

令和元年6月11日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221105

研究課題名(和文)抑制と抗抑制によるエピゲノム動態制御機構の解明

研究課題名(英文)Controlling mechanisms of epigenome by silencing and anti-silencing

研究代表者

角谷 徹仁(Kakutani, Tetsuji)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・教授

研究者番号：20332174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 150,500,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの遺伝子における抗抑制に働くヒストン脱メチル化酵素遺伝子IBM1の変異体と、ibm変異による発生異常をサプレスする変異であるldl2のエピゲノム解析により、エピゲノム分化における遺伝子内H3K4me1の重要性を示した。また、低メチル化変異体の遺伝解析から、ゲノム全体での抑制クロマチンを制御する負のフィードバック機構の存在を示した(Ito et al 2015)。さらに、配列特異的にDNAメチル化喪失を引き起こすタンパク質であるVANCの標的配列がタンデムリピートを形成することで同調して速く進化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子のON/OFF状態が細胞分裂後にまで継承される「エピジェネティック」な遺伝子制御は個体発生やゲノム進化の理解に重要なだけでなく、農学や医学にも重要である。本研究では、遺伝子ON/OFF状態の決定にヒストンタンパク質修飾の相互作用が重要であることを示し、また、エピジェネティックな抑制を除くタンパク質とその標的配列を同定した。得られた知見は、エピジェネティックな機構の理解とともに、それを制御する技術にもつながりうるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Through genetic characterization of histone demethylase genes IBM1 and LDL2 of Arabidopsis, we showed importance of gene body H3K4me1 for establishment of epigenetic states (Inagaki et al 2017). Characterization of hypomethylation mutant revealed genome-wide negative feedback to control global level of heterochromatin (Ito et al 2015). Furthermore, we showed behavior and evolutionary dynamics of sequence-specific anti-silencing systems of VANC proteins and their targets (Hosaka et al 2017).

研究分野：遺伝学、エピゲノミクス

キーワード：エピゲノム DNAメチル化 ヒストン修飾 トランスポゾン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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「エピゲノム」動態は個体発生、染色体挙動、老化、癌形成などの重要な生命現象に關与する。エピゲノム動態を理解するには抑制と抗抑制の両面を知る必要があるが、後者（抗抑制）の理解は遅れていた。私達は、DNA メチル化に影響するシロイヌナズナ変異体を用いた遺伝学とゲノミクスによるアプローチで、遺伝子のメチル化を負に制御する因子 IBM1 (increase in BONSAI methylation 1) や、配列特異的 DNA 脱メチル化活性を持つ因子 VANC を同定し、これらの因子の關与する新奇のエピゲノム抗抑制機構の解析をはじめていた。

2. 研究の目的

本課題では、私達のこれまでの研究で得られた研究素材を生かし、抑制/抗抑制によるエピゲノム形成と個体発生制御機構、および新奇 DNA 脱メチル化因子の分子機構という新たな問題を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

課題1「ヘテロクロマチン制御様式と発生への影響の理解」

ヒストン脱メチル化酵素 IBM1 遺伝子の変異体では、遺伝子にヘテロクロマチンの目印が蓄積する。これにともない、多くの発生異常が誘発される (Saze et al 2008 *Science*; Miura 2009 *EMBO J*; Inagaki et al 2010 *EMBO J*)。ヘテロクロマチンの蓄積は世代を超えて漸進的に進み、これにともない発生異常も強くなる。発生を指標にサプレッサー変異を選抜したところ、ヘテロクロマチンの喪失した変異体とともに、ヘテロクロマチンを維持したまま発生異常をサプレスするものが見いだされた。これらの素材、および新たに作出した系統を用いた遺伝解析およびゲノム解析によって、ヘテロクロマチン蓄積の機構とそれが発生に影響する経路を理解する。

課題2「新奇 DNA 脱メチル化の分子機構理解」

DNA 脱メチル化効果を持つタンパク質 VANC は、末端の逆位反復配列の崩れた DNA 型トランスポゾンの解析を進める中で見いだした新奇因子である (Fu et al 2013 *EMBO J*)。VANC を発現させると、一群のトランスポゾンで全長にわたる脱メチル化が誘発される。VANC による低メチル化の誘導は、配列特異性が高いにもかかわらず、数 Kb にわたる領域の全長でおこる点が興味深い。この機構を知るため、染色体における VANC の分布を知る。また、VANC と結合するタンパク質を同定し、抗抑制におけるその機能を検討する。

4. 研究成果

(i)「ヘテロクロマチン制御様式と個体発生への影響の理解」

ヒストン H3 の第9リジンのメチル化 (H3K9me) は多くの真核生物で抑制クロマチンの目印として働き、トランスポゾンなどの反復配列を抑制することが知られている。不思議なことに H3K9me は、プロモーターだけでなく、転写が抑制された配列の内部にも分布する。シロイヌナズナの変異体 *ibm1* (increase in BONSAI methylation 1) では、遺伝子内部に H3K9me が蓄積するとともに、発生異常が誘発される。この発生異常をサプレスする変異体を調べることで、遺伝子内部のクロマチン動態の意義にアプローチした。まず、このサプレッサー変異の原因遺伝子は、ヒストン H3 リジン4の脱メチル化酵素をコードする *LDL2* だった。この変異体および H3K9メチル化酵素の変異体を用いた遺伝解析とエピゲノム解析によって、遺伝子内部の H3K9me は、遺伝子内部の H3K4me1 (モノメチル化) の脱メチル化を介してトランスポゾンの転写抑制を行っていることを見出した (Inagaki et al 2017 *EMBO J*)。H3K4me1 は動物ではエンハンサーに特徴的な修飾として知られているが、遺伝子内 H3K4me1 は、ほとんど注目されていない。本研究は、この修飾が多くのトランスポゾンの抑制を仲介することを示した。

また、*LDL2* と類似のヒストン脱メチル化酵素遺伝子 *LDL3* の変異体を用いた共同研究で、H3K4me が個体再生に関わることを示した (Ishihara et al 2019 *Nat Commun*)。

また、ゲノム DNA 低メチル化変異体 *ddm1* (decrease in DNA methylation 1) の背景で局所的な高メチル化がみられることに着目し、ゲノム全体での抑制クロマチンのレベルを制御する負のフィードバックの存在を示した (Ito et al 2015 *PLoS Genet*)。

(ii)「新奇 DNA 脱メチル化の分子機構理解」

トランスポゾン *VANDAL21* のコードするタンパク質の一つ VANC21 は、*VANDAL21* コピーに特異的な DNA メチル化喪失と転写脱抑制を引き起こす (Fu et al 2013 *EMBO J*)。この機構の理解を目指した。VANC21 は、他の *VANDAL* コピーの DNA メチル化には影響しないが、興味深いことに、他の *VANDAL* も VANC21 と似たタンパク質をコードする。他の *VANDAL* の一つ、*VANDAL6* のコードする VANC21 類似のタンパク質 VANC6 を発現させたところ、*VANDAL6* および類似配列で特異的 DNA メチル化喪失を引き起こした。配列の近い VANC21 と VANC6 が、極めて高い配列特異性で数 kb にわたる領域の抗抑制を達成する機構が興味深い。

この問題にアプローチするため、ChIP-seq (クロマチン免疫沈降に続く塩基配列決定) によって、VANC タンパク質のゲノム中での分布を調べたところ、*VANDAL21* コピーの非コード領域に特異的に分布することがわかった。VANC の局在領域には、短い標的配列がタンデムリピートとして分布しており、これと結合することにより、速い進化、および高い特異性と数 kb にわたる領域の抗抑制を達成していることがわかった (Hosaka et al 2017 *Nat Commun*)。

また、このタンパク質と標的配列の組み合わせにより、極めて高い配列特異性で数 kb にわたる領域の抗抑制を引き起こせることから、エピゲノム編集における利用を視野に、国内および国際特許を出願している（特願 2017-176009、PCT/JP2018/033988）。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件；すべて査読あり)

Ishihara H, Sugimoto K, Tarr PT, Temman H, Kadokura S, Inui Y, Sakamoto T, Sasaki T, Aida M, Suzuki T, Inagaki S, Morohashi K, Seki M, Kakutani T, Meyerowitz EM, Matsunaga S. (2019) Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nat Commun* 10, 1786 DOI: 10.1038/s41467-019-09386-5.

Yoshida T, Furihata H, To T-K, Kakutani T, and Kawabe A (2019) Genome defense against integrated organellar DNA fragments from plastids into plant nuclear genomes through DNA methylation. *Scientific Reports* 9, 2060. DOI: 10.1038/s41598-019-38607-6.

Hosaka, A., and Kakutani, T. (2018) Transposable elements, genome evolution and transgenerational epigenetic variation (review). *Curr Opin Genet Dev.* 49, 43-48. DOI: 10.1016/j.gde.2018.02.012.

Yoshida T, Tarutani Y, Kakutani T, Kawabe A. (2018) DNA Methylation Diversification at the Integrated Organellar DNA-Like Sequence. *Genes* 9 E602. DOI: 10.3390/genes9120602.

Hosaka A, Saito R, Takashima K, Sasaki T, Fu Y, Kawabe A, Ito T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, and Kakutani T (2017) Evolution of sequence-specific anti-silencing systems in Arabidopsis. *Nat. Commun.*, 8, 2161. DOI: 10.1038/s41467-017-02150-7.

Wollmann H, Stroud H, Yelagandula R, Tarutani Y, Jiang D, Jing L, Jamge B, Takeuchi H, Holec S, Nie X, Kakutani T, Jacobsen SE, Berger F. (2017) The histone H3 variant H3.3 regulates gene body DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* 18, 94. DOI: 10.1186/s13059-017-1221-3.

Inagaki S., Takahashi M., Hosaka A., Ito T., Toyoda A., Fujiyama A., Tarutani Y., and Kakutani T (2017) Gene-body chromatin modification dynamics mediate epigenome differentiation in Arabidopsis. *EMBO J* 36, 970-980. DOI: 10.15252/embj.201694983.

Ito H, Kim JM, Matsunaga W, Saze H, Matsui A, Endo TA, Harukawa Y, Takagi H, Yaegashi H, Masuta Y, Masuda S, Ishida J, Tanaka M, Takahashi S, Morosawa T, Toyoda T, Kakutani T, Kato A, Seki M (2016) A stress-activated transposon in Arabidopsis induces transgenerational abscisic acid insensitivity. *Sci Rep.* 6: 23181. DOI: 10.1038/srep23181.

Ito T, Tarutani Y, To TK, Kassam M, Duvernois-Berthet E, Cortijo S, Takashima K, Saze H, Toyoda A, Fujiyama A, Colot V, Kakutani T (2015) Genome-wide negative feedback drives transgenerational DNA methylation dynamics in Arabidopsis. *PLoS Genet* 11:e1005154. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005154.

To TK, Saze H, Kakutani T (2015) DNA Methylation within Transcribed Regions (review). *Plant Physiol.* 168:1219-25. DOI: 10.1104/pp.15.00543.

Ito H, Kakutani T. (2014) Control of transposable elements in Arabidopsis thaliana (review). *Chromosome Res.* 22, 217-223. DOI: 10.1007/s10577-014-9417-9.

〔学会発表〕(計 4 7 件；招待講演および受賞した発表のみを以下に示す)

T Kakutani “RNAi targets sequence-specific anti-silencing systems of DNA TE in Arabidopsis.” (招待講演) *Cold Spring Harbor Meeting “Transposable Elements”* (November 2018, Cold Spring Harbor, NY, USA)

T Kakutani “Evolution of sequence-specific anti-silencing system in Arabidopsis” (招待講演) *International Symposium of Plant Epi/Genetics* (Oct 2018, Angers, France)

西澤優一郎、藤泰子、富永さやか、角谷徹仁「シロイヌナズナにおけるヒストンバリエント H2A.Z と DNA メチル化の拮抗作用」(BP 賞を受賞した講演)日本遺伝学会第 90 回大会 (2018 年 9 月、奈良)

稲垣宗一、高畑信也、村上洋太、角谷徹仁「分裂酵母を用いた遺伝子内クロマチン修飾動態制御の解析」(BP 賞を受賞した講演)日本遺伝学会第 90 回大会 (2018 年 9 月、奈良)

T Kakutani “Evolution of sequence-specific anti-silencing system in Arabidopsis” (招待講演, Plenary talk) *Annual Meeting of Society for Molecular Biology and Evolution* (July 2018, Yokohama)

T Kakutani “Transgenerational heterochromatin dynamics in coding and noncoding regions” (招待講演) *25th International Congress on Plant Sexual Reproduction-Satellite Symposium* (June 2018, Yokohama)

T Kakutani “The gene body H3K4me1 dynamics mediate heterochromatin silencing” (招待講演) *Cold Spring Harbor Asia meeting “Chromatin, Epigenetics and Transcription”* (Apr 2018, Suzhou, China)

R Saito, T Kakutani “Evolution of sequence-specific anti-silencing DNA demethylation systems by transposon-encoded anti-silencing factor” (ポスター発表; The First Prize 受賞) *Cold Spring Harbor Asia meeting “Chromatin, Epigenetics and Transcription”* (Apr 2018, Suzhou, China)

T Kakutani “Evolution of sequence-specific anti-silencing system in Arabidopsis” (招待講演) *France-Japan Epigenetics Workshop*. (Oct 2017, Paris, France)

橋本祐里、藤泰子、樽谷芳明、角谷徹仁「シロイヌナズナの経世代的 de novo DNA メチル化動態に対する既存 DNA メチル化の効果」(BP 賞を受賞した講演)日本遺伝学会第 89 回大会 (2017 年 9 月、岡山)

T Kakutani “Rapid evolution of sequence-specific anti-silencing systems in Arabidopsis.” (招待講演) *Cold Spring Harbor Meeting “Transposable Elements”* (November 2016, Cold Spring Harbor, NY, USA)

保坂碧、齋藤絡、高嶋和哉、佐々木卓、樽谷芳明、角谷徹仁「シロイヌナズナの配列特異的抗抑制系とその速い進化」(BP 賞を受賞した講演)日本遺伝学会第 88 回大会 (2016 年 9 月、三島)

T Kakutani “Silencing and anti-silencing of genes and transposons in Arabidopsis” (招待講演) *Mary Curie Institute 12th Epigenetics Course*. (March 2016, Paris, France)

T Kakutani “DNA methylation and transposon dynamics in Arabidopsis” (招待講演) *B-DEBATE Symposium “Evolution of Plant Phenotypes, from Genomes to Traits”* (March 2015, Barcelona, Spain)

T Kakutani “DNA methylation and TE dynamics” (招待講演) *Naito Conference “Molecular Basis for Biological Systems”* (October 2014, Sapporo)

T Kakutani “DNA methylation and TE dynamics” (招待講演) *EPIC Symposium “Epigenetic regulation of organismal function and response to the environment”* (May 2014, Philadelphia, PA, USA)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: トランスジェニック植物、トランスジェニック植物の製造方法、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドのクラスター、ベクター、及びキット

発明者: 角谷徹仁、保坂碧、付ゆう、齋藤絡、佐々木卓、高嶋和哉

権利者: 大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

種類: 国内出願

番号：特願 2017-176009

出願年：2017年9月13日

国内外の別：国内

名称：トランスジェニック植物、トランスジェニック植物の製造方法、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドのクラスター、ベクター、及びキット

発明者：角谷徹仁、保坂碧、付ゆう、斎藤絡、佐々木卓、高嶋和哉

権利者：大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

種類：PCT出願

番号：PCT/JP2018/033988

出願年：2018年9月13日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~iden/>