

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292002

研究課題名(和文) エピジェネティックな遺伝子発現制御を介した分子育種法の開発

研究課題名(英文) Development of a method of molecular breeding involving epigenetic control of gene expression

研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA, Akira)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30281794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティックな遺伝子発現の制御を介した形質改変を植物の分子育種の方法として確立する観点から、エピジェネティックな変化の誘導の効率化と安定化に影響する要素を明らかにすることを目的として研究を行った。RNAサイレンシングを起こしている植物体において特定の条件下で生じるエピジェネティックな変化を解析し、その過程における低分子RNA産生とシトシンのメチル化の動態、ならびに、変化した状態の安定性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This work was aimed to understand the factors affecting the efficient induction and stabilization of epigenetic changes from the view point of establishing modification of plant traits via epigenetic control of gene expression as a tool for molecular breeding. Epigenetic changes that occurred under a specific condition in plants that had RNA silencing were analyzed. The patterns of dynamic changes in small RNA production and cytosine methylation, together with the stability of the altered state, were uncovered.

研究分野：農学

キーワード：遺伝子発現 植物 分子育種

1. 研究開始当初の背景

DNA のシトシン残基のメチル化およびヒストンのメチル化やアセチル化といった修飾状態の変化を介した機構、すなわち、エピジェネティックな機構による遺伝子発現の変化が、さまざまな生命現象に関与することが、近年、明らかになってきた。エピジェネティックな機構はクロマチンの構造を制御し、RNA ポリメラーゼが基本転写因子群と複合体を形成して遺伝子の転写を開始する過程を制御している。植物においては、パラミューテーションをはじめとする遺伝現象や、春化の過程やストレス応答などにエピジェネティックな機構による遺伝子発現制御が関わることが報告されていた。

エピジェネティックな変化が RNA を介して塩基配列特異的な様式により起こることが、以下に述べる、1990 年代以降に行われた植物を対象とした研究により明らかになっていた。RNA のみからなる病原体であるウイルスや RNA からなるゲノムを持つ RNA ウイルスを、それらの cDNA をゲノムに挿入した植物に感染された際に、cDNA 中のシトシンがメチル化されることが報告された (Wassenegger et al., 1994; Jones et al., 1998)。さらに、二本鎖 RNA が配列特異的な RNA 分解を誘導する現象に関連して、植物細胞中において外来遺伝子のプロモーターの二本鎖 RNA を産生させた際に、このプロモーターのシトシンのメチル化と転写抑制が誘導されることが報告された (Mette et al., 2000)。これらの発見を端緒として、低分子 RNA が塩基配列特異的なシトシンのメチル化やヒストン修飾の変化を誘導すること、ならびにその反応に関与するさまざまな因子が明らかになった (Matzke et al., 2009)。

本研究の研究代表者は、このような知見の集積を背景として、エピジェネティックな機構による遺伝子発現の変化を植物の分子育種の方策として利用することを考えた。しか

しながら、エピジェネティックな機構による変化の誘導ならびに維持の機構には未解明な部分が多く残されている状況にあり、とりわけ、こうした変化を効率的に誘導する方法や安定化する方法は提案されていなかった。

2. 研究の目的

エピジェネティックな機構を介した遺伝子発現の変化を植物育種に利用する観点から、こうした変化が誘導される過程、ならびに、いったん起きた変化が細胞分裂を経た場合にどのように伝達され、維持されるかを明らかにすることを目指した。特に、研究代表者が研究に用いてきた植物材料においてエピジェネティックな変化が誘導される現象を利用して、これらの点に関する理解を深めるための基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

アントシアニン色素の合成系に含まれるカルコン合成酵素をコードする *CHS-A* 遺伝子のコサプレッションが起きたことにより、色素合成が起きずに花卉が白色になるペチュニアの系統を主な研究材料として用いた。この系統の植物体を長期間にわたり維持すると、花卉に着色した部分が生じることを研究代表者は見出していた。この現象がエピジェネティックな機構によるものと考えられたことから、この植物体をエピジェネティックな変化を解析する材料として用いた。

(2) DNA メチル化の解析

DNA メチル化の状態をメチル化感受性制限酵素およびメチル化依存性エンドヌクレアーゼによる DNA の切断と PCR 増幅を利用した方法、ならびに、バイサルファイトシーケンス法により解析した。

(3) 低分子 RNA の解析

低分子 RNA の産生状態をノーザン法、ならびに、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により解析した。

4. 研究成果

(1) *CHS-A* コサプレッションからの復帰現象

本研究に用いた、*CHS-A* 遺伝子のコサプレッションが起きることで花卉全体が白色になるペチュニア系統は、作出後に十数世代を経ても安定に同じ表現型を示す。しかしながら、この系統の植物体を1年程度の長期間にわたり維持すると、花卉に野生型の植物と同じ紫色の着色部分が徐々に生じる。本研究では第一にこの現象の再現性を確認し、その後の解析に用いた。着色が起きた花卉の組織においては、白色の組織では分解されてほとんど存在しない *CHS-A* の mRNA の量が増加しており、コサプレッションによる *CHS-A* 遺伝子の RNA 分解からの復帰が起きていた。

(2) シトシンメチル化の動態

バイサルファイトシーケンス解析により、シトシンのメチル化頻度を白色の花弁とコサプレッションからの復帰により着色した花弁について調べた。その結果、遺伝子のプロモーターを含む複数の領域に関して、着色した組織においてメチル化の頻度が高かった。特にエキソン2の領域において高頻度のメチル化が検出された。

(3) 低分子 RNA の産生状態

白色の花弁とコサプレッションからの復帰により着色した花弁について、低分子 RNA のディープシーケンス解析を行い、*CHS-A* 遺伝子の配列を持つ低分子 RNA (short interfering RNA; siRNA) を検出した。その結果、白色の花弁組織においては、着色した組織に比べて、より多くの *CHS-A* siRNA が検出された。例えば、21ヌクレオチド長の siRNA

でリード数が最大のものは、前者において後者の約10倍存在した。ディープシーケンス解析により検出された siRNA 量の違いは、ノーザン解析によるシグナル強度の違いと矛盾しないものであった。なお、既報における結果 (Morita et al., 2012; Kasai et al., 2013) と同様、*CHS-A* siRNA はエキソン2の配列に相当するものが、センス鎖、アンチセンス鎖の両者に関して多く検出された。

(4) エピジェネティックな機構により変化した状態の次世代への伝達

コサプレッションからの復帰により着色した花弁を産生する植物体に対して、野生型の花弁を授粉し、次世代の種子を得た。この種子を発芽させ、次世代の植物体で外来遺伝子を持つ個体を選抜して育成した。その結果、それらの個体に産生した花は、さまざまな程度に着色していた。このことから、いったん起きたエピジェネティックな機構により変化した *CHS-A* 遺伝子の状態が次世代へ伝達されることが示唆された。

(5) エピジェネティックな変化の拡大機構と安定化

白色の花弁と比較して、コサプレッションからの復帰により着色した花弁においては *CHS-A* siRNA の産生量が顕著に減少していた。このことは *CHS-A* mRNA の分解の効率が低下していることと矛盾しない結果である。24ヌクレオチド長の siRNA はシトシンのメチル化に関与することが知られている (Matzke et al., 2009)。この大きさの siRNA に関して、*CHS-A* 遺伝子のコード領域の配列を持つものに対する *CHS-A* プロモーター領域の配列を持つものの割合を算出したところ、その値は着色した花弁において相対的に高かった。すなわち、siRNA の産生量の変化に加え、siRNA の産生領域に変化が見られた。遺伝子領域において siRNA の産生はエキソ

ン2の部分を中心に起きている。これらのことから、コサプレッションからの復帰の過程で、siRNAの産生部位が周辺領域へ拡大し、それに伴いシトシンのメチル化も同様に拡大した可能性があるものと研究代表者は考えている。転写されている領域において起きたシトシンのメチル化は次世代に伝達されないのに対し、転写されない領域におけるメチル化は次世代へ伝達されることが報告されている (Jones et al., 2001)。上記のことから、コサプレッションのRNA分解によって生じたsiRNAを介して起きたシトシンメチル化が、周辺領域へ広がることにより、次世代へ伝達される安定化した変化を生み出したことが示唆された。このことは、エピジェネティックな機構を介した遺伝子発現制御を育種へ利用する上での新たな指針を提供するものと考えている。

(6) その他の研究成果

特定の遺伝子に関するRNAサイレンシングの誘導を研究する枠組みにおいて、上記の研究のほか、レトロトランスポゾンの不活性化や外来遺伝子のRNAサイレンシングの誘導に関する研究を行い、シトシンのメチル化頻度の変化やシトシンのメチル化と低分子RNAの産生の関連性等に関する知見を得た。

<引用文献>

- ① Jones, A. L., Thomas, C. L. and Maule, A. J. (1998) *De novo* methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.* 17, 6385-6393.
- ② Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D. C. (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.*

11, 747-757.

- ③ Kasai, M., Matsumura, H., Yoshida, K., Terauchi, R., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2013) Deep sequencing uncovers commonality in small RNA profiles between transgene-induced and naturally occurring RNA silencing of chalcone synthase-A gene in petunia. *BMC Genomics* 14, 63.
- ④ Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B. and Matzke, A. J. (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 367-376.
- ⑤ Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. and Matzke, A. J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19, 5194-5201.
- ⑥ Morita, Y., Saito, R., Ban, Y., Tanikawa, N., Kuchitsu, K., Ando, T., Yoshikawa, M., Habu, Y., Ozeki, Y. and Nakayama, M. (2012) Tandemly arranged *chalcone synthase A* genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 70, 739-749.
- ⑦ Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H. L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Zhao, C., Takeshima, R., Zhu, J., Xu, M.,

Sato, M., Watanabe, S., Kanazawa, A., Liu, B., Kong, F., Yamada, T. and Abe, J. (2016) A recessive allele for delayed flowering at the soybean maturity locus *E9* is a leaky allele of *FT2a*, a *FLOWERING LOCUS T* ortholog. *BMC Plant Biol.* 16, 20. 査読有 doi: 10.1186/s12870-016-0704-9

② Xu, M., Yamagishi, N., Zhao, C., Takeshima, R., Kasai, M., Watanabe, S., Kanazawa, A., Yoshikawa, N., Liu, B., Yamada, T. and Abe, J. (2015) The soybean-specific maturity gene *E1* family of floral repressors controls night-break responses through down-regulation of *FLOWERING LOCUS T* orthologs. *Plant Physiol.* 168, 1735-1746. 査読有 doi: 10.1104/pp.15.00763

③ 金澤 章・深井英吾・宮尾安藝雄・佐瀬英俊・築山拓司 (2015) トランスポゾンによる変異創成とその育種への利用 育種学研究 17, 77-87. 査読無 doi: org/10.1270/jsbbr.17.77

[学会発表] (計 12 件)

① 福本沙弥・河西めぐみ・種田晃人・金澤 章 ペチュニアにおけるカルコン合成酵素遺伝子のコサプレッションからのエピジェネティックな復帰: 低分子 RNA 産生とシトシンメチル化状態の変化 日本育種学会第 130 回講演会 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市) 2016 年 9 月 24 日

② 金澤 章 レトロトランスポゾンの挿入を介した植物の環境適応とエピミュータージェネシス: 重複遺伝子を持つダイズにおける事例 2016 年度国立遺伝学研究所 研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」国立遺伝学研究所 (静岡県・三島市) 2016 年 9

月 6 日

③ 御厨 駿・種田晃人・阿部 純・金澤 章 ダイズにおけるレトロトランスポゾン *SORE-1* の small RNA 産生と DNA メチル化 日本育種学会第 129 回講演会 横浜市立大学 (神奈川県・横浜市) 2016 年 3 月 21 日

④ 福本沙弥・河西めぐみ・金澤 章 ペチュニアのカルコン合成酵素遺伝子のコサプレッションとエピジェネティックな表現型の復帰過程におけるシトシンメチル化の動態 日本育種学会第 128 回講演会 新潟大学 (新潟県・新潟市) 2015 年 9 月 12 日

⑤ 金澤 章 ダイズにおける RNA サイレンシングによる遺伝子発現制御とその利用 第 8 回ダイズ研究会 岩手大学 (岩手県・盛岡市) 2015 年 3 月 6 日

⑥ 金澤 章・土屋真弓・阿部 純 遺伝子重複とレトロトランスポゾンの挿入を介したダイズの適応進化 日本育種学会第 56 回シンポジウム (シンポジウム・ワークショップ) 「トランスポゾンによる変異創成とその育種への利用」 南九州大学 (宮崎県・都城市) 2014 年 9 月 26 日

⑦ 土屋真弓・Yuan Hongyu・佐藤雅子・河西めぐみ・阿部 純・金澤 章 北海道の栽培ダイズ分化過程における遺伝子破壊を伴うレトロトランスポゾン *SORE-1* の転移 日本育種学会第 124 回講演会 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市) 2013 年 10 月 12 日

⑧ 金澤 章 植物の RNAi 機構 2013 年度

国立遺伝学研究所 研究集会「転移因子
と宿主の相互作用による生命機能」国立
遺伝学研究所（静岡県・三島市）2013
年10月10日

〔図書〕（計1件）

- ① Kanazawa, A. and Kasai, M. (2015)
Induction of stable epigenetic gene silencing
in plants using a virus vector. *In* Plant Gene
Silencing: Methods and Protocols, Methods
in Molecular Biology, vol. 1287, Ed. By K.
S. Mysore and M. Senthil-Kumar, Springer
Science + Business Media New York, pp.
129-137.

6. 研究組織

(1)研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA, Akira)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30281794