

研究報告書

「DNA メチル化の下流で働く作用メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 西村 泰介

1. 研究のねらい

DNA メチル化は哺乳動物と植物で共通に観察されるエピジェティック修飾と呼ばれるクロマチン修飾の1つであり、DNA メチル化酵素の働きにより、DNA 複製後も、特に植物では次世代においても、その修飾パターンが維持される。プロモーター領域におけるDNA メチル化は遺伝子発現の抑制(Transcriptional Gene Silencing, TGS)を引き起こすことが知られており、DNA メチル化のパターンが、遺伝子の発現パターンに密接に関連づけられると考えられている。これまで哺乳動物・植物を用いた研究により、確立・維持・解除と言った DNA メチル化の制御に関与する因子が次第に解明され、哺乳動物-植物間で共通の機構が少なからず存在することが明らかになっている。

このように、DNA メチル化自体の制御、つまり上流の作用メカニズムについては解明が進む一方で、下流の作用メカニズム、つまり DNA メチル化のシグナルがどのようにクロマチン構造に影響を与え、最終的に遺伝子の発現を変化させるのかは、哺乳動物、植物を通して、ほとんど明らかにされていない。しかしながら、エピジェネティック修飾やクロマチン構造の変化と遺伝子の発現制御の関連というエピジェネティクスの本質を理解する上で、この過程は解明されるべき課題であり、その全容の解明が待たれている。

未知の経路の新規因子の同定には、順遺伝学アプローチによる突然変異体の探索が非常に有効であるが、哺乳動物の DNA メチル化関連因子の突然変異体は、しばしば胚性致死の表現型を示し、遺伝解析が困難である。そこで本研究では、遺伝解析の容易なモデル植物シロイヌナズナを研究材料に用いて、DNA メチル化の下流に作用する候補因子の突然変異体を新規方法により選抜し、これらの候補因子を同定、解析することにより、DNA メチル化から遺伝子の発現制御までの作用メカニズムを明らかにすることを旨とする。

2. 研究成果

(1) 概要

シロイヌナズナの TGS 因子 MOM1 の突然変異体では、TGS は解除されるが DNA メチル化は変化しない。このことから MOM1 は DNA メチル化の下流で作用する因子の候補と考えられる。本研究ではさらに多くの下流候補因子を単離する事を目的に、*mom1* 突然変異体の抑圧変異体 *smom* を複数単離し、その内の *smom3* 突然変異体に特に着目して解析を行った。CG メチル化酵素の変異体 *met1* や非 CG メチル化酵素の二重変異体 *drm2 cmt3* では、それぞれ CG メチル化と非 CG メチル化が減少し、ヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除されるが、これらの変異体背景でさらに *smom3* 突然変異を導入すると、これらのヘテロクロマチン遺伝子の発現が再び抑制された。しかしこれらの遺伝子では発現が再抑制されているにも関わらず、DNA メ

チル化は減少したままであった。これらの遺伝解析結果から SMOM3 は DNA メチル化の下流でヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御していると予想される。原因遺伝子を同定した結果、SMOM3 遺伝子のコードするタンパク質は、原核生物のメチル化酵素の活性ドメインと似たドメインを持っていた。ヒトを含めた真核生物でも同様のドメインを持つホモログが見出されたが、真核生物での分子機能は明らかにされておらず、このタンパク質が遺伝子発現制御に関与する事が示されたのは本研究が初めてである。また DNA メチル化による遺伝子発現制御機構を持たない分裂酵母でもこのドメインを持つホモログが存在する。このホモログの遺伝子破壊株を作製して観察したところ、RNAi 経路に関与する因子の遺伝子破壊株で TGS が解除されたヘテロクロマチン遺伝子の発現を抑制した。この結果から SMOM3 のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御するという機能は分裂酵母と植物で保存されている事が示された。

(2) 詳細

下流因子の同定を目的とした順遺伝学的探索方法の1つとして、既知の DNA メチル化制御因子の突然変異体に対する抑圧変異体を探索する方法が考えられる。例えば、DNA メチル化維持酵素 Dnmt1 ホモログの欠失したシロイヌナズナ *met1* 突然変異体では、CG メチル化が減少し、ヘテロクロマチン遺伝子における TGS が維持できないが、再び TGS が維持されるようになる抑圧変異は、DNA メチル化の下流因子に誘発された突然変異であることが期待される。しかしながら *met1* のような CG メチル化が減少するような突然変異体では、生育に大きな影響が見られる上に、TGS が解除された遺伝子座の発現は、*met1* 突然変異と独立に振る舞いかつ不安定で、通常の遺伝様式に従わない事から、*met1* 突然変異体に対する抑圧変異の探索を困難にしている。そこで本研究では、DNA メチル化の下流で作用する候補因子 MOM1 の突然変異体に着目して、その抑圧変異体 (*suppressor of mom1*, *smom*) を探索するというアプローチにより、DNA メチル化の下流で作用する候補因子をさらに同定し、その機能解析を行った。

(a) *smom* 突然変異体の探索と遺伝解析

mom1 突然変異体では、DNA メチル化に変化が観察されることなくヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除される。この *mom1* 突然変異体に化学変異原処理を施し、再び TGS が引き起こされる変異体系統を 12 系統独立に単離した (*smom1* から 12 まで)。 *mom1* 突然変異体への戻し交配と連鎖解析を行う事で、*smom1*、2、4 は優性、残りは劣性の変異体であり、その中でも少なくとも *smom2*、3、6 は 1 遺伝子座に起因するもので、それぞれ 1 番、2 番、3 番染色体上に座乗する可能性が高い事が示された。また突然変異体同士を交配して相補性を試験したところ、*smom3*、5、12 は雑種 1 代目で表現型が相補できず、同じ遺伝子に変異が生じている事が示された。そこで複数の変異アリルが存在する *smom3*、5、12 (それぞれ *smom3-1*、*3-2*、*3-3* に改名) に焦点を当てて解析を進めた。

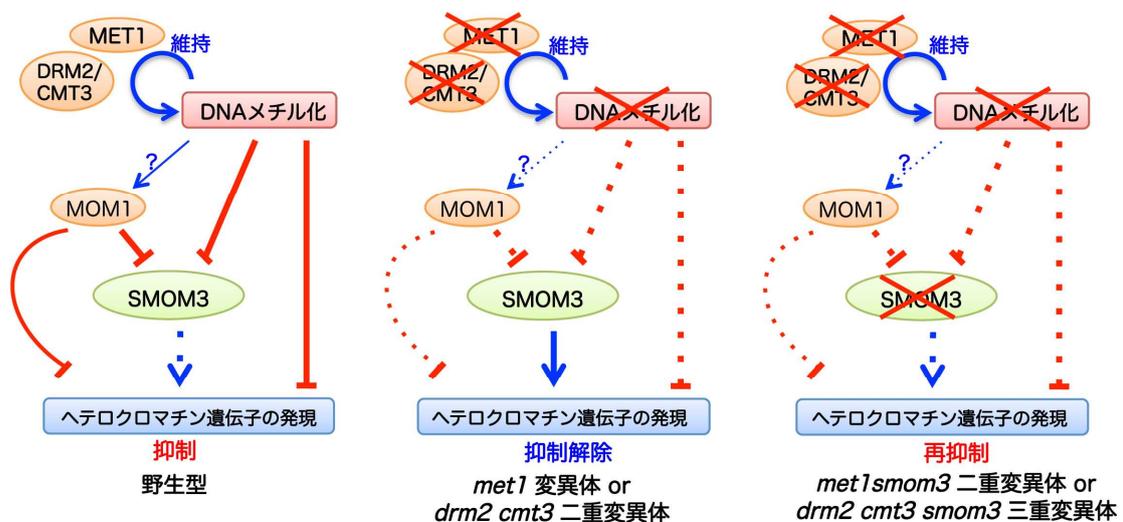
(b) DNA メチル化酵素突然変異体と *smom3* 突然変異体との遺伝的相互作用の解析

SMOM3 タンパク質が DNA メチル化による遺伝子発現制御にどのように関与するかを調べるために、*smom3* 突然変異体と DNA メチル化酵素の突然変異体に交配し、二重・三重突然変異体の表現型を観察した。CG メチル化の維持に作用する MET1 の突然変異体では、CG メチル

化が減少し、セントロメアリピートやトランスポゾンといったヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除されるが、*met1 smom3* 二重突然変異体では、これらのヘテロクロマチン遺伝子の発現が抑制された。発現が再抑制されるトランスポゾンの1つ *MULE-F19G14* では、*met1 smom3* 二重突然変異体でも CG メチル化は低下したままであった。これらの遺伝解析結果から *SMOM3* は CG メチル化の下流で、ヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子である事が示唆された。

一方、非 CG メチル化の維持に作用する DNA メチル化酵素である *DRM2* と *CMT3* の二重変異体では、*SDC* 遺伝子などの非 CG メチル化によって発現が抑制されているヘテロクロマチン遺伝子の非 CG メチル化が減少し TGS が解除されるが、*drm2 cmt3 smom3* 三重突然変異体では、これらの遺伝子の発現が再抑制された。このように発現が抑制されるにも関わらず、この三重突然変異体でも *SDC* 遺伝子のプロモーター領域における非 CG メチル化は減少したままであった。しかしながら非 CG メチル化によって TGS が維持される遺伝子の発現全てに *SMOM3* が関与するわけではなく、野生型と比べて *drm2 cmt3* 二重突然変異体で TGS が解除される 200 の遺伝子の内、*drm2 cmt3 smom3* 三重突然変異体では、53 の遺伝子だけが有意に発現が抑制されていることが明らかになった。これらの結果から *SMOM3* は非 CG メチル化に制御される一部のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子である事が示唆された。

これらの遺伝解析の結果から予想されるモデルを図1に示す。



(c) *SMOM3* 遺伝子の同定と機能解析

連鎖解析によって *SMOM3* 遺伝子の座乗する領域を 500kb 以内に限定し、次世代シーケンサーによる *smom3-1* 突然変異体の全ゲノム配列の再決定の結果から、野生型と異なる塩基配列を持つ遺伝子を当該領域内で選び出し、*smom3-2* 突然変異体と *smom3-3* 突然変異体における塩基配列を決定したところ、これら3つの突然変異体全てで点突然変異が生じている遺伝子を見出した。この遺伝子を含む約 6kb の染色体領域を、*smom3-1* 突然変異体に形質転換したところ、この突然変異体の表現型が相補された事から、この遺伝子を *SMOM3* であると結論づけた。この *SMOM3* 遺伝子がコードするタンパク質は、原核生物で S-アデノシルメチオニン依存的にリボソーム RNA のアデニンをメチル化する酵素のメチル化活性ドメインに似たドメイン

を持つ。真核生物でも植物以外にもヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、分裂酵母などでこのドメインを持つホモログと考えられるタンパク質が存在するが、出芽酵母にはこのタンパク質のホモログは存在しない。線虫と植物では機能欠失体の報告があり、それぞれ生殖細胞系列の発生や花成の遅延という表現型を表す事が報告されている。しかし、メチル基を付与する基質などその分子としての機能については、真核生物では何も明らかになっておらず、遺伝子発現制御への関与も本研究で始めて明らかにされた。

SMOM3プロモーターに制御される SMOM3-GFP 融合遺伝子を形質転換した植物を観察したところ、植物体全身の細胞で GFP シグナルが観察され、細胞内では核内にシグナルが観察された。リボソーム RNA のプロセッシングは核小体で行われるが、特に核小体で GFP シグナルは観察されなかったことから、真核生物ではリボソーム RNA のメチル化とは別の機能を持つと予想された。

(d) 分裂酵母ホモログの解析

分裂酵母は DNA メチル化による発現抑制機構は持たないが、セントロメアリピートなどのヘテロクロマチン領域は Dcr1 や Ago1 などが関与する RNAi 経路によって TGS が維持される。SMOM3ホモログ *sth1* (*smom three homologue 1*) の遺伝子破壊株を作製し、*dcr1* Δ や *ago1* Δ との二重遺伝子破壊株を作製して観察したところ、これらの遺伝子破壊株背景で、TGS の解除されたセントロメアリピートの発現が、*sth1* Δ により抑制された。この結果から、SMOM3 のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御するという機能は DNA メチル化による発現抑制機構の無い分裂酵母でも進化的に保存されている事が示唆された。

3. 今後の展開

本研究で、新たな制御因子として SMOM3 を同定する事に成功したが、この SMOM3 の分子レベルでの機能を明らかにすることが今後は必要であろう。具体的には SMOM3 が植物でもメチル化酵素として作用するのか、また、もし作用するならばその基質は何かを解明する事が望まれる。これらの結果から DNA メチル化の遺伝子発現への作用についての新しい側面が明らかになっていくであろう。また本研究からヒトやマウスのホモログの解析に発展させることで、哺乳動物における DNA メチル化による遺伝子発現制御にも新しい展開が期待できる。本研究で単離した *smom3* 以外の *smom* 変異体についても、まだ解析が途中であるので、原因遺伝子を明らかにすることで、DNA メチル化の下流の作用メカニズムがさらに明らかにされるであろう。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究ではシロイヌナズナ突然変異体を用いることで、DNA メチル化の下流で作用する新規因子の候補 (SMOM3) を同定し、さらにこの因子のホモログタンパク質が植物以外にも存在し、分裂酵母では類似の機能を持つ事を示す事が出来た。このように、遺伝解析の容易な植

物を用いた研究を端緒に、他の生物でも機能が保存された因子を同定するという当初の目的を達成出来たと考えている。一方、今回同定した SMOM3 の分子レベルでの作用機構を生化学的アプローチで明らかにする事を試みたが、残念ながら本研究期間内には達成出来なかった。今後も研究を進めることで、SMOM3 の分子機能を解明したいと考えている。

(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)

DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子 MOM1 の突然変異体に着目して、その抑圧変異体を探索する方法で、DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子群を探索し、同定した。その中の一つ、*smom3*に着目し遺伝子解析を進めた結果、SMOM3 は CG メチル化、あるいは非 CG メチル化の下流で、ヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子であることが分かった。*smom3* 遺伝子の構造解析により、リボソーム RNA のアデニンをメチル化する酵素のメチル化活性ドメインに似たドメインを持つことが分かった。植物以外に真核生物でもこのドメインを持つタンパク質が存在することを明らかにした。

DNA メチル化下流で抑制する因子を同定し、その機構を明らかにすることをめざし一定の成果を得ることができたことは評価したい。そのために構造解析、遺伝学的解析、細胞学的解析などはなされたが、機能解析は不十分であり、今後とも生化学的に明らかにすることを期待したい。また、ほかの候補遺伝子の同定も進め、全体像が明らかになることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. Nishimura, G. Mollinard, T. J. Petty, L. Broger, C. Gabus, T. D. Halazonetis, S. Thore, *J. Paszkowski. Structural basis of transcriptional gene silencing mediated by <i>Arabidopsis</i> MOM1. <i>PLoS Genetics</i> , (2012) 8 : e1002484.
2. H. Saze, K. Tsugane, T. Kanno and *T. Nishimura. DNA methylation in plants: relationships with small RNAs and histone modifications, and functions for transposon inactivation. (Review) <i>Plant and Cell Physiology</i> , (2012) 53 , 766–784. *Corresponding author.
3.
4.
5.

(2) 特許出願

該当項目無し

(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)

国際学会発表

- 1.“A novel positive regulator for heterochromatin gene expression acting downstream of DNA methylation”, T. Nishimura, A. Yamamoto, L. Broger, G. Theiler, M. Kaufmann, Y. Tomita, K. S. Takeda, T. Tsukahara, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, J. Paszkowski, Cold Spring Harbor Asia Conferences –Plant Epigenetics, Stress and Evolution–, Suzhou (China), (2012.10). Oral presentation.

国内学会シンポジウム等の招待講演

1. 「DNA メチル化の下流で働くエピジェネティック因子」, 西村泰介, 阿蘇フロンティアサミット –植物の形作りの明日を語る–, 熊本, 2011.8
2. “The epigenetic factors acting downstream of DNA methylation in *Arabidopsis*”, T. Nishimura, L. Broger, A. Yamamoto, M. Kaufmann, Y. Tomita, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, J. Paszkowski, 第 54 回日本植物生理学会年会シンポジウム “Response to environmental/developmental signals and regulation of epigenetic state of chromatin”, 京都, 2012.3
3. 「エピジェネティクス解析手法—いくつかの具体例とともに—」, 西村泰介, 第 44 回種生物学シンポジウム, 奥滋賀, 2012.12

国内学会発表

1. 「シロイヌナズナ突然変異体を用いた DNA メチル化の下流で働く因子の解析」, 西村泰介, Larissa Broger, 山本章子, 山口勝司, 重信秀治, Jerzy Paszkowski, 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 熊本, (2011.5) ポスター発表。
2. 「新規エピジェネティック因子 SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する」, 西村泰介, 山本章子, Larissa Broger, 山口勝司, 重信秀治, Gregory Theiler, Markus Kaufmann, 加藤悦子, 富田洋子, 武田真, 服部束穂, Jerzy Paszkowski, 第 55 回日本植物生理学会年会, 岡山, (2013.3) 口頭発表。
3. 「シロイヌナズナ SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する」, 西村泰介, 山本章子, Larissa Broger, 山口勝司, 末武勲, 三島優一, 加藤悦子, 田嶋正二, 重信秀治, Jerzy Paszkowski, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良, (2013.5) ポスター発表。