

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06360

研究課題名(和文) エピゲノム状態と遺伝子進化様式の関連性の解明

研究課題名(英文) The effect of epigenomic status on gene evolution

研究代表者

宅野 将平 (Shohei, Takuno)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・助教

研究者番号：20547294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム-エピゲノム間の進化的インタラクションを解明するために、遺伝子領域にDNAメチル化を持つ遺伝子の進化パターンを調べた。このタイプのDNAメチル化は遺伝子ボディメチル化と呼び、発現抑制に関与せず、むしろ発現量の高い遺伝子で観察される。私の先行研究で、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子のDNA配列には負の自然選択が働いていることを発見した。しかし、なぜ自然選択が働いているかは明らかにできなかった。そこで、DNAメチル化とヌクレオソームの分布に相関があることに着目し、ヒストンタンパク質のDNAの結合の維持のために自然選択が働いているという仮説を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私の研究は、遺伝子の発現制御に関わるエピゲノムがどのように進化してきたかを明らかにすることである。昨今の次世代シーケンサーの発展により、エピゲノムデータの作出は非常に簡単になった。しかし、データの増加から予想されるほど、それぞれのエピゲノムがどのような機能を持つかは明らかになっていない。私の研究は、エピゲノムの存在意義を進化学の観点から解き明かすことであり、学術的意義があると考えられる。近年エピゲノムを人為的に改変する方法が少しずつ普及しており、将来的にエピゲノムの改変を品種改良に利用できるかもしれない。私の研究は、このための基礎研究に有用である。

研究成果の概要(英文)：I have been investigating how epigenomes evolve mainly in plant species. My main focus is gene body methylation that is found in transcribed regions and is observed in highly-expressed genes in plants and animals. My previous studies found that body-methylated genes tend to evolve more slowly than unmethylated genes in angiosperms. The DNA sequences of body-methylated genes are subject to negative natural selection. However, the reason why negative selection acts on body-methylated genes. The pattern of DNA methylation is associated with the distribution of nucleosomes in plant genomes. Thus, I hypothesized that negative selection work on body-methylated genes such that the position of nucleosomes are kept to be stable. I am now testing this hypothesis in *Arabidopsis thaliana*.

研究分野：ゲノム進化

キーワード：ゲノム進化 集団遺伝学 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

生物の設計図である遺伝情報はゲノム DNA 上に書き込まれている。ゲノム DNA には遺伝子が多数存在し、各発生段階、あるいは各組織や環境の変化に応じて必要な遺伝子が発現するようにプログラムされている。この遺伝子発現は、ゲノム DNA とヒストンタンパク質の複合体であるクロマチンを化学的に修飾するエピジェネティクス機構によって、精密に制御されている。この化学修飾の総称をエピジェネティック修飾と言う。エピジェネティック修飾には様々な種類がある。主なものとして、DNA メチル化、ヒストン修飾が挙げられる。また、ゲノム上のヌクレオソームの分布の特徴も遺伝子発現に大きく影響する。例えば、DNA のシトシンに付与される DNA メチル化は、重要なエピジェネティクス修飾の一種である。DNA メチル化は、クロマチンを凝縮し、遺伝子発現を抑制する方向に働く。特に、DNA メチル化は、トランスポゾン発現抑制に重要であると考えられている。これらのエピジェネティック修飾のゲノムワイドなパターンはエピゲノムと呼ばれる。私は、植物をモデル生物として用い、ゲノム-エピゲノムの共進化のメカニズムを包括的に明らかにすることを目的として研究を続けている。

私はこれまでの研究で、遺伝子転写領域（遺伝子ボディ領域）に見られる DNA メチル化の進化パターンの研究を主に行ってきた。この DNA メチル化は、遺伝子ボディメチル化と呼ばれている。遺伝子ボディメチル化は発現抑制に働かず、むしろ発現量が高く、多くの組織で発現している遺伝子で観察される傾向にある。また、私は、遺伝子ボディメチル化は遺伝子長が長く、エクソンの多い遺伝子で観察される傾向にあることを発見した。遺伝子ボディメチル化は被子植物、裸子植物、シダ植物のオーソログ間で高確率で保存されていた。遺伝子ボディメチル化の機能の有無には議論があったが、この保存性は遺伝子ボディメチル化が機能を持つことを示唆した。

一方、遺伝子ボディメチル化が長期間特定の遺伝子に存在することには、不利な点があると予想された。なぜならば、DNA メチル化は発現制御だけではなく、突然変異源としても働くからである。この予想に反し、私は、被子植物の遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子の進化速度は、持たないものより遅いことを明らかにした。この現象は、エクソン上の同義置換、非同義置換、イントロン上の塩基置換全てにおいて観察された。この現象の説明するための仮説は、2 つある。一つは、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子の突然変異率が低い可能性であり、もう一つは、負の自然選択の影響によって、見かけの進化速度が下がっている可能性である。シロイヌナズナの集団ゲノムデータの解析から、私は、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子の開始コドンから終始コドンまでの領域全体に渡って、負の自然選択が働いていることを明らかにした。この傾向は、イネとトウモロコシでも観察された。しかも、DNA メチル化が付与されるシトシンだけでなく、他の 3 つの塩基にも負の自然選択の痕跡が見つかった。しかし、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子に負の自然選択が働いている理由は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子に負の自然選択が働いている理由を明らかにすることを目的とした。DNA メチル化は、重要なエピジェネティック修飾であると認識されている。しかし、他の複数のエピジェネティック修飾と相関して遺伝子上に分布していることが知られている。つまり、特定の遺伝子に負の自然選択が働いている原因が、遺伝子ボディメチル化であるという保証はない。DNA メチル化の分布は、ゲノム上でのヌクレオソームの分布と密接に関係している。そこで、私は、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子と持たない遺伝子上のヌクレオソームの分布を調査した。されに、ヌクレオソームの分布の特徴が負の自然選択のターゲットとなりうる 2 つの仮説を立て、検証を試みた。

## 3. 研究の方法

本研究の目的のために、NCBI などで公開されているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のゲノム、エピゲノムデータを用いた。具体的には、シロイヌナズナの全ゲノム配列、集団ゲノムデータ、葉と花それぞれの DNA メチル化データ、遺伝子発現データ、ヌクレオソームデータを用いた。エピゲノムデータと発現データは次世代シーケンサーによるものであり、最新のシロイヌナズナゲノムにマッピングを行い、以降の解析を行った。さらに、遺伝子ごとの進化速度を計算するため、シロイヌナズナの野生近縁種である *Arabidopsis lyrata* の全ゲノム配列を用いた。この目的のために、シロイヌナズナと *A. lyrata* のオーソログを同定した。これらのデータを合わせて、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子と持たない遺伝子でのヌクレ

オソームの分布の特徴を明らかにした。

#### 4. 研究成果

シロイヌナズナゲノムの葉と花における DNA メチル化、遺伝子発現、ヌクレオソームの分布の同定は、先行研究と同様の結果であった。つまり、私の次世代シーケンサーデータの解析は信頼できると考えられる。また、葉と花のエピゲノムのパターンは、微細ば差はあるものの、大まかに一致しており、私の先行研究どおりであった。また、シロイヌナズナの集団ゲノミクスデータから計算された集団遺伝学の統計量と、シロイヌナズナ-*A. lyrata* 間のオソログから計算された進化速度も先行研究とほぼ一致していた。これらのデータを用いて、以下の2つの仮説を検証した。

##### (1) 仮説1：ヌクレオソームの占有率の差

ゲノム DNA は、ヒストンタンパク質の巻きついている 146bp の領域と、ヌクレオソームの間にあるヒストンタンパク質に巻きついていない領域とに分けられる。前者をリンカー領域と呼び、後者をヌクレオソームフリー領域と呼ぶ。ヌクレオソームフリー領域には、他の酵素が容易にアクセスすることができる。このため、ヌクレオソームフリー領域には、DNA 修復酵素がリクルートされやすくなる。実際、酵母では、ヌクレオソームフリー領域の進化速度が、リンカー領域より遅いことが明らかになっている。私の予備研究でも、シロイヌナズナで同様の結果を得ている。もし、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子で、持たない遺伝子よりヌクレオソームの占有率 (nucleosome occupancy) が高い場合、つまり、ヌクレオソームフリー領域が短い場合、より多くの突然変異に晒されることになる。本研究のターゲットは、多くの突然変異が有害となりうる遺伝子である。そこで、これらの有害突然変異を集団中から排除するため、強い負の自然選択が働いているという仮説を立て、シロイヌナズナで検証した。

この仮説を、シロイヌナズナのデータを用いて検証したが、葉と花の両方のデータで、この仮説は否定された。予想とは逆に、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子は、持たない遺伝子よりヌクレオソームの占有率が有意に低いことが明らかになった。また、ヌクレオソームの占有率が同レベルの遺伝子を、遺伝子ボディメチル化を持つものと持たないものに分けて、進化速度の差を調査した。ヌクレオソームの占有率が同じレベルであるにも関わらず、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子は、持たない遺伝子よりも常に有意に進化速度が遅いという結果が得られ、仮説は棄却された。

##### (2) 仮説2：ヒストン-DNA 結合の親和性維持に関わる塩基組成への自然選択

ヒストンと DNA が物理的に結合しているリンカー領域では、理由は不明であるが、塩基組成に偏りがある。リンカー領域とヌクレオソームフリー領域では、この組成の差が有意であり、ヌクレオソームの位置の規定に重要であると考えられている。仮説1の検証の際に、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子は、有意にヌクレオソームフリー領域が長いことが示された。つまり、何らかの理由で遺伝子ボディメチル化は、ヌクレオソームが密集しないようにデザインされていると考えられる。ここから、遺伝子ボディメチル化は、多くのエンハンサーやサプレッサー等の発現調節領域が遺伝子内部に多く存在し、ヌクレオソームによって転写因子の結合を阻害するのを防いでいるのかもしれない。

つまり、遺伝子ボディメチル化を持つ遺伝子は、遺伝子領域の塩基組成と、そこに存在する発現調節領域を維持するために負の自然選択が働いていると仮説を立てた。実際に、シロイヌナズナで、リンカー領域とヌクレオソームフリー領域で塩基組成に有意な違いがあることを発見した。ここから、塩基組成自体に働く自然選択と、調節領域に働く自然選択の有無を検定する予定であったが、コロナウイルス 感染症拡大に対する緊急事態宣言のため研究が遅れ、これらの仮説は現在検証中である。

#### <引用文献>

- ① Takuno S, Gaut BS. Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve slowly. *Mol Biol Evol.* 29:219-227. (2012)
- ② Takuno S, Gaut BS. Gene body methylation is conserved between plant orthologs and is of evolutionary consequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:1797-1802. (2013)
- ③ Takuno S, Ran JH, Gaut BS. Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants. *Nat Plants.* 2:15222. (2016)
- ④ Takuno S, Seymour DK, Gaut BS. The evolutionary dynamics of orthologs that shift in gene body methylation between *Arabidopsis* species. *Mol Biol Evol.* 34:1479-1491. (2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Espinás Nino A., Tu Le Ngoc, Furci Leonardo, Shimajiri Yasuka, Harukawa Yoshiko, Miura Saori, Takuno Shohei, Saze Hidetoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Transcriptional regulation of genes bearing intronic heterochromatin in the rice genome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008637	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 Takahashi Satoshi, Osabe Kenji, Fukushima Naoki, Takuno Shohei, Miyaji Naomi, Shimizu Motoki, Takasaki-Yasuda Takeshi, Suzuki Yutaka, Dennis Elizabeth S, Seki Motoaki, Fujimoto Ryo	4. 巻 25
2. 論文標題 Genome-wide characterization of DNA methylation, small RNA expression, and histone H3 lysine nine di-methylation in Brassica rapa L.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 511 ~ 520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsy021	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 該当する

1. 著者名 Horvath Robert, Laenen Benjamin, Takuno Shohei, Slotte Tanja	4. 巻 123
2. 論文標題 Single-cell expression noise and gene-body methylation in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41437-018-0181-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shohei Takuno
2. 発表標題 The evolution of gene body methylation in plant species.
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宅野将平
2. 発表標題 On the presence of CHG methylation in plant gene bodies.
3. 学会等名 日本遺伝学会 第90回大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Shohei Takuno
2. 発表標題 The evolution of gene body methylation in plant species.
3. 学会等名 Society for Molecular Biology and Evolution Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019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