

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06348

研究課題名（和文）抗抑制因子VanC21によるトランスポゾン活性化機構の遺伝学的解析

研究課題名（英文）Genetic dissection of VANC21-mediated anti-silencing mechanism

研究代表者

佐々木 卓（SASAKI, Taku）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任助教

研究者番号：80744870

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）： シロイヌナズナのトランスポゾンVANDAL21は、脱抑制因子VANC21をコードしており、VANC21が標的トランスポゾンに結合し、配列特異的なDNA脱メチル化、転写活性化を引き起こす脱抑制機構を持つ。脱抑制機構は宿主のエピゲノムに対するダメージを最小限に抑えつつ、VANDAL21の転移を可能にする機構と考えられるが、その分子機構は不明である。

そこで、本研究は順遺伝学的手法より脱抑制機構に関わる因子をスクリーニングし、複数の変異体候補を得た。また、VANCによる脱抑制システムの進化およびホストとのエピジェネティックな拮抗関係についても解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポゾンは転移酵素以外にもさまざまな遺伝子をコードしているが、それらの機能のほとんどはわかっていない。VANDALが持つ脱抑制因子VANCは、配列特異的なDNA脱メチル化とトランスポゾンの活性化を促す因子で、トランスポゾンの進化の観点からもエピジェネティック制御因子としての観点からも興味深い。本研究が示した脱抑制機構の進化およびホストとの拮抗的制御関係、ゲノム進化に脱抑制という新しい視点をもたらしたと考えられる。また、スクリーニングにより脱抑制機構に関わる候補が多数得られており、その機能解明は新規エピジェネティック制御機構の発見にも繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）： VANDAL21 is unique transposable elements (TEs) which have anti-silencing system. Anti-silencing factor VANC21, which is encoded within VANDAL21, binds to noncoding regions of VANDAL21, and induces DNA demethylation and transcriptional activation. This sequence-specific anti-silencing system would contribute to the proliferation of VANDAL21 with minimizing damage to the host epigenome. However, the underlying molecular mechanism is elusive.

I carried out forward genetic screening of factors involved in VANC21-mediated anti-silencing system, and obtained some candidates of mutants. In addition, I also analyzed the evolution of VANC-mediated anti-silencing system and the molecular basis of the epigenetic conflict between host and TEs.

研究分野：遺伝学

キーワード：トランスポゾン DNAメチル化 脱抑制機構

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン(Transposon)は真核生物のゲノムに広く存在する転移配列である。トランスポゾンは遺伝子の新規機能獲得やゲノムの拡大をもたらすなど、進化の原動力として機能する一方で、ゲノム中を転移する性質から潜在的な危険性を併せ持っている。多くの真核生物で、トランスポゾンはエピジェネティックな修飾機構により抑制されているが、いくつかのトランスポゾンはホストによる抑制を打破する機構を獲得して、軍拡競争にも例えられる進化を繰り返している。しかし、ホストによる抑制機構についてはさまざまな生物種で解析が進められているのに対し、トランスポゾンがそれに抗う機構についてはほとんど分かっていない。

シロイヌナズナのトランスポゾン VANDAL21 がコードする VANC21 は、同じサブファミリーに属する近縁のトランスポゾンを配列特異的に活性化させる脱抑制機能を持つ。これまでに、脱抑制機能を持つ VANC21 と VANC6 が同定されており、それぞれがサブファミリー特異的に機能することが示されている(Fu et al. 2013, Hosaka et al. 2017)。この脱抑制機能は、ホストのエピゲノムに対する影響を最小限にしつつ、自身の転移を可能にするシステムであると考えられ、ゲノム進化の観点からも興味深い、その分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究は、順遺伝学的スクリーニングにより VANC21 による脱抑制機能に必要な因子を探索し、その作用機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

トランスポゾンが持つ脱抑制機構の解明を目指し、DNA メチル化を指標とした順遺伝学的スクリーニングシステムを構築した。まず、VANC21 を発現させた系統に対し、EMS 処理により突然変異を誘発させ、M2 集団を作成した。VANC21 を導入した系統では、VANC21 の機能により VANDAL21 の DNA メチル化が低下するが、このスクリーニングでは、脱抑制に関わる因子に変異が入り、メチル化の低下が見られなくなるものを選抜した。DNA メチル化の評価は、DNA メチル化感受性制限酵素を処理したゲノム DNA を鋳型とした PCR により行なった。

また、スクリーニングの効率を高めるために、表現型によるスクリーニングの系を構築した(図 1)。新規に構築した系では、VANDAL21 内部にカナマイシン耐性遺伝子を入れたレポーターと、VANC21 の両方を入れた系統を作成した。この系統は、カナマイシンを含む培地で生育させても正常に根を伸長させるが、脱抑制が働かなくなり、VANDAL21 内部に入れたカナマイシン

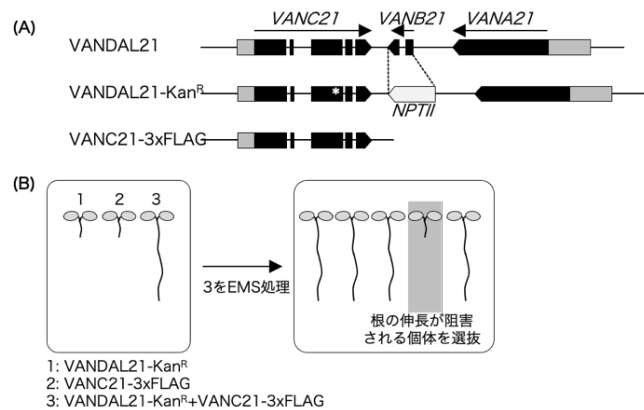


図1. 根の伸長を指標とした順遺伝学的スクリーニング

(A)スクリーニングに用いた組換え遺伝子。VANDAL21-Kan^Rは、VANC21 をカナマイシン耐性遺伝子(NPTII)と置き換え、VANC21 遺伝子には機能欠損をもたらす変異(*)を導入している。VANC21-3xFLAGは、VANC21のC末端側にFLAGタグを付加したものである。(B)各組換え体を、カナマイシンを含む培地で生育させた時の表現型。VANDAL21-Kan^RとVANC21-3xFLAGの両方を持つ個体は、脱抑制によりNPTIIの発現が活性化し、カナマイシンを含む培地でも根を伸長させることができる。スクリーニングでは、VANDAL21-Kan^RとVANC21-3xFLAGの両方を持つ個体に対してEMS処理をし、カナマイシン培地上で根の伸長が阻害される個体を選抜した。

耐性遺伝子がサイレンシングされると根の伸長が阻害される。この系統に対して突然変異を誘導し、根の伸長が阻害される個体を選抜した。

4. 研究成果

新たに構築した根の伸長によるスクリーニングシステムは、表現型で選抜を行えることから、スクリーニングの効率を大幅に向上させることに貢献した。DNAメチル化および根の伸長を指標としたスクリーニングから、それぞれ複数の変異体候補を得た。得られた変異体候補については、自殖した後代での表現型の確認を行い、安定した表現型を示すものについてはマッピングの準備を進めている。原因遺伝子を同定し、機能を解明することで、脱抑制の分子機構の解明に迫れると期待している。

上記の結果に加えて、VANDALの脱抑制機構の進化と、トランスポゾンと宿主との拮抗関係の分子的背景の解析も同時に進めた。脱抑制機構の進化については、パリ・サクレー大学のLeandro Quadrana博士との共同研究により、シロイヌナズナが持つ脱抑制機構を網羅的に同定し、VANDALファミリーのトランスポゾンで祖先型であると考えられるVANDAL1が持つVANC1にも脱抑制能があることを示した。また、植物のゲノム情報を比較することで、VANCによる脱抑制機構が、真正双子葉類で獲得され、さらにアブラナ科においてVANCタンパク質が持つドメインの置換が起きたことを明らかにした(Sasaki et al. 2022)。この成果は、シロイヌナズナにおける脱抑制機構の研究を進める上で、遺伝的基盤となる情報をもたらしたと考えられる。

トランスポゾンと宿主の間でのエピジェネティックな拮抗関係については、遺伝学的解析からVANCの不活性化に植物の*de novo*メチル化機構であるRdDM(RNA-directed DNA methylation)が関与していることを示した。ゲノムワイドなDNAメチル化解析から、VANCとRdDMがともにVANDALの非コード領域を標的とし、それぞれ脱抑制と抑制という正反対の制御を行なっていることを明らかにした(図2、Sasaki et al. 2023)。また、VANDAL配列のCGサイトのメチル化が、RdDMを標的配列に誘導する際のマークになっていることも示した。以上の結果は、VANDALがRdDMからの抑制を回避するようなかたちで進化してきたことを示唆している。

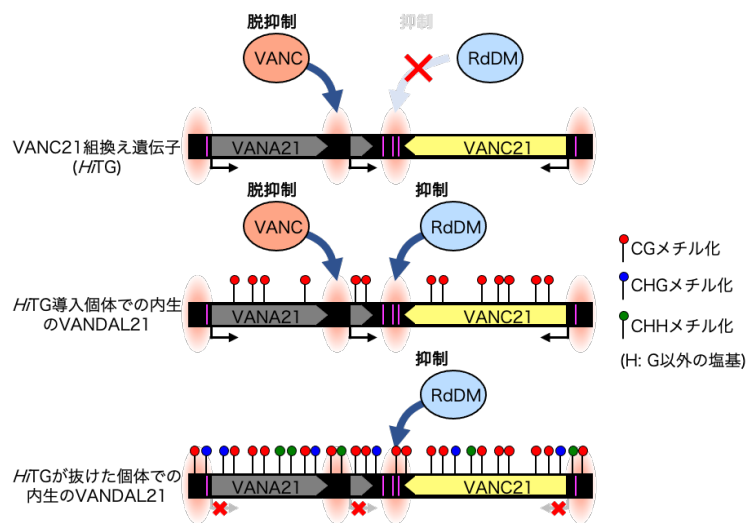


図2. VANCとRdDMのエピジェネティックな拮抗関係

VANC21を導入した個体(H1TG)では、組換え遺伝子自体(上)および内生のVANDAL21(中)はともに活性化され、RdDMによる不活性化は受けない。また、両者のDNAメチル化状態は異なり、組換え遺伝子はCGメチル化されていないが内生のVANDAL21はCGメチル化されている。自殖後代でH1TGが抜けた個体(下)では、RdDMにより非コード領域がメチル化され、VANDAL21は不活性化される。

参考文献

Fu et al. (2013) *EMBO J*, 32: 2407-2417

Hosaka et al. (2017) *Nat Commun*, 8: 2161

Sasaki et al. (2022) *EMBO J*, 41: e110070

Sasaki et al. (2023) *EMBO Rep*, in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Taku, Ro Kyudo, Caillieux Erwann, Manabe Riku, Bohl Viallefond Gregoire, Baduel Pierre, Colot Vincent, Kakutani Tetsuji, Quadrana Leandro	4. 巻 41
2. 論文標題 Fast co evolution of anti silencing systems shapes the invasiveness of Mu like DNA transposons in eudicots	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e110070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2021110070	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 Sasaki T, Kato K, Hosaka A, Fu Y, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Arms race between anti-silencing and RdDM in noncoding regions of transposable elements	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202256678	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sasaki T, Ro K, Manabe R, Caillieux E, Bohl G, Kramdi A, Benchouaia M, Colot V, Kakutani T, Quadrana L
2. 発表標題 Fighting back epigenetic silencing: The discovery and character of multiple transposon-encoded anti-silencing systems in Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 EMBO workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木卓
2. 発表標題 植物のエピジェネティクス -その基礎と園芸植物への応用の可能性-
3. 学会等名 園芸学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木卓、加藤夏絵、樽谷芳明、角谷徹仁
2. 発表標題 シロイヌナズナのトランスポゾンVANDAL21の活性制御におけるRNAiと抗抑制因子の拮抗的制御
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木卓
2. 発表標題 VANDAL21の活性制御と進化的軍拡競争
3. 学会等名 2018年度遺伝研研究会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木卓、盧達都、真鍋陸、角谷徹仁
2. 発表標題 VANDALトランスポゾンの脱抑制機構の進化
3. 学会等名 第94回日本遺伝学会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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	CNRS			