

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780027

研究課題名(和文)種特異的な外来遺伝子発現抑制機構の解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of species-specific transgene silencing

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(系)・准教授

研究者番号：70390888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リンドウより見出した35Sプロモーター配列特異的なDNAメチル化の分子機構について詳細な解析を行った。リンドウに1コピー導入したT-DNAの全長について、de novoメチル化が高頻度に起きる領域が2箇所存在することを突き止めた。これら配列は2種のモチーフを持ち、核内因子と結合することを見出し、酵母ワンハイブリッド法により候補因子を同定した。また懸濁培養細胞を用いてDNAメチル化とヒストン修飾の関係について調査し、de novoメチル化に伴いヒストン修飾が変化していることを確認した。さらに組換えレタスを作成し、リンドウと同様の現象を見出した。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of the 35S promoter-specific DNA methylation in gentian was investigated in this study. Two distinct de novo methylated regions were identified after the methylation analysis of an entire T-DNA segment in transgenic gentian. Both of the regions contain two consensus sequences, to which gentian nuclear extracts could bind, and yeast one-hybrid screening identified candidates for binding to the sequences. Additionally, relationship between DNA methylation and histone modification was investigated using transgenic gentian cell suspension culture, and the results showed that de novo methylation of the 35S region occurred in connection with histone modification. To investigate whether the 35S promoter-specific DNA methylation exists in other plant species, transgenic lettuce plants having 35S promoter were produced. As the result, suppression of the transgene expression and hypermethylation of the 35S promoter region were found in the transgenic lettuce plants.

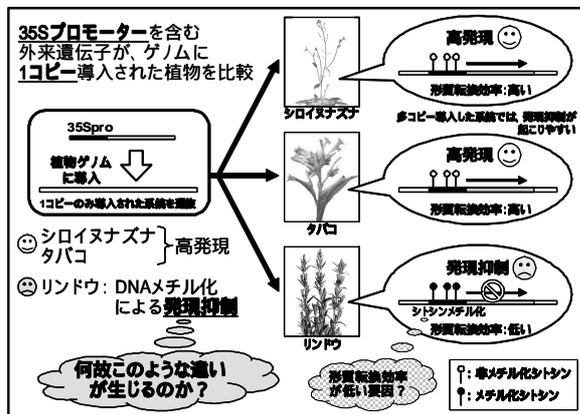
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：DNAメチル化 リンドウ 分子育種 レタス サイレンシング 遺伝子組換え 園芸

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え植物を作出した時に、期待通りに外来遺伝子の発現がみられない場合がある。このような現象は、導入した外来遺伝子における染色体上の位置、コピー数、断片化や再編成などの影響が考えられる。これまで外来遺伝子の発現抑制(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が働くものと考えられてきた。しかし研究代表者が花卉園芸植物であるリンドウより見出した発現抑制現象は、同一の外来遺伝子を導入した形質転換タバコやシロイヌナズナでは起こらないことから、植物種特異的に引き起こされていると考えられた。研究代表者はまた、このリンドウの発現抑制現象が 35S プロモーター配列特異的な DNA メチル化により生じていることを明らかにし、さらに、この現象が 35S プロモーター配列のコピー数やゲノム上の挿入位置にかかわらず起きることを示した(下図)。



プロモーター配列特異的な DNA メチル化は、相同な配列を持つ低分子 RNA により誘導される例が報告されている。しかし、研究代表者のこれまでの研究では、リンドウにおいて 35S プロモーター配列に相同な低分子 RNA は検出されていない。一方、動物細胞では DNA 結合因子を介したプロモーター領域の DNA メチル化が報告されていることから、このような核内因子が 35S プロモーター配列の DNA メチル化に関与している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、リンドウにおける 35S プロモーター配列特異的な *de novo* (新規) DNA メチル化の分子機構を明らかにすることを目的としている。そのために、35S プロモーター配列を認識する因子がどのような分子機構で DNA メチル化を引き起こしているのか? またリンドウと同様の現象が起こる植物種は存在するか? さらには、メチル化がみられないモデル植物にはこのような因子は存在していないのか? といった疑問について、様々な実験手法を駆使して解明していく

ことを目的とする。

研究代表者のこれまでの研究から、従来形質転換が困難であったリンドウでは、マーカー遺伝子に連結していた 35S プロモーターをそれ以外のプロモーターに代えることにより形質転換効率が向上した。また目的遺伝子にのみ 35S プロモーターを用いた場合であっても、DNA メチル化領域の拡大によりマーカー遺伝子の発現も抑制された。これらのことから、形質転換が困難な植物種においては、その要因の一つとしてリンドウと同様の発現抑制現象が生じている可能性が考えられる。実際にメキシカンライムでは、マーカー遺伝子の DNA メチル化による発現抑制が、形質転換効率の低下をもたらしていた (Dominguez *et al.*, MGG 267, 2002)。したがってリンドウ以外の植物種においても、マーカー遺伝子の発現抑制が生じることにより、組換え体が選抜されないものが潜在的に存在している可能性がある。このような観点から本研究を進めることで、形質転換が困難な植物種の分子育種に貢献する知見を得ることが期待される。また本研究で扱う現象は、トランスポゾンやウイルスなどの外的な遺伝子配列からゲノムの恒常性を守るための戦略が、植物種によって異なることを示している可能性がある。したがって、このメカニズムを解明することにより、真核生物におけるエピジェネティック機構の進化を知ろうと興味深い知見を得ることが期待される。

### 3. 研究の方法

リンドウゲノムに挿入された T-DNA の全領域を対象とした詳細な DNA メチル化解析を行うため、バイナリーベクター pSMABR35SsGFP の T-DNA がシングルコピーで導入されている、組換えリンドウ植物体 3 系統を解析に用いた。Inverse-PCR 及び Straight Walk 法により T-DNA 隣接配列を決定し、これら隣接配列及び T-DNA 配列情報をもとに、T-DNA 領域(約 4kb) 全長をカバーする 30 種のプライマーを設計した。Bisulfite 処理したゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅を行い、メチル化シトシン配列を解析した。また Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) により、高頻度に *de novo* メチル化が生じた配列をプローブとして、リンドウ核タンパク質との結合性を調査した。野性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 (-148 ~ -85、-298 ~ -241) における EMSA を行った。なお、解析領域において 26 塩基の 2 本鎖 DNA を設計し、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。

酵母 one-hybrid については、ゲルシフトアッセイで核因子との結合がみられた配列と、

*de novo* メチル化ピークに共通した塩基配列をモチーフにした3タンデムリピートのベイト配列を作成した。このベイト配列は-275~-250の塩基配列モチーフが3コピーおよび-149~-124の塩基配列モチーフが2コピーとなるように設計されている。相同組換えを用いて、作成したベイト配列を酵母のゲノムに挿入し、リンドウのcDNAライブラリーを導入した prey ベクターを形質転換してオーレオバシジン A によるスクリーニングを行った。

形質転換リンドウの懸濁培養細胞を用いた実験については、35S プロモーターに *sGFP* 遺伝子を連結したコンストラクトがシングルコピーで導入されたリンドウ形質転換体由来する、以下に示す異なる分化段階より誘導したカルス由来の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2種の培養細胞について、*GFP* 蛍光の観察、bisulfite法によるDNAメチル化、ノザン解析による *sGFP* mRNA の発現量解析、およびクロマチン免疫沈降法によるヒストンの修飾を解析した。

35S プロモーターを含むT-DNAが導入された組換えレタスを作成するために、アグロバクテリウム法を用いて、レタス品種‘カイザー’への形質転換を行った。次亜塩素酸ナトリウムより滅菌したレタス種子を発芽培地に無菌播種し、発芽5日目の実生より子葉を切り出して、バイナリーベクター pSMAB35SsGFP (WT-35S) と、35S エンハンサー領域に3塩基の変異を導入した2種類の改変ベクター (mut13, mut24) をそれぞれ保持するアグロバクテリウム EHA101 株を感染させた。感染させた子葉を3日間共存培地で共存培養し、ピアラフォスを含むカルス誘導培地で4週間選抜培養し、カルスを誘導した。カルス誘導がみられた葉切片について、ピアラフォスを含むシュート誘導培地で培養し、得られたシュートを発根培地に継代した。得られた形質転換レタス葉組織より DNA 及び RNA を抽出し、サザンブロット及びノザンブロットにより導入した T-DNA コピー数と、*GFP* もしくは *bar* 遺伝子の mRNA 発現を解析した。さらに bisulfite 法により 35S エンハンサー領域の DNA メチル化を解析した。

#### 4. 研究成果

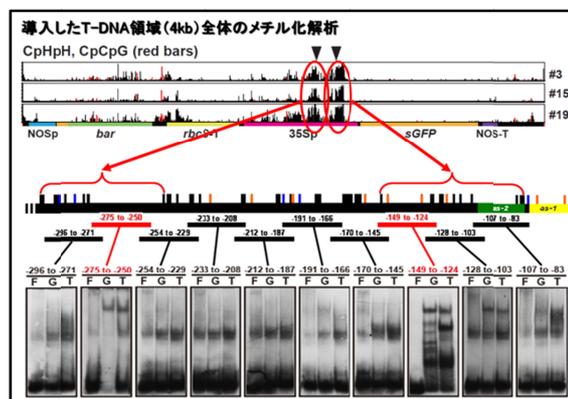
##### 35S 配列を導入した組換えリンドウの作出

研究代表者は、様々な改変 35S プロモーター配列のリンドウへの導入を試みており、これまでに 200 系統以上の独立した組換え植物体を作成し、その中からシングルコピーでゲノムに挿入された 87 系統を選抜して、改変 35S プロモーター領域のメチル化を解析した。

その結果、コアプロモーター(-90)を含まない 35S エンハンサー領域のみで、DNA メチル化が誘導されることがこれまでに明らかとなっている (Mishiba *et al.*, PLOS ONE 5, 2010)。

##### リンドウに導入した T-DNA 領域全長の *de novo* DNA メチル化解析

上述の研究を進めていく課程で、研究代表者は CpG や CpHpG (H=A, C, T) 以外のシトシン配列 (CpHpH) のメチル化に着目した。この配列は維持型 DNA メチル化酵素によって DNA 複製時にメチル化状態を維持出来ないため、CpHpH 配列のメチル化に着目することで、*de novo* メチル化が高頻度に行き起きている領域の推定が可能ではないかと考えた。これまでに解析した DNA メチル化のデータより、35S エンハンサーの一部の領域 (-148~-85) で高頻度な *de novo* メチル化が生じることを明らかにしていたが、メチル化解析を行った領域が限定されていたため、本領域以外にも同様の配列が存在している可能性が残されていた。また *de novo* メチル化を誘導する因子として DNA 結合因子の関与が示唆されていた。そこで、リンドウゲノムに挿入された T-DNA の全領域を対象とした詳細な DNA メチル化解析を行い、さらに新たに見出した *de novo* メチル化領域と DNA 結合因子との関係について調査した。リンドウゲノムに挿入された 4kb に及ぶ T-DNA 領域に含まれる、全ての CpHpH 配列のメチル化頻度を解析した結果、35S エンハンサー配列中に、高頻度にメチル化されている領域が2ヶ所 (-148~-85、-298~-241) にのみ存在することを見出した (Yamasaki *et al.*, PlantBiotechnol 28, 2011)。新たに見出した -298~-241 領域について、EMSA によりリンドウ核因子との結合を確認したところ、-275~-250 プロンプでシフトバンドが観察された。興味深いことに -149~-124 プロンプとリンドウ核因子との結合は、-275~-250 の競合 DNA により阻害された。これらの配列は共通して2種類のモチーフ (GAAGA, GTGGAAA) が含まれることから、両配列に結合する核因子の *de novo* メチル化への関与が推察された。(下図)



##### One-hybrid 法による DNA 結合因子の同定

ゲルシフトアッセイで核因子との結合がみられた配列と、*de novo* メチル化ピークに一致する、2つの共通した塩基配列をモチーフにした3タンデムリピートのベイト配列を酵母ゲノムに挿入し、リンドウのcDNAライブラリーが導入された prey ベクターをこの酵母に形質転換することで、one-hybrid スクリーニングを行った。その結果、prey ベクターのcDNA から翻訳されたタンパク質が酵母ゲノムに挿入されたベイト配列に結合したと考えられる、オーレオバシジン A 耐性を獲得したコロニーが9系統得られた。スクリーニングされた酵母の母数は約430,000系統であり、形質転換効率は約0.0021%であった。このうち prey ベクターが1つのみ導入されていた系統は6系統あり、この6系統が持つ prey インサートの塩基配列を解析した。判明した塩基配列から選択した ORF を、NCBI の Blast X を用いてデータベース上のタンパク質との相同性を調べた結果、2系統についてはシロイヌナズナのルビスコとジアシルグリセロールアシル基転移酵素と相同性を示したが、残りは未知のタンパク質であった。これら未知のタンパク質についてアミノ酸配列を比較した結果、SSGINAEWPLWPG の13アミノ酸配列が一致していることが判明した。

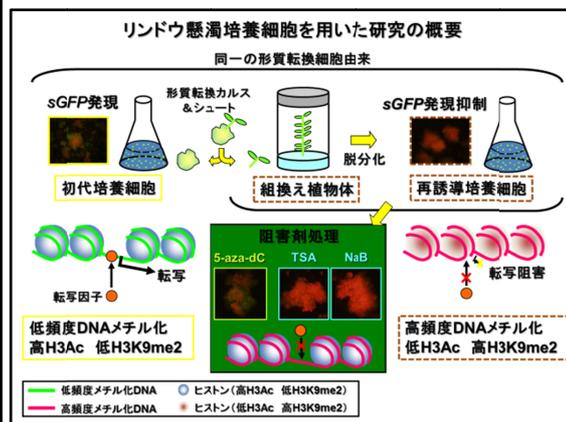
### リンドウ培養細胞を用いた 35S プロモーター領域のエピジェネティクス解析

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いる。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している可能性が考えられる。そこで、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係について調査した。形質転換リンドウより誘導した2種類(初代培養細胞、再誘導培養細胞)の培養細胞について GFP 蛍光を調査したところ、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 蛍光は見られなかった。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。

Bisulfite 法で 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と形質転換植物体において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 メチル化が殆ど生じていないことが確認された。また、クロマチン免疫沈降法により、35S プロモーター領域におけるヒストン H3 のアセチル化、4番目のリジン残基(Lys4)のジメチル化、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調査した。その結果、再誘導培養細胞は、初代培養細胞と比較して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。

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、7日後に *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、DNA メチル化阻害剤処理でのみ GFP 蛍光の復帰が確認された(Yamasaki *et al.*, PlantSci 180, 2011)。

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高頻度 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唆された(下図)。また発現抑制時のヒストン H3 における Lys4 のジメチル化については興味深い知見であり、今後より詳細に解析する予定である。



### レタス形質転換体の作出とメチル化解析

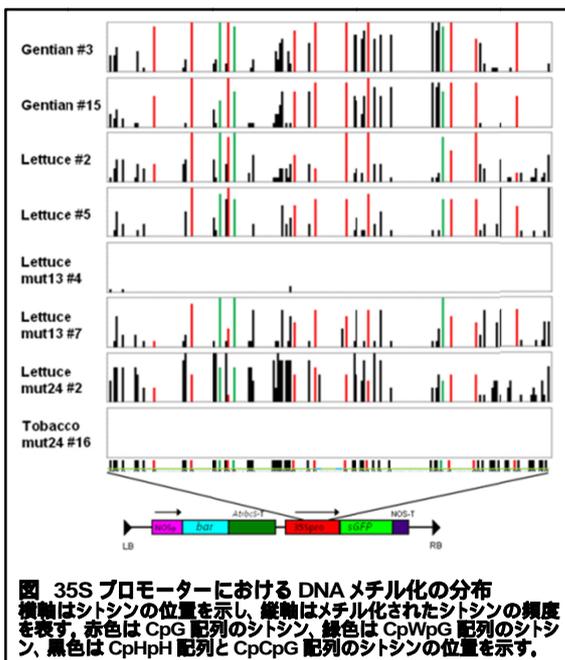
これまでに解析してきたリンドウの 35S プロモーター配列特異的な DNA メチル化を伴う発現抑制現象が、他の植物種でも起きているか解明するために、過去の研究で 35S プロモーターを導入した組換え植物が期待通りの発現を示さないことが報告されているレタスに着目して、組換えレタスの作出と、導入した外来遺伝子の解析を行った。

35S プロモーターを含む T-DNA が導入された組換えレタスを作成するために、アグロバクテリウム法を用いて、レタス品種 'カイザー' への形質転換を行った。バイナリーベクター pSMAB35SsGFP (WT-35S) と、35S エンハンサー領域に3塩基の変異を導入した2種類の改変ベクター (mut13, mut24) をそれぞれ保持するアグロバクテリウム EHA101 株を子葉に感染させた。ピアラフォスを含むカルス誘導培地で選抜培養し、選抜されたカルスよりシュートを誘導した。結果として、WT-35S 系統、mut13 系統、mut24 系統それぞれで数十系統のピアラフォス耐性をもつシュートを得た。

早い段階で得られた WT-35S の5系統、mut13 の8系統、および mut24 の8系統の組換え植物体からゲノム DNA を抽出し、DIG 標識された *bar* 遺伝子プローブを用いてサザンブロットを行い、T-DNA の挿入を確認した。その結果、1~11 コピーのレタスゲノムへの

T-DNA の挿入が確認された。レタスゲノムへの T-DNA の挿入が確認された 7 系統の組換えレタスと、WT-35S を導入した組換えタバコ 2 系統から全 RNA を抽出し、DIG 標識された *sGFP* 及び *bar* プロンプを用いてノザンプロットを行い、導入されたこれら 2 つの外來遺伝子 mRNA の発現解析を行った。その結果、WT-35S 系統では *sGFP* 遺伝子と *bar* 遺伝子 mRNA の発現が共に抑制されていたが、mut13 系統と mut24 系統では、外來遺伝子が発現している系統と抑制されている系統の両方が確認された。一方、WT-35S タバコ系統では、*sGFP* 遺伝子と *bar* 遺伝子 mRNA はともに発現していた。

サザンプロットによりレタスゲノムへの T-DNA の挿入が確認された WT-35S 系統#2、#5、mut13 系統#4、#7、および mut24 系統#2 の 5 系統について、bisulfite 法を用いて、35S プロモーターのエンハンサー領域を含む 226 bp の領域について、DNA メチル化を解析した。ポジティブコントロールとして WT-35S を導入した組換えリンドウ 2 系統と、ネガティブコントロールとして mut24 を導入した組換えタバコ 1 系統を用いた。その結果、WT-35S 系統レタス 2 系統では、同一の T-DNA が挿入された組換えリンドウと同様に、35S プロモーターのエンハンサー領域を含む 226 bp の領域で高度な DNA メチル化が確認された。一方、mut13 系統#4 では、ほとんど DNA メチル化は見られず、mut13 系統#7 と mut24 系統#2 では、WT-35S と同様に高度なメチル化がみられた。また、mut24 系統タバコでは DNA メチル化が見られなかった（下図）。



これらの結果から、レタスでもリンドウと同様の 35S プロモーター配列特異的な DNA メチル化による発現抑制が生じている可能性が示された。また、エンハンサー領域の変異が DNA メチル化に影響を与えた可能性も示唆された。今後はシングルコピーで T-DNA

が挿入された組換え体を獲得して、DNA メチル化の詳細な解析を行っていく必要がある。

本研究により、35S プロモーター配列がリンドウの核ゲノムに導入された時に引き起こされる、DNA メチル化やヒストン修飾の変化の詳細や、標的となる配列が明らかにされた。またレタスにおいてもリンドウと同様の現象が起きている可能性が示唆され、このような発現抑制機構をリンドウのみならず幅広い植物種が進化の過程で獲得している可能性がある。またこのような知見は、形質転換効率を向上させ、発現抑制を起さずに高発現を長期間にわたって維持することが可能なプロモーターの開発につながるものと期待される。したがって、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出来る。本研究で得られた知見をもとにして、35S エンハンサー配列特異的な *de novo* DNA メチル化の分子機構の解明を今後も進めてしていきたい。

#### 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3件)

Yosuke Miyagawa, Jun Ogawa, Yuji Iwata, Nozomu Koizumi, Kei-ichiro Mishiba (2013) An attempt to detect siRNA-mediated genomic DNA modification by artificially induced mismatch siRNA in *Arabidopsis*. PLOS ONE 8(11): e81326, 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0081326

Satoshi Yamasaki, Masayuki Oda, Nozomu Koizumi, Kazuhiko Mitsukuri, Masafumi Johkan, Takashi Nakatsuka, Masahiro Nishihara, Kei-ichiro Mishiba (2011) *De novo* DNA methylation of the 35S enhancer revealed by high-resolution methylation analysis of an entire T-DNA segment in transgenic gentian. Plant Biotechnology 28(2):223-230, 査読有、DOI:10.5511/plantbiotechnology.10.1222a

Satoshi Yamasaki, Masayuki Oda, Hiroyuki Daimon, Kazuhiko Mitsukuri, Masahumi Johkan, Takashi Nakatsuka, Masahiro Nishihara, Kei-ichiro Mishiba (2011) Epigenetic modifications of the 35S promoter in cultured gentian cells. Plant Science 180(4):612-619, 査読有、DOI:10.1016/j.plantsci.2011.01.008

[学会発表](計3件)

Tomoya Fujiwara, Shunji Teranishi, Yuki Hiramatsu, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi, Genetic engineering of eggplant with high carotenoid contents in fruits., JSOL 10th International Symposium on Solanaceae

Genomics、Japanese Solanaceae Genomics Initiative (JSOL)、2013 年 11 月 29 日、大阪府立大学

藤原知也、平松由季、三柴啓一郎、小泉望、ナス果実で強く発現する遺伝子のプロモーター解析、第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会、日本植物細胞分子生物学会、2012 年 8 月 5 日、奈良先端科学技術大学院大学

Tomoya Fujiwara, Shunji Teranishi, Yuki Hiramatsu, Kei-ichiro Mishiba, Nozomu Koizumi、Making transgenic eggplant with high carotenoids contents.、SOL2011 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference、Japanese Solanaceae Genomics Initiative (JSOL)、2011 年 11 月 28 日、神戸コンベンションセンター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.plant.osakafu-u.ac.jp/~mishiba/>

## 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・准教授

研究者番号：7 0 3 9 0 8 8 8

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：