

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23715

研究課題名（和文）植物Pol VのゲノムワイドなノンコーディングRNA転写メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study about genome-wide noncoding transcription by Pol V in plants

研究代表者

都筑 正行 (Tsuzuki, Masayuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：40845616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：トランスポゾン等の抑制にはたらく植物特異的なRNAポリメラーゼV (Pol V) のゲノムワイドな転写のメカニズムと役割を明らかにすべく研究を行った。転写物の網羅的同定およびゲノミクス解析からゲノムワイドな転写はDNAメチル化や小分子RNAの蓄積を伴わなかった。またDNAメチル化変異体におけるPol Vの転写動態から、Pol Vの転写とDNAメチル化の間に正のフィードバックが存在することを示唆された。これらの結果は、Pol Vのゲノムワイドな転写は通常抑制される領域からの転写が起きた際に備えてあらかじめ起きていること、新規DNAメチル化が小分子RNAの蓄積依存的に起きることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物の新規DNAメチル化機構についての大きな疑問点の1つである開始時のメカニズムについての新たな知見をもたらすものであり、当該分野において学術的に新規性の高い内容であると考えられる。また近年の網羅的なゲノミクス解析により、トランスポゾンの転移やDNAメチル化の多型が農作物の形質に影響を与えている例が数多く報告されていることから、DNAメチル化機構の解明は社会的にも重要性を備える。本研究ではこのDNAメチル化機構の解明の一端を成しており、農作物の品種改良等の応用面に向けた研究としても重要な成果を得たと考えている。

研究成果の概要（英文）：Plant-specific RNA polymerase V (Pol V) silences intergenic regions including transposable element (TE) by noncoding transcription. By genome-wide sequencing analysis and comparative genomics, it was revealed that the regions with genome-wide transcription does not have DNA methylation and small RNAs. Also, sequencing analysis with DNA methylation mutants suggests Pol V transcription is affected by DNA methylation. These data suggest that Pol V transcription occurs genome-widely to surveil the genome from the unexpected transcription and de novo DNA methylation is initiated by the accumulation of small RNAs derived from aberrant transcripts at de-silenced regions.

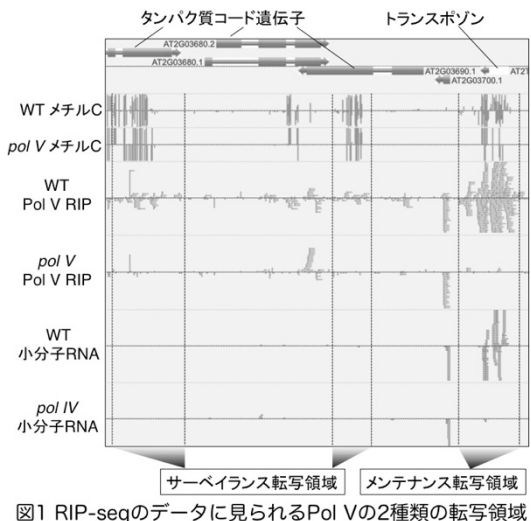
研究分野：植物遺伝子発現制御

キーワード：転写サイレンシング DNAメチル化 クロマチン RNAポリメラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の核内ゲノム DNA の中には、外来性のトランスポゾンやリピート配列などが存在しているが、これらの領域はクロマチン状態を安定化させるために、通常は発現を抑制されている。クロマチン状態の制御を行うシステムとして、RNA サイレンシングがある。クロマチン制御を行う RNA サイレンシング経路は、生物種によって多様化している。植物の持つ RNA 依存性 DNA メチル化経路 (RdDM)、分裂酵母の RNAi、動物の持つ piRNA 経路などがあるが、小分子 RNA と、RNA ポリメラーゼによって転写された長鎖 RNA が関わる点で共通している。



植物の RdDM 経路はトランスポゾンなど発現が抑制されるべき領域のシトシン DNA をメチル化する経路であるが、未だ解明されていない疑問の1つが、新規に DNA メチル化がどのような経路で開始されるかというものである。新規に DNA メチル化が起こるシチュエーションとして、トランスポゾンが新たに挿入された場合などが想定されるが、これまでの研究ではトランスポゾンなどに蓄積した DNA のメチル化をどのように維持するのかに焦点が当てられてきたため、その開始メカニズムは不明である。

RdDM 経路には、2種類の RNA ポリメラーゼ、Pol IV と Pol V が必須であることがわかっている。Pol IV は小分子 RNA の鋳型 RNA を転写し、Pol V は DNA メチル化酵素などの因子がはたらくための足場となる RNA を転写していると考えられている。申請者はこれまでに網羅的な Pol V 転写物の同定を行ない、Pol V は RdDM の標的領域に限らず、ゲノムワイドに多くの転写領域を持つことがわかってきた (図 1)。従来の RdDM 領域と比較すると、Pol V 転写物 RNA および Pol IV 依存性小分子 RNA の蓄積量が低く、遺伝子コード領域にも存在するという特徴がある。

2. 研究の目的

本研究では、この RdDM の標的以外の領域における Pol V の転写が、新規に DNA メチル化を付与する必要が起きた場合に、迅速に DNA メチル化経路を開始するための監視・見張りを行っていると仮定し、サーベイランス転写と呼ぶ (図 1)。また従来の DNA メチル化を維持するための転写をメンテナンステranscription と名付け区別することで、サーベイランス転写が DNA メチル化の開始に重要なかどうかを明らかにすること、そして実際の生体内でのサーベイランス転写の機能を明らかにすることを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

まず Pol V によるゲノムワイドなサーベイランス転写が、メンテナンステranscription と比較してどのような特徴を持っているのかを明らかにすべく、RNA 免疫沈降シーケンシング (RIP-seq) を改良した IPARE 法によって得た網羅的な Pol V 転写物のデータを用いて、ゲノミクス解析を行うことでサーベイランス転写の特徴を解析した。

次に Pol V の正常な転写に影響を与える可能性が考えられる因子の変異体植物を用いて、Pol V の転写物 RNA を IPARE によって網羅的に同定した。これにより、Pol V のサーベイランス転写、

およびメンテナンス転写に必要な因子を同定し、PoI V の転写動態が DNA メチル化の新規導入および維持するメカニズムを解析した。

またサーベイランス転写のもたらす植物体における役割を知る目的で、ヘアピン RNA の発現系や脱メチル化によるトランスポゾン誘導系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) PoI V の転写状態に応じてゲノム領域を認知バイアスの少ない方法で分類するため、統計的な手法である隠れマルコフモデルを用いて PoI V のメンテナンス転写領域およびサーベイランス転写領域を推定し、ゲノム領域を分類することができた。

(2) (1) によって分類したサーベイランス転写領域の特徴をゲノミクス解析により明らかにした。サーベイランス転写領域は、ゲノム領域の 20%以上を占め、メンテナンス領域と合わせると 50%近くに及んだ。このことから、PoI V による転写はこれまで考えられてきた DNA メチル化レベルの高い RdDM 標的領域に限らず、ゲノムワイドに起きていることが示唆された。

(3) サーベイランス領域の特徴をさらに詳細に解析し、DNA メチル化レベルが低いこと、小分子 RNA の蓄積が見られないことから、メンテナンス領域とは異なる性質を持つ領域であることがわかった。

(4) サーベイランス転写の機能を推定するため、DNA メチル化が起きない変異体植物である *ddm1* における DNA メチロームデータとの比較解析を行った。その結果、*ddm1* 変異体のサーベイランス領域では PoI V 依存的に DNA メチル化が起きることがわかった。このことからサーベイランス転写は DNA メチル化の消失など何らかの要因により通常転写が抑制された領域から転写物 RNA が蓄積した際に速やかに新規の DNA メチル化 (*de novo* RdDM) が誘導できるように備える役割を持つことが予測された。

(5) 続いて PoI V の DNA メチル化開始におけるメカニズムを明らかにすべく、PoI V の正常な転写に影響を与える可能性が考えられる因子の変異体植物を用いて IPARE を行なった。これまでの予備的な解析から、DNA メチル化変異体である *met1*、*cmt3*、*drm2* のそれぞれについて、一部の PoI V の標的領域における転写量に変動があることが示唆されていたが、PoI V の標的領域が複数のメチル化経路が冗長的にはたらく可能性などから、強い結論を得ることができていなかった。そこで新たに IPARE によってより高感度なシーケンスデータを得た後、先行研究によるメチローム解析のデータと組み合わせてゲノム領域を分類することでメチル化レベルの PoI V 転写への影響を詳細に解析した。その結果、すべてのシトシン背景での DNA メチル化が PoI V の転写に影響することが示唆され、DNA メチル化と PoI V の転写には正のフィードバックが存在することを裏付けるデータを得ることができた。これらの因子の PoI V の転写への関与は、トランスポゾン上とそれ以外のゲノムワイドな領域とでの大きな違いを検出することはできなかったことから、サーベイランス転写とメンテナンス転写の 2 つの転写メカニズムには大きな違いは現時点では観察できなかった。

(6) DNA メチル化誘導時のメカニズムを明らかにすべくヘアピン RNA による小分子 RNA 発現系および DNA 脱メチル化化合物によるトランスポゾン誘導系の確立を試みたが、条件検討の段階で植物体への重篤な影響を持つものが多いなどの原因から、系の確立には至らなかった。この点に関しては今後改良を重ねた解析を継続する必要がある。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuzuki Masayuki, Sethuraman Shriya, Coke Adriana N., Rothi M. Hafiz, Boyle Alan P., Wierzbicki Andrzej T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Broad noncoding transcription suggests genome surveillance by RNA polymerase V	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 30799 ~ 30804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2014419117	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 Tsuzuki Masayuki, Futagami Kazutaka, Shimamura Masaki, Inoue Chikako, Kunimoto Kan, Oogami Takashi, Tomita Yuki, Inoue Keisuke, Kohchi Takayuki, Yamaoka Shohei, Araki Takashi, Hamada Takahiro, Watanabe Yuichiro	4. 巻 29
2. 論文標題 An Early Arising Role of the MicroRNA156/529-SPL Module in Reproductive Development Revealed by the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3307 ~ 3314.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.07.084	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都筑正行, Shriya Sethuraman, Andrzej T. Wierzbicki
2. 発表標題 RNAポリメラーゼVによるゲノムワイドなノンコーディングRNAの転写
3. 学会等名 第8回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 都筑正行, Shriya Sethuraman, Andrzej T. Wierzbicki
2. 発表標題 RNA ポリメラーゼ V によるゲノムワイドなノンコーディング RNA の転写
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田ひかり, 都筑正行, Mario Arteaga-Vazquez, 渡邊雄一郎
2. 発表標題 ゼニゴケにおける RNA ポリメラーゼIV、Vの機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都筑 正行, Shriya Sethuraman, Andrzej T. Wierzbicki
2. 発表標題 RNAポリメラーゼVによるゲノムワイドなノンコーディングRNAの転写
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都筑 正行, Shriya Sethuraman, Adriana N. Coke, M. Hafiz Rothi, Alan P. Boyle, Andrzej T. Wierzbicki
2. 発表標題 RNAポリメラーゼVによる広範囲のノンコーディングRNA転写が示唆するゲノム安定性維持のメカニズム
3. 学会等名 第9回植物RNA研究者ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都筑正行
2. 発表標題 RNAポリメラーゼVによる広範囲のノンコーディング転写が示唆するゲノム安定性維持のメカニズム
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田ひかり, 都筑正行, 渡邊雄一郎
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるRNA ポリメラーゼIV、Vの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 都筑正行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 147
3. 書名 実験医学2020年6月号 News & Hot Paper Digest 離れた調節因子は植物に広く保存されている	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/m_tsuzuki 渡邊雄一郎研究室ホームページ個人ページ http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/RNAwatanabe/profile_3.html
--

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
---------	---------

米国	University of Michigan			
----	------------------------	--	--	--