

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 山崎識知

学位授与の日付 平成23年3月31日

論文名 **Analysis of transgene silencing mechanism in gentian**  
(リンドウにおける外来遺伝子発現抑制機構の解析)

論文審査委員 主査 小田 雅行  
副査 大門 弘幸  
副査 小泉 望

## 論文要旨

高等植物の遺伝子組換えは、生理学や細胞生物学などの基礎研究から分子育種などの応用研究まで広く利用される重要な技術である。しかし、シロイヌナズナなどのモデル植物と比較して、一部の植物種では組換え体の獲得が困難であり、これら植物種の組換え体を研究対象とする場合に、大きな負担となっている。組換え体の獲得が困難である背景には、外来遺伝子の発現が長期的に安定せず、結果として顕著に低い、または完全に消失してしまう発現抑制の関与が疑われる。したがって、外来遺伝子における発現抑制機構の解明は、導入遺伝子発現の安定化を図るうえで重要な知見となり、組換え体の獲得が困難な植物種を利用する研究分野の進展に貢献すると思われる。

近年、遺伝子組換えで広く利用される **Cauliflower Mosaic Virus 35S** プロモーター（以下 **35S** プロモーター）配列に特異的な、DNA メチル化を伴う植物種特異的な外来遺伝子発現抑制現象が、花卉園芸植物のリンドウ（*Gentiana triflora* × *G. scabra*）において報告された（Mishiba *et al.*, 2005）。この発現抑制現象では、シングルコピーで導入された **35S** プロモーターが、導入された染色体位置やコピー数非依存的に DNA メチル化されることで、コード配列の転写が抑制されることが明らかになった。一方、同様の外来遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナやタバコにシングルコピーで導入した場合、この様な配列特異的な発現抑制現象は認められなかった。

本研究は、このリンドウ特異的な外来遺伝子発現抑制現象の制御機構や分子機構を解明することを目的としている。また本研究で得られた知見は、モデル植物種以外の植物種における分子育種への貢献が期待される。

## 第1章 リンドウにおける 35S プロモーター配列特異的な高頻度 DNA メチル化を伴った外来遺伝子発現抑制現象の発見

Mishiba ら (2005) により報告されたリンドウの外来遺伝子発現抑制では、T-DNA 領域内に 35S プロモーターを 2 コピー含むタンデムリピートになっており、この構造が発現抑制を誘導する可能性が想定された。そこで、単一の 35S プロモーターを含むコンストラクトをシングルコピーで導入したリンドウ形質転換体を新規に作出し、導入遺伝子の発現および DNA のメチル化解析を行った。その結果、同様の DNA メチル化を伴う外来遺伝子発現抑制現象が認められたことから、リンドウでは 35S プロモーター配列が特異的に認識されてメチル化されることが明らかとなった。

## 第2章 発現抑制レベルの異なる組換え培養細胞を用いた発現抑制機構の解析

リンドウでは、35S プロモーターを導入した全ての組換え植物体で発現抑制が起きるので、コントロールを用いた比較実験が長らく困難であった。本章では発現抑制が解除されたリンドウの懸濁培養細胞系を樹立し、これを用いて導入遺伝子のエピジェネティックな抑制機構の解析を試みた。

本実験に供試した懸濁培養細胞は、同一の組換え細胞由来でありながら、導入遺伝子 (35S-*sGFP*) の発現抑制レベルが異なる。初代培養細胞 (PS) では GFP 蛍光および *sGFP* mRNA の発現が確認されたが、再誘導培養細胞 (RS) ではそれらが検出されず、形質転換植物体と同様の発現抑制が認められた。35S プロモーター領域 (-257 から +110) における DNA メチル化頻度を解析したところ、PS では低レベルのメチル化であったが、RS では形質転換植物体と同様のパターンで高頻度の DNA メチル化が認められた。

35S プロモーター領域におけるヒストン修飾パターンをクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により解析したところ、PS と比較して RS ではヘテロクロマチンに特徴的なヒストン H3 の低アセチル化ならびに 9 番目のリジン (K9) におけるジメチル化が見られた。一方、ユークロマチンに特徴的なヒストン修飾であるヒストン H3K4 のジメチル化が PS と比較して RS で高くなっていった。しかし、ヒストン H3K4 のトリメチル化では逆の傾向を示したため、RS におけるジメチル化 H3K4 の増加は、トリメチル化 H3K4 の脱メチル化によるものである可能性がある。また、RS に対し DNA メチル化阻害剤 (5-*aza-dC*) および脱アセチル化阻害剤 (TSA, sodium butyrate) をそれぞれ処理したところ、DNA メチル化阻害剤処理でのみ *sGFP* 発現の復帰が確認された。

以上の結果より、リンドウにおける外来遺伝子発現抑制は、35S プロモーター領域における高頻度 DNA メチル化に加えて、ヒストン H3 の脱アセチル化および K9 のジメチル化等のヒストン修飾によるヘテロクロマチン様構造の形成に起因していると考えられる。また、ヒストン脱アセチル化の解除のみでは発現抑制が解除されなかったことから、DNA メチル化の解除がリンドウにおける発現抑制解除に必須であることが示された。

## 第3章 35S エンハンサー配列特異的な *de novo* DNA メチル化誘導機構の解析

ゲノム DNA 中のシトシンメチル化は、異なる 2 タイプの DNA メチル化酵素によって触媒される。新たにメチル化を確立する *de novo* DNA メチル化酵素は、任意のシトシン残基をメチル化する。それに対して維持型 DNA メチル化酵素は、CpG および CpWpG (W: A or T) 配列のシトシンのみをメチル化するが、これら配列のメチル化がどちらのタイプの DNA メチル化酵素により

引き起こされたのかを判別することはできない。したがって、CpGやCpWpG以外のシトシン配列 [CpHpH (H: A, T or C)] に着目することで、*de novo* DNAメチル化が起きている領域を推定できると考えた。本章ではこの方法論に基づいて、リンドウに導入された外来遺伝子で *de novo* DNAメチル化のターゲットとなる領域の推定を試みた。

第1章で用いた植物体における *de novo* DNAメチル化頻度は、解析した全ての系統において 35Sプロモーターの-148から-85領域で高頻度を示し、35Sエンハンサー領域のみを導入した組換え体においても同様の現象が見られた。一方、第2章で用いたPSは35Sプロモーターの低メチル化が認められたが、植物体で見出された領域 (-148から-85) における *de novo* DNAメチル化は低頻度ながら観察された。またPSではヒストンの脱アセチル化が起きていないため、ヒストン修飾よりも先に *de novo* DNAメチル化が起きていることが示唆された。以上の結果から35Sエンハンサーの-148から-85領域が *de novo* DNAメチル化の引き金になっていることが示唆された。

そこで、*de novo* DNAメチル化頻度の高い領域が他に存在しないか確認するために、組換えリンドウ植物体に導入したT-DNA全長(約4 kb)のDNAメチル化頻度を解析した。その結果、CpGおよびCpWpGの高頻度メチル化は*sGFP*領域を除いて広く見られたが、CpHpHのメチル化分布は35Sエンハンサーにおいて2カ所のピークのみが明確に示された。すなわち、これまでに見出された領域 (-148から-85)に加えて、その5'側上流域 (-298から-241) が *de novo* DNAメチル化の初期標的位置であると推察された。

一方、配列特異的なDNAメチル化を誘導する候補因子として低分子RNA (siRNA) が考えられるが、非組換えおよび組換えリンドウにおいて、35Sプロモーター配列に相同性のあるsiRNAは検出されなかった。それ以外の可能性として、*de novo* DNAメチル化の初期標的位置に結合するリンドウ内在のDNA結合因子が、*de novo* DNAメチル化酵素を直接、または間接的に誘導するモデルが考えられる。このことを検証するために、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) によって、リンドウおよびタバコの核タンパク抽出物に対して顕著なバンドシフトの差異がみられる領域を探索した。その結果、*de novo* DNAメチル化の2つのピーク領域にそれぞれ一致する、-149から-124、および、-275から-250領域のプロープにおいて、バンドシフトが見出された。さらにこれらプロープの競合アッセイにより、両領域に共通して結合する核因子の存在が確認された。これら両領域には、GTGGAAAA (SV40エンハンサー領域類似配列) およびGAAGAの二つの配列が隣接して存在していることが判明した。

## 総括

リンドウで見出された35Sエンハンサー配列特異的なDNAメチル化を伴う外来遺伝子発現抑制は、*de novo* DNAメチル化が引き金となり、ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾が生じることにより引き起こされることが示唆された。また、35Sプロモーターのエンハンサーに存在する2カ所のGTGGAAAAおよびGAAGA配列が隣接する領域 (-149から-124、および-275から-250) が、発現抑制の初期誘導に関与するリンドウ内在の核因子の結合領域となり、その結合因子が直接的あるいは間接的に *de novo* DNAメチル化酵素をリクルートするという、これまで高等植物で見出されていない新規の経路が推定された。

## 審査結果の要旨

本論文では、花卉園芸植物であるリンドウ (*Gentiana triflora* × *G. scabra*) で観察された、高等植物の遺伝子組換えで広く利用される Cauliflower Mosaic Virus 35S (以下 35S) プロモーター配列に特異的な、DNA メチル化を伴う外来遺伝子の発現抑制現象を解析した。これまでの研究で、この発現抑制現象は 35S プロモーターを含む外来遺伝子が導入された組換えリンドウで DNA メチル化を伴う発現抑制が生じる一方で、同様の外来遺伝子をモデル植物であるタバコに導入した場合には、発現抑制現象が認められないことが判明している。本論文では、このリンドウ特異的な外来遺伝子発現抑制現象の分子機構を解明することを目的として、組換えリンドウやタバコを用いた分子生物学的解析を試みた。

第 1 章では、これまでに報告されたリンドウの発現抑制では、35S プロモーターをタンデムリピートで 2 コピー持つ導入遺伝子を解析対象としていることから、この構造が発現抑制を誘導する可能性について検討した。単一の 35S プロモーターをもつ T-DNA をシングルコピーで導入したリンドウ形質転換体を作成し、導入遺伝子の発現および DNA のメチル化解析を行った結果、これらの組換え体においても 35S プロモーター配列の高度な DNA メチル化を伴う発現抑制が認められた。このことから、リンドウではゲノムに導入された 35S プロモーターが、配列特異的にメチル化されることが明らかとなった。また、同一のベクターを導入した組換えタバコでは発現抑制が起きなかったことから、植物種特異的な発現抑制機構であることが推定された。

第 2 章では、同一の組換えイベントに由来しながら、導入遺伝子 (35S-*sGFP*) の発現抑制レベルが異なるリンドウの懸濁培養細胞系を樹立し、これらを用いて導入遺伝子のエピジェネティックな抑制機構の解析を試みた。初代培養細胞 (PS) では、GFP 蛍光および *sGFP* mRNA の発現と 35S プロモーターの低メチル化が確認されたが、再誘導培養細胞 (RS) ではそれらが検出されず、形質転換植物体と同様の発現抑制と高メチル化が認められた。これら培養細胞について 35S プロモーター領域におけるヒストン修飾パターンをクロマチン免疫沈降法により解析したところ、PS と比較して RS ではヒストン H3 の低アセチル化、ならびに 9 番目のリジンにおけるジメチル化が認められた。これらの結果より、リンドウに導入された 35S プロモーター領域では、DNA メチル化に加えて、ヒストン修飾によるヘテロクロマチン様構造が形成されていると考えられた。

第 3 章では、維持型 DNA メチル化酵素に捕捉される CpG や CpWpG (W: A/T) 以外のシトシン配列である CpHpH (H: A/C/T) 配列に着目することで、*de novo* DNA メチル化が起きている領域の推定を試みた。シングルコピーで 35S プロモーターが導入されている組換えリンドウでは、解析した全ての系統で 35S プロモーターの-148 から-85 領域に含まれる 11 塩基の CpHpH 配列が、共通して高頻度にメチル化されていた。さらに 35S コアプロモーター領域を除いて、エンハンサー領域のみを導入した組換え体においても、同様の高メチル化が認められた。一方、35S プロモーターの低メチル化がみられた PS でも、低頻度ながらこの領域の CpHpH メチル化が観察されたことから、ヒストン修飾よりも先に *de novo* DNA メチル化が生じていることが示唆された。さらに T-DNA 全長の CpHpH メチル化を解析した結果、もう一つの高頻度に CpHpH メチル化が生じる領域 (-298 から-241) を発見した。これら 2 つの領域に着目し、ゲルシフトアッセイによって、リンドウの核タンパク抽出物に対

してシフトバンドがみられる領域を探索した。その結果、*de novo* DNA メチル化の 2 つのピーク領域にそれぞれに一致する、-149 から-124、および-275 から-250 領域のプロープにおいてシフトバンドが見出された。これらプロープの競合アッセイにより、両領域に共通して結合する核因子の存在が確認され、さらに両領域には GTGGAAAA と GAAGA の二つの配列が隣接して存在していることが判明したことから、これら領域への核因子の結合と *de novo* DNA メチル化の関係が推定された。

本研究により、リンドウで見出された外来遺伝子の発現抑制現象が、35S エンハンサー配列特異的な *de novo* DNA メチル化と、ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾により引き起こされることが示された。さらに、*de novo* DNA メチル化が高頻度に生じる領域が、リンドウ内在の核因子との結合領域と一致することを明らかにし、DNA 結合因子が *de novo* DNA メチル化酵素をリクルートするという、これまで高等植物で見出されていない新規のサイレンシング経路を提唱した。これらの結果は、ゲノムの恒常性維持のためのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構が、植物種により異なる戦略を持つことを示す重要な知見となり、さらには高等植物の分子育種学の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。