

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03743

研究課題名(和文)植物におけるエピジェネティックな形質変化の動態に関する階層的理解とその制御

研究課題名(英文) Hierarchical understanding of the dynamics of epigenetic changes in characters and their control in plants

研究代表者

金澤 章 (Kanazawa, Akira)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：30281794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸の塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂後も継承されるエピジェネティックな遺伝子発現の変化に着目し、その遺伝子内、対立遺伝子間、細胞・組織間と言った異なる階層における動態を解析した。特に植物体の生育過程で誘導される外来遺伝子のメチル化に関し、表現型の変化との関連性、世代間での安定性、ならびに、対立遺伝子間の相互作用を介した変化を明らかにした。また、植物の転移因子の進化過程における転移の対象となる染色体領域の変化や発現の組織特異性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティックな機構による遺伝子発現の変化は、他の方法によってはなし得ない、DNAの塩基配列の変化を伴わない形質改変を可能にし、したがって、植物の形質を改変する新たな手法となり得る。一方、エピジェネティックな変化は必ずしも安定ではなく、可逆的であるという特徴を持つ。本研究の成果は、エピジェネティックな変化の誘導を新たな植物育種の方法として確立する上で考慮する必要のある、安定性を含む、この現象の特性に関する知見を提供した意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Focusing on epigenetic changes in gene expression, which are maintained through cell division without alterations in the DNA sequence, their dynamics in different layers including within gene, between alleles, and between cells and/or tissues were analyzed. In particular, transgene methylation that is induced during the growth of plants was characterized in terms of its relationship with changes in phenotypes, its stability across generations, and its changes via allelic interactions. In addition, changes in the insertional preference of a plant transposable element into chromosomal regions during evolution and the tissue specificity of its expression were explored.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：遺伝子発現制御 エピゲノム 植物

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな遺伝子発現の変化は、核酸の塩基配列の変化を伴わずに細胞分裂後も継承される遺伝子発現の変化であり、その物質としての実体は DNA (シトシン) のメチル化やヒストン修飾の変化、ならびに、それらに関連したクロマチン構造の変化が担っている。とりわけ植物と哺乳動物では DNA のメチル化を介した遺伝子発現の制御が高度に発達している。植物では塩基配列特異的な低分子 RNA を介した DNA のメチル化 (RNA-directed DNA methylation; RdDM) が見出され、その機構の解明が進展した。RdDM の機構は、メチル化を誘導し得る二本鎖 RNA を起点として、以下の反応を含むと考えられた。二本鎖 RNA から、Dicer-like (DCL) タンパク質による分解、ならびに、末端のメチル化を経て、24 nt の short interfering RNA (siRNA) が産生する。この siRNA は Argonaute (AGO) タンパク質に取り込まれ、RNA ポリメラーゼ V による転写産物との相補的結合を介して、DNA 上の特定の部位にメチル基転移酵素を呼び込み、メチル化を誘導する。また、RNA ポリメラーゼ IV による転写によって生じた RNA を鋳型として DCL タンパク質によって二本鎖 RNA が生じ、上記の反応に使われる。RNA ポリメラーゼ IV はメチル化された DNA を転写すると考えられ、このことにより、いったんメチル化された DNA がその後もこの反応経路によりメチル化されることが示唆された。さらに、RNA 分解の経路で生じる 21-22 nt の siRNA が関与して新規なメチル化が誘導されることが示されていた (Law and Jacobsen 2010; Matzke et al. 2015; Cuerda-Gil and Slotkin 2016)。

このような DNA 上の特定の部位・領域において DNA のメチル化が起きる機構に加え、植物の生活環の中において DNA のメチル化が動的に変化することが示唆されていた。一般に転移因子の発現および転移は DNA のメチル化を介して抑制されている。一方、植物の花粉中において、栄養核で転移因子の転写が活性化され、その転写産物を元に作られた siRNA が精細胞へ移動して精細胞の DNA 中の転移因子を不活性化し、次世代へ伝達される DNA における転移因子の抑制を確立するというモデルが提唱されていた (Slotkin et al. 2009)。すなわち、エピジェネティックな機構を介した遺伝子発現の制御は、エピジェネティックな修飾が可逆的に変化することを介して行われる、動的な制御であるという特徴を持つと考えられた。

植物においてエピジェネティックな機構を介した遺伝子発現の変化は、さまざまな事象に関して認められてきた。例えば、環境条件の変化に応答したヒストン修飾の変化が起きることで遺伝子発現の変化が誘導され、開花の制御がなされる (Berry and Dean 2015)。一般にこのようなエピジェネティックな変化は可逆的であり、生殖の過程を経ることでリセットされる。一方、例えば、対立遺伝子間の相互作用を介したエピジェネティックな変化であるパラミューテーションでは、変化した状態が安定に次世代に伝達される (Chandler and Stam 2004)。このような継承可能なエピジェネティックな変化が誘導された場合には新たな形質を持った植物系統が生じる可能性がある。したがって、エピジェネティックな変化を誘導することには育種の方策としての潜在的な有用性があると考えられた。

2. 研究の目的

一般に哺乳動物においては、DNA メチル化が始原生殖細胞において消失し、その後の配偶子形成の過程で再び生じる、エピジェネティックな修飾のリプログラミングが起きる。それに対し、植物においては、生殖の過程および世代を越えて DNA のメチル化が継承され、それに伴いエピジェネティックな機構を介して生じた形質が伝達される事例が多く見つかっている。これらのことは、エピジェネティックな変化を誘導することで、安定に形質が変化したエピアルルを持つ植物系統を育成できる可能性を喚起する。また、エピジェネティックな機構はゲノムに存在するあらゆる遺伝子の基本的な発現制御に関わっている。したがって、エピジェネティックな機構を介した遺伝子発現の変化は、農業生産の上で重要な形質に関与するものを含め、さまざまな遺伝子において誘導し得るものと想定できる。人為的にエピジェネティックな変化を誘導することは、他の方法によってはなし得ない、DNA の塩基配列の変化を伴わない形質改変のツールとなり得る。

一方、エピジェネティックな変化は DNA の塩基配列の変化とは異なり、前述のとおり、不安定性を含み、可逆的であるといった特徴を持つ。エピジェネティックな修飾が動的であることは、細胞や組織における形質の差異をもたらすのみならず、個体内での形質のばらつき、さらには、生物の集団における個体間での形質の多様性に影響する要素となり得る。したがって、エピジェネティックな変化を新規な育種ツールとして利用する目的で植物の改変に適用する場合には、このようなエピジェネティックな変化の誘導効率や、いったん誘導された状態の安定性を含む動態を考慮することが必要となる。しかしながら、エピジェネティックな変化の誘導効率や動態について、体系的に調べられた事例は、転移因子を対象としたものを除くと、極めて限られる。

こうした状況を背景として、本研究では、エピジェネティックな変化が再現性よく誘導される植物材料を用い、その遺伝子内、対立遺伝子間、細胞・組織間といった異なる階層におけるエピジェネティックな変化の動態、ならびに、転移因子の動態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

アントシアニン色素合成経路に含まれるカルコン合成酵素をコードする *CHS-A* 遺伝子のコサプレッションが起きることで白色の花弁を産生するペチュニア系統 (Kanazawa et al. 2007; Kasai et al. 2012)、および、この系統に由来する、エピジェネティックな機構により不活性化した外来遺伝子のエピアレルを持つ系統 (Kanazawa et al. 2007) を遺伝子発現解析、DNA メチル化の解析、接ぎ木実験、および、交配による遺伝学的解析に用いた。また、転移因子に関する解析を目的として、フィトクローム A タンパク質をコードする *GmphyA2* 遺伝子中にレトロトランスポゾン *SORE-1* (Liu et al. 2008; Kanazawa et al. 2009) を含むダイズ系統を用いた。これらに加え、*SORE-1* の全域を導入したシロイヌナズナ系統、ならびに、*SORE-1* の long terminal repeat (LTR) を -glucuronidase (*GUS*) 遺伝子に連結した DNA 構築物を導入したシロイヌナズナ系統を作成し、発現解析に用いた。

(2) 遺伝子発現量の解析

植物組織より全 RNA を抽出し、Kasai et al. (2012) の方法に基づき、定量 RT-PCR 法により解析した。

(3) DNA メチル化の解析

DNA メチル化の状態を、Kanazawa and Kasai (2015) の方法によるバイサルファイトシーケンシング法、ならびに、メチル化感受性制限酵素およびメチル化依存性エンドヌクレアーゼによる DNA 切断と PCR 増幅を利用した方法により解析した。

(4) 低分子 RNA の解析

Goto et al. (2003) の方法に基づき、植物体の組織より低分子 RNA 画分を単離し、siRNA の産生をノーザン法により解析した。

(5) データベースを用いた転移因子の動態解析

ダイズにおけるレトロトランスポゾン *SORE-1* を主な対象として、SoyBase (Grant et al. 2010) における塩基配列情報を利用し、染色体領域における分布の解析、LTR 間の配列相同性を利用した挿入年代の推定、コピー間の系統関係の推定を行った。

(6) レポーター遺伝子を用いた組織特異的発現の解析

SORE-1 の LTR を *GUS* 遺伝子に連結した DNA 構築物を導入したシロイヌナズナを用いて、植物体の *GUS* 染色を行った。また、植物体より切り出した組織を寒天に包埋した後、振動刃ミクロームにより組織切片を作成し、顕微鏡を用いて染色部位を観察した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子内におけるエピジェネティックな変化の動態に関する解析

CHS-A 遺伝子のコサプレッションにより花弁の全体が白色になるペチュニア系統を研究材料に用いた。この系統の植物体を数ヶ月以上の長期間にわたって維持すると、花弁において部分的に着色が復帰する。この現象に伴い、外来 *CHS-A* 遺伝子を制御するプロモーターの高頻度のメチル化が検出されていた。遺伝子内の異なる DNA 領域を解析した結果、メチル化された領域が拡大する傾向が見出された。着色が復帰した植物に野生型の植物を交配した次世代の植物について解析を行った結果、いったん生じたコサプレッションから表現型が復帰した状態が生殖の過程を経た次世代に伝達されることが明らかになった。また、次世代における表現型の復帰の程度が、個体間および個体内において多様であることを見出した。従来の解析結果と併せることで、植物体の育成期間、表現型の変化、外来遺伝子の発現変化、DNA のメチル化に関連性があり、これらの現象が遺伝子内における DNA メチル化領域の変動に関連すること、ならびに、変化した状態が世代を越えて継承され得るものであることが示唆された。

(2) 対立遺伝子間におけるエピジェネティックな変化の動態に関する解析

外来 *CHS-A* 遺伝子を持つことに伴ってコサプレッションを起こした系統、および、それに由来し、エピジェネティックな変化を介して転写不活性化した外来 *CHS-A* 遺伝子のエピアレルを持つ系統を用いて以下の解析を行った。これらの系統に存在する異なるエピアレル間での相互作用を介した変化の可能性を検討するため、両系統の間での交配を行い、次世代の植物における花の表現型を解析した。その結果、両親とは異なる表現型、すなわち、異なる着色の程度の花弁を産生する個体が見出された。この結果に基づき、更なる遺伝学的な解析を行った。異なる表現型の花弁を産生した個体に対して野生型の系統を戻し交配し、次世代の集団を対象として、表現型と外来遺伝子のメチル化の状態に関する分離を解析した。その結果、異なる表現型は両親に由来する外来遺伝子のエピアレルを持つ個体において生じたことが明らかになった。これらのことから、外来遺伝子の異なるエピアレルが同一核内に存在する場合に、それらの間における相互作用を介してパラミュテーション様の現象が起きたことが示唆された。

(3) 細胞・組織間におけるエピジェネティックな変化の動態に関する研究

植物体内において細胞・組織間でエピジェネティックな修飾が変化する可能性を検証した。この目的から、上記の外来遺伝子の異なるエピアレルを持つ系統の個体間で接ぎ木を行った。接ぎ木後に植物体の育成を継続し、穂木と台木に相当する部位における花の表現型と外来遺伝子のDNAメチル化の程度を解析した。その結果、これらの部位において、それぞれ接ぎ木を行う以前の穂木と台木に用いた植物体と同様な花の表現型とメチル化の状態が検出された。これらのことから、細胞・組織間でのDNAメチル化の拡大を含むエピジェネティックな変化は見出されなかった。現時点では、組織間を移動してエピジェネティックな変化の誘導に關与するsiRNAの量が制限要因となった可能性を、今後の検証対象として考えている。

(4) 転移因子の動態に関する研究

一般に転移因子はDNAメチル化を含むエピジェネティックな修飾により転写および転移が抑制されている。植物では、転移因子は配偶子形成の過程においてリプログラミングを受けることが知られている。本研究では、ダイズにおいて見出したレトロトランスポゾン *SORE-1* を対象として、その進化過程における動態、ならびに、組織特異的発現を主体とした解析を行った。ゲノムデータベースを活用することにより、96コピーの *SORE-1* の特徴付けを行った。その結果、その59%がペリセントロメア領域に存在し、残りの41%は遺伝子が多く存在する染色体腕領域に存在することが明らかになった。LTRが維持されているコピーに関し、その塩基配列を利用してゲノムへの挿入年代を推定した結果、ペリセントロメア領域と染色体腕領域に存在する *SORE-1* の平均挿入時期はそれぞれ $2.58 \times$ 百万年前と $0.83 \times$ 百万年前と推定された。また、年代ごとの挿入数に基づき、*SORE-1* の挿入先がペリセントロメア領域から染色体腕領域へ百万年前以降に変化したことが示唆された。*SORE-1* の発現に関するダイズおよびシロイヌナズナを用いた解析から、そのRNA量が生殖過程で増加することを明らかにした。また、レポーター遺伝子を用いた解析から、*SORE-1* のLTRによる転写活性が胚珠の発生過程において増加することを明らかにした。さらに、ゲノム情報を活用することにより、*SORE-1* の隣接領域のメチル化の頻度が染色体領域の特性と関連することを見出した。

(5) 関連する研究材料の作出と解析

前述の遺伝子内および対立遺伝子間におけるエピジェネティックな変化の動態を異なる系で再現し、更なる解析に用いる目的から、*CHS-A* 遺伝子ならびに *CHS-A* 遺伝子の一部の逆向き反復配列を構成的プロモーターに連結したDNA構築物を作成し、それらを導入したシロイヌナズナ系統を作出した。これらの系統を用いた解析から、RNA分解に伴って起きるDNAのメチル化が当該遺伝子の転写抑制を導く可能性を支持する結果が得られ、これらの研究材料が今後の解析に有効であると考えられた。また、ペチュニアにおいてアントシアニン合成経路で機能する転写因子をコードする *PURPLE HAZE* 遺伝子の過剰発現系統を作出した。この系統を利用することで、この転写因子の制御対象の遺伝子の転写増強を利用したさまざまな観点からの解析が可能になるものと想定している。本研究では、その一つとして、薬の表現型の変化が誘導されることを明らかにした。

< 引用文献 >

- Berry S, Dean C (2015) Environmental perception and epigenetic memory: mechanistic insight through *FLC*. *Plant J* 83:133-148
- Chandler VL, Stam M (2004) Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet* 5:532-544
- Cuerda-Gil D, Slotkin RK (2016) Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nat Plants* 2:16163
- Goto K, Kanazawa A, Kusaba M, Masuta C (2003) A simple and rapid method to detect plant siRNAs using nonradioactive probes. *Plant Mol Biol Rep* 21:51-58
- Grant D, Nelson RT, Cannon SB, Shoemaker RC (2010) SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res* 38:D843-846
- Kanazawa A, Kasai M (2015) Induction of stable epigenetic gene silencing in plants using a virus vector. *Methods Mol Biol* 1287:129-137
- Kanazawa A, O'Dell M, Hellens RP (2007) Epigenetic inactivation of *chalcone synthase-A* transgene transcription in petunia leads to a reversion of the post-transcriptional gene silencing phenotype. *Plant Cell Physiol* 48:638-647
- Kanazawa A, Liu B, Kong F, Arase S, Abe J (2009) Adaptive evolution involving gene duplication and insertion of a novel *Ty1/copia*-like retrotransposon in soybean. *J Mol Evol* 69:164-175
- Kasai M, Koseki M, Goto K, Masuta C, Ishii S, Hellens RP, Taneda A, Kanazawa A

(2012) Coincident sequence-specific RNA degradation of linked transgenes in the plant genome. *Plant Mol Biol* 78:259-273

Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11:204-220

Liu B, Kanazawa A, Matsumura H, Takahashi R, Harada K, Abe J (2008) Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics* 180:995-1007

Matzke MA, Kanno T, Matzke AJ (2015) RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 66:243-267

Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzić M, Becker JD, Feijó JA, Martienssen RA (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136:461-472

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima, K., Abe, J. and Kanazawa, A.	4. 巻 26
2. 論文標題 Chromosomal distribution of soybean retrotransposon SORE-1 suggests its recent preferential insertion into euchromatic regions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chromosome Res.	6. 最初と最後の頁 199-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-018-9579-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima, K., Tsuchiya, M., Fukushima, S., Abe, J. and Kanazawa, A.	4. 巻 248
2. 論文標題 Transcription of soybean retrotransposon SORE-1 is temporally upregulated in developing ovules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 1131-1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-018-3005-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ゆはず 真白・原 涼子・金澤 章
2. 発表標題 ペチュニアにおける薬の着色に顕在化する転写因子の機能的冗長性
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ゆはず 真白・原 涼子・金澤 章
2. 発表標題 ペチュニアにおいて薬の着色を誘導するアントシアニン生合成経路に関与する遺伝子と転写制御ネットワーク
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 涼子・金澤 章
2. 発表標題 ペチュニアにおけるPHZの異所的発現はアントシアニン生合成後期段階の遺伝子の発現増強を介して葯の着色を誘導する
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ゆはず 真白・御厨 駿・森 あゆみ・千田 峰生・金澤 章
2. 発表標題 ダイズの新規な種皮着色突然変異体においてCHS遺伝子のinverted repeatが失われている
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 涼子・木村 芽生・金澤 章
2. 発表標題 ペチュニアにおけるアントシアニン生合成を制御するR2R3-MYB転写因子PHZの過剰発現による葯の着色
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 芽生・長澤 裕美・金澤 章
2. 発表標題 ペチュニアにおけるトランスジーンのエピアレル間の相互作用を介したコサプレッションによる表現型からの復帰
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋 健太・阿部 純・金澤 章
2. 発表標題 ダイズのレトロトランスポゾンSORE-1の進化過程での挿入領域の変化
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋 健太・阿部 純・金澤 章
2. 発表標題 ダイズのレトロトランスポゾンSORE-1の日長依存的転写制御
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------