

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770009

研究課題名(和文) 遺伝子転写領域におけるDNAメチル化の役割と制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role and regulation of gene body DNA methylation

研究代表者

藤 泰子 (TO, TAIKO)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：10623978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、モデル生物シロイヌナズナを用いて、分子生物学的および情報学的な手法により、転写活性化状態にある遺伝子転写領域上のDNAメチル化がもつ生物学的機能の探索を試みた。その結果、遺伝子転写領域のDNAメチル化がDNA複製期におけるねじれストレスおよびDNA傷害に対し抑制的にはたらく可能性が示唆された。また、変異体スクリーニング解析により、遺伝子転写領域上のDNAメチル化が減少する変異体の単離に成功した。本研究の成果は、遺伝子転写領域上のDNAメチル化と、DNA複製やDNA傷害との関連性を示唆する新たな視点を提唱し、また遺伝子転写領域上のDNAメチル化を研究する新たな材料を提供する。

研究成果の概要(英文)：I searched for the biological role of gene body DNA methylation that is found inside of transcriptionally active genes, by molecular biology and bioinformatics using a model plant *Arabidopsis thaliana*. The results suggested that gene body methylation may function to prevent torsional stress and/or DNA damage during DNA replication. In addition, I could isolate the mutants that tend to lose DNA methylation within gene. These results propose the novel point of view for the function of DNA methylation in DNA replication and DNA damage, as well as providing the suitable material for the research in gene body DNA methylation.

研究分野：生物

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 転写

1. 研究開始当初の背景

遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化は遺伝子発現抑制に作用することが知られている。また、DNA メチル化を介した反復配列の抑制は、ゲノムの安定化制御に深く関わると考えられている。しかしながら、近年、様々な真核ゲノムの DNA メチル化状態が次々と決定され、DNA メチル化は不活化された遺伝子や反復配列のみならず、多くの発現活性化状態にある遺伝子の転写領域においても高度に蓄積することが明らかにされている。その DNA メチル化量と遺伝子発現量の間には正の相関があることから、「遺伝子発現に対してポジティブな働きを持つ DNA メチル化の新たな機能の存在」が示唆されている。これら遺伝子転写領域上の DNA メチル化は動物から植物にいたるまで広く保存されていることから、遺伝子転写領域上の DNA メチル化の重要性が示唆される。

モデル植物シロイヌナズナにおいて、DNA メチル化酵素 MET1 はゲノムワイドに CpG 配列の DNA をメチル化修飾する。この遺伝子変異株ではゲノム上の不活性化領域、活性化遺伝子領域ともに CpG DNA メチル化を消失することから、MET1 が遺伝子転写領域上の DNA メチル化を担う酵素である。しかし、不活化領域における DNA メチル化を減少する既知の変異体において、遺伝子転写領域における DNA メチル化は変化しないことから、遺伝子転写領域における DNA メチル化は、遺伝子抑制機構とは異なる特有かつ新規な DNA メチル化機構により制御されており、遺伝子転写領域特異的に DNA メチル化を制御する何らかの制御因子が存在することが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物シロイヌナズナの DNA メチル化酵素 MET1 遺伝子の変異体を用いて、*met1* 変異により生じる遺伝子転写領域上のメチル化消失現象とその機能を解析するとともに、遺伝子転写領域の DNA メチル化に必須な新規因子の探索を行い、遺伝子転写領域における DNA メチル化の役割とその制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

始めに、遺伝子転写領域における DNA メチル化の役割についても解明を目指した。ゲノムワイドな DNA メチル化解析の結果から、遺伝子転写領域のエクソン上に認められる DNA メチル化量とその領域の転写量が相関することが報告されており、遺伝子転写領域上の DNA メチル化が転写調節に関与することが示唆された。しかしながら、*met1* 変異株において遺伝子転写領域上の DNA メチル化が消失しているにも拘らず、その遺伝子発現量は大きく変化しないことも明らかであった(研究代表者未発表データ)。このことから、遺伝子

転写領域における DNA メチル化が、単に転写量を制御するのではなく、スプライシングや転写伸長など、転写機能を正常に保つための何らかの制御に関与すると考えられた。そこで、上記で単離した変異株を中心に *met1* 変異株と合わせて様々な転写解析およびゲノムワイドな解析を行い、遺伝子転写領域上に蓄積する DNA メチル化の生物学的機能について調べた。転写伸長の安定化、転写開始の誘導性など、発現活性化遺伝子上に存在する DNA メチル化が関与しうる様々な作用点を考慮し、分子生物学的手法や情報学的手法を駆使して、DNA メチル化の機能スクリーニング解析を行った。

また、遺伝子転写領域のメチル化を制御する機構を正確に理解する上で、遺伝子転写領域特異的に DNA メチル化に機能する因子の解析が重要な鍵を握る。ここではじめに、本研究では遺伝子転写領域特異的に DNA メチル化が消失する変異株の探索と機能解析を行った。申請者の所属する研究室が所有する約 3000 ラインの EMS 処理遺伝子破壊株システムを用いて、遺伝子転写領域上の DNA メチル化が消失する変異株の探索を行った。遺伝子転写領域に対してより高い特異性を示す変異株をこれらの中から選定した後、シーケンサーを利用した配列同定により、原因遺伝子を同定した。また、その変異体における DNA メチル化状態を、いくつかの遺伝子領域について調べ、変異の DNA メチル化に与える影響の作用機序を考察した。

4. 研究成果

本研究は、転写活性化状態にある遺伝子転写領域上の DNA メチル化の機能を解明し、DNA メチル化の生物学的本質および進化的意義を知ることが目的とした。

始めに、遺伝子転写領域上の DNA メチル化と遺伝子発現量が相関するという知見をもとに、遺伝子転写領域上の DNA メチル化を大きく消失するシロイヌナズナ *met1* 遺伝子変異体を用いたゲノムワイドな発現解析を行った。その結果、ゲノム上のトランスポゾンや反復配列などの転写不活化領域においては *met1* 変異による転写活性化が認められたが、転写活性化状態にあり、遺伝子転写領域上に DNA メチル化を有する遺伝子の転写活性には顕著な差は認められなかった。このため、遺伝子転写領域上の DNA メチル化は、単に転写量や転写恒常性を制御するのではなく、転写と関連する何か別の制御を担うことが示唆された。さらに、公開データを利用した情報学的解析から、転写領域が長く恒常的に発現する遺伝子(図 1)、また、分裂細胞や DNA 複製期に活発に発現している遺伝子は、その転写領域に高度な DNA メチル化を有することが明らかとなった。

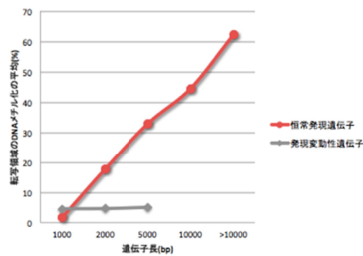


図1 恒常発現遺伝子と発現変動性遺伝子における遺伝子長と転写領域のDNAメチル化の関係

恒常的に発現する遺伝子は、DNA複製期においても転写活性化状態にあるといえる。そのため、DNA複製期において発現する遺伝子および恒常発現遺伝子は、転写機構と複製フォークの衝突によるDNAのねじれストレスが発生することが知られる。そのねじれストレスは遺伝子長が長いほど強く、解消できない場合はDNA傷害を誘発することもある。本研究では、DNA複製期においてねじれストレスが多発する遺伝子と、遺伝子転写領域上のDNAメチル化を高蓄積する遺伝子の特徴が一致することに着目し、DNA複製期におけるねじれストレスおよびDNA傷害と遺伝子転写領域上のDNAメチル化との関係を調べた。

分裂細胞を多く含む発芽5日後の植物体を用いて遺伝子発現解析を行った結果、*met1-3*変異体においてDNA傷害応答遺伝子や細胞周期チェックポイントのマーカー遺伝子が高発現していることが明らかとなり、*met1*変異体においてDNA傷害が多発し、細胞周期の遅延が生じていることが示唆された。さらに、DNA複製期におけるねじれストレスの解消に働くトポイソメラーゼ1の阻害剤カンプトシンに対する感受性試験を行った結果、*met1*変異体が非常に強い感受性を示した(図2)。一方、これら変異体でみられた表現型および発現異常は、トランスポゾンや反復配列特異的にDNAメチル化を消失する*ddm1*変異体においては認められなかったことから、*met1*変異体における遺伝子転写領域上のDNAメチル化の消失が上記の表現型および発現異常を引き起こしていると考えられる。以上の結果は、活性化状態にある遺伝子転写領域のDNAメチル化が、DNA複製期におけるねじれストレスおよびDNA傷害に対し抑制的にはたらく可能性を強く示唆する。



図2 トポイソメラーゼ阻害剤感受性試験

さらに本研究では、遺伝子転写領域におけるDNAメチル化の制御機構に關与する新奇因子を同定するため、遺伝子転写領域のDNAメチル化が減少する変異体の探索を行った。その結果、いくつかの候補変異体の単離に成功した。その候補変異体の表現型は、遺伝子転写領域および不活化領域ともにDNAメチル化を消失する*met1*変異体や、トランスポゾンなど不活化領域特異的にDNAメチル化を消失する*ddm1*変異体とは異なっていた。このことは、遺伝子転写領域のDNAメチル化の減少が、植物の発生異常を誘発している、すなわち、遺伝子転写領域のDNAメチル化を介した植物の発生、分化の未知の制御機構の存在を示唆すると考える。これまでに、遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化がその遺伝子発現を抑制し、植物の発生、分化を制御している事例は多数報告されているが、遺伝子転写領域のDNAメチル化の寄与については、ほとんど知られていない。本研究で得られた植物変異体は、遺伝子転写領域のDNAメチル化の役割や制御機構の探索に有用なだけでなく、植物の発生、分化の制御機構を新規的な角度で切り込む材料を提供する。

これまでの知見では、DNAメチル化の生物学的機能として、トランスポゾンなど反復配列や不活化遺伝子の発現抑制、ヘテロクロマチン化の構造維持などが古くから知られているが、ユークロマチン領域に存在するDNAメチル化、特に転写活性化状態にある遺伝子転写領域上のDNAメチル化の生物学的機能に迫る先行研究は、ほとんどなかった。本研究では、ゲノムや遺伝子の構造がシンプルで、DNAメチル化の研究に適したモデル生物シロイヌナズナを用いて、転写活性化状態にある遺伝子転写領域上のDNAメチル化がもつ生物学的機能の探索を試みたところ、活性化状態にある遺伝子転写領域のDNAメチル化が、DNA複製期におけるねじれストレスおよびDNA傷害に対し抑制的にはたらく可能性を示唆する結果を得ることに成功した。このことは、DNAメチル化というエピジェネティックな情報が、DNA複製やDNA傷害に深く關連する可能性を示唆する新たな視点を提供する。活性化状態にある遺伝子転写領域のDNAメチル化は、多くの真核生物に保存されていることから、マウスやヒトを含む他の真核生物におけるDNAメチル化、DNA複製やDNA傷害研究に対する、シロイヌナズナを用いた本研究結果の応用が期待される。

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 1 件)

Taiko Kim To, Jong Myong Kim, Epigenetic regulation of gene responsiveness in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 査読有、4巻、2014、548.
DOI: 10.3389/fpls.2013.00548.

〔学会発表〕(計 1 件)

Taiko Kim To, Epigenetic regulation in plant environmental responses. 日本遺伝学会、第85回大会、招待講演、2013年9月23日、慶応大学日吉キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤 泰子 (To Taiko)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・
特任研究員

研究者番号：10623978

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：