

氏 名 齋藤 絡

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2244 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Evolution, biochemical properties and single-molecule  
dynamics of transposon-encoded anti-silencing factor

論文審査委員 主 査 前島 一博  
遺伝学専攻 教授  
小田 祥久  
遺伝学専攻 教授  
野々村 賢一  
遺伝学専攻 准教授  
村山 泰斗  
遺伝学専攻 准教授  
貴島 祐治  
北海道大学 大学院農学研究院 教授

(様式 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Saito, Raku

Title Evolution, biochemical properties and single-molecule dynamics of transposon-encoded anti-silencing factor

Transposable Elements (TEs) have a wide variety of survival strategies for each TE. Because their transposition and insertion are potentially harmful to the host, the host silences their transcriptional activity by epigenetic systems such as DNA methylation. On the other hand, our understanding of how TEs counteract host silencing, i.e., "anti-silencing" by TEs against the host, is less advanced than the control of TEs by the host. One of the few known examples of anti-silencing by TEs is caused by VANC21 protein, which is encoded in *VANDAL21* family TEs in *Arabidopsis thaliana*. Exogenous expression of *VANC21* gene induces loss of DNA methylation specifically in *VANDAL21* family TEs, which results in transcriptional re-activation of *VANDAL21*-encoded genes. Although VANC21 protein binds to the specific region of *VANDAL21* sequence, DNA de-methylation spreads over the entire *VANDAL21* sequence, which leads to robust loss of silencing. Unraveling the mechanisms behind these phenomena will advance our understanding of how TEs have proliferated in the genomes of diverse organisms. However, the study of VANC21 protein remain at the stage of discovery and many aspects have not been answered. For instance, the evolutionary aspect, the mechanism of DNA-binding, and the biochemical process from DNA-binding to de-methylation, are entirely unknown. In this doctoral thesis, I aimed to investigate three different uncovered aspect of VANC21 protein; evolution, biochemical properties and single-molecule dynamics.

I first describe basic knowledge about TEs and recent discovery about anti-silencing protein VANC21 in "Introduction" chapter. An interesting aspect of VANC21

protein is its high specificity. I introduced the recent studies about VANC21 protein with a focus on its target specificity.

To investigate the evolutionary aspect, I focused on *VANC21*-like genes of other *VANDAL* TE families that were particularly similar to VANC21 in amino acid sequence. I expressed these *VANC* genes as transgenes and analyzed DNA methylome by whole-genome bisulfite sequencing, and confirmed that one of *VANC* gene has an anti-silencing function. This gene, which I named *VANC6*, is encoded by *VANDAL6* TE family. Exogenous expression of *VANC6* induces hypomethylation specifically in *VANDAL6* and its phylogenetically closely related TE families. Although *VANDAL21* and *VANDAL6* TE families are related, the targets for de-methylation of their respective VANC proteins were different and did not affect each other. These results suggest that all *VANDAL* TE families have evolved to get *VANCs* with different target specificities.

Next, I focused on the biochemical properties of VANC protein. Using ion-exchange column chromatography and gel filtration chromatography, I successfully purified a single-band, nucleic acid-free pure VANC21 protein. I used this protein to investigate the biochemical properties such as kinetics of the reaction in binding to DNA. The kinetics of the complex of VANC21 protein and DNA showed a sigmoidal curve as the concentration of VANC21 protein increased, indicating that VANC21 proteins binds to its target DNA motif with positive cooperativity. Moreover, I found that target motif is a partial palindromic sequence. These findings suggest the VANC21-binding mode in which two VANC21 proteins bind to both strands of one single motif to form a dimer.

In the process of purifying VANC21 protein by gel filtration chromatography, I noticed that it was separated into void fractions when it contained the N-terminal and C-terminal disorder regions. In order to comprehensively analyze the role of the disorder region, I used high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). HS-AFM is the powerful and only tool available for observing the real-time, real-scale dynamics of

proteins, including intrinsically disordered proteins. By applying HS-AFM to VANC21 protein, I was able to visualize its real-time dynamics and DNA-binding mode. HS-AFM observation revealed that VANC21 protein forms multimer but exists in a monomeric form when the disorder regions were deleted. The multimeric form of VANC21 protein does not take a constant shape and VANC21 protein bound to DNA in any multimeric form. The disorder region of VANC21 have extremely acidic and basic regions and this feature is also conserved in VANC6. This suggests the electric charge bias is essential for multimerization. In addition, VANC21 proteins dynamically attach to and detach from each other. This dynamic movement of VANC21 may form the basis of the phenomenon of de-methylation at non-CG sites by VANC21 protein, which spreads over from the localization site to the entire *VANDAL21* sequence.

Based on these above findings, I propose a model that positive cooperative effects and subsequent multimerization of VANC protein contribute to its specific binding to rapidly-evolving arrays of short target motifs. This model may explain the spreading of DNA de-methylation across the entire *VANDAL21* sequence. These findings on biochemical property of VANC proteins would pave the way towards understanding the molecular basis of the elaborate survival strategy of the *VANDAL* TEs.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 齋藤 絡

論文題目 Evolution, biochemical properties and single-molecule dynamics of transposon-encoded anti-silencing factor

生命が誕生して以来、生物のゲノムは絶え間なく変化し、その変化が生物進化の原動力となってきた。ゲノムの変化は様々な要因によってもたらされるが、トランスポゾン (TE) などの反復配列はゲノム変化に大きな貢献をしてきたと考えられている。TE はゲノム中で移動したり、コピー数を増加させたりする。このような TE の転移は、多くの場合、宿主生物にとって有害であるため、TE は宿主生物によって厳密にサイレンシングされている。一方、宿主に対抗する TE によるアンチサイレンシングについての数少ない知見の 1 つは、シロイヌナズナの VANDAL21 ファミリー TE にコードされている VANC21 タンパク質によるものである。VANC21 遺伝子の exogenous 発現は、VANDAL21 ファミリー TE で DNA の脱メチル化を誘発し、VANDAL21 にコードされた遺伝子の転写再活性化をもたらす。VANC21 タンパク質は VANDAL21 配列の特定の領域に結合するが、DNA の脱メチル化は、VANDAL21 配列全体に広がり、サイレンシングが失われることが知られていた。齋藤さんはこれらの現象の背後にあるメカニズムに興味を持ち、VANC21 遺伝子の進化、生化学的特性および単一分子動態の 3 つの異なる側面から研究をおこない、主に以下のことを見出した。

1, VANDAL TE ファミリーの VANC21 様近縁遺伝子、VANC6 遺伝子の機能を解析した。その結果、VANC6 の exogenous 発現は、VANDAL6 および最も近縁の TE ファミリーでのみ低メチル化を誘導し、VANDAL21 ファミリー TE には影響を及ぼさなかった。また、脱メチル化パターンの比較と精製タンパク質の DNA 結合解析から、VANC6 はターゲット TE に存在する特異的な DNA 配列を認識することが示唆された。これらの結果は、VANDAL TE の VANC とターゲット配列の協調的な迅速進化によって、ファミリー毎に異なるターゲット特異性を持つ VANC を獲得した可能性を示唆する。

2, VANC タンパク質の生化学的性質を調べるため、高純度の VANC21 タンパク質の精製に成功し、ターゲット DNA への特異的結合における反応の速度論などを解析した。そして、VANC21 タンパク質がその標的 DNA モチーフに正の協同性で結合することを示した。また、結合モチーフが部分回文配列であることが判明した。これらの知見は、2 つの VANC21 タンパク質が単一モチーフの両方の鎖に結合して二量体を形成することを示唆している。

3, VANC21 タンパク質の N 末端と C 末端の変性領域の機能を知るため、タンパク質のリアルタイム動態を観察できる高速原子間力顕微鏡を用いて VANC21 タンパク質の挙動を解析

した。VANC21 タンパク質は多量体を形成したが、変性領域を削除すると単量体型で存在した。VANC21 タンパク質の多量体は液滴のように一定の形状をとらず、どの多量体も DNA に結合し、互いに動的に結合・解離する様子が観察された。これはゲノム上の VANC21 タンパク質局在部位から変性領域を介してタンパク質が多量体化し、VANDAL21 配列全体に広がる可能性を示唆した。

これらの一連の知見に基づき、齋藤さんは、VANC タンパク質の特異的配列結合に対する正の協同効果とそれに続く変性領域を介した多量体化が、VANC タンパク質の効率的な DNA 結合に寄与し、VANDAL21 配列全体を束ね、DNA 脱メチル化を伝播させるというモデルを提唱した。得られた成果は TE の「アンチサイレンシング」機能メカニズムの理解を深める学術上の優れた研究である。以上のことから齋藤さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。