

氏 名 塚原 小百合

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1560 号

学位授与の日付 平成24年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Studies on control of mobile retrotransposons in *Arabidopsis*

論文審査委員 主 査 教授 倉田 のり  
教授 広海 健  
教授 深川 竜郎  
助教 飯田 哲史  
准教授 長岐 清孝 岡山大学

< Part1 >

Retrotransposons are major components of eukaryotic genome. They have proliferated in the genome during evolution through their copy-and-paste type transposition. However, in the current genome, most of them are inactivated by degeneration or silencing mechanism of hosts. In the model plant, *Arabidopsis thaliana*, mobile endogenous retrotransposon have not been found. This is one of the reasons why characteristics of retrotransposons have not been well investigated in *A. thaliana*. To understand dynamics of retrotransposon in the genome, the identification of mobile endogenous copies is essential.

In Part 1, I described identification of a mobile endogenous LTR (long terminal repeat) retrotransposon, *ATGP3*, by through genetic characterization of one of the developmental abnormalities induced by *ddm1* (*decreased in DNA methylation 1*) mutation. *ddm1* mutant shows genome-wide reduction of DNA methylation, especially in transposable elements. *ddm1* mutation induces various developmental abnormalities during repeated self-pollination. *ATGP3* was identified in one of such abnormalities, called *wavy-sepal*. Using map-based cloning, I found that *wavy-sepal* phenotype was caused by an insertion of *ATGP3* into *FASCIATA1* gene. *ATGP3* is transcriptionally activated and it retrotransposed in self-pollinated *ddm1* mutant, while it is inactive in wild-type. This is the first identification of mobile endogenous LTR retrotransposon in *A. thaliana*.

In plants, DNA methylation is observed in cytosines in all three contexts, CG, CHG, and CHH (H means A, C or T). Methylation at CG sites and non-CG (CHG and CHH) sites depends on MET1 (METHYLTRANSFERASE 1) and CMT3 (CHROMOMETHYLASE 3), respectively. *DDM1* (*Decrease in DNA Methylation 1*), which encodes a SWI/SNF2 chromatin remodeling factor contribute to the maintenance of both CG and non-CG methylation. To investigate epigenetic control of *ATGP3* by DNA methylation, I examined retrotransposition of *ATGP3* in *met1*, *cmt3*, *met1cmt3* mutants. *ATGP3* was also mobilized in the double mutant of *met1* and *cmt3*, but not in *met1* or *cmt3* single mutant, suggesting that *ATGP3* is repressed by both CG and non-CG methylation.

To examine whether activated *ATGP3* in *ddm1* mutant is re-silenced in *DDM1* background, I backcrossed *ddm1* mutant with wild-type. *ATGP3* was transcriptionally active in twice-backcrossed plants, suggesting *DDM1* is not sufficient to silence activated *ATGP3* at least in two plant generations.

I also investigated new insertion sites of activated *ATGP3* in *ddm1* mutant. As a result, *ATGP3* integrated various positions of chromosomes, and it did not show biased integration in the genome, suggesting that *ATGP3* does not have integration

specificity.

Identification of *ATGP3* triggered the identification of other mobile retrotransposon in *A. thaliana*, and led us to investigate dynamics of retrotransposon.

< Part2 >

The distribution of retrotransposon in the genome is not uniform in the genus *Arabidopsis*. Most of the retrotransposons are located in pericentromeric region. Such biased distribution is also observed in genomes of other eukaryotic organisms, such as fruit fly or puffer fish. However, it is not clear how such biased distribution have formed. There are two hypotheses for the biased distribution. One is that retrotransposon insertions in genic region have been eliminated by natural selection and they have remained in gene-poor heterochromatic region. The other is that retrotransposons preferentially integrate into pericentromeric region. However, mobile retrotransposon with targeted integration into such region has not been identified in plants so far.

In Part 2, I investigated the second hypothesis using another retrotransposon family, *COPIA93*. *COPIA93* family is one of the retrotransposon families mobilized in *ddm1* mutant of *A. thaliana*. The same family retrotransposons are abundant in *A. lyrata* and their sequences are very similar to each other, suggesting their recent amplification in the *A. lyrata* genome. Interestingly, most of the copies of *COPIA93* in *A. lyrata* are located in centromeric repeats, implying that they specifically integrate into centromeric repeats. In order to examine insertion specificity of their *de novo* integrations, I cloned and introduced one of the *COPIA93* family retrotransposon in *A. lyrata*, which we named *Tall* (*Transposon of A. lyrata 1*), into *A. thaliana*. Introduced *Tall* was transcribed and retrotransposed in *A. thaliana*. Surprisingly, *Tall* exclusively integrated into centromeric repeats of the *A. thaliana* genome, suggesting that *Tall* has integration specificity into centromeric repeats.

In contrast to *A. lyrata*, *COPIA93* copies in *A. thaliana* (*ATCOPIA93*) do not show centromere-specific localization, although their sequences are very similar (> 90% similarity) to *Tall*. I also introduced *ATCOPIA93* into *A. thaliana*. *ATCOPIA93* integrated into various positions of chromosomal arm region, suggesting that *ATCOPIA93* does not have targeting specificity into centromeric region. Thus, even though *ATCOPIA93* and *Tall* are highly related, their targeting specificities differ considerably. *Tall* provides us useful experimental system to investigate evolutionary dynamics of retrotransposon.

## 博士論文の審査結果の要旨

塚原さんは、レトロトランスポゾンがゲノム進化に果たす役割を知るため、2つの目標を設定して、ゲノム構造既知の *Arabidopsis* を用いて研究を進めた。はじめに、動く活性を持つレトロトランスポゾンを単離・同定する事、次にレトロトランスポゾンがセントロメア周辺部のヘテロクロマチン領域に偏在するメカニズムとその意義を調べることに目的を置いた。

第一の目的である、現在でも転移する活性を持つレトロトランスポゾンの同定は、*ddm1* (DNA 低メチル化) 変異体から派生した萼片に異常を持つ変異体 *wavy-sepal* の原因遺伝子を単離する事により達成された。マップベースクローニングにより、*wavy-sepal* 変異は、内在性の動く LTR レトロトランスポゾンである *ATGP3* が *FASCIATA1* 遺伝子に挿入され、その遺伝子機能が破壊されることにより引き起こされる事が明らかになった。このことから、*ATGP3* は、少なくともゲノムの低メチル化状態のもとでは、転移活性を示す事が *A. thaliana* の レトロトランスポゾン での初めての例として証明された (Nature 461. 2009)。

植物における DNA メチル化は CG サイトが MET1 に、non-CG サイト (CHG, CHH) が CMT3 によって修飾される。DDM1 は、これら両者のメチル化の維持に働くことが分かっている。*ATGP3* の転移活性を *met1*, *cmt3* および double mutant で調べたところ、転移は double mutant でのみ起こり、単一変異体ではいずれでも転移しなかった。よって、通常ゲノム中の *ATGP3* は、CG と non-CG の両部位のメチル化により不活性化されている事がわかった。

第二の目的であるゲノム中のレトロトランスポゾンのセントロメア周辺部のヘテロクロマチン領域への偏在についての実験には、*A. thaliana* の *ddm1* mutant 中で動く事の分かったもうひとつの レトロトランスポゾン である *COPIA93* family を用いた。これは、これらの family のコピーが、*A. thaliana* の近縁種である *A. lyrata* のセントロメアリピートに偏在していることが明らかになっていたためである。*A. lyrata* の *COPIA93* family から *Tall* と名付けた 1 コピーをクローニングし、*A. thaliana* に導入したところ、ほとんどの *Tall* がセントロメアリピートに局在して挿入される事が明らかになった (Genes & Dev. 26. 2012)。しかしながら、*A. thaliana* からクローン化したコピーは、同じ *COPIA93* family のレトロトランスポゾンであるにも関わらず (>90% similarity)、セントロメアへの特異的な挿入は起こらず、主に染色体腕部上のいろいろな場所へ挿入された。類似のコピーであっても転移するゲノム上の場所が異なる事から、塚原さんが開発した実験系は、転移先を決める要因がレトロトランスポゾンの配列上にあるのかゲノムの他の因子なのかを知るために有用なシステムとなることが期待される。

以上の塚原さんの博士研究は、いずれも質の高い新規の発見で、学位論文としては申し分のない内容である。これらの研究において塚原さんの貢献と独自に考えた部分は大きく、審査員一同、学位論文として高いレベルに到達していると認め、学位に値することを同意

した。