

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06301

研究課題名(和文)トランスポゾンによる植物のエピゲノムと遺伝子発現の制御

研究課題名(英文)Epigenetic control of plant genome and gene expression by transposons

研究代表者

星野 敦 (Atsushi, Hoshino)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：80312205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アサガオの刷毛目絞をモデルとして、トランスポゾンが誘発するエピジェネティックな変異と遺伝子発現の制御を研究した。転移酵素遺伝子をコードするトランスポゾンのDNAメチル化やヒストン修飾と、転移酵素遺伝子の発現抑制の関連の概要を明らかにできた。また、刷毛目絞変異体の全ゲノム配列を解読することで、新規の自律性トランスポゾンを特定した。それらの転写産物の解析から、転移酵素遺伝子の構造も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の多様性の獲得と進化に、エピジェネティックな変異が突然変異と同様に寄与するとされている。刷毛目絞はエピジェネティックな変異が生じて次世代に伝達するため、多様性の獲得の過程を観察していると言える。そのため本研究の成果は、エピジェネティクス理解だけでなく、生物が多様性獲得する機構の一端に迫るものとしても意義がある。

研究成果の概要(英文)：Using the duskish mutant of Japanese morning glory as a model, transposon-induced epigenetic variation and its impact on gene expression were studied. The results outlined the relationship between DNA methylation and histone modifications of a transposon and suppression of the genes for transposition. By decoding the whole genome sequence of the duskish mutant, novel autonomous transposons were identified. Analysis of their transcripts also revealed the structure of the genes for transposition.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：エピジェネティクス トランスポゾン アサガオ DNAメチル化 ヒストン 花

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな変異(エピ変異)は、突然変異と同様に多様性の獲得と進化に寄与するとされる。植物ではトランスポゾンが多くのエピ変異を誘発しており、エピ変異により変化した形質の遺伝も古くから観察されている。

アサガオにおいても、エピ変異によると思われる花の着色形質の変化と遺伝が戦前から観察されている。刷毛目絞変異体は、刷毛目絞と呼ばれる模様の花を咲かせる(図1)。その表現型から刷毛目絞はエピ変異により生じると推測される。一方、この変異体は模様がない濃色花や薄色花も咲かせ、濃色花あるいは薄色花だけを咲かせる個体を分離する。薄色花の個体からは、改めて刷毛目絞の個体も分離する。このため、刷毛目絞と薄色花の出現はエピ変異による可能性が高く、濃色花が出現することもエピ変異による可能性がある。刷毛目絞は、アントシアニン色素合成に関わる花色遺伝子のプロモーター領域への、*Tpn1*ファミリーのトランスポゾンの挿入変異である(図2)。また、花色遺伝子のプロモーター配列が高度にメチル化されており、濃色花ではアセチル化されたヒストンが集積している。一方、*Tpn1*ファミリーのトランスポゾンはゲノム中に300コピー以上存在して、刷毛目絞の原因である*Tpn10*を含めて、その多くは転移酵素をコードしない非自律性のトランスポゾンである。野生型のゲノム中には、転移酵素遺伝子をコードする*TpnA1*と*TpnA2*が存在する。前者は自律性トランスポゾンで活性が抑制されており、後者は末端配列の欠失により自身は転移できないが、転移酵素を供給することで非自律性トランスポゾンを制御する活性があると考えられている。

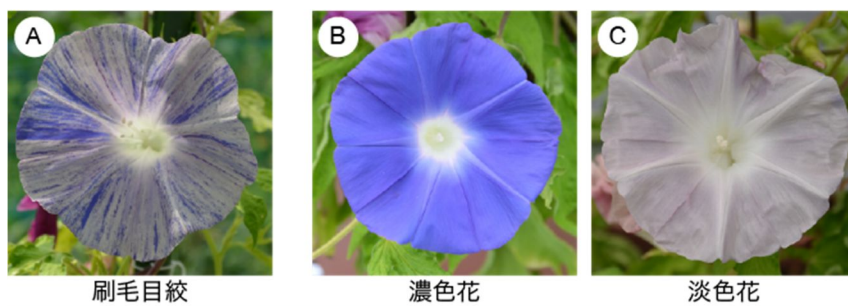


図1: 刷毛目絞変異体1個体の中に、3種類の表現型が現れる。また、次世代では濃色花、淡色花だけを咲かせるエピ変異体が出現する。

刷毛目絞

濃色花

淡色花

刷毛目絞変異体 (Q0531)

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物のトランスポゾンによるエピゲノムと遺伝子の制御機構を明らかにすることにある。とくに、トランスポゾンがその配列と周辺配列にどのようなエピ変異を誘発し、どのように周辺遺伝子を制御するのかを解明する。そのためにここでは、刷毛目絞変異体を材料に、*TpnA2*のエピ変異と、転移酵素遺伝子や花色遺伝子の発現との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) *TpnA2*のDNAメチル化、ヒストン修飾並びに、転移酵素遺伝子の発現を調べ、野生型、濃色花と淡色花のエピ変異体で比較検討する。DNAメチル化は全ゲノムバイサルファイブシーケンス(WGBS)で、ヒストン修飾はクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)で、遺伝子発現はRT-qPCRで調べる。
- (2) 花色遺伝子の発現抑制に抑制的なエピジェネティック修飾が関わることを立証する。抑制的なヒストン修飾であるヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)のメチル化を触媒するKRYPTONITE(KYP)や、H3K9のメチル化やDNAメチル化に関わるDecrease in DNA methylation1(DDM1)の遺伝子をゲノム編集により破壊し、その影響を検討する。
- (3) 刷毛目絞変異体変異体の全ゲノム配列を決定し、*TpnA2*以外に転移酵素を発現して刷毛目絞に関与する可能性がある*Tpn1*ファミリーのトランスポゾンを特定する。全ゲノム配列の決定は、一分子リアルタイムシーケンサーのPacBio Sequel IIのHiFiリードを取得して、Hifiasmによりアセンブリを構築することで行う。

4. 研究成果

- (1) WGBSの結果をもとに*TpnA2*のDNAメチル化を比較検討した。野生型でも刷毛目絞変異体でも内部配列が高度にメチル化されていた。*TpnA2*の上流域では、野生型の方が変異体よりもDNAメチル化のレベルが高い。これは野生型では*TpnA2*が不活性であることと一致する。濃色花と淡色花のエピ変異体の間でも、DNAメチル化の状態に差が見られ、DNAメチル化のレベルが濃色花の方が高い領域と、淡色花の方が高い領域の両方が混在していた。一方で、WGBSでは解析できない領域も多く、これは*TpnA2*が繰り返し配列であるために、次世代シーケンサーから得られたDNA配列がマップできないためと考えられた。この問題を解決するために、一分子リアルタイムシーケンサーのHiFiリードを用いてDNAメチル化を解析する手法の開発にも着手した。この手法には、標品とし

て解析対象となる配列の全てのシトシンがメチル化された、あるいはメチル化されていない DNA 断片を用意する必要がある。 *TpnA2* の様な繰り返し配列を含む DNA を PCR で増幅することが難しく、メチル化シトシンを用いて DNA メチル化を導入することはさらに難しい。 PCR の条件を PCR 装置も含めて検討したが、再現性の良いプロトコルは確立できなかった。しかし、本研究に必要な DNA 断片は取得できた。 HiFi リードのライブラリーの調整も試みたので、近く結果が出る見込みである。

ChIP-seq では、ヒストン H3 のリジンのアセチル化 (H3K9/27Ac) と、2 種類のメチル化 (H3K4me2、H3K27me3) で再現性のある結果が得られた。これらの修飾は、刷毛目絞変異体の *TpnA2* 内部で検出できたが、野生型では検出されなかった。 DNA メチル化の結果と合わせると、野生型では DNA メチル化により転移酵素遺伝子の発現が抑制されており、変異体では抑制が解除されていると考えられた。転移酵素遺伝子の発現は RT-qPCR で調べたが、これまでのところ濃色花と薄色花の間での有意差は確認できていない。なお、この RT-qPCR に用いる RNA は、花色遺伝子の発現がピークとなる開花前日の花弁より抽出した。当初は、抽出効率が極めて悪いために十分な RNA が得られなかった。そこで、20 種類の方法を検討し、従来は RNA が抽出できないとされていた萎れた花弁からも効率よく純度の高い RNA を抽出する方法を確立できた。

- (2) アサガオのゲノム中には、*KYP* と *DDM1* のオースログと考えられる遺伝子が 1 コピー存在した。これらの遺伝子、*InKYP* (INIL01g00036) と *InDDM1* (INIL05g09588) のエキソン内の 3 カ所を標的としてゲノム編集するためのベクターを構築した。それぞれを野生型のアサガオに導入してゲノム編集を試みたが、いずれも再生個体を得ることができなかった。そこで対象実験として、アントシアニンの色素生成と花の形態形成に関わることが予想された遺伝子についても同様にゲノム編集を試みたところ、再生個体が得られた。これらの個体は、いずれも T0 世代でゲノム編集された変異型のアレルをホモに持ち、アントシアニンの着色や形態の変異形質が観察された。以上のことから、*InKYP* と *InDDM1* のゲノム編集はベクターの導入に問題があるのではなく、ベクター導入とゲノム編集に成功し、生じたエビ変異が再生を阻害することが問題だと推察された。今後、*InKYP* や *InDDM1* に代わるヒストン修飾や DNA メチル化に関わる遺伝子を解析して、花色遺伝子の発現抑制への影響を検討したい。
- (3) 刷毛目絞変異体の変異体の全ゲノム配列を決定した。一分子リアルタイムシーケンサーの HiFi リードを取得して Hifiasm によりアセンブリを行い、750 Mb と推定されるゲノムサイズに対して、総延長 751.71 Mb の配列を構築できた。シーケンスの数は 919、N50 値は 2.27 Mb、平均長は 818 kb であった。これらの数値は、2016 年に公表した野生型のゲノム配列と同等かそれを上回っている。このゲノム配列をもとにトランスポゾンの解析を行った結果、変異体には転移酵素を発現する可能性があるトランスポゾンが *TpnA2* 以外にも、4 コピー存在することを突き止めた。これらの転写産物を解析して、従来の転移酵素遺伝子の構造予測に誤りを見出した。すなわち、従来のエキソン 1 の上流に、新しく 2 つのエキソンが存在していた。さらに、これら 2 つのエキソンの一部は、トランスポゾンではなく宿主遺伝子に由来することも明らかになった。転移酵素を発現する可能性があるトランスポゾンのうち、実際に転移酵素遺伝子が転写されているコピーの特定を、RT-PCR により試みた。その結果、*TpnA2* 以外のコピーも転写されていることが示唆された。

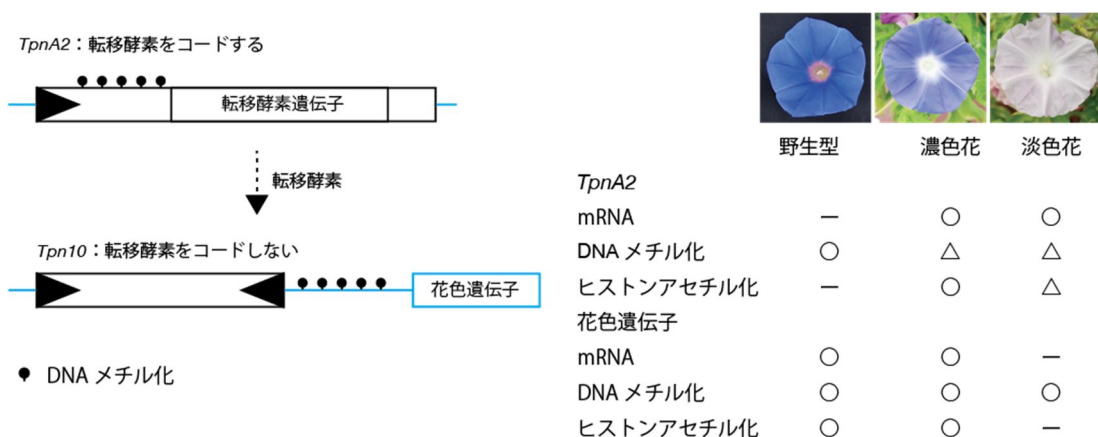


図 2：本研究結果の概要

左は、刷毛目絞の遺伝子座（下）と転移酵素をコードする *TpnA2*（上）の模式図。転移酵素を介した相互作用があると予測される。右は、野生型と、濃色花や淡色花だけを咲かせるエビ変異体の中で、*TpnA2* の転移酵素遺伝子の発現、DNA メチル化、ヒストンアセチル化を比較検討した結果。野生型の *TpnA2* は、最も高度に DNA メチル化され、転写も抑制されていた。濃色花と淡色花では、DNA メチル化レベルの低下とアセチル化ヒストンの集積がみられ、転写抑制も解除されていた。繰り返し配列部分では、DNA メチル化を解析できておらず、解析できた範囲では濃色花と淡色花での明確な違いを検出できなかった。

本研究では、*TpnA2* の DNA メチル化とヒストン修飾、並びに転移酵素遺伝子の発現の関連について明らかにすることができた。また、刷毛目絞変異体の全ゲノム配列を解読することで、新たに転移酵素をコードする *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンと転移酵素遺伝子の構造を明らかにするなど、当初の計画以上の進展があった。一方、WGBS では *TpnA2* の DNA メチル化について十分な解析が行えず、*TpnA2* のエピ変異と遺伝子発現との関連を完全に解くことはできなかった。また、*TpnA2* だけでなく、新たに特定した転移酵素をコードする *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンと遺伝子発現の関連を調べる必要性も生じた。WGBS の問題を解決するため、一分子リアルタイムシーケンサーを用いた DNA メチル化の解析手法の開発にも着手しており、これを駆逐することで、トランスポゾンのエピ変異と遺伝子発現の関連を明らかにできると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagaki Kiyotaka, Furuta Tomoyuki, Yamaji Naoki, Kuniyoshi Daichi, Ishihara Megumi, Kishima Yuji, Murata Minoru, Hoshino Atsushi, Takatsuka Hiroto	4. 巻 29
2. 論文標題 Effectiveness of Create ML in microscopy image classifications: a simple and inexpensive deep learning pipeline for non-data scientists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 361 ~ 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-021-09676-z	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野敦
2. 発表標題 アサガオのエピジェネティクスによる模様形成と経世代伝達
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会（シンポジウム・模様研究のあした ~形成機構や機能~）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野敦, 森田裕将, 長岐清孝
2. 発表標題 アサガオの刷毛目紋を司るエピジェネティックな遺伝子発現御
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野敦, 森田裕将, 長岐清孝
2. 発表標題 アサガオの刷毛目紋とエピゲノム解析
3. 学会等名 第10回アサガオ研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水成友紀、白澤健太、星野敦、仁田坂英二
2. 発表標題 アサガオにおける安定化自律性因子が制御するTpnトランスポゾンの転移
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野敦、白澤健太、仁田坂英二
2. 発表標題 リシーケンスによるアサガオ100系統の多型と遺伝子変異の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水成友紀、白澤健太、星野敦、仁田坂英二
2. 発表標題 アサガオの主要な変異原Tpnトランスポゾンの転移及び転移抑制機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川颯也、朴慶一、森田裕将、飯田滋、星野敦
2. 発表標題 アサガオの花弁周縁部に特異的な三重化した遺伝子のRNAサイレンシング
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野敦、白澤健太、仁田坂英二
2. 発表標題 アサガオ:ゲノム情報でキラリと光りはじめた日本独自のバイオリソース
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>基礎生物学研究所分野横断研究ユニット(星野グループ) https://www.nibb.ac.jp/hoshino/</p> <p>Japanese Morning Glory Genome Database https://ipomoeanil.nibb.ac.jp/</p>

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	長岐 清孝 (NAGAKI KIYOTAKA)		
研究協力者	仁田坂 英二 (NITASAKA EIJI)		
研究協力者	森田 裕将 (MORITA YASUMASA)		

6. 研究組織（つづき）

	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	伊藤 多世 (ITO KAZUYO)		

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