

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570065

研究課題名(和文) ヒストン修飾酵素複合体による植物ゲノム基盤の構築と制御

研究課題名(英文) Establishment and regulation of plant genome by histone modifier complex

研究代表者

金 鍾明 (Kim, Jong-Myong)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：90415141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのゲノム制御に機能するHDA6複合体の、ゲノム上での作用点(遺伝子領域)の同定に成功した。HDA6は乾燥耐性を制御するジャスモン酸シグナルネットワーク系の遺伝子群、およびCOPIAタイプのトランスポゾンに特異的に結合する。このことから、HDA6複合体には、ユークロマチン領域を制御する複合体とヘテロクロマチン領域を制御する複合体の、少なくとも2種類の複合体が存在することが示唆された。これらの結果は、ゲノム構造と遺伝子応答に関わる異なる複合体に於いて、1つのエピジェネティック因子が機能して、異なる作用・役割を持つことを示す大きな成果である。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase6 (HDA6) is a chromatin modifier to establish the heterochromatin structure in *Arabidopsis thaliana*. We identified working points and target genes of HDA6 complex on the *Arabidopsis* genome. HDA6 specifically binds to genes responded to jasmonic acid signaling network required for the water deficit responses and COPIA type retro-transposable element in heterochromatin regions. From these results, it is suggested that there are at least two types of HDA6 complexes. First one is for gene regulation on euchromatic region, and second one is for silencing of heterochromatic region. Perhaps these two types of HDA6 complexes have division of labor on *Arabidopsis* genome. These results that single epigenetic factor functions different structural targets (euchromatin and heterochromatin) on plant genome are significant achievement to expand and to develop the research field of epigenetic study in plant science.

研究分野：植物エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 植物ゲノム 環境応答 ヘテロクロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムDNAは様々なタンパク質と相互作用しながら、核内に高密度に折り畳まれ保持されている。多様な生命現象に伴う遺伝子の発現調節や染色体の動態変化には、エピジェネティックな制御機構を介し高度に調節されたゲノム高次構造のダイナミックな変化と維持が必要である。このゲノム高次構造の維持・調節機構の崩壊は、癌化や発生異常などの致命的な影響を及ぼす。植物も例外ではなく、春化過程や花成などに関与する遺伝子の発現調節に、ヒストン修飾およびDNAメチル化を介したエピジェネティックな制御機構が機能することが報告されている。また、植物ゲノム中のヘテロクロマチン領域には、多くのトランスポゾンが存在している。このヘテロクロマチン抑制が外れると、トランスポゾンの転移と増幅が世代を超えて繰り返され、ゲノム上に傷が蓄積し、致命的な増殖異常および形態異常を引き起こすことが知られている (Tsukahara et al. 2009 *Nature*)。一方で、環境条件の急激な変動に呼応した染色体の凝集や、発生および分化にはDNA複製、細胞分裂時のセントロメア領域を中心としたヘテロクロマチン領域の再編成など、ゲノム構造のダイナミックな変化を伴う。それゆえ、ヘテロクロマチン構造の形成とその調節は植物ゲノムの維持、調節に非常に重要な役割を果たすと考えられる。

一般的に、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は複合体を形成し機能することが知られている。申請者は、シロイヌナズナのヒストン脱アセチル化酵素 Hda6 が DNAメチル化酵素 Met1 と協調しながら植物ゲノム上のトランスポゾンの発現抑制に関与し、ヘテロクロマチン領域の構造形成に必要であることを明らかにしている (To et al. 2011 *PLoS Genet.*)。このことから、植物におけるゲノムの維持・動態制御機構について、トランスポゾン抑制を介したヘテロクロマチン形成とこれを基盤としたゲノム高次構造の構築と維持に、クロマチン制御因子である Hda6 複合体の機能が必須であると考えられる。さらに、ゲノムタイリングアレイを用いた発現解析の結果、シロイヌナズナでは、環境ストレス処理により多様な遺伝子の発現変動とトランスポゾンの発現誘導が確認されている (Matsui et al. 2008 *Plant Cell & Physiol.*)。また、Hda6 が直接・間接的に低温や乾燥などの環境変動時の遺伝子発現応答に機能することを示した (To et al. 2011 *BBRC*)。興味深い事に、Hda6 のホモログタンパク質である出芽酵母 Rpd3 は異なる2種類の複合体に内包され、環境の違いに応じてゲノム上の異なった作用領域でそれぞれ機能する事が報告されている (Keogh et al. 2005 *Cell*)。しかしながら、植物において Hda6 のゲノムワイドな作用領域および Hda6 複合体

の構成因子は未だ同定されていない。

## 2. 研究の目的

「植物ゲノム高次構造の構築基盤」の解析：まず、シロイヌナズナにおけるジーンサイレンシングおよびヘテロクロマチン領域の高次構造形成に関与する、Hda6 のゲノムワイドな結合領域の同定と、それら領域におけるヌクレオソーム密度およびヒストン修飾変動などのクロマチン状態を明らかにする。これにより、ヘテロクロマチン構造をもとにした「植物ゲノム高次構造の構築基盤」の解明を目指す。

「Hda6 複合体」の同定と機能解析：次に、ヘテロクロマチン化および遺伝子発現調節に関与する Hda6 複合体を同定する。また、Hda6 複合体を構成するタンパク質のうち、植物ゲノムのヘテロクロマチン構造構築に必須な因子を明らかにする。これまで植物において、ゲノム維持に機能する HDAC 複合体は同定されておらず、本研究の実施から、シロイヌナズナのヘテロクロマチン形成複合体の新規同定が可能となる。また、Hda6 のホモログタンパク質である出芽酵母 Rpd3 は、複数種類の HDAC 複合体を形成することが報告されており (Keogh et al. 2005 *Cell*)、Hda6 も複数の複合体に内包されている可能性が高い。これら複合体を構成する主要タンパク質のホモログに着目して、ゲノムワイドでの結合領域を特定し、ゲノム上での複合体の種類に依存した作用領域の違いを調べる。さらに、これら因子がシロイヌナズナゲノムのクロマチン状態および遺伝子発現制御に及ぼす影響を解析することで、Hda6 複合体を介したヒストン修飾変化による植物ゲノムの維持およびゲノムワイドな遺伝子発現制御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒストン修飾酵素 Hda6 のゲノムワイドな結合領域とクロマチン状態の同定：シロイヌナズナのヘテロクロマチン形成および遺伝子発現制御に関与する、ヒストン脱アセチル化酵素 Hda6 のゲノムワイドな結合領域と Hda6 機能に依存したクロマチン動態およびゲノム構造(ヒストン修飾)の変化を、ChIP-seq 法を用いて調べる。

Hda6 複合体の同定：抗 HDA6 特異抗体を用いた免疫沈降実験により Hda6 複合体を精製し、Hda6 複合体の構成因子を同定する。

植物ゲノムのヘテロクロマチン構造構築に必須な Hda6 複合体構成因子の同定：これら因子の遺伝子破壊株を用いて、植物ゲノムのヘテロクロマチン形成に必須の因子を決定する。

Hda6 複合体のゲノムワイドな結合領域の特定：野生型株、*hda6* 変異株および同定された新規ヘテロクロマチン形成必須因子の遺伝子変異株に対して、表現型解析を行うとともに、遺伝子発現、クロマチン状態、およびこれらタンパク質の結合領域の変動を、ゲノムタイリングアレイを用いた発現解析および ChIP-seq 法によりゲノムワイドに検出・解析を行う。

#### 4. 研究成果

シロイヌナズナ Hda6 がゲノムの基本構造構築に寄与するゲノム領域を検出するため、プレートで生育させた *hda6* 変異株と野生株に対して、抗ヒストン H4 アセチル化修飾抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験 (ChIP 法) を行った結果、*hda6* 変異株では、Gypsy および LINE に属するトランスポゾン群を介したペリセントロメア領域のヒストン H4 アセチル化の高度蓄積と、ヘテロクロマチン構造の弛緩が同定された。

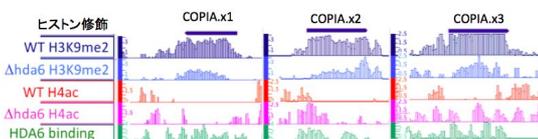
シロイヌナズナヒストン脱アセチル化酵素 HDA6 の複合体構成因子の同定と、この複合体が機能するゲノム上の結合領域を同定するために、よりアフィニティーの高い抗 HDA6 モノクローナル抗体を幾つか作成した。そのうち幾つかは、ウェスタンブロット法により高感度のシグナルが検出できることが分かった。

一方で、これまでに ChIP 実験で実績のある抗 GFP 抗体を用い、複合体の検索同定を行うため、GFP タグを融合した HDA6 の遺伝子導入株を作成し、ホモ系統単離に成功した。これらを用いて、今後さらに複合体を精製、同定することが可能になった。

これら複合体のゲノム上での機能領域を同定するため、野生型株及び *hda6* 変異株を用いて、活性化および抑制化のマーカとなるヒストン修飾について、ChIP-seq 法によりゲノムワイドな変動領域を同定した。これにより、HDA6 がターゲットとする特異的なトランスポゾン領域でのヒストン修飾変動が明らかとなった。また、分子進化学的な解析の結果から、HDA6 がターゲットとするトランスポゾンの中でも、*hda6* 変異株では特に比較的若い COPIA タイプのレトロトランスポゾンの再活性化が顕著であり、HDA6 複合体による抑制ターゲットとなっていることが示唆された。

Hda6 複合体のゲノムワイドな結合領域の特定：形質転換株等を用いた解析から、乾燥応答時の HDA6 ターゲットは、植物ホルモンであるジャスモン酸に対する応答遺伝子群に多く見出された。これら遺伝子領域では、遺伝子発現タイミングや反応性に大きな嵯峨見られたことから、HDA6 複合体の応答性お

よび反応性の違いが寄与することが示唆された。ここで考えられる複合体の機能には、これまで得られている特異的なトランスポゾン領域での HDA6 複合体の役割と大きく異なることから、HDA6 複合体には遺伝子制御に機能する複合体と、トランスポゾン抑制に機能する複合体の少なくとも 2 種類が存在すると考えられた。また、HDA6 が標的とする進化的に若い COPIA 領域の精練シング状態を調べるため、ヘテロクロマチン抑制のマーカであるヒストン H3 の N 末端領域 9 残基目に位地するリジンのジメチル化 (H3K9me2) について、ChIP-seq 実験を行った。その結果、発現パターンに変化が見られる COPIA のうち、*hda6* 変異体にもみ特異的に、ヘテロクロマチン抑制マーカである H3K9me2 の存在量が著しく減少し、それに変わってクロマチン活性化マーカであるヒストン H4 のアセチル化が大きく増加している特異領域の同定ができた。



これらの結果により、ヘテロクロマチン化に寄与する HDA6 複合体の作用点の同定が一歩進んだと考える。

#### < 引用文献 >

Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A. and Kakutani, T. Burst of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. (2009) *Nature* 461, 423-426.

To, T.K., Kim, J.M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T.A., Kakutani, T., Toyoda, T., Yokoyama, S., Shinozaki, K. and Seki, M. Arabidopsis HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. (2011) *PLoS Genet.* 7(4):e1002055. doi: 10.1371/journal.pgen.1002055.

To, T.K., Nakaminami, K., Kim, J.M., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Yokoyama, S., Shinozaki, K. and Seki, M. Arabidopsis HDA6 is required for freezing tolerance. (2011) *BBRC* 406. 414-419.

Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kamiyama, E., Endo, T.A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M., Satou, M., Kim, J.M. Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K. and Seki, M. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. (2008) *Plant Cell & Physiol.* 49. 1135-1149.

Keogh, M.C., Kerudistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.r., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J.S., Hughes, T.R., Strahl, B.D., Grunstein, M., Greenblatt, J.F., Buratowski, S. and Krogan, N.J. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. (2005) *Cell* 123. 593-605.

## 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)

Kim, J.M., Sasaki, T., Ueda, M., Sako, K. and Seki, M. "Chromatin changes in response to drought, salinity, heat and cold stresses in plants", *Frontiers in PLANT SCIENCE*, 査読有, 2015, vol.6, 114, doi: 10.3389/fpls.2015.00114.

To, T.K. and Kim, J.M. "Epigenetic regulation of gene responsiveness in Arabidopsis" *Frontiers in PLANT SCIENCE*, 査読有, 2014. Vol.4,548. doi: 10.3389/fpls.2013.00548

Jung, J.H., Park, J.H., Lee, S., To, T.K., Kim, J.M., Seki, M. and Park, C.M. "The cold signaling attenuator HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1 activates FOLWERING LOCUS C transcription via chromatin remodeling under short-term cold stress in Arabidopsis", *Plant Cell*, 査読有, 2013, Vol.25, 4378-4390. doi: 10.1105/tpc.113.118364

[学会発表](計 8件)

Kim, J.M. "Novel Epigenetic and antisense RNA regulation in plant abiotic stress responses", The KEYSTONE SYMPOSIA plant epigenetics: from genotype to phenotype (B1), 2016.Feb.17. (Taos, New Mexico, USA)

Kim, J.M., To, T.K., Seki, M. "Histone deacetylase triggers the novel mechanism for plant drought tolerance" 日本生化学会・日本分子生物学会 2015年年会, 2015年12月2日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Kim, J.M. "Novel epigenetic control of drought tolerance in plants" The international symposium "Towards increased plant productivity through understanding of environmental responses and epigenetic regulation", 2015.Nov. 24. 理化学研究所(神奈川県横浜市)

金 鍾明, 「エピジェネター転写-代謝解析から見てきた植物の新規乾燥耐性機構」日

本育種学会第126回講演会、2015年3月22日、玉川大学(神奈川県川崎市)

金 鍾明, 「エピジェネティクスで耐える植物の環境ストレス応答におけるヒストン修飾の役割」北海道大学 理学部バイオセミナー、2014年10月30日、北海道大学(北海道、札幌市)

Kim, J.M. "Acetic acid is essential for drought tolerance in plants" International conference of Arabidopsis research 2013, 2013. Jun. 24-28. (Sydney, Australia)

金 鍾明, 「エピジェネティックに制御される酢酸発酵は植物の乾燥耐性獲得に必須である」日本植物生理学会、2013年3月21日、岡山大学(岡山県岡山市)

金 鍾明, 「酢酸合成経路を介した植物の新規乾燥耐性機構はエピジェネティックに制御される」日本分子生物学会、2012年12月12日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[図書](計 1件)

Kim, J.M., Endo, T.A., To, K.T., Matsui, A., Fiona, C.R., Ishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T. and Seki, M. "Methods in Molecular Biology; The Arabidopsis protocols, 3<sup>rd</sup> edition" Springer Science+Business Media, 2014, 1062, (405-426) doi: 10.1007/978-1-62703-580-4\_22.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 鍾明 (KIM, Jong-Myong)

国立研究開発法人 理化学研究所  
環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号 : 90415141