

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号 : 24302

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23657040

研究課題名(和文) ヒストンコードを用いた植物ゲノムの網羅的発現プロファイリング手法の開発

研究課題名(英文) Development of a comprehensive method for expression profiling of the plant genome with the use of histone code.

研究代表者

小保方 潤一 (OBOKATA JUNICHI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 50185667

研究成果の概要(和文) : ヌクレオソーム成分の一種であるヒストン H2A.Z は、動物や酵母のゲノムでは、主に転写開始領域に局在化している事が知られている。本研究では、高等植物のシロイヌナズナのゲノム上で、H2A.Z の分布を網羅的に解析した。その結果、植物の H2A.Z は、動物や酵母とは異なって、ゲノム上の遺伝子領域や転写領域の内部に局在化しており、その分布は植物の生理的応答の過程であまり変化しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文) : In order to develop a comprehensive method for expression profiling of the plant genome with the use of histone code, we examined the genome-wide distribution profile of a histone variant H2A.Z in reference to the external stimuli and the position and strength of the transcription start sites (TSSs). Our results suggest that the plant H2A.Z could be a relatively stable marker for the transcribed regions of the plant genome.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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 : シロイヌナズナ、ChIP-seq 解析、クロマチンリモデリング、ヒストンコード、H2A.Z、遺伝子予測、発現プロファイリング、植物ゲノム

1. 研究開始当初の背景

筆者は、植物ゲノムの進化の過程で、新規の遺伝子領域やプロモーター、転写領域などがどのように出現するのかに興味をもってきた。言い換えれば、ゲノムの中で、転写領域と非

転写領域はどのように区別されるのか、という問題である。一般に考えられている『プロモーター配列』は、実はゲノムの至る所にあり、このような区別を引き起こす要因にはなっていない。このような研究を進めるために

は、まず、あるゲノム領域が転写されているのか否かを明確に識別できる検出法が必要である。しかし、転写物の蓄積量には転写部位によって数万倍以上の開きがある。さらに、真核ゲノムには、不安定なRNA や非常に短い機能性RNA なども多数コードされており、それらを包括的に検出する事は、最新のシーケンサーをもってしても必ずしも容易ではない。そこで筆者が注目したのは、転写領域の周辺に生じるクロマチンのリモデリングである。特に、転写開始点の前後に特徴的に現れるヒストン成分に着目して、植物ゲノムの幾つかの領域でモデル解析を進めたところ、ゲノムの塩基配列や、通常のトランスクリプトーム解析では予測や検出が困難だったmiRNA などの微弱な転写単位が明確に予測・同定出来た。この知見が、本研究の着想を導いた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物ゲノム上のヌクレオソームに記されたヒストンコードを利用して、ゲノム上の転写領域と非転写領域、遺伝子領域と遺伝子間領域を効率よく予測し区分する手法を開発することである。この目的を達成するため、当初予定では、H3K4me3 と H2A. Z の2種類のヒストンマークの分布を重点的に解析する予定だったが、H3K4me3についてはシロイヌナズナゲノム上での網羅的解析結果が報告されたため、本研究では、植物ではまだ網羅的な解析が行われていないH2A. Zの分布に焦点を絞った。具体的には、次の3項目について検討を進めた。

(1) シロイヌナズナのゲノム上での転写開始点 (TSS) とH2A. Zの局在部位を、次世代シーケンサーを用いて、網羅的に解析する。

(2) 上記の局在や強度が、植物遺伝子群の環境応答の前後でどのように変化するのか、あ

るいはしないのかを解析する。

(3) 上記の知見を総合して、植物ゲノム上での発現領域を網羅的に予測する手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と処理区

シロイヌナズナ *Arabisopsis thaliana* col-0 の種子を、1%蔗糖を含む寒天プレートに播種し、 $30 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の白色光下で8日間栽培した。次いで植物群を二つに分け、片方に $750 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の強光を3時間照射し(強光HL処理区)、他方は同じ時間、 $30 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ の光条件で栽培を継続した(通常光NL処理区)。

(2) ヒストンバリエントH2A/Zの局在解析

上記の各処理区の植物からそれぞれクロマチンを抽出し、抗H2A. Z抗体を用いて網羅的なChIP-seq解析(クロマチン免疫沈降-配列解析)を行った。得られた配列タグの解読には318型チップを装着したIonPGM シーケンサーを用いた。

(3) 転写開始点(TSS)の解析

上記の各処理区の植物からそれぞれRNAを抽出し、cap-trap法でpol II による転写開始点の位置と強度を網羅的に解析した。

(4) バイオインフォマティクス解析

ChIP-seq解析でのタグ配列のゲノム上へのマッピングには、TMAP (The Torrent Mapping Alignment Program for Ion Torrent) を用いた。マッピング情報からのヌクレオソームピーク位置の検出にはMACS2プログラムを用いた。こうして得られたヌクレオソームのピーク位置と転写開始点や遺伝子モデルとの位置関係の解析には、Rパッケージ(RStudio)を用いた。また、これら以外の諸解析には自作のPERLスクリプトを用いた。

4. 研究成果

まず、今回の研究の柱となったヒストンH2A.ZのゲノムワイドなChIP-seq解析（クロマチン免疫沈降-配列解析）と転写開始点解析の概要を述べ、次いで、これらのデータを解析して明らかになった諸点を整理し、その上で、本研究で得られた現時点での結論と今後の展望について述べる。

(1) シロイヌナズナにおけるヒストンバリエントH2A.ZのChIP-seq解析の概要

植物のH2A.Zについてウサギでポリクローナル抗体を作成し、それを用いて、強光(HL)処理植物と通常光(NL)処理植物の各々についてChIP-seq解析(クロマチン免疫沈降-シーケンス解析)を行ったところ、それぞれ平均鎖長が124~134bp程度、リード数にして268万~270万ほどの配列情報がえられた。これらの配列リードをシロイヌナズナのゲノム上にマップしたところ、それぞれのリード数の96%程度がマップされた。

次いで、これらのマップ情報からH2A.Zの分布のピーク位置を抽出し、それを基にヒストンバリエントH2A.Zを含むヌクレオソームのゲノム上での局在位置を推定したところ、HL処理区でおよそ19000箇所、NL処理区で13000箇所ほどが見出された。ただしこれらの箇所の多くは両処理区で共通しており、検出された局在位置自体の総数は全体でおよそ20000箇所だった。

(2) 転写開始点 (TSS) 解析の概要

今回のTSS解析では、強光処理植物と対照処理区からそれぞれ651万と756万ほどの転写開始点タグ配列が得られた。それらをシロイヌナズナの核ゲノムにコードされている33323の遺伝子モデル (TAIR10による) に対応させたところ、強光処理によって転写が誘導される

遺伝子が1182種、抑制される遺伝子が1435種、強光処理に関係なく発現している遺伝子が18177種で、今回の解析で転写物が検出されなかった遺伝子群が12529種だった。

(3) 植物ゲノムではH2A.Zは遺伝子領域を特徴づけるマーカーになっている

動物や酵母では、H2A.Zは遺伝子の転写開始領域に局在することが知られている。ところが今回の解析の結果、シロイヌナズナのH2A.Zは転写開始領域に局在するだけではなく、むしろ大部分のH2A.Zは遺伝子領域の内部 (gene body) に分布していることが明らかになった (表1)。さらに、遺伝子間領域で検出されたH2A.Zは全体のわずか6~7%にすぎず、この領域にまだ未知の遺伝子が存在する可能性や、遺伝子間領域自体の大きさを考えると、実質的に、遺伝子領域以外のゲノム部位には殆ど分布していないと考えられる。

表1.シロイヌナズのH2A.Zの局在分布

	対照処理区	強光処理区
遺伝子間領域	6.7%	6.0%
転写開始領域	6.3%	6.5%
遺伝子領域内	87.0%	87.5%

(4) H2A.Zはタンパク質遺伝子だけではなく、miRNA遺伝子の転写領域にも局在する

次頁の図1に示したのはmiR398とよばれるmiRNAのコード領域だが、この図で明らかのように、H2A.Zは、タンパク質コード遺伝子だけではなく、miRNA遺伝子の転写領域にも分布している。

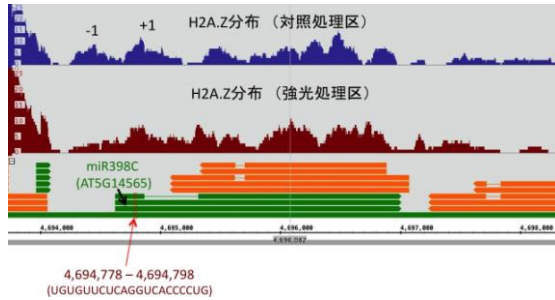


図1. miR398C遺伝子周辺でのH2A.Zの分布図。転写開始点の前後に-1ヌクレオソームと+1ヌクレオソームが検出されている。

(5) 植物のH2A.Zは転写領域のなかでもエキソン部分に局在する傾向がある

これまで解析した範囲では、H2A.Zは転写領域に均等に分布するのではなく、主にエキソン領域に局在し、イントロン領域では存在密度が低い傾向がある。この傾向は図1に示したゲノム領域でも見出される。

しかし、図1に示したmiR398遺伝子では、エキソンの部分が全て最終遺伝子産物になるのではないため、H2A.Zの分布域は、少なくともRNA遺伝子については最終産物となる領域を反映しているのではないらしい。

(6) 大部分のH2A.Zの局在位置は3時間の強光処理によっては変化しない

今回の実験で検出された20000箇所ほどのH2A.Zを含むヌクレオソームの局在位置のうち、強光処理によって新たに出現したものが約23%、逆に消失したものが18%ほどで、全体の59%ほどの部位では強光処理の有無にかかわらずヌクレオソームの局在に変化はなかった(図2)。

次に、この変化を遺伝子毎に集計してみると、強光処理によって新たにH2A.Zのシグナルが検出された遺伝子が全体のおよそ19%、逆に消失した遺伝子が約16%で、全体の64%程

の遺伝子群については強光処理の有無に関わらず、その領域にH2A.Zマーカーが局在していた。

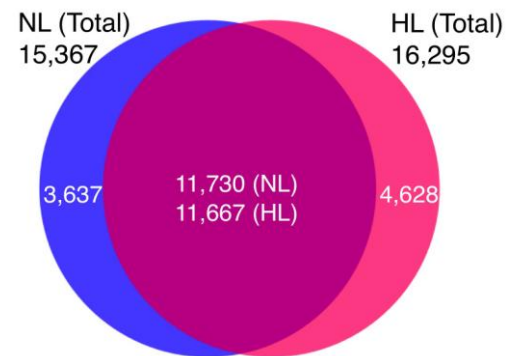


図2. H2A.Zを含むヌクレオソームの局在位置。3時間の強光処理(HL)と対照処理(NL)の植物を比較すると、ヌクレオソームの局在位置は大部分で共通していた。

(7) 強光処理によるH2A.Zの出現/消失と、そのヌクレオソーム部位にある遺伝子の機能や発現調節との間には特異的な関係はみられなかった

上記の解析で、全体の35%ほどの遺伝子領域では、3時間の強光処理によってその領域に局在するヌクレオソームのH2A.Z成分が出現/消失した。この出現/消失と、遺伝子の機能、発現誘導、発現レベル(TSSタグの検出数)などの関係を解析したが、いずれについても明瞭な相関関係はみられなかった。

(8) 転写開始点近傍での局所的なH2A.Zの存在状態について：転写開始点を挟む二つのヌクレオソーム(-1ヌクレオソームと+1ヌクレオソーム)のリモデリングと転写調節

次に、転写開始点近傍での局所的なH2A.Zの状態と遺伝子の発現調節との関係を調べた。まず、強光で発現が誘導される遺伝子、変化しない遺伝子、抑制される遺伝子の3つのグルー

プからそれぞれ代表的な遺伝子を取りだし、総計40の遺伝子について、-1ヌクレオソーム (=転写開始点の5'側に隣接) と+1ヌクレオソーム (3'側に隣接) におけるH2A.Zの存在量を調べた。その結果、このいずれのグループでも、H2A.Zの存在量は+1ヌクレオソームの方が高かった。また、強光で発現が誘導される遺伝子については、強光処理で+1ヌクレオソームに含まれるH2A.Zの相対量が増加する傾向が見られた。

(9) 今回の解析から明らかになった植物のヒストンコードの特徴

キャノニカルヒストンH2AのバリエーションであるH2A.Zは、動物や酵母では転写開始点周辺のヒストンマークとして知られている。それに対し、本研究では、植物のH2A.Zはエキソンを中心とする転写領域内のマーカーになっていることが明らかになった。さらに、この転写領域マーカーは、数時間程度の強光処理ではあまり変化せず、植物の生理応答を通じて比較的安定に保たれているマーカーであることが示唆された。

ヒストンタンパク質は、一般に動物と植物の間でも高い配列保存性を示すが、H2A.Zの保存性は他のヒストンほど高くはなく、植物と動物の間で保存されていない領域もある。植物のH2A.Zは、動物とは多少異なる独自の役割をもつように進化したのかもしれない。

(10) ヒストンコードを利用した植物ゲノムの発現プロファイリング手法の開発：今後の展望

① 植物クロマチンでゲノムワイドなヌクレオソーム解析を行うためには、今回解読した総計500万リード程度の ChIP-seqでは規模がまだ不十分である。今回の結論を確

認する為、IonProton などの大量リードシーケンサーによる追実験を予定している。

- ② 今回の研究から、植物のH2A.Zは、miRNA や noncoding RNAなどのように、ゲノム配列だけからでは遺伝子構造や転写領域の予測が難しい遺伝子群について、転写領域を予測する新たなマーカーとして使える可能性が示唆された。
- ③ 本研究の所期の目的である「ヒストンコードを利用した植物の網羅的発現プロファイリング手法」を確立するためには、今後、H2A.Zによる転写領域のマーカーと、例えばH3K4me3などによる発現状態のマーカーの有効な組み合わせ方を検討してゆく必要がある。
- ④ 本課題では、「発現プロファイリング技術を開発するためのヒストンコードの解読」というスタンスで研究作業を進めているが、その基礎となるのは植物自身がゲノム情報をどのように読み書きしているのか、というまさにそのルールである。その意味で、本研究は、技術開発を目指した応用研究であると同時に、極めて基礎的な基盤研究でもある。

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0件)

本報告書の執筆時点ではまだ実験結果の解析が継続中であり、それらが完了次第、原著論文を作成・投稿する予定である。

[学会発表] (計8件)

- ① 佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一：遺伝子重複型偽遺伝子の転写状態の維持におけるATG配列の役割。第54回日本植物生理学会年会 2013年3月21-23日 岡山

- ② 佐藤壮一郎、Babiychuk Elena、松尾充啓、坂本智昭、倉田哲也、Kushnir Sergei、小保方潤一：シロイヌナズナTFIIF変異体のゲノムワイド転写開始点解析。第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡
- ③ Junichi Obokata : A new driving force for the functional gene transfer during endo- symbiotic evolution: pol II promoter *de novo* origination, Protists 2012. 29 July to 3 August, 2012, Oslo, Norway
- ④ 佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一 : 遺伝子重複領域内のATG開始コドンが転写状態に与える影響について。第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16-18日 京都
- ⑤ 松尾充啓、佐藤壮一郎、工藤久幸、安井孝彰、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一 : 高等植物において遺伝子コード領域の存在は転写型ジーンサイレンシングを抑制する。第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16-18日 京都
- ⑥ 佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一 : 遺伝子重複領域内のATG開始コドンの保存性が転写状態の持続性に及ぼす影響について。第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜
- ⑦ 松尾充啓、佐藤壮一郎、工藤久幸、安井孝彰、木村宏、中邨真之、山本義治、小保方潤一 : 植物の核ゲノムにはATG開始コドンを介したプロモーター機能領域の出現メカニズムがある。日本遺伝学会第83回大会 2011年9月20-23日 京都
- ⑧ 佐藤壮一郎、松尾充啓、工藤久幸、安井孝彰、木村宏、中邨真之、山本義治、小保

方潤一 : 植物ゲノム上でのプロモーター機能領域の出現に対するATG開始コドンの役割.

日本植物学会第75回大会 2011年9月17-19日 東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_genome_bio/

<http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp/ppdb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小保方 潤一 (OBOKATA JUNICHI)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50185667

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし