

氏 名	加藤 政臣
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 868 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 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	DNA Methylation and Epigenetic Behavior of Transposons in Arabidopsis
論文審査員	主査 教授 廣瀬 進 教授 佐々木 裕之 教授 広海 健 教授 倉田 のり グループ長 廣近 洋彦（農業生物資源 研究所）

論文内容の要旨

DNA cytosine methylation found in several eukaryotic genomes has been implicated in ensuring proper gene expression and stabilizing genome structure through the silencing transposon activity. In order to examine these possibilities, *Arabidopsis* provides a genetically tractable system because viable mutants affecting genomic DNA methylation are available. MET1 (Methyltransferase 1) is required for maintenance of DNA methylation at CG site. *Arabidopsis* additionally methylates cytosines at non-CG site, which depends on CMT3 (Chromomethylase 3). The third gene necessary for DNA methylation is *DDM1* (*decrease in DNA methylation*), which encodes a chromatin remodeling factor. The mutation in *DDM1* gene reduces DNA methylation at both CG and non-CG sites, and causes several morphological abnormalities.

Arabidopsis endogenous transposon *CACTA1* was originally isolated as an inserted gene from a mutant allele induced by *ddm1* mutation. This transposon is silent and does not transpose in wild type background but it is mobilized in *ddm1*-induced DNA hypomethylation background. Although this observation is consistent with the interpretation that DNA methylation is important for silencing transposons, it remains unclear whether the loss of DNA methylation is sufficient for mobilization of transposons, because the primary function of DDM1 is likely to be chromatin remodeling.

In this study I examined the behavior of transposon *CACTA1* in mutants defective in DNA methyltransferases, MET1 and CMT3. The *met1-cmt3* double mutation induced high frequency transposition of *CACTA1* element. However, the single mutation, either *met1* or *cmt3*, was not sufficient for mobilization of *CACTA1*. These observations suggest that both CG and non-CG methylation redundantly function as genome defense against transposon movement. Chromomethylase-mediated non-CG methylation has only been reported in plant kingdom. It might have evolved as an additional epigenetic mark for silencing transposons.

Epigenetic alteration of gene expression not based on a change in DNA sequence has been reported in plants. Notably, these epigenetic mutations are often stably inherited over generations. However, the biological significance of epigenetic inheritance remains understood. I propose here that the maintenance of silent state over generations can function as genome defense against deleterious effect of transposon movement.

Transposon *CACTA1* activated by *ddm1* mutation remained mobile in wild type background. In addition, the *CACTA1* hypomethylated by *ddm1* mutation remained hypomethylated in the presence of wild-type-derived functional *DDM1* copy. This is in contrast to the wild type plants, in which the *CACTA1* is heavily methylated and kept silent. These results suggest that de novo silencing is not efficient for immobilization, at least of this class of transposon. Silencing of transposons depends on the maintenance of silent state over generations with the stable inheritance of DNA methylation.

This system enables us to identify the integration specificity of transposon in wild type background. Transposons and their derivatives are not randomly distributed in the genome. They tend to be localized near centromeric heterochromatin in several eukaryotes including plants. Although it remains unknown how the transposons accumulate in such region, one possible explanation is that the transposon preferentially integrates into heterochromatin. In order to test this possibility, I examined the integration sites of transposon *CACTA1* induced in wild type *DDM1* background. The *CACTA1* mobilized in wild type did not show preferential integration into wild-type-derived heterochromatin or transposon-rich regions, despite the accumulation of *CACTA*-like sequences near centromeric and transposon-rich regions in wild type *Arabidopsis* strains. These results suggest that the centromere-biased distribution of *CACTA* elements is not directly caused by the targeted integration into heterochromatin.

論文の審査結果の要旨

脊椎動物や高等植物のゲノムではDNA シトシンのメチル化が観察される。DNA メチル化はトランスポゾンの不活性化を通じてゲノムの安定性に寄与していると言われていたが直接的な証拠はほとんどない。

加藤君はDNA 低メチル化がトランスポゾン転移活性化の十分条件かどうかを調べるため、シロイヌナズナのDNA メチル化酵素遺伝子の変異体で*CACTA1*の挙動を調べた。*MET1* は哺乳類*Dnmt1* のオーソログでCG 配列のシトシンメチル化の維持に必要である。更にシロイヌナズナでは*CMT3* (Chromo- methylase3) による非CG 配列のシトシンメチル化が観察される。*MET1* 及び*CMT3*遺伝子の二重変異体ではトランスポゾン*CACTA1* は高頻度で転移を起こした。しかし、単独の変異体では転移は観察されなかった。この結果から、CG 配列のメチル化と非CG 配列のメチル化の両方がトランスポゾンの転移抑制に働くが、両者が消失してはじめて*CACTA1*の転移を引き起こすのに充分となることがわかった。

次に一度活性化されたトランスポゾンが野生型条件下でどのような挙動をとるか調べた。*ddm1*変異により活性化されたトランスポゾン*CACTA1*は、野生型由来の正常な*DDM1*遺伝子の存在下においてもすぐには再不活性化されず、転移活性を維持し続けた。同時に、*ddm1*変異により引き起こされた*CACTA1*におけるDNA 低メチル化の状態が維持されていた。トランスポゾンの転移抑制にはDNA メチル化の状態を維持して不活性状態を次世代に伝えることが重要と考えられる。

多くの生物種のゲノムでトランスポゾンやその派生因子は染色体上にランダムには存在しておらず、しばしばセントロメアヘテロクロマチンに偏った分布を示す。その原因の一つとして、トランスポゾンがヘテロクロマチン特異的に転移を起こした可能性が考えられる。この可能性を検討するため、*DDM1* 野生型で転移誘導したトランスポゾン*CACTA1*の挿入部位を調べたところ、*CACTA1*のヘテロクロマチンへの特異的な挿入は観察されな

かった。トランスポゾンCACTA1のセントロメア付近への蓄積は、ヘテロクロマチンをターゲットにした部位特異的な挿入が直接的な原因ではないと考えられる。

この論文は、DNAメチル化がCACTAタイプのトランスポゾンの転移、挿入活性を制御していることを明らかにし、さらにトランスポゾンがセントロメアヘテロクロマチンに遍在するメカニズムの解析を試みたもので、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすことを審査員全員が認めた。