

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19380004

研究課題名（和文） 全ゲノムタイリングアレイを利用した生殖系列特異的な DNA メチル化パターンの解明

研究課題名（英文） Analysis of DNA methylation in the reproductive cells using a tiling array

研究代表者

中園 幹生（NAKAZONO MIKIO）

東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70282697

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、LMD 法によりイネの生殖系列の組織を単離し、全ゲノムタイリングアレイを利用して、メチル化 DNA のパターンの異なる領域をゲノムワイドに調査するというものである。まずイネの各組織より全 DNA を抽出し、bisulfite 処理を行い、条件検討を行った。DNA 量が多い場合には bisulfite 処理はうまくいったが、LMD を用いて単離した微量な DNA を用いた場合には、シトシンの変換が観察されなかった。結局、微量な DNA を鋳型にする場合の bisulfite 処理の最適条件を見つけ出すに至らなかった。今後、bisulfite 処理の条件検討を継続して、これらの問題の解決を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this research, we tried to investigate DNA methylation pattern in laser microdissection (LMD)-isolated embryo and endosperm by a tiling array. We examined optimal conditions for bisulfite sequencing using total DNA extracted from some tissues in rice. We succeeded in the bisulfite sequencing when we used enough amounts of DNA, but failed in the sequencing using small amounts of DNA extracted from the LMD isolated tissues. As a result, we did not succeed in solution of this problem, and thus were not able to carry out the tiling array. We are continuing to examine the optimal conditions for the bisulfite sequencing using small amounts of DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：植物分子遺伝学、植物分子生物学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：レーザーマイクロダイセクション、DNA メチレーション

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、胚発生過程で DNA メチル化のゲノムワイドなリプログラミングが起こり、組織・器官分化の過程では特定の遺伝子

領域における DNA のメチル化や脱メチル化がダイナミックに起きていることが知られている。一方で、植物では、生殖過程でのダイナミックな DNA メチル化／脱メチル化の変化

が重要であることは、ゲノムインプリンティングなど限られた例が明らかになっているのみで、その全容はよく分かっていなかった。この原因として、受精卵の培養が極めて難しいことや、ゲノムワイドな解析手法の遅れが挙げられた。さらに植物では、雑種強勢・雑種弱勢や異質倍数体化にDNAメチル化などのエピジェネティックな情報の変化が関わることが明らかになりつつあり、植物進化との関連が議論されていた。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」のような状況の中、生殖系列や胚発生過程でのゲノムワイドなDNAメチル化の変化を解析し、エピジェネティックな制御を受ける遺伝子を多数同定することは必要不可欠であると考えられた。

研究代表者は微小な植物組織を精度良く単離するLaser Microdissection (LMD)の技術を開発した一人であり、当研究室ではLMD技術がすでに確立されていた。DNAメチル化のパターンの異なる領域を網羅的に同定するためには、ハイスループットかつゲノムワイドな解析ができる全ゲノムタイリングアレイの技術が有用であると考えられた。本研究では、イネを材料とすることで育種上の様々な課題（雑種強勢・雑種弱勢）の解決のための基盤を整備することにもアプローチできると考えた。

本研究課題では、LMDの技術により、イネの生殖系列細胞・組織を単離後、全ゲノムタイリングアレイを利用して、メチル化DNAのパターンの異なる領域をゲノムワイドに調査することによって、生殖系列特異的なDNAメチル化/脱メチル化の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

イネの葉や開花後7日目の胚乳より全DNAを抽出した。さらに、開花後7日目の胚乳については、LMDを用いて胚乳の中央の組織も単離し、全DNAを抽出した。これらのDNAを用いて、様々な濃度でbisulfite処理をした。bisulfite法によって、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは変換されないため、メチル化シトシンと非メチル化シトシンを区別することができるので、メチル化DNAのパターンの異なる領域に塩基配列の多型を生じさせる。塩基配列を調査する対象として、イネのインプリント遺伝子として知られている *FIE1* 遺伝子領域

に着目した。微量なDNAでも、bisulfite法によるDNAメチル化領域の検出ができるかどうかの確認をした。

4. 研究成果

LMDで単離した微量DNAを用いてタイリングアレイを行い、メチル化DNA領域をゲノムワイドに同定したという報告はまだなされていなかった。そこで、パイロット研究として、イネの葉、開花後7日目の胚乳全体、および開花後7日目の胚乳をLMDで単離したものの(図1)を材料として用いた。

A. LMD前の胚乳の切片



B. LMDによる切断後の胚乳の切片

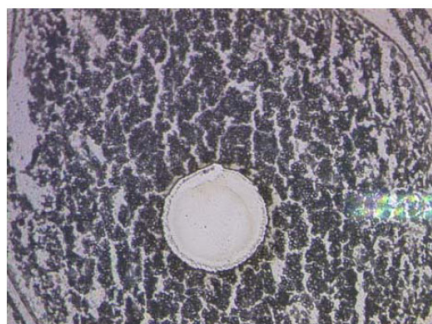


図1. 開花後7日目のイネの胚乳の切片.
A. LMDを行う前の胚乳の切片. B. LMDによって胚乳の中央組織を切断後の胚乳の切片.

それぞれの組織より全DNAを抽出して、bisulfite処理を行い、イネの *FIE1* 遺伝子領域において、DNAメチル化された塩基配列を検出できるかどうかを調査した。

DNA量が多い場合にはbisulfite処理は比較的うまくいった(図2)が、LMDを用いて単離した微量なDNAを鋳型としてbisulfite処理を行ったところ、DNAが少なかったためかPCRによってうまく増幅しなかった。また、何とか増幅産物を得た場

合も、bisulfite 処理による非メチル化シトシンからウラシルへの変換が観察されなかった。結局、微量な DNA を鋳型にする場合の bisulfite 処理の最適条件を見つげ出すに至らなかった。その結果、全ゲノムタイピングアレイを行うことができなかった。今後も bisulfite 処理の条件検討を継続して、これらの問題の解決を目指す。



図 2. Bisulfite sequencing の結果。

イネ *FIE1* 遺伝子領域の塩基配列。DNA メチル化された塩基配列と DNA メチル化されていない塩基配列の部分で多型が生じている。

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 14 件)

- (1) Ishimaru, T., M. Nakazono, T. Masumura, M. Abiko, Y. San-oh, N. K. Nishizawa and M. Kondo: A method for obtaining high integrity RNA from developing aleurone cells and starchy endosperm in rice (*Oryza sativa* L.) by laser microdissection. **Plant Sci.**, 173: 321-326 (2007)
- (2) Yan, H., H. Saika, M. Maekawa, I. Takamura, N. Tsutsumi, J. Kozuka and M. Nakazono: Rice tillering dwarf mutant *dwarf3* has increased leaf longevity during darkness-induced senescence or hydrogen peroxide-induced cell death. **Genes Genet. Syst.**, 82: 361-366 (2007)
- (3) Saika, H., M. Okamoto, K. Miyoshi, T. Kushiro, S. Shinoda, Y. Jikumaru, M. Fujimoto, T. Arikawa, H. Takahashi, M. Ando, S. Arimura, A. Miyao, H. Hirochika, Y. Kamiya, N. Tsutsumi, E. Nambara and M. Nakazono: Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. **Plant Cell Physiol.**, 48: 287-298 (2007)
- (4) Ohtsu, K., H. Takahashi, P.S. Schnable and M. Nakazono: Cell type-specific gene expression profiling in plants by using a combination of laser microdissection and high-throughput technologies. **Plant Cell Physiol.**, 48: 3-7 (2007)
- (5) Hobo, T., K. Suwabe, K. Aya, G. Suzuki, K. Yano, T. Ishimizu, M. Fujita, S. Kikuchi, K. Hamada, M. Miyano, T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, Y. Mizuta, H. Takahashi, K. Shiono, M. Nakazono, N. Tsutsumi, Y. Nagamura, N. Kurata, M. Watanabe and M. Matsuoka: Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. **Plant Cell Physiol.**, 49: 1417-1428 (2008)
- (6) Suwabe, K., G. Suzuki, H. Takahashi, K. Shiono, M. Endo, K. Yano, M. Fujita, H. Masuko, H. Saito, T. Fujioka, F. Kaneko, T. Kazama, Y. Mizuta, M. Kawagishi-Kobayashi, N. Tsutsumi, N. Kurata, M. Nakazono and M. Watanabe: Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. **Plant Cell Physiol.**, 49: 1407-1416 (2008)
- (7) Fujimoto, M., S. Arimura, M. Nakazono and N. Tsutsumi: *Arabidopsis* dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. **Plant Cell Rep.**, 27: 1581-1586 (2008)
- (8) Endo, A., Y. Sawada, H. Takahashi, M. Okamoto, K. Ikegami, H. Koiwai, M. Seo, T. Toyomasu, W. Mitsuhashi, K. Shinozaki, M. Nakazono, Y. Kamiya, T. Koshiba and E. Nambara: Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. **Plant Physiol.**, 147: 1984-1993 (2008)
- (9) Arimura, S., M. Fujimoto, Y. Doniwa, N. Kadoya, M. Nakazono, W. Sakamoto and N. Tsutsumi: *Arabidopsis* ELM1 is required for the localization of dynamin-related protein DRP3A to mitochondrial fission sites. **Plant Cell**, 20: 1555-1566 (2008)
- (10) Shiono, K., H. Takahashi, T.D. Colmer

and M. Nakazono: Role of ethylene in acclimations to promote oxygen transport in roots of plants in waterlogged soils. **Plant Sci.**, 175: 52-58 (2008)

- (11) Ishimaru, T., A.K. Horigane, M. Ida, N. Iwasawa, Y.A. San-oh, M. Nakazono, N.K. Nishizawa, T. Masumura, M. Kondo and M. Yoshida: Formation of grain chalkiness and changes in water distribution in developing rice caryopses grown under high-temperature stress. **J. Cereal Sci.**, 50: 166-174 (2009)
- (12) Fujimoto, M., S. Arimura, S. Mano, M. Kondo, C. Saito, T. Ueda, M. Nakazono, A. Nakano, M. Nishimura and T. Tsutsumi: Arabidopsis dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission but have distinct roles in peroxisomal fission. **Plant J.**, 58: 388-400 (2009)
- (13) Okamoto, S., E. Ohnishi, S. Sato, H. Takahashi, M. Nakazono, S. Tabata and M. Kawaguchi: Nod factor, nitrate-induced *CLE* genes that drive systemic regulation of nodulation. **Plant Cell Physiol.**, 50: 67-77 (2009)
- (14) Inoue, H., T. Kobayashi, T. Nozoye, M. Takahashi, Y. Kakei, K. Suzuki, M. Nakazono, H. Nakanishi, S. Mori and N.K. Nishizawa: Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. **J. Biol. Chem.**, 284: 3470-3479 (2009)

[学会発表] (計5件)

- (1) 高橋宏和、塩野克宏、長村吉晃、堤伸浩、中園幹生: イネの湛水条件下における養水分吸収機構の動態. 第113回日本育種学会講演会. 2008. 3. 28-29. 川崎.
- (2) 中園幹生: レーザーマイクロダイセクションを植物生理学に応用する. 第50回日本植物生理学会年会. 2009. 3. 21-24. 名古屋.
- (3) 高橋宏和、雑賀啓明、松村英生、長村吉晃、西澤直子、堤伸浩、中園幹生: イネ *reduced adh activity (rad)* 変異体の子葉鞘における細胞分裂・伸長の抑制. 第115回日本育種学会講演会. 2009. 3. 27-28. つくば.

(4) Hirokazu Takahashi, Hiroaki Saika, Hideo Matsumura, Yoshiaki Nagamura, Naoko K. Nishizawa, Nobuhiro Tsutsumi and Mikio Nakazono: Suppression of cell division and elongation in coleoptiles of rice reduced adh activity (*rad*) mutant. Plant Biology 2009. 2009. 7. 18-22. Hawaii, USA.

(5) Mikio Nakazono, Imene Rajhi, Hirokazu Takahashi, Katsuhiko Shiono, Kazuhiro Ohtsu, Nobuhiro Tsutsumi, Tieming Ji, Daniel S. Nettleton, Patrick S. Schnable, Naoko K. Nishizawa: Identification of genes expressed during aerenchyma formation in maize roots using laser microdissection and a microarray. 7th ISRR Symposium. 2009. 9. 2-4. Vienna, Austria.

[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] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中園幹生 (NAKAZONO MIKIO)
東京大学大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 70282697

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

堤伸浩 (TSUTSUMI NOBUHIRO)
東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 00202185

木下哲 (KINOSHITA TETSU)
奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・准教授
研究者番号: 60342630

石丸努 (ISHIMARU TSUTOMU)
独立行政法人農業食品産業技術総合研究機構・作物研究所・研究員
研究者番号: 40414635