

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07100

研究課題名(和文) DNAメチル化の下流で発現制御に関与する新規因子群の同定と解析

研究課題名(英文) Characterization of newly identified factors acting downstream of DNA methylation in gene expression.

研究代表者

西村 泰介(Nishimura, Taisuke)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10378581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのサイレンシング因子MOM1は、その機能が欠失した突然変異体の表現型から、DNAメチル化の下流で遺伝子発現を制御すると予想されるタンパク質である。本研究課題では、MOM1による遺伝子発現制御に関わる新規因子の同定を、遺伝学および生化学アプローチから試み、複数の因子を得ることに成功した。これらの因子の中に、タンパク質の修飾であるSUMO化および脱SUMO化に関連する因子が見出されたことから、遺伝子発現制御においてタンパク質のSUMO化がDNAメチル化の下流で作用する仮説を提案した。

研究成果の概要(英文)：MOM1, a silencing factor in *Arabidopsis thaliana*, is predicted to act downstream of DNA methylation in gene expression due to the phenotype of its loss of function mutants. By genetic and biochemical approaches, we identified new factors which function in the same pathway as MOM1 in gene regulation. Since the factors involved in addition or elimination of SUMO, which is one of protein modifications, were included among them, we hypothesized that SUMOylation in some proteins would be important as a downstream mechanism of DNA methylation in gene expression.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：遺伝子サイレンシング DNAメチル化 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA メチル化は哺乳動物と植物で共通に観察されるクロマチン修飾であり、遺伝子発現に深く関与することが知られている。特にプロモーター領域の DNA メチル化は安定した発現抑制を引き起こすが、DNA メチル化がどのような分子機構でクロマチン構造を変化させ、その結果、どのように遺伝子発現に作用するのかは、ほとんど理解されていない。

(2) シロイヌナズナの突然変異体を用いた解析から、DNA メチル化の確立・維持・解除といった DNA メチル化自体の制御メカニズムは次第に解明され、哺乳動物-植物間で共通の機構が存在する事が明らかになっている。このことから、シロイヌナズナの分子遺伝学を用いた研究手法は新規の制御機構を明らかにするのに非常に有効であることが期待される。

(3) シロイヌナズナ MOM1 タンパク質は、その機能欠失変異体では、DNA メチル化の変化を伴わずに DNA メチル化によって発現の抑制された遺伝子の発現抑制が解除されることから、DNA メチル化の下流で作用する因子の候補と考えられている¹。これまでの研究から MOM1 タンパク質の機能ドメインの立体構造が決定され、そのドメインがタンパク質間の相互作用に機能する可能性が示された²。

(4) 以上のことから、遺伝子発現抑制における DNA メチル化の下流の分子機構を解明するためには、MOM1 に対する遺伝学および生化学的相互作用因子を同定し、その機能解析を行うことが、有効なアプローチであると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、DNA メチル化の下流作用因子の候補と考えられているシロイヌナズナ MOM1 の相互作用因子の同定およびそれらの機能解析を行うことで、DNA メチル化が何に作用することで遺伝子発現を制御するかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) MOM1 の遺伝学的相互作用因子の同定と解析

研究開始時点で、MOM1 の機能欠失変異体背景で抑制の解除された遺伝子発現が再抑制される(つまり遺伝学的な相互作用を示す)抑圧変異体 (*suppressor of mom1*, *smom*) を 12 系統 (*smom1-12*) 単離していた。これら変異体の原因遺伝子がコードするタンパク質は、MOM1 による遺伝子発現制御に関与する因子であることが期待できる。これまでの研究により、*smom3, 5, 12* は同一の遺伝子に変異が生じ、その遺伝子はメチル

化酵素の触媒ドメインに似た配列を持つ核局在タンパク質をコードしていることを明らかにしている。本研究ではさらに *smom2, 6, 8, 12* の 4 つの変異体の原因遺伝子を次世代シーケンサーによるゲノム配列解析と連鎖解析を組み合わせることで同定し、その遺伝子産物に対して、細胞生物学的、生化学的解析を行い、MOM1 による遺伝子発現制御における機能を明らかにする。

(2) MOM1 の生化学的相互作用因子の解析

研究開始時点で、MOM1 の機能ドメインに物理的に結合(生化学的相互作用)する因子の候補として、PIAL1 および PIAL2 タンパク質を得ることに成功していた。これらのタンパク質をコードする遺伝子の突然変異体を解析することで、遺伝子発現制御にどのように関与するかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) SMOM6 遺伝子は核膜孔関連因子 SAC3B をコードする

smom6 突然変異体の原因遺伝子を明らかにしたところ、*SAC3B* と名付けられた遺伝子であることが明らかになった。この遺伝子は核膜孔と相互作用するタンパク質複合体の構成因子をコードしており、核-細胞質間における物質の輸送に関与することが知られている³。MOM1 タンパク質による遺伝子発現制御に核-細胞質間の物質輸送が関連する可能性が示唆された。

(2) 脱 SUMO 化関連因子 NUA の機能欠失変異も *mom1* 突然変異体の表現型を抑圧する

SMOM6/SAC3B タンパク質は同じく核膜孔と相互作用する NUA タンパク質と結合することが報告された³。NUA タンパク質は、タンパク質の脱 SUMO 化反応を触媒する ESD4 タンパク質分解酵素と結合し、タンパク質から SUMO 修飾を取り除く作用を持つことが報告されている⁴。そこで、NUA タンパク質が MOM1 タンパク質による遺伝子発現制御に関与するか検証するために、*mom1* 突然変異体と *nua* 突然変異体との二重突然変異体を作出し、その表現型を観察することで、これらの因子に遺伝学的相互作用があるか調べた。その結果、*smom6/sac3b* 突然変異と同様に、*nua* 突然変異により *mom1* 突然変異体の表現型は抑圧された。このことから MOM1 タンパク質による遺伝子発現制御にタンパク質の脱 SUMO 化が関連することも示唆された。

(3) SMOM2, 8, 12 遺伝子の同定の試み

優性 1 遺伝子座である *smom2* 突然変異体に対して連鎖解析を行ったところ、原因遺伝子が MOM1 遺伝子座周辺に座乗することが示された。このことからこの突然変異は MOM1 遺伝子における遺伝子内変異の可能性が高いと考えられた。*smom8* 突然変異体は劣性で 4

番染色体上の長腕末端側における 1 遺伝子座が表現型に関連することが明らかになり、次世代シーケンサーによってゲノム配列を再決定したところ、有力な候補として機能未知の加水分解酵素をコードする遺伝子が同定された。一方、*smom12* 突然変異体は戻し交配後もその表現型が安定して観察されることから、原因遺伝子の同定が可能なが示された。

(4) PIAL1 および PIAL2 タンパク質は MOM1 タンパク質と同一の経路で遺伝子発現を抑制する

PIAL1, PIAL2 タンパク質の機能欠失変異体 *pial1*, *pial2* 突然変異体の表現型を解析したところ、*mom1* 突然変異体の表現型と同じく DNA メチル化の変化を伴わずに遺伝子発現の抑制が解除された。また二重突然変異体の観察から PIAL1 タンパク質と PIAL2 タンパク質が遺伝子発現に冗長的に作用することも明らかになった (図 1)。同様の結果は Han らによっても示され⁵、PIAL1, PIAL2 タンパク質が MOM1 タンパク質と同様に DNA メチル化の下流で遺伝子発現の抑制に作用する可能性が高いことが示された。

PIAL1, PIAL2 タンパク質が MOM1 タンパク質と同一の経路で機能するか検証するために *mom1 pial1 pial2* 三重突然変異体を作成し、表現型を観察したところ、*mom1* 突然変異体および *pial1 pial2* 二重突然変異体のそれぞれの表現型に対して、相加的な効果を示さなかった (図 1)。この結果から、PIAL1, PIAL2 タンパク質は MOM1 タンパク質と同一の経路で遺伝子発現の抑制に作用することが明らかになった。

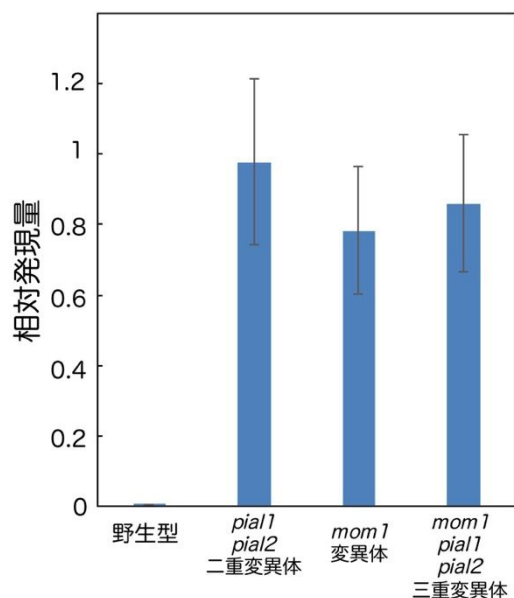


図 1 DNA メチル化によって発現が抑制されている形質転換 GUS レポーター遺伝子の発現量の比較。*pial1 pial2* 二重突然変異体および *mom1* 突然変異体では、抑制が解除される。*mom1 pial1 pial2* 三重突然変異体では相加的な効果は観察されない。

PIAL1, PIAL2 タンパク質は SUMO 化酵素のホモログであり、これまでに細胞内でも試験管内でも SUMO 化の活性は検出されていないものの、試験管内の実験では SUMO 化における長鎖化に作用することを示唆する報告もあり⁶、SUMO 化に関連した機能を持つと予想される。

(5) *mom1* 変異は PIAL2 タンパク質の細胞内局在に影響を与える。

PIAL2 と GFP レポータータンパク質との融合タンパク質を発現する遺伝子コンストラクトを野生型と *mom1* 突然変異体とに導入し、GFP の蛍光観察を行ったところ、野生型では細胞内全体で得られた蛍光シグナルが *mom1* 突然変異体においては、核と予想される位置における蛍光シグナルが減少したように観察される系統が得られた。まだ予備的な実験結果であり、他の実験アプローチによる検証が必要であるが、核タンパク質である MOM1 が PIAL2 の核での局在に関与することが予想された。

(6) 結論と今後の展開

本研究で MOM1 の生化学的相互作用因子の解析からは SUMO 化関連タンパク質が、MOM1 タンパク質による遺伝子発現の抑制に作用することを、一方で遺伝学的相互作用因子である *mom1* 変異に対する抑圧変異の解析からは、MOM1 タンパク質によって機能が抑えられる因子として脱 SUMO 化関連タンパク質が同定された。これらのことから、DNA メチル化の下流で作用する遺伝子発現抑制のメカニズムにタンパク質の SUMO 化修飾が関与する可能性を新たに見出したと言える。哺乳動物でもタンパク質の SUMO 化が遺伝子発現に作用することが報告されているが、DNA メチル化やクロマチン構造の変化に作用するかはわかっていない。今後はどのタンパク質の SUMO 化が遺伝子発現の制御に関わっているのか、各種突然変異体を用いたプロテオーム解析を進めることで明らかにすることが可能であろう。

また PIAL2 の核への局在機構も *mom1* 突然変異体の解析から明らかになることが期待される。*smom8*, *smom12* 突然変異体の原因遺伝子が明らかになれば、今回明らかになった制御機構をより詳細に解析する糸口が得られることも期待できる。

< 引用文献 >

- Amedeo et al. (2000), Nature. 405, 203-206.
- Nishimura et al. (2012), PLoS Genet. 8, e1002484.
- Yang et al. (2016), Nuc. Acid Res. 45, 181-197.
- Xu et al. (2007), Plant Cell 19, 1537-1548.
- Han et al. (2016), Plant Cell 28,

1215-1229.

Tomanov et al. (2014), *Plant Cell* 26, 4547-4560.

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)

[学会発表](計 8 件)

Taisuke Nishimura, DNA methylation in plant cell reprogramming, The first meeting of a consortium of plant epigenetists in Japan, 2015年7月29日-30日、国立遺伝学研究所(静岡県、三島市)。

Tran Hien Linh 他、Suppressor mutants of *mom1*, a mutant of silencing factor in *Arabidopsis*, 日本植物学会第79回大会, 2015年9月6日-8日、朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)。

湯川裕介 他、シロイヌナズナ・サイレンシング因子 *MOM1* の機能欠損変異の抑圧変異体 *smom2*, *smom6* の遺伝解析、第34回日本植物細胞分子生物学会、2016年9月1日-3日、信州大学繊維学部(長野県上田市)。

野川省吾 他、シロイヌナズナ *PIAL1*, *PIAL2* タンパク質は DNA メチル化の下流もしくは独立で遺伝子サイレンシングに關与する、第34回日本植物細胞分子生物学会、2016年9月1日-3日、信州大学繊維学部(長野県上田市)。

西村泰介 他、DNA メチル化に依存しない遺伝子サイレンシング機構、第35回日本植物細胞分子生物学会、2017年8月29日-31日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)。

新垣誠 他、シロイヌナズナ・サイレンシング因子 *MOM1* の機能欠損変異の抑圧変異体 *smom8*, *smom12* の遺伝解析、2017年8月29日-31日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)。

平沢巽 他、シュート再生効率が上昇するエピジェティック組換え自殖系統の遺伝解析、2017年8月29日-31日、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)。

Taisuke Nishimura, Epi-alleles involved in plant development and environmental responses, The Plant epigenetics consortium in Japan -Second meeting, 2017年8月31日-9月1日、国立遺伝学研究所(静岡県、三島市)。

[図書](計 2 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, p13-p29.

西村泰介、文一総合出版、*エピジェネティクスの生態学 環境にตอบสนองして遺伝子を調節するしくみ*(種生物学会編、荒木希和子責任編集)、2017、p81-p98(第3章)p205-p217(第10章)。

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・工学研究科・准教授
研究者番号: 10378581

(2)研究協力者

加藤 悦子 (KATOH, Etsuko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター 生体分子解析チーム・主席研究員

Tran Hien Linh
長岡技術科学大学・大学院生

野川 省吾 (NOGAWA, Shogo)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

湯川 裕介 (YUKAWA, Yusuke)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

新垣 誠 (ARAKAKI, Makoto)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

平沢 巽 (HIRASAWA, Tatsumi)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

久古 貴将 (KUGO, Takamasa)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

星野 愛海 (HOSHINO, Ami)
長岡技術科学大学・工学研究科・大学院生

佐藤 卓磨 (SATO, Takuma)
長岡技術科学大学・工学部・学部4年生

山本 満理恵 (YAMAMOTO, Marie)
長岡技術科学大学・工学部・学部4年生