

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790137

研究課題名(和文) エピゲノム情報のプロファイリングによる種子エピジェネティクスの分子基盤の確立

研究課題名(英文) Epigenome information profiling for molecular basis on seed epigenetics

研究代表者

中村 公亮 (Nakamura, Kosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部・主任研究官

研究者番号：60570926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAのメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化は、塩基配列に基づかない遺伝情報(エピゲノム情報)として体細胞分裂や世代の壁を超えて伝達・維持される。しかし、植物体、特に種子の状態から発芽後までのエピゲノムのダイナミズムとしての情報は十分に得られていない。本研究では、イネ種子における野生型と遺伝子組換え型種子を実験モデルに使用し、それらの種子一粒毎についてそのゲノムDNAのメチル化パターンとヒストン修飾パターンを分析し、それらのデータを統合して多変量解析した。その結果、植物体への異種遺伝子導入は、イネ種子のゲノムに野生株とは異なるメチル化をもたらしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genomic DNA and histone modifications, such as methylation, acetylation and phosphorylation, code for epigenetic information which control cellular function such as gene expression and regulation. This information is independent of the nucleic acid sequence, and is transmitted and maintained through cell division and generations. However, the epigenetic dynamics among plants, especially dry seed to its germinal stage at individual grain level, have not been well characterized. In this study, an experimental model system was developed to analyze pattern of the genomic DNA methylation and histone modifications in genetically modified and wild-type rice. The obtained data were analyzed using multivariable statistical method. For the first time, the epigenetic information profiling showed that the genetically modified seed may differ from the wild-type seed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：種子 遺伝子導入 ゲノム エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の生体を構成する全ての細胞は、同一の塩基配列情報を持つにも関わらず、それぞれの細胞種ごとに異なる表現型とその基盤となる遺伝子発現プロファイルを有することが知られている。この現象は、ゲノム DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化・リン酸化など、塩基配列に基づかない遺伝情報（エピゲノム情報）として、遺伝子の発現やその制御機構を担うことに起因し、体細胞分裂や世代の壁を超えて伝達・維持される。植物体への異種遺伝子導入に伴うエピゲノム情報の変化に関しては、未だ詳細な解析がなされておらず、野生型と遺伝子組換え型の違いなどの情報は十分に得られていない。特に乾燥状態の種子においては、発芽に伴う遺伝子は活性化前であり、ゲノムの修飾に関わる酵素は働いておらず、修飾パターンは種子粒間で保存されている情報であると推察された(図1)。種子一粒単位でエピゲノム情報を網羅的に解析し、複数粒から得られた全情報をまとめ、解析した例はこれまでにない。

2. 研究の目的

植物体への異種遺伝子導入は、イネ種子(玄米)のゲノムに野生型とは異なるメチル化などエピゲノム変化をもたらしているこ

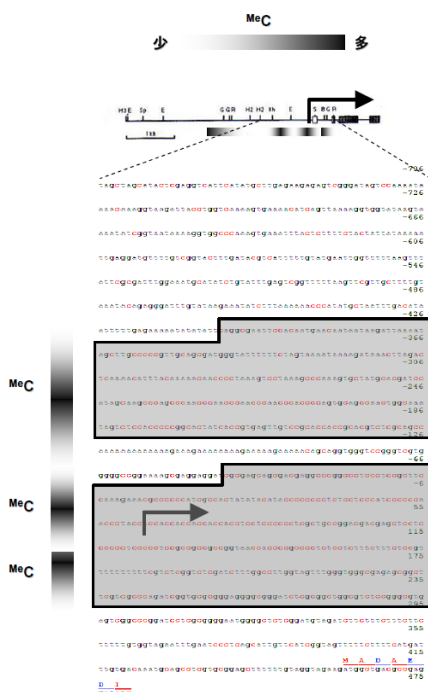


図1.イネ *actin 1* 遺伝子領域のメチレーション対象配列の islet 領域

とを明らかにするため、まず種子エピゲノムのダイナミズムとしての分子基盤の確立を目指した。野生型及び遺伝子組換え型の玄米種子を供試サンプルとして、ゲノム(DNA及びヒストン)の、特に遺伝子組換えの際に目的遺伝子を発現させるために汎用される内在性 Actin 遺伝子のプロモーター (Act1 プロモーター)のエピジェネティックパターンに着目し網羅的に解析し得たデータを、多変量解析法である Principal Component Similarity (PCS, 主因子類似性解析)を用いてプロファイリングを試みる。特に、

- (1) 玄米種子を対象にした一粒単位での解析
- (2) 野生型種子と遺伝子組換え型種子間のゲノム DNA のメチル化やヒストン修飾のプロファイルを多変量解析プログラムを使用し網羅的に解析
- (3) 発芽時の外的環境が遺伝子修飾様式のバラエティーに及ぼす影響についての解析

の3点に焦点を絞って、最終的にゲノム中に挿入された組換え遺伝子の特徴をつかむことを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目標を達成するため、単子葉植物で組換え遺伝子の発現を目的に汎用されるイネ由来 Act1 プロモーター制御下で GFP を発現するトランスジェニック構造配列を有する Ti ベクター-pSTARA(R5)-GFP (図2)をアグロバクテリウムよりイネゲノムへ導入し、

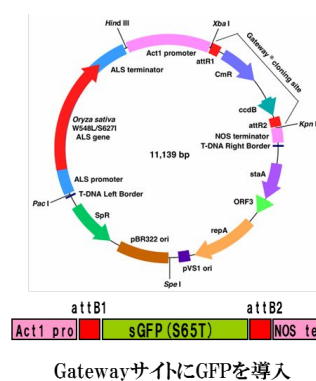


図2. pSTARA(R5)-GFP コンストラクト構造

作成した遺伝子組換えイネの種子を用いて解析を行った。Act1 プロモーターは、日本晴品種の染色体3番の開始コドンから846 bp上流(-846~+1)について種子間のエピゲノム情報のプロファイリングを行った。野生型種子では、玄米種子4粒の発芽前と発芽後1年後とのゲノム DNA のメチル化修飾パターン

を比較し、野生型種子の Act1 プロモーターの普遍的プロファイリングデータとした。また、環境刺激が修飾バラエティーに及ぼす影響について調べた。遺伝子組換え種子に関しては、野生型種子で解析した 846 bp 領域に関して、環境刺激前後の状態の修飾プロファイリングを行い、野生型種子とは異なるパターンを探索した。

4. 研究成果

乾燥状態の種子のゲノム DNA 試料は、イネ由来 Act1 プロモーター制御下で GFP を発現させるコンストラクト構造を持つ pSTARA(R5)-GFP プラスミドを導入した GM イネとその野生型（日本晴品種）イネの玄米から調製した。発芽前の乾燥状態の種子は、遺伝子発現などの生理活性が不活性化した状態であるため、イネゲノム DNA の修飾バラエティーが種子間で一律であると考えた。そこで、単子葉植物の組換え遺伝子の発現に使用されるイネ由来の Act1 プロモーター上の DNA メチル化修飾パターンを内在型と導入型で比較することとした。野生型の種子と発芽後 1 年の成熟イネから精製した DNA をバイサルファイト処理し、Act1 プロモーター 846 bp 解析対象中の DNA メチル化対象の全シトシン塩基 48 塩基に関して、メチル化比率を調べた（図 3）。乾燥状態の玄米では、発

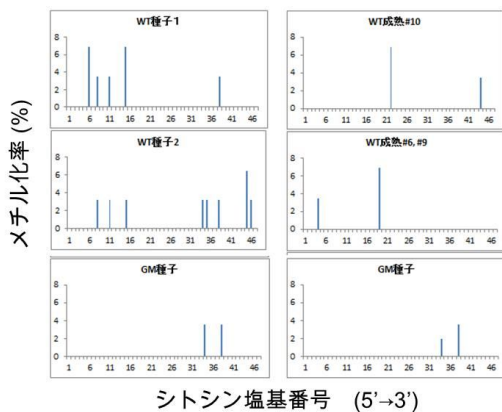


図 3. イネ *actin 1* 遺伝子領域のメチル化率

芽後の Act1 プロモーターと比較し、メチル化対象シトシンは 2.5 ~ 8 倍以上、メチル化率も最大 4 倍以上の差を検出した。これは、発芽後にイネが *actin* 遺伝子の発現を活性化させるため、発芽前に休止状態であった遺伝子を発現させるためプロモーターを非メチル化させ活性化させるためであることが示唆された。また、同様にイネとは別のシロイヌナズナ由来 ALS プロモーターを有する pSTARA

A-2-sGFP を導入した遺伝子組換え玄米の ALS プロモーターを解析した。その結果、発芽後の ALS プロモーター領域のメチル化率は発芽前の種子中のプロモーターと比較し、2.3 ~ 4.6 倍低下しており発芽と同時にプロモーターを活性化する変化が生じていると考えられた。特に内在性遺伝子のプロモーター配列は本来ゲノム中に存在している配列と遺伝子組換えにより導入された配列の DNA メチル化パターンに差が生じていることが確認され（図 3）、このパターンを多変量解析用のデータとして利用し、野生型および遺伝子組換え型種子の判別に利用することを考案した。

上述したバイサルファイト処理を行った DNA をシーケンス解析する BSS 法を使用したデータに加え、DNA メチレーション部位の特定は、DNA メチル化可変部位を検出することのできる DNA メチル化感受性酵素 (*AfaI*, *BssHII*, *Eco52I*, *ApaI*) と PCR を組合わせた MS-AP-PCR 法、及び、非メチル化感受性制限酵素 (*MspI*, *EcoRI*) をリファレンスとして組合わせることによってリアルタイム PCR を利用し定量（図 4）を行った。リアルタイ

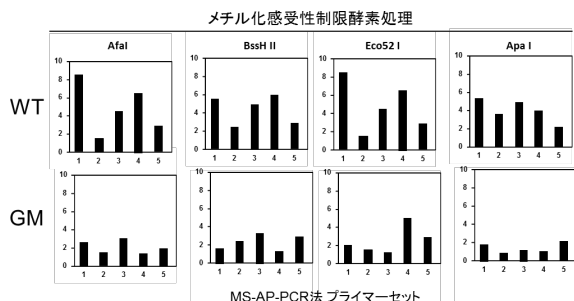


図 4. メチル化感受性制限酵素処理を行った DNA を鋳型に定量リアルタイム PCR を行った結果

ム PCR の結果で得られる Ct 値と End-point 値を PCS 解析に付し、エピゲノム情報のプロファイリングを行った。得られた Ct 値と End-point 値ともに、Act1 プロモーター全体的に遺伝子組換え種子の方が最大約 84% 低い傾向が得られた。ヒストン修飾のプロファイリングは、化学修飾特異的かつヒストンバリエーション特異的な抗ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いて解析した。ChIP 解析用の鋳型 DNA は、ヘテロクロマチン構造に局在する H3 ヒストン修飾である Me-Lys9 及び diMe-Lys9 に特異的な抗体、ユークロマチン構造に局在する H3 ヒストン修飾である Me-Lys4, diMe-Lys4 及び Ac-Lys9 に特異的な抗体を使用し、MS-AP-PCR 法で使用したプライマー対を用いてリアルタイ

Δ PCR より定量を行った。その結果、内在性遺伝子配列は、組換え遺伝子の配列と比較し Me-Lys9 及び diMe-Lys9 に対する抗体で共沈した DNA がそれぞれ内在性遺伝子の 1.5 倍と 2.4 倍であった。その結果、組換え遺伝子の配列はよりユークロマチン化されている傾向にあることが判った。得られた全てのデータは多変量解析のため PCS プログラムに供し、野生型及び遺伝子組換え型種子のプロファイリングを行った。その結果、野生型と遺伝子組換え型種子を判別可能なグループ化が可能であることが示唆された。現在、発芽時の外的環境刺激下における変化について解析を行っているところであるが、概ね同様の変化は維持されたままであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件) 全て査読あり

1. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014
2. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014
3. Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to *papaya ringspot virus* strains in Thailand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1-5, 2014.
4. Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 20, 161-169, 2013.
5. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct. *Food Chemistry*, 141, 2618-2624, 2013.
6. Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136, 895-901, 2013
7. Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hygiene and Safety Science*, 54, 309-315, 2013.
8. Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1454-1459, 2013.
9. Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya. *Journal of AOAC International*, 96, 1054-1058, 2013.
10. Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 32, 728-735, 2013.
11. Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, 2012
12. Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and identification of genetically modified maize events in non-identity preserved maize samples in 2009 using an individual kernel detection system. *Food Hygiene and Safety Science*, 53, 157-165, 2012
13. Mano, J., Harada, M., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Noritake, H., Hatano, S., Futo, S.,

Minegishi, Y., Iizuka T. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation, Journal of AOAC International, 95, 508-516, 2012

〔学会発表〕(計 27 件)

1. Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J. Novel monitoring scheme for authorized GM maize, GMCC-13, Portugal, 2013 年 11 月.
2. Nakamura, K., Kobayashi, T., Nakamura, S., Kondo, K., Teshima, R. Development of a novel heterogeneous and homogeneous gene screening method for detecting unauthorized genetically modified rice in processed rice products. Pharma-nutrition 2013, Singapore, 2013 年 4 月.
3. Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, 2012 年 12 月.
4. Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, 2012 年 10 月.
5. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子: 遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月.
11. 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、布藤 聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月.
6. 近藤一成、坂田こずえ、赤星千絵、黒飛希美、中村公亮、野口秋雄、小林友子、手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメの場合) 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月.
7. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、大森清美、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、手島玲子: 安全性未

承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会、富山、2013 年 11 月.

8. 真野潤一、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、二宮健二、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高畠令王奈、橘田和美: ダイレクトリアルタイム PCR による食品分析の可能性検証、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月.
9. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 2010 年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月.
10. 中村公亮、小林友子、真野潤一、野口秋雄、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月.
11. 中村公亮、小林友子、野口秋雄、大森清美、高畠令王奈、橘田和美、穠山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月.
12. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹: シリカモノリススペースによる複雑系穀物マトリックスから DNA の抽出・精製、第 106 回 日本食品衛生学会学術講演会、沖縄、2013 年 11 月.
13. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穠山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月.
14. 中村公亮、穠山浩、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月.
15. 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橘田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第 19 回 総会・学術大会、名古屋、2013 年 8 月.
16. 真野潤一、原田美央子、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、則武寛通、飯塚太由、中村公亮、穠山浩、手島玲子、高畠令王奈、古

井聡、橘田和美：遺伝子組換え農産物網羅的検知法の単一試験室による妥当性確認、2013年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2013年6月。

17. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：デジタルPCRを利用した遺伝子組換え農産物の高精度定量、日本食品衛生学会第105回大会、東京、2013年5月。

18. 中島治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子：ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について、日本薬学会 第133年会、横浜、2013年3月。

19. 中村公亮、穠山浩、野口秋雄、小林友子、坂田こずえ、近藤一成、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：パパイヤ加工品の遺伝子組換えパパイヤ含有に関する総合的評価法、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、2012年11月。

20. 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、小林友子、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ 55-1 系統特異的検知法の妥当性評価、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、2012年11月。

21. 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発（第二報）、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、2012年9月。

22. 小林友子、中村公亮、近藤一成、野口秋雄、小櫃冴未、峰岸恭孝、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、2012年9月。

23. 中村公亮、南竹優美、近藤一成、野口秋雄、小櫃冴未、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、川上浩、手島玲子：遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモ DNA の断片長について、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、2012年9月。

24. 真野潤一、高島かおり、峯岸恭孝、二宮健二、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：遺伝子組換えトウモロコシグループテスト法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、2012年9月。

25. 西辻泰之、菊池洋介、真野潤一、福留真一、遠藤繁、林田拓也、川上裕之、栗本洋一、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイムPCRアレイ法への適用、第104回日本

食品衛生学会学術講演会、岡山、2012年9月。
26. 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、吉松嘉代、野口秋雄、近藤一成、真野潤一、橘田和美、手島玲子：日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ（Kefeng 系統）混入に関する検知技術の開発について（第2報）、日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会、函館、2012年6月。

27. 高島令王奈、則武寛通、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、真野潤一、橘田和美：加工品を含む複数のスイートコーン試料からのDNA抽出法の検討、日本食品化学学会 第18回 総会・学術大会、函館、2012年6月。

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村公亮 (KOSUKE NAKAMURA)
国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官
研究者番号：60570926

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし