

氏 名 佐々木 卓

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1348 号

学位授与の日付 平成 22 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 Genetic dissection of DNA hypermethylation  
induced by *ddm1* mutation.

論文審査委員 主 査 准教授 野々村 賢一  
教授 小林 武彦  
教授 広海 健  
助教 西嶋 仁  
特任教授 飯田 滋 (静岡県立大学)

## 論文内容の要旨

DNA methylation is an epigenetic mark important for heterochromatin silencing and regulation of gene expression. In plants, DNA methylation is observed in cytosines in all of contexts including CG, CHG, and CHH. DDM1 (decrease in DNA methylation 1), a SWI2/SNF2 chromatin remodeling factor is required for maintenance of DNA methylation in all contexts of cytosines. In the *ddm1* mutant, genome-wide reduction of DNA methylation was observed, and de-repression was found in silent repetitive elements. Although *ddm1* mutant initially grows normally, various developmental abnormalities were induced during repeated self-pollinations. Most of the abnormalities were induced by de-repression of silent element caused by DNA hypomethylation in *ddm1*. However, one abnormal phenotype named *bonsai* (*bns*) was caused by DNA hyper-methylation and silencing of the responsible gene, *BNS*, which encodes a protein similar to Anaphase Promoting Complex 13 (APC13). Thus, *BNS* locus is hyper-methylated locally in the background of global hypomethylation. To understand this enigmatic phenomenon, here I examined the factors involved in the *BNS* hyper-methylation, and I also analyzed genome-wide effect of *ddm1*-induced DNA hyper-methylation.

First, to understand the factors required for this phenomenon, double mutants between *ddm1* and various factors involved in the epigenetic modifications were generated, and after the repetitive self-pollination, DNA methylation states in *BNS* locus were detected. In *ddm1* and *bns* plants, 24-nt small RNA, which is considered as a trigger of *de novo* DNA methylation in plant (RNA-directed DNA methylation: RdDM), was accumulated. This observation implied that *BNS* gene is *de novo* methylated by RdDM pathway. However, previously-characterized components of RdDM pathway were dispensable for *ddm1*-induced *BNS* methylation. On the other hand,

mutation in plant-specific DNA methyltransferase, CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) suppressed the induction of DNA hyper-methylation. CMT3 was considered as a DNA methyltransferase for maintenance of non-CG methylation. The mutation in KRYPTONITE (KYP), a histone H3K9 methyltransferase which directs non-CG methylation by CMT3, also suppressed the induction of *BNS* methylation. These results indicate that *ddm1*-induced *BNS* methylation was mediated by KYP and CMT3, rather than RdDM pathway.

Next, to understand the genome-wide effect of *ddm1*-induced DNA hyper-methylation, I detected global states of DNA methylation in *ddm1* mutant by MeDIP-chip analysis. Consistent with previous reports, drastic reduction of DNA methylation in transposable elements was observed as a rapid effect in *ddm1* mutant. During self-pollinations, DNA methylation states changed in many loci. Some loci kept decreasing DNA methylation during self-pollinations. I also found numerous loci which behave in *BNS*-like manner. Induction of DNA methylation was observed in both of genes and transposable elements. The slow DNA hyper-methylation was induced into all the three contexts, but it was generally most frequent at CHG sites. Compared to genic region, induction of DNA hyper-methylation in transposable elements tend to be moderate. In most loci, as was the case for the *BNS* locus, induction of DNA hyper-methylation was suppressed in the *ddm1 kyp* double mutant.

In this study, I showed KYP and CMT3 mediated induction of DNA methylation in *ddm1* mutant. Interestingly, although KYP and CMT3 were considered as components required for the maintenance of DNA methylation in non-CG contexts, this study revealed that they are also involved in induction of DNA methylation including CG context in *ddm1* background. KYP has a SRA domain, which can bind to methylated DNA, and CMT3 has a chromo-domain, which can bind to methylated histone, so they could be recruited to epigenetic modifications catalyzed by the other

factor. This self-reinforcement mechanism may be involved in the spreading of DNA methylation in *ddm1* mutant.

Recent studies revealed the epigenetic backup mechanism, which is the induction of DNA methylation in globally hypomethylated mutants. In *ddm1* mutant, many hyper-methylated loci were observed, implying that a similar mechanism might be activated. Although target specificity is still unclear, DNA methylation and/or H3K9 methylation might be a target of DNA hyper-methylation, because induction of DNA methylation depends on KYP and CMT3. Previous study reported that although H3K9 methylation in heterochromatic region was reduced in the *ddm1* mutant, overall level of H3K9 methylation was not changed. Thus the *ddm1* mutation might have induced ectopic H3K9 methylation and DNA methylation in various genic loci, in a manner dependent on KYP and CMT3.

## 博士論文の審査結果の要旨

シロイヌナズナの *ddm1* 突然変異体は、ゲノム全域にわたって DNA の低メチル化を引き起こすことが知られる。しかし一部の領域では逆に、DNA の高メチル化による遺伝子発現の抑制を引き起こす。佐々木卓さんは、*ddm1* 変異によって DNA 高メチル化および発現抑制を受ける遺伝子群に着目し、高メチル化のメカニズム解明とその生物学的意味について考察した。DNA メチル化は脊椎動物と高等植物で共通してみられることから、本論文が掲げるテーマは、両者に共通するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解明する上で重要である。

佐々木さんはまず、*ddm1* 変異により *de novo* 型の DNA 高メチル化を受けることが既に報告されている *BONSAI* (*BNS*) 遺伝子領域を指標として、高メチル化に寄与する遺伝子を調べた。*ddm1* 変異により誘発される *bns* エピ変異体では、RNA に依存する *de novo* 型 DNA メチル化 (RdDM) との関連が示唆される *BNS* 領域由来の 24-nt small RNA が異常に蓄積する。そこで RdDM や RNA 干渉、*de novo* 型あるいは維持型 DNA メチル化に関わる遺伝子について、それぞれの突然変異と *ddm1* 変異を組み合わせた二重変異体を作成したところ、RdDM や RNA 干渉に関連する遺伝子の影響は見られず、DNA メチル化を認識するヒストン H3K9 メチル化酵素である KRYPTONITE (KYP) とメチル化 H3K9 を認識する DNA メチル化酵素である CHROMOMETHYLASE3 (CMT3) の 2 つが、*ddm1* 変異下での *BNS* の *de novo* 型 DNA 高メチル化およびその維持に寄与することを見出した。従来は非 CG 配列の維持型 DNA メチル化にのみ機能が知られる KYP-CMT3 経路が、*de novo* 型にも機能し、かつ CG 配列にも機能し得ることを示した点は新規性が高く、十分評価できる。

次に、野生型および *ddm1* ホモ接合体の異なる自殖世代を用いてゲノムワイドな DNA メチル化の動態を解析し、*BNS* 領域と同様、*ddm1* 変異によって DNA が高メチル化される領域が多数存在することを明らかにした。これまでの知見と同様、*ddm1* 変異で大多数を占める DNA の低メチル化が、主にトランスポゾン配列で自殖第 2 世代までにみられたが、*ddm1* による高メチル化は、低メチル化よりも多世代の自殖を経てゆっくりと確立されることを示した。また *BNS* 領域以外の高メチル化も、多くは *BNS* と同様に KYP-CMT3 経路に依存することなどを明らかにした。

*ddm1* 変異環境下における *BNS* の高メチル化は、隣接する LINE 配列に依存することが知られる。佐々木さんは、同 LINE 配列を起点として、KYP-CMT3 経路による *de novo* 型 DNA メチル化が *BNS* へと伝搬し、その後も同経路により高メチル化状態が維持されるという新規のモデルを提唱した。佐々木さんは更にもう一段考えを進め、メチル化 H3K9 再分配仮説、すなわち *ddm1* 変異下では DNA 低メチル化異常を補填するためゲノム上でメチル化 H3K9 の再分配が起こるとする既存の仮説と組み合わせることで、以下の仮説を提唱した; すなわち、*ddm1* 変異下で *BNS* に隣接する LINE 配列が低メチル化異常を受け、それを補填するため H3K9 メチル化再分配機構が働き、KYP-CMT3 経路による LINE 配列の *de novo* 型メチル化とその自己強化サイクルが誘導されるという仮説である。この仮説において *BNS* への高メチル化の伝搬と維持は、*ddm1* 変異により低メチル化異常を受けた隣接 LINE 配列を再抑制し、ゲノム恒常性を維持しようとする働きの後に起こる二次的な結果として説明される。*BNS* 以外の高メチル化領域の解析も含めて、特に後半の仮説の

証明には更なる検証が必要であるが、*ddm1* 変異下で遺伝子発現抑制型のエピ変異が出現する生物学的意味として、非常に独創的かつ興味深い考察といえる。

英語表記による博士論文の提出、英語による公開発表会、および外部委員1名を含む5名の審査員との口頭試問により審査を行った。

博士論文では、博士後期課程の3年間で得られた非常に多くの結果が、わかりやすく簡潔にまとめられていた。また結果に対して非常に適切な考察がなされており、今後とも研究を続けていく上で十分な知識と科学的思考能力を身につけていることが見て取れた。口頭発表では、多くのデータがよくまとめられ、聴衆にわかりやすい説明を心がけ、質問にも適切に答えていた。以上のことから審査員全員が一致して、佐々木卓さんが本大学院の学位を授与されるに十分な能力を有していると判断した。