様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ２０６２８

研究課題名（和文）クロマチンリモデリング因子DDM1複合体の同定およびトランスポゾン標的機構の解明

研究課題名（英文）Identification of protein complex containing the chromatin remodeling factor DDM1 and characterization of its targeting mechanism on transposons

研究代表者

越阪部　晃永（Osakabe, Akihisa）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任助教

研究者番号：７０６３２１０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究にて、トランスポゾン上の抑制型エピゲノム修飾の維持に重要なクロマチンリモデリング因子Decrease in DNA methylation 1（DDM1）を含む複合体を単離・精製し、DDM1と相互作用する因子群を質量分析によって同定した。得られた相互作用因子について、T-DNAが挿入された変異植物を用いてメチル化DNAをゲノムワイドに解析した結果、多くの変異植物において、DDM1機能喪失植物で観察されるような大規模な脱メチル化は観察されなかった。一方で、同定された因子と類似したドメインを有する遺伝子の変異植物では、トランスポゾン上のメチル化レベルが野生型植物に比べて下がる結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
トランスポゾンは動植物ゲノムの進化に重要な役割を果たす一方、その可動的な性質からゲノム恒常性維持に脅威をもたらすことが知られている。また、DDM1の哺乳類オルソログHELLS/LSHの機能喪失に伴うヘテロクロマチン中の脱メチル化がICF患者で確認されている。したがって、DDM1を含む複合体によるトランスポゾンの標的および鎮静化機構を明らかにすることで、植物のエピジェネティクス研究分野にとどまらず、動植物に共通した機構、さらにエピゲノム異常を示す疾病の分子機構の解明に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the current study, I isolated and purified the protein complex containing the chromatin remodeling factor Decrease in DNA Methylation 1 (DDM1), which functions in the maintenance of repressive epigenetic marks over transposons in Arabidopsis thaliana, and identified the candidates binding to DDM1 by mass spectrometry. I obtained Arabidopsis T-DNA insertion lines and performed the genome-wide DNA methylation analyses. As a result, DNA methylation levels in most of mutant plants were not reduced as observed in ddm1 mutant plants. However, a mutant plant of one gene, of which domains are similar to the binding candidate identified in this study, showed the reduction of DNA methylation over transposons compared to wild type plants.

研究分野：分子生物学、生化学、遺伝学

キーワード：トランスポゾン　ペリセントロメア　ヘテロクロマチン　メチル化DNA　クロマチンリモデリング

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

動植物のゲノムは可動性 DNA（トランスポゾン）などの反復配列を多量に含む。これらの配列はゲノムの安定性にとって潜在的に有害であり、DNA やクロマチン構成因子ヒストン H3 のメチル化などのエピゲノム修飾を受けて鎮静化されている。クロマチンリモデリング因子 Decrease in DNA methylation 1（DDM1）はトランスポゾンなどの反復配列における抑制修飾の維持に関わる因子として、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析によって同定された。これまでに、*ddm1* 変異植物体においてペリセントロメア上の抑制修飾が失われ、それに伴いトランスポゾンの脱抑制・可動化による近隣遺伝子の発現撹乱が観察されている。研究代表者がこれまでに実施した生化学的解析とシロイヌナズナを用いた分子遺伝学・ゲノム生物学的解析によって、DDM1 がヘテロクロマチン特異的なヒストンの亜種（バリアント）H2A.W をペリセントロメア領域に運び、トランスポゾンの発現を抑制するという新規機構を明らかにした（文献 1）。このように DDM1 によるトランスポゾンの沈静化機構は明らかになったものの、DDM1 がどのようにしてトランスポゾンを他の遺伝子群と区別しているのか、どのようにして H2A.W をペリセントロメア領域へ特異的に運び込むのかは依然不明であった。

＜引用文献＞

① Osakabe, A *et al.* The chromatin remodeler DDM1 prevents transposon mobility through deposition of histone variant H2A.W. Nature Cell Biology 23, 391–400 (2021).

２．研究の目的

本研究の目的は、DDM1 を含むクロマチンリモデリング複合体を同定し、生化学・分子遺伝学的解析によって DDM1 複合体のトランスポゾン認識機構およびその鎮静化機構を明らかにすることである。クロマチンリモデリング因子はその ATP 加水分解活性を介して、ヌクレオソームの交換や移動を触媒することが知られている。さらに、多くのクロマチンリモデリング因子は特異的な機能獲得のために他の因子と相互作用して複合体を形成する。そこで本研究では、DDM1 の機能特異性を担保する因子の同定および機能解析を行うことを目指した。DDM1 の哺乳類オルソログ HELLS/LSH の機能欠損が DDM1 機能喪失植物体と同様の表現型を示すことから、本研究の達成により、植物のエピジェネティクス研究分野にとどまらず、動植物に共通した機構、さらにエピゲノム異常を示す疾病の分子機構の解明に結びつくことが期待される。

３．研究の方法

本研究を遂行するために、研究代表者が独自に作製したリコンビナント DDM1 に対する抗 DDM1 抗体（図 1）を用いて、シロイヌナズナから抽出したタンパク質溶液から DDM1 を含む複合体を単離・精製し、質量分析によって DDM1 相互作用因子の探索を行なった。さらに、得られた DDM1 相互作用候補因子の T-DNA 挿入型変異植物をパブリックリソースから取得し、変異植物におけるトランスポゾン上の DNA メチル化のレベルをゲノムワイドに解析した。

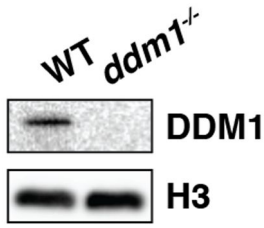

図 1. 抗 DDM1 抗体のウェスタンブロッティングによる評価

４．研究成果

（１）DDM1 を含む複合体の単離・精製

まず、シロイヌナズナ由来の培養細胞 T87 細胞からタンパク質溶液を抽出する方法を検討した。これまでに実施したウェスタンブロッティングに用いたサンプルは DNA を含むクロマチン画分であったため、DDM1 複合体を含み、かつ DNA を含まない可溶性核タンパク質溶液を得る必要があった。塩濃度や界面活性剤等の条件を検討した結果、内在性 DDM1 タンパク質を含む核タンパク質溶液の抽出に成功した。この核タンパク質溶液を用いて、作製した抗 DDM1 抗体と混合して免疫沈降を行い、DDM1 を含む複合体の単離・精製を行なった。ウェスタンブロットおよび SDS-PAGE による解析の結果、DDM1 に対応するバンド以外にも複数のバンドが検出されたことから、DDM1 を含むタンパク質複合体が得られたことが示唆された（図 2）。

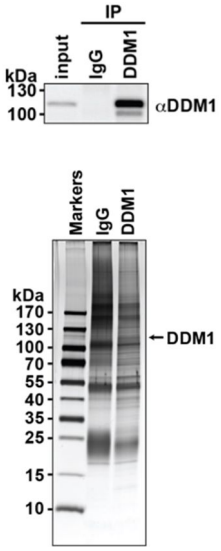

図 2. 抗 DDM1 抗体を用いた免疫沈降の結果（上：ウェスタンブロッティング、下：銀染色）

（２）DDM1 相互作用因子の質量分析による同定

次に、免疫沈降サンプルから DDM1 と相互作用する因子群を質量分析によって同定を試みた。3 回の独立した免疫沈降および質量分析を行った結果、68 種類のタンパク質が再現良く DDM1 との相互作用因子の候補として同定された（図 3）。そのうち、核内で局在・機能することが予想されるドメインを有する 16 種類のタンパク質に絞り込んだ。今回同定した DDM1 相互作用候補因子には、これまでに DDM1 との相互作用が報告されていないクロマチン結合因子や機能未知のタンパク質が含まれていた。

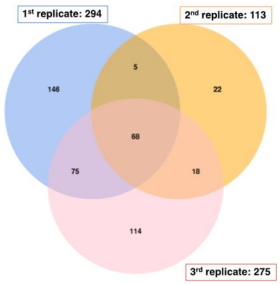

図 3. 質量分析によって得られた DDM1 相互作用因子候補の数

（３）DDM1 相互作用因子の変異植物におけるメチル化 DNA の解析

質量分析による解析で DDM1 相互作用因子の候補として得られた 16 種類のうち 12 種類のタンパク質について、それらをコードする遺伝子領域に T-DNA が挿入された変異植物を合計 20 系統取得した。取得した変異植物体からゲノム DNA を抽出し、野生型と DDM1 機能喪失植物体をコントロールとして用いて、Enzymatic methyl-seq（EM-seq）によってメチル化 DNA をゲノムワイドに解析した。解析の結果、多くの変異植物において、DDM1 機能喪失植物体で観察されるような大規模な脱メチル化は観察されなかった（図 4）。このことから、今回の質量分析で同定

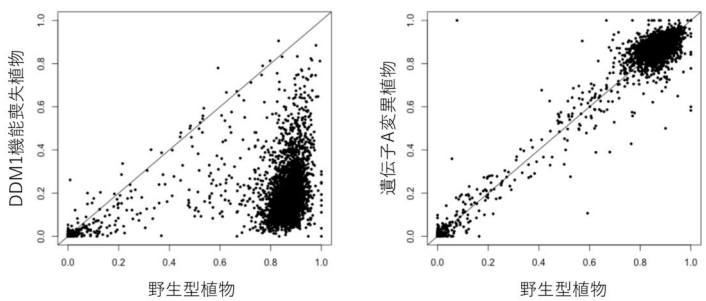

図４．野生型および変異植物におけるトランスポゾン上におけるメチル化 DNA の解析

された因子と DDM1 との相互作用はアーティファクトか、もしくは同定された因子が複合体形成を介して協調して DDM1 のトランスポゾン特異的な集積に関わることが考えられる。一方で、今回の質量分析で得られた相互作用因子と類似したドメインを有する遺伝子の T-DNA 挿入型変異植物を用いて同様の解析を行った結果、トランスポゾン上のメチル化レベルが野生型植物に比べて下がる結果が得られた。

本研究で得られた成果をもとに引き続き多重変異体を用いた解析や試験管内再構成クロマチンを用いた生化学的解析を行うことで、DDM1 相互作用因子を介した DDM1 のトランスポゾン標的機構およびトランスポゾン鎮静化機構の詳細を明らかにしたい。

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　2件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Osakabe Akihisa、Jamge Bhagyshree、Axelsson Elin、Montgomery Sean A.、Akimcheva Svetlana、Kuehn Annika Luisa、Pisupati Rahul、Lorkovic Zdravko J.、Yelagandula Ramesh、Kakutani Tetsuji、Berger Frederic	４．巻 23
２．論文標題 The chromatin remodeler DDM1 prevents transposon mobility through deposition of histone variant H2A.W	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Nature Cell Biology	６．最初と最後の頁 391～400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-021-00658-1	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 Osakabe Akihisa、Molaro Antoine	４．巻 135
２．論文標題 Histone renegades: Unusual H2A histone variants in plants and animals	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	６．最初と最後の頁 35～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2022.05.001	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10件（うち招待講演　1件／うち国際学会　3件）

１．発表者名 越阪部晃永、Bhagyshree Jamge、Elin Axelsson、Annika Luisa Kuehn、Sean Akira Montgomery、Svetlana Akimcheva、Rahul Pisupati、Ramesh Yelagandula、角谷徹仁、Frederic Berger
２．発表標題 クロマチンリモデリング因子によるトランスポゾン鎮静化機構
３．学会等名 日本遺伝学会第93回大会
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 越阪部晃永、山﨑慈恵、田中祐梨子、Bhagyshree Jamge、Zdravko Lorkovic、Frederic Berger、角谷徹仁
２．発表標題 ヒストンバリアントのダイナミクスを介したトランスポゾン発現制御機構
３．学会等名 第44回分子生物学会年会
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名
Akihisa Osakabe, Bhagyshree Jamge, Elin Axelsson, Sean A Montgomery, Svetlana Akimcheva, Annika Luisa Kuehn, Rahul Pisupati, Zdravko J Lorkovic, Ramesh Yelagandula, Tetsuji Kakutani, Frederic Berger

２．発表標題
The chromatin remodeling factor DDM1 mediates the deposition of heterochromatic histone variant for TE silencing

３．学会等名
Cold Spring Harbor Asia, Integrative Epigenetics in Plants Pre-conference（国際学会）

４．発表年
2021年～2022年

１．発表者名
越阪部晃永、山﨑慈恵、田中祐梨子、Bhagyshree Jamge、Zdravko Lorkovic、Frederic Berger、角谷徹仁

２．発表標題
ヒストンバリアントによるトランスポゾン発現制御機構

３．学会等名
第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会

４．発表年
2021年～2022年

１．発表者名
越阪部晃永，山﨑慈恵，Jamge Bhagyshree，田中祐梨子，小川公美，Lorkovic Zdravko，Berger Frederic，角谷徹仁

２．発表標題
クロマチンリモデリング因子によるヒストンバリアントダイナミクスを介したトランスポゾン調節機構

３．学会等名
第15回日本エピジェネティクス研究会年会

４．発表年
2022年～2023年

１．発表者名
越阪部晃永，山﨑慈恵，Jamge Bhagyshree，田中祐梨子，小川公美，Lorkovic Zdravko，Berger Frederic，角谷徹仁

２．発表標題
遺伝子様エピゲノムを獲得したトランスポゾンの発現調節機構

３．学会等名
第94回日本遺伝学会大会

４．発表年
2022年～2023年

１．発表者名
越阪部晃永，山﨑慈恵，Jamge Bhagyshree，田中祐梨子，小川公美，Lorkovic Zdravko，Berger Frederic，角谷徹仁

２．発表標題
ヒストンバリアントのダイナミクスを介したトランスポゾン調節機構

３．学会等名
第95回日本生化学会大会（招待講演）

４．発表年
2022年～2023年

１．発表者名
越阪部晃永，滝沢由政，堀越直樹，Berger Frederic，胡桃坂仁志，角谷徹仁

２．発表標題
DDM1によるクロマチンリモデリング活性とそのヒストンバリアント嗜好性

３．学会等名
第45回日本分子生物学会年会

４．発表年
2022年～2023年

１．発表者名
Akihisa Osakabe, Yoshimasa Takizawa, Naoki Horikoshi, Frederic Berger, Hitoshi Kurumizaka, Tetsuji Kakutani

２．発表標題
Structural and biochemical analyses for the chromatin remodeling activity of DDM1

３．学会等名
CHSA meeting on Integrative Epigenetics in Plants（国際学会）

４．発表年
2022年～2023年

１．発表者名
Akihisa Osakabe, Bhagyshree Jamge, Elin Axelsson, Sean A Montgomery, Svetlana Akimcheva, Annika Luisa Kuehn, Rahul Pisupati, Zdravko J Lorkovic, Ramesh Yelagandula, Tetsuji Kakutani, Frederic Berger

２．発表標題
DDM1 silences transposons by deposition of the histone variant H2A.W

３．学会等名
International symposium on chromatin architecture: structure and function（国際学会）

４．発表年
2023年

〔図書〕　計1件

１．著者名 越阪部晃永、Frederic Berger	４．発行年 2021年
２．出版社 羊土社	５．総ページ数 4
３．書名 実験医学2021年9月号　Current Topics 「クロマチンリモデリング因子DDM1によるパラサイトDNAの鎮静化機構」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者が所属する研究室のホームページ http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~iden/

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