

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616007

研究課題名(和文) 一次代謝産物 S - アデノシルメチオニン生合成経路によるトランスポゾンの発現調節

研究課題名(英文) Involvement of the metabolism pathway of S-Adenosyl methionine in epileptics

研究代表者

吉川 学 (Yoshikawa, Manabu)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号：80391564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック制御では、DNAやヒストン、siRNAなどへのメチル基修飾が重要な役割を果たす。それらのメチル化にはS-アデノシルメチオニン(SAM)がメチル基供与体の基質となるが、SAMがエピジェネティック制御にどのように関わっているかは明らかになっていない。本研究では、SAMの代謝とエピジェネティック制御の関わりを解明することを目的に行った。

SAM代謝に異常を示すシロイヌナズナ変異体で転写が上昇するトランスポゾンを探し、DNAのメチル化を解析した結果、SAM代謝異常変異体でDNAのメチル化に変化が見られるものがあった。このことからSAMの代謝とDNAのメチル化が関連することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In epigenetics, cytosines, histones and siRNAs are methylated. S-Adenosyl methionine (SAM) is used as a donor of methyl group to them. However, it is unknown whether SAM is related to epigenetics in plants. To address this point, I performed this study using Arabidopsis mutants that are defective in SAM metabolisms. I explore transposons that are up-regulated in SAM metabolism defective mutants. I found that a few transposons are up-regulated in the mutants among some transposons. Next I analyzed the status of DNA methylation of up-regulated transposons. These results showed that DNA methylation at a locus is affected in SAM metabolism defective mutants and some epigenetic mutants. This observation implies that SAM metabolism is related to epigenetic regulation.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティック制御 S-アデノシルメチオニン

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック制御では、DNA やヒストン、small interfering RNA などへのメチル基修飾が重要な役割を果たす。それらのメチル化には、S-アデノシルメチオニンがメチル基供与体の基質として使われるが、これまでのエピジェネティック制御に関する研究からは植物のエピジェネティック制御において、S-アデノシルメチオニンの代謝がエピジェネティック制御にどの様に関わっているかは明らかになっていない。これまでに行われていたシロイヌナズナを使ったエピジェネティック制御に関わる遺伝子を単離することを目的とした遺伝学解析では、S-アデノシルメチオニンを S-アデノシルホモシステインに変換する酵素の遺伝子の変異体(*hog1*)やメチオニン過剰蓄積変異体(*mto1*)が同定されている。また、この変異体のマイクロアレイによる網羅的な転写発現の解析では、シロイヌナズナのいくつかのトランスポゾンの発現上昇が確認されていた。

2. 研究の目的

動物及び植物において、エピジェネティック制御では、ゲノム上のある領域の DNA のシトシンがメチル化され、その領域からの転写が起こらなくなり、その遺伝子の活性が抑えられることが知られている。その植物における DNA のシトシンのメチル化ではゲノムに変異を誘発するトランスポゾンなどを抑制するために世代を超えてそれらの因子の DNA のシトシンのメチル化を維持する「維持型 DNA メチル化経路」と、small interfering RNA を指標として新たに DNA のメチル化を導入する「新規 DNA メチル化経路」が知られている。上に書いたようにシロイヌナズナでは *hog1* 変異体に加えて、維持型メチル化経路と新規メチル化経路それぞれの経路に異常を起こす様々な変異体が単離・同定されている。これらの豊富な遺伝的材料を用いて、一次代謝物である S-アデノシルメチオニンの代謝とエピジェネティック制御を遺伝学的に解析することにより、植物のエピジェネティクス研究において知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体で発現が上昇するトランスポゾンの探索

S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体の両方で発

現が増加するトランスポゾンを探索するために、以前に行われた *SAHH1* 変異体を使ったマイクロアレイのデータを参考にして、*hog1* と *mto1* の S-アデノシルメチオニン代謝経路異常変異体及び維持型メチル化経路の変異体(*ddm1* 及び *met1*)と新規メチル化経路(*mom1*, *drm2cmt3*, *polvia*, *drd3*)の変異体から RNA を抽出し、ノーザン解析または RT-PCR によって、数十個トランスポゾンの発現を調べた。

(2) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体における MRU1 領域のシトシンメチル化状態の解析

該当ゲノムの DNA シトシンのメチル化が低下によりエピジェネティック制御が異常となり、トランスポゾンなどの転写が増加することが知られている。そこで、S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体と維持型メチル化経路の変異体、新規メチル化経路のいずれにおいても発現上昇が確認できた MRU1 のゲノム領域について、DNA シトシンのメチル化状態を調べるために、バイサルファイト法によって解析した。

(3) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体の多重変異体における MRU1 及び他のトランスポゾンの発現解析

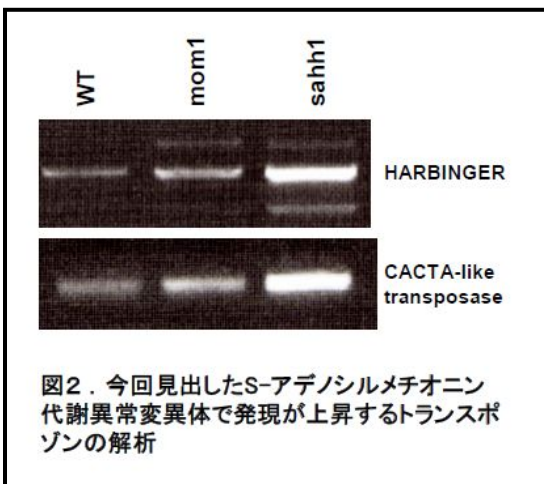
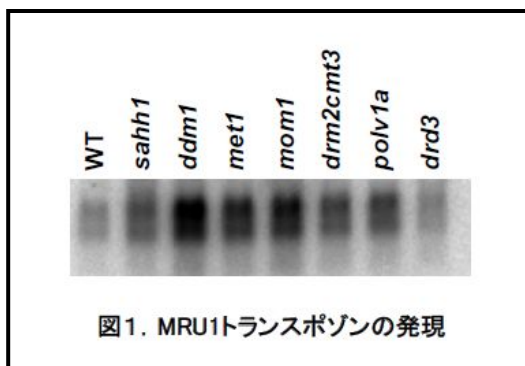
図 1 に示したとおり、MRU1 と 2 つのトランスポゾンの転写の増加が確認できた。そこで、S-アデノシルメチオニン代謝経路異常変異体(*mto1* 及び *hog1*)における MRU1 の発現上昇が、エピジェネティック制御に関わるかを遺伝学的に調べるために、「維持型 DNA メチル化経路」で機能する DDM1 変異体(*ddm1*)の合計 5 個の変異体を組み合わせた二重変異体(*mto1hog1*, *mto1nrpd1*, *mto1ddm1*, *hog1nrpd1*, *hog1ddm1*)及び、「新規 DNA メチル化経路」で機能する *polvia* を作製し、それらにおける MRU1 や他のトランスポゾンの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体で発現が増加するトランスポゾンの探索

その結果、MRU1 と呼ばれるトランスポゾンに加えて(図 1)、さらに 2 つのトランスポゾンの転写が増加していることがわかった(図 2)。これらの結果は、S-アデノシルメチオニン代謝経路とエピジェネティック制

御の間に何らかの相関があることが示唆される。



(2) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体における MRU1 領域のシトシンメチル化状態の解析

解析した結果、野性型においてこのゲノム領域のシトシンは高度にメチル化されているのに対して、ddm1 では、それらのメチル化が著しく低下することがわかった。一方、hog1 及び mto1 という S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体では、それぞれの変異体で固有のメチル化状態にあることがわかった。

(3) S-アデノシルメチオニン代謝異常変異体とエピジェネティック制御変異体の多重変異体における MRU1 及び他のトランスポゾンの発現解析

作製した二重変異体のける MRU1 の転写量を解析した結果、それぞれで MRU1 の発現上昇が確認されたことより、メチオニン代謝経路とエピジェネティック制御の間に何らかの相関があると考えられた。

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3件)

Kanno T, Yoshikawa M, Habu Y
Locus-specific requirements of DDR complexes for gene-body methylation of TAS genes in Arabidopsis thaliana
Plant Molecular Biology Reporter 31:1048-1052 (2013)

Yoshikawa M
Biogenesis of trans-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants
Genes & Genetic Systems 88:77-84 (2013)

吉川 学, 菅野 達夫, 土生 芳樹
植物における RNA サイレncing機構 転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) と転写型ジーンサイレンシング (TGS)
細胞工学 30:706-711 (2011)

[学会発表](計2件)

菅野達夫, 不動寺晶子, 保坂アエニ, 吉川学, 土生芳樹 (2012) シロイヌナズナ TAS 遺伝子領域に見られる DNA のメチル化に関するタンパク因子の解析 第35回日本分子生物学会年会 ():2P-153 [ID:9248]

菅野達夫, 吉川学, 土生芳樹 (2013) シロイヌナズナにおける RNA silencing を介した遺伝子発現抑制機構の解析 第36回日本分子生物学会年会 ():3PW11-4 [ID:10373]
[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

6．研究組織

(1)研究代表者

吉川 学 (YOSHIKAWA Manabu)

研究者番号：80391564

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：