

# 研究報告書

## 「環境変動にともなう転移因子と宿主のゲノム応答」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 伊藤 秀臣

### 1. 研究のねらい

“動く遺伝子”トランスポゾンとは様々な生物に広く存在しゲノムの主たる構成要素となっている。近年トランスポゾンがゲノムの安定化に重要な働きをしていること、近傍の遺伝子の発現を調節していることなどが報告されるにつれその生物学的な重要性が明らかになってきた。一方宿主はトランスポゾンの転移によるゲノム破壊などの悪影響を防ぐための防御機構を備えている。一つはトランスポゾンの転写を抑制することで不活性化させ転移を防ぐ機構。もう一つは転移を抑制することで世代を超えたゲノム変化を抑制する機構である。我々は先行研究で高温ストレス条件下で活性化し、RNA 干渉を担う遺伝子の変異体で、次世代に転移が伝わるトランスポゾンを同定した。このトランスポゾンは“高温”と“RNA 干渉の欠落”という条件下で、宿主の二重(転写と転移)の防御機構を免れることで、次世代に転移が伝わり自らのコピー数を増殖することに成功した。さらに、このトランスポゾンの転移は配偶子形成時期より前の体細胞組織で起ったことが示唆された。トランスポゾンの世代を超えた転移は、宿主の遺伝子情報をコントロールすることで環境に適応した個体を生じさせる原動力となり得ると考えられる。本研究の一つ目のねらいは、この活性型トランスポゾンを用いることで、環境ストレスにより活性化したトランスポゾンと宿主ゲノムにおけるエピジェネティックなゲノム変化を明らかにすることである。現在までに、活性化したトランスポゾンをもつ個体の子孫でストレス耐性を得た個体を複数得ており、この個体にどのようなエピジェネティックな変化が起きているのか調べる。本研究の二つ目の狙いは、環境ストレスで活性化したトランスポゾンについていつ、どこで転移が起るのかを明らかにすることである。そのため、シロイヌナズナの組織特異的なトランスポゾンの制御機構を明らかにする。具体的には、植物のメリステムでトランスポゾンの制御が起る可能性を考えており、本研究では特にメリステムが持つトランスポゾン制御機構の解明を目的とする。さらに「栄養成長メリステム」から「生殖成長メリステム」へと相転換に伴うトランスポゾンの制御機構について理解することを目的とする。宿主としての植物のトランスポゾン制御機構を解明することでメリステムの持つ新しい機能を理解することができると思う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

#### 活性化トランスポゾンと宿主ゲノムのエピジェネティックな変化

トランスポゾンは宿主のゲノム構造を変化させ、時には宿主遺伝子を調節する重要な要素となり保存されている。そのため、トランスポゾンの転移は進化の速度を早める重要な因子であり、また生物が環境変動にさらされた際に環境適応形質を生み出す因子になり得る。本研究ではシロイヌナズナの RNA 干渉に関与する遺伝子の変異体において、高温ストレスで転移するトランスポゾン(ONSEN)を用いた。この転移は次世代に伝わり、転移先は遺伝子領域が8割以

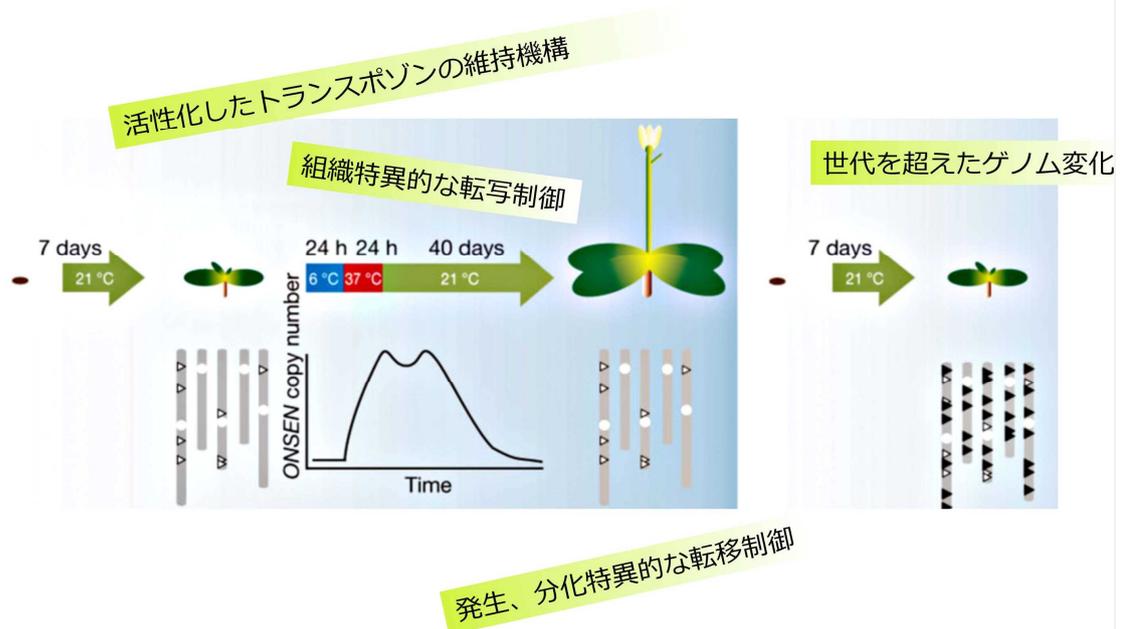
上を占めていた。トランスポゾンの転移が観察された個体のいくつかは、ストレス耐性を獲得した。このことは環境変化が生物の進化に大きな影響力を持つことを示唆している。得られたストレス耐性個体において、トランスポゾンの挿入による遺伝子発現の変化をゲノムワイドに解析した。

### トランスポゾンの転移抑制機構の解析

幼少期に活性化した *ONSEN* が次世代に転移する機構を解明するために幼少期の植物に高温ストレスを与え、活性化したトランスポゾンを用いて組織特異的な転写活性を解析した。葉原基組織をレーザーマイクロダイセクションで単離し発現解析を行い組織特異的なトランスポゾンの制御系を調査した。RNA 干渉を担う遺伝子の変異体ではトランスポゾンの転移抑制機構が働かなくなっていることが予想され、そのような状態で活性化したトランスポゾンはどのような状態で維持されているのか分子遺伝学的なアプローチにより解析した。

### *ONSEN* の転写制御因子の同定

*ONSEN* トランスポゾンは高温ストレスにより活性化するが、その活性のメカニズムは明らかにされていなかった。また、多くのトランスポゾの転写活性が DNA のメチル化で抑制されているのに対し、*ONSEN* は DNA メチル化とは独立した機構で制御されていると考えられた。本研究では、*ONSEN* の制御因子を明らかにするため、トランスポゾンのプロモーター配列にレポーター遺伝子(GFP)を繋いだ形質転換体を作成し、植物体内でのトランスポゾンの発現解析を行った。



## (2) 詳細

### 1. 熱活性型トランスポゾンの転移による宿主ゲノムのエピジェネティック変化

シロイヌナズナの RNA 干渉を担う遺伝子の変異体に高温ストレスを与えその子孫でレトロ

ランスポゾン *ONSEN* の転移が確認された集団を作成した。集団に様々なストレスを与えることでストレス耐性個体のスクリーニングを行った。その結果、植物ホルモンであり乾燥耐性や種子の休眠に関与するアブシジン酸(ABA)に対するストレス耐性(非感受性)個体を得ることができた。次世代シーケンサーを用いた解析より、*ONSEN*の挿入をマッピングした結果、ABAストレス関連遺伝子に *ONSEN*が挿入されていることが明らかになった。現在までにストレス耐性スクリーニングによって独立した2系統を得ており、それぞれ別の遺伝子に *ONSEN*の挿入が見つかった。各 *ONSEN* 挿入系統における遺伝子発現解析を行い、ABA 関連遺伝子が *ONSEN* の挿入により発現しなくなっていることを確かめた。*ONSEN* の挿入先は7割以上が遺伝子内であるが、その配列には共通のモチーフが見つからないことや、発現パターンにも共通性が無いことから、エピジェネティックな特徴があるのか調べるために、クロマチン免疫沈降法を用いてヒストン修飾を調べた。*ONSEN* が挿入された遺伝子の一つである ABI5 の 5' UTR, exon, intron 領域にヒストン H3K9ac, H3K9m2, H3K4ac, H3K4m3 の抗体を用いた免疫沈降実験を行った。高温処理の前後において野生型、*polIV* 変異体それぞれについて実験をおこなった結果、この領域は遺伝子を ON にするヒストン修飾を受けていることがわかったが、高温や変異体を用いた場合でも顕著なヒストン修飾の変化は見られなかった。今回さらにクロマチン免疫沈降法を用いて H3K27me3 の修飾を調べた。その結果、*ONSEN*の転移が見られる *polIV* 変異体に高温ストレスをかけた場合、ABI5 の 5' UTR, exon, intron 領域の H3K27me3 の修飾が減少していること傾向がみられた。

*ONSEN* の新たな転移が宿主の遺伝子発現に与える影響について、前回までの報告でストレスホルモンであるアブシジン酸(ABA)非感受性表現型の原因遺伝子を遺伝学的なマッピングで試みた結果、F2 世代で予測される分離比に分離しなかった。しかしながら ABA ストレス非感受性集団を自殖させた子孫集団では表現型は維持されていた。これらの結果から考えられる仮説は、ABA ストレス非感受性集団は siRNA が生成されない *polIV* 変異体では維持されるが、マッピングのために野生型と交配することで F1, F2 集団ではトランスポゾン由来の siRNA が生成され RNA-directed DNA methylation (RdDM)によりトランスポゾンに DNA のメチル化が起こり表現型に関与する遺伝子の発現を変化(もとに戻す)させるというものである。この仮説を検証するために、今回独立に転移が起きた2つの系統を用いて解析を行った。1つ目の系統では、*ONSEN*が ABI4 のエクソンに挿入されており、2つ目の系統では ABI5 のイントロンに挿入されている。ABI4 と ABI5 は共に ABA ストレス応答遺伝子であり、ストレス環境下では ABI4 と ABI5 が発芽を抑制する。ABI4, ABI5 の変異体では ABA ストレスに非感受性となり ABA ストレス下でも発芽が見られる。発芽を指標とした F2 集団での表現型観察の結果、ABI4 に挿入された系では *polIV* の有無に関わらず分離集団で劣性遺伝の分離比に表現型が観察される一方、ABI5 に挿入された系では *polIV* 変異体下でしか表現型が観察できなかった。このことから *ONSEN* がエクソンに挿入された場合とイントロンに挿入された場合で挿入先への影響が異なることがわかった。

## 2、トランスポゾン *ONSEN* の転移抑制機構の解明

### 2-1) トランスポゾンの転移制御と siRNA の関連性について

熱活性型トランスポゾンである *ONSEN* は熱応答性のプロモーター配列を持ち、その領域に

結合する熱ショック因子の欠乏変異体での解析結果から、高温条件下で熱ショック因子を介した転写の促進が行われていることが明らかになってきた。この *ONSEN* の熱活性は野生型の植物にも起こる現象であるが、野生型では転移は認められない。一方 siRNA 生合成に関わる遺伝子の変異体に熱ストレスを与えた個体の子孫で *ONSEN* の転移が観察された。このことから、siRNA がトランスポゾンの転移を何らかの形で制御している可能性が考えられる。*ONSEN* の発現が組織特異的に起こっているのか調べるために *ONSEN* のプロモーター領域に GFP を繋いだ形質転換体を用いて解析を行った。その結果 *ONSEN* の発現は熱ストレス後植物体全体で上昇していることが分かった。さらに、*polIV* 変異体ではその活性度合いが認められた。しかしながら、活性化の継続時間は野生型と *polIV* 変異体で大きな差は見られなかったことから、活性化の引き金と持続には独立した機構が働いているようである。形質転換体の *ONSEN* プロモーター領域のメチル化をメチル化感受性の制限酵素 McrBC で処理した DNA を鋳型とした PCR により解析を行った結果、野生型では熱ストレス後プロモーター領域がメチル化されるが、*polIV* 変異体ではメチル化されないことが分かった。

### 3. 今後の展開

抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq を行うことで、*ONSEN* の挿入ターゲット領域に特異的なヒストン修飾の変化を解析する予定である。また、DNA のメチル化の変化が *ONSEN* の挿入先を決めている可能性を調べるために、高温ストレスをかけた直後のゲノムワイドな DNA のメチル化の変化についてもバイサルファイトシーケンスにより解析中である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究課題提案時に掲げた研究目的は7割ほどの達成度である。研究実施体制は1年目でほぼ整えることができたが2年目以降実験補助員を雇用し実験の効率化を図った。研究費の執行にあたっては計画的に行うことができた。研究成果の公表はこれからであり、可能な限り早急に論文による発表を行う予定である。研究期間中に新たな研究の進展につながる成果を得ることができたため、今後の研究の発展が期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

熱活性型トランスポゾン *ONSEN* が転移したあとに宿主の遺伝子発現に影響を与え、ストレス耐性の表現型を獲得した2系統を得た。*ONSEN* の挿入先は7割以上が遺伝子内であった。2つの系統のうち、一つはエクソン内に挿入されており、もう一方はイントロンに挿入されていた。イントロンに挿入された系統では *polIV* 変異体 (siRNA 生合成に関わる遺伝子の変異体) でしか表現型が観察されなかった。従ってエクソンとイントロンに挿入される場合で挿入先への影響が異なることが分かった。一方トランスポゾンの転移抑制について、野生型では転移は認めら

れないが、polIV 変異体に熱ストレスを与えた個体の子孫に *ONSEN* の転移が認められた。研究はまだ緒についたばかりであり、解決すべき課題が多く存在する。そもそも siRNA が転移に関わる機構は何なのか、次世代に受け継がれるメカニズムの解明、組織特異的な転移機構の解明など、具体的課題のもと研究を進展させて欲しい。また、今後実用化を視野に入れた研究の展開も求められる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, <b>Ito H</b> . The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of <i>ONSEN</i> , a copia-like retratransposon in <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Plant &amp; Cell Physiology</i> . 53: 824–833 (2012). |
| 2. <b>Ito H</b> , Yoshida T, Tsukahara S, Kawabe A. Evolution of the <i>ONSEN</i> retrotransposon family activated upon heat stress in Brassicaceae. <i>Gene</i> . 518: 256–261 (2013).                                                                                                            |
| 3. Kato H, Saito T, <b>Ito H</b> , Komeda Y, Kato A. Overexpression of the TIR-X gene results in a dwarf phenotype and activation of defense-related gene expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Journal of Plant Physiology</i> . 171: 382–388 (2014).                                    |
| 4. Yamada M, Yamagishi Y, Akaoka M, <b>Ito H</b> , Kato A. Genomic localization of AtRE1 and AtRE2, copia-type retrotransposons, in natural variants of <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Mol Genet Genomics</i> . published on line. (2014)                                                        |

### (2) 特許出願

特になし

### (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)

#### 学会発表

##### (国内)

- ・ 日本遺伝学会第 83 回大会 (2011.9.20)
- ・ 第 53 回日本植物生理学会シンポジウム (2012.3.16) 招待講演
- ・ 日本遺伝学会第 84 回大会 (2012.9.26)
- ・ 植物電子顕微鏡若手ワークショップ (2013.1.15)
- ・ 種生物学学会シンポジウム (2012.12.9) 招待講演
- ・ 日本分子生物学会年会ワークショップ (2012.12.14) 招待講演
- ・ 日本遺伝学会第 85 回大会 (2013.9.19)
- ・ 遺伝研研究集会(2013.10.10) 招待講演
- ・ 日本育種学会第 125 回講演会(2013.10.12)
- ・ 第 30 回資源植物科学シンポジウム (2014.3.6)
- ・ 第 55 回日本植物生理学会年会シンポジウム (2014.3.17) 招待講演
- ・ 日本実験動物科学技術札幌2014(2014.5.15) 招待講演

##### (国際)

- The 14th Hokkaido University–Seoul National University Joint Symposium (2011.11.18)
- Genomic Impact of Eukaryotic Transposable Elements (2012.2.26)
- The 8th Okazaki Conference Speciation and Adaptation II (2012.3.22) 招待講演
- Frontiers in Plant RNA Research 2012 (2012.10.16) 招待講演
- FUJIHARA SEMINAR 2012 A new horizon of retroposon research (2012.8.2) 招待講演
- CMCB2013 (2013.6.14) 招待講演
- 24th International Conference on Arabidopsis Research (2013.6.25)

#### 受賞

- 日本遺伝学会第 82 回大会 Best Paper 賞受賞 (2010.11.1)