

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月25日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657016

研究課題名（和文） シダ DNAi の機構解明と応用

研究課題名（英文） STUDY ON THE MECHANISM OF DNAi IN FERN AND ITS APPLICATION

研究代表者

和田 正三 (WADA MASAMITSU)

九州大学・大学院理学研究院・特任教授

研究者番号：60011681

研究成果の概要（和文）：シダに特徴的な、世代を超えて有効な DNA 断片による遺伝子サイレンシング (DNAi) 効果はヒストンの脱アセチル化によって起こり、脱アセチル化阻害剤によって遺伝子機能が回復することから、DNAi はヒストンの脱アセチル化によって誘導され、次世代に伝わることを示めされた。また DNAi の普遍性を証明するために、シロイヌナズナの葉緑体運動に必須な KAC のシダの相同遺伝子の DNAi を行った結果、葉緑体は細胞膜から離脱し、凝集を示した。この結果から、DNAi の有効性が他の遺伝子でも示された。

研究成果の概要（英文）：Gene silencing by DNA fragment of the *NEO1* gene (DNAi) is induced in fern by cytosine methylation and histon H3 deacetylation and recovered by a histone deacetylation inhibitor, indicating that DNAi is induced by histone deacetylation and transferred to the next generation. To show the effectiveness of DNAi in other genes, KAC gene that is indispensable in chloroplast movement in Arabidopsis was introduced. Chloroplasts came apart from the plasma membrane and aggregated. The results showed the DNAi effectiveness in other gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シダ、遺伝子機能、DNAi、サイレンシング、メチル化、ヒストン

1. 研究開始当初の背景

我々は長年に亘りシダ植物の生理反応、特に光形態形成現象を解析して来た (Wada 2008, 2009)。また二度に亘る大規模な EST (expressed sequence tags) 解析 (Yamauchi et al. 2005) によって、27,000 クローンの配列を得ており、その情報は近年生命科学系データベースアーカイブサービスにデータ

ベースとして寄託された。シダの遺伝子情報としては最大規模である。我々はシダにおける安定的な遺伝子導入法の開発を目指して多くの実験をしてきたが、その過程で、エクソン配列の一部を bombardment によってシダ配偶体細胞に導入すると、その遺伝子機能が押さえられることを発見した。RNA 干渉 (RNAi) に類似の現象として DNAi と命名した。

DNAi 誘導には cDNA でもゲノム DNA でも良く、500bp の長さでも十分効果があり、PCR で増幅した断片でも効果があることから、非常に簡便な遺伝子機能の解析法である。また世代を超えても有効な場合がある一方、効果が短期間で解消してしまう場合もある。

シダ植物は進化上、また種子植物に近縁の維管束植物として利用価値の高い遺伝子が多いにも関わらず、Agrobacterium やポリエチレングリコールによる安定的な遺伝子導入ができないために、上述の EST 情報の利用や、遺伝子の機能解析、変異体の原因遺伝子の解明など、遺伝子レベルでの解析が後れている。本研究の結果、DNAi のメカニズムが解明され、世代を超えて機能する場合と短期間の効果だけの場合の違いが判明すれば、どの遺伝子でも世代を超えて機能するようにできるかもしれない。それが可能になればその利用価値は計り知れない。

## 2. 研究の目的

近年の生物学研究は、ゲノムプロジェクトによる個々の生物種的全塩基配列の解読や、EST (expressed sequence tags) 情報の利用によって急速な発達を遂げた。特に RNAi による逆遺伝学的な遺伝子機能の解析は、ゲノム配列や EST 情報を効果的に利用する重要な技術である。しかしこれらの技術や情報は、限られた生物グループ、または種のレベルに留まっており、すべての生物種で可能な訳ではない。隠花植物と顕花植物を結ぶ進化学上非常に重要なグループであるシダ植物においても遺伝子操作はほとんど不可能である。また RNAi の効果は一般的には世代を超えることはない。本研究では、我々が発見した DNA 断片による遺伝子のサイレンシング機能：DNA 干渉 (DNAi) (Kawai-Toyooka et al. 2004) のメカニズムを明らかにし、DNAi 効果が世代を超える機構を解明することにより、応用技術としての確立を目指す。

## 3. 研究の方法

ハウライシダの配偶体を材料とし、機能既知の遺伝子 (neochrome1, phototropin, FtsZ など) の DNA 断片を polymerase chain reaction (PCR) 反応により増幅し、particle bombardment によってシダ前葉体に導入し、DNAi によるサイレンシングを誘導する。また neochrome に関しては、すでに数回の世代交代を越えて DNAi 効果が継続しているラインとして使用した。

ペチュニアやシロイヌナズナでは、プロモーター領域もしくはイントロンの領域を RNAi に用いると、小分子 RNA によるゲノム DNA のメチル化が起こり、転写が抑制され、その結果、遺伝子サイレンシングが起こる。さらに、その効果は世代を超える場合がある

ことが報告されている (Shibuya et al. 2009)。DNAi ではエクソン領域が使われているが、その効果は世代を超えて働く場合がある。この場合には DNAi によって目的遺伝子にメチル化がおきている可能性が高い。そこでメチル化したシトシンを特異的に認識し、DNA を切断する Nuclease (McrBC) とシトシンのメチル化感受性の制限酵素 (HpaII、HaeIII 等) で処理した後、PCR およびサザンブロット解析によって目的遺伝子領域のメチル化を確認した。DNA 断片を導入し、DNAi によりサイレンシングが起こったシダに DNA メチル化阻害剤 5-Azacytidine を添加し、DNAi 効果の消失の有無を調べた。詳細な目的遺伝子領域のメチル化プロファイルを作成するために、Bisulfite sequencing によって、目的遺伝子領域上でメチル化したシトシンを特定した。ChIP 解析により、目的遺伝子領域上のヒストンにメチル化、ユビキチン化等修飾の有無を調べた。

## 4. 研究成果

RNA 干渉 (RNAi) とよばれる遺伝子サイレンシング技術が遺伝子機能解析に広く利用されているが、我々はハウライシダでは DNA 断片によって RNAi 同様に目的遺伝子の発現抑制により遺伝子サイレンシングが起こることを発見した (DNAi) (Kawai-Toyooka et al. 2004)。赤色光で誘導される葉緑体光定位運動や光屈性に関わる光受容体遺伝子 *NEO1* の場合は DNAi 効果が次世代まで引き継がれる。RNAi ではヒストン修飾および DNA のメチル化が、遺伝子サイレンシングには重要な役割を果たしているため、*NEO1* 遺伝子を用いて、DNAi におけるヒストン修飾を Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)-PCR 法で調べた。その結果、下図のように DNAi によりサイレンシングされたシダでは、*NEO1* 遺伝子付近のヒストン H3 サブユニットの 9 番目のリジンが脱アセチル化しており、ヒストンの修飾も次世代に引き継がれていた。またヒストンの脱アセチル化阻害剤をサイレンシングされたシダに添加すると *NEO1* の遺伝子発現は回復し、DNAi の効果が打ち消された。しかしながら、DNA メチル化阻害剤による DNAi 効果の打ち消しは確認されなかった。従って、DNAi における遺伝子サイレンシング効果による表現型の発現は直接的にはヒストンの脱アセチル化によって引き起こされることが示され、DNA のメチル化は次世代に伝えるために必要であることが示唆された。また DNA のメチル化は particle bombardment 時に PCR 断片を導入したエクソン部分だけにとどまらず *NEO1* promoter 部分や PCR の領域に入っていなかったエクソンの配列についても起こっていることが示された。

ホウライシダに系統的に近いリチャードミズワラビの変異体には、細胞内の全ての葉緑体が一カ所に凝集するラインが得られている。同様な変異体はホウライシダでもSK変異体として多数得られている。我々は葉緑体運動に関わるKAC (kinesin-like protein for actin-based chloroplast movement 1) 遺伝子によるDNAiを行った結果、葉緑体は凝集して細胞内の一カ所に集る現象、すなわち従来得られているSK変異体と類似の分布を示した。そこで我々はホウライシダから過去に沢山単離したSK変異体の遺伝子解析を行った結果、全ての変異体において、KAC遺伝子に一部の欠損または変異が観察された。そこでさらに、シダ植物では系統的に古い系統であるカニクサからKAC遺伝子を得て、そのDNAiを行った結果、どれもがSK変異体と同じ表現型を示した。このことは恐らく、シダ植物配偶体の細胞によく観察されるSK型変異体は、ほとんどの場合、KAC遺伝子の欠損によることが分った。さらにホウライシダSK変異体の解析から、KAC遺伝子C末端側の欠損が長いほど、葉緑体の凝集が強いことが分った。現在論文の執筆中である。

さらに上記の実験結果からカニクサにおいても DNAi が誘導されることがわかったので、実際にカニクサにおいて DNAi を用いて遺伝子の機能解析を試みた。植物ホルモンであるジベレリン (GA) はカニクサにおいて造精器形成に関与していることが知られている。そこでジベレリンの受容体である *GAI* 遺

伝子の DNAi を行い、GA 応答が抑制され造精器形成が起きないかどうかを調べた。同時に、ホウライシダで知られているように情報が一つの細胞から前葉体全体へ伝わるか否かを調べるために葉緑体運動に関わる光受容体遺伝子 *PHOT2* と、精子形成抑制作用を調べるために褐藻の精子形成に関与する遺伝子 *CENTRIN* の DNAi を行った。その結果、*PHOT2* 遺伝子がサイレンシングされたことによる葉緑体逃避反応の消失が全前葉体細胞で観察された。また *GAI* および *CENTRIN* 遺伝子をサイレンシングさせたラインでは、共に GA<sub>3</sub> 投与による造精器の形成の促進はみられず、*GAI* 遺伝子が造精器の形成における GA の受容体であることが示された。以上の結果から DNAi はシダ植物ではかなり普遍的に起こる現象であることがわかり、機能解析に非常に有用な方法であることが示された。

なお、世代を越えて DNAi が起こる機構を明らかにした結果については、下記の表題の論文を投稿審査中である。

Epigenetic memory of DNAi mediated by cytosine methylation and histone modification in fern.

Keita Sutou, Hidenori Tsuboi, Masamitsu Wada

また、KAC の論文に関しては下記の表題で執筆中である。

Kinesin-like proteins, KAC, are essential for the attachment of chloroplasts to the plasma membrane in cryptogam plants.

Noriyuki Suetsugu, Yoshikatsu Sato, Hidenori Tsuboi, Masahiro Kasahara, Takato Imaizumi, Takatoshi Kagawa, Yuji Hiwatashi, Mitsuyasu Hasebe and Masamitsu Wada

## 5. 主な発表論文等

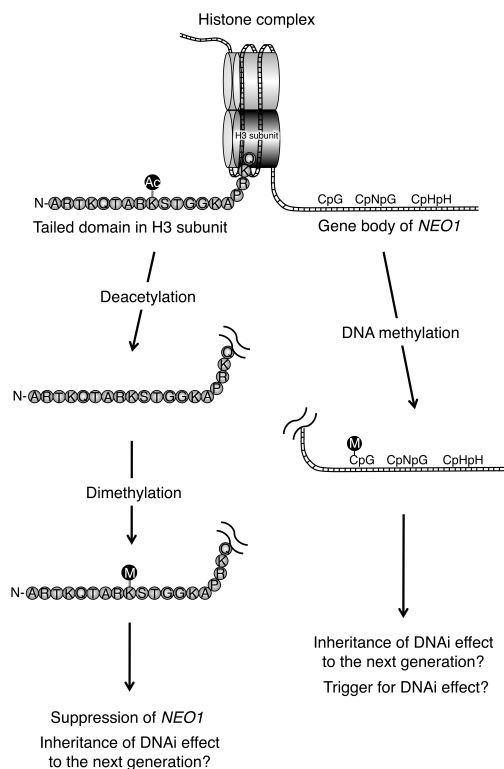
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

① シダの DNAi におけるエピジェネティックな制御機構 須藤慶太、坪井秀憲、和田正三 第 52 回日本植物生理学会 2011 年 3 月 20-22 日 仙台市

〔図書〕 (計 0 件)



[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://wadalab.biology.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 正三 (WADA MASAMITSU)  
九州大学・大学院理学研究院・特任教授  
研究者番号：60011681

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：