

領域融合レビュー, 2, e001 (2013)
DOI: 10.7875/leading.author.2.e001
2013年1月15日 公開

植物の生殖過程におけるエピジェネティックな情報のリプログラミング

Epigenetic reprogramming of maternal and paternal genomes during plant sexual reproduction

木下 哲
Tetsu Kinoshita

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 植物生殖遺伝学研究チーム

要約

近年のエピジェネティクス研究の進捗により、DNA塩基配列以外の情報が遺伝情報としてはたらいっていることへの理解は急速に進んだ。しかしながら、その全容は依然として混沌としており、多くの研究者を魅惑してやまない。ここでは、多くの生命現象のなかでも、エピジェネティクスととくに関連の深い植物の生殖過程をとりあげる。植物の複雑な生殖過程において、どのような分子機構によりエピジェネティックな情報が制御されているのかを解説し、その生物学的な意義を考察する。

はじめに

暖かな春の季節になると、多くの草花がわれわれの目を楽しませてくれる。一方で、植物にとって花を咲かせることは、つぎの世代へ種子を残すための重要な営みのひとつである。このような植物の生殖過程では、おしべとめしべの相互作用により、種のアイデンティティの維持や、集団における多様性の維持に関して、驚くべきダイナミックなせめぎあいが起こっている。エピジェネティックな情報を含めた遺伝情報をどのように“正しく”伝達するか、あるいは、ある“許容範囲内”での変化を伝えるのか、また、その結果、どのような個性や多様性が付与されるのか、はたまた、世代のくり返しのはてに植物の進化に対しどのような影響をあたえるのか、その詳細はほとんど明らかになっていない。研究の進捗により、DNAのメチル化、ヒストンの修飾、低分子RNAなど、DNAの塩基配列以外のエピジェネティックな情報そのものに対する理解は深まったが、その情報が生殖過程においてどのようにリプログ

ラムング（書き換え）されるのか、現在は、新たな知見が つぎつぎと報告されるようになった段階である^{1,2)}。

一般的な植物のDNAメチル化制御に関してはほかに詳細な総説があるため³⁾、ここでは簡単に述べるにとどめるが、植物には3つのカテゴリーのDNAメチル化部位が存在する。最近では、哺乳動物でもES細胞などごく一部の細胞においてCpG配列以外の配列でのDNAメチル化がみつまっているが、植物では多くの場合、CpG配列のほか、CpHpG配列およびCpHpH配列(H=C, T, A)のシトシン塩基の5位にメチル基が付加され5-メチルシトシンとなる。シロイヌナズナでは、CpG配列はおもにDNA複製とともに一方のDNA鎖のみがメチル化したヘミメチル化部位において維持型DNAメチル化酵素MET1によりメチル化される。CpHpG配列はヒストンH3の9番目のリジン残基のメチル化を担うヒストンメチル化酵素KYPのはたらきに依存して植物に特異的なクロモメチル化酵素CMT3によりメチル化される。CpHpH配列はRdDM(RNA-directed DNA methylation, RNA指向型DNAメチル化)の機構により低分子RNAを介して*de novo*型メチル化酵素DRMによりメチル化される³⁾。

植物の生殖過程におけるエピジェネティックな情報、とりわけ、DNAのメチル化がどのように制御されるかを理解するにあたっては、被子植物の重複受精のしくみを理解することが必須である。したがって、まず、最後に参考図書としてあげた、“東山哲也: 植物の生殖細胞と受精戦略。領域融合レビュー, 1, e007 (2012)”を熟読してほしい。また、RdDMの機構に関しても、ここでは誌面の都合からくわしくは解説しないので、もう一方の参考図書、“植物におけるRNAサイレンシング機構”を熟読してほしい。そのうえで、植物の生殖過程においては、雌雄の配偶体、

受精後の胚発生および胚乳発生において、エピジェネティックな情報が制御されリプログラミングされることに理解を進めてほしい。以下、現在、明らかになりつつある、植物の生殖過程におけるエピジェネティックな制御を順に解説する。

1. 雌性配偶体における母親に由来するゲノムのエピジェネティックな制御

雌性配偶体は、めしべの奥深くに存在する胚珠組織において、大孢子母細胞の減数分裂のち 1 つだけ残される大孢子が 3 回の半数体の体細胞分裂をへることで成熟する。多くの被子植物は、卵細胞、中央細胞、2 つの助細胞、3 つの反足細胞の 8 核 7 細胞からなり、胚嚢 (embryo sac) ともよばれる (図 1)。このうち、花粉により運ばれてくる 2 つの精細胞との受精にあずかるのは卵細胞と中央細胞であり、それぞれ胚と胚乳を形成する。これらの細胞のうち、中央細胞においてもっとも顕著に DNA メチル化によるエピジェネティックな情報の変化がみられることが知られている^{4,5)}。

中央細胞におけるエピジェネティックな制御の研究の発端となったのは、インプリント遺伝子として *MEDEA* (*MEA*) 遺伝子の発見である^{6,7)}。インプリント遺伝子は、その対立遺伝子が父親から由来したか母親から由来したかに応じて遺伝子発現のオン・オフが決定される。このよ

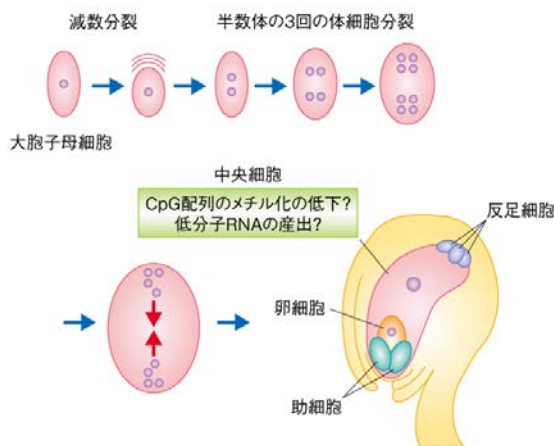


図 1 雌性配偶体の形成過程

雌性配偶体は、大孢子母細胞の減数分裂、機能的な大孢子的 3 回の体細胞分裂をへて形成される。中央細胞においては DNA 脱メチル化酵素の遺伝子が発現しており、インプリント遺伝子などを標的とする DNA 脱メチル化が起こると考えられている。雄性配偶体と異なり、雌性配偶体のそれぞれの細胞の大量分画はまだ成功していない。しかしながら、遺伝学的な解析ならびに胚乳画分を用いた解析により、中央細胞における DNA 脱メチル化、24 塩基の低分子 RNA の産出と卵細胞あるいは胚への移行、標的配列の RdDM 機構による DNA メチル化のモデルが提唱されている。

うな現象はおもに哺乳動物と被子植物においてみつかっており、ゲノムインプリンティングとよばれている⁸⁾。*MEA* 遺伝子や、機能未知の HD-ZIP 型の転写因子をコードする *FWA* 遺伝子などのインプリント遺伝子は、*DEMETER* (*DME*) 遺伝子にコードされる DNA 脱メチル化酵素により、受精前の雌性配偶体の中央細胞において DNA 脱メチル化され、遺伝子発現が誘導される^{9,10)} (図 2)。最近では、*MEA* 遺伝子に関しては DNA 脱メチル化のほかにもクロマチンのループ構造を介したエピジェネティックな制御のあることがモデルとして提唱されている¹¹⁾。さらには、マウスと同様に、次世代シーケンサーを用いた SNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) の解析から、父親に由来する対立遺伝子あるいは母親に由来する対立遺伝子に特異的に発現するインプリント遺伝子の多数の候補がみつかつてきている¹²⁾。古くは、インプリント遺伝子はシロイヌナズナを用いた変異体の研究により発見されてきた。シロイヌナズナでは、ポリコム複合体の構成タンパク質をコードする *MEA* 遺伝子と *FIS2* (*Fertilization-Independent-Seed*) 遺伝子にゲノムインプリンティングがみつかつている。また、遺伝子は異なっていたものの、単子葉植物および双子葉植物においてポリコム複合体構成タンパク質をコードする遺伝子のどれかがゲノムインプリンティングをうけていたため、哺乳動物および被子植物におけるインプリント遺伝子は、ある進化的な選択圧の結果として生じたとするコンフリクト仮説^{13,14)} を支持していた。しかしながら、次世代シーケンサーを用いた解析の結果は、イネ、シロイヌナズナ、トウモロコシのあいだで驚くほどの多様性があった¹²⁾。インプリント遺伝子がどのように生じてきたかは、今後、検証する必要があるが、いずれにせよ、植物の生殖過程におけるエピジェネティックな制御は、こうしたインプリント遺伝子の解析をモデルとして理解されるようになってきたといっても過言ではないだろう。

2. 能動的な DNA 脱メチル化の機構

DNA 複製の過程では 5-メチルシトシンは娘 DNA 鎖に取り込まれないため、DNA メチル化の維持機構がはたらかない場合には DNA 複製にともない DNA メチル化は減少していく。これを受動的 DNA 脱メチル化 (passive DNA demethylation) とよぶ。一方、DNA 複製に依存せずメチル基を積極的に取り除く機構も存在する。これを能動的な DNA 脱メチル化 (active DNA demethylation) とよぶ。

シロイヌナズナにおける *DME* 遺伝子の変異体の単離と、そののちの“能動的な” DNA 脱メチル化酵素としての *DME* の研究は、植物の生殖過程におけるエピジェネティックなリプログラミングを知るうえでひとつの突破口となった¹⁵⁾。また、哺乳動物における DNA 脱メチル化の研究にも多大な影響を及ぼした^{16,17)}。*DME* 遺伝子は比較的大きなタンパク質をコードするが、その C 末端側に塩

基除去修復にかかわる DNA グリコシラーゼとよく似たドメイン構造をもつ¹⁸⁾。シロイヌナズナにおいては 4 つのホモログ, *DME* 遺伝子, *DML2* 遺伝子, *DML3* 遺伝子, *ROS1* 遺伝子が存在する¹⁶⁾。このうち, 中央細胞において中心的な役割をはたしているのは *DME* 遺伝子である¹⁹⁾。単子葉植物であるイネにおいても, 遺伝子ターゲティングの手法を用いて *OsROS1a* 遺伝子を破壊すると, 生殖過程にシビアな影響の生じることが示されている²⁰⁾。*DME* をはじめ, これらのタンパク質にドメイン構造として存在する DNA グリコシラーゼは, 多くの生物をつうじ塩基除去修復機構においてはたらく酵素として知られている。塩基除去修復機構では, まず G/T などミスマッチ塩基の認識とその切り出しが起こり, ヌクレオチド骨格の切断, 修復 DNA の合成と DNA リガーゼによるギャップの修復が起こり, DNA 修復は完了する。シロイヌナズナにおける *ROS1* や *DME* の生化学的な解析の結果, これらのタンパク質はグアニンと 5-メチルシトシンとのペアをあたかもミスマッチペアのように認識し, 5-メチルシトシン塩基の切り出しとヌクレオチド骨格の切断を行うことが示された。したがって, これらの酵素は DNA 脱メチル化酵素であると理解されている。また, DNA リガーゼや DNA ホスファターゼなど塩基除去修復機構にかかわる酵素が, このあとの段階において DNA 脱メチル化に必要であることが示されつつあり^{21,22)}, 植物の DNA 脱メチル化は塩基除去修復機構の分子機構と類似の経路により行われていることが理解されている (図 3)。

DNA 脱メチル化の過程は, このような塩基除去修復機構による 5-メチルシトシンの除去のほかにも, DNA 脱メチル化配列の認識や決定, クロマチン構造やクロマチン機能の変化, あるいは, ヒストン修飾の変化をともなうことが予想される¹⁹⁾。最近の研究により, これらの分子機構の一端がようやくみえはじめてきていた^{23,24)}。筆者らは, さきに述べた内在性のインプリント遺伝子である *FWA* 遺伝子の発現を可視化できる *FWA-GFP* 遺伝子を利用して, ゲノムインプリンティングに異常のある変異体の選抜を行ってきた。*FWA* 遺伝子は, その 5'側の領域に SINE レトロトランスポゾンに由来すると考えられる反復配列が存在し, これがインプリンティングのシス制御領域であることが示されている²⁵⁾。この反復配列は, 通常, 高度に DNA メチル化をうけており遺伝子発現は抑制されているが, 中央細胞において *DME* により DNA 脱メチル化をうけると遺伝子発現は誘導される⁹⁾。変異体の選抜に用いたコンストラクトは, *FWA* 遺伝子のゲノムインプリンティングの制御に必要なシス制御領域を含んでいる。

こうした系を用いて, HMG ドメインをもつ *SSRP1* (*structure specific recognition protein 1*) 遺伝子がみつかった²³⁾ (新着論文レビューでも掲載)。*SSRP1* 遺伝子は FACT (facilitate to chromatin transcription/transaction) ヒストンシャペロン複合体の構成タンパク質をコードしており²⁶⁾, 酵母からヒトまで広く保存されている。*SSRP1* は SPT16 とヘテロ二量体を形成し, 転写の開始, 転写伸張, DNA 複製, DNA 修復な

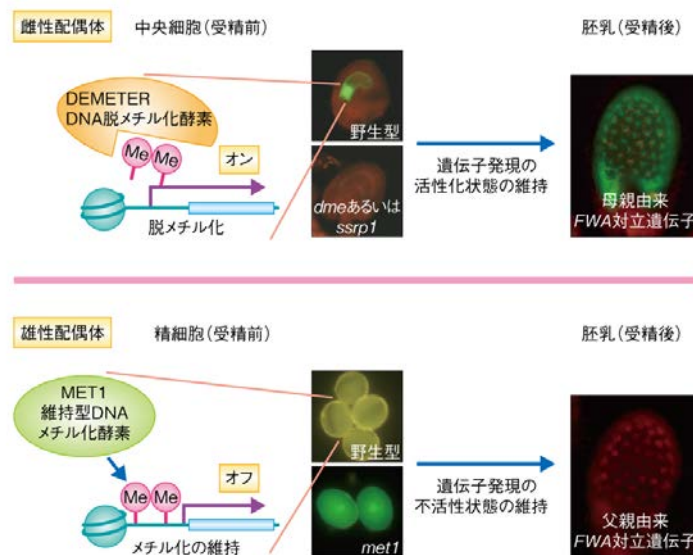


図 2 シロイヌナズナの *FWA* 遺伝子におけるゲノムインプリンティングの制御機構

雌性配偶体の中央細胞ではインプリント遺伝子である *FWA* 遺伝子の 5'側の領域の反復配列において DNA 脱メチル化が起こり, 遺伝子発現が誘導される。雄性配偶体の側では維持型 DNA メチル化酵素により DNA メチル化の情報は維持されている。雌雄とも受精前の情報が受精後の胚乳組織にエピジェネティックに伝達され, 母親に由来する対立遺伝子に特異的な遺伝子発現が観察される。なお, 卵細胞では *FWA* 遺伝子の活性化は起こらないため, 胚では父親および母親に由来する対立遺伝子はともに発現が抑制されている。

Me : 5-メチルシトシン。

ど、クロマチンの機能変換が必要な数多くの局面に登場するヒストンシャペロンであることが知られている²⁶⁾。*ssrp1* 変異体は、*FWA-GFP* 遺伝子を活性化できないことにくわえ、受精していないにもかかわらず鞘の伸張や中央細胞の核分裂がみられた。このような表現型は自発的な胚乳発生 (autonomous endosperm development) とよばれ、ほかのインプリント遺伝子である *MEA* 遺伝子の変異体などにもみられる。そのため、*FWA-GFP* 遺伝子の発現を指標に選抜した変異体ではあったが、*SSRP1* 遺伝子はほかのインプリント遺伝子の発現にも影響することが考えられた。実際に、さまざまなインプリント遺伝子の発現を調べた結果、*ssrp1* 変異体では多くのインプリント遺伝子の発現に影響のみられることがわかった。さらに、*FWA* 遺

伝子の DNA メチル化領域、すなわち、ゲノムインプリンティングのシス制御領域における DNA 脱メチル化にも影響することがわかった²³⁾。

DNA 脱メチル化研究の難問は、いつどこでどの遺伝子がどのように DNA 脱メチル化されるかという質問に生化学的にせまることがむずかしいことにある。動物および植物をつうじて、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化の起こる細胞や組織は限られている。たとえば、哺乳動物では生殖系列や受精後の初期胚など限られた細胞において能動的な DNA 脱メチル化が起こる。このことは植物においても同様であり、中央細胞は胚珠組織のなかのたった 1 個の細胞にすぎない。したがって、生化学的な解析によりこの質問にせまるためには、エピゲノム解析における解析感度の劇的な向上と、細胞の効率的な単離法の確立が必要である。一方で、栄養組織において DNA 脱メチル化にはたらく ROS1 に関しても、いつどこでどの遺伝子を DNA 脱メチル化しているかという質問に答えるのはむずかしい。このことは、いつどこでどの遺伝子がという問いに答えられる、すなわち、受精前に、中央細胞において、*FWA* 遺伝子が、DNA 脱メチル化されることの明らかな *FWA-GFP* 遺伝子を用いた系において遺伝学的な解析を行うことが現状では効果的であることを意味している。そこで筆者らは、維持型 DNA メチル化酵素 MET1 の変異体 *met1* と DNA 脱メチル化酵素 DME の変異体 *dme* との二重ヘテロ接合体を作製し、*FWA-GFP* 遺伝子の活性化にあたる影響を解析した。その結果、中央細胞において *dme* 変異体は *FWA-GFP* 遺伝子を活性化できないという表現型を、*met1* 変異体は完全に抑圧することが示された。したがって、*dme* 変異により DNA 脱メチル化のできなくなった細胞でも、あらかじめ *met1* 変異により DNA メチル化のレベルを低下させてやれば遺伝子発現は引き起こされることが示された。一方、FACT ヒストンシャペロンの構成タンパク質をコードする *SSRP1* 遺伝子の場合には、*met1* 変異体と *ssrp1* 変異体との二重ヘテロ接合体では、中央細胞における *met1* 変異による *ssrp1* 変異の抑圧効果は非常に弱く、さきほどの *met1* 変異体と *dme* 変異体との二重ヘテロ接合体の結果とは明らかに異なっていた。このことから、DNA メチル化のほか、クロマチン機能が *FWA* 遺伝子の転写に阻害的にはたらいていると考えることができ、ほかの生物において明らかになっている *SSRP1* 遺伝子の機能²⁶⁾ とよく一致した。また、中央細胞において核が分裂をはじめると、それにともない *FWA-GFP* 遺伝子の発現は徐々に強くなっていった。このことも、DNA メチル化が失われた状態で分裂をくり返すと、発現を示さないクロマチン情報も活性をもつクロマチン情報へと置き換わっていくことと一致していた²³⁾。以上の知見から、モデルをまとめた (図 4)。

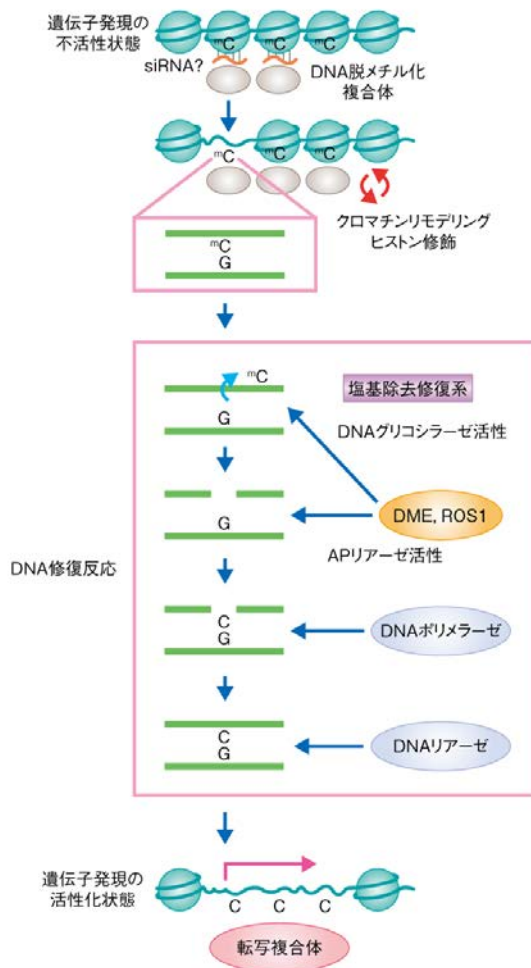


図 3 植物における DNA 脱メチル化の機構

DNA メチル化をともなって発現が抑制された状態にある遺伝子が、DNA 脱メチル化をともない活性化されて転写されるまでの過程には、まだまだ謎が多い。DME や ROS1 など DNA 脱メチル化酵素の研究を皮切りに、塩基除去修復機構が DNA 脱メチル化の過程では必須であることがわかってきている。また、クロマチンの機能変換も必要であると考えられている。

mC : 5-メチルシトシン。

3. DNA 脱メチル化酵素の変異体を利用したゲノムワイドな DNA メチル化解析

中央細胞での機能が顕著な DNA 脱メチル化酵素 DME について、シロイヌナズナの *dme* 変異体の胚乳画分におけるゲノムワイドな DNA メチル化解析がなされた。古くは、トウモロコシの胚乳を材料に DNA メチル化感受性酵素を用いてほかの組織との DNA メチル化を比較した解析から、胚乳においては母親に由来するゲノムの DNA メチル化は低下することが示されていたが²⁷⁾、その詳細は明らかではなかった。ショットガンバイサルファイトシーケンス解析から、野生型のシロイヌナズナの胚乳画分ではすべてのカテゴリーの DNA メチル化のレベルが胚画分より低いことが示された⁴⁾。また、注目すべき点は、胚画分における CpHpH 配列のメチル化のレベルは地上部の栄養組織より高いことであった。それらの多くはトランスポゾン様配列のため、中央細胞や胚乳における DNA 脱メチル化の結果、トランスポゾンの転写をひき起こし 24 塩基対の低分子 RNA が蓄積し、それが卵細胞あるいは胚へ移行してトランスポゾンの抑制を強化する、という仮説が提唱されている²⁴⁾。最新の研究では、DME の標的としているゲノム領域の詳細がみえてきている⁵⁾。DME は AT リッチな 500 bp 以下の小さなトランスポゾンを標的としている。また、これらはヘテロクロマチン領域ではなく、ヌクレオソームの少ないユークロマチン領域に局在していることが示された。

DNA 脱メチル化酵素の変異体として、栄養組織におけ

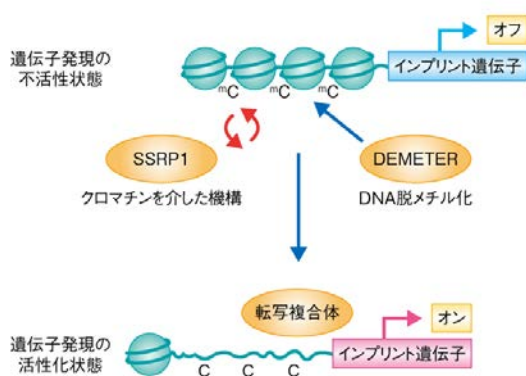


図 4 SSRP1 と DEMETER による DNA 脱メチル化と遺伝子の発現誘導のモデル

遺伝学的な解析から、DNA の脱メチル化には DEMETER を含めた塩基除去修復機構と FACT ヒストンシャペロン複合体の構成タンパク質である SSRP1 が必要と考えられる。*ssrp1* 変異体では、インプリント遺伝子である *FWA* 遺伝子の DNA 脱メチル化が誘導されないため、少なくとも DMETER を含む塩基除去修復機構のみでは DNA 脱メチル化は進行しない。SSRP1 によるクロマチンを介した機構が必要と考えられている。

^mC : 5-メチルシトシン。

る機能の顕著な *ROS1* 遺伝子、*DML2* 遺伝子、*DML3* 遺伝子に対する三重変異体を用いたゲノムワイドな DNA メチル化解析もなされている^{4,5,28)}。くわえて、*ROS1* 遺伝子の変異体の解析からも、これらのコードする DNA 脱メチル化酵素は栄養組織において過剰に亢進した有害な 5-メチルシトシンを取り除き、遺伝子発現を保証するはたらきをしていると理解されている¹⁶⁾。これらの結果を考えあわせると、植物の DNA メチル化の情報もダイナミックに制御されていることがわかる。

4. 雄性配偶体におけるエピジェネティックな制御

植物のエピジェネティックな変異は後代に安定して伝達される例が多い²⁹⁾。DNA メチル化の情報が変化したエピジェネティック変異体は、生殖過程においてリプログラミングが起こると仮定すると、失われた DNA メチル化の情報ももとに戻るため後代に伝達されることが予想される。このため、植物の生殖過程における DNA メチル化の情報のリプログラミングは、哺乳動物とは大きく異なることが予想されていた。また、さきに述べた中央細胞における DNA 脱メチル化も、胚乳は役目をおえると退化する組織なので次世代には直接は影響しない。くわえて、受精にあずかる精核を形成する生殖系列や卵細胞への生殖系列において、微量な組織あるいは細胞に対する解析のむずかしさゆえ明確なリプログラミングに関する情報は乏しかった。しかしながら、過去には、タバコの花粉を 5-メチルシトシンの抗体により染色した結果の報告が存在する³⁰⁾。精核の前駆細胞である雄原細胞において DNA メチル化の著しく低下した像が得られており、リプログラミングの可能性を示唆していたが、抗体を使った実験のため正確な定量性に乏しくあまり考慮されてはいない。

2009 年に入ると、シロイヌナズナにおいてゲノムワイドな DNA 低メチル化を誘導するクロマチンリモデリングタンパク質 DDM1 (decreased in DNA methylation) の変異体を用いて、いちど失われた DNA メチル化の情報が復帰する領域とそうでない領域とが存在することが明らかにされた³¹⁾。野生型と DNA メチル化の低下した *ddm1* 変異体とを交配すると、*ddm1* 変異に由来するゲノム領域にもふたたび DNA メチル化がみられるようになった。また、このことは RdDM 経路の変異体では観察されないため、低分子 RNA を介した機構であることが示された³¹⁾。いつどこでという質問は残るものの、低分子 RNA を介した DNA メチル化の補償作用のあることが明らかになった。また、雄性配偶体 (花粉) において栄養細胞の核と精細胞の核とではそもそも核の大きさが異なることから、濃縮度の違いが考えられていた。シロイヌナズナでは、栄養細胞の核において DDM1 は蓄積しないこと、セントロメアに特異的なヒストン H3 のバリエーションは局在しないこと、花粉と精細胞の核に 21 塩基対の低分子 RNA が蓄積すること、などがあいついで報告された^{32,33)}。これらのことから、

栄養細胞ではゲノムワイドな DNA 低メチル化の起こること、同時に観察される 21 塩基対の低分子 RNA により精細胞におけるトランスポゾンが抑制されること、がモデルとして提唱された³²⁾。

2012 年に入り、このモデルを支持するばかりでなく、さらに画期的な発見を報告する論文が発表された³⁴⁾。花粉において栄養細胞の核と精細胞の核、さらには、両者の前駆細胞である小孢子細胞の核をセルソーターにより分収し、ゲノムワイドな DNA メチル化解析ならびに低分子 RNA の解析が行われた。DNA メチル化解析では、ショットガンパイサルファイトシークエンスによるデータをもとに、DNA メチル化の程度に統計的に有意差のある領域 (DMR: differentially methylated region) を決定している。その結果、CpG 配列に関しては、これらの細胞のゲノムのあいだでは DMR は明確に同定されるが、同定された DMR は比較的少ないことがわかった。すなわち、哺乳動物の生殖系列では CpG 配列のメチル化がゲノムワイドに著しく低下することとは現象を異にしていた。また、CpHpG 配列にはこれらの細胞において顕著な DMR は観察されていない。一方で、CpHpH 配列に関しては小孢子細胞の段階ですでにその DNA メチル化の情報が劇的に失われていることが明らかになった。このことは、*de novo* 型 DNA メチル化酵素 DRM2 の蓄積が小孢子細胞にみられないことから支持された。一方、栄養細胞ではほかの細胞と比較して CpHpH 配列のメチル化がふたたび高くなっており、このことは DRM2 の局在パターンとも一致していたため、新規の DNA メチル化の起こっていることが予想された。すなわち、雄性配偶体 (花粉) は、細胞のタイプごと、また、DNA メチル化のカテゴリーごとに異なる制御の起こっていることがわかる。

5. 雄性配偶体におけるインプリント遺伝子の制御

さて、つぎの質問は、雄性配偶体の形成過程においてインプリント遺伝子はどのような制御をうけるかである。栄養細胞の CpG 配列は、DNA 脱メチル化をうける程度は限定されるものの、精細胞とは明確な差がある。また、これらの多くは DNA 脱メチル化酵素の標的配列とオーバーラップしていることが明らかになった³⁴⁾。これまでに、DNA 脱メチル化酵素の花粉における機能は明確には報告されていなかったが、最近になり、*dme* 変異体では花粉の発芽率が低下するという報告がなされた³⁵⁾。この表現型との因果関係は明らかになっていないが、栄養細胞と精細胞とで DNA メチル化を比較すると、インプリント遺伝子である *FWA* 遺伝子のシス制御領域、また、同じくインプリント遺伝子である *MEA* 遺伝子の 5'側の領域と 3'側の領域の CpG 配列のメチル化が栄養細胞において低下していることが明らかになっている³⁵⁾。母親に由来する対立遺伝子に特異的に発現する *FWA* 遺伝子や *MEA* 遺伝子の活性化は、雌性配偶体の中央細胞に発現する DNA 脱メチル化

酵素をコードする *DME* 遺伝子に依存している。一方で、DNA 脱メチル化酵素が父親の側でもはたらいていることは、いっけん奇妙な現象である。しかしながらこれも、遺伝情報を伝達しない栄養細胞における DNA 脱メチル化であることに注意する必要があるだろう。低分子 RNA の蓄積を解析したデータでは、精細胞において母親に由来する対立遺伝子に特異的に発現するインプリント遺伝子の DMR にくわえて、父親に由来する対立遺伝子に特異的に発現するインプリント遺伝子の DMR に一致する、24 塩基の低分子 RNA の蓄積がみられる³⁴⁾。これらの低分子 RNA の由来は栄養細胞であると考えられている。また、精細胞において CpG 配列あるいは CpHpH 配列に対する DMR に一致する低分子 RNA は、種子と比較して、21 塩基の低分子 RNA がより多く検出されている。これらの 21 塩基あるいは 24 塩基の低分子 RNA は、栄養細胞の核において産出され精細胞の核へと移行して、それぞれトランスポゾンやインプリント遺伝子を制御していると考えられている。すなわち、雌性配偶体と同様に、遺伝情報を伝達する精細胞におけるエピゲノム情報をより強固に補強していると考えられている。

哺乳動物ではインプリント遺伝子のリプログラミングは生殖系列で起こる。生殖系列においては、前の世代の DNA メチル化の情報をいったん消去して、雌雄の生殖系列ごとに *de novo* 型メチル化酵素により DNA メチル化が書き込まれることによりリプログラミングは完了する。書き込まれたインプリント遺伝子の DNA メチル化の情報は、受精卵におけるゲノムワイドな DNA 脱メチル化から保護され、体細胞へと受け継がれることにより片親性の発現が維持される²⁾。一方で、シロイヌナズナの母親に由来する対立遺伝子に特異的な *FWA* 遺伝子や *MEA* 遺伝子に関して、父親に由来する対立遺伝子の不活性化は *de novo* 型メチル化酵素をコードする *DRM1* 遺伝子および *DRM2* 遺伝子には依存しないことが示されており^{9,36)}、DNA メチル化の書き込みのプロセスは必要ないと考えられている。つまり、動物および植物におけるゲノムインプリンティングでは、DNA メチル化はエピジェネティックな情報として共通して利用されているが、その制御機構は異なることが示されている。シロイヌナズナにおけるインプリント遺伝子の DNA メチル化の制御は、さきに述べたように、不活性化されている遺伝子を母親の側の中央細胞において DNA 脱メチル化することにより行われている。*FWA* 遺伝子は、雄性配偶体における CpG 配列のメチル化の維持が遺伝子の発現抑制に重要であることが示されているため³⁷⁾、精細胞の CpHpH 配列におけるゲノムワイドな DNA メチル化の消失の影響はうけないと考えられ、結果と矛盾はない。一方で、最近のゲノムワイド解析により同定されたインプリント遺伝子である *SDC* (*Suppressor of drm1 drm2 cmt3*) 遺伝子は、プロモーター配列に存在する反復配列のシトシンが RdDM 経路に依存して DNA メチル化

されていることが知られている。おそらく、この配列が *SDC* 遺伝子のゲノムインプリンティングにおけるシス制御領域と考えられる。驚いたことに、*SDC* 遺伝子のこの領域の DNA メチル化は、精細胞の CpHpH 配列におけるゲノムワイドな DNA メチル化の消失から保護されていることが示された³⁴⁾。哺乳動物ではゲノムワイドな DNA 脱メチル化から必要なメチル化情報を保護する機構が示されており、関連した機構が植物からもみつかると可能性がある。

6. 受精後のエピジェネティックな制御

受精後の胚発生のステージをおってさまざまな遺伝子の DNA メチル化について解析したデータから、胚発生ステージにおいて CpHpH 配列のメチル化のレベルの上昇が観察されている³⁸⁾ (図 5)。また、このことはゲノムワイドなデータによっても裏づけられている⁴⁾。生殖過程におけるエピジェネティックな制御が受精後のエピジェネティックな制御に影響する例として、ショウジョウバエの雑種致死現象 (hybrid dysgenesis) があげられる。また、この現象はしばしば植物の生殖過程における低分子 RNA の制御と比較して論じられている⁹⁾。シロイヌナズナの胚発生の過程における CpHpH 配列のメチル化は RdDM を介し低分子 RNA により制御されている³⁸⁾。また、胚乳発生前に原因をもとめられる現象、たとえば、倍数体のあいだの交雑にも低分子 RNA が関与しており、種子サイズの制御にかかわっていることが示唆されている³⁹⁾。種子の成熟の過程では母親に由来する低分子 RNA が顕著に蓄積し

ており⁴⁰⁾、このこととの関連も興味深い。

おわりに

これまで述べてきたように、次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析などをとおして、植物の雄性配偶体の栄養細胞と精細胞という 2 種の細胞種における、3 つのカテゴリーの DNA メチル化の制御が明らかになってきた。精細胞における CpHpH 配列のメチル化の消失と受精後のリプログラミングの機構、生殖に対し付随的な機能をもつ栄養細胞における CpG 配列の DNA 脱メチル化の機構、そして、精細胞との低分子 RNA のやりとりの結果もたらされるゲノムの安定性、これらの過程の生物学的な意義についても、今後ますます理解されることと予想される。これらの研究の突破口となったのは、いうまでもなく 1 細胞種レベルでの解析であった。つぎの課題として、さらに技術革新が必要と考えられるが、卵細胞へいたる細胞系譜におけるエピジェネティックな制御にせまる必要がある。おそらくそれは、そう遠くないうちに明らかになるであろう。

ここで解説した植物の生殖過程におけるエピジェネティックな制御機構は、シロイヌナズナのような均一なゲノム情報およびエピゲノム情報をもつモデル生物を中心に研究が進められてきた。一方で、今後は、われわれヒトを含め遺伝情報が均一ではない生物を対象に、集団および個体におけるエピゲノム情報に多様性をはらみながら、エピジェネティックな情報はどのように頑強性を維持してい

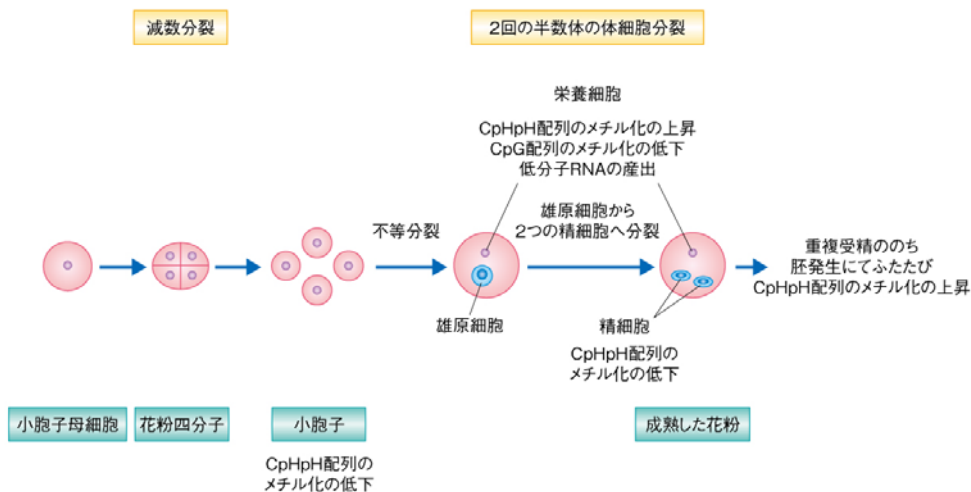


図 5 雄性配偶体の形成過程

雄性配偶体は、小孢子母細胞の減数分裂ののち、小孢子細胞の 2 回の体細胞分裂をへて形成される。1 回目の分裂では、不等分裂により栄養細胞 (花粉管細胞ともよばれる) と雄原細胞を形成する。そののち、2 回目の分裂はシロイヌナズナでは花粉の成熟のまえに起こり、雄原細胞のみ分裂して 2 つの精細胞を形成する。これらの過程では、小孢子細胞の段階で CpHpH 配列の低メチル化が観察されており、栄養細胞になると CpHpH 配列のメチル化レベルはふたたび上昇する。精細胞では CpHpH 配列のメチル化のレベルは低く、受精後の胚では CpHpH 配列のメチル化レベルはふたたび上昇するため、父親 (花粉) の側の CpHpH 配列のメチル化に関してはリプログラミングの存在が示唆されている。

るのか、また、その多様性に軋轢が発生すると有性生殖にどのような破綻をきたすのか、それらが長い年月での進化の過程にどのように影響するのか、研究の対象も広がっていくものと思われる。とくに植物は、種間や倍数体間における雑種の形成が比較的容易であり、雑種強勢の機構など、それらの過程におけるエピジェネティックな制御機構の解明が今後の課題であると考え⁴¹⁾。

文献

- 1) Bourc'his, D. & Voinnet, O.: A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science*, 330, 617-622 (2010)
- 2) Feng, S., Jacobsen, S. E. & Reik, W.: Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330, 622-627 (2010)
- 3) Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T. et al.: DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol.*, 53, 766-784 (2012)
- 4) Hsieh, T. F., Ibarra, C. A., Silva, P. et al.: Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science*, 324, 1451-1454 (2009)
- 5) Ibarra, C. A., Feng, X., Schoft, V. K. et al.: Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science*, 337, 1360-1364 (2012)
- 6) Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J. J. et al.: Imprinting of the *MEDEA* polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell*, 11, 1945-1952 (1999)
- 7) Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J. P., Hoepfner, M. A. et al.: Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science*, 280, 446-450 (1998)
- 8) Kinoshita, T., Ikeda, Y. & Ishikawa, R.: Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 19, 574-579 (2008)
- 9) Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y. et al.: One-way control of *FWA* imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science*, 303, 521-523 (2004)
- 10) Gehring, M., Huh, J. H., Hsieh, T. F. et al.: DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA* polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, 124, 495-506 (2006)
- 11) Wohrmann, H. J., Gagliardini, V., Raissig, M. T. et al.: Identification of a DNA methylation-independent imprinting control region at the *Arabidopsis MEDEA* locus. *Genes Dev.*, 26, 1837-1850 (2012)
- 12) Ikeda, Y.: Plant imprinted genes identified by genome-wide approaches and their regulatory mechanisms. *Plant Cell Physiol.*, 53, 809-816 (2012)
- 13) Haig, D. & Westoby, M.: Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 333, 1-14 (1991)
- 14) Moore, T. & Haig, D.: Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.*, 7, 45-49 (1991)
- 15) Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L. et al.: DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*, 110, 33-42 (2002)
- 16) Zhu, J. K.: Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.*, 43, 143-166 (2009)
- 17) Franchini, D. M., Schmitz, K. M. & Petersen-Mahrt, S. K.: 5-methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. *Annu. Rev. Genet.*, 46, 419-441 (2012)
- 18) Mok, Y. G., Uzawa, R., Lee, J. et al.: Domain structure of the DEMETER 5-methylcytosine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19225-19230 (2010)
- 19) Ikeda, Y. & Kinoshita, T.: DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma*, 118, 37-41 (2009)
- 20) Ono, A., Yamaguchi, K., Fukada-Tanaka, S. et al.: A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmittable to progeny. *Plant J.*, 71, 564-574 (2012)
- 21) Andreuzza, S., Li, J., Guitton, A. E. et al.: DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 137, 73-81 (2010)
- 22) Martinez-Macias, M. I., Qian, W., Miki, D. et al.: A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, 45, 357-370 (2012)
- 23) Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Susaki, D. et al.: HMG domain containing *SSRPI* is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, 21, 589-596 (2011)
- 24) Qian, W., Miki, D., Zhang, H. et al.: A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Science*, 336, 1445-1448 (2012)
- 25) Kinoshita, Y., Saze, H., Kinoshita, T. et al.: Control

of *FWA* gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. *Plant J.*, 49, 38-45 (2007)

26) Formosa, T.: The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1819, 247-255 (2012)

27) Lauria, M., Rupe, M., Guo, M. et al.: Extensive maternal DNA hypomethylation in the endosperm of *Zea mays*. *Plant Cell*, 16, 510-522 (2004)

28) Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H. et al.: DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 6752-6757 (2007)

29) Kakutani, T.: Epi-alleles in plants: inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiol.*, 43, 1106-1111 (2002)

30) Oakeley, E. J., Podesta, A. & Jost, J. P.: Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11721-11725 (1997)

31) Teixeira, F. K., Heredia, F., Sarazin, A. et al.: A role for RNAi in the selective correction of DNA methylation defects. *Science*, 323, 1600-1604 (2009)

32) Slotkin, R. K., Vaughn, M., Borges, F. et al.: Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, 136, 461-472 (2009)

33) Schoft, V. K., Chumak, N., Mosiolek, M. et al.: Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO Rep.*, 10, 1015-1021 (2009)

34) Calarco, J. P., Borges, F., Donoghue, M. T. et al.: Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell*, 151, 194-205 (2012)

35) Schoft, V. K., Chumak, N., Choi, Y. et al.: Function of the DEMETER DNA glycosylase in the *Arabidopsis thaliana* male gametophyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 8042-8047 (2011)

36) Cao, X. & Jacobsen, S. E.: Role of the *Arabidopsis DRM* methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.*, 12, 1138-1144 (2002)

37) Saze, H., Mittelsten Scheid, O. & Paszkowski, J.: Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat.*

Genet., 34, 65-69 (2003)

38) Jullien, P. E., Susaki, D., Yelagandula, R. et al.: DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 22, 1825-1830 (2012)

39) Chen, H. M., Chen, L. T., Patel, K. et al.: 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 15269-15274 (2010)

40) Mosher, R. A., Melnyk, C. W., Kelly, K. A. et al.: Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature*, 460, 283-286 (2009)

41) Ishikawa, R. & Kinoshita, T.: Epigenetic programming: the challenge to species hybridization. *Mol. Plant*, 2, 589-599 (2009)

参考図書

吉川 学, 菅野達夫, 土生芳樹: 植物における RNA サイレンシング機構: 転写後型ジーンサイレンシング (PTGS) と転写型ジーンサイレンシング (TGS). *細胞工学*, 30, 706-711 (2011)

東山哲也: 植物の生殖細胞と受精戦略. *領域融合レビュー*, 1, e007 (2012)

著者プロフィール

木下 哲 (Tetsu Kinoshita)

略歴: 1996年 総合研究大学院大学生命科学研究科博士後期課程 修了, 1998年 米国 California 大学 Berkeley 校 博士研究員, 2001年 国立遺伝学研究所 助手を経て, 2007年より奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 特任准教授 (現 研究チーム長).

研究テーマ: 植物の生殖過程におけるエピジェネティックな制御. ここでとりあげたように, エピゲノム情報がどのように維持され, 植物の営みに影響をあたえているか, シロイヌナズナ, 栽培イネと野生イネとの種間雑種などを用いて, 多くの生物にあてはめられるような共通の原理機構の解明をめざす.

研究室 URL:

<http://bsw3.naist.jp/courses/courses701.html>