が維持され、内在の低メチル化状態には戻らなかった。

これまでの二つの実験では、ゲノム DNA 断片は導入された胚のゲノムで、本来とは異なる（異所的な）領域に挿入されており、それが本来の DNA メチル化状態への復帰を妨げている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、CRISPR-Cas9 による相同組み換え誘発を利用して、遺伝子座の一部領域の DNA メチル化状態をその場所で人工的に変化させた。胞胚期、さらに受精後 3 日、7 日まで相同組み換えで入れ換えた DNA 断片のメチル化状況を調べたが、この場合も、内在の状態ではなく挿入時のメチル化状態が維持されていた。

以上の結果は、ゲノム内で低メチル化と高メチル化領域には塩基配列では明確な違いは存在するが、その配列自身が直接 DNA のメチル化状態を規定していないことを明確に示している。これまで実験的根拠が十分でない状況で漠然と信じられていた、「DNA メチル化と配列の特異的關係」に、本実験は疑問を投げかける初めてのゲノムワイドの研究となったと言える。

なお、本論文は中村遼平、宇野絢子、福島悠人、熊谷真彦、森下真一、武田洋幸（東京大学）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究戦略の設定、実験、考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。