

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570008

研究課題名（和文） 植物ヘテロクロマチン領域のサイレンシング機構の解明

研究課題名（英文） Silencing mechanisms of plant heterochromatin regions

研究代表者

土生 芳樹（HABU YOSHIKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：80266915

研究成果の概要（和文）：植物における内在性反復配列のサイレンシングに関わる因子群の関与を解析した結果、①主に MORPHEUS' MOLECULE1 (MOM1) が関与する機構、②RNA 依存性 DNA メチル化経路が関与する機構、③両者が冗長的に関与する機構が独立に存在することが示された。MOM1 の機能について詳細な解析を行い、MOM1 が一部の内在性領域のサイレンシング経路において DNA メチル化の下流で機能することなどを示す結果を得た。

研究成果の概要（英文）：We analyzed function of factors involved in silencing of endogenous repetitive elements in the plant genome. The results suggested the presence of three independent silencing pathways regulated by (1) MORPHEUS' MOLECULE1 (MOM1), (2) RNA-directed DNA methylation (RdDM), and (3) both of MOM1 and RdDM, respectively. Chromodomain is often found in MOM1 protein of plants other than Arabidopsis thaliana, but our analysis indicated that it is dispensable for silencing activity of MOM1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：サイレンシング、反復配列、シトシンメチル化、シロイヌナズナ、MORPHEUS' MOLECULE1

1. 研究開始当初の背景  
高等真核生物のゲノムにはトランスポゾン

を初めとする多くの反復配列が存在する。特にセントロメア周縁領域では、機能を失った

レトロトランスポゾンの残骸が集積され、高度に凝集したヘテロクロマチン構造を形成していることが知られている。セントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域に存在する反復配列の多くは、通常、転写レベルでのサイレンシングを受けていることが知られているが、ごく最近になって、分裂酵母を用いた解析から、細胞周期のS期において複製直後に一過的に転写された反復配列のRNAが、RNA interference (RNAi) の機構によって直ちに鋳型DNAを不活性化することが明らかにされた。植物においてもRNAiに関わるタンパク質やセントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域の特徴は類似しており、同様の機構が存在することが予想される。しかし、その一方で、酵母とは決定的に異なるメチル化シトシンの存在など、植物に特徴的な内在性反復配列のサイレンシング機構が存在することが示されている。

## 2. 研究の目的

RNA代謝に関わるさまざまな因子の単独変異体およびそれらと *mom1*、*dcl2* との二重変異体における *TSI* RNAの蓄積を解析し、*TSI* のサイレンシングにおける *DCL2* と *MOM1* の階層的關係を明らかにする。また、*DCL2* 遺伝子の誘導型ノックダウンにより、*TSI* サイレンシングの確立段階における *DCL2* の機能を明らかにする。さらにプロモーター領域に存在する反復配列の RdDM によって制御されているユークロマチン領域遺伝子のサイレンシングについて鋳型DNAのクロマチン修飾状態や関係する因子を解析し、セントロメア周縁部ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域反復配列の RdDM の確立と維持の相違点・共通点を明らかにする。加えて、*TSI* RNA のような non-coding RNA が RdDM を誘導する機構、特に non-coding RNA の分解と RNAi につ

いて、遺伝学的な方法によりその関係の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ユークロマチン領域の反復配列の RdDM の例として、遺伝子プロモーター領域に存在する反復配列のサイレンシングを取り上げ、ヘテロクロマチン領域反復配列の RdDM との比較を行う。解析対象とする *Suppressor of drm1drm2cmt3* (*SDC*; Henderson and Jacobsen 2008) のサイレンシングには、*MOM1* が必要であることを明らかにしている。*MOM1* が RdDM 確立後の不活性化状態維持に関与している可能性を検討するために、野生型と *mom1* 変異体における *SDC* 遺伝子プロモーター反復配列領域の DNA およびヒストンの修飾状態を解析する。反復配列領域は野生型で RdDM により高度にメチル化されていることが報告されており、予想が正しければ、*mom1* 変異体においてサイレンシングが解除されても DNA のメチル化状態は維持されたままのはずである。

(2) さまざまな RdDM 因子遺伝子などと *MOM1* の多重変異体における DNA メチル化やヒストン修飾の状態を解析する。これまでの解析から *mom1* 変異体では特定のゲノム領域の H3K9me2 が低下することが示されているが、non-CG メチル化が失われた *drm2 cmt3* 二重変異体では H3K9me2 はさらに低下する。ゲノム中の幾つかの反復配列について *MOM1* と RdDM 因子の関与を詳細に解析し、*MOM1* と RdDM 経路の関係を明らかにする。

(3) これまでに、異常 RNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) に関わる遺伝子の変異体 (*up-frameshift mutation*, *upf3*) と *mom1* の二重変異体では、

*mom1* 単独変異体と比較して *TSI* RNA の蓄積が減少することを明らかにしている。一方、*upf3* 単独変異体では、*TSI* の蓄積は見られない。これらの結果から、*TSI* RNA は①*mom1* 変異によるサイレンシング解除と NMD による分解とのバランスの上に蓄積されていること、②NMD による *TSI* RNA の分解産物は RNAi を誘導しないが、NMD が欠損した状況では一部の *TSI* RNA が RdDM による鋳型 *TSI* のサイレンシングを誘導している可能性が考えられる。さらに、mRNA の 3' プロセッシングを行うタンパク質遺伝子の変異体 (*fy*) と *mom1* の二重変異体でもこの仮説を支持する結果が得られている。この仮説を検証するために、異常 RNA の認識と RdDM 誘導に関わる因子の変異体 (*rdr6*, *dc14* など) と *mom1 upf3* および *mom1 fy* との三重変異体を作成し、*TSI* RNA の蓄積が *mom1* 単独変異体のレベルに回復するか否かを調べる。

(4) これまでに明らかになっている限り、イネなどシロイヌナズナ以外の植物の MOM1 にはクロモドメインが存在する。クロモドメインはメチル化リシンの認識に関わることが知られており、RdDM とヒストンメチル化をつなぐ MOM1 の機能を知る上で重要な意味を持つことが予想される。これまでの解析からイネに存在する 2 つの *MOM1* 遺伝子の片方 (*OsMOM1b*) の変異体で活性化される内在性トランスポゾン様因子の存在が明らかになっている。この変異体にクロモドメイン部分を改変した *OsMOM1b* 遺伝子を導入し、内在性トランスポゾンのサイレンシングを指標とした相補実験を行う。並行して野生型 *OsMOM1b* 遺伝子を導入した相補実験を行い、MOM1 によるサイレンシングにおけるクロモドメインの必要性を明らかにする。

(5) 酵母での報告から類推して、シロイヌナズナでは複製直後に転写された *TSI* RNA が DCL2 によってプロセスされ、RdDM による鋳型 *TSI* の不活性な状態形成が行われているものの、*dc12* 変異体ではこのプロセスが機能しないために *TSI* RNA 蓄積されていることが予想される。この点を検証するために、*DCL2* cDNA の一部を用いた誘導型 RNAi ベクターを構築し、植物のさまざまな生長段階での *DCL2* 遺伝子のノックダウンが *TSI* RNA の蓄積に及ぼす影響を調べる。上記の仮説が正しければ、すでに分裂を停止した器官において *DCL2* 遺伝子をノックダウンしても *TSI* RNA の蓄積は見られないはずである。

#### 4. 研究成果

(1) ゲノムタイリングアレイ解析により *mom1* 変異体での活性化が確認された内在性遺伝子のうち、ユークロマチン領域に存在する *SDC* 遺伝子はプロモーター領域タンデムリピートの RNA 依存的 DNA メチル化 (RdDM) により不活性な状態に保たれている。バイサルファイト解析の結果、*mom1* 変異体では、*SDC* 遺伝子タンデムリピートの DNA メチル化は野生型と変わらず、タンデムリピート由来の small RNA の蓄積も変化なかった。これらの結果から、MOM1 が *SDC* 遺伝子のタンデムリピートに作用する RdDM の下流で、または独立に機能する可能性が考えられた。クロマチン免疫沈降法によりタンデムリピート領域のヒストン修飾状態を調べたところ、野生型個体に見られる低レベルのジメチル化ヒストン H3 lysine9 (H3K9me2) が *mom1* 変異体では低下していることが示され、MOM1 は RdDM 標的遺伝子のヒストンメチル化の維持に関与していることが明らかになった。

(2) ①*mom1* 変異体で強く活性化されるトラ

ンスポゾン様ゲノム領域 (*AtISI12A*、*MULE-F19G14*) は non-CG メチル化機能を失った *drm2cmt3* 二重変異体では弱い活性化しか示さず、*mom1drm2cmt3* 三重変異体でも *mom1* 変異体と同程度の活性化を示す。一方で、②プロモーター領域タンデムリピートのメチル化により制御される *SDC* 遺伝子は、*mom1* 変異体では弱い活性化しか示さないが、*drm2cmt3* 二重変異体で強く活性化され、*mom1drm2cmt3* 三重変異体でも *drm2cmt3* 二重変異体と同程度の活性化を示す。さらに、③トランスポゾン様配列である *ROMANIAT5* は、*mom1* 変異体および *drm2cmt3* 二重変異体のいずれにおいても弱い活性化を示すが、*mom1drm2cmt3* 三重変異体では強く活性化される。以上のことから、①の領域のサイレンシングでは MOM1 が、②の領域では non-CG メチル化が主なサイレンシング経路として寄与し、③の領域では MOM1 と non-CG メチル化経路が冗長的にサイレンシングに寄与する可能性が考えられた。また、これらの領域における non-CG メチル化の程度はさまざまだが、これらのメチル化の程度と上述の多重変異体における活性化のパターンに明確な関連性は見られなかった。

(3) 異常 RNA 分解経路に関わる遺伝子 (*UPF1*、*UPF3*) の変異体と *mom1* 変異体、さらに RdDM 経路で機能する *RDR2* 遺伝子および PTGS 経路で機能する *RDR6* 遺伝子の変異体をさまざまに組合せた多重変異体を作製した。*mom1rdr6* 二重変異体では予想に反して *TSI* RNA 蓄積量が減少することが明らかとなり、MOM1 経路と *RDR6* が関与する PTGS 経路の両方が欠損することで、異常 RNA を分解する別経路が活性化される可能性が示された。さらに *mom1upf3rdr2* 三重変異体で極めて特徴的な形態異常が現れることが、明らかとなり、上

述の RNA 分解経路に *UPF3* が関わる RNA 分解経路が関与する可能性が示された。

(4) MOM1 によるサイレンシング機構におけるクロモドメインの必要性を検証するために、イネを用いた解析を行った。イネには MOM1 遺伝子が 2 コピー存在するが、これまでの解析から、そのうちの片方 (*MOM1b*) が内在性トランスポゾン様配列 (*Pong6*) のサイレンシングに必要であることが明らかになっている。2kb のプロモーター領域を含む野生型 *MOM1b* 遺伝子およびクロモドメインがメチル化リシンに結合する機能に必須の役割を果たすアミノ酸残基に変異を導入した変異型 *MOM1b* 遺伝子に triple HA タグを結合して *mom1b* 遺伝子変異体に導入し、*Pong6* の RNA 蓄積量を指標とした相補実験を行ったところ、野生型、変異型いずれの *MOM1b* 遺伝子の導入個体においても *Pong6* の発現抑制が見られた。このことは、イネ MOM1 に存在するクロモドメインがサイレンシング機能に必要ではないことを示唆する。他の植物種の MOM1 タンパク質が持つ PHD finger などのクロマチン関連モチーフもシロイヌナズナ MOM1 には存在しないことと合わせて、MOM1 が CHD3 タンパク質から進化してきた過程で、クロモドメインや PHD finger などのドメインを必要としない特殊なサイレンシング機構を獲得したことが考えられる。

(5) *dc12* 変異体における *TSI* の活性化について詳細に調べるために、*dc12-1* 変異体と *mom1-2* 変異体との交配により二重変異体を作製し、F2 世代での *TSI* RNA の蓄積を解析したところ、予想外に *TSI* の活性化は *dc12-1* 変異とはリンクしないことが明らかになった。さらに、新たに取得した *dc12-2* および *dc12-3* 変異体においても *TSI* RNA の蓄積は認

められなかった。以上の結果から、*dc12-1* 変異体における *TSI* の活性化は *DCL2* 以外の未知遺伝子の変異による可能性が示唆されたため、これ以上の解析は行わないこととした。

#### 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 7 件)

1. Morita Y, Saito R, Ban Y, Tanikawa N, Kuchitsu K, Ando T, Yoshikawa Ma, Habu Y, Ozeki Y, Nakayama M (2012) Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor phenotype in *Petunia hybrida*. *Plant J* 70:739-749 査読有

2. Kanno T, Habu Y (2011) siRNA-mediated chromatin maintenance and its function in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1809:444-451 査読有

3. 吉川学, 菅野達夫, 土生芳樹 (2011) 植物における RNA サイレンシング機構: 転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) と転写型ジーンサイレンシング (TGS) 細胞工学 p. 706-711 学研メディカル秀潤社 査読無

4. Numa H, Kim J-M, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Mochizuki Y, Kimura H, Shinozaki K, Toyoda T, Seki M, Yoshikawa M, Habu Y (2010) Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 29:352-362 査読有

5. Habu Y, Yoshikawa M (2010) Locus-specific dependency of endogenous silent loci on MOM1 and non-CG methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 5:724-726 査読有

6. Habu Y (2010) Epigenetic silencing of endogenous repetitive sequences by MORPHEUS' MOLECULE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Epigenetics* 5: 562-565 査読無

[学会発表] (計 15 件)

1. 土生芳樹 (2011) クロマチン修飾を介した植物のゲノム組成改変 第 17 回京都府立大学植物バイテクシンポジウム「エピゲノム研究の展開と植物科学」

2. 土生芳樹 (2009) 育種におけるクロマチン修飾: 減数分裂期組み換えとのかかわり 日本育種学会シンポジウム「RNA サイレンシング研究の新展開とその育種の利用に向けた展望」 日本育種学会 2009 年秋季大会

3. 土生芳樹 (2009) ゲノムタイリングアレイが拓くヘテロクロマチンサイレンシングの新局面 日本植物生理学会シンポジウム「植物科学におけるタイリングアレイと次世代シーケンサーの利用」 第 50 回日本植物生理学会年会

[図書] (計 1 件)

1. Arita K, Kanno T, Yoshikawa M, Habu Y (2011) Mechanisms linking cytosine methylation to histone modification in *Arabidopsis thaliana*. In: Non coding RNAs in plants. (Erdmann VA, Barciszewski J, Eds), Springer (Heidelberg, Germany),

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nias.affrc.go.jp/press/20100>

121/

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土生 芳樹 (HABU YOSHIKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノム機能  
改変研究ユニット・主任研究員

研究者番号：80266915

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：