

令和元年6月28日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19358

研究課題名（和文）ゲノム変動がトランスクリプトーム変動を生み出す根本的メカニズムの解明

研究課題名（英文）Basic mechanism of how variation in the genome alters transcriptome

研究代表者

小保方 潤一（Obokata, Junichi）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50185667

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノムDNAの構造変動（挿入、重複、欠失、転座など）によって、ゲノム中に新規の転写開始点や転写領域が生じるメカニズムを実験的に検討した。プロモーターを持たないコード配列を植物ゲノムにランダムに挿入すると、受容ゲノム領域の配列や性質とはほぼ無関係に、一定の頻度で偶発的に転写開始点と転写領域が生成された。一方、受容植物のクロマチンリモデリングを攪乱すると、内在遺伝子の発現には大きな影響は無かったが、新規転写領域の転写強度は大きく変化した。これらの知見は、ゲノムの構造変動はその近傍で生じるクロマチンリモデリングを介してトランスクリプトームを変動させていることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で得られた知見は、真核生物界でみられる進化や遺伝子新生などの背景には、ゲノムDNAの切断修復に伴うクロマチンのリモデリングが関与していることを示唆しており、「DNAの切断修復と転写活性化の関係」という進化分子生物学の根本原理に関わる新しい研究領域に光をあてる研究、言い換えれば、新しい研究領域を切り拓く研究である。また、これらの研究によって得られる一連の知見は、生物進化の原理だけでは無く、ゲノム中に人為的に挿入された外来遺伝子の活性化メカニズムにも強く関係しており、その意味で、遺伝子操作技術の安全性評価の理論面にも今後大きな影響を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although genome shuffling by recombination and mobile element transposition have a potential to generate transcriptional units, we still have little knowledge about how such variation in the genome alters transcriptome. To address this question, we attempted a massive promoter trap experiment using a promoter-less luciferase gene in the plant genome. Contrary to the widely accepted idea, transcriptional activation of the LUC transgenes occurred independently of the sequence properties of the integration sites but occurred stochastically. This indicates that some factors besides genomic sequence play critical roles in causing the alteration of transcription. We further found that the mutation in histone modification enzymes greatly alters the expression level of above de novo transcripts but influence little on the intrinsic genes. These results suggest chromatin remodeling following the DNA double strand break repair should play an important role in altering the transcriptome.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノム変動 トランスクリプトーム 転写開始点 クロマチンリモデリング DNA修復 クロマチン修復
ヒストン修飾 プロモータートラッピング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の核ゲノム中では、ゲノムシャフリングや遺伝子転移などによって、不断に様々な新規遺伝子配列が出現している。近年、真核ゲノムのこのような動的な姿が次第に明らかになってきたが、一方、この様な新規構造遺伝子配列がどのような仕組みで転写能を獲得するのかは、まだわかっていない。筆者らは、この問題に対する解決の糸口を得るため、プロモーター配列を持たないレポーター遺伝子配列(ORF配列)をシロイヌナズナの核ゲノムに大量に挿入したところ、それらの配列はゲノム上の挿入部位の性質とはほぼ無関係に、一定の確率で転写されることを、実験結果からほぼ突き止めていた。この知見は、ゲノム中に新規に出現したORF配列に転写能を賦与するのは、ゲノム上の部位や位置に関わる属性、つまりDNAの塩基配列では無いことを示唆している。では、ゲノム中に出現した新規の遺伝子配列の転写は、一体どのような仕組みで誘導・活性化されるのだろうか？これが、筆者らにとって、本研究を開始した時点での最大の疑問だった。

2. 研究の目的

真核ゲノムで、配列のシャフリングや遺伝子転移などが生じる際は、必ず、2本鎖DNAの切断(DSB)と、それに続くDNA修復が生じる。より正確には、単に切断箇所のDNAが連結されるだけではなく、その周辺のクロマチン構造がいったんほどけた上で、DNAが連結され、その後、周辺クロマチンの再構築が生じる。そこで本研究では、このクロマチンの切断修復反応と、その部位に挿入された外来配列の転写活性化との関係の解明を試みた。

3. 研究の方法

実験材料には、シロイヌナズナの培養細胞と植物体を用い、それらの核ゲノムに、プロモーターを持たないルシフェラーゼ(LUC)遺伝子をアグロバクテリウム法で導入した。培養細胞については、配列導入後に10~20回程度分裂増殖した細胞を、植物体については、形質転換のT2世代を用いて、導入配列の転写物量を定量した。具体的には、培養細胞については、cDNAのアンプリコンシーケンス、植物体については、RTR-PCR法を用いた。それ以外の実験手法については、植物分子生物学の標準的な手法を用いた。

4. 研究成果

本研究で得られた主要な成果は、大きく三つに分けることが出来る。それらの概況を説明した上で、それらの結果からどのような結論と課題が導かれるのかを概説する。

(1) 挿入外来配列の転写活性化に必要な受容ゲノム側の配列要素について

植物ゲノムに挿入したレポーターORFの転写活性化には、挿入位置近傍の塩基配列やクロマチンの性質(ヘテロクロマチンかユークロマチンか、など)はほぼ無関係だったが、より詳しい解析をするには、これらの発現配列の転写開始点(TSS)を正確に決定する必要があった。これらの配列はその発現レベルが非常に低いため、それらを鋭敏に検出する新しい転写開始点決定法を考案し、それを用いて解析したところ、新生TSSは「ORFの100~200塩基ほど上流にあるPyPu配列、つまりピリミジンとプリン交代位置」に形成されることが明らかになった。しかし、このような条件を満たす部位はゲノム中のそこかしこにあるため、このような配列の存在の可否が挿入配列の転写活性化の可否を決定しているとは考えられない。

(2) クロマチンリモデリングと挿入外来配列の転写活性化について

シロイヌナズナで、ヒストンアセチル化酵素(HAT)、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)、ヒストンシ

ヤベロン(SGA1)の各々の遺伝子についてのRNAiによるノックダウン系統を確立し、それらの変異型植物に対してプロモーター配列を持たないレポーター遺伝子配列(ORF配列)を導入し、その発現レベルを野生型植物の場合と比較した。その結果、シロイヌナズナの内在遺伝子であるUBQ10(ユビキチン遺伝子)の発現レベルは、これらのノックダウン系統と野生型植物との間で殆ど差が無かったが、外来ORF配列の発現レベルは、ノックダウン系統と野生型植物では大きく異なっていた。この結果は、外来ORFの挿入による転写活性化には、受容ゲノム側のクロマチン状態が大きく影響することを示している。また、上記の変異体での発現レベルの変化は、受容配列の転写活性化には受容ゲノム側の複雑なメカニズムが関わっていることを示唆していた。

(3) 植物ゲノムの切断を人為的に誘導出来る実験系の開発

DNAの切断修復と、その周辺領域の転写活性化との関係をより直接的に解析するため、シロイヌナズナの核ゲノムにヒートショックで発現を誘導できる制限酵素を導入し、人為的な切断修復の誘導系の作成を試みた。現在、制限酵素 BsiWI の発現誘導植物が作成出来たので、それを用いてDNA2本鎖切断(DSB) の人為操作について、基礎的な条件や実験系の性質の解析を進めている。

(4)現時点での結論と今後への課題について

上記の知見を始めとする今回の研究での実験結果から、植物ゲノムに挿入された外来ORF配列の転写活性化には、クロマチンの切断修復と挿入配列近傍でのクロマチンリモデリングなどによってまずゲノム上の転写開始可能領域が大まかに決定され、その上で、局所的な転写開始点TSSの位置決定には、ORFからの距離とPyPuモチーフが関わっていることが強く示唆された。しかし、これだけの知見では、挿入配列の転写活性化が「確率的に生じる」ことの、分子的な説明がまだ困難である。今後は、上記(3)で開発中の切断誘導植物などの系を用いて、DNA-クロマチンの切断修復反応とその近傍での転写活性化のメカニズムを、より詳細に解析する必要がある。

5 . 主な発表論文等

本報告書作成時点で数編の論文が作成中であり、いずれも本年の秋までに公表予定である。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計10件)

(1) Obokata, J.

Lessons from two unique model systems: how horizontal and endosymbiotic gene transfer occurs.

XVIII Annual meeting of the International Society of Endocytobiology German Section. (招待講演)Konstanz, Germany, 2017年9月

(2) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Hayakawa, C., Kazama, M., Uchikoba, T., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.

Molecular basis of EGT and HGT: How bacterial transgenes express in the eukaryotic genome?

Taiwan-Japan Plant Biology 2017.(国際学会) 台北(台湾) 2017年11月

(3) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Uchikoba, T., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.

Molecular basis of transcriptional activation of transgenes: How the genome fluctuation influences its transcriptome?

2017年度生命科学系合同年次大会 (ConBio2017) 神戸、2017年12月

- (4) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Hayakawa, C., Kazama, M., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.
Experimental evolution approach reveals stochastic behavior of transcriptional activation of transgenes in the plant genome.
第 59 回日本植物生理学会、札幌、2018 年 3 月
- (5) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Hayakawa, C., Kazama, M., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.
Genome-wide analysis of transcriptional activation of foreign DNA in *Arabidopsis thaliana*.
第 51 回植物バイオテクノロジーシンポジウム、京都、2018 年 7 月
- (6) 小保方潤一
遺伝子の水平転移はどのように生じるのか -分子の時間から進化の時間まで-
第 2 回日本共生生物学会（招待講演）神戸、2018 年 11 月
- (7) 畑貴之、佐藤壮一郎、高田直東、風間明、早川千明、立川誠、松尾充啓、Sergei Kushnir, 小保方潤一
細胞内共生進化における転移遺伝子の活性化モデル
第 2 回日本共生生物学会、神戸、2018 年 11 月
- (8) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Hayakawa, C., Kazama, M., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.
Genome-wide analysis of de novo originated transcription start site in the *Arabidopsis* genome
第 41 回日本分子生物学会、横浜、2018 年 11 月
- (9) Hata, T., Satoh, S., Takada, N., Hayakawa, C., Kazama, M., Tachikawa, M., Matsuo, M., Kushnir, S., and Obokata, J.
Characterization of the de novo activated transcription start sites in the *Arabidopsis* genome.
第 61 回日本植物生理学会、名古屋、2019 年 3 月
- (10) Obokata, J.
How EGT/HGT occurs from the time scale of molecules to the evolution.
The 14th International Colloquium in Endocytobiology and Symbiosis in Lille, France.
(招待講演として講演確定済)Lille, France, 2019 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 https://www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_genome_bio/Site/Top.html

6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 壮一郎

ローマ字氏名：SATOH Soichirou

研究協力者氏名：松尾 充啓

ローマ字氏名：MATSUO Mitsuhiro

研究協力者氏名：畑 貴之

ローマ字氏名：HATA Takayuki

研究協力者氏名：風間 明

ローマ字氏名：KAZAMA Mei

研究協力者氏名：早川 千明

ローマ字氏名：HAYAKAWA Chihiro

研究協力者氏名：西門 航平

ローマ字氏名：NISHIMON Kohei

研究協力者氏名：山口 史香

ローマ字氏名：YAMAGUCHI Fumika

研究協力者氏名：川口 晃平

ローマ字氏名：KAWAGUCHI Kohei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。