

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05974

研究課題名(和文) イネの多様なエピジェネティック制御を司るDNA脱メチル化酵素の分子機構の理解

研究課題名(英文) Understanding the molecular mechanisms behind the multiple layers of epigenetic regulation by DNA demethylases in rice.

研究代表者

小野 明美 (Ono, Akemi)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：90732826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネのもつ6つのDNA脱メチル化酵素の特異性を支える分子機構を解明していくための解析を試みた。その中で、DNA脱メチル化酵素の基質として考えられるイネゲノム中のトランスポゾンの発現が、胚乳発生に伴ってダイナミックかつユニークな変動を示すことを明らかにした。それぞれの酵素の変異体では、その変動に相違があることが示唆された。またDNA脱メチル化酵素と相互作用する因子を生化学等の方法により明らかにしていくために、tag付きDNA脱メチル化酵素を発現したイネを作出し解析に着手した。得られた成果の一部は、論文投稿、学会発表により報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚乳は胚の生育を支える栄養を供給するとともに、穀類においては農業形質を決める重要な組織である。また種間・倍数体間交雑における生殖隔離の場でもあり、進化的な役割も大きい。このような胚乳の多様な役割の背景には、エピジェネティックな制御が不可欠であるがその分子機構の理解は限られている。分子機構の解明に直接関わる成果とともに、エピジェネティック修飾をはじめとする胚乳発生に伴う様々な情報の蓄積、ゲノムワイドシーケンスや生化学実験等における方法論の確立・改良、変異体やタグ付きタンパク発現イネなどの実験材料の拡充といった成果も含めて、胚乳の成り立ちや役割の理解、育種への利用へと貢献することを期待している。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms that specify the function of rice DNA demethylases, I performed the genomic and biochemical approaches. I found that transposons, which would be the targets of DNA demethylases, in rice genome, dynamically expressed during the rice endosperm development. In the DNA demethylases mutants, the expression patterns of transposons were changed, and the differences of the expression patterns varied between mutants. Meanwhile, I designed the constructions which express DNA demethylases with FLAG/HA tag and produced transgenic rice plants expressing each DNA demethylase with tag. I started biochemical analysis to explore the factors which interact with the rice DNA demethylases.

研究分野：植物分子遺伝育種

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 DNA脱メチル化酵素 胚乳発生 トランスポゾン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストンの可逆的な修飾に基づくエピジェネティックなゲノム制御は、DNA の塩基配列に基づくジェネティックな制御とともに多様な生物現象を支える。エピジェネティックなゲノム修飾は、DNA の複製を越えて適正に保たれ続けることが生物の営みにおいては不可欠である。

種子植物の胚乳は、重複受精によって生じる組織である。胚の発生に必要な栄養を蓄積、供給するとともに、農作物として栄養を蓄える組織でもあり、その発生にはゲノムインプリンティングや生殖隔離などの多様な現象が関わる。胚乳はまた、積極的な脱メチル化により他の組織に比べて DNA メチル化が低いことなど、特徴的なエピジェネティック修飾の様子を示すことが知られている (Park *et al.*, PNAS 2016)。この特徴的なエピジェネティック制御が、胚乳の発生や交雑の可否に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、その分子機構の理解は非常に限定的である。胚乳の特徴的な低メチル化を担うと考えられる DNA 脱メチル化酵素に関しては、主な研究材料である *A. thaliana* の 4 つの酵素が組織特異的発現により棲み分ける傾向があることから、それぞれの酵素の詳細な機能の違いが論じられる機会は、研究開始当初にはことさら限られていた (Zhu *et al.*, Annu Rev Genet 2009, Gong and Zhu, Cell Res 2011, Ikeda *et al.*, Dev Cell 2011, Martinez-Macias *et al.*, Mol Cell 2012, Qian *et al.*, Science 2012)。一方、報告の数は少ないもののイネの DNA 脱メチル化酵素については、それぞれの酵素の作用の相違を示唆する報告があったが、その比較解析や、分子機構の解明に踏み込んだ状況にはなかった (La *et al.*, PNAS 2011, Liu *et al.*, PNAS 2018)。そこでイネを材料に、DNA 脱メチル化酵素の特異性に着目し、その分子基盤を明らかにしていくことを通して、多様なエピジェネティック制御の一端を理解することを計画した。

### 2. 研究の目的

イネは 6 つの DNA 脱メチル化酵素を、どのように使い分けているのか？その背景にある分子機構を明らかにしていくことを通して、イネの胚乳で展開する多様なエピジェネティックな制御の仕組みを理解していくことを目的としている。その延長として、エピジェネティック制御に関わる現象を育種に利用していく際の、分子生物学的な裏付けを提供できればと考えている。

### 3. 研究の方法

イネゲノムにコードされる 6 つの DNA 脱メチル化酵素の特異性を決める分子機構を明らかにしていくために、新規基質やゲノム環境を含めた基質特異性と、相互作用因子に着目し、3 つのアプローチ方法を軸として解析を進めた。

(1) 基質および周辺ゲノム環境の特異性の精査：トランスポゾンアレイを用いて、胚乳発生における継時的な発現解析を野生型と各酵素の変異体について行った。DNA 脱メチル化のターゲットとして考えられているトランスポゾンの発現変動を比較解析することで、ターゲットの推定を試みた。更に発現変動の見られるトランスポゾンのゲノム情報と遺伝子の発現変化の情報を得るために、ゲノムワイドな RNAseq を用いて発現の比較解析を行った。また、変異体での DNA メチル化の変化およびエピゲノム環境の比較解析のために、従来のパイサルファイト法あるいは改良型の EMseq により DNA メチル化解析を行った。さらに野生型を用いて、各種ヒストン修飾のゲノムワイドな情報を ChIPseq により集めた。

(2) 5-メチルシトシン(5mC)以外の新規基質塩基の探索：Pac Bioによるロングリードシーケンスを用いて、N<sup>6</sup>-メチルアデニン(6mA)の基質としての可能性について検討を試みた。

(3) DNA 脱メチル化酵素と相互作用する因子の検出：相互作用因子を免疫沈降(IP)を用いた生化学的解析により探索していくために、各 DNA 脱メチル化酵素にタグを付けた遺伝子を作成し形質転換イネを作成した。目的のタグ付きタンパク質それぞれの発現を検出・確認した。この形質転換イネを用いて、目的とするタンパク質の抽出方法の検討から、付加したタグに対する抗体による一連の IP 過程のための各種条件検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 通常、DNA メチル化によって転写・転移が抑制されているトランスポゾン、DNA メチル化が低下する胚乳ではその発現の抑制が解かれることが想定されている (Bartels *et al.*, *Int J Mol Sci* 2018)。この胚乳での DNA メチル化の低下に DNA 脱メチル化酵素が関与することが考えられることから、トランスポゾンの脱抑制の様子を比較解析することは DNA 脱メチル化酵素の特異性を明らかにしていく上での大きな手掛かりとなると考えられる。そこでまず、イネの胚乳発生過程におけるトランスポゾンの発現の様子を、大規模かつ継続的に捉えるために、トランス

ポゾンアレイを用いた発現解析を行った。その結果、イネの胚乳発生に伴って、イネゲノム中のトランスポゾンはダイナミックかつユニークな発現変動を示すことが明らかとなった。発現

変動パターンをクラスターに分類し、それぞれのクラスターに属するトランスポゾンファミリーを特定することができた (図 1)。また、イ

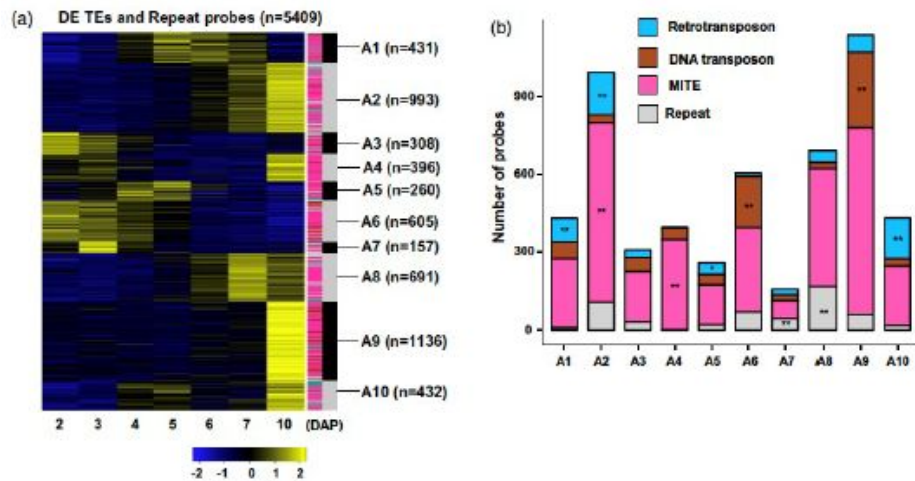


図1. イネ胚乳発生に伴うトランスポゾンの発現変動パターン分類 (a) とそれぞれのクラスターに属するトランスポゾンファミリーの分布 (b)。DE TE: 発現変動するトランスポゾン, DAP: Day after pollination (Nagata *et al.*, 2022 改変)

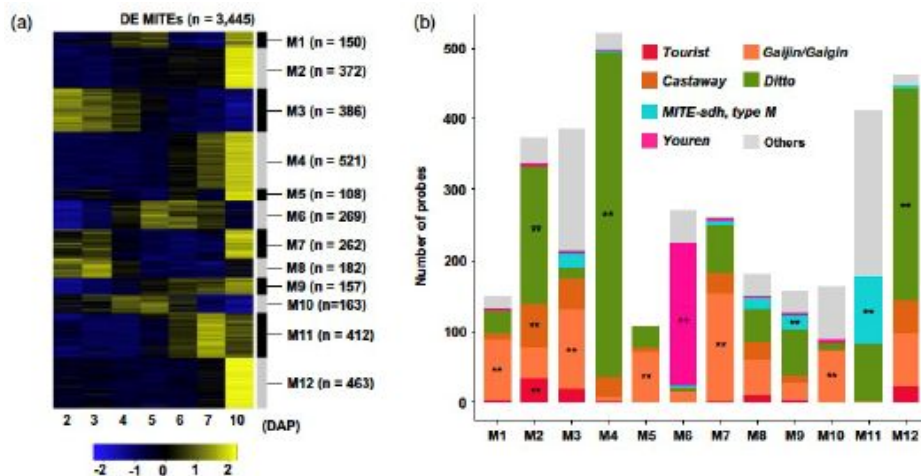


図2. イネ胚乳発生に伴うMITE ファミリーの発現変動パターン分類 (a) とそれぞれのクラスターに属するサブファミリーの分布 (b)。 (Nagata *et al.*, 2022 改変)

ネゲノム中に最も多く存在する MITE ファミリーについて更に、それぞれの発現パターンクラスターごとにサブファミリーの特定を行った(図2)。その中の1つ *Youren* は、イネゲノム中に散在する多コピーが揃って同様の発現パターンを示し、その発現パターンは *Youren* 配列中の特定の *cis* 因子に起因する制御であることが示唆された(図3)。これらの成果は論文として投稿した(Nagata *et al.*, Plant J 2022)。この解析方法および得られた情報を踏まえて、DNA 脱メチル化酵素の

変異体を用いて、同様の継時的なトランスポゾンの発現解析を行った。トランスポゾン発現変

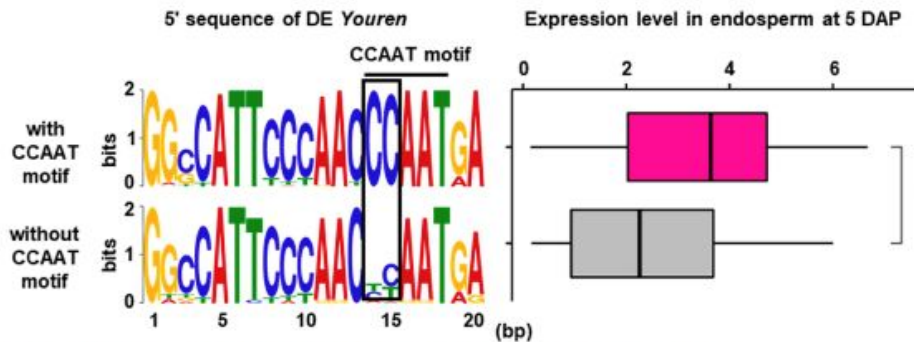


図3. *Youren*配列中の *cis* 因子 (CCAAT motif) に起因する発現量の上昇。(Nagata *et al.*, 2022 改変)

動の大規模な推移を野生型および変異体間で比較解析することで、DNA 脱メチル化酵素変異体特異的に発現変動する、あるいは、変異体間で共通に変動するものなど、注目すべきトランスポゾン群を抽出することができた。更にマイクロアレイによる解析では捉えられないゲノム中に散在する個々のトランスポゾンの発現情報を得るために RNAseq も行い、両者の情報の補填を行なった。これと並行して、イネゲノムにおける DNA メチル化への影響を捉えるために、変異体でのメチローム解析を行った。解析は発現解析の結果を踏まえ、変化の期待される時点で行った。比較解析に際して、ゲノムを広範囲にカバーし、より精度を高くメチロームを行うために、従来のバイサルファイトシーケンス法に加えて酵素反応を用いた EMseq を試み、その評価を行った。その結果、EMseq はイネゲノムをより広範囲かつ均一にカバーできることから、高精度なイネゲノムのメチロームが期待できることが明らかとなった。この成果は学会で口頭発表した(上地ら、日本育種学会 143 回講演会)。トランスポゾンアレイと RNAseq の情報を統合し、メチロームとともに比較解析・評価を行っている。更にはヒストン修飾の情報も加味し解析を進めている。

(2) Pac Bio を用いたロングリードシーケンスにより、6mA の検出を試みた。条件を変えて検討したが、精度のある検出に至らなかった。更なる解析条件等の改善が次回への課題である。

(3) DNA 脱メチル化酵素と相互作用する因子を探索するために、イネの 6 つの DNA 脱メチル化酵素の発現量や類似性等を考慮して、まず 3 つの酵素 OsROS1a, OsROS1d, OsDML3a を選んだ。それぞれの cDNA に生化学解析等に活用するためのタグとして FLAG, HA を付加した遺伝子をクローニングし、イネへの遺伝子導入、目的の遺伝子を持つイネを作成した。得られた形質転換イネからタンパク質を抽出し、目的とする FLAG, HA タグを付加したそれぞれの DNA 脱メチル化酵素が発現して

いることを確認した。それぞれの酵素について目的の



図4. 抗-FLAG抗体を用いた形質転換イネでの目的タンパク発現の検出。NC: negative control

タンパクを発現した形質転換イネを、複数ライン作出することができた(図4)。これらの FLAG, HA で標識された DNA 脱メチル化酵素を用いて、FLAG あるいは HA 抗体による IP などの生化学的手法により相互作用する因子をイネから抽出してくることを試みている。

これらを含む植物のライフサイクルにおけるエピジェネティクス研究の現状と展望について総説としてまとめ発表した (Ono and Kinoshita, Curr Opin Plant Biol 2021)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Hiroki Nagata, Akemi Ono, Kaoru Tonosaki, Taiji Kawakatsu, Yutaka Sato, Kentaro Yano, Yuji Kishima, Tetsu Kinoshita  | 4. 巻<br>109                   |
| 2. 論文標題<br>Temporal changes in transcripts of miniature inverted-repeat transposable elements during rice endosperm development  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>The Plant Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>1035-1047       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/tpj.15698   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Tonosaki Kaoru, Ono Akemi, Kunisada Megumi, Nishino Megumi, Nagata Hiroki, Sakamoto Shingo, Kijima Saku T, Furuumi Hiroyasu, Nonomura Ken-Ichi, Sato Yutaka, Ohme-Takagi Masaru, Endo Masaki, Comai Luca, Hatakeyama Katsunori, Kawakatsu Taiji, Kinoshita Tetsu | 4. 巻<br>33                    |
| 2. 論文標題<br>Mutation of the imprinted gene OsEMF2a induces autonomous endosperm development and delayed cellularization in rice   | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>The Plant Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>85-103          |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/plcell/koaa006  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Ono Akemi, Kinoshita Tetsu   | 4. 巻<br>61                    |
| 2. 論文標題<br>Epigenetics and plant reproduction: Multiple steps for responsibly handling succession  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Current Opinion in Plant Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>102032 ~ 102032 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.pbi.2021.102032   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>M. Yvonne Kim, Akemi Ono, Stefan Scholten, Tetsu Kinoshita, Daniel Zilberman, Takashi Okamoto, and Robert L. Fischer   | 4. 巻<br>116                   |
| 2. 論文標題<br>DNA demethylation by ROS1a in rice vegetative cells promotes methylation in sperm   | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Proc. Natl. Acad. Sci. USA   | 6. 最初と最後の頁<br>9652-9657       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1073/pnas.1821435116   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上地真子、浅井一希、殿崎薫、小野明美、木下哲               |
| 2. 発表標題<br>WGBSとEM-seqの比較 イネ胚乳におけるDNAメチル化解析に向けて |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会 第143回講演会 2023春季               |
| 4. 発表年<br>2023年                                 |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>矢口杏珠、丸岡博、小野明美、殿崎薫、遠藤真咲、木下哲 |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリア内膜に存在するOsATM3の解析    |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会 第143回講演会 2023春季     |
| 4. 発表年<br>2023年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>T. Kawakatsu, H. Nishida, H. Nagata, A. Ono, K. Tonosaki, T. Kinoshita               |
| 2. 発表標題<br>Unique heterochromatin landscape in the rice endosperm.                              |
| 3. 学会等名<br>The 2022 Cold Spring Harbor Asia Conference Integrative Epigenetics in Plants (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>K. Tonosaki, A. Ono, H. Furuumi, Y. Sato, T. Kawakatsu, T. Kinoshita                                |
| 2. 発表標題<br>Multiple-layers of epigenetic controls in the genomic imprinting during rice endosperm development. |
| 3. 学会等名<br>The 2022 Cold Spring Harbor Asia Conference Integrative Epigenetics in Plants (国際学会)                |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>永田博基, 小野明美, 殿崎薫, 川勝泰二, 木下哲                 |
| 2. 発表標題<br>イネ胚乳におけるMERMITE18Bトランスポゾンサブファミリーの転写と転写制御機構 |
| 3. 学会等名<br>日本分子生物学会 第44回年会 (MBSJ2021)                 |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>殿崎薫、小野明美、古海弘康、野々村賢一、佐藤豊、遠藤真咲、Luca Comai、畠山勝徳、川勝泰二、木下哲 |
| 2. 発表標題<br>イネ胚乳発生を制御するポリコーム複合体の標的遺伝子の同定                          |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会春季大会 (第139回講演会)                                 |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Megumi Nishino, Kaoru Tonosaki, Megumi Kunisada, Akemi Ono, Tetsu Kinoshita |
| 2. 発表標題<br>Functional analysis of OsEMF2a in rice endosperm development                |
| 3. 学会等名<br>17th International Symposium on Rice Functional Genomics (国際学会)             |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>丸岡博、小野明美、永田博基、遠藤真咲、三上雅史、木下哲    |
| 2. 発表標題<br>イネの鉄硫黄クラスター合成経路遺伝子OsATM3 の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会秋季大会 (第136回講演会)          |
| 4. 発表年<br>2019年                           |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>殿崎 薫、川勝 泰二、小野 明美、古海 弘康、野々村 賢一、Comai Luca、木下 哲 |
| 2. 発表標題<br>イネ種間雑種胚乳におけるインプリントーム解析                        |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会秋季大会（第136回講演会）                          |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>国定 愛美、殿崎 薫、西野 愛、小野 明美、木下 哲 |
| 2. 発表標題<br>自律的胚乳発生を示すOsEMF2aの形態学的解析   |
| 3. 学会等名<br>日本育種学会秋季大会（第136回講演会）       |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>永田博基、小野明美、福田友一、貴島祐治、矢野健太郎、木下哲 |
| 2. 発表標題<br>イネ胚、胚乳発生時におけるTEのサブクラス特異的な発現   |
| 3. 学会等名<br>第13回エビジェネティクス研究会年会            |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>浅井一希、小野明美、永田博基、福田友一、三上雅史、遠藤真咲、木下哲 |
| 2. 発表標題<br>イネにおけるDNA脱メチル化酵素変異体の解析            |
| 3. 学会等名<br>第13回エビジェネティクス研究会年会                |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|