

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871014

研究課題名(和文) 高等植物ヒストンH3K9脱メチル化機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of H3K9 demethylation in higher plant

研究代表者

佐瀬 英俊 (Saze, Hidetoshi)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：70510006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：動植物ゲノムの大部分を占めるリピート配列はDNAメチル化などのエピジェネティック修飾の働きにより不活化される。その一方で申請者らはこれまでの研究から生存に必須な遺伝子群を不活性化から保護する機構の存在を示した。本研究ではシロイヌナズナの遺伝子領域に高DNAメチル化が引き起こされる変異体の解析からヒストン脱メチル化酵素のエピジェネティックな発現制御がゲノムワイドなDNAメチル化の抑制に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The genomes of vertebrates and plants contain a substantial number of transposable elements (TEs), which are silenced by repressive epigenetic modifications, such as cytosine methylation. Using Arabidopsis DNA hypermethylation mutants, we found that removal of H3K9 methylation and non-CG methylation at transcribed genic regions is affected by epigenetic regulation of H3K9 demethylase gene.

研究分野：遺伝学

キーワード：エピジェネティクス エピジェネティクス トランスポゾン DNAメチル化 植物科学

1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノムではその大部分をトランスポゾンなどのリピート配列が占めているが、これらの配列はヘテロクロマチンと呼ばれる高度に凝集した構造をとって不活化されている。これまでの研究により、このヘテロクロマチン形成には DNA シトシン塩基のメチル化やヒストン H3Lys9 メチル化 (H3K9me)そして低分子 RNA の生成などのエピジェネティックな制御が関与していることが明らかになっている (参考文献 1,2)。このリピート配列のヘテロクロマチン化による抑制は、偶発的な染色体の組み換えや DNA 損傷、トランスポゾンの活性化による遺伝子の破壊などを防ぎ、ゲノム構造を安定化させるために重要な働きをしていると考えられている。

この特定の DNA 配列に対するヘテロクロマチン修飾の制御については、『細胞がどのような機構でヘテロクロマチン修飾の標的とするリピート配列とそれ以外の通常の遺伝子配列を認識しているのか?』という未解明の問題がある。誤制御された異所的なヘテロクロマチン修飾は哺乳類の癌細胞での癌抑制遺伝子のサイレンシングの誘発や、植物においては発生異常を引き起こす要因となる (3, 4)。これまでの先行する研究によってリピート配列のヘテロクロマチン修飾の確立、維持には DNA メチル化酵素やヒストンメチル化酵素、RNAi 因子などが関与していることが明らかにされてきたが、その一方で遺伝子領域からヘテロクロマチン修飾を積極的に排除する分子メカニズムについてはほとんど理解がすすんでいない。

2. 研究の目的

仮にリピート配列以外の遺伝子領域からヘテロクロマチン修飾を積極的に除去する機構が存在するならば、その機能喪失変異体では異所的に DNA メチル化や H3K9me の蓄積が引き起こされることが推察される。我々はモデル植物シロイヌナズナを用いて異所的に DNA メチル化が上昇する変異体の選抜を行い、複数単離された変異体中からその一つの原因遺伝子 IBM1 (Increase in BONSAI Methylation1) を同定した (5)。IBM1 は jmjC ドメインを持つタンパク質であり、哺乳類の KDM3/JHDM2 クラスのヒストン H3K9 脱メチル化酵素と高い相同性を持つ。この *ibm1* 変異体は不稔を含む多面的で重篤な発生異常の表現型を示す。*ibm1* 変異体を用いたゲノムワイドな DNA メチル化解析の結果、この変異体ではゲノム中の 4000 以上の遺伝子、特に mRNA が転写されている遺伝子領域を中心に H3K9me 依存的な高 DNA メチル化を引き起こしていることが明らかになった (6, 7)。

これらの結果は、通常転写され発現している遺伝子領域にも H3K9me や DNA メチル化が潜在的に蓄積する傾向があるが、積極的にへ

テロクロマチン修飾を除去する機構が存在していることを示している。我々が同定したヒストン H3K9 脱メチル化酵素 IBM1 は動植物に幅広く保存されていることから普遍的な遺伝子制御においてその機能の重要性が示唆されるが、この IBM1 を含むヘテロクロマチン修飾除去機構はどのように標的配列を認識しているのか? という問題は動物の実験系を含むこれまでの研究からは未だ明確な答えが出ていない。申請者はこれまで既に IBM1 と同様に遺伝子領域に異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体を独立に複数単離している。本研究計画では生化学的、遺伝学的なアプローチからこの IBM1 を含むヘテロクロマチン修飾除去機構に關与する因子を同定しその分子メカニズムに迫ることを目標とする。

<参考文献>

1. Lippman Z and Martienssen R. *Nature*, 431(7006):364-70, 2004.
2. Grewal SI and Jia S. *Nat Rev Genet.*, 8(1):35-46, 2007.
3. Egger G, et al. *Nature*, 429(6990):457-63, 2004.
4. Saze H. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 19(6): 527-36, 2008.
5. Saze H. et al. *Science*, 319(5862): 462-65, 2008.
6. Miura A. et al. *EMBO J.* 28(8): 1078-86, 2009.
7. Inagaki S. et al. *EMBO J.* 29(20):3496-506, 2010.

3. 研究の方法

(1) ゲノム中に異所的に DNA の高メチル化を引き起こすシロイヌナズナ変異体を EMS 変異によって誘導し、独自に設計したスクリーニングを行った。これまでに複数の高 DNA メチル化変異体が得られており、そのうちの 1 つの変異体の原因遺伝子 IBM1 を同定している。この *ibm1* 以外にも同様の高 DNA メチル化と発生異常を示す未解析の変異株 *ibm4* があり、原因遺伝子は IBM1 と同様ヒストン H3K9 脱メチル化酵素経路に關与する新規の因子であることが期待される。この *ibm4* 変異体に関しては既に全ゲノム DNA を次世代シーケンサーでリシーケンスし、ゲノム中に 9000 塩基以上の変異 (SNP) を同定している。この SNP 情報をもとに原因遺伝子を特定する。

(2) IBM1 タンパク質複合体の同定。細胞内ではヒストン H3K9 脱メチル化酵素 IBM1 が特定の標的遺伝子ヘリクルートされ機能するためには他の因子との複合体の形成が必要であることが推察される。そこで IBM1 蛋白質に細胞内で相互作用している因子を複合体として生化学的に精製することを試みる。

(3) 既に取得している *ibm1* 変異体の mRNA-seq による発現プロファイルデータ

から IBM1 標的遺伝子の組織特異的発現を解析する。

4. 研究成果

(1) 申請者はこれまで既に IBM1 と同様に遺伝子領域に異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体を複数単離している。本研究計画では生化学的、遺伝学的なアプローチからこの IBM1 を含むヘテロクロマチン修飾除去機構に関与する因子を同定することを目的としている。IBM1 と同様の表現型を示す *ibm4* と呼ぶ変異体について原因遺伝子を特定するための連鎖解析をおこなったところ H3K9 脱メチル化酵素 IBM1 遺伝子の近傍に原因遺伝子がマップされたにもかかわらず遺伝子の変異は観察されなかった。そこでエピジェネティックな変化を調べるため BS-seq 解析を行った。ゲノムワイドな DNA メチル化解析の結果、*ibm4* 変異は *ibm1* 変異と同様に遺伝子領域特異的に non-CG DNA メチル化、特に CHG 配列に高 DNA メチル化を引き起こしていることが明らかになった。更なる解析の結果、IBM1 遺伝子のイントロン中に存在する DNA メチル化が変異体では消失していることがわかった。このイントロン内の DNA メチル化を受けている配列が IBM1 mRNA の適切なスプライシングと機能的な全長 mRNA の発現に重要であることを我々は明らかにしており(発表論文)この変異体で DNA メチル化の消失により IBM1 遺伝子の発現にどのような影響が出ているのか更なる解析を行っている。我々の今回の研究結果はヒストン脱メチル化酵素 IBM1 遺伝子の発現がエピジェネティックな制御下にあることを示しており、この制御の乱れがゲノムワイドな DNA メチル化パターンに大きな影響を及ぼしうることを示している。一方、様々な環境条件や発生段階で IBM1 遺伝子のエピジェネティック制御がどのように行われているのかの解析が今後重要と考えられる。

(2) 生化学的探索から IBM1 と相互作用する因子候補を複数見いだしている。実際にこれら高

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 2 件)

Le, T., Miyazaki, Y., Takuno, S., Saze, H. Epigenetic Regulation of Intragenic Transposable Elements Impacts Gene Transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Res.**, (査読有)43, 3911-21, doi:10.1093/nar/gkv258 (2015).

Saze, H., Kitayama, J., Takashima, K., Miura, S., Harukawa, Y., Ito, T. & Kakutani, T. Mechanism for full-length RNA processing of *Arabidopsis* genes

containing intragenic heterochromatin. **Nature communications** (査読有) 4, 2301, doi:10.1038/ncomms3301 (2013).

[学会発表](計 8 件)

(招待講演) 佐瀬英俊 “シロイヌナズナにおける遺伝子内トランスポゾンのエピジェネティック制御”、日本育種学会第 126 回講演会、2014 年 9 月 26 日、宮崎、日本。

(招待講演) Saze H. “Epigenetic regulation of intragenic transposon in *Arabidopsis*”, 第 86 回日本遺伝学会国際シンポジウム、2014 年 9 月 17 日、滋賀、日本。

(招待講演) Saze H. “Epigenetic Control of genes and transposable elements in *Arabidopsis*” The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, July 17~18, 2014. Samsung Medical Center, Seoul, Korea.

(招待講演) Saze H. “Control of intragenic heterochromatin in *Arabidopsis*”, 第 55 回日本植物生理学会年会国際シンポジウム、2014 年 3 月 19 日、富山、日本。

(招待講演) 佐瀬英俊 “遺伝子内トランスポゾンのエピジェネティック制御”、遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能」、2013 年 10 月 10 日、三島、日本。

(招待講演) Saze H. “Control of intragenic heterochromatin in *Arabidopsis*”, 第 85 回日本遺伝学会年会国際シンポジウム、2013 年 9 月 21 日、横浜、日本。

(Poster presentation) Saze H. “Mechanism for full-length RNA processing of *Arabidopsis* genes containing heterochromatin”, Gordon Research Conference: Epigenetics, 2013 Aug 4-09, RI, US.

(招待講演) 佐瀬英俊 “シロイヌナズナの遺伝子内ヘテロクロマチン制御” 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、2013 年 5 月 30 日、奈良、日本。

[図書](計 2 件)

(共著) 佐瀬英俊 「遺伝子図鑑」 第 2 章 5 植物の細胞組織、p34-5; 第 6 章 8 植物のエピジェネティクス、p134-5、悠書館、2013.

(共著) 佐瀬英俊 「エピジェネティクスキーワード事典」第 2 部 7 章 植物の外界適

応、p145-151、 羊土社、2013.

〔その他〕
ホームページ等

<https://groups.oist.jp/peu>