

論文内容の要旨

申請者氏名 和田 七夕子

In higher organisms, cytosine methylation is essential for transcriptional silencing by condensing chromatin structure. Methylated cytosines are frequently observed in retroelements and in CpG islands within a promoter region of particular genes. In plants, cytosine methylation is also important for development and for repression of transposable elements. Genetic analyses suggested that pattern of methylation is created by 'de novo' DNA methyltransferases and is maintained by 'maintenance' DNA methyltransferases. However, their enzymatic activities and physiological functions remain to be determined.

The first chapter of this study discusses physiological meaning of maintenance DNA methylation in tobacco plants. The global methylation pattern is maintained through generations by the type I methyltransferase (MET1), which is homologous to mammalian maintenance methyltransferase (Dnmt1). In order to identify genes that are regulated by DNA methylation, the differential display was performed using transgenic tobacco plants expressing an anti-sense construct for tobacco MET1, *NtMET1*. Among 31 identified genes, transcripts of a pathogen responding gene (*NtAlix1*) were found to be accumulated. The methylation status of the genomic locus was obviously changed at CCG sites upon tobacco mosaic virus infection in inoculated leaves of wild-type plants. The results suggest that the level of DNA methylation at CCG sites changes in response to external stresses, and that this is closely related to activation of stress responsive genes.

In the chapter II, I characterized a domains-rearranged methyltransferase (DRM), whose enzymatic activity has not been determined so far, although sequence analysis suggested it to be responsible for *de novo* methylation. Using GFP fusion technique, I found that the protein localized exclusively in the nucleus. Upon expression in insect cell, Sf9, it exhibited methylation activity

towards unmethylated DNA samples. Methylation mapping directly demonstrated preferential methylation toward cytosines in CpNpN and CpNpG sequences (N is A, T, or C), but apparently excluded CpG. Transcripts of *NtDRM1* ubiquitously accumulated in all tissues and during the cell cycle in tobacco cultured BY2 cells. These results indicated that NtDRM1 is a *de novo* non-CpG methyltransferase, which is the first clear example of enzyme involved in asymmetric cytosine methylation.

In the chapter III, I examined the molecular function of *in vivo* methylation by NtDRM1. To this end, I isolated an NtDRM1 complex from BY-2 cells, and screened for NtDRM1 interacting factors.

Results of the current study will provide new insights into physiological function of maintenance and *de novo* DNA methylation in higher plants.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 和田七夕子

シトシンの5位がメチル基された5メチルシトシンは、真核生物のDNA中に微量塩基として存在する。DNAのメチル化といわれる。シトシンのメチル化はS-アデノシルメチオニン(AdoMet)をメチル基供与体として、DNAメチル化酵素により触媒される。メチル化された遺伝子座では、しばしば遺伝子発現の不活化が見られる。したがってその機構の解明は遺伝子発現調節を理解するうえで重要である。

植物のDNAメチル化酵素は、アミノ酸の一次構造からDNA methyltransferase 1(MET1)、Chromomethylase(CMT)、Domains rearranged methyltransferase(DRM)の3種に分類される。MET1は動物のmaintenance型メチル化酵素と同じファミリーに属し、maintenance型活性をもつことが知られる。いっぽう植物に特有のCMTとDRMは、*de novo*型と推測されるが酵素活性の報告はない。

本研究室で作成された、タバコのDNAメチル化酵素*NtMET1*のアンチセンスを導入した株では、ゲノムDNAのメチル化レベルが低下した。そこで転写が増加した遺伝子をディファレンシャルディスプレイによりスクリーニングしたところ多数のクローンが得られた。そのうちのひとつに動物のアポトーシス関連タンパク質ALG-2に結合するタンパク質Alixに高い相同性を示すクローンがあり、*NtAlix1*と名付けた。細胞死との関連からTMV感染下での*NtAlix1*の挙動を調べた結果、*NtAlix1*遺伝子座の脱メチル化および転写産物の蓄積が見られた。これらの結果は遺伝子種によっては外部ストレスによってメチル化レベルが変動し、転写が活性化されることを示唆した。

次に、メチル化パターンを決定すると考えられるDRM酵素遺伝子をタバコより単離し(*NtDRM1*)、機能解析をおこなった。バキュロウイルス発現系によって得た酵素タンパク質は非CG配列に高い特異性を示す*de novo*型活性を示した。さらにクロマチン画分に対し、抗*NtDRM1*抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、*NtDRM1*と相互作用する因子の存在が示唆された。植物にはCG以外のシトシンも高度にメチル化されているが、その機構や機能はながく不明であった。本研究はDNAメチル化機構のうち、MET1とDRMが関わる経路に新たな知見をもたらした。

以上のように、本論文はエピジェネティックな遺伝子発現調節機構、およびその生理意義の解明に貢献するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。