

研究報告書

「ヘテロクロマチン修飾除去メカニズムの解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 9 月～平成 25 年 3 月

研究者: 佐瀬 英俊

1. 研究のねらい

真核生物ゲノムではその大部分をトランスポゾンなどのリピート配列が占めているが、これらの配列はヘテロクロマチンと呼ばれる高度に凝集した構造をとって不活化されている。これまでの研究により、このヘテロクロマチン形成には DNA シトシン塩基のメチル化やヒストン H3Lys9 メチル化(H3K9me)そして低分子 RNA の生成などの抑制的なエピジェネティック修飾がその制御に関与していることが明らかになっている。一方、これら抑制的なエピジェネティック修飾は一般的に活発に転写される遺伝子領域からは排除されている。しかしながら、細胞がどのような機構によってリピート配列と遺伝子配列を識別し領域特異的なエピジェネティック修飾を導入しているのかについてはいまだ不明な点が多い。

我々は遺伝子発現に対して抑制的に働く DNA メチル化やヒストン H3K9 メチル化を遺伝子領域から積極的に排除するメカニズムに注目して研究を行っている。我々はこれまでにモデル植物シロイヌナズナを用いて遺伝子領域に異所的に DNA メチル化と H3K9 メチル化の蓄積を引き起こす変異体を単離し、その原因遺伝子の1つとして H3K9 脱メチル化酵素遺伝子 Increase in BONSAI Methylation 1 (IBM1)を同定している。IBM1 は jmjC ドメインを持つタンパク質であり、哺乳類の KDM3/JHDM2 クラスの H3K9 脱メチル化酵素と高い相同性を持つ。ibm1 変異体では BONSAI と呼ばれる遺伝子領域に H3K9me とそれに依存した DNA メチル化が蓄積するのに加えて、DNA 脱メチル化酵素の変異体などよりむしろ多面的で重篤な発生異常の表現型を示すことが明らかになった。

本研究課題では上述のように異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体群の Forward genetics による単離とその詳細な解析を通し、このヘテロクロマチン修飾除去機構の実態を明らかにすることを目的としている。これら変異体の解析結果は動植物に共通のヘテロクロマチン修飾除去メカニズムを理解する上で基盤となる知見を与えるものと考え。異所的なヘテロクロマチン修飾は動植物においてエピジェネティック疾患や発生異常の要因となるが、本研究の成果はこれらエピジェネティック修飾異常の形成プロセスやその制御についても重要な示唆を与えるものであると考える。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題ではモデル植物シロイヌナズナにおいて異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体群の Forward genetics による単離とその詳細な解析を通し、このヘテロクロマチン修飾除去機構の実態を明らかにすることを目的としている。さきがけ研究期間、具体的には以下に挙げた3つのテーマに取り組んだ。

1) Forward Genetics により単離されてきた新規高 DNA メチル化変異体群の原因遺伝子の同定と解析

2) 1)から単離されてきた新規因子 IBM2 の詳細な解析

3) jmjC ドメインタンパク質 IBM1 と相互作用する因子の生化学的・遺伝学的な手法による同定と解析

結果の詳細は以下の通りである。

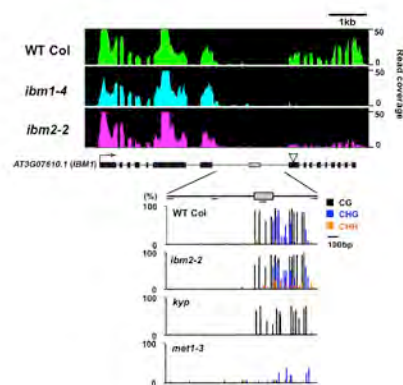
(2) 詳細

1) 新規高 DNA メチル化変異体の選抜と原因遺伝子の同定

シロイヌナズナゲノム中に異所的に DNA の高メチル化を引き起こす変異体のスクリーニング系から複数の高 DNA メチル化変異体を得られ、ibm1 に加えて ibm2, ibm3, ibm4 と名付けて解析を行った。これら変異体を順次遺伝的背景の異なる野生系統に掛け合わせ、F2 集団において SNP 多型を用いて連鎖解析を行い、ibm2, ibm3 について変異が起きている原因遺伝子座を同定した。ibm3 は既に報告がある既知の遺伝子であったが、これまで遺伝子のエピジェネティック制御への関与は示唆されていない。この IBM3 については後述する IBM2 と同じ経路で機能していることを示唆するデータが得られている。Ibm4 と呼ぶ変異体については、ibm2, ibm3 とは異なる経路で高メチル化を引き起こしているという結果を得ている。

2) 1)から単離されてきた新規因子 IBM2 の詳細な解析

IBM2 と呼ぶ因子について、次世代シーケンサーによる mRNA-seq 発現解析を行った。その結果、ibm1 と ibm2 における遺伝子発現変化には正の相関があることが明らかになった。また、ibm1 変異体と同様に ibm2 変異体でも non-CG メチル化の上昇が観察されたことから ibm2 が IBM1 と同一の経路で機能していることが示唆された。その後、ibm2 では IBM1 遺伝子の 3' 領域において発現が減少することを見だし(下図)、IBM2 が IBM1 遺伝子の発現をポジティブに制御している可能性が示唆された。IBM1 遺伝子内には高度に DNA メチル化を受けたオルガネラ由来の DNA 配列が挿入されており、この配列を削除した IBM1 トランスジーンで ibm2 の高メチル化表現型が相補されたことから、ibm2 変異体で見られた高メチル化表現型は IBM1 の発現阻害によるという事が明らかになった。また、IBM1 は H3K9 脱メチル化酵素であるため、IBM1 遺伝子内ヘテロクロマチンがゲノム中の DNA メチル化減少を感知して IBM1 の発現を減少させ、結果的にゲノムワイドに補償的なメチル化上昇が引き起こされる DNA メチル化のフィードバックループの存在が示唆された。



3) jmjC ドメインタンパク質 IBM1 と相互作用する因子の生化学的・遺伝学的な手法による同定と解析

FLAG-HA エピトープタグを融合した jmjC ドメインタンパク質 IBM1 の形質転換体を ibm1 変

異体に導入して変異を相補した形質転換体を作製し、IBM1 複合体の精製条件を検討した。しかしながら本研究期間では目的の IBM1 複合体を同定するには至らなかった。

3. 今後の展開

ヘテロクロマチン修飾が遺伝子内に存在する事で遺伝子の機能阻害を引き起こすことがこれまでの研究から知られている。今回の我々の研究結果から生物がヘテロクロマチン修飾を遺伝子領域から特異的に排除する経路を進化させてきた事が示唆された。また、今回我々が発見した IBM2 が関与する経路がヘテロクロマチンを内包する遺伝子の制御にどの程度貢献しているかを探るのが今後の課題である。

4. 自己評価

真核生物の多くは巨大なゲノムを持つが、そのほとんどが転移因子からなっており、複雑な構造ゆえにその解析と理解はいまだに困難をきわめている。本研究課題の中で我々の発見した機構は今後動植物のゲノム進化と動態を理解する上で重要な知見となったと考えている。異所的な DNA メチル化は動植物において疾患や発生異常の要因となるが、本研究の成果はこれらエピジェネティック修飾異常の形成プロセスやその制御についても重要な示唆を与えるものであると考える。

5. 研究総括の見解

動植物に共通のヘテロクロマチン修飾除去を理解することはエピジェネティクス研究の基盤として重要である。モデル植物シロイヌナズナを用いて異所的に DNA の高メチル化を引き起こす変異体を複数分離した。その中の ibm 1 は報告済みの H3K9 脱メチル化酵素遺伝子であるが、新たに ibm 2 および ibm3 の原因遺伝子を同定した。その結果 ibm 2 は ibm 1 を介して表現型をもたらすことから、ibm 1 の上位に位置し、遺伝子内のヘテロクロマチン領域をマスクする機能があることが分かった。ヘテロクロマチン修飾除去を理解する上で今までにないヘテロクロマチン領域の形成や消失のメカニズムの一端を明らかにした意義は大きい。

今回の成果は評価に値するが、ヘテロクロマチンがマスクされる分子機構を明らかにする課題が残されており、今後他の変異体の解析も含めてヘテロクロマチン修飾除去機構の実態に迫る研究を進めて欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. (Review) Saze, H. (2012). Transgenerational Inheritance of Induced Changes in the Epigenetic State of Chromatin in Plants. *Genes Genet Systems*, 87(3):145-52..
2. (Review) Saze, H., Tsugane K, Kanno T and Nishimura T. (2012). DNA Methylation in Plants: Relationship with Small RNAs and Histone Modifications, and Functions in Transposon Inactivation. *Plant Cell & Physiol.*, 53(5): 766-84.

- | |
|---|
| 3. Sasaki T, Kobayashi A, <u>Saze H</u> , Kakutani T. (2012) RNAi-independent de novo DNA methylation revealed in Arabidopsis mutants of a chromatin remodeling gene DDM1. <i>Plant J.</i> , 70(5): 750–758. |
| 4. (Review) <u>Saze, H</u> and Kakutani T. (2011) Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. <i>Curr Opin Plant Biol.</i> , 14(1):81–7. |
| 5. Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, <u>Saze H</u> , Kakutani T. (2010). Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. <i>EMBO J.</i> , 29(20):3496–506. |

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<招待講演>

1. 佐瀬英俊 “植物における遺伝子発現のエピジェネティック制御”、日本食品科学工学会第59回大会シンポジウム、藤女子大学、札幌市、2012年8月30日。

2. Saze H. (MIPI seminar series) “Epigenetic control of genes and transposable elements in Arabidopsis thaliana”. Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colonge, Germany. June 27, 2012

3. (Symposium co-organizer/speaker) Tamada Y and Saze H. Symposium: Response to environmental/developmental signals and regulation of epigenetic state of chromatin. Regulation of Intragenic Heterochromatin in Arabidopsis thaliana. The 53rd Annual Meeting of 4. The Japanese Society of Plant Physiologists, Kyoto Sangyo University, Kyoto, Japan. March 16, 2012.

5. Saze H. Symposium: Plant Stress Research Symposium. Epigenetic regulation of Heterochromatin and Stress Response. Kurashiki-ai-theater, Okayama, Japan. March 8, 2012.

6. 佐瀬英俊. 「シロイヌナズナを用いた新たな DNA メチル化制御機構の研究」日本遺伝学会第83回大会 日本遺伝学会奨励賞受賞講演、京都大学、2011年9月21日。

<受賞>

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

平成23年度 日本遺伝学会奨励賞

