

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660008

研究課題名(和文)植物ゲノム上のエピジェネティック状態の動きをハイスループットで検出する手法の開発

研究課題名(英文)Development of a high-throughput method for detection of the behavior of plant epigenome.

研究代表者

佐藤 壮一郎(Sato, Soichirou)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・研究員

研究者番号：00399809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の核ゲノムでは、外来からのDNAの挿入などによって、新たな遺伝子や転写領域が生じる場合がある。本研究では、このメカニズムを解明する為、植物ゲノムに多数のレポーター遺伝子を導入し、それらのエピジェネティックな状態を大量に観測する新しい基盤技術の開発に取り組み、原型となる実験系を確立することができた。また、本研究の過程で、外来DNAの挿入に伴う転写領域の出現が、多くの場合、ゲノム中に内在するプロモーターによるものではなく、未知の転写活性化メカニズムによって引き起されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the plant genome, de novo origination of genes or transcribed regions is occasionally caused by the integration of foreign DNA fragments. To clarify this mechanism, we tried to develop new comprehensive method for the detection of epigenetic states of the reporter genes that were randomly integrated into the plant genome. As a result, we succeeded in the development of a prototypic experimental system, and found that majority of foreign genes acquired transcriptional competence not by the intrinsic promoters in the upstream region of foreign genes but by the novel transcriptional activation mechanism.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写 エピジェネティクス プロモーター 次世代シーケンサー クロマチン 進化 ジーントラップ
ゲノム

1. 研究開始当初の背景

植物の核ゲノムには、葉緑体ゲノムから転移した遺伝子が多数存在している。しかし、これらは葉緑体ゲノム上では原核生物型のプロモーターによって転写されており、核ゲノムへの転移後、どのようにして転写能を獲得したのかは、よく分かっていなかった。

以前、筆者らはこの問題を明らかにするため、プロモーターを欠損したルシフェラーゼ遺伝子を、葉緑体から核への転移遺伝子に見立ててシロイヌナズナに形質転換し、ルシフェラーゼ遺伝子が発現した個体について、それらの転写状態とエピジェネティックな状態を調べた。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子が発現した遺伝子座では、+1ヌクレオソームと呼ばれる、遺伝子の5'末端付近の特定の位置のヒストンにおいて、エピジェネティックな変化が生じていることが分かってきた。しかし、上記の方法では多大な労力の割に、解析効率が非常に低く、包括的な解析が出来なかった。

そのような中、2013年に、マウスのES細胞を対象として、核ゲノムに挿入された多数のレポーター遺伝子の位置と転写レベルを一括解析する方法 (TRIP: Thousands of Reporters Integrated in Parallel) が発表された。そこで筆者は、この方法を導入・応用することで、転移遺伝子のエピジェネティックな状態を包括的に解析できると考えた。

2. 研究の目的

従来の実験手法、例えばプロモータートラップやジントラップと呼ばれる実験方法では、ゲノム上の様々な領域に挿入されたレポーター遺伝子のうち、いくつかのプロモーターやエンハンサーの配列を探索することはできるが、ゲノムのあらゆる場所に挿入されたレポーター遺伝子について、それらの転写やエピジェネティックな状態を網羅的に解析し、傾向を明らかにする為には、パフォーマンスが不十分である。

TRIP法は、DNAバーコードと呼ばれる短い塩基配列(本方法では12塩基)を付加した多数のレポーター遺伝子を核ゲノムにランダム挿入し、それらの位置と転写レベルを次世代シーケンサーで解析する方法である(図1)。この方法では、mRNA中に含まれるDNAバーコードを次世代シーケンサーでカウントし、転写レベルを決定するため、数千系統の形質転換体を個別に分離せずに解析でき

る。

そこで本研究では、TRIP法を改良し、植物の核ゲノムに導入されたレポーター遺伝子のエピジェネティックな状態をハイスループットに解析する方法 (ChIP-TRIP法)を開発することを目的とした(図1)。具体的には、以下の5項目について検討を進めた。(1)シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた形質転換体の作製、(2)植物のプロモーター解析用 TRIP法の検討、(3)野生型 T87 培養細胞の転写領域地図の作製、(4)植物体を用いた TRIP法の検討、(5)ChIP-TRIP法によるレポーター遺伝子上流領域におけるヒストンバリエーション・修飾ヒストンの局在解析。項目(1)-(3)では植物のプロモーター解析に向けた TRIP法の導入と最適化、項目(4)、(5)では TRIP法を用いた植物体のエピジェネティック解析系の構築を目指した。

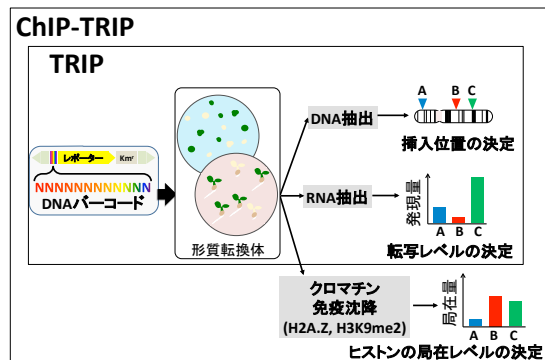


図1. TRIP法とChIP-TRIP法の概要

3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナ T87 培養細胞の形質転換
形質転換用ベクターの開発と T87 培養細胞への形質転換を行う。形質転換用ベクターには、プロモーター欠損型ルシフェラーゼ遺伝子と、カナマイシン耐性遺伝子カセットを挿入した。また、ルシフェラーゼ遺伝子のコード領域の5'末端にDNAバーコードを挿入した。形質転換細胞の選抜は、カナマイシン存在下で行った。

(2) TRIP法の検討

形質転換細胞の培養は、全ての系統を混合した状態で行った。次いで、DNAとRNAを抽出し、ベンチトップ型次世代シーケンサー (MiSeq)を用いて、レポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子の位置と転写レベルを解析した。

レポーター遺伝子の位置の同定は、抽出DNAを用いたインバースPCRと次世代シーケンス解析を組み合わせで行った。具体的には、レポーター遺伝子の配列内部からDNAバーコ

ードとレポーター挿入箇所の周辺領域を増幅するように PCR 用プライマーを設計し、インバース PCR 法による増幅を行った。次に、得られた PCR 産物を次世代シーケンサーで解読し、レポーター遺伝子の挿入箇所と DNA バーコード配列を決定した。

次に、レポーター遺伝子の発現解析を行った。初めに、RNA を用いた RT-PCR 法により、DNA バーコード部分を増幅した。DNA バーコードはルシフェラーゼ遺伝子のコード領域に隣接した位置に挿入されているため、DNA バーコード領域の転写量を、レポーター遺伝子の転写量として考えることが出来る。PCR 産物を次世代シーケンサーで解析した後、DNA バーコード配列毎に、シーケンスリード数をカウントした。

また、DNA を用いて、同様に DNA バーコードを次世代シーケンス解析し、リード数をカウントした。これは、各 DNA バーコードを持った系統毎に細胞量(生育速度)が異なるので、これを補正する為である。各 DNA バーコード配列を持つレポーター遺伝子毎に、RNA 由来のリード数を DNA 由来のリード数で補正し、各レポーター遺伝子の転写レベルとした。

上記のデータを統合し、DNA バーコード配列毎に、レポーター遺伝子の挿入位置と転写レベルを対応付けたデータベースを作成した。

(3) 野生型 T87 細胞の転写領域地図の作成

TRIP 法によって得たデータを解析するためには、野生型 T87 培養細胞のトランスクリプトームやエピゲノムの情報が必要である。そこで、野生型 T87 培養細胞を形質転換細胞と同条件で培養し、RNA と、修飾ヒストン H3K9me2 が局在する領域のクロマチン DNA を抽出した。ヒストン H3K9me2 の分布は、シロイヌナズナではヘテロクロマチン領域の指標となる。トランスクリプトームと H3K9me2 のエピジェネティック解析は、それぞれ RNA-Seq 法と ChIP-Seq 法により行った。

(4) 植物体を用いた TRIP 法の検討

TRIP 法による解析を、他の組織でも行うことが出来るように拡張するため、植物体(芽生え)を用いた TRIP 法の検討を行った。T87 培養細胞の実験と同じベクターを用いて形質転換を行い、387 系統の T2 種子を得た。これらを混合した状態で明所で栽培し、芽生えから DNA と RNA を抽出し、レポーター遺伝子の挿入位置と転写レベルの決定を進めた。レポーター遺伝子の転写レベルを解析する際

には、公共のデータベースからダウンロードしたデータを用いた。

(5) ChIP-TRIP 法の検討

上記の項目(4)と同じ条件で栽培した植物体から、一般的なクロマチン免疫沈降(ChIP)法を用いて、ヒストンバリエント H2A.Z と修飾ヒストン H3K9me2 が局在する領域のクロマチン DNA を精製した。次いで、これらのクロマチン DNA 中に含まれる DNA バーコード領域を PCR 法と次世代シーケンサーにより解読した。そして、レポーター遺伝子の発現解析と同様に、DNA バーコード配列毎に、シーケンスリード数をカウントした。また、免疫沈降操作を行っていないクロマチン DNA を用いて同様の解析を行い、DNA バーコード毎にリード数の補正を行った。

また、ChIP-TRIP 法の解析精度向上のため、レポーター遺伝子領域のクロマチン DNA を濃縮する方法の検討を行った。具体的には、レポーター遺伝子領域の配列に特異的に結合する特殊なアダプター DNA を作製し、これを用いたアフィニティー精製による濃縮を試みた。濃縮率の測定は、リアルタイム PCR を用いて行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ T87 培養細胞の形質転換

DNA バーコードを連結したルシフェラーゼ遺伝子を T87 培養細胞に導入し、カナマイシンを用いた選抜によって、TRIP 解析用の形質転換細胞群を得た。次世代シーケンサーを用いて、DNA バーコード配列の種類を調べたところ、約 16,000 種の形質転換系統が含まれていることがわかった。

(2) TRIP 法の検討

4,504 種の DNA バーコードについて、レポーター遺伝子の挿入位置と転写レベルを決定した。レポーター遺伝子は、セントロメア周辺を除く、ゲノム中の様々な領域に一樣に分布していた。レポーター遺伝子の転写レベルと挿入位置の関係を調べたところ、約 2 割りのレポーター遺伝子が、ゲノム中に内在するプロモーターの下流に転写方向を合わせて挿入されていた。それらは、高確率で転写能を獲得し、高い転写レベルを示していた。

一方で、想定外の現象も見られた。大部分のレポーター遺伝子は、遺伝子間領域や、遺伝子領域内で転写方向に対して逆向きに挿入されていた。この場合、レポーター遺伝子

の上流領域にはプロモーターが無い場合、発現する可能性は非常に低いと予想されたが、実際には、プロモーターの下流に挿入された場合より若干低い3割の確率で転写されていた(図2)。また、このようなレポーター遺伝子の挿入領域には、共通のシスエレメントや配列パターンが全く見つからなかった。つまり、レポーター遺伝子の多くは、その挿入位置に関係なく、一定の確率で転写能を獲得したことを示唆していた。これは、既存の転写活性化メカニズムでは説明できない、新しい現象があることを意味している。

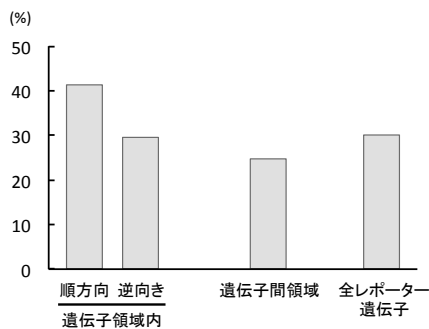


図2. 発見したレポーター遺伝子の割合

(3) 野生型 T87 培養細胞の転写領域地図の作成

野生型 T87 培養細胞の RNA-Seq 解析と、ヒストン H3K9me2 の ChIP-Seq 解析から、転写領域とヘテロクロマチン領域をそれぞれ決定した。

野生型細胞の転写領域と、発見したレポーター遺伝子の位置を重ね合わせたところ、野生型細胞の転写領域中に挿入されて発見したレポーター遺伝子の数に対して、3 倍以上のレポーター遺伝子が、野生型細胞の非転写領域で発現していた。

次に、発見したレポーター遺伝子の位置にヒストン H3K9me2 の分布領域を重ねたところ、120 のレポーター遺伝子が、H3K9me2 領域内に位置していたが、これらは、他のレポーター遺伝子と同じ転写レベルを示した。さらに、H3K9me2 の局在量とレポーター遺伝子の転写レベルの間には、ほとんど相関性がないことが明らかとなった。これらの結果は、レポーター遺伝子の転写状態は、挿入領域周辺の転写ならびにエピジェネティックな状態の影響をほとんど受けていないことを示していた。

以上の結果から、核ゲノムに挿入されたレポーター遺伝子の転写活性化には、未知のメカニズムが介在していることが示唆された。また、現在のところ、包括的な解析には至っ

ていないが、非常に近い位置に挿入された複数のレポーター遺伝子が、全く異なる転写レベルを示す現象も確認されている。従って、この未知の転写活性化メカニズムが、クロマチンリモデリングを介して、外来遺伝子にランダムに転写能を与える性質のものであると予想される。

(4) 植物体を用いた TRIP 法の検討

現在まで、58 系統のレポーター遺伝子について、挿入位置と転写レベルを決定できた。このうち、ゲノム中のプロモーターの下流に挿入されたレポーター遺伝子は全て発現し、他の領域のものに比べて、高い転写レベルを示していた。また、野生型植物で転写されている領域に挿入されたレポーター遺伝子も、高い確率で発現していた。これらの結果は、植物体の場合では、レポーター遺伝子の発現に対するゲノム中のプロモーターの寄与が、培養細胞に比べて大きいことを示唆している。

(5) ChIP-TRIP 法の検討

レポーター遺伝子の 5' 末端領域における H2A.Z、H3K9me2 の局在レベルを解析したところ、H2A.Z については、発見したレポーター遺伝子のいくつかにおいて、その局在化が検出された(図3)。一方、H3K9me2 の場合ではその局在量が、レポーター遺伝子の転写レベルや H2A.Z の局在量に対して逆相関する結果が期待されたが、そのような傾向は見られなかった。この結果については、クロマチン免疫沈降操作、あるいは次世代シーケンス用サンプルの調製過程について、S/N 比の向上につながる改善が必要であると考えられた。

また、レポーター遺伝子領域のクロマチン DNA の濃縮法の検討を行ったところ、ある程度の濃縮効果を得ることが出来た。しかし、数百、数千の形質転換系統を対象とした ChIP-TRIP 解析を行うにはまだ不十分であり、実用には至らなかった。

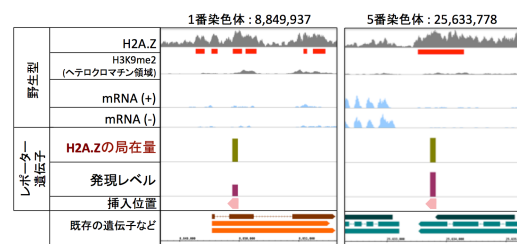


図3. 各レポーター遺伝子上のヒストンH2A.Zの局在量

(6) まとめと展望

本研究は TRIP 法を導入・改良し、植物核ゲノムに導入されたレポーター遺伝子のエピジェネティックな状態を解析する方法 (ChIP-TRIP 法) を開発することを目的として行われた。その結果、植物核ゲノム中の約 4,500 ヶ所に挿入されたレポーター遺伝子の発現解析を実現し、さらには、ヒストン H2A.Z の局在量を解析することができた。従って、本研究の当初の目的は達成できたと考えられる。今後は、ChIP-TRIP 法のためのクロマチン DNA 濃縮技術などの付加的技術の確立や、TRIP 法の解析精度の検討を進めることで、より精度と解像度の高い解析が可能になると考えられる。また本研究中に、新たな転写活性化メカニズムの発見に至ったことは、非常に大きな収穫であった。

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 畑貴之、高田直東、立川誠、松尾充啓、佐藤壮一郎、小保方潤一: 転移遺伝子の転写活性化は、その周辺領域の転写状態及びエピゲノムの攪乱を伴う。第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18-20 日 盛岡

(2) 高田直東、畑貴之、立川誠、松尾充啓、佐藤壮一郎、小保方潤一: シロイヌナズナ植物体におけるプロモーター獲得プロセスの Ex-TRIP 法を用いたエピジェネティック解析。第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18-20 日 盛岡

(3) 佐藤壮一郎: 「植物ゲノムに組み込まれた遺伝子はどのように転写されるのか?」第 41 回植物バイテクシンポジウム「これからの植物科学」2016 年 1 月 22 日 京都産業大学

(4) 佐藤壮一郎、畑貴之、高田直東、立川誠、松尾充啓、小保方潤一: TRIP 法を用いた植物ゲノム上のクリプティックプロモーターの広範囲マッピング。第 38 回日本分子生物学学会年会 2015 年 12 月 1-4 日 神戸

(5) 畑貴之、高田直東、立川誠、松尾充啓、佐藤壮一郎、小保方潤一: シロイヌナズナ核ゲノム中におけるクリプティックプロモーターの配列的特徴について。第 38 回日本分子生物学学会年会 2015 年 12 月 1-4 日 神

戸

(6) Soichirou Satoh, Takayuki Hata, Naoto Takada, Makoto Tachikawa, Mitsuhiro Matsuo, and Junichi Obokata: Molecular basis of EGT and HGT: How do newly emerged/introduced protein-coding sequences in the eukaryotic genome become transcriptionally active? The 2nd International Symposium. Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells. 30 September to 2 October, 2015, Tsukuba, Japan

(7) 佐藤壮一郎、畑貴之、高田直東、立川誠、松尾充啓、小保方潤一: TRIP 法を用いた植物核ゲノムにおけるプロモーター新生領域の包括的解析。第 79 回日本植物学会年会 2015 年 9 月 6-8 日 新潟

(8) 畑貴之、高田直東、立川誠、松尾充啓、佐藤壮一郎、小保方潤一: TRIP 法を用いた植物核ゲノム中の潜在的プロモーター領域の包括的解析系の構築。第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16-18 日 東京

[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:
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

佐藤 壮一郎 (SATO SOICHIROU)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員
研究者番号: 00399809

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし（ ）

研究者番号：