

論文内容の要旨

申請者氏名 金 賢仲

本研究ではタバコの DNA メチルトランスフェラーゼ (NtMET1) の特徴づけをおこなった。第一に、NtMET1 を過剰発現させたタバコを作成し、形質転換体のメチル化の変化による遺伝子発現と形質の変化を調べた。第二に、酵素化学的解析や細胞内局在の観察から NtMET1 の作用機構とその生理的意義を明らかにすることを目指した。

NtMET1 の全長鎖 cDNA (4.5 kb) を単離して過剰発現タバコを数十系統作成した。それらのゲノム DNA のメチルシトシン含量を測定したところ、予想に反して全ての系統で低メチル化が検出された。そこで、通常は発現しない病害応答遺伝子の発現変化を調べたところ、全ての系統で恒常的に発現していた。病原細菌に対する抵抗性も増加していた。根の伸長や発育も組換え体では異常をきたし、分裂細胞数も半減していた。メチルトランスフェラーゼの強制発現が内生メチル化を攪乱したと思われ、メチル化が精妙に制御される反応であることが窺えた。これらの結果からメチル化は抵抗性遺伝子だけでなく、分化や形態形成関連遺伝子にも影響を及ぼすことが明らかになった。次に、NtMET1 の生化学的解析を行った。精製蛋白質は *in vitro* で酵素活性を示さなかった。それは N 末端と C 末端の分子内相互作用による不活化によるものと推定された。NtMET1-GFP 融合タンパク質は間期には核に局在したが、細胞分裂の中期には細胞質に移動し、後期には再び染色体に戻ることが明らかとなった。スピンドル形成に関わる RAN GTPase との相互作用が認められた。これらの結果から、メチル化活性は分子内あるいは他の分子との相互作用により制御されていること、メチル化機能以外にも染色体の分離や転移に重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 金 賢仲

多くの真核生物では DNA を構成するシトシンがメチル化されている。シトシンのメチル化は遺伝子の発現状態を安定に保つ主要な機能として、遺伝子の発現だけでなく、クロマチンの形成、リモデリングを介してゲノムの機能全体に密接に関与している。DNA のメチル化は DNA メチルトランスフェラーゼによって触媒され、親のメチル化パターンを維持する活性と、新たにメチル化を加える新規メチル化活性の 2 種類がある。植物では維持型酵素として MET1 (DNA methyltransferase 1) が知られる。

本研究ではタバコの DNA メチルトランスフェラーゼ (NtMET1) を材料として、その特徴づけをおこなった。過剰メチル化の影響を知るために NtMET1 チセンス鎖を導入したタバコ植物体は予想に反して、全て低メチル化になった。強制発現が内生メチル化反応を攪乱した結果と思われた。次に、生化学的解析を行った。昆虫細胞で発現させた精製したタンパク質は新規、維持の活性を示さなかった。これは分子内相互作用によって活性部位がマスクされた結果と推定された。GFP 融合タンパク質を用いて細胞内局在を調べた。NtMET1 は細胞分裂間期には核に局在するが、細胞分裂の中期には細胞質に移動し、後期には再び染色体に戻ることが示された。同様の分布様式を示す RAN との相互作用が認められた。RAN はスピンドル形成に関わることから、NtMET1 も細胞分裂に関与することが示唆された。これらの結果から、メチル化活性は分子内あるいは他の分子との相互作用により制御されていること、メチル化機能以外にも染色体の分離や転移に重要な役割を担っていること、の二点が明らかになった。

以上のように、本論文は植物 DNA メチルトランスフェラーゼの分子機構の一端を明らかにしたもので、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。