

【審査結果の要旨】

本研究は、生物のゲノムが外的・内的要因によってさまざまな損傷を絶えず受けている中で、特に突然変異や染色体の再編成を引き起こす可能性がある重篤な損傷である DNA の二本鎖切断 (DSB) という現象に着目した研究である。遺伝情報を守るためには、これらの損傷をすみやかに修復する必要があり、真核生物は効率的な修復機構を備えている。酵母や動物細胞でのこれまでの DSB 研究により、損傷修復時に生じるクロマチンリモデリングや損傷誘導性 RNA (diRNA) の転写様式が徐々に解明されてきた。しかし、その詳細なメカニズムや、生物系統間における共通性については不明の点が多かった。本研究では、植物ゲノムを対象に DSB 誘導性クロマチンリモデリングと diRNA 転写についてのゲノムワイドな解析を実施し、DNA 修復時のこれらの特徴や機能について詳細な解析を行い、DSB が生じた多くのゲノム領域について、修飾ヒストンやヒストンバリエーションおよび diRNA の解析を実施し、DSB に起因するクロマチンリモデリングや新生 RNA の転写が特定の条件下で起こる稀な現象ではなく、ゲノム全体で同じように生じる可能性があることを明らかにした。

第 1 章では、本研究の背景、目的、意義を述べている。DSB 修復機構と多様な分子との関係性についての現在までの理解を概説している。さまざまな生物種の DSB 修復研究を網羅しつつ、DSB 修復の特性やその分子メカニズムについて説明している。次に、DSB 依存的なクロマチンリモデリングに焦点を当て、真核生物におけるクロマチン分布の変化が DSB 修復プロセスにどのような影響を与えているのかについて、現在までの知見を述べている。さらに、近年明らかとなってきた、DNA 修復に作用する RNA 分子の新たな役割についての最新情報も要約し、最後に、これらの知見を踏まえた上で、本研究における核心となる疑問と、それらをかいつくすための研究アプローチについて提案している。

第 2 章では、制限酵素 *Sbf* I の発現誘導が可能な植物の DSB 誘導ツールとしての特徴と有用性について述べている。DSB の誘導には、DNA 損傷誘導剤、紫外線、電離放射線などがしばしば用いられてきたが、これらの手法はゲノム全域にランダムな DSB を生成するため、再現性のあるクロマチンおよび RNA の解析には適していなかった。一方、ゲノム編集で使用される ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 などの DNA 切断酵素を利用した DSB 誘導システムは、狙った箇所に DSB を誘導することができるが、特定の単一部位でしか DSB を生成できないため、包括的な解析には不向きであった。また、これまでの DSB 修復研究のほとんどが、DSB を不可逆的にしか誘導できない形質転換体を使用していたため、DSB 修復中のクロマチンおよび RNA の動態しか調べられておらず、修復完了後に DSB 部位周辺のエピジェネティックランドスケープと転写状態が元通りに復元されるのかどうかについて、実験的な検証がほとんどなされていなかった。これらの問題を解決するために、本研究では熱誘導性プロモーターを連結した制限酵素 *Sbf* I 遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナへと導入し、ヒートショック処理によって一過的な DSB をゲノム上の複数箇所に一斉に誘導できる植物体を作成している。

第3章では、第2章で作出した *Sbf* I 誘導植物を用いて、DNA 凝集度の制御に関わるヒストン H4K16ac と H2A.Z のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を実施し、シロイヌナズナ核ゲノム内に存在する 623 箇所の *Sbf* I 切断サイト周辺におけるこれらのヒストンマークの動態を調べている。その結果、360 箇所の *Sbf* I による DSB 誘導が確認され、これらの切断サイト近傍で H4K16ac と H2A.Z は修復中に一過的に集積していると述べている。さらに、多くの DSB 部位では、H4K16ac と H2A.Z が共局在していたことも明らかにしている。第3章の結論として、DSB 修復依存的なクロマチンリモデリングはゲノム全体に普遍的な事象であり、動植物間で高度に保存されていることを明らかにした。

第4章では、上述の *Sbf* I 誘導植物を使用して、シロイヌナズナ核ゲノム内の DSB 部位周辺で生じる diRNA の網羅的検出を試みている。その結果、360 箇所の DSB 部位のうちの 88 箇所で、RNA ポリメラーゼ II によって転写された diRNA が検出された。これらの大部分は転写レベルの高い遺伝子領域内で生じた DSB 部位近傍から出現しており、その転写方向は、遺伝子の向きとは関係なく双方向的であった。さらに、diRNA の転写伸長は、DSB 近傍の内在性遺伝子の境界で終結する傾向があることを見いだした。これらの結果は、植物における diRNA の性質や挙動を新たに明らかにしたものであり、さらに、これら転写がタンパク質コード遺伝子の転写と類似した性質を持っていることを明らかにした。

第5章では、DSB が生じた多くのゲノム領域について、修飾ヒストンやヒストンバリエーションおよび diRNA の解析を実施したことを通じて、DSB に起因するクロマチンリモデリングや新生 RNA の転写が特別なゲノム領域で生じる稀な現象ではなく、ゲノム全域で同様に生じる可能性があることを示した。特に、植物ゲノム全体でのクロマチンや diRNA の大規模な解析を行なったのは本研究が世界初であり、DSB 修復時のクロマチンリモデリングや diRNA の転写誘導が動植物間で高度に保存されている現象であることを明らかにしている。

本論文は、全体を通じて、植物ゲノムでの DSB 誘導性クロマチンリモデリングと diRNA 転写のゲノムワイド解析を実施し、DNA 修復時のこれらの挙動や性質についての詳細な解析を行い、DSB が生じた多くのゲノム領域について、修飾ヒストンやヒストンバリエーションおよび diRNA の状態を明らかにし、その結果、DSB に起因するクロマチンリモデリングや新生 RNA の転写がゲノム上の特定の部位や領域で生じる稀な現象ではなく、ゲノム全域で同様に生じる可能性が高いことを世界に先駆けて明らかにした。以上のことから、本論文は博士学位論文として価値あるものと判断した。

6 最終試験の結果の要旨

令和6年8月23日13時30分より、稲盛記念会館104室において、博士学位論文発表会を公開で行った。口頭発表後、質疑応答が行われた。質問は、DNA二本鎖切断(DSB)の検出に関する次世代型DNAシーケンスのデータ解析方法や、DSBが検出されたゲノム領域の生物学的特徴に関するもの、また、DSB依存的に転写されるdiRNAの検出方法や、転写機構およびRNAプロセッシング機構、機能、様々な生物におけるdiRNAの転写様式の普遍性に関するものなど、多岐

にわたるものであった。申請者は全ての質問に対し、適切に回答を行った。以上により、最終試験の結果について審査員全員一致で合格と判定した。