

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840107

研究課題名(和文) エピ変異体の解析により明らかにする脱分化・再生過程におけるDNAメチル化の役割

研究課題名(英文) Study on role of DNA methylation for plant cell reprogramming by using Arabidopsis epi-mutants.

研究代表者

西村 泰介(Nishimura, Taisuke)

長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10378581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特定の遺伝子領域のDNAメチル化のパターンが野生型と異なるシロイヌナズナのエピジェネティック組換え自殖系統群(epiRILs)に対して、カルス化とシュート再生誘導実験を行い、野生型よりもシュート再生効率が高い系統と低い系統をそれぞれ複数単離した。安定に表現型を示すシュート再生効率が高い系統について遺伝解析を行ったところ、この形質は優性で、少なくとも2つ以上の遺伝子座の影響に依ることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：By the screening of Arabidopsis epiRILs (epigenetic Recombinant Inbred Lines) in which genetic sequences are mostly identical, but patterns of DNA methylation are highly variable on their genome, several lines that exhibit high or low efficiency of shoot regeneration from callus have been identified. In one of lines with high shoot regeneration efficiency, the phenotypes inherit stably with a dominant manner, and would be caused by at least two loci.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：細胞リプログラミング DNAメチル化 シロイヌナズナ エピジェネティクス 分化

1. 研究開始当初の背景

(1) iPS 細胞作製技術の発達により、哺乳動物でも分化した細胞を未分化な細胞に初期化する事が可能になった。しかし、それ以前より植物では、外的環境によって分化した細胞が容易に脱分化し、分化全能性を持つ未分化な細胞に変化することが知られている。またこの過程は植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンを与えることで人為的に操作することが可能である。オーキシンを分化した植物組織に与えると、未分化な細胞塊(カルス)へと脱分化するが、このカルスはサイトカイニンを与えることで、再び分化し、これらの植物ホルモンの濃度比に応じて、地上部(シュート)や地下部(根)を再生する。しかしながらこの過程の背景で作用する分子機構については、まだまだ未解明な点が多い。

(2) 哺乳動物での ES 細胞や iPS 細胞からの発生や再生の研究が進むにつれ、脱分化や分化の過程でゲノム上の DNA メチル化のパターンが大きく変化し、この変化自体が、細胞の脱分化・分化過程に積極的に作用することが次第に明らかになってきた。植物でも同様のパターン変化が観察され⁽¹⁾、シロイヌナズナの DNA メチル化維持酵素・突然変異体 *met1* では、DNA メチル化のレベルが減少した結果、カルス化及びそれに続く再生過程に異常が観察されることが知られている⁽²⁾。しかしながら DNA メチル化がどのように脱分化・再生の過程に作用するか、またこの過程でこういった遺伝子群の発現を制御しているかは、いまだ明らかでない。

(3) 植物は哺乳動物と異なり、世代間で DNA メチル化の情報が維持される。このため DNA メチル化パターンの変化によって生じた表現型が次世代にまで引き継がれ、遺伝することが知られている。このような DNA メチル化のパターン変化はエピ変異と呼ばれ、これまでもシロイヌナズナで花器官の形成や花成時期に異常が観察される *clk* や *fwa* などが報告されている⁽³⁾⁽⁴⁾。しかしながら、これまで報告されているエピ変異体は、自然環境の中、もしくは DNA メチル化異常変異体背景で、偶発的に得られたものばかりである。

2. 研究の目的

哺乳動物と同様に、植物においても脱分化・再生の過程に DNA メチル化による制御が深く関与することが知られているがその詳細は不明である。そこで本研究では、脱分化・再生過程が異常になる新規エピ変異体を独自の方法で単離・解析することで、DNA メチル化に制御される脱分化・再生関連遺伝子を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) カルス化もしくはシュート再生に異常

が観察されるエピ変異体の選抜

本研究計画では、エピ変異体の選抜を行うためのリソースとして、エピジェネティック組換え自殖系統(epigenetic Recombinant Inbred Lines; epiRILs)を用いる。epiRILs はシロイヌナズナの *met1* 突然変異体と野生型を交配し、6 世代以上自殖を繰り返した系統群で、系統ごとに、ゲノム上の特定の部位で DNA メチル化のパターンがそれぞれ異なる事が期待される(図1)⁽⁵⁾。

約 70 系統確立されている epiRIL 系統について、植物体から切除した根や胚軸に対して、植物ホルモンを与える事で、カルス化とシュート再生を誘導し、その効率が野生型と異なる系統を選抜する。

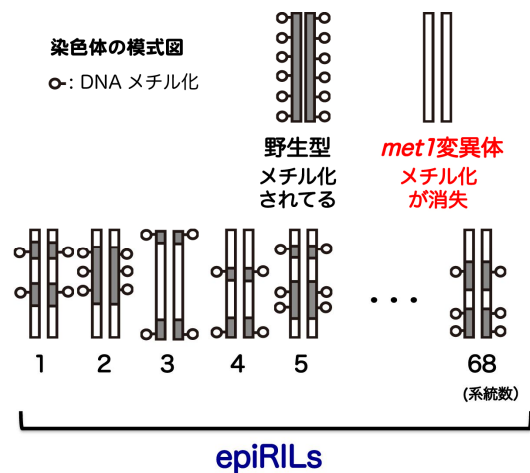


図1 epiRILs は各系統間で塩基配列は野生型とほぼ同一であるが、染色体上の位置によって DNA メチル化のパターンが異なる系統群。

(2) (1) で得られた epiRIL 系統の遺伝解析

得られた候補変異体について、次世代でも同様にカルス化とシュート再生を誘導し、表現型(効率の変化)が遺伝されるか観察する。また、野生型に戻し交配し、雑種第 1 世代、第 2 世代でもカルス化とシュート再生を誘導して観察することで、優劣性と関与する遺伝子座の数を明らかにする。

(3) 連鎖解析とトランスクリプトーム・メチローム解析によるエピ変異遺伝子座の同定、及び解析

epiRILs は Columbia アクセション背景であることから、Landsberg といった異なるアクセション背景の野生型系統に戻し交配を行い、後代における表現型と、アクセション間の遺伝子多型マーカーとの連鎖解析を行い、原因遺伝子領域を同定する。また、マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム及びメチローム解析により、同定された遺伝子領域内で、発現量や DNA メチル化が変化された遺伝子を特定する。

4. 研究成果

(1) シュート再生効率が野生型と異なる epiRIL 系統の発見

約 70 系統の epiRILs のうち、60 系統について、カルス化とシュート再生を行った結果、カルス化効率が野生型と異なる系統は得られなかったが、シュート再生効率が野生型より低下した系統と上昇した系統が、それぞれ少なくとも 2 系統ずつ発見することに成功した。

(2) epiRIL 系統 #A81 はシュート再生効率が低下する

新規に発見したシュート再生効率が低下する 2 系統の epiRILs の内、#A81 と名付けた epiRIL は、比較的高い頻度で次世代にその表現型が引き継がれた。

また植物ホルモンの感受性を調べた結果、サイトカイニンに対する感受性が低下していることが示唆された。

(3) epiRIL 系統 #A471 はシュート再生効率が上昇する

新規に発見したシュート再生効率が上昇する 2 系統の epiRILs の内、#A471 と名付けた epiRIL は、ほぼ全ての次世代の植物個体でその表現型が引き継がれた。この #A471 系統では、カルス化効率自体は野生型と違いが観察されなかったが、野生型では緑化が観察されないサイトカイニン濃度で、カルスが緑化した (図 2)。

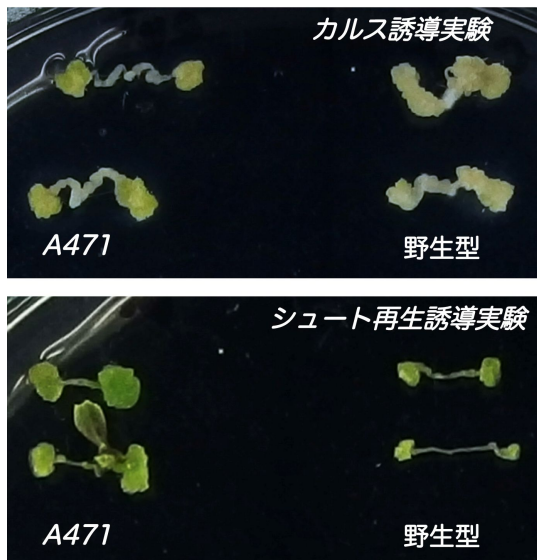


図 2 #A471 系統の表現型。カルス誘導実験 (上図) では、野生型では緑化しないサイトカイニン濃度で、緑化が観察される。シュート再生誘導実験 (下図) では、シュート再生効率の上昇が観察される。

(4) #A471 の形質は優性を示し 2 遺伝子座以上に起因する

#A471 を野生型に戻し交配し、次の第 1 世代を観察したところ、シュート再生効率の上昇とカルス緑化の両方の表現型が観察され

たことから、これらの表現型は、優性形質であることが明らかになった。また第 2 世代における表現型を示す個体の分離比から、これらの形質は少なくとも 2 つ以上の遺伝子座に起因する事が示された。

(5) #A471 系統は連鎖解析が可能で原因遺伝子座の 1 つは 4 番染色体上に座乗する可能性が高い

原因遺伝子座の同定を目指し、連鎖解析を行うために、異なるアクセッション背景である Landsberg 野生型系統に交配し、雑種第 2 世代を観察したところ、シュート再生効率上昇とカルス緑化の両方の表現型が認められた。この結果は、#A471 は連鎖解析による原因遺伝子座の同定が可能であることを示している。実際に小規模で連鎖解析を行ったところ、原因遺伝子座の 1 つは 4 番染色体上に座乗する可能性が高いことが示唆された。

(6) 今後の展望

本研究により、epiRILs から #A471 というシュート再生効率の高い、非常に安定したエピ変異体候補系統を単離することに成功した。同じ表現型を示す epiRIL 系統が少なくとも 1 系統、独立に得られており、これらの系統で観察される表現型は同じ遺伝子座における DNA メチル化の変化によって引き起こされたと考えられる。以上の結果は、epiRILs はエピ変異体を単離するための格好のソースとなり得ることを示している。

残念ながら、当初の到達目標である原因遺伝子座の同定は、研究期間内に行う事ができなかったが、連鎖解析が可能であることを示したことは、原因遺伝子同定の道筋を立てることに成功したと言える。最近、epiRILs から得られた量的形質を示す遺伝子座の同定の試みが報告されたが、原因遺伝子の同定には至っていない⁽⁶⁾。本研究が世界初の事例となるようにさらに研究を進める。

< 引用文献 >

- Tanurdizic et al. (2008), PLoS Biol. 6, e302.
- Berdasco et al. (2008), PLoS One 3, e3306.
- Jacobsen & Meyerowitz (1997), Science 277, 1100-11-3.
- Soppe et al. (2000), Mol. Cell 6, 791-802.
- Reinders et al. (2009), Genes & Dev. 23, 939-950.
- Cortijo et al. (2014), Science 343, 1145-1148.

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)

Y. Ohno, T. Nishimura, T. Hattori, S. Takeda. BRU1 maintains configuration of the euchromatic subchromosomal domain in the nucleus of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 32, 19-27 (2014). 査読有り。
DOI:10.1007/s11105-013-0596-x

〔学会発表〕(計 6 件)

西村泰介 他、カルスからの再分化過程に異常を示す新規エピ変異体の探索、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)。

西村泰介 他、脱分化・再分化過程に異常を示す新規エピ変異体、第 32 回日本植物細胞分子生物学会大会、2014 年 8 月 22 日、アイーナいわて県民情報交流センター(岩手県盛岡市)。

西村泰介 他、細胞リプログラミング過程に異常を示す新規エピ変異体の探索、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 13 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)。

Taisuke Nishimura, The epigenetic factor acting downstream of DNA methylation in *Arabidopsis*, The 38th NAITO Conference on Molecule-based biological systems, 2014 年 10 月 8 日、シャトレ・ゼガトーキングダムサッポロ(北海道札幌市)。

西村泰介 他、細胞リプログラミング過程に異常を示すシロイヌナズナ新規エピ変異体の探索、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)。

Taisuke Nishimura, DNA methylation in gene silencing and cell reprogramming, IPSR 共同利用・共同拠点ワークショップ Plant Epigenetics: From Emerging Phenomena to Novel Molecular Events. 2015 年 1 月 31 日、倉敷市芸文館(岡山県倉敷市)

〔図書〕(計 1 件)

Y. Ikeda and T. Nishimura, Springer, The role of DNA methylation in transposable element silencing and genomic imprinting, in *Nuclear Functions in Plant Transcription, Signaling and Development* (Ed. O. Pontes, H. Jing), 2015, 13-29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 泰介 (NISHIMURA, Taisuke)

長岡技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10378581