

研究報告書

「RNA シグナルを介した DNA のメチル化の分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 3 月～平成 26 年 3 月

研究者: 菅野 達夫

1. 研究のねらい

近年、多くの真核生物で RNA 干渉等の RNA シグナルを介した‘RNA サイレンシング’と呼ばれるエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構の研究が広く、深く行われている。‘RNA サイレンシング’とは、RNA 分子によってその RNA 分子と相補性を持つ遺伝子の発現を抑制するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一つであり、植物においては、21 あるいは 22 塩基の microRNA (miRNA) あるいは miRNA によって切断された RNA から生じる 21 塩基の trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) による標的 RNA 分解経路といった転写後調節による遺伝子発現抑制経路ならびに本研究のテーマである、24 塩基の small interfering RNA (siRNA) による標的 DNA 領域上のシトシンのメチル化を介した RNA-directed DNA Methylation (RdDM) と呼ばれる転写調節による遺伝子発現抑制経路の分子機構がよく研究されている。

これまでの研究により RdDM の分子機構は、他の RNA サイレンシング経路とも共通するいくつかのタンパク質の機能ホモログに加えて、植物特異的な DNA-dependent RNA polymerase 複合体である Pol IV および Pol V 等、種々のタンパク質が同定され、その全体像が明らかになりつつある。しかしながら、現在同定されている RdDM 機構に関与するタンパク因子は(1) RNA シグナル (siRNA) 生合成に関与するものか、(2) siRNA 生合成後、ターゲットとなる DNA 領域にメチル化を導入するステップで機能するものであり、現在のところ、RdDM の開始時においてこの 2 つのステップがどのようにつながっているのか、つまり「siRNA-タンパク複合体はどのようにしてターゲットとなる DNA 領域を見つけるのか？」というステップ (RdDM 初期段階) にどのようなタンパク質が必要なのかはよく分かっていない。

本研究では、RdDM の初期段階における分子機構に関与するタンパク質の同定と植物体において RdDM 機構が果たす役割について、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) をモデル植物として用い、遺伝学的手法および生化学的手法によって明らかにしていくことを目的として研究を遂行した。

2. 研究成果

(1) 概要

RNA シグナルを介した DNA のメチル化 (RNA-directed DNA methylation: RdDM) 現象は、RNA 分子を介したエピジェネティックな遺伝子発現抑制 (RNA サイレンシング) 機構のひとつで、二本鎖 RNA が二本鎖 RNA 特異的リボヌクレアーゼによって分解され生成される 24 塩基の small interfering RNAs (siRNA) によって、その siRNA と相同性を持つ DNA 領域に存在するシトシン残基に *de novo* のメチル化が導入される現象である。

これまでに、シロイヌナズナを用いた遺伝学的、逆遺伝学的解析により RdDM の分子機

構に関与する種々のタンパク質が同定されてきたが、siRNA を含む Silencing Effector Complex がどのようにして標的となる DNA 領域にリクルートされるのかは依然として分かっていない。

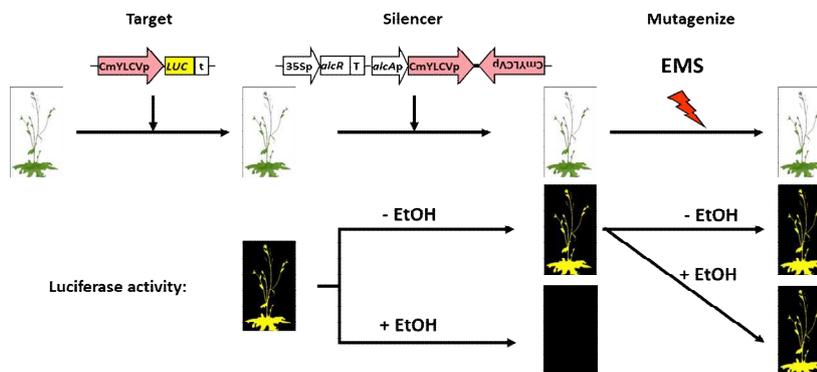
現在までに RdDM の分子機構に関与するタンパク質を検索する目的で行われてきた変異株のスクリーニングは、RdDMを既に起こしている植物体を変異処理し RdDM が解除された変異株を解析するというものである。このような手法は siRNA の生成あるいは de novo のメチル化を導入するステップの変異株を取得するには有効であるが、すでに RdDM を起こした後の植物体を変異処理しているが故に、RdDM の開始のステップに関与する変異株を取得するのに適しているとは言えない。

本研究では、誘導型のプロモーターを利用し、ターゲットとなる DNA 領域と相補性を持つ siRNA の発現を人為的に制御することによって、RdDM を起こす前の植物体に突然変異誘起処理を施し、スクリーニングによって RdDM が起きなくなった変異株を取得・解析することにより、RdDM の初期段階に関与するようなタンパク質を単離し、RdDM の分子機構の全体像を解明していくことを目的とした。

2 つ目の研究として、シロイヌナズナゲノム上で恒常的に発現している TAS 遺伝子座(これらの遺伝子の転写産物が分解されて tasiRNA となることから TAS 遺伝子と呼ばれている)に DNA のメチル化が導入されており、このメチル化には tasiRNA 生合成経路に必要なタンパク質因子および RdDM 経路に必要なタンパク質因子が必要であること、すなわち tasiRNA 生合成経路と RdDM 経路間のリンクを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ A「RdDM の初期段階における分子機構に関与するタンパク質の同定のための形質転換シロイヌナズナ株の確立」



本研究の流れを示した図

本実験系では Cestrum yellow leaf curling virus プロモーターを (CmYLCVp) を RdDM によるメチル化のターゲットプロモーターとしてレポーター遺伝子の発現に用いた。CmYLCVp プロモーターはシロイヌナズナの植物体において恒常的に働くプロモーターであるため、後の変異株単離の過程において、さまざまな成長段階あるいは器官におけるスクリーニングが可能と考えられる。このプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードする遺伝子を融合した遺伝子カセットをシロイヌナズナに形質転換を行い、ターゲット株を得た。このターゲット株に対し、サイレンサーコンストラクトとしてアルコール誘導型プロモーターあるいは

ホルモン誘導型プロモーター(図ではアルコール誘導型プロモーターを用いたコンストラクトのみを示した)の下流にCmYLCVpを逆位反復配列の形で接続したコンストラクトを形質転換し、二つのトランスジーンを持つ二重形質転換シロイヌナズナを作成した。この二重形質転換体では、サイレンサー由来の小分子 RNA 存在下でターゲットプロモーターのメチル化が誘導され、ルシフェラーゼ活性の減少が観察された。

研究テーマ B「TAS 遺伝子座における DNA メチル化分子機構の解析」

植物では miRNA によって切断された RNA から生じる 21 塩基の trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) によって tasiRNA と相補性を持つ標的 RNA が分解される経路が存在している。tasiRNA は 21 塩基の小分子 RNA であり、RdDM を誘導すると考えられている 24 塩基の小分子 RNA とは異なる。一方、現在公開されているシロイヌナズナエピゲノムマップ上では恒常的に発現している TAS 遺伝子座(これらの遺伝子の転写産物が分解されて tasiRNA となることから TAS 遺伝子と呼ばれている)にシトシンのメチル化が導入されている。そこで、このメチル化がどのような経路によって誘導されるのかを tasiRNA 生合成経路に欠損を持つ種々の変異株および RdDM 経路に欠損を持つ種々の変異株を用いて解析した。その結果、そのメチル化には tasiRNA 生合成経路に由来する二本鎖 RNA および RdDM 経路に必要なタンパク質因子が必要であること、さらにはいくつかの Dicer の変異株を用いた解析により、おそらく 24 塩基のみならず 21 あるいは 22 塩基の小分子 RNA でも DNA のメチル化を誘導できることを明らかにし、これらの結果を論文発表した。

3. 今後の展開

誘導型のプロモーターを利用し、ターゲットとなる DNA 領域と相補性を持つ siRNA の発現を人為的に制御できる植物体に突然変異誘起処理を施すことが可能となっており、スクリーニングによって RdDM が起きなくなった変異株を取得・解析することにより、RdDM の開始のステップに関与するタンパク質因子を取得することができると考えられる。現時点で、「siRNA-タンパク複合体はどのようにしてターゲットとなる DNA 領域を見つけるのか？」というステップ(RdDM 初期段階)にどのようなタンパク質が必要なのかは依然としてよく分かっておらず、本研究から展開される研究成果は RdDM 分子機構の全体像を知る上で重要な知見をもたらすと考えられる。

植物において RNA 分子を介した DNA のメチル化現象はトランスポゾンや反復配列の発現抑制、種々のストレスに対する応答機構および植物の形態形成等多岐にわたってその関与が示唆されており、その分子機構の解明の重要性は、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を知るという基礎生物学的見地のみならず新しいバイオテクノロジーの開発の可能性を探るといった応用生物学的見地から見ても明らかである。

4. 評価

(1) 自己評価

RdDM 初期段階の分子機構の解明、具体的には RdDM 初期段階における分子機構に関与するタンパク質因子を遺伝学的手法によって単離・解析するという本研究の狙いに対して、上

述の結果は今後すべての研究の礎となる部分である。ただ、誘導をかけなくても小分子 RNA が生成してしまう等の事柄により、形質転換体の確立に終始してしまったのは残念である。せめてスクリーニングまではしたかったというのが本当の気持である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

RNAによって引き起こされる DNA メチレーション(RdDM)の分子メカニズムに関して、初期段階の分子機作を明らかにするために遺伝学的手法を用いて解析を進めた。そのために構築した系が有効に働くことは確かめることができたが、突然変異誘起処理により RdDM が起きなくなった変異体の取得、解析までは至らなかった。サブテーマの tasiRNA に関しては、tasiRNA を含む小分子 RNA が TAS 遺伝子領域のメチル化に関与していることを明らかにした。

RdDM の分子メカニズムを解明するための遺伝学的アプローチを行った。当初計画したエタノール誘導系が有効に働かないため、あらたな系の構築に時間を費やし当初の目的のところまで到達できなかった。計画を立てる時点で慎重に検討することが望ましい。今後研究環境の事情が許せば、所期の目的を達成すべく RdDM の開始ステップを含めた RdDM の分子機構の全体像を解明することを期待する。一方 TAS 遺伝子に関しては、TAS 経路と RdDM 経路のクロストークなど興味深い成果を得ることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kanno, T., Yoshikawa, M. and Habu, Y. (2013) Locus-Specific Requirements of DDR Complexes for Gene-Body Methylation of TAS Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 31, 1048-1052.
2. Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., Nishimura, T. (2012) DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol.*, 53, 766-784.
3. Naumann, U., Daxinger, L., Kanno, T., Eun, C., Long, Q., Lorkovic, Z.J., Matzke, M., Matzke, A.J. (2011) Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 187, 977-979.
4. Kanno, T., Habu, Y. (2011) siRNA-mediated chromatin maintenance and its function in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta.*, 1809, 444-451.
5. Yoshikawa, M., Kanno, T., Habu, Y. (2011) Two types of RNA silencing in plants: Post-transcriptional gene silencing and transcriptional gene silencing. *Cell Technology*, 30, 706-711.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Dec. 2013: 36th Annual meeting of the molecular biology society of Japan (Kobe JAPAN;
Invited speaker)

Dec. 2012: 35th Annual meeting of the molecular biology society of Japan (Hakata JAPAN;
poster and oral presentation)

Jun. 2012: Seminar at Tokyo University of Agriculture and Technology (Tokyo, Japan)

May 2011: Seminar at National Institute of Agrobiological Sciences (Ibaraki, Japan)

Mar. 2011: 52nd Annual meeting of the Japanese society of Plant Physiology (Miyagi, Japan;
Invited speaker)