

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06291

研究課題名(和文)植物における新規転写型遺伝子サイレンシング機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of new transcriptional gene silencing mechanism in plants

研究代表者

池田 陽子 (Ikeda, Yoko)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：80467688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物特異的なトランスポゾン関連ドメインを持つPMDタンパク質MAIN及びMAIL1は、シロイヌナズナにおいて転写型遺伝子サイレンシング(TGS)に寄与する。PMDタンパク質はDNAメチル化やsiRNAとは独立の機構でTGSに関わる事が示唆されたが、その分子機構は不明であった。本研究ではMAIN及びMAIL1によるTGSのメカニズムを明らかにするため、シロイヌナズナmail1変異体の抑圧変異のスクリーニングを行った。また、MAIN及びMAIL1タンパク質が実際に核内でどのように機能しているかを明らかにするため、変異体におけるクロマチンのアクセシビリティや核内のクロマチン状況を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスやトランスポゾンといった侵略者と、宿主ゲノムの間では、活性化と抑制のせめぎ合いが絶えず行われて来たと考えられ、この現象は生物のゲノム進化の過程で重要な役割を果たした可能性がある。本研究はこの機構が植物進化の過程に関与してきたことを示唆するゲノム進化のモデルケースとして興味深い。また、本研究で明らかになった新規サイレンシング機構は植物の遺伝子発現調節の新たな系として利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plant mobile domain (PMD) protein, MAIL1 and MAIN, are required for TGS independent of DNA methylation and siRNAs. To understand the precise mechanism of TGS regulation by MAIL1 and MAIN, we did suppressor screening of mail1 mutant to isolate factors that are related to TGS regulation by MAIL1 and MAIN. To reveal the subnuclear functions of PMD proteins, we also tried to analyze 3D chromatin structure by chromatin conformation capture technology and open chromatin region.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：サイレンシング 植物 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

転写型遺伝子サイレンシング (TGS) は、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな機構を介してクロマチン構造を変化させ、遺伝子やトランスポゾンなどの発現を抑制する機構のことである。生物は進化過程において、外来のウイルスや内在のトランスポゾンの転移に対抗するための防御機構としてサイレンシング機構を発達させたと考えられている。トランスポゾンの転移は、近傍の遺伝子発現を変化させ、個体間の多様性を生み出す原動力となり得るが、挿入先の遺伝子を破壊し、死に至る場合もある。ウイルスやトランスポゾンといった侵略者と、宿主ゲノムの間では、活性化と抑制のせめぎ合いが絶えず行われて来たと考えられ、この現象は生物のゲノム進化の過程で重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

我々は、トランスポゾンを介したゲノム進化の新たなモデルケースとして、トランスポゾン関連ドメイン (Plant mobile domain; PMD) を持つシロイヌナズナ MAIN、MAIL1 が TGS に関与する事を明らかにした (Ikeda et al., 2017)。main、mail1 変異体では多くのトランスポゾンに加え、特定の遺伝子の発現抑制が解除される。PMD は種子植物特異的に保存されているドメインであり、祖先種で

は、トランスポゾン活性により PMD がゲノム上に広がったと考えられる。その一方で、進化過程の比較的近年、PMD タンパク質自身がサイレンシング能を獲得したことが我々の解析により明らかになった。さらに、特定の種では、PMD タンパク質が新たに別のトランスポゾンに取り込まれているケースを複数見いだしており、PMD が現在もトランスポゾンを介した進化過程にあることが示唆された (図 1)。

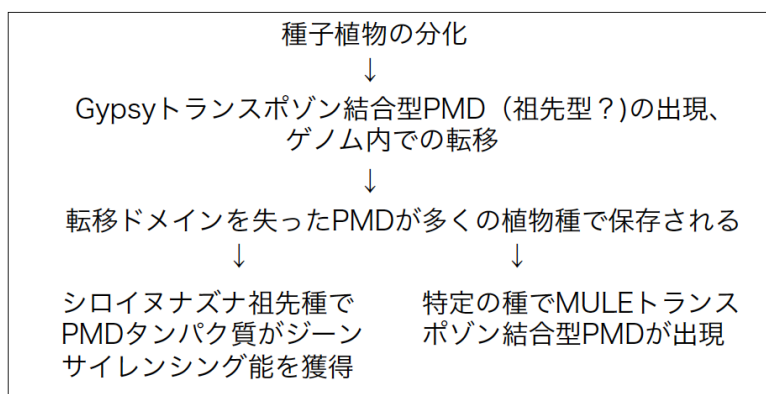


図1 PMDタンパク質と植物進化

2. 研究の目的

ウイルス遺伝子の水平伝播やトランスポゾンの転移は、個体間の多様性をもたらす進化の原動力となり得る一方、生存に悪影響を与える恐れもある。そのため、宿主生物はこれらに対する防御機構としてサイレンシング機構を発達させてきたと考えられる。植物特異的なトランスポゾン関連ドメインを持つ PMD タンパク質 MAIN 及び MAIL1 は、シロイヌナズナにおいて転写型遺伝子サイレンシング (TGS) に寄与する。これまでの遺伝学的解析により、PMD タンパク質は DNA メチル化や siRNA などの既知の遺伝子サイレンシング機構と異なる機構で TGS に関与する事が示唆されたが、その分子機構は不明であった。本研究では、植物における PMD タンパク質によるサイレンシングの分子機構を明らかにし、トランスポゾンを介した生物のゲノム進化過程について考察することを目指した。

3. 研究の方法

(1) mail1 変異体の抑圧変異体の単離及び解析

MAIN 及び MAIL1 による TGS のメカニズムを明らかにするため、シロイヌナズナ mail1 変異体を用い、TGS 解除表現型を抑圧する変異のスクリーニングを行った。抑圧変異体を効果的に選抜するため、mail1 変異によって発現抑制が解除される 35S-GUS がタンデムに挿入された植物を利用した (図 2)。野生型植物ではタンデムに挿入された 35S-GUS がサイレンシングを受け発現が抑制されているのに対し、mail1 変異体では GUS のサイレンシングが解除される。これを指標に、mail1 変異体に変異原処理を行い、GUS マーカーのサイレンシング解除がみられない個体をスクリーニングした。得られた変異体について、次世代シーケンサを用いて原因遺伝子候補の同定を試みた。

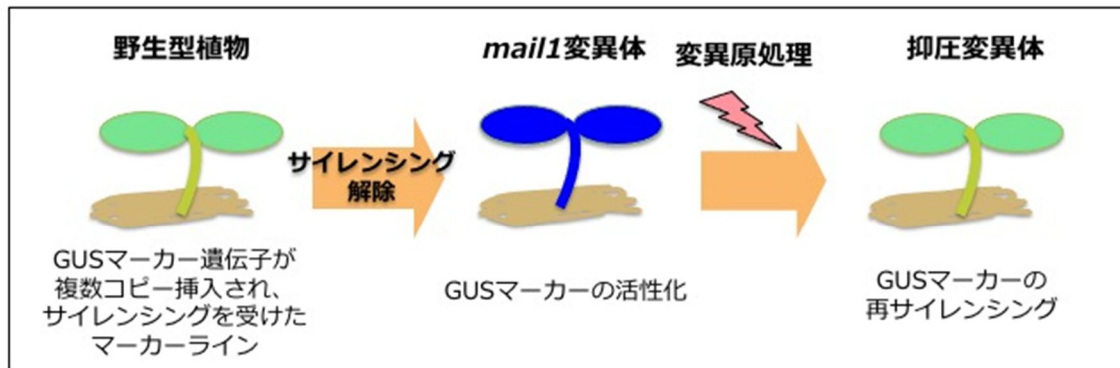


図2 トランスポゾンの転写状態をマ-カ-遺伝子により可視化する系を用いた *mail1* の抑圧変異体スクリーニングの模式図。

(2) MAIN/MAIL1 の核内での機能解析

MAIN 及び MAIL1 タンパク質が核内でどのように機能しているかを明らかにするため、GFP タグと融合させた MAIN 及び MAIL1 を発現させた植物を用いてクロマチン免疫沈降を行ったサンプルに関してゲノムワイドシーケンス解析を試み、ゲノム上の MAIN 及び MAIL1 がターゲットとする領域を明らかにすることを試みた。さらに、*main* 及び *mail1* 変異体における、クロマチンのアクセシビリティや核内のクロマチン状況を解析するため、Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq) 及び Chromosome conformation capture (Hi-C) 法による解析を行い (Dong et al., 2017)、MAIN 及び MAIL1 が核内構造にどのような影響を与えるかを明らかにした。

4. 研究成果

(1) *mail1* 変異体の抑圧変異体の単離及び解析

シロイヌナズナ *mail1* 変異体の複数のアレルに対し、エチルメタンスルホン酸による変異原処理を行い、35S-GUS の活性化を指標に、*mail1* 変異の表現型を抑圧する個体 (成長抑制表現型及び TGS が解除される個体) を選抜することで、*mail1* 変異の遺伝学的サプレッサーのスクリーニングを行なった。変異原処理後3世代目において、GUS の発現が抑制される個体のスクリーニングを行なった結果、サプレッサー変異を持つと考えられる個体が複数得られた。これらのサプレッサー変異を持つ変異体の候補となる個体と、シロイヌナズナの異なる accession との掛け合わせを行った。サプレッサー変異を持つ変異体の候補となる個体の後代での表現型を確認して、新規サプレッサー候補を絞り込むとともに、F2 世代でのマッピングと変異同定のための次世代シーケンスを行い、複数の候補を得た。

(2) MAIN/MAIL1 の核内での機能解析

MAIN 及び MAIL1 タンパク質が実際に核内でどのように機能しているかを明らかにするため、GFP タグと融合させた MAIN 及び MAIL1 を発現させた植物を用い、GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降を試み、MAIN 及び MAIL1 タンパク質が結合している領域の同定を試みた。しかしながら、GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降では、目的の GFP 融合タンパク質の沈降が確認できなかった。サンプルの固定条件検討や免疫沈降の条件検討を行ったが、改善はみられなかった。一方、学術変革領域「ゲノム支援」の支援を受け、*main/mail1* 変異体における、クロマチンのアクセシビリティの解析を行った。当初トランスポゼースを利用してオープンクロマチン領域を明らかにする ATAC-seq 法を計画していたが、サンプル調整がうまく行かなかったため、フェノール・クロロホルム抽出によりオープンクロマチン領域を検出する FAIRE-seq 法に切り替えて解析を行い (Baum et al., 2020)、変異体特有のクロマチン状態を明らかにすることができた。また、Chromosome conformation capture 法 (Hi-C) を用いた変異体の核内3次元構造の解析も進め、*main/mail1* 変異体における核内の構造を明らかにし、既知の変異体との類似が明らかになった。

(引用文献)

Ikeda Y, Péliissier T, Bourguet P, Becker C, Pouch-Péliissier MN, Pogorelcnik R, Weingartner M, Weigel D, Deragon JM, Mathieu O. Arabidopsis proteins with a transposon-related domain act in gene silencing. Nature Communications. Article no.15122, (2017).

Dong P, Tu X, Chu PY, Lü P, Zhu N, Grierson D, Du B, Li P, Zhong S. 3D Chromatin Architecture of Large Plant Genomes Determined by Local A/B Compartments. Mol Plant. Dec 4;10(12):1497-1509, (2017).

Baum S, Reimer-Michalski EM, Jaskiewicz MR, Conrath U. Formaldehyde-assisted isolation of regulatory DNA elements from Arabidopsis leaves. Nat Protoc. Mar;15(3):713-733, (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Song Qingxin, Ando Atsumi, Jiang Ning, Ikeda Yoko, Chen Z. Jeffrey	4. 巻 21
2. 論文標題 Single-cell RNA-seq analysis reveals ploidy-dependent and cell-specific transcriptome changes in Arabidopsis female gametophytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13059-020-02094-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeda Yoko, Nishihama Ryuichi, Yamaoka Shohei, Arteaga-Vazquez Mario A, Aguilar-Cruz Adolfo, Grimaneelli Daniel, Pogorelcnik Romain, Martienssen Robert A, Yamato Katsuyuki T, Kohchi Takayuki, Hirayama Takashi, Mathieu Olivier	4. 巻 59
2. 論文標題 Loss of CG methylation in Marchantia polymorpha causes disorganization of cell division and reveals unique DNA methylation regulatory mechanisms of non-CG methylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2421 ~ 2431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcy161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Frost Jennifer M., Kim M. Yvonne, Park Guen Tae, Hsieh Ping-Hung, Nakamura Miyuki, Lin Samuel J. H., Yoo Hyunjin, Choi Jaemyung, Ikeda Yoko, Kinoshita Tetsu, Choi Yeonhee, Zilberman Daniel, Fischer Robert L.	4. 巻 115
2. 論文標題 FACT complex is required for DNA demethylation at heterochromatin during reproduction in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E4720 ~ E4729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1713333115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ikeda, Y. and Mathieu, O.
2. 発表標題 Analysis for Gene Silencing Mechanism by Plant Mobile Domain Proteins in Arabidopsis.
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子
2. 発表標題 植物のエピゲノム制御メカニズムとその利用に向けて.
3. 学会等名 令和2年度植物科学4拠点アライアンス交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子・西浜 竜一・山岡尚平・Mario A. Arteaga-Vazquez・Daniel Grimanelli・Romain Pogorelcnik・Robert A. Martienssen・大和勝幸・河内孝之・平山隆志・Olivier Mathieu
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるDNAメチル化制御
3. 学会等名 日本エピジェネティクス研究会第13回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikeda, Y
2. 発表標題 Analysis for transcriptional regulation mechanism of transposon-like elements in plants
3. 学会等名 日本エピジェネティクス研究会第13回年会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田陽子
2. 発表標題 Plant mobile domainを介した新規サイレンシング機
3. 学会等名 遺伝研研究会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田陽子・西浜 竜一・山岡尚平・Mario A. Arteaga-Vazquez・Daniel Grimanelli・Robert A. Martienssen・Romain Pogorelcnik・Olivier Mathieu・大和勝幸・河内孝之・平山隆志
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるDNAメチル化制御
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田陽子・十川太輔・西浜竜一・山岡尚平・荒木崇・河内孝之・平山隆志・大和勝幸
2. 発表標題 ゼニゴケの新規DNAメチル化制御機構：植物と動物の狭間で
3. 学会等名 第84回日本植物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子
2. 発表標題 植物の進化とエピゲノム制御（DNAメチル化を中心に）
3. 学会等名 植物科学フロンティア研究会2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子
2. 発表標題 植物の進化とDNAメチル化制御
3. 学会等名 埼玉大学・岡山大学若手合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田陽子・岡田聡史・金谷麻加・井上小槇・最相大輔・井藤純・辻寛之・持田恵一・平山隆志
2. 発表標題 圃場オオムギにおけるヒストン修飾と遺伝子発現のゲノムワイド時系列解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田峻也・大河優奈・若林荘太郎・高橋広夫・町田千代子・池田陽子・西村泰介・小林括平・賀屋秀隆
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける脱メチル化酵素を用いたDNAメチル化編集技術の開発
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	マシュー オリビエ (Mathieu Olivier)	Principal Investigator	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	Universite Clermont Auvergne		