様式Ｃ－１９

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 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2010 ～ 2012
課題番号：22658001
研究課題名（和文）　植物におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御を利用した新規機能性成分の分析系
研究課題名（英文）　Development of assay systems involving epigenetic control of gene expression to identify novel functional components in plants
研究代表者
金澤　章（KANAZAWA AKIRA）
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：30281794

研究成果の概要（和文）：植物成分の持つ未知の機能を探索する観点から、エピジェネティックな機構による転写不活性化を受けている状態にあるレポーター遺伝子を持つ形質転換植物を利用して、物質の持つ DNA メチル化の抑制効果および転写不活性化状態を解除する効果を検出する系を開発した。この系を利用することで、イソフラボンの一種であるゲニステインが、植物細胞でこの活性を持つ植物由来の物質として初めて同定された。

研究成果の概要（英文）：In terms of finding novel functions of plant-derived compounds, assay systems for inhibitory activity of DNA methylation and transcriptional repression were developed using transgenic plants that carry an epigenetically silenced transgene. Through these assays, genistein, an isoflavonoid, was identified as the first plant-derived compound that had such an activity in plant cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総　計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：農学
科研費の分科・細目：農学、育種学
キーワード：植物・機能性成分・エピジェネティクス・シトシンメチル化・転写抑制

１．研究開始当初の背景

植物には、抗酸化活性、免疫系の亢進効果、抗ウイルス活性、ホルモン様活性などを持つさまざまな機能性成分が存在し、それらは摂取されることを通して人間の健康維持に役立っている。植物成分に含まれる物質の持つ未知の機能を明らかにするには、それを検出する新たなアッセイ系の開発が求められる。本研究の研究代表者は、以下に述べる経緯から、DNA メチル化を抑制することを介して、がん抑制等の効果を持つ機能性植物成分を同定する新規なアッセイ系を着想するに至

った。

近年、低分子 RNA の機能を介した DNA のメチル化やヒストンタンパク質の修飾を含むエピジェネティックな機構による遺伝子発現制御に関して、さまざまな真核生物において研究が進展している。研究代表者は、1990 年代後半より植物のジーンサイレンシングに関する研究に着手し、外来遺伝子がエピジェネティックな機構により転写不活性化される現象を見出すとともに(Kanazawa et al. 2007)、新規な RNA ウイルスベクターを作出して(Otagaki et al. 2006; Nagamatsu et al. 2007)、配列特異的な DNA のメチル化ならびに、それを介した遺伝子の転写不活性化を、既存のベクターを用いた場合よりも早く誘導することに成功している(Otagaki et al. 2006)。これらの研究成果に基づき、研究代表者は、外来遺伝子の転写不活性化が起きている植物を DNA のメチル化を抑制する活性をもつ物質の存在下で育成することにより、DNA メチル化、および転写抑制の状態をモニターすることが可能であることを見出した。研究代表者は、この原理を利用することにより、植物成分中における DNA メチル化酵素の抑制効果をもつ物質の同定を可能にするアッセイ系を開発することを着想した。

エピジェネティックな遺伝子発現制御の機構に関しては、さまざまな真核生物を対象として研究が進展している。しかしながら、エピジェネティックな転写不活性化を人為的に誘導し、それを農学・医学等の研究に利用するという試みは、研究代表者の知る限り存在しなかった。本研究は、植物のエピジェネティックな現象を積極的に利用するという点において、農学ならではの学術的な特色を発揮できるものと考えた。

ヒトにおいて DNA のメチル化は、がん抑制遺伝子の正常な発現を妨げることを介して、がん化を誘導することが知られている。また、老化の一因にもなっていると考えられる。したがって、本研究における DNA メチル化抑制物質のスクリーニングは、植物成分中に含まれる新規ながん抑制物質、ならびに、老化抑制物質を同定することにつながると期待できる。これまでに、植物におけるエピジェネティックな変化の誘導活性を指標にした植物成分の分析は行われていないため、新規な機能性成分を同定する手段として有効であると研究代表者は考えた。

上記のことに加え、近年、エピジェネティックな変化を遺伝子特異的あるいはゲノム上にランダムに誘導することを介して、有用な植物系統を作出する試みがなされている。本研究で植物においてエピジェネティックな変化を誘導する新規な成分が同定された場合、そのような物質は既存の同様な活性を持つ物質と異なる変異スペクトルを持つエピ変異原として利用可能であると期待された。

２．研究の目的

エピジェネティックな機構による転写不活性化を受けている状態にあるレポーター遺伝子を持つ形質転換植物を利用して、その不活性化状態を解除する効果を持つ植物成分のスクリーニング系を開発する。この系を利用することにより、がんの発症や老化を抑制してヒトの健康維持に役立つ植物成分や、植物に対する新規なエピ変異原として利用可能な植物成分など、植物成分の持つ新規な機能を明らかにすることが可能になるものと期待される。

３．研究の方法

(1) プロモーター配列中のシトシンのメチル化を介して転写不活性化されたレポーター遺伝子を持つ植物系統の作出

RNA ウイルス (*Cucumber mosaic virus*) を元にして作成されたベクター(Otagaki et al. 2006)のクローニングサイトに *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S プロモーターの配列を挿入し、その核酸を持つウイルスを、CaMV 35S プロモーターの制御下で転写される green fluorescent protein (*GFP*) 遺伝子をゲノムに組み込んである *Nicotiana benthamiana* 植物体に対して接種することにより、このプロ

モーターのメチル化および *GFP* 遺伝子の転写不活性化を誘導した。この植物体を自殖させて得た次世代種子をメチル化抑制効果の検出実験に用いた。

同様に、研究代表者が保持していた、CaMV 35S プロモーターにエピジェネティックな変化が起きることで、転写不活性化された外来遺伝子を持つペチュニア系統 (Kanazawa et al. 2007)の種子を実験に用いた。

(2) メチル化抑制効果の検出

種子をシトシンメチル化を抑制する効果を持つ物質を含む培地に無菌的に播種した。GFP タンパク質の蛍光観察、*GFP* 遺伝子の mRNA 量の定量による転写不活性化からの解除効果の解析、ならびに bisulfite sequencing 法によるプロモーター中のシトシンメチル化頻度の解析により、培地に添加した物質の持つメチル化抑制効果を解析した。

４．研究成果

(1) 物質の持つメチル化抑制効果の検出系の開発

植物に含まれる新規機能性成分を同定することを目的とし、エピジェネティックな機構による転写不活性化を受けている状態にあるレポーター遺伝子を持つ形質転換植物を利用して、その不活性化状態を解除する効果を持つ植物成分のスクリーニング系の開発を行った。それは、以下の二つの段階を含む方法による。1) 低分子二本鎖 RNA の持つ機能を利用して、植物に導入されているレポーター遺伝子の転写制御を行うプロモーター配列中のシトシンメチル化を誘導し、レポーター遺伝子を転写不活性化状態にする。2) 自殖により得た次世代の植物に対して、シトシンメチル化を抑制する効果を持つ物質を与えた場合に起きるレポーター遺伝子発現の復帰を指標にして、物質をスクリーニングする系を確立する。この方法を確立するための第一段階として、新規な RNA ウイルスのベクターのクローニングサイトに CaMV 35S プロモーターの配列を挿入し、その核酸を持つウイルスを、CaMV 35S プロモーターの制御下で転写される *GFP* 遺伝子をゲノムに組み込んである *Nicotiana benthamiana* 植物体に対して接種した。これにより、このプロモーターのメチル化および *GFP* 遺伝子の転写不活性化が誘導された。また、次世代の植物においてもシトシンのメチル化および転写不活性化の状態が維持されていることを確認した。植物体を多数育成し、スクリーニングに使用する自殖種子を得た。この種子を無菌培地に播種し、植物体を育成した。その際、培地中に 5-azacytidine、および、trichostatin A を正の対照として加え、植物体においてメチル化抑制および *GFP* 遺伝子の転写抑制解除が起きることを確認した。

(2) メチル化抑制効果を持つ植物成分の探索

メチル化抑制効果を持つ可能性がある植物成分を検討し、ダイズ種子に多く含まれるイソフラボンの一種、ゲニステインがこの効果を持つことを見出した。上記のアッセイ系に加え、自然に起きたエピジェネティックな変化により、より安定に転写不活性化された、CaMV 35S プロモーターに制御される外来のカルコン合成酵素遺伝子を持つペチュニアを用いて、同様の実験を行った。その結果、上記の *GFP* 遺伝子を用いた時と同様に、メチル化抑制効果を持つと想定される物質の作用により、外来遺伝子の mRNA 量の増加ならびにプロモーターのメチル化頻度の低下が検出された。これらの効果は、既知のメチル化抑制物質に加え、上記の系で新たにその効果を見出したゲニステインに関しても検出された。

以上の研究により、転写が不活性化された状態にある外来遺伝子を持つ植物を利用して、物質の持つ DNA のメチル化抑制効果を検出する二つの系を開発するとともに、植物においてその活性を持つ新規の物質を同定した。

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 18 件）

① Kasai, M., Matsumura, H., Yoshida, K., Terauchi, R., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2013) Deep sequencing uncovers commonality in small RNA profiles between transgene-induced and naturally occurring RNA silencing of chalcone synthase-A gene in petunia. *BMC Genomics* 14, 63. 査読有り doi: 10.1186/1471-2164-14-63

② Otagaki, S., Kasai, M., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2013) Enhancement of RNA-directed DNA methylation of a transgene by simultaneously downregulating a *ROS1* orthologue using a virus vector in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Genet.* 4, 44. 査読有り doi: 10.3389/fgene.2013.00044

③ Kasai, M. and Kanazawa, A. (2013) Induction of RNA-directed DNA methylation and heritable transcriptional gene silencing as a tool to engineer novel traits in plants. *Plant Biotechnol.* (in press) 査読有り

④ Koide, Y., Shinya, Y., Ikenaga, M., Sawamura, N., Matsubara, K., Onishi, K., Kanazawa, A. and Sano, Y. (2012) Complex genetic nature of sex-independent transmission ratio distortion in Asian rice species: the involvement of unlinked modifiers and sex-specific mechanisms. *Heredity* 108, 242-247. 査読有り doi: 10.1038/hdy.2011.64

⑤ Kasai, M., Koseki, M., Goto, K., Masuta, C., Ishii, S., Hellens, R. P., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2012) Coincident sequence-specific RNA degradation of linked transgenes in the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 78, 259-273. 査読有り doi: 10.1007/s11103-011-9863-0

⑥ Arase, S., Kasai, M. and Kanazawa, A. (2012) *In planta* assays involving epigenetically silenced genes reveal inhibition of cytosine methylation by genistein. *Plant Methods* 8, 10. 査読有り doi: 10.1186/1746-4811-8-10

⑦ Takahashi, R., Morita, Y., Nakayama, M., Kanazawa, A. and Abe, J. (2012) An active CACTA-family transposable element is responsible for flower variegation in wild soybean *Glycine soja*. *Plant Genome* 5, 62-70. 査読有り doi: 10.3835/plantgenome2011.11.0028

⑧ Kasai, M. and Kanazawa, A. (2012) RNA silencing as a tool to uncover gene function and engineer novel traits in soybean. *Breeding Sci*. 61, 468-479. 査読有り doi: 10.1270/jsbbs.61.468

⑨ 金澤 章、河西めぐみ (2012) 植物改変の新技術：エピジェネティックな遺伝子発現制御 BIO INDUSTRY 29 巻 8 号, 26-34 査読なし

⑩ Kanazawa, A., Inaba, J., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B. M., Goto, K. and Masuta, C. (2011) Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *Plant J.* 65, 156-168. 査読有り doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04401.x

⑪ Wang, X., Yamada, T., Kong, F., Abe, Y., Hoshino, Y., Sato, H., Takamizo, T., Kanazawa, A. and Yamada, T. (2011) Establishment of an *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation system in *Miscanthus sinensis* Anderss., a potential bioenergy crop. *Global Change Biology Bioenergy* 3, 322-332. 査読有り doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01090.x

⑫ Arase, S., Hase, Y., Abe, J., Kasai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Narumi, I., Tanaka, A. and Kanazawa, A. (2011)

Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants. *Plant Biotechnol.* 28, 323-329. 査読有り doi: 10.5511/plantbiotechnology.11.0111a

⑬ Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. (2011) RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant Signal. Behav.* 6, 1090-1093. 査読有り doi: 10.4161/psb.6.8.16046

⑭ Otagaki, S., Kawai, M., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2011) Size and positional effects of promoter RNA segments on virus-induced RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Epigenetics* 6, 681-691. 査読有り doi: 10.4161/epi.6.6.16214

⑮ 金澤 章 (2011) 外来遺伝子を持たずに特定形質が変化した植物をつくる育種法 ニューカントリー 58 巻 693 号, 70-71 査読なし

⑯ Liu, B., Watanabe, S., Uchimiya, T., Kong, F., Kanazawa, A., Xia, Z., Nagamatsu, A., Arai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Masuta, C., Harada, K. and Abe, J. (2010) Soybean stem growth habit gene *Dt1* is an orthologue of *Arabidopsis TFL1*. *Plant Physiol.* 153, 198-210. 査読有り doi: 10.1104/pp.109.150607

⑰ Kong, F., Liu, B., Xia, Z., Sato, S., Kim, B., Watanabe, S., Yamada, T., Tabata, S., Kanazawa, A., Harada, K. and Abe, J. (2010) Two coordinately regulated homologs of *FLOWERING LOCUS T* are involved in the control of photoperiodic flowering in soybean. *Plant Physiol.* 154, 1220-1231. 査読有り doi: 10.1104/pp.110.160796

⑱ Ohta, H., Ogino, A., Kasai, M., Sano, Y. and Kanazawa, A. (2010) Fertility restoration by *Ifr1* in rice with BT-type cytoplasmic male sterility is associated with a reduced level, but not processing, of *atp6-orf79* co-transcribed RNA. *Plant Cell Rep.* 29, 359-369. 査読有り doi: 10.1007/s00299-010-0827-7

〔学会発表〕（計 29 件）

① Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. RNA-mediated epigenetic modifications by a viral vector: a potent system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 24th, 2012

② Tsuchiya, M., Yuan, H., Sato, M., Kasai, M., Abe, J. and Kanazawa, A. Transcription and transposition of the soybean retrotransposon *SORE-1*. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 24th, 2012

③ Kasai, M., Taneda, A. and Kanazawa, A. Coincident RNA silencing of linked transgenes in the plant genome mediated by read-through transcription. 10th International Congress on Plant Molecular Biology. ICC, Jeju, Republic of Korea. Oct. 23rd, 2012

④ 荒瀬幸子・河西めぐみ・金澤 章 エピジェネティックな機構による転写抑制の解除を利用した *in planta* アッセイ系により明らかになった植物成分の DNA メチル化抑制効果 日本遺伝学会第 84 回大会 福岡市 九州大学 2012 年 9 月 25 日

⑤ 河西めぐみ・松村英生・吉田健太郎・寺内良平・種田晃人・金澤 章 ディープシークエンス解析によって明らかになった、ペチュニアにおけるコサプレッションと naturally occurring RNA サイレンシングの低分子 RNA 産生機構の共通性 日本遺伝学会第 84 回大会 福岡市 九

州大学　2012 年 9 月 25 日

⑥ 河西めぐみ・金澤　章　ペチュニア形質転換体における長期間の育成により誘導されたコサプレッションからの復帰　日本育種学会第 122 回講演会　京都市　京都産業大学　2012 年 9 月 15 日

⑦ 金澤　章・河西めぐみ　エピジェネティックな遺伝子発現制御を介した形質改変　日本育種学会第 54 回シンポジウム「エピミュータジェネシスと次世代育種への展開」　京都市　京都産業大学　2012 年 9 月 14 日

⑧ Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene as a tool to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. SOL&ICuGI 2011 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference. Kobe Convention Center, Kobe, Japan. Dec. 1st, 2011

⑨ 金澤　章・稲場純一・河西めぐみ・志村華子・増田　税　外来遺伝子を持たずに特定の形質が変化した植物体の作出に必要なエピジェネティックな変化の促進　日本育種学会第 120 回講演会　福井市　福井県立大学　2011 年 9 月 24 日

⑩ 河西めぐみ・種田晃人・金澤　章　コサプレッションを誘導する遺伝子と共に導入した薬剤耐性遺伝子の RNA サイレンシング誘導機構　日本育種学会第 120 回講演会　福井市　福井県立大学　2011 年 9 月 24 日

⑪ 金澤　章・河西めぐみ　花の模様形成に現れる RNA サイレンシングの誘導過程　日本遺伝学会第 83 回大会・ワークショップ　「植物の機能性 RNA：花成から受精まで」　京都府　京都大学　2011 年 9 月 22 日

⑫ 河西めぐみ・種田晃人・金澤　章　低分子 RNA の解析より示された隣接した 2 つのトランスジーンの RNA サイレンシングの誘導機構　日本遺伝学会第 83 回大会 京都府　京都大学　2011 年 9 月 20 日

⑬ 金澤　章　RNA サイレンシングによる遺伝子機能解析と形質改変　第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム「植物の逆遺伝学的解析技術はどこまで来たか」福岡市　九州大学 2011 年 9 月 7 日

⑭ Inaba, J., Kanazawa, A., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B., Goto, K. and Masuta, C. The inheritable transcriptional gene silencing targeted to an endogenous gene in petunia by using the *Cucumber mosaic virus* vector. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Portola Hotel & Spa, Monterey, California, USA. 22 March 2011

⑮ 河西めぐみ・種田晃人・金澤　章　Read-through 転写が関わる隣接したトランスジーン間の相互作用による RNA サイレンシングの誘導　日本遺伝学会第 82 回大会 札幌市　北海道大学　2010 年 9 月 20 日

〔図書〕（計 3 件）

① Kasai, M., Tsuchiya, M. and Kanazawa, A. (2012) Gene duplication and RNA silencing in soybean. *In* A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships, Ed. by J. E. Board, InTech, pp. 507-530. doi: 10.5772/51053

② 金澤　章 (2011) RNA サイレンシングとエピジェネティクス　鈴木正彦・編著「植物の分子育種学」pp. 123-134 講談社

③ 金澤　章 (2011) 花の模様形成　鈴木正彦・編著「植物の分子育種学」pp. 167-178 講談社

６．研究組織

(1)研究代表者

金澤　章（KANAZAWA AKIRA）

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30281794