

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (A)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19688017  
 研究課題名 (和文) 組織特異的発現制御に関わる *de novo* DNA メチル化機構の網羅的解析  
 研究課題名 (英文) Genome-wide analyses of organ-specific DNA methylation and transcription in *Arabidopsis thaliana*  
 研究代表者  
 柴 博史 (SHIBA HIROSHI)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
 研究者番号：20294283

## 研究成果の概要：

植物でも組織特異的な DNA メチル化の変動が見られるかどうかを明らかにすることを目的に、Col-0 株の花序、成葉、根のメチローム・トランスクリプトーム統合解析を行った。また DNA メチル化の影響を具体的に示すために DNA メチル化酵素変異株ホモ株当代の花序および成葉のメチローム・トランスクリプトーム解析を行い、Col-0 株の結果と比較した。その結果、器官特異的な DNA メチル化・脱メチル化が見られた遺伝子を多数見出した。またメチル化によって遺伝子発現が制御されていると見られる遺伝子も多数見出した

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：DNA メチル化、ゲノムタイリングアレイ、組織特異的発現、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は、エピジェネティックな遺伝子発現抑制機構の主原因として動植物を問わず広く知られている。植物の場合、内在性の DNA メチル化機構としてトランスポゾン等の転移を抑制するといったゲノムの安定化 (gene silencing)、性特異的な形質発現 (genomic imprinting)、種間交雑時における遺伝子量補正 (nucleolar dominance)、親の世代における表現型が、遺伝的変異を受け継ぐ事なく遺伝する現象 (paramutation)

等に関わっていることが知られている。従来植物のメチル化は、動物と異なり、分化、発生段階でのダイナミックな変化は見られず、世代を超えてメチル化状態が維持されるとされてきた。しかしながら筆者が研究を進めてきたアブラナ科植物の自家不和合性の自己識別に関わる対立遺伝子間の優劣性現象で、劣性側の対立遺伝子のプロモーター領域が、時期・組織特異的にメチル化され、当該遺伝子の発現が抑えられることを発見していること、またシロイヌナズナの *de novo*

DNA メチル化酵素欠損株が、生育遅延、植物体サイズの減少、部分的な不稔性を示すことが知られているなど、植物にも時期・組織特異的なゲノム DNA の *de novo* メチル化が存在し、動物と同様に植物の発生、分化を制御していることが示唆されている。

最近、シロイヌナズナでは、全ゲノム領域を貼り付けた gene chip (*Arabidopsis* Tiling 1.0R(F) Array, Affymetrix)が開発され、遺伝子の発現と DNA メチル化の関係が全ゲノムレベルで可視化出来るようになってきた。筆者は米国留学中に tiling array を使った転写、DNA メチル化検出系の確立に携わってきた経緯もあり、その経験及び知識を生かして本研究課題でも植物の組織特異的発現制御に関わる *de novo* DNA メチル化を tiling array を用いて網羅的に解析することを着想するに至った。

## 2. 研究の目的

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、生物の発生や分化、発癌などに関わっていることが示されており、ポストゲノム研究の重要な位置を占めている。植物でも花器官の形成等でゲノム DNA のメチル化やヒストンアセチル化といったゲノムの構造変化を伴う事象がいくつか観察されているが、どれくらいの遺伝子が影響を受けているのか不明であった。本研究では、tiling array を使った植物の器官別の DNA メチル化と遺伝子発現を網羅的かつ包括的に解析することで、植物の発生、分化や種々の生理現象に *de novo* メチル化が関与しているのかどうか、また上記 *de novo* DNA メチル化がどのような機構によって生じるのかを明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナの野生株 (col-0)、維持型メチル化酵素欠損株 (met1) および *de novo* DNA メチル化酵素欠損株 (ddc, *DRM1*, *DRM2*, *CMT3* 遺伝子の欠損株) の葉 (播種後 30 日経過したロゼット葉)、蕾 (播種後 30 日経過した花序全体。開花後の花は除く) と野生株の根 (播種後一週間経過した根端 0.5 cm) を採取して、total RNA およびゲノム DNA を抽出する。polyA RNA あるいは抗メチルシトシン抗体を用いて回収したメチル化部位を含むゲノム断片を tiling array に供して、各器官における polyA RNA, DNA メチル化の詳細な profile の作成を試みた。そして *de novo* メチル化によって組織特異的な発現制御を示す遺伝子候補の探索法を確立した。得られた候補遺伝子が実際に DNA メチル化によって転写制御が行われるのかどうかについて、器官

ごとに定量 PCR、bisulfite sequence を行い、比較した。

また上記器官レベルでの解析では、一部の DNA メチル化と遺伝子発現の関係しか明らかに出来ないことが示唆されたため、Laser マイクロダイセクション装置を用いた組織・細胞レベルにおける遺伝子発現様態、DNA メチル化パターンの解析を計画し、シロイヌナズナ柱頭組織および葯タペート組織の回収と RNA 抽出を試みた。

## 4. 研究成果

植物でも組織特異的な DNA メチル化の変動が見られるかどうかを明らかにすることを目的に、Col-0 株の花序、成葉、根のメチローム解析を行った。その結果、器官特異的な DNA メチル化・脱メチル化が見られた遺伝子を多数見出した (図 1)。

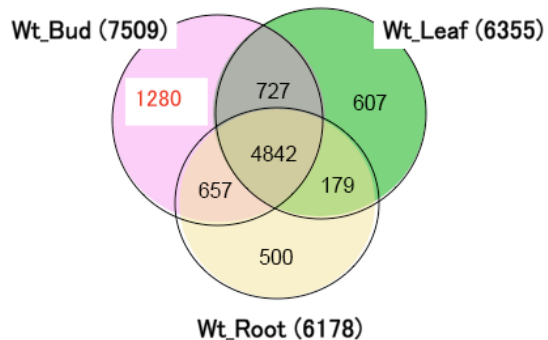


図 1 器官特異的なメチル化遺伝子

上記タイリングアレイで見つかった蕾器官特異的なメチル化が見られた遺伝子に関して、各器官から抽出したゲノム DNA を用いてそのメチル化部位を bisulfite sequence したところ、器官特異的なメチル化が確認された。この結果は、植物においても動物と同様にメチル化のダイナミックな変動があることを示唆しており、植物の発生、分化への *de novo* DNA メチル化の関与の有無を明らかにする上でも重要な成果であると言える。なお本研究成果の一部は、国内のシンポジウムでも発表を行っており、大きな反響を得ている。

また DNA メチル化の影響を具体的に示すために DNA メチル化酵素変異株ホモ株当代の花序のメチローム、トランスクリプトーム解析を行い、Col-0 株の結果と比較した。その結果、遺伝子発現が制御されていると見られる遺伝子を多数見出した (図 2、表)。

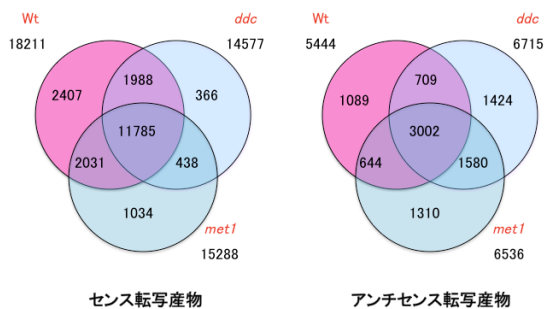


図2 DNAメチル化酵素変異株と野生株の花序で発現の違いが見られた遺伝子の抽出

	センス転写産物	アンチセンス転写産物
Col > met1	314 (4395)	21 (1798)
Col > ddc	475 (4438)	37 (1733)
Col < met1	23 (1472)	26 (2890)
Col < ddc	4 (804)	5 (3004)

表 花序特異的なDNAメチル化によって遺伝子発現が制御されていると見られる遺伝子のリスト。括弧内は野生株とメチル化酵素欠損株間で発現に差が見られた遺伝子の総数。

上記器官別メチローム・トランスクリプトーム統合解析の結果から、DNAメチル化は、遺伝子発現の抑制にも亢進にも関わっている可能性が示された。また上記トランスクリプトーム解析では、strand-specific に発現をみているため、mRNA以外とそのアンチセンス転写産物を区別して検出している。この結果、mRNAだけでなくアンチセンス転写産物の発現制御に関してもDNAメチル化が関わっている可能性が示唆された。そこで器官別メチローム・トランスクリプトーム統合解析の結果から器官特異的なDNAメチル化によって器官特異的な遺伝子発現が見られた候補遺伝子について既知のマイクロアレイ解析結果データベース (Arabidopsis eFP browser) で調べたところ、花粉や葯組織等で特異的に発現していることが分かった。また実際にDNAメチル化によって転写制御が行われるのかどうかについて、いくつかの候補遺伝子について野生株とDNAメチル化酵素欠損株の器官由来のRNAを用いて定量PCRを行い、比較したところ、野生株に比べて変異株では転写産物が低下していた。今後、どのようにして器官特異的なDNAメチル化が遺伝子発現の

亢進に関わっているのかを明らかにしたい。またメチル化部位を標的とするようなT-DNAタグラインを探索してその表現型を調べ、*de novo* DNAメチル化が遺伝子発現パターンに影響する実例を提示していきたい。

上記研究から植物でも器官特異的な *de novo* DNAメチル化・脱メチル化が広く起きていることが示された一方で、DNAメチル化の遺伝子発現への影響の有無を明らかにするためには、さらに組織レベルでの解析が必要と考えた。そのためLaserマイクロディセクションによる組織・細胞レベルにおける遺伝子発現様態、DNAメチル化パターンの解析を計画した。まずマイクロディセクションで単離した組織から高品質なDNAおよびRNAを抽出する系の確立を進めた。東京大学大学院農学生命科学研究科中園 幹生准教授の協力を得て、マイクロアレイ発現解析が可能なサンプル回収のための固定、パラフィン切片の作成法の検証を行った結果、ディセクションしたシロイヌナズナの葯の発達に伴い、細胞死が観察されるタペート細胞からマイクロアレイ解析に利用可能な高品質なRNAを抽出することに成功した。今後は、この系を利用してDNAの回収も進め、抗メチルシトシン抗体で回収した、あるいはbisulfite処理したゲノム断片をタイリングアレイあるいは次世代シーケンサーに供することでエピジェネティックな諸現象によって遺伝子発現が制御されている事例を探索したい。

## 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5件)

- ① 柴博史, 渡辺正夫, 高山誠司, 自家不和合性のエピジェネティックな制御機構, 植物の生長調節誌, 42巻, 113-120, 2007, 査読無し
- ② 柴博史, 高山誠司, RNA silencing systems and their relevance to allele-specific DNA methylation in plants, Biosci Biotech Biochem 誌, 71巻, 2632-2646, 2008, 査読有
- ③ 垣田満, 柴博史, 高山誠司(他5名, 6番目), Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*, Plant Cell 誌, 19巻, 3961-3973, 2007, 査読有
- ④ 岩野恵, 柴博史, 高山誠司(他7名, 2番目), Actin dynamics in papilla cells of *Brassica rapa* during self- and

cross-pollination, Plant Physiol 誌, 144 巻, 72-81, 2007, 査読有

⑤ 下里裕子, 柴博史, 高山誠司(他 6 名, 3 番目), Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in Brassica self-incompatibility, Plant Cell 誌, 19 巻, 107-117, 2007. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 柴博史, 矢崎潤史, 樽谷芳明, 磯貝彰, Joseph R Ecker, 高山誠司, シロイヌナズナで見られる *de novo* DNA メチル化の網羅的解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009. 3. 27, 福岡

② 柴博史, 矢崎潤史, 磯貝彰, Joseph R Ecker, 高山誠司, シロイヌナズナゲノムタイリングアレイを用いたメチローム・トランスクリプトーム統合解析, 第 50 回日本植物生理学会, 2009. 3. 21, 名古屋

③ 柴博史, 植物における small RNA を介した時期・組織特異的な対立遺伝子間の優劣性発現調節機構, 国際高等研究所研究会「細胞履歴に基づく植物の形態形成」, 2008. 12. 6, 奈良

④ 柴博史, シロイヌナズナゲノムタイリングアレイを用いたメチローム・トランスクリプトーム統合解析, 明治大学ワークショップ「大規模オミックス・データの利用と展望」, 2008. 9. 8, 東京

⑤ 柴博史, シロイヌナズナゲノムタイリングアレイを用いたエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の網羅的解析, 植物科学研究教育推進事業ワークショップ「オミックスワールドの全貌～ゲノミクスからメタボロミクスまで」, 2007. 9. 27, 奈良

⑥ 柴博史, 樽谷芳明, 岩野恵, 渡辺正夫, 磯貝彰, 高山誠司, アブラナ科植物の自他識別に関わる対立遺伝子間の優劣性に関する研究, 日本農芸化学会 2007 年度大会, 2007. 3. 24, 東京

[図書] (計 2 件)

① 柴博史, 高山誠司, 第 4 章 様々なエピジェネティック現象 1、自家不和合遺伝子, 別冊植物細胞工学「植物のエピジェネティクス」, 120-128, 2008

② 渡辺正夫, 鈴木剛, 柴博史, 高山誠司, アブラナ科植物の自家不和合性で見られる花粉側優劣性発現機構と DNA メチル化, 生物の化学 遺伝別冊, 21 巻, 225-229, 2007  
[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

平成 21 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴博史 (SHIBA HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 20294283

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

Joseph R. Ecker

Salk institute of biological studies・教授

矢崎潤史 (YAZAKI JUNSHI)

Salk institute of biological studies・博士研究員