

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 5月28日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011~2013

課題番号：23570045

研究課題名(和文) 高等植物の胚発生に関わるエピジェネティック因子の
相互作用と発現調節機構の解明研究課題名(英文) Study on the interaction of epigenetic factors and
regulation of gene expression in higher plant embryogenesis.

研究代表者

鎌田 博 (KAMADA, Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00169608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：

シロイヌナズナで見られるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤で引き起こされる発芽後成長の阻害が高等植物に普遍的な現象であるか否かを検証するため、シロイヌナズナ近縁種3種を用い、Trichostatin A処理を行った。その結果、全てにおいて栄養成長相への転換阻害が認められ、相転換にHDACが普遍的に関与している事が示唆された。一方、DNAメチル化の関与に付いて、体細胞が胚的な性質を獲得する際の*C-LECI*遺伝子の発現上昇と5'上流域のDNAメチル化上昇がカップルしている事を突き止めた。DNAメチル化の一過的上昇は、CxGとCHH部位にあるシトシンのメチル化が大きく変化していることに起因しており、*de novo*型のメチル基転移酵素が働いている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In order to evaluate whether the inhibition of growth after germination induced by histone deacetylase (HDAC) inhibitors was a universal phenomenon in higher plants, Trichostatin A treatment was performed to three *Arabidopsis* related species. As a result, transition to the vegetative phase was inhibited in all, and it was suggested that HDAC is involved in this transition universally. On the other hand, expression of *C-LECI* gene and DNA methylation level in upstream region of *C-LECI* were observed peaks in early timing of embryo induction in carrot. The transiently increasing of DNA methylation was derived from CxG and CHH contexts that might be controlled by *de novo* type methylase.

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：胚発生、エピジェネティクス、成長相転換

1. 研究開始当初の背景

哺乳類等の研究から、生物の発生や形態形成にヒストン修飾やDNAメチル化と言ったエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を果たしていることが徐々に明らかにされつつある。これらエピジェネティックな制御機構はクロマチンの高次構造を変化させて遺伝子発現を調節しているものと考えられている。ヒストン修飾は2種類に大別され、遺伝子の発現を抑制する凝集したクロマチン(ヘテロクロマチン)

を誘導するものと、遺伝子の発現を可能にする緩んだクロマチン(ユークロマチン)を誘導するものがある。一方、DNAのメチル化もヒストン修飾を誘導すると考えられており、ヒストンのヘテロクロマチン化修飾(主にメチル化修飾)、ユークロマチン化修飾(主にアセチル化修飾)、DNAメチル化の3者がクロマチンを介した遺伝子発現制御機構に密接な関わり合いを持っていると考えられている。こうした制御系の

研究は様々な生物種を用いて進められており、それぞれの修飾がどのようにクロマチン構造変化を引き起こし、また、遺伝子発現制御に関わっているかが徐々に明らかになりつつある。しかし、各修飾の相互関係を総合的に捉えた研究はほとんど進められていないのが現状である。

近年になって、高等植物においても様々な生理現象においてエピジェネティックな制御機構の関与が報告されはじめており、花成関連の *FWA* では DNA のメチル化について、葉形成の *AS* 遺伝子群ではヒストンのアセチル化修飾との関わりについて研究が精力的に進められている。研究代表者と分担者はこれまで協調して胚発生現象に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明を進め、胚的性質の抑制にヒストンのアセチル化修飾 (Tanaka et al. 2008)、DNA メチル化 (Shibukawa et al. 2008) が重要な役割を果たしていること、さらに胚発生に関与するヒストンメチル転位酵素を見出し (Hariganeya et al. 2008)、これらの変異体の研究から、やはり胚的性質の抑制にヒストンのメチル化が重要な役割を担っている事を明らかにしてきた。こうした研究成果から、胚発生に関与する複数の転写調節因子がエピジェネティックな制御を受けていることが示唆されている。本研究申請ではエピジェネティック因子の相互関係を明らかとし、エピジェネティックな制御機構の全容を捉える契機になると期待される。

2. 研究の目的

生物の発生や形態形成にヒストン修飾や DNA メチル化と言ったクロマチンの構造変化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を果たすことが明らかになりつつあり、様々な生物種を用いた研究から、それぞれの修飾がどのようなクロマチン構造変化を引き起こし、遺伝子の発現制御に関わっているかが徐々に明らかになってきた。しかし、各因子の相互関係を捉えた研究はほとんど進められていないのが現状である。本申請では高等植物の胚発生現象に関与するヒストン修飾と DNA メチル化に関して、それらの関与と制御機構を明らかにし、エピジェネティック因子がどのように遺伝子発現の制御を行っているか明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 近縁種におけるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と相転換の関与

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* WS)、およびシロイヌナズナ近縁種である *Arabidopsis*

griffithiana、*Olimarabidopsis pumila*、および *Capsella bursa-pastoris* を 50 μ M Trichostatin A (TSA) を含む B5 液体培地で振とう培養し、成長遅延の観察と胚様体の誘導を行った。胚様組織形成を Fat Red 7B で染色し、種子貯蔵物質の検出を行った。

(2) 相互作用因子の単離

シロイヌナズナの給水から発芽に至る期間の cDNA を用いて、Yeast Two Hybrid 法により、HDA6 と相互作用タンパク質の検索を行った。

(3) DNA メチル化の変動解析

ニンジンストレス不定胚誘導系を用いて、ストレス処理期間中の *C-LECI* 遺伝子の発現を qRT-PCR 法により解析するとともに、次世代シーケンサーを用いたパイサルファイトシーケンシングを行い、ストレス処理期間中の *C-LECI* 遺伝子の発現変動と上流域の DNA メチル化を解析した。

4. 研究成果

シロイヌナズナおよび近縁種の乾燥種子 100 粒を表面滅菌し、TSA 50 μ M 処理を行った。TSA 処理を 2 週間行った植物体は、緑化がほとんど起こらず、成長の遅延した異常な実生となった。その後、TSA を含まない B5 固形培地に移植して 4 週間培養し、胚様体の誘導を試みたところ、*A. thaliana* と *C. bursa-pastoris* においては、トライコームが無く、つやのある不定胚様組織が得られたが、*O. pumila* および *A. griffithiana* では不定胚様組織の形成は見られなかった。次に、胚様体誘導を行った植物個体に対して、種子貯蔵物質染色液である Fat Red 7B 染色を行ったところ、不定胚様組織の得られた *A. thaliana* と *C. bursa-pastoris* では、顕著な染色が観察されたが、*O. pumila* および *A. griffithiana* では茎頂部位にわずかな染色が見られただけであった。

これらの結果から、TSA 処理により発芽後成長の抑制は全ての種で認められたものの *O. pumila* および *A. griffithiana* においては、一部に胚性を示す組織が認められたが胚様体の形成が認められなかった。植物種に応じてその反応制が異なる事が確認された。しかし、供試した全ての種において発芽後成長の抑制が認められ、高等植物において HDAC が普遍的に胚性の制御に寄与している事が示唆された。

既に、シロイヌナズナにおいて、この相転換に主要な機能を持つヒストン脱アセチル化酵素が HDA6 である事を明らかにしているが、当因

子の発現はライフサイクルを通じて概ね一定であることから、栄養成長相への転換時期を決定する別な因子が存在すると考えられた。そこで HDA6 と相互作用し転換時期を決定する別な因子の単離を Yeast Two Hybrid 法により目指した。しかし幾種類かの実験系を試みたが、目指す候補因子と思われる遺伝子は単離できなかった。これは、目的因子が直接 HDA6 に結合せず、他の因子を介している可能性が強く示唆された。

一方、胚発生のモデル植物であるニンジンを用いた研究では、胚発生の進行に応じて起こる *C-LECI* 遺伝子の発現変動に 5' 上流域の DNA メチル化が支配的であることが明らかとされていた。本研究課題では体細胞が胚的細胞へと変化する際の現象に焦点を当て、研究を進めた。しかし、体細胞から胚的細胞への相転換の際には活発な細胞分裂を伴う実験系が多く、アプローチが困難であった。そこで、ニンジンのストレスによる不定胚誘導系

(図 1) に着目し、体細胞が胚的な細胞に変化する際の細胞の動態を明確にした。その結果、胚発生能を獲得した細胞の出現には細胞分裂により新しい性質を有する細胞が産み出されるのではなく(図 2、表 1)、体細胞がストレス等の何らかの条件により胚的な細胞に変化することを突き止めた。これは、リプログラミングされた新生細胞が細胞分裂により作られるのではなく、体細胞自身がセルフリニューアルされて胚的細胞へ変化したことを示している。一度決定を受けた体細胞が胚的細胞へと変化するには、発現している遺伝子セットの種類が大きく変化する必要があると考えられる。エピジェネティックな制御系の稼働によりこうした変更を引き起こしていることが強く示唆された。また、多くの胚発生関連遺伝子の発現がストレス処理の期間に応じて上昇するが(図 3)、*C-LECI* 遺伝子は処理期間の初期に一過的発現上昇が起こることを明らかにした。そこで、*C-LECI* 遺伝子の 5' 上流域の DNA メチル化の変動を解析したところ、*C-LECI* 遺伝子が発現ピークを迎える際に、やはり、一過的に 5' 上流域の DNA メチル化が上昇していることを突き止めた。また、この際の DNA メチル化の一過的上昇は、CxG 部位と非対称の CHH 部位にあるシトシンのメチル化が大きく変化していることに起因し、CG 部分のメチル化には大きな変

化が起こっていないかった。以上の結果から、体細胞が胚的な細胞に変化する際には、細胞分裂により新生細胞が産み出されるのではなく、細胞分裂を経ずに DNA のメチル化が変更されることにより *C-LECI* 遺伝子の発現が誘起され、細胞の性質が胚的なものへと変化したことが想定された。そして、このようなセルフリニューアルが引き起こされる際には、DRM 等と言った *de novo* 型のメチル基転移酵素が働き、DNA のメチル化状態を変化させ、遺伝子の発現パターンを変更することにより、新たな性質を付与していることが強く示唆された。

本研究課題ではヒストン脱アセチル化酵素と相互作用し転換時期を決定する因子の単離は行えなかったが、ヒストン修飾の関与は植物に普遍的機構である可能性が示された。一方、胚性の制御に DNA のメチル化変化が重要な役割を持っている事も示唆され、胚という成長相の転換にエピジェネティックな因子が関与し、成長相に必要な遺伝子セットの発現調節に大きく寄与している事が示された。今後、ヒストン修飾と DNA メチル化の関連を明らかにする事により、高等植物の胚発生、成長相の転換に寄与するエピジェネティックな制御系の全容が明らかにされるものと考えられ、それらに重要な基礎的知見を提供する研究成果が得られたと考えている。

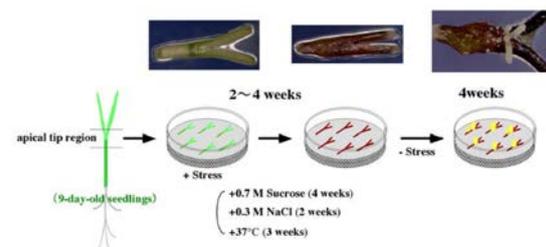


図 1. ストレス不定胚誘導系
播種後 9 日目のニンジン実生茎頂部を切り出し、ストレスを含む MS 培地上で一定期間培養し、その後ストレスの無い培地に移植すると、外植片上に不定胚が誘導される。ショ糖、塩、熱など様々なストレスにより不定胚誘導が可能である。(出典 : Kikuchi et al. 2006 Planta)

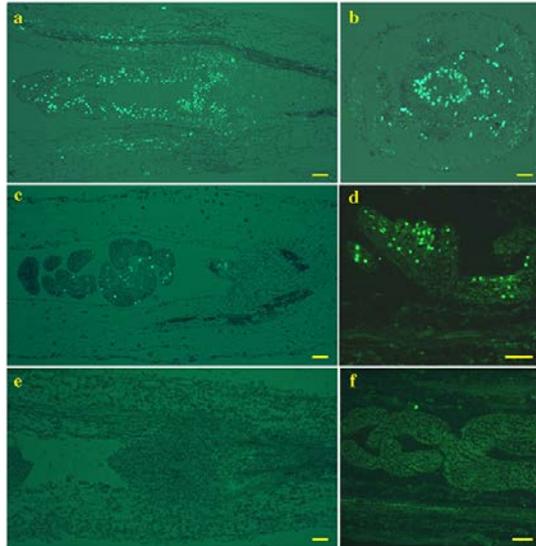


図2. ストレス処理中における外植片の細胞分裂の様子

BrdU を添加し、核酸合成が起こっている細胞を標識した。ストレス未処理 3 日目の外植片 (a, b) では活発な細胞分裂が認められるが、ストレス処理 3 日目 (c, d) ではごく一部でのみ分裂が観察される。ストレス処理 7 日目 (e) では、分裂する細胞は観察されない。細胞分裂の阻害剤を添加しストレス処理 3 日目 (f) を行ったところ、細胞分裂は観察されない。(出典 : Kikuchi et al. 2013 JPR)

Table 1 Effect of cell division inhibitors on the induction of somatic embryogenesis

Treatment	Frequency of embryo formation ^a (%)
Control	17.3 ± 0.7
Aphidicolin	17.5 ± 2.8
Propyzamide	15.8 ± 0.8

表1 細胞分裂阻害剤による不定胚形成の影響

細胞分裂阻害剤であるアフィディコリンとプロピザマイドをそれぞれ処理し、細胞分裂を阻害した場合、不定胚の形成率は未処理のものと同様変わらない。細胞分裂が起こらない事と不定胚形成は独立の事象と考えられる。

(出典 : Kikuchi et al. 2013 JPR)

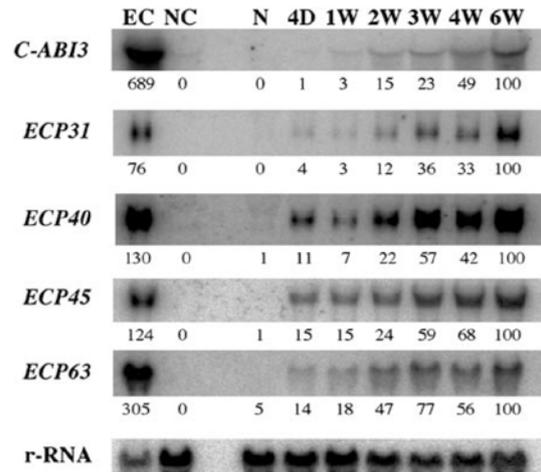


図3. ストレス処理中の胚発生関連遺伝子の発現

胚発生関連遺伝子の発現はストレス処理期間とともに上昇を示す。これは不定胚形成率の上昇と挙動をともにするものであった。

(出典 : Kikuchi et al. 2006 Planta)

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 1 件)

① Akira Kikuchi, Masashi Asahina, Motoki Tanaka, Shinobu Satoh, Hiroshi Kamada. Acquisition of embryogenic competency does not require cell division in carrot somatic cell. Journal of Plant Research. 126:243-250. 2013. 査読有. DOI 10.1007/s10265-012-0517-3

[学会発表] (計 1 件)

① 島田 尚久、針金谷 尚人、鎌田 博. シロイヌナズナおよび近縁種におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A による胚発生関連転写因子の発現の相違. 第 53 回日本植物生理学会年会. 2012 年 3 月 18 日. 京都産業大学

[その他]

ホームページ等

鎌田研究室へようこそ

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/Plant/MolecularBiology/index/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 博 (KAMADA Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号 : 00169608

(2)研究分担者

菊池 彰 (KIKUCHI Akira)

筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：00400648