

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22227001

研究課題名(和文) エピゲノム解析とエピ遺伝学による反復配列動態制御機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of repetitive sequences by epigenetic and epigenomic approaches

研究代表者

角谷 徹仁 (Kakutani, Tetsuji)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：20332174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 90,300,000円

研究成果の概要(和文)：抑制クロマチンの目印であるヒストンH3リジン9メチル化(H3K9me)を遺伝子から除くシロイヌナズナの酵素IBM1の効果をもつさまざまな変異体の背景でエピゲノム解析をすることにより調べた。その結果、この酵素は転写される配列から特異的にH3K9meを除き遺伝子と反復配列の分化に貢献することがわかった。また、DNA低メチル化状態で増殖するシロイヌナズナのトランスポゾンと配列の似たトランスポゾンをシロイヌナズナ近縁種で調べること、動原体に特異的に飛び込むトランスポゾンを見いだした。また、別の可動性トランスポゾンの挙動を調べることで新奇の抗抑制因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：By epigenomics approach using various mutants of *Arabidopsis thaliana*, we analyzed effects of mutation in the IBM1 gene, which encodes a protein removing H3K9 methylation, a mark of silent chromatin. The results showed that this enzyme removes H3K9 methylation from transcribed sequences, contributing to differentiation of active and inactive sequences. We also identified a transposon which targets to centromere, through analysis of a transposon of *Arabidopsis lyrata*, which shows sequence similarity to a mobile transposon of *Arabidopsis thaliana*. In addition, by characterizing another mobile transposon, we identified a novel anti-silencing factor encoded by the transposon.

研究分野：エピジェネティクス、植物遺伝学

キーワード：トランスポゾン DNAメチル化 クロマチン 進化

## 1. 研究開始当初の背景

塩基配列以外の形で遺伝子の ON/OFF 情報が分裂後の細胞に継承される「エピジェネティック」な制御は個体発生、老化、癌形成などとともに、染色体挙動やゲノム進化にも貢献し、反復配列がその主要な標的になりうる。私達はこれまで、シロイヌナズナの DNA 低メチル化突然変異体で誘発される発生異常を連鎖解析するという独自のアプローチで研究を進めてきた。シロイヌナズナの低メチル化突然変異 *ddm1* (decrease in DNA methylation) は、トランスポゾンの転移誘発や、世代を超えて継承される遺伝子発現の攪乱により、種々の発生異常を誘発する。また、遺伝子のメチル化を負に制御する因子 IBM1 (increase in BONSAI methylation 1) を同定し、この因子の関与する新奇経路の解析をはじめていた。

## 2. 研究の目的

以下の互いに密接に関連した2つの課題を目標とした。(i)「遺伝子から DNA メチル化を排除して反復配列と区別する機構の解明」および(ii)「全ゲノムレベルでのトランスポゾン動態の理解」

## 3. 研究の方法

(i)「遺伝子から DNA メチル化を排除して反復配列と区別する機構の解明」DNA メチル化はトランスポゾン抑制によってゲノム安定化に貢献する。一方、遺伝子をメチル化しないためには、*jmjC* タンパク質である IBM1 が必要である。ただし、このタンパク質がトランスポゾンと遺伝子とを区別する機構は未知である。この経路で正や負の方向に働く既知因子の変異体を用いた解析と、エピゲノム解析によって、この機構を理解する。また新たな変異体を選抜する。

(ii)「全ゲノムレベルでのトランスポゾン動態の理解」ゲノムレベルでトランスポゾンのコピー数と修飾を調べることによりトランスポゾンの動態を知る。またシロイヌナズナの変異体を用いることで分子機構を知る。さらに、野生系統や同属近縁種を用いることで、自然集団中でのトランスポゾンの挙動とゲノム進化を理解する。

## 4. 研究成果

(i)「遺伝子から DNA メチル化を排除して反復配列と区別する機構」構成的ヘテロクロマチンの目印であるヒストン H3 リジン9のメチル基 (H3K9me) を遺伝子から除去する酵素 IBM1 の効果をさまざまな遺伝背景で調べた。その結果、IBM1 は、転写される配列から特異的に H3K9me を除去することがわかった (Inagaki et al 2010 *EMBO J*)。これにもとづいて、2つの正のフィードバ

ックによって、遺伝子とトランスポゾンのクロマチン状態の分化が起こるというモデルを提案した。さらに、トランスポゾンと遺伝子の分化の最初のひきがねとして、両者での発現制御シス因子の分布の違いが重要であるというモデルを提案した (Inagaki and Kakutani 2013 *CSH Symp Quat Biol*)。さらに、IBM1 タンパク質のゲノム上での分布を調べたところ、上記のモデルを支持する結果が得られた (Hosaka 他、未発表)。

また、*ibm1* 変異体における発生異常をサプレッスする変異体を選抜したところ、H3K9メチル化酵素 KYP、DNA メチル化酵素 CMT3 および S アデノシルホモシステイン加水分解酵素 HOG1 の遺伝子変異体を得られた。これらは、遺伝子における DNA メチル化とヒストンメチル化を阻害することにより、*ibm1* の効果をサプレッスすると考えられる。これに加え、新奇因子の変異が *ibm1* の効果をサプレッスすることがわかった (Inagaki 他、未発表)。これらの結果についてはできるだけ早く論文にする予定である。

さらにゲノムワイドのヒストン修飾解析および RNA 解析から、*ibm1* 変異における発生異常を仲介する遺伝子の候補を絞り込んでいる。この結果もできるだけ早く論文にしたい。

(ii)「全ゲノムレベルでのトランスポゾン動態の理解」タイリングアレイを用いて、ゲノムレベルでのトランスポゾンのコピー数と修飾を調べることで、可動性のトランスポゾンを幾つかシロイヌナズナで同定している。

そのうちのひとつ *COPIA93* は、シロイヌナズナの近縁種 *A. lyrata* のゲノムでは動原体に局在する。この *A. lyrata* 因子を形質転換でシロイヌナズナに導入したところシロイヌナズナの動原体に特異的に挿入した (Tsukahara et al 2012 *Genes Dev*)。多くの生物で、動原体のまわりにはトランスポゾンが高密度で分布するが、動原体に特異的に挿入するトランスポゾンはこれまで見つかっていなかった。染色体の進化を考えるうえで強力な研究材料が得られたと考える。動原体配列は進化が早く、*thaliana* と *lyrata* の間でも配列は大きく異なる。それにもかかわらず *lyrata* の動原体トランスポゾン *Tal1* が *thaliana* の動原体を標的とすることから、このトランスポゾンは塩基配列でなく何らかのクロマチン情報を手がかりに動原体に飛び込むと推察される。

また、別の可動性トランスポゾン *VANDAL21* は、形質転換で活性のある因子を野生型に導入したところ、もとはサイレントだった内在因子の脱メチル化と転写活性化、および転移を引き起こした。興味深いことに、この効果はトランスポゼースとは別のタンパク質によるものだった (Fu et al 2013 *EMBO J*)。さらに興味深いことに、DNA 脱メチル化はトランスポゾン全長にわたり

おこり、かつ、*VANDAL21* サブファミリー内の因子だけに、非常に高い特異性で影響した。数 KB にわたる範囲に影響し、かつ、高い配列特異性を示す抗抑制の分子機構がたいへん興味深い。

このように(i) (ii) の課題とも、新奇のアンチサイレンシング機構の存在を示す結果を得た。本課題は、最終年度前年度にすでに当初想定した課題に答を出し、当初予想していなかった新たな研究素材を得たことから、最終年度前年度の応募として基盤研究 S 「抑制と抗抑制によるエピゲノム動態制御機構の解明」に切替える申請を行い、採択された。この切替えた課題では特に、*ibm1* 変異による発生異常誘発経路の解明と、*VANDAL* トランスポゾンのコードする新奇アンチサイレンシングの機構の解明を主要な課題としている。

#### 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)

Ito H, Kakutani T. (2014) Control of transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* 22, 217-23. 査読有

Fu Y, Kawabe A, Etcheverry M, Ito T, Toyoda A, Fujiyama A, Colot V, Tarutani Y, Kakutani T (2013) Mobilization of a plant transposon by expression of the transposon-encoded anti-silencing factor. *EMBO J.* 32, 2407-2417 査読有

Saze H, Kitayama J, Takashima K, Miura S, Harukawa Y, Ito T, Kakutani T (2013) Mechanism for full-length RNA processing of *Arabidopsis* genes containing intragenic heterochromatin. *Nature Commun* 4, 2301. 査読有

Inagaki S and Kakutani T (2013) What triggers differential DNA methylation in genes and TEs: contribution of body methylation? *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* Vol. 77, 155-160. 査読無

Tsukahara S, Kawabe A, Kobayashi A, Ito T, Aizu T, Shin-i T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T (2012) Centromere-targeted de novo integration of an LTR retrotransposon of *Arabidopsis lyrata*. *Genes Dev* 26, 705-713 査読有

Sasaki T, Kobayashi A, Saze H, Kakutani T. (2012) RNAi-independent de novo DNA methylation revealed in *Arabidopsis* mutants of chromatin remodeling gene DDM1. *Plant J.* 70: 750-8. 査読有

Ikeda Y, Kinoshita Y, Susaki D, Ikeda Y, Iwano M, Takayama S, Higashiyama T,

Kakutani T, Kinoshita T (2011) HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 21, 589-596. 査読有

Kawagoe T, Shimizu KK, Kakutani T, Kudoh H. (2011) Coexistence of trichome variation in a natural plant population: a combined study using ecological and candidate gene approaches. *PLoS One* 6, e22184 査読有

Saze H and Kakutani T (2011) Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. *Curr Opin Plant Biol* 14, 81-87. 査読無

To TK, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo T, Kakutani T, Toyoda T, Kimura H, Yokoyama S, Shinozaki K, Seki M. (2011) *Arabidopsis* HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genet.* 7:e1002055. 査読有

Fujimoto R, Sasaki T, Kudoh H, Taylor JM, Kakutani T, Dennis ES (2011) Epigenetic variation in the FWA gene within the genus *Arabidopsis*. *Plant J* 66, 831-843 査読有

Toyota M, Matsuda K, Kakutani T, Terao Morita M, Tasaka M (2011) Developmental changes in crossover frequency in *Arabidopsis*. *Plant J* 65, 589-599 査読有

Inagaki S, Kakutani T (2010) Control of genic DNA methylation in *Arabidopsis*. *J Plant Res* 123, 299-302 査読有

Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, Saze H, Kakutani T. (2010) Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the *Arabidopsis* genome. *EMBO J* 29, 3496-3506. 査読有

[学会発表](計 45 件)

Kakutani T. "DNA methylation and transposon dynamics in *Arabidopsis*" Symposium: "Evolution of Plant Phenotypes, from Genomes to Traits" (招待講演, 17 March 2015, Barcelona, Spain)

Kakutani T. "Epigenetic silencing and anti-silencing of TEs in *Arabidopsis*"

第 38 回内藤コンファレンス (招待講演, 2014 年 10 月 8 日, 北海道札幌市)

Kakutani T. "DNA methylation and TE dynamics" Symposium: Epigenetic regulation of organismal function and response to the environment (招待講演, 20 May 2014, Philadelphia, U.S.A.)

Kakutani, T. “ Genetics of DNA Methylation in Genes and Transposons in Arabidopsis ” 21<sup>st</sup> International Congress of Genetics (招待講演, 14 April 2013, Singapore)

Kakutani, T. "Genetics of DNA methylation in genes and trasposons in Arabidopsis ” Cold Spring Harbor Asia Meeting: Plant epigenetics, stress response and evolution (招待講演, 2 October 2012, Suzhou, China)

Kakutani, T. “Genetics of DNA methylation in genes and transposons ” The23rd International Conference on Arabidopsis Research (招待講演, 4 July 2012, Vienna, Austria)

Kakutani, T. “Genetics of DNA methylation in genes and transposons” The 77<sup>th</sup> Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: The Biology of Plants (招待講演, 2 June 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA)

Kakutani, T. “Genetics of DNA meethylation in genes and trasposons”Keystone Symposium on Nuclear Events in Plant Gene Expression and Signaling (招待講演, 8 March 2012, Taos, NM, USA)

Kakutani, T. “ Genetics of DNA methylation in genes and transposons Gordon Research Conference, Epigenetics (招待講演, 8 August 2011, Easton, U.S.A.)

Kakutani, T. “Genetics of DNA methylation in genes and transposons in Arabidopsis ” Cold Spring Harbor Asia meeting “ From Plant Biology or Crop Biotechnology ” (招待講演, 28 October 2010, Suzhou, China)

Kakutani, T. “Genetics of DNA methylation in genes and transposons in Arabidopsis ” International Conference of Arabidopsis Research (招待講演, 8 June 2010, 神奈川県横浜市)

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/AgrGen/home-j.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

角谷 徹仁 (KAKUTANI, Tetsuji)

国立遺伝学研究所

総合遺伝研究系、教授

研究者番号：20332174

### (2)研究分担者

(なし)

### (3)連携研究者

(なし)