

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12702

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18585

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾に関わる自然選択の検出

研究課題名(英文) Natural selection for maintaining epigenetic status in plants

研究代表者

宅野 将平 (Shohei, Takuno)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教(特定有期雇用)

研究者番号：20547294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム進化学にエピジェネティクスを取り入れ、ゲノム-エピゲノム間の進化的インタラクションと新たな自然選択の検出を目指して研究を行った。エピゲノムのうち、DNAメチル化に着目して研究を行った。陸上植物のDNAメチル化、特に遺伝子内メチル化に焦点を当てて、解析を行った。遺伝子内メチル化は自然選択により、長期間植物種のオーソログで保存されていた。遺伝子内メチル化レベルは、トランスポゾン増加によるDNAメチル化レベルの影響を受け進化していた。さらに、遺伝子内メチル化を保護するため、そのメチル化を持つ遺伝子のDNA配列への自然選択が検出された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is an important epigenetic modification that affects both chromatin packing and transcription. DNA methylation occurs in three sequence contexts, that is, CG, CHG, and CHH (where H is A, C, or T) in plants. All three contexts are methylated within repetitive elements. The major role of DNA methylation within repetitive elements is to silence transcription and functions as a host defense against transposons. On the other hand, only the CG context is mainly methylated within coding regions in plants that is called gene body methylation. Gene body methylation is considered a byproduct of the process of removing heterochromatic marks within active genes; gene body methylation might not be functional. However, I found that gene body methylation was observed in a biased subset of genes, tended to be conserved between plant orthologs, and the drastic changes of gene body methylation significantly affected expression levels.

研究分野：進化エピジェネティクス

キーワード：ゲノム進化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ゲノムは、生物をその生物たらしめる全ての遺伝情報と定義されており、その正体は DNA 配列である。生物進化を考えると、ゲノム進化を考えるとほぼ同義である。ゲノム進化の主な原動力は、突然変異と自然選択である。突然変異は、DNA 複製時に起こるエラーであり、DNA 配列自体が変化する。突然変異は、まれに表現型(形質)を変化させる。自然選択は、このような突然変異の運命を決定する。突然変異の影響により生存に有利な形質が生まれた時、自然選択により、その変異が後代に伝わる確率が上昇する。その結果、有利な突然変異の頻度が上昇し、種内に固定する。他方、突然変異の影響が有害である場合、後代に伝わる確率が減少し、最終的には種内から排除される。これら2つの自然選択の様式を、正あるいは負の自然選択という。

高等生物では、ゲノムは DNA 配列単体として存在していない。まず、DNA 配列とヒストンタンパク質がクロマチンという複合体を形成する。クロマチンがさらに高次構造を形成し、染色体として細胞中に存在する。この構造と、クロマチンを化学的に修飾するメカニズムは可変である。この変化は DNA 配列の変化を伴わず、ゲノムに存在する遺伝情報の適切な発現を制御する。この、「DNA 配列の変化を伴わないで次世代に伝えられる、遺伝情報発現の変化を探求する研究分野」をエピジェネティクスと呼ぶ。

研究代表者は、ゲノム進化学にエピジェネティクスを取り込んだ研究を行ってきた。クロマチンを化学的に修飾する機構はエピジェネティック修飾と称される。この修飾には、DNA メチル化、ヒストン修飾など様々なバリエーションがある。エピジェネティック修飾のゲノムワイドなパターンは、ゲノムに対し、エピゲノムと呼ばれる。このエピゲノムの進化様式は、未だ明らかになっていない。

本研究では、エピジェネティック修飾のうち、DNA メチル化に焦点を当てた。DNA メチル化のゲノムワイドなパターンをメチロームと呼ぶ。DNA メチル化は、様々な生物で見られる。高等生物では、DNA メチル化はシトシン残基で観察される。DNA メチル化は、遺伝子発現を抑制する方向に働く。例えば、ある遺伝子のプロモーターの DNA 配列が DNA メチル化の修飾を受けると、この遺伝子の発現は抑制される。また、DNA メチル化はトランスポゾン領域において、非常に高いレベルを示す。このメチル化は、トランスポゾンの発現を抑制し、トランスポゾンの転移によるホストゲノムの損傷を防いでいる。

本研究では、DNA メチル化の中でも特異な「遺伝子内メチル化」(gene body methylation)に焦点を当てた。この種の DNA メチル化は、動植物の遺伝子の転写領域に見

られる。遺伝子内メチル化には幾つの特徴がある。まず、遺伝子内メチル化のメチル化レベルは、遺伝子によって大きく異なる。また、遺伝子内メチル化は、それを持つ遺伝子の発現抑制を行わない。むしろ、遺伝子内メチル化は、高い発現量を示し、広範囲な組織で発現している遺伝子に観察される傾向にある。現在のところ、遺伝子内メチル化の機能は未知である。

2. 研究の目的

研究代表者の目的は、ゲノムとエピゲノムの進化的インタラクションを検出することにある。さらに、その中で、自然選択の役割を明らかにする。本研究では、遺伝子内メチル化の進化機構に焦点を当てた。特に、エピジェネティック修飾にかかる自然選択の検出、ゲノム-エピゲノムの共進化の解明、エピジェネティック修飾に関わる DNA 配列への自然選択の検出を行った。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子内メチル化の進化様式を明らかにするために、植物をモデル生物として用いた。陸上植物のうち、被子植物 13 種 (*Arabidopsis thaliana*、*Arabidopsis lyrata*、*Capsella grandiflora*、*Capsella rubella*、*Brachypodium distachyon*、*Populus trichocarpa*、*Glycine max*、*Zea mays*、*Oryza sativa*、*Amborella trichopoda*、*Nuphar adven*、*Aristolochia fimbriata*、*Liriodendron tulipifera*)、裸子植物 3 種 (*Cycas rumphii*、*Pinus taeda*、*Picea glauca*)、シダ植物 2 種 (*Asplenium nidus*、*Pteridium aquilinum*)、コケ植物 3 種 (*Marchantia polymorpha*、*Physcomitrella patens*、*Selaginella moellendorffii*) のメチロームを解析した。これらのメチロームは bisulfite 処理を施した DNA ライブラリーを、次世代シーケンサーで解読することで決定できる。このうち、13 種のメチロームは本研究によって決定した。残りは、NCBI などのデータベースから先行研究のデータを取得した。次世代シーケンサーによって得られたショートリードを bismark によってリファレンスゲノムにマッピングし、各シトシン残基におけるメチル化状態を推定した。リファレンスゲノムが存在しない種に関しては、代わりに EST 配列か、RNA-seq によるアッセムブリーを用いた。

これらのメチロームに加えて、ゲノム配列、遺伝子情報、RepeatMasker によって推定されたトランスポゾン情報、RNA-seq による遺伝子発現情報を網羅的に解析し、遺伝子内メチル化の進化パターンを明らかにした。

4. 研究成果

(1) 遺伝子内メチル化にかかる自然選択の検出

陸上植物全体におけるメチローム、特

に遺伝子内メチル化の進化パターンの解析を行った。サンプル全体で、6億年という長期のスパンでどのような進化が起こってきたかを調査した。陸上植物のうち、コケ植物は遺伝子内メチル化を持っていなかった。その他の被子植物、裸子植物、シダ植物では、メチル化レベルにバリエーションがあるものの、全ての種で遺伝子内メチル化が観察された。次に、コケ植物以外の植物種で、遺伝子内メチル化レベルが、オーソログで保村されている傾向を見出した。遺伝子内メチル化は機能未知であり、特定の機能を持たない可能性も指摘されてきた。しかし、遺伝子内メチル化レベルが4億年という長期に渡り保存されている傾向から、このメチル化が自然選択により保持されていることが示唆された。

遺伝子内メチル化は、オーソログ間で進化的に保存されている傾向にあるが、例外が存在する。遺伝子内メチル化を定量的ではなく、定質的に捉えた時、少数のオーソログで遺伝子内メチル化の新規獲得、あるいは消失が観察される。このような遺伝子群を解析し、遺伝子内メチル化の進化的重要性を調査した。*A. thaliana* と *A. lyrata* のオーソログ間で遺伝子内メチル化の有無が異なっている遺伝子を同定した。さらに *C. gradiflora* を外群とすることで、どちらの種で獲得または消失が起こったかを推定した。このような遺伝子内メチル化の大きな変化を伴う例外的な遺伝子を約400同定した。*A. thaliana* と *A. lyrata* の分岐年代は1,300万年前と推定されている。ここから遺伝子内メチル化の獲得・消失率を計算した。この率はおおむね突然変異率と同等であった。これらの遺伝子は重要度が低く、発現量も低い傾向にあった。このような遺伝子では、遺伝子内メチル化はそれほど重要ではないと考えられる。一方、重要性と発現量が高い遺伝子では、遺伝子内メチル化の変化が見られにくい傾向にあった。また、遺伝子内メチル化が保存されているオーソログ間での発現変化率は、メチル化が変化しているオーソログより有意に低かった。つまり、遺伝子内メチル化の変化には遺伝子発現の変化が伴い、この変化を防ぐために負の自然選択が働いている可能性が示唆された。

(2) ゲノム-エピゲノムの共進化

ゲノムとエピゲノムの進化的インタラクションの検出を行った。陸上植物のメチロームデータから、各種の全遺伝子における遺伝子内メチル化レベルの平均値に大きなバリエーションがあった。この大きなばらつきは、ゲノムサイズと関連があるという仮説を立てた。植物の

ゲノムサイズも、非常に大きなバリエーションがあることが知られている。ゲノムサイズの大きい種では、トランスポソンの割合が高くなることが知られている。また、トランスポソンはDNAメチル化レベルが非常に高い。ここから、トランスポソンの発現・転移を抑制し、ゲノムへのダメージを最小限にするために、DNAメチル化機構が効率的に働いていると推測した。仮説のとおり、遺伝子内メチル化レベルは、ゲノムサイズと強い正の相関を示した。遺伝子内メチル化自体は発現抑制の働きをしないが、ゲノムサイズの増大に引っ張られて、そのレベルが上昇してきたと考えられる。

(3) エピジェネティック修飾に関わる DNA 配列への自然選択の検出

研究代表者の先行研究で、遺伝子内メチル化を持つ遺伝子の進化速度は、持たない遺伝子の速度より有意に遅いことが明らかになっている。この現象は、DNAメチル化が突然変異原として働くという事実と矛盾する。この原因には、何らかの理由で、遺伝子内メチル化を持つ遺伝子では突然変異率が減少しているか、負の自然選択によってDNA配列が保存されている可能性が挙げられる。突然変異率の減少という仮説は、研究代表者の先行研究によって否定されている。本研究では、自然選択の仮説を検定するため、*A. thaliana* の種内多型データを解析した。遺伝子内メチル化を持つ遺伝子では、持たない遺伝子より有意に多く低頻度多型が観察された。つまり、遺伝子内メチル化を持つ遺伝子では、それらのDNA配列を保持するため、負の自然選択が働いていることが明らかになった。この結果の一般性を問うため、現在イネでも同様の解析をおこなっている。完全な結論はまだ得られていないが、シロイヌナズナと同様に負の自然選択がかかっている可能性が示唆されている。遺伝子内メチル化を持つ遺伝子に自然選択が働いている理由は明らかになっていない。近年エピジェネティック修飾の大部分は、結局のところDNA配列の情報によって決定されるという結果が発表された。この結果と、遺伝子内メチル化が進化的に重要であるという結果を合わせると、突然変異は遺伝子内メチル化になんらかのダメージを与えるため、自然選択によってそのような突然変異は種内から排除されているという可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Takuno S, Gaut BS. Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve

slowly. *Mol Biol Evol.* 29:219-227. (2012)

- ② Takuno S, Gaut BS. Gene body methylation is conserved between plant orthologs and is of evolutionary consequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:1797-1802. (2013)

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 7 件)

原著論文: 全て査読有り

1. Takahashi S, Osabe K, Fukushima N, Takuno S, Itabashi E, Miyaji N, Shimizu M, Takasaki-Yasuda T, Suzuki Y, Dennis ES, Seki M, Fujimoto R. Genome wide characterization of DNA methylation, small RNA expression, and histone H3 lysine nine di-methylation in *Brassica rapa* L. *DNA Res.* (in press).
2. Takuno S, Seymour DK, Gaut BS. The evolutionary dynamics of orthologs that shift in gene body methylation between *Arabidopsis* species. *Mol Biol Evol.* 34:1479-1491. doi: 10.1093/molbev/msx099 (2017)
3. Bousios A, Diez CM, Takuno S, Bystry V, Darzentas N, Gaut BS. A role for palindromic structures in the *cis*-region of maize Sirevirus LTRs in transposable element evolution and host epigenetic response. *Genome Res.* 26:226-237. doi: 10.1101/gr.193763.115 (2016)
4. Takuno S, Ran JH, Gaut BS. Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants. *Nat Plants.* 2:15222. doi: 10.1038/nplants.2015.222 (2016)
5. Roessler K, Takuno S, Gaut BS. CG Methylation covaries with differential gene expression between leaf and floral bud tissues of *Brachypodium distachyon*. *PLoS One.* 11:e0150002. doi: 10.1371/journal.pone.0150002 (2016)
6. 宅野将平 植物における遺伝子内メチル化の進化パターン 領域融合レビュー, 5, e009. DOI: 10.7875/leading.author.5.e009 (2016)
7. Le TN, Miyazaki Y, Takuno S, Saze H. Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 43:3911-3921. doi: 10.1093/nar/gkv258 (2015)

[学会発表] (計 6 件)

1. 宅野将平, Ran JH, Gaut BS, 陸上植物における遺伝子領域の DNA メチル化の進化パターン、日本遺伝学会第 88 大会、2016 年 9 月、静岡
2. 宅野将平, 植物における遺伝子内メチル化の進化パターン、木原生物学研究所ミニ研究集会 (招待講演)、2016 年 7 月、神奈川
3. 宅野将平, Ran JH, Gaut BS, 陸上植物におけるゲノムサイズと DNA メチル化レベルの共進化、第 10 回日本エピジェネティクス研究会、2016 年 5 月、大阪
4. Takuno S, Ran JH, Gaut BS. Evolutionary patterns of genic DNA methylation across a broad taxonomic sample of Land Plants. *Plant & Animal Genome Conference XXIV, Jan/2016, CA, USA*
5. 宅野将平, DNA メチル化と塩基配列の共進化、日本遺伝学会第 87 大会、2015 年 9 月、宮城
6. 宅野将平, 進化遺伝学とエピジェネティクス、第 9 回日本エピジェネティクス研究会 (招待講演)、2015 年 5 月、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

<https://sites.google.com/site/shoheitakuno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宅野 将平 (TAKUNO, Shohei)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教 (特定有期雇用)

研究者番号: 20547294

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

Brandon S. Gaut

University of California, Irvine ·
Department of Ecology and Evolutionary
Biology · Professor