

平成22年 4月 23日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780005

研究課題名（和文）リンドウに導入した35Sプロモーターのメチル化に関与する因子の探索

研究課題名（英文）Molecular dissection of 35S promoter-specific DNA methylation in gentian.

研究代表者 三柴 啓一郎（MISHIBA KEI-ICHIRO）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：70390888

研究成果の概要（和文）：本研究は、リンドウ形質転換体で見出された35Sプロモーター配列特異的なDNAメチル化を伴う外来遺伝子の発現抑制現象に関与する因子を同定し、発現抑制の誘導機構を明らかにすることを目的として行った。35Sプロモーター配列に結合するDNA結合因子を解析した結果、2つの領域においてリンドウ特異的に結合する因子の存在が確認された。興味深いことに、これら領域は*de novo* DNAメチル化が高頻度に生じた2つの領域と一致した。さらに両結合領域には共通のモチーフが含まれていたことから、このような核因子と*de novo* DNAメチル化との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study is intended to determine a causal factor for 35S promoter sequence-specific silencing in gentian. As a consequence of the analysis of nuclear factors in gentian, we found two regions in the 35S promoter that showed specific binding to nuclear factors of gentian. These two regions were consistent with the highly *de novo* methylated regions in the transgenic gentian plants. Since the two regions share common motifs, the gentian nuclear factors may involve the *de novo* methylation of the two regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学、植物分子育種、花卉、発現抑制、DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

これまで高等植物における外来遺伝子の発現抑制現象（ジーンサイレンシング）は、いくつかのモデル植物種で研究されてきた知見によりそのメカニズムが体系化され

つあり、基本的にはどのような植物種においても同様のメカニズムを持つものと考えられてきた。しかし研究代表者がリンドウより見出した発現抑制現象は、同様のベクターを導入した形質転換タバコでは確認されな

ったことから、種特異的に引き起こされている可能性が示された。したがって、この現象はゲノムの恒常性に対する戦略が植物種によって異なることを示唆すると考えられた。

またリンドウの発現抑制現象は、35S プロモーターを含む外来遺伝子を導入した全ての組換え植物体で確認されたが、このような厳密な抑制はこれまでタバコの PTGS (転写後型ジーンサイレンシング) を介した抑制現象として報告されているのみである。しかしながらリンドウの抑制現象は、これまでの解析から TGS (転写型ジーンサイレンシング) によるものであることが示されており、タバコで見出された現象とは異なる新規の現象であると考えられた。さらに 35S プロモーター配列がリンドウゲノム中にシングルコピーで導入された場合であっても、このプロモーター領域のメチル化を介した発現抑制が生じることが明らかとなった。したがってこの現象は、これまで TGS の主要な原因であるとされていた相同配列間の相互作用とは異なり、リンドウゲノムに導入された 35S プロモーター配列に対して特異的に誘導されることが示された。

一方、これまで形質転換が困難であるとされてきた植物種においては、その要因の一つとしてリンドウで認められた選抜マーカー遺伝子の発現抑制が生じていた可能性が考えられる。このことはメキシカンライムの形質転換体作出時に、非選抜条件下で得られた形質転換体の 30%以上がメチル化による発現抑制を受けており、選抜条件下ではこのような抑制個体がみられなかった、という報告 (Domínguez *et al.*, MGG 267, 544, 2002) が論拠になっている。したがってリンドウ以外の植物種においても、リンドウと類似した発現抑制現象によってマーカー遺伝子の発現抑制が高頻度に生じてしまい、その結果として形質転換効率 (選抜効率) が低いものが存在している可能性があると思われる。従って、このような発現抑制現象の抑制機構を明らかにすることは、高等植物の分子育種を行ううえでの有益な知見となることが期待される。

2. 研究の目的

研究代表者はアグロバクテリウム法で作出した組換えリンドウを解析する過程で、導入した CaMV (Cauliflower Mosaic Virus)-35S プロモーター領域のシトシン配列がメチル化されることにより、その転写が高頻度に抑制される現象を見出した。さらに導入された 35S プロモーターは、リンドウゲノム中にシングルコピーで存在する場合であっても発現抑制が引き起こされることから、相同な配列の相互作用に依存しない配列特異的なサイレンシング機構が働いていることが想定

された。また改変 35S プロモーターを導入した組換えリンドウの DNA メチル化解析により、*as-1* エレメントより上流の領域が存在するだけでメチル化が誘導されていることが示された。このようなプロモーター配列特異的な DNA メチル化は、プロモーター配列に相同性のある低分子 RNA により誘導される例が報告されているが、これまでリンドウにおいて 35S プロモーター配列に相同性のある低分子 RNA は検出されていない。一方、動物細胞では DNA 結合因子を介した DNA メチル化の例が報告されていることから、リンドウにおいても 35S プロモーター配列に結合する因子が DNA メチル化に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、*de novo* DNA メチル化が高頻度に誘導される領域を絞り込み、その領域に結合する DNA 結合因子の存在を調査した。

一方、エピジェネティックな遺伝子発現制御には、DNA メチル化以外にもヒストン修飾の変化が知られており、リンドウの外来遺伝子発現抑制においても、脱アセチル化やメチル化などのヒストン修飾パターンの変化が関与する可能性が示唆される。そこで本研究では外来遺伝子の発現抑制機構の解明を目的として、形質転換リンドウの懸濁培養細胞を用いて、DNA メチル化およびヒストン修飾と遺伝子発現抑制の関連性についても調査した。

このように本研究では、リンドウにおいて配列特異的にメチル化を引き起こす現象を DNA メチル化やヒストン修飾の両面から詳細に解析し、発現抑制の誘導機構を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) リンドウ培養細胞のヒストン修飾解析

35S-*sGFP* コンストラクトがゲノム中にシングルコピーのみ挿入されているリンドウの組換え懸濁培養細胞を用いて、DNA メチル化およびヒストン修飾と遺伝子発現抑制の関連性について調査した。実験に供試した懸濁培養細胞については、単一の形質転換イベントから得られた以下に示す異なる分化段階から誘導されたカルス由来の 2 系統を用いた。

①: 形質転換細胞の選抜時に得られた再分化を経ていないカルスを、液体培地に誘導して懸濁培養細胞を得た (初代培養細胞)。

②: ①で誘導されたカルスから再生した形質転換植物体より再度カルスを誘導し、懸濁培養細胞とした (再誘導培養細胞)。

これらの培養細胞について GFP 蛍光および *sGFP* mRNA の発現解析を行った。また bisulfite 法で 35S プロモーター領域の DNA メチル化を解析した。さらに、培養細胞から核を単離し、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

により、35S プロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基 (Lys4) および 9 番目のリジン残基 (Lys9) のジメチル化の各ヒストン修飾パターンを比較した。

さらに再誘導培養細胞に対し、DNA メチル化阻害剤 (5-aza-dC) およびヒストン脱アセチル化阻害剤 (TSA, sodium butyrate) をそれぞれ処理して GFP 蛍光の回復 (サイレンシングの解除) を観察した。

(2) 35S 配列に結合する核内因子の解析

35S-*sGFP* コンストラクトがシングルコピーで導入された組換えリンドウ植物体の葉よりゲノム DNA を抽出し、bisulfite 法により転写開始点より-674から+110までの784bpの領域についてメチル化シトシンの出現頻度を解析した。一方、野生型リンドウおよびタバコ植物体の葉より調整した核抽出物を用いて、35S プロモーターのエンハンサー領域 (-296 から-83) における Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) を行った。なお、解析領域において 5 塩基ずつ重複する 26 塩基の 2 本鎖 DNA を 10 種類設計し、プローブおよび競合 DNA として使用した。また、核因子の結合配列を絞り込むために、より短く変異を導入した競合 DNA を作成し、解析に使用した。

4. 研究成果

(1) リンドウ培養細胞のヒストン修飾解析

培養細胞の GFP 蛍光を観察したところ、初代培養細胞では GFP 蛍光が観察されたが、再誘導培養細胞では GFP 蛍光は確認されなかった。また *sGFP* mRNA の発現解析でも GFP 蛍光の有無を反映する結果となった。これら培養細胞における 35S プロモーター領域の DNA メチル化を解析したところ、GFP の発現抑制がみられた再誘導培養細胞で高頻度のメチル化が確認された。一方、初代培養細胞では、DNA メチル化が殆ど起きていないことが確認された。しかし興味深いことに 35S プロモーター配列の-148 から-85 までの領域の CpHpH シトシン配列では、低頻度ながら *de novo* DNA メチル化が観察された。また、ChIP アッセイの結果、再誘導培養細胞は初代培養細胞と比較してヒストン H3 のアセチル化が減少し、逆に Lys4 と Lys9 のジメチル化が増加していることが示された。したがって、*sGFP* の発現抑制が起きている再誘導培養細胞においては、35S プロモーター領域のヘテロクロマチン化が起きていることが示唆された。

さらに再誘導培養細胞に対し、5-aza-dC および TSA もしくは sodium butyrate をそれぞれ処理し、*sGFP* 遺伝子の発現抑制解除の有無を蛍光顕微鏡で確認したところ、5-aza-dC 処理でのみ GFP 蛍光の回復が観察された。これらの結果より、リンドウにおける外来遺伝子

発現抑制は、35S プロモーター領域における *de novo* DNA メチル化およびヒストンの脱アセチル化に起因すると思われるが、脱アセチル化の解除のみでは発現抑制が回復しないことが示された。また初代培養細胞に 5-aza-dC 処理を行った場合でも-148 から-85 までの領域のシトシンメチル化は解除されなかったことから、この領域の *de novo* DNA メチル化が発現抑制現象の初期に働いている可能性が示唆された。

(2) 35S 配列に結合する核内因子の解析

リンドウ植物体より調整した核抽出物において、35S エンハンサー領域の配列をプローブに用いた EMSA を行った結果、10 種のプローブのうち-275 から-250、および -149 から-124 の 2 種のプローブで、タバコ核抽出物を用いた場合と異なる顕著なバンドシフトが観察された。これら両領域は組換えリンドウにおいて確認された *de novo* DNA メチル化が高頻度に生じた 35S エンハンサー配列中の 2 つのピーク領域と一致し、また両結合領域には 2 種類のモチーフ (5' -GAAGA-3' および SV40 エンハンサー類似配列) が共に含まれていた。さらに EMSA の競合アッセイにより、リンドウには両領域に共通して結合する特異的な核因子が存在する可能性が示され、このような核因子と *de novo* DNA メチル化との関連性が示唆された。

本研究により、リンドウの核ゲノムに導入された時に DNA メチル化やヒストン修飾の変化を引き起こす原因となる配列が明らかにされた。この配列は植物ウイルスに由来するものであることから、リンドウ特異的なゲノムの恒常性維持に関わる機能が存在していることが推察された。このような基礎的知見を基にして、現在リンドウへの導入時に発現抑制がみられずに高発現が維持されるプロモーターの検討を行っている。本研究で得られた知見はリンドウのみならず、形質転換効率が低い植物種の分子育種に有益な情報をもたらすことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kei-ichiro Mishiba, Satoshi Yamasaki, Takashi Nakatsuka, Yoshiko Abe, Hiroyuki Daimon, Masayuki Oda, Masahiro Nishihara, Strict *de novo* methylation of the 35S enhancer sequence in gentian., PLoS ONE, 査読有, 5(3), 2010, e9670

② Takashi Nakatsuka, Kei-ichiro Mishiba, Akiko Kubota, Yoshiko Abe, Saburo Yamamura, Noriko Nakamura, Yoshikazu Tanaka, Masahiro Nishihara, Genetic engineering of

novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian.、Journal of Plant Physiology、査読有、167(3)、2009、231-237

〔学会発表〕(計5件)

- ①山崎識知、小田雅行、小泉望、中塚貴司、西原昌宏、三柴啓一郎、35Sプロモーターのエンハンサー領域に結合するリンドウ核因子と *de novo*メチル化の関係、日本育種学会、2010年3月26日、京都大学(京都府)
- ②山崎識知、小田雅行、大門弘幸、淨閑正史、箕作和彦、中塚貴司、西原昌宏、三柴啓一郎、リンドウ培養細胞を用いた外来遺伝子のエピジェネティクス解析、日本植物細胞分子生物学会、2009年7月30日、日本大学(神奈川県)
- ③中塚貴司、中村典子、三柴啓一郎、山村三郎、田中良和、西原昌宏、アントシアニンシル基転移酵素遺伝子抑制によるリンドウの花色改変、日本植物細胞分子生物学会、2009年7月30日、日本大学(神奈川県)
- ④山崎識知、小田雅行、大門弘幸、岸脇由季、中塚貴司、西原昌宏、三柴啓一郎、組換えリンドウのカルスにおける発現抑制の解析、日本育種学会、2008年10月11日、滋賀県立大学(滋賀県)
- ⑤三柴啓一郎、中塚貴司、山崎識知、柿崎裕子、阿部善子、西原昌宏、改変35Sプロモーター導入リンドウの *de novo*メチル化解析、日本植物細胞分子生物学会、2008年9月1日、大阪大学(大阪府)

〔その他〕

ホームページ等

(発表論文の情報)

<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0009670>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三柴 啓一郎 (MISHIBA KEI-ICHIRO)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：70390888

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：