

植物において siRNA が誘導する DNA とクロマチンの修飾

岡野 陽介

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座

(島本 功 教授)

平成 19 年 8 月 28 日

目次

I. 序論

II. 材料と方法

1. 植物材料
2. ターゲット遺伝子
3. 形質転換イネの作製
 - 3-1. コンストラクトの作製
 - 3-2. 形質転換イネの作製
4. GFP 蛍光の観察
5. RNA 解析
 - 5-1. total RNA の抽出法
 - 5-2. 遺伝子の発現解析法
 - 5-2a. RT-PCR
 - 5-2b. real-time RT-PCR
 - 5-3. siRNA の検出法
 - 5-3a. 低分子 RNA の精製
 - 5-3b. DNA プローブと LNA プローブを用いた siRNA のノーザン解析
6. サザン解析
 - 6-1. ゲノム DNA の抽出法
 - 6-2. サザン解析
7. DNA メチル化の解析
 - 7-1. メチル化感受性酵素を用いたサザン解析
 - 7-2. Bisulfite sequencing 法
8. ヒストン修飾の解析 (Chromatin immunoprecipitation 法)

9. 培養細胞および形質転換イネ植物体における阻害剤を用いた解析

III . 結果

1. 外来遺伝子 35S-GFP の発現解析
2. 35S プロモーターの DNA メチル化
3. 35S プロモーターのヒストン修飾
4. DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化阻害剤による解析
5. ターゲット内在遺伝子
6. ターゲット内在遺伝子の発現解析
7. ターゲット内在遺伝子の DNA メチル化
8. ターゲット内在遺伝子のヒストン修飾

IV . 考察

1. siRNA によるクロマチンの不活化
2. siRNA によりインプットされた情報のエピジェネティックな遺伝
3. siRNA によって不活化されるクロマチンの段階
4. siRNA によるクロマチンの不活化が起こらない理由
 - 4-1. siRNA によるクロマチンの不活化が起こらない理由の可能性
 - 4-2. siRNA vs ゲノム

V . 謝辞

VI . 参考文献

VII . 表

VIII . ☒

I. 序論

siRNA (small interfering RNA) は、二本鎖 RNA (double-stranded; dsRNA) から生じる 21-26 ヌクレオチドの短い RNA であり、細胞質で相同な mRNA の分解、RNA interference (RNAi) を引き起こすことで有名である (Fire et al., 1998, Tuschl et al., 1999, Hamilton et al., 2002, 図 1)。近年、RNAi 分野の研究が盛んに行なわれ、いくつかの RNAi 関連機構が発見された。その中のひとつに、siRNA が DNA メチル化やヒストン修飾を誘導し、クロマチンの不活化を引き起こす機構がある (図 1)。この siRNA のクロマチンに対する機構に関しては、特に 2 つの現象が研究されており、それらは植物における RNA-directed DNA methylation (RdDM) と分裂酵母におけるヘテロクロマチンの形成である。

RdDM は、siRNA により相同な DNA 配列のシトシン残基が新規にメチル化される現象である (Matzke et al., 2004; Wassenegger, 2005)。植物の siRNA は、そのサイズから短いクラス (21-22 nt) と長いクラス (24-26 nt) に分類されるが、RdDM には長いクラスの主に 24 nt の siRNA が機能している (Hamilton et al., 2002)。また、シロイヌナズナの解析から、レトロトランスポゾンなどのリピート配列が RdDM により不活化されており、その RdDM にはリピート配列由来の 24 nt の内在性 siRNA が関与している (Chan et al., 2005)。さらに、RNAi 関連因子の Argonaute4 (AGO4) が、内在性 siRNA を含む複合体を形成し、リピート配列における RdDM を制御していることが示唆されている (Li et al., 2006; Pontes et al., 2006; Qi et al., 2006)。シロイヌナズナでは、遺伝学的アプローチから、リピート配列における RdDM に関連する因子がいくつか同定されている (Chan et al., 2005; Elmayan et al., 2005)。

RdDM は、導入した IR (Inverted Repeat) コンストラクトが由来のいわば外来性 siRNA によっても誘導される。IR コンストラクトからの転写産物は、ヘアピン RNA の構造をとり、通常の RNAi のように Dicer のプロセッシングを受け、siRNA が産生される。Matzke のグループは、IR コンストラクトに遺伝子のプロモーター配列を用い、

ターゲット遺伝子のプロモーター配列と相同な siRNA を高蓄積させた形質転換タバコあるいはシロイヌナズナを作出した。ターゲット遺伝子として、外来遺伝子 *NOS-NPTII* と α' -*GFP* (α' プロモーターは種子特異的なプロモーター) が用いられた。これらの形質転換植物では、siRNA と相同なターゲットプロモーター領域に RdDM が誘導され、そのターゲット遺伝子の転写抑制、転写型サイレンシング (Transcriptional gene silencing; TGS) が引き起こされる (Mette et al., 2000; Kanno et al., 2004, 図 2)。また、このようなサイレンシングは、RNA-mediated TGS と名付けられた (Matzke et al., 2004)。現在までに、他のグループの報告も合わせ、RNA-mediated TGS が、タバコ (Mette et al., 2000; Jones et al., 2001)、シロイヌナズナ (Mette et al., 2000; Melquist and Bender, 2003)、ペチュニア (Sijen et al., 2001)、トウモロコシ (Cigan et al., 2005) で起こることが確認され、3 つの外来遺伝子と 5 つの内在遺伝子に対してサイレンシングが誘導された。ヒト細胞においても、プロモーターと相同な siRNA を導入することにより、ターゲット遺伝子の TGS が誘導されることが報告されている (Morris et al., 2004; Castanotto et al., 2005; Ting et al., 2005)。哺乳類細胞では、長い dsRNA が対ウイルスの免疫反応であるインターフェロン応答の標的となるため、ヘアピン RNA が効率的に使用できない。そのため、siRNA を直接細胞にトランスフェクションする。

シロイヌナズナでは、上述した *NOS-NPTII* と α' -*GFP* をターゲットにした RNA-mediated TGS の系を用いて、遺伝学的な解析が行なわれている。これまでに、DNA メチラーゼや AGO4、クロマチンリモデリング因子などの遺伝子変異により、RNA-mediated TGS が、少なくとも RdDM のレベルに支障をきたし起きなくなることが分かっている (Jones et al., 2001; Aufsatz et al., 2002; Cao et al., 2003; Aufsatz et al., 2004; Zilberman et al., 2004; Kanno et al., 2004)。また、RNA ポリメラーゼ IV (植物特異的な RNA ポリメラーゼ, RNA polymerase IV; RNA pol IV) のサブユニットも、 α' -*GFP* の RNA-mediated TGS が起きなくなる突然変異体として単離された (Kanno et al., 2005)。RNA pol IV は、内在性 siRNA の産生の初期のステップに関与していることが示唆されている (Herr et al., 2005; Onodera et al., 2005)。

これまでにいくつかの RdDM では、ヒストン修飾が伴うことも報告されている。シロイヌナズナのレトロトランスポゾン *AtSN1* では、RdDM に加え、アクティブクロマチンのマーカーであるヒストン H3K4 のジメチル化 (H3K4me2) の減少とヘテロクロマチンマーカーであるヒストン H3K9 のジメチル化 (H3K9me2) の増加が観察される (Zilberman et al., 2003; Xie et al., 2004)。また、RNA-mediated TGS により不活化されている α' プロモーターでは、哺乳類のセントロメアで確認されるヒストン H3K27 のモノメチル化 (H3K27me1) と H3K9me2 が誘導されている (Huettel et al., 2006)。さらに、哺乳類細胞において、プロモーターと相同な siRNA により TGS が引き起こされたプロモーターでは、ポリコム群による遺伝子の不活化に関与するヒストン H3K27 のジメチル化 (H3K27me2) や H3K9me2 の増加が観察された (Ting et al., 2005; Weinberg et al., 2006)。

一方、DNA メチル化を有していないとされている分裂酵母では、内在性 siRNA が、セントロメアなどのヘテロクロマチンの形成に機能する (Martienssen et al., 2005)。分裂酵母では、セントロメアリピート由来の内在性 siRNA がクローニングされており、その内在性 siRNA を含む RNA-induced transcriptional silencing (RITS) 複合体が単離されている (Reinhart and Bartel, 2002, Verdel et al., 2004)。RITS は、H3K9me2 を誘導することにより、ヘテロクロマチン形成を開始する (Verdel et al., 2004, Martienssen et al., 2005)。また、RITS は、内在性 siRNA の産生を促進するために、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase) を核とする RNA-dependent RNA polymerase complex (RDRC) 複合体をセントロメリピートヘリクルートし、ヘテロクロマチンの形成を維持している (Martienssen et al., 2005)。内在性 siRNA がセントロメアのヘテロクロマチン形成に関与する事例は、マウス (Kanellopoulou et al., 2005)、ショウジョウバエ (Pal-Bhadra et al., 2004)、シロイヌナズナ (May et al., 2005) においても報告されている。これら植物の RdDM とセントロメアのヘテロクロマチン形成の知見から、siRNA が誘導するクロマチンの不活化では、DNA メチル化に加えヒストン修飾も重要であることが考えられている。

さて、近年さまざまな生物種において、内在性 siRNA がクローニングされており、シロイヌナズナ (Xie et al., 2004; Lu et al., 2005; Qi et al., 2006) やイネ (Sunkar et al., 2005; Nobuta et al., 2007) においても、内在性 siRNA がクローニングされた。それらの数は膨大であり、特に RdDM に関与する 24 nt の siRNA が多い。また、それら内在性 siRNA は、レトロトランスポゾンなどのリピート配列だけではなく、リピートではない遺伝子間領域や遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーターといった配列とも相同性を持つものが存在していた。また、AGO4 複合体から同定された 24 nt の siRNA の 53% は、リピートではない配列と相同であった (Qi et al., 2006)。さらに、内在性 siRNA のソースの一部として考えられているアンチセンス RNA や non-coding RNA も、さまざまなゲノム領域から転写されている (Yamada et al., 2003; Li et al., 2005)。そのため、クローニングが困難な蓄積量の低い内在性 siRNA も多く存在することが考えられる。これらのことから、内在性 siRNA は細胞内に多種存在しており、ゲノムの広範囲が siRNA と相同性を示すことが推測される。しかし、もし全ての内在性 siRNA がクロマチンに対して機能的であり、クロマチンの不活化を引き起こすならば、ゲノムは正常に機能しないかもしれない。それゆえ、siRNA の活性がどのように制御されているのか、また siRNA はどのようなゲノム領域に対してもクロマチン修飾や不活化を引き起こすのかどうかということは、重要な問題点である。

そこで、本研究ではこれらの問題点を解明するために、単子葉植物イネにおける RNA-mediated TGS の解析を行なった。これまでに、外来遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS が精力的に研究されており、内在遺伝子をターゲットにした系が詳細に解析された例はほとんどない。また、siRNA とヒストン修飾の関係が解析された報告も少ない。そこで、本研究では、35S-GFP と 7 つの内在遺伝子をターゲット遺伝子に選択し、ヒストン修飾も加えた詳細な解析を行なった。その結果、イネにおいても siRNA がクロマチンを不活化する機構が存在するが、ほとんどの内在遺伝子では RNA-mediated TGS が誘導されないことが分かった。これらの結果をもとに、本論文では、siRNA によるクロマチンの不活化について、さらにその siRNA の活性の制御

について考察する。

II. 材料と方法

1. 植物材料

- ・ 日本稲 (*Oryza sativa* L.) 品種である金南風および日本晴。
- ・ 日本稲品種の日本晴をバックグラウンドした形質転換イネ M65。T-DNA (pM65) 上に *35S-GFP* を有する (Hashizume et al, 1999)。

2. ターゲット遺伝子

ターゲット遺伝子には、外来遺伝子 *35S-GFP* と内在遺伝子 *OsRac1*、*OsRac3*、*OsRac4*、*Se5*、*Cen8-9*、*Cen8-11*、*Cen8-18* を選択した (表 1)。各遺伝子の推定転写開始点とターゲット領域の位置は図 3 に示した。

3. 形質転換イネの作製

3-1. コンストラクトの作製

各ターゲット遺伝子のターゲットプロモーター領域は、表 2 に示す PCR プライマーを用いてそれぞれ増幅した。PCR 産物を pENTR/D-TOPO cloning vector (Invitrogen) にサブクローニングし、それをエントリーベクターとした。バイナリーベクターには、pANDA もしくは pANDA- β ベクターを用いた (Miki & Shimaoto, 2004)。バイナリーベクターの作製には、LR クロナーゼ (Invitrogen) を使用し、エントリーベクター内のターゲットプロモーター領域をバイナリーベクターに導入した。外来遺伝子 *35S-GFP* をターゲットした形質転換イネの作製の際には pANDA- β ベクターを、内在遺伝子をターゲットした形質転換イネの作製の際には

pANDA ベクターを用いた。

3-2. 形質転換イネの作製

形質転換イネの作製には、アグロバクテリウム法を用いた (Hiei et al, 1994)。35S-GFP をターゲットした際には形質転換イネ M65 (Hashizume et al, 1999) を、*OsRac1*、*OsRac3*、*OsRac4*、*Se5* をターゲットした際には金南風を、*Cen8-9*、*Cen8-11*、*Cen8-18* をターゲットした際には日本晴を親株として用いた。

4. GFP 蛍光の観察

蛍光実体顕微鏡は、LEICA MZ FLIII (Leica) を用いた。蛍光フィルターは、GFP の蛍光波長約 510 nm 周辺の波長のみを通す GFP フィルターを用いた。

5. RNA 解析

5-1. total RNA の抽出法

Total RNA の抽出には、EASY Prep RNA (Takara) を用い、その方法に準じた。

5-2. 遺伝子の発現解析法

5-2a. RT-PCR

RT 反応は SuperScript II (Invitrogen) を使用し、その方法に準じた。PCR は、岡野 (2004) の方法に準じた。なお、使用したプライマーは表 2 に示した。

5-2b. real-time RT-PCR

Real-time PCR は、Miki & Shimamoto (2004) の方法に準じた。なお、使用したプライマーは表 2 に示した。

5-3. siRNA の検出法

5-3a. 低分子 RNA の精製

低分子 RNA の精製では、100 μ g の total RNA を開始量とし、Miki & Shimamoto (2004) の方法に準じた。

5-3b. siRNA のノザン解析

siRNA のノザン解析は、Miki & Shimamoto (2004) の方法に準じた。DNA プロブの作製には、各ターゲットプロモーター領域がクローニングされているエントリーベクターを用いた。LNA (Locked Nucleic Acid) プロブの作製には、3 塩基ごとにひとつの割合で LNA を用いたオリゴヌクレオチドを使用した。用いた LNA オリゴヌクレオチドは、35S-LNA probe-01-S (5'- GLgA ALaG GLcT ALtC GLtT CLaA GLaT GLcC -3'), 35S-LNA probe-01-AS (5'- GLgC ALtC TLtG ALaC GLaT ALgC CLtT TLcC -3'), 35S-LNA probe-02-S (5'- CLgT TLcC ALaC CLaC GLtC TLtC ALaA GLcA -3'), 35S-LNA probe-02-AS (5'- TLgC TLtT GLaA GLaC GLtG GLtT GLgA ALcG -3') である。LNA プロブ (10 pmol) は、T4 polynucleotide kinase (Takara) を用いて[γ -32P]ATP を末端ラベルし、MicroSpin G-25 column (GE Healthcare) で精製した。LNA プロブを用いたノザン解析では、ハイブリダイゼ

ーションバッファーに PerfectHyb-Plus (Sigma) を用いたほかは、Miki & Shimamoto (2004) の方法に準じた。

6. サザン解析法

6-1. ゲノム DNA の抽出法

ゲノム DNA の抽出は、CTAB 法により行なった (Murray & Thompson, 1980)。

6-2. サザン解析法

ゲノム DNA 10 μ g を、任意の制限酵素 (6 ~ 20 ユニット) で処理し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い 0.8% ~ 1.5% のアガロースゲルにより分離した。その後、Hybond N+メンブレンにトランスファーし、DNA プロブを用いたハイブリダイゼーションを行なった。なお、サザン解析におけるハイブリダイゼーションはノザン解析のそれと同様な方法で行なった。

7. DNA メチル化の解析

7-1. メチル化感受性酵素を用いた DNA メチル化解析法

本解析法では、まず、10 μ g のゲノム DNA を約 2 倍量 (6 ~ 20 ユニット) のメチル化感受性酵素で処理した。その後、制限酵素認識配列内のシトシンメチル化による酵素活性への影響をサザン法で検出した。

7-2. Bisulfite sequencing 法

Bisulfite 処理には、3 μ g のゲノム DNA を *Bam*HI 処理したものをいい、BisulFast DNA Modification Kit for Methylated DNA Detection (TOYOBO) を使用して行なった。その後、3 μ l の Bisulfite 処理した DNA を鋳型に PCR し、p-GEM T ベクターにクローニングした。各植物体につき 16 クローンのシーケンス解析を行なった。なお、表 2 に PCR プライマーを示す。

8. ヒストン修飾の解析 (Chromatin immunoprecipitation 法)

6 g のイネ葉身を用いて、Chromatin immunoprecipitation (ChIP)法を行なった (Nagaki et al, 2004)。また、ChIP 法に用いた抗体は、抗アセチル化ヒストン H3 (06-599; Upstate)、抗アセチル化ヒストン H4 (06-866; Upstate)、抗ジメチル化ヒストン H3Lys4 (07-030; Upstate)、抗ジメチル化ヒストン H3Lys9 (07-441; Upstate, ab7312; Abcam)、そして抗ジメチル化ヒストン H3Lys27 (07-322; Upstate) である。ChIP 解析の定量には、real-time PCR を用い、インターナルコントロールに *rice actin1* を用いた。表 2 に、使用した PCR プライマーを示した。

9. 培養細胞および形質転換イネ植物体における阻害剤を用いた解析

イネ培養細胞は、R2S 培地、30℃、恒明条件で培養した。DNA メチル化阻害剤として、5-アザシチジン (5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza); Sigma) を用い、ストック溶液を 10 mM とした。また、ヒストン脱アセチラーゼの阻害剤として、トリコスタチン A を用い、ストック溶液を 3.3 mM (trichostatin A (TSA); Wako) とした。阻害剤の処理方法は、阻害剤を含む培地で最初の 4 日間を培養し、その後は阻害剤を含まない通常の培地で培養した。各阻害剤の最終濃度は、5-Aza が 300 μ M、TSA が 200 nM、mock が 0.1%エタノールとした。一方、形質転換イネ植物

体を用いた解析では、阻害剤を加えた MS-agar 培地に、滅菌した種子を静置、発芽させ一週間後の seedling を試料に用いた。5-Aza の濃度は 1 μ M、10 μ M、100 μ M とし、TSA の濃度は 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M とした。また、mock 処理では 0.1 % エタノールを用いた。

III．結果

1. 外来遺伝子 *35S-GFP* の発現解析

本研究では、siRNA はどのようなゲノム領域に対してもクロマチンの不活化を引き起こすのかどうかということを解明するために、単子葉植物イネにおける RNA-mediated TGS の解析を行なった (図 2)。タバコやペチュニアでは、*35S* プロモーターが、RNA-mediated TGS により不活化される (Jones et al., 2001, Sijen et al., 2001)。イネにおいて、RNA-mediated TGS が起こるかどうか未知であったため、本研究では *35S-GFP* をターゲット遺伝子のひとつに選択した (表 1)。

植物では siRNA を恒常的に高蓄積させるために IR のサイレンサーコンストラクトを用いるのが一般的である。本研究では、RNA-mediated TGS のサイレンサーコンストラクトに pANDA あるいは pANDA- β ベクター (Miki and Shimamoto, 2004) を使用し、アグロバクテリウム法によりプロモーター配列と相同な siRNA (プロモーター siRNA) を高蓄積する形質転換イネを作製した (図 2)。また、サイレンサーコンストラクトに用いたターゲットプロモーター領域は、TATA ボックスのすぐ上流約 300 bp を使用した (表 1, 図 3)。

外来遺伝子 *35S-GFP* をターゲットする系では、*35S-GFP* を 2 コピー有する形質転換イネ M65 ライン (Hashizume et al., 1999) を親株に用いた。図 4 は、M65 およびサイレンサーコンストラクトを導入した *35S-Pi* ライン T_0 世代の葉身の GFP 蛍光を示す。M65 では、Blue light 照射下で GFP 蛍光が観察されたが、*35S-Pi* ラインの独立 3 個体では GFP 蛍光は観察されなかった。ノザン解析により、これら *35S-Pi* ラインにおける *35S* プロモーター siRNA の蓄積を確認した (図 5)。そこで、RT-PCR および real-time RT-PCR により *GFP* mRNA の発現を解析したところ、*35S-Pi* ラインでは *GFP* mRNA を検出することはできなかった (図 5)。これらの結果から、タバコ (Jones et al., 2001) やペチュニア (Sijen et al., 2001) の知見と同様に、イネにおいても *35S* プロモーター siRNA が、ターゲットである *35S* プロモーターを不活化することが明らかとなった。

RNA-mediated TGS は、ターゲットプロモーター領域における DNA メチル化やヒストン修飾が起因となるエピジェネティックなサイレンシングであることが示唆されている。そこで、観察された 35S-*GFP* のサイレンシングが後代へ受け継がれるかどうかを調べた。ゲノムサザンにより、35S-Pi ライン T_1 個体の遺伝子型を決定した。その結果、siRNA を供給する IR のサイレンサーが分離した 35S-Pi ラインの T_1 植物を独立に 3 個体得ることができた (図 6A)。これらの 3 個体の葉身では、GFP の蛍光は観察されなかった (図 6B)。また、サイレンサーが分離した植物では、サイレンサーを持つ植物と同様に、*GFP* mRNA の発現が完全に抑制されていた (図 6C)。DNA プローブを用いたノザン解析から、サイレンサーが分離した植物では、siRNA は検出されなかった (図 6C)。さらに、最も高感度な LNA プローブを用いたノザン解析においても、サイレンサーが分離した植物では、35S プロモーター配列と相同な siRNA は検出されなかった (図 7)。これらのことから、 T_0 世代で観察された 35S-*GFP* のサイレンシングの情報が、siRNA 非依存的に T_1 世代へ受け継がれていることが分かった。したがって、35S ターゲットプロモーターは、 T_0 世代において、siRNA 依存的な DNA メチル化やヒストン修飾を受け、クロマチンが不活化したことが予想できる。

3. 35S プロモーター領域の DNA メチル化

RdDM は、siRNA によるクロマチンの不活化に関与している重要なファクターである (Matzke et al., 2004)。本研究では、プロモーター-siRNA によりサイレンシングが誘導された 35S プロモーターに RdDM が誘導されているかどうかを解析した。DNA メチル化の解析には、メチル化感受性酵素を用いたサザン法と一塩基レベルのシトシンメチル化を検出できる Bisulfite sequencing 法を用いた。親株 M65 ラインの 35S ターゲットプロモーター領域は、ほとんど DNA メチル化を受けていないが、35S-Pi ライン T_0 世代では、ターゲット領域内のすべてのシトシン残基において、シトシン残基が強くメチル化されていた (図 8A, B)。植物の DNA メチル化は、全てのシトシン残基がその対象となり、CpG、CpHpG、CpHpH (H は A、C、T のいずれか) の 3 パター

ンに分類される。そこで、各パターンの DNA メチル化レベルを解析したところ、35S-Pi のターゲットプロモーター領域では、CpG パターンのシトシン残基の 90%、CpHpG パターンのシトシン残基の 80%、CpHpH パターンのシトシン残基の 60%がメチル化されていた (図 8C)。これらの結果から、イネにおいても RdDM の分子機構が存在することが分かった。また、35S-GFP のサイレンシングに siRNA 依存的な DNA メチル化 (RdDM) が関与していることが示唆された。

次に 35S-Pi ライン T₁ 世代において確認された siRNA 非依存的にサイレンシングと DNA メチル化の関係について解析を行なった。材料には、図 6 で解析した 35S-Pi ライン T₁ 世代の個体を用いた。サザン法と Bisulfite sequencing 法の結果から、サイレンサーを有する個体と比較して若干 DNA メチル化のレベルは減少していたが、サイレンサーが分離した個体の 35S プロモーターにおいても、全てのシトシン残基のメチル化が維持されていた(図 9)。DNA メチル化の維持では、symmetric なパターンのシトシン残基 (CpG、CpHpG) がその対象になると考えられているが、興味深いことに、サイレンサーが分離した個体においても asymmetric な CpHpH パターンの DNA メチル化レベルは依然高度なものであった (図 9)。これらのことから、T₀ 世代で siRNA によりインプットされた DNA メチル化が siRNA 非依存的に遺伝され、エピジェネティックなサイレンシングの原動力のひとつになっていることが考えられる。また、asymmetric な CpHpH パターンの DNA メチル化も維持される可能性が示唆された。

3. 35S プロモーターのヒストン修飾

分裂酵母やシロイヌナズナでは、セントロメアやリピート配列の不活化において、内在性 siRNA とそれに依存したヒストン修飾の重要性が指摘されている (Chan et al, 2005; Martienssen et al, 2005)。また、植物の RNA-mediated TGS において、siRNA 依存的にクロマチンの不活化を示すヒストン修飾が誘導される (Huettel et al., 2006)。そこで、本研究においても、プロモーター-siRNA 依存的にヒストン修飾が誘導されているかどうか解析した。ヒストン修飾の解析には、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法

(Nagaki et al., 2004) を用い、本実験では活性化クロマチンのマーカーであるヒストン H3 のアセチル化 (H3ace)、H4 のアセチル化 (H4ace)、H3K4 のジメチル化 (H3K4me2)、ヘテロクロマチンのマーカーである H3K9 のジメチル化 (H3K9me2) を調べた。また、ChIP 法の定量にはリアルタイム PCR を用いた。それぞれの処理区における ChIP 法のコントロール実験として、活性化クロマチンの rice *actin1* 転写開始点付近と第 8 染色体のセントロメア内の領域 31 (Nagaki et al., 2004) を解析した。図 10A に示すように、H3ace、H4ace、H3K4me2 はアクティブな rice *actin1* で高く、セントロメアの領域 31 では低い、逆に H3K9me2 は rice *actin1* で低く、領域 31 で高いことから、本実験においても ChIP 法が良好であり用いた抗体が機能的であることをそれぞれの実験処理区で確認した。各ターゲットプロモーター領域の解析には、図 10B に示した 5' region と 3' region をそれぞれ特異的に増幅できる PCR プライマーセットを用いた。また、5' region と 3' region の間で結果に差異が無かったため、図 10C および後述する内在遺伝子をターゲットした解析では、5' region の結果を示した。

T₀ 世代の 35S-Pi ラインの解析から、サイレンシングしている 35S プロモーター領域では、親株 M65 に比べ H3ace と H4ace のレベルが有意に低下していたが、H3K4me2 のレベルに変化は無かった (図 10C)。M65 ラインにおける 35S プロモーターの H3K4me2 のレベルは、今回調査した内在遺伝子のターゲットプロモーターと比較して低いことから (図 11)、siRNA 存在下における影響が及ばなかったことが考えられる。続いて、ヘテロクロマチンマーカーである H3K9me2 について解析したところ、35S-Pi ラインの 35S プロモーターでは、そのレベルが顕著に上昇していた (図 10C)。さらに、サイレンサーが分離した T₁ 世代においても、35S プロモーターの H3K9me2 は維持されていた (図 12)。これらヒストン修飾と DNA メチル化の解析から、プロモーター-siRNA によりサイレンシングされた 35S プロモーターでは、DNA メチル化、ヒストンの脱アセチル化、そして H3K9me2 が伴い、クロマチンが不活化されていることが強く示唆される。また、siRNA によりインプットされたサイレンシングの情報は、DNA メチル化やヒストン修飾というマークもしくは記憶により、後代へ siRNA

非依存的に遺伝することが示唆された。

4. DNA メチル化およびヒストン脱アセチル化阻害剤による解析

これまでの解析から、プロモーター-siRNA による 35S-GFP のサイレンシングと DNA メチル化およびヒストン修飾の関連性を示唆した。そこで、これらのクロマチン修飾が、実際に観察されたサイレンシングにおいて機能的であるのかどうかを、DNA メチル化阻害剤とヒストン脱アセチラーゼ阻害剤を用いて解析した。DNA メチル化阻害剤には 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza)、ヒストン脱アセチラーゼ (histone deacetylase; HDAC) の阻害剤には Trichostatin A (TSA) を用いた。まず、本解析には 35S-Pi とその親株 M65 ラインのイネ培養細胞を用いた。35S-Pi ラインの培養細胞においても、植物体と同様なサイレンシングが起きており、RdDM やヒストン修飾、特に H3K9me2 の上昇が起きていることを確認している (data not shown)。阻害剤の処理方法は、阻害剤を添加した培地で 4 日間、その後は阻害剤を抜いた培地で培養した。そして、0 (start)、4、7、12、19 日目にサンプリングした試料を用いて解析した (図 13)。

GFP 蛍光を観察したところ、5-Aza 処理を施した 35S-Pi ラインの培養細胞では、弱いながらも GFP 蛍光の回復がみとめられた。4 日目より 7 日目の方が回復していたことは、培養細胞への薬害が影響したためであることが考えられる。また、5-Aza に加え TSA (5-Aza + TSA) を処理した 35S-Pi 培養細胞では、さらに GFP の蛍光が回復し、12 日目まで GFP 蛍光が維持された。一方、TSA を単独で処理した場合には、GFP 蛍光の回復は観察されなかった (図 13A)。続いて GFP mRNA の発現を RT-PCR および real-time RT-PCR を用いて解析した。その結果、GFP 蛍光の回復に伴い GFP mRNA の上昇が確認された (図 13B-C)。また、スタート時と比較して、GFP mRNA の発現は最大で、5-Aza 単独処理では約 15 倍、5-Aza + TSA 処理では約 60 倍上昇していた (図 13C)。さらに、阻害剤処理により、35S プロモーター-siRNA の蓄積量は特に変化していないことから、観察された 35S-GFP のサイレンシングの回復は、阻害剤の影響であることが示唆された (図 13B)。35S-GFP のサイレンシングの回復に伴う DNA メチル

化の変化についても確認した。DNA メチル化の解析にはゲノムサザン法を用い、メチル化感受性酵素には *PshAI* を使用した。35S-*GFP* ターゲット遺伝子内には、*PshAI* がターゲットプロモーター領域の一箇所にしか存在せず、その配列から全てのパターンの DNA メチル化が検出される。サザン解析の結果、サイレンシングの回復がみとめられた 5-Aza、5-Aza + TSA において、DNA 脱メチル化が検出され、サイレンシングと DNA メチル化の間に相関関係があることが示唆された (図 13D)。また、5-Aza と 5-Aza + TSA の実験区を比較したところ、DNA 脱メチル化の程度に大きな差異がみられなかった (図 13D)。このことから、5-Aza 単独処理と比較して 5-Aza + TSA 処理でよりサイレンシングが回復したことは、TSA による脱アセチル化の阻害効果が起因していることが示唆される。しかし、ChIP 解析を行なったところ、サイレンシングの回復が観察された細胞では、有意なヒストンアセチル化の上昇は検出されなかった (data not shown)。阻害剤の効果 (5-Aza + TSA) は、最大で *GFP* mRNA の発現を約 60 倍に上昇させるが、M65 の発現と比較するとその量は 1/100 に満たない (図 13C)。そのため、*GFP* mRNA の発現量の回復に伴うヒストンのアセチル化の変化量は、ChIP 法の検出限界以下であった可能性がある。

次に、35S-Pi ライン T_2 世代の植物体を用いた解析を行なった。解析に使用した T_2 世代は図 6 の解析で用いた T_1 世代を親とする。また、 T_2 世代の植物体においても、 T_1 世代と同様に、siRNA 非依存的にサイレンシングが維持されている (図 14)。 T_2 世代の植物体への阻害剤処理は、阻害剤を加えた MS-agar 培地上で T_2 世代の種子を発芽させそのまま 1 週間生育させることにより、根から阻害剤を摂取させた。なお、本解析では 5-Aza、TSA それぞれの単独処理のみを行なった。

GFP 蛍光を観察したところ、10 μ M および 100 μ M の 5-Aza 処理を行なった実験区において、サイレンサーを有していない 35S-Pi ラインの根における *GFP* 蛍光が強く観察された (図 15A)。サイレンサーを有しているラインの根では、100 μ M 5-Aza において、非常に弱い *GFP* 蛍光が観察された (図 15A)。 *GFP* mRNA の解析においても、*GFP* 蛍光と同様な結果が得られた (図 15B, C)。一方、0.1 μ M ~ 10 μ M の TSA 単

独処理では、サイレンサーの有無に関わらず、特に目立った GFP 蛍光および GFP mRNA の回復は観察されなかった(図 15)。20 および 100 μ M の TSA 処理を試みたが、根や seedling の発育に著しい障害が生じ、解析に十分な試料を得ることができなかった (data not shown)。

5. ターゲット内在遺伝子

本研究ではこれまでに、外来遺伝子 35S-GFP をモデル遺伝子として、イネの RNA-mediated TGS の解析を行ってきた。また、シロイヌナズナにおいても、外来遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS が精力的に研究されている。内在遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS については、シロイヌナズナ (Melquist and Bender, 2003)、ペチュニア (Sijen et al., 2001)、トウモロコシ (Cigan et al., 2005) の 3 例が報告されているが、いずれにおいてもヒストン修飾の解析は行われていない。そこで、本研究では内在遺伝子におけるプロモーター siRNA の影響をみるために、7 つの内在遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS の実験系を構築し、ヒストン修飾を合わせた解析も行なうことにした。7 つのターゲット内在遺伝子には、*Se5*、*OsRac1*、*OsRac3*、*OsRac4*、*Cen8-9*、*Cen8-11*、そして *Cen8-18* を選択した。これら 7 つの遺伝子は、葉、花、根、種子、培養細胞など計 8 つの器官の発現を RT-PCR 解析したところ、組織特異性はみられず恒常的に発現していることが分かった (図 16)。最近、イネのフルゲノムタイリングアレイを用いた転写ユニットの解析が行われ、そのデータベース <http://mpss.udel.edu/rice> が公開されている (Nobuta et al, 2007)。各内在遺伝子のターゲットプロモーターのセンス鎖あるいはアンチセンス鎖由来の転写産物が存在するか、このデータベースを用いて調べたところ、いずれの転写産物も確認されなかった。また、野生型 (WT) において、各ターゲットプロモーター領域をプローブにノザン解析を行なったが、特に内在性 siRNA は検出されなかった (図 17)。そのため、これら 7 つの遺伝子は、内在性 siRNA などの制御を受けていないことが考えられ、プロモーターと相同な siRNA が引き起こすクロマチンへの効果やサイレンシ

ングのみをモニターできることが期待される。また、*Se5*、*OsRac1*、*OsRac3*、*OsRac4* は、それぞれ異なった染色体に存在し、それらの遺伝子座は発現している遺伝子の密度が高い。さらに、さまざまな MITE (Miniature inverted-repeat transposable elements) 様配列はみられるが、レトロトランスポゾンやダイレクトリピートなどのリピート配列が見られない。そのため、これら 4 つの内在遺伝子座は、ユークロマチンもしくは活性化クロマチン内に存在することが考えられる (図 3)。3 つの *Cen8* 遺伝子は、第 8 染色体のコアセントロメア内に存在しているにもかかわらず、転写がアクティブな遺伝子である。また、これら 3 つの遺伝子座には、レトロトランスポゾンが多数存在する (Nagaki et al., 2004; 図 3)。分裂酵母などのいくつかの生物では、内在性 siRNA がセントロメアのヘテロクロマチン形成に重要であることが報告されている (Pal-Bhadra et al., 2004; Martienssen et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005; May et al., 2005)。そのため、これら 3 つの遺伝子は siRNA の影響を受けやすい可能性があるとして予想し、ターゲット遺伝子に選択した。なお、ターゲット遺伝子の accession number やコードされる推定タンパク質は表 1 に示す。

6. ターゲット内在遺伝子の発現解析

Se5 および 3 つの *OsRac* をターゲットする系では、日本稲金南風を親株に、3 つの *Cen8* 遺伝子をターゲットする系では、日本稲日本晴を親株に用いた。また、各ターゲット領域は、推定転写開始点を PlantPromoterDB (<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/>) で確認後、TATA 様の配列を探索、その上流約 300 bp とした (表 1, 図 3)。ノザン解析を行なった結果、それぞれサイレンサーコンストラクトを導入した形質転換イネ *Se5*-Pi、*OsRac1*-Pi、*OsRac3*-Pi、*OsRac4*-Pi、*Cen8*-9-Pi、*Cen8*-11-Pi、*Cen8*-18-Pi ラインにおいて、目的のプロモーター-siRNA が蓄積していることを確認した (図 17)。

Se5-Pi ラインの独立 4 個体では、35S-*GFP* の発現抑制レベルほどではないが、ターゲット遺伝子 *Se5* の有意な発現抑制が引き起こされており、親株の 20%程度まで発現量は抑制されていた (図 17A)。しかし、残りの 6 つの内在遺伝子では有意なサイレ

ンシングが誘導されなかった。*OsRac4*-Pi ラインの独立 3 個体では、*OsRac4* プロモーター-siRNA が高蓄積しているにもかかわらず、有意な発現抑制は観察されなかった (図 17D)。また、独立 8 個体の *OsRac1*-Pi あるいは独立 12 個体の *OsRac3*-Pi ラインを解析したが、ターゲット遺伝子 *OsRac1* あるいは *OsRac3* のサイレンシングは誘導されていなかった (図 17B-C, data not shown)。3 つの *Cen8* 遺伝子については、siRNA の影響を受けやすいと予想していた。しかし、複数の独立個体をそれぞれ解析したが、*Cen8-9*-Pi、*Cen8-11*-Pi、*Cen8-18*-Pi、いずれにおいても、ターゲット遺伝子の発現抑制はみとめられなかった (図 17E-G, data not shown)。これらの結果から、*Se5* ではサイレンシングが観察されたが、イネにおいて、プロモーター-siRNA はどのような内在遺伝子に対してもサイレンシングを誘導するわけではないことが示唆された。

さらに、*OsRac4*-Pi についても、35S-Pi と同様に T_1 世代の解析を行なった。その結果、siRNA を蓄積する T_1 個体では、特に有意なサイレンシングはみとめられなかった (図 18)。蓄積する内在遺伝子で唯一有意なサイレンシングが誘導された *Se5* についても、解析を試みた。ところが、理由はよく分からないのだが、解析に十分な *Se5*-Pi の T_1 世代の種子を得ることができなかった。*Se5*-Pi の中間的なサイレンシングが、後代へ受け継がれるのかどうかという問題は今後の課題である。

7. ターゲット内在遺伝子の DNA メチル化

内在遺伝子をターゲットにした系においても、サザン法と Bisulfite sequencing 法を用いて DNA メチル化の解析を行なった。ターゲットした内在遺伝子の中で唯一有意なサイレンシングが観察された *Se5* では、35S と同様に全てのパターンの DNA メチル化が新規に誘導されていた (図 19)。一方、興味深いことに、サイレンシングが誘導されなかった内在遺伝子のプロモーターにおいても、RdDM が引き起こされていた。*OsRac3*-Pi および *OsRac4*-Pi の各ターゲットプロモーター領域には、全てのパターンの DNA メチル化が誘導されていた (図 20)。*OsRac1*、*Cen8-9*、*Cen8-11*、*Cen8-18* のターゲットプロモーター領域は、WT の段階で DNA メチル化のレベルが高かった (図

21A-D)。3 つの *Cen8* 遺伝子は、セントロメア内に存在する遺伝子であるためかもしれないが、*OsRac1* に関しては何が起因であるのかは不明である。しかし、プロモーター siRNA を高蓄積している形質転換イネ *OsRac1*-Pi、*Cen8*-9-Pi、*Cen8*-11-Pi、*Cen8*-18-Pi ラインでは、WT で DNA メチル化のレベルが低かった CpHpH のシトシン残基に DNA メチル化が誘導されていた (図 21A-D)。例えば、*OsRac1* ターゲットプロモーター領域の *Sfa*NI サイトでは、*OsRac1*-Pi において、DNA メチル化のシグナルが観察される (図 21E-F)。これらのことから、35S-*GFP* の解析やシロイヌナズナなど報告と同様に、イネの内在遺伝子に対しても siRNA は *de novo* DNA メチル化を誘導することが明らかとなり、植物において siRNA は強力な DNA メチル化のインデューサーであることが強く示唆された。しかし、RdDM だけでは内在遺伝子をサイレンシングするのに十分ではないことが示唆された。

8. ターゲット内在遺伝子のヒストン修飾

DNA メチル化の解析から、RdDM のシグナルは、サイレンシングが誘導されていない 6 つの内在遺伝子プロモーターにも到達していた。そのため、DNA メチル化の有無でサイレンシングの有無を説明することはできない。そこで、もうひとつのエピジェネティックマーカーであるヒストン修飾の情報を得るために、ターゲットした内在遺伝子プロモーターについても ChIP 解析を行なった。唯一サイレンシングが誘導された *Se5* のターゲットプロモーター領域では、有意な H3ace と H4ace の脱アセチル化、H3K4me2 の脱メチル化が誘導されており、複数の活性化クロマチンのマーカーが減少していた。しかし、35S プロモーターでみられたような H3K9me2 の上昇は観察されなかった (図 22A)。一方、サイレンシングが誘導されなかった *OsRac4*-Pi の ChIP 解析を行なったが、部分的な H3 脱アセチル化はみられたが、活性化クロマチンのマーカーである H4ace や H3K4me2 の減少、ヘテロクロマチンマーカーの H3K9me2 の上昇は観察されなかった (図 22D)。また、同様にサイレンシングが起きていない *OsRac1*-Pi や *OsRac3*-Pi においても、活性化クロマチンのマーカーが同時に複数減少

することはなく、H3K9me2 のレベルも変化はなかった (図 22B-C)。これらの結果から、プロモーター-siRNA によるサイレンシングと活性化クロマチンを示すヒストン修飾の減少との間に相関関係があることが示唆された。また、35S プロモーターの解析と合わせると、H3K9me2 が伴うことによりターゲットプロモーターが強く不活化され強いサイレンシングが誘導されることが示唆された。さらに、イネの内在遺伝子のプロモーターは、siRNA 依存的なヒストン修飾をほとんど受けず、*Se5* においても H3K9me2 が誘導されなかったことから、特に H3K9me2 の誘導には規制がかかっていることが推測される。

IV . 考察

本研究では siRNA が、どのようなゲノム領域に対してもクロマチン修飾や不活化を引き起こすのかどうかということに着目した。そのために、本研究では外来性のマーカー遺伝子 *35S-GFP* と 7 つの内在遺伝子をターゲット遺伝子に選択し、それらのプロモーターを siRNA の標的にした RNA-mediated TGS の実験系について解析を行なった。これまでに、RNA-mediated TGS の実験系を用いた解析は、タバコ (Jones et al, 2001; Mette et al, 2000)、シロイヌナズナ (Melquist & Bender, 2003; Mette et al, 2000)、ペチュニア (Sijen et al, 2001)、トウモロコシ (Cigan et al, 2005) で報告されているが、それら全てのターゲット遺伝子ではサイレンシングが誘導された。また、ヒト細胞においても、プロモーターと相同な siRNA がターゲット遺伝子のサイレンシングを引き起こす (Morris et al., 2004; Castanotto et al., 2005; Ting et al., 2005)。しかし、本研究において、7 つ中 6 つの内在遺伝子では、プロモーター-siRNA によるサイレンシングが誘導されなかった (表 3)。

1. siRNA によるクロマチンの不活化

RdDM は、siRNA によるクロマチンの不活化に関与していると考えられている (Matzke et al., 2004)。実際、シロイヌナズナでは、内在性 siRNA 依存的なリピート配列の不活化において、RdDM はキーとなる分子機構である (Chan et al, 2005)。また、これまでに調査されているかぎり、植物の RNA-mediated TGS では RdDM が伴う (Cigan et al, 2005; Jones et al, 2001; Melquist & Bender, 2003; Mette et al, 2000; Sijen et al, 2001)。本研究においても、プロモーター-siRNA によりサイレンシングされた *35S* および *Se5* ターゲットプロモーターでは、高度な RdDM が観察された (表 3)。さらに、シロイヌナズナの遺伝学的解析から、あるリピート配列の不活化および外来遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS において、DNA メチル化が機能的であることが報告されている (Cao et al, 2003; Chan et al, 2005; Matzke et al, 2004)。本研究では、DNA メチル化阻害剤 5-Aza を用いた解析により、*35S-GFP* のサイレンシングにおいて、DNA

メチル化が重要であることを示唆した (図 13, 図 15)。これらのことから、植物において、siRNA は DNA メチル化の強力なインデューサーであり、siRNA によるクロマチンの不活化において DNA メチル化が機能的であることは明らかである。しかし、本研究ではサイレンシングが起きていない時でも RdDM がみとめられた (表 3)。それゆえ、siRNA によるクロマチンの不活化において、RdDM は必要条件ではあるが十分条件ではなく、さらにヒストン修飾を必要とすることが考えられる。なぜならば、siRNA によるクロマチンの不活化には、siRNA 依存的なヒストン修飾が誘導されている例がいくつかあるからだ。

分裂酵母では、内在性 siRNA 依存的な H3K9me2 がヘテロクロマチン形成において重要な役割を果たしている (Martienssen et al, 2005)。シロイヌナズナのリピート配列の不活化においても、内在性 siRNA が誘導するヒストン修飾が関与していることが考えられている (Chan et al, 2005; Lippman et al, 2003; Zilberman et al, 2003)。さらに、プロモーターと相同な siRNA とヒストン修飾の関連性を示唆する報告もある。シロイヌナズナでは、RNA-mediated TGS によって不活化された外来遺伝子プロモーターにヘテロクロマチンマーカーのひとつ H3K27me1 が誘導されていた (Huettel et al, 2006)。ヒト細胞では、プロモーター-siRNA 依存的な H3K9me2 や H3K27me2 がターゲット遺伝子の転写抑制に関与する (Ting et al, 2005; Weinberg et al, 2006)。本研究では、顕著なサイレンシングが起きている 35S プロモーターにおいて、ヒストンの脱アセチル化や H3K9me2 の上昇が誘導されており、35S プロモーターは不活化クロマチンの様相を示した (表 3)。また、顕著ではないが有意なサイレンシングが起きている *Se5* プロモーターにおいても、ヒストンの脱アセチル化や H3K4me2 の脱メチル化が観察された (表 3)。しかし、サイレンシングが起きていないプロモーターでは特にダイナミックなヒストン修飾の変化はみとめられなかった (表 3)。さらに、HDAC の阻害の影響が、35S-GFP のサイレンシングの解除に関連している (図 13)。これらのことから、内在性あるいはプロモーター-siRNA によるクロマチンの不活化には、ヒストン修飾が重要であることが考えられる。これまでにペチュニア (Sijen et al, 2001)、シロイヌナズナ

(Melquist & Bender, 2003)、トウモロコシ (Cigan et al, 2005) において解析されたくつかの内在遺伝子は、RNA-mediated TGS によりサイレンシングされた。まだヒストン修飾の解析は行なわれていないが、おそらくこれらのターゲットプロモーターでも、siRNA 依存的なヒストン修飾が誘導されていると思われる。

2. siRNA によりインプットされた情報のエピジェネティックな遺伝

本研究の解析から、 T_0 世代で観察された 35S-GFP のサイレンシングは、siRNA 非依存的に T_1 、 T_2 世代へ遺伝される。また、その遺伝は、DNA メチル化や H3K9me2 の情報が伴うことから、エピジェネティックな遺伝であることが示唆される(図 6、7、9、12)。タバコやシロイヌナズナの外来遺伝子をターゲットにした RNA-mediated TGS においても、siRNA 非依存的にサイレンシングの情報が後代へ遺伝することが報告されている (Aufsatz et al, 2002; Jones et al, 2001)。これら 2 つの報告では、ヒストン修飾の解析は行なわれていないが、メチル化感受性酵素を用いたサザン法により DNA メチル化の解析は行なわれている。それらの DNA メチル化解析の結果では、symmetric なシトシンパターンである CG と CHG のメチル化は後代へある程度維持されているが、asymmetric なシトシンパターンである CHH のメチル化は維持されない。しかし、本研究では、CHH パターンのシトシン残基を含め 35S プロモーターのターゲット領域内の全てのシトシンメチル化が維持されていた(図 9)。通常、シトシンメチル化の維持は、2 本鎖 DNA のうち片方のシトシン残基がメチル化されているヘミメチル化の状態を維持型 DNA メチラーゼが認識し、もう片方の鎖のメチル化されていないシトシン残基をメチル化することにより成立する。そのため、維持型メチラーゼの基質と成り得るのは、5'-CG-3'および 5'-CHG-3'パターンのシトシン残基である。維持型メチラーゼに依存した機構から考えると、タバコやシロイヌナズナの報告は理にかなう (Aufsatz et al, 2002; Jones et al, 2001)。しかし、シロイヌナズナのヒストン H3K9 メチラーゼをコードする *KRYPTONITE* (KYP) / *SUVH4* の突然変異体の解析から、KYP 依存的な H3K9me2 の下流に、non-CG (CHG および CHH) パターンのシトシン残基を

メチル化する機構が存在することが明らかとなっている (Jackson et al, 2002)。本研究では、サイレンサーが分離した T_1 世代においても、35S プロモーターの H3K9me2 が観察された (図 12)。また、KYP のイネホモログとして SDG714 遺伝子が ChromatinDatabase (<http://www.chromdb.org/index.html>) に登録されている。したがって、本研究における CHH パターンのシトシンメチル化は、SDG714 依存的な H3K9me2 により維持されている可能性が高い。だが、タバコやシロイヌナズナの系 (Aufsatz et al, 2002; Jones et al, 2001) において、なぜ CHH パターンのシトシンメチル化が維持されていないのかはよく分からない。なお、ヒストン修飾自体がシトシンメチル化のように後代へ維持されるのかは不明であるが、CG パターンのシトシンメチル化に依存的な H3K9me2 がシロイヌナズナで報告されている (Mathieu et al, 2005; 後述する)。

3. siRNA によって不活化されるクロマチンの段階

本研究で観察されたサイレンシングは、35S-GFP の顕著なサイレンシング、それより抑制効果の低い Se5 の有意なサイレンシング、そしてサイレンシングが誘導されなかった残り 6 つの内在遺伝子に分けられる (図 23)。全てのターゲットプロモーター領域に RdDM が誘導されていたため、DNA メチル化ではこの異なったサイレンシングを説明できないが、ヒストン修飾を用いればこれらの差異を説明することができる。35S プロモーターでは、アクティブな修飾 (H3ace、H4ace) の減少と H3K9me2 の増加がみられることから、クロマチンが不活化されていることが示唆される (Inactive chromatin, 図 23)。また、Se5 プロモーターでは、アクティブな修飾 (H3ace、H4ace、H3K4me2) の減少は観察されるが H3K9me2 の誘導はみられない。このことから、Se5 プロモーターのクロマチンは、活性化クロマチンと不活化クロマチンの中間的な状態であることが考えられる (Intermediate chromatin, 図 23)。一方、サイレンシングが起きていない内在遺伝子プロモーターでは、特に siRNA 依存的なヒストン修飾の変化が起きていない。これらのプロモーターでは DNA メチル化は誘導されているが、活性化クロマチンの状態であることが考えられる (active chromatin, 図 23)。

最近報告された 2 つの知見は、このクロマチンの段階がヒストン修飾に依存しているという考えをサポートする。シロイヌナズナの知見では、RNA Pol IV の制御を受ける遺伝子座が同定され、それらのクロマチンの状態はヒストン修飾により 2 つに分けられる。ひとつは、“silent, potentially reversible”と呼ばれる状態で、DNA メチル化、アクティブなヒストン修飾、そして H3K27me1 が観察される。ふたつめは、“constitutive heterochromatin”と呼ばれる状態であり、ひとつめの段階と比較して、アクティブなヒストン修飾が低下し、H3K9me2 が加わる (Huettel et al, 2006)。また、ニワトリ赤血球の培養細胞において、ある外来性遺伝子の転写型サイレンシング (TGS) の確立には 2 段階のクロマチン状態が存在する。1 段階めでは、アクティブなクロマチンを示すヒストン修飾が減少し、ターゲット遺伝子の転写が抑制され、2 段階めにおいて、DNA メチル化と H3K9me2 が加わり、完全な転写抑制が確立される (Mutskov & Felsenfeld, 2004)。本研究およびこれらの知見から、siRNA により誘導される不活化クロマチンは、ヒストン修飾に依存してふたつの段階に分けることができる。それらはアクティブなヒストン修飾が減少した中間的な不活化クロマチンと H3K9me2 などのヘテロクロマチンマーカーが加わった不活化クロマチンであると考えられる (図 23)。

4. siRNA によるクロマチンの不活化が起こらない理由

4-1. siRNA によるクロマチンの不活化が起こらない理由の可能性

本研究のイネにおける解析から、プロモーター siRNA は、内在遺伝子に対してクロマチンの不活化をほとんど誘導しないことが示唆された。このことから、ひとつの仮説が考えられる。それは、siRNA によるクロマチンの不活化は、クロマチンをアクティブに維持する分子機構により阻害されているというものである。実際、シロイヌナズナには、siRNA によるクロマチンの不活化を阻害する分子機構がみついている。その分子機構の中心は、ROS1 (Repressor Of Silencing 1) と呼ばれる因子である。ROS1

遺伝子は、RNA-mediated TGS のサプレッサー変異として同定されたものであり、DNA glycosylase/lyase をコードし、イネゲノムにもそのホモログが存在する (Gong et al, 2002)。ROS1 は、siRNA の産生の経路には関与しておらず、RdDM によりメチル化されたシトシン残基を、メチル化されていないシトシン残基に置換することにより、RNA-mediated TGS を阻害すると考えられている (Gong et al, 2002)。ところが、本研究では、サイレンシングが起きていないプロモーターにも DNA メチル化が誘導されていた。その理由としては、ROS1 のイネホモログにその活性がない、何らかの理由でターゲットプロモーターに ROS1 がリクルートされていない、などが挙げられるがよくわからない。しかし、本研究のサイレンシングされなかった内在遺伝子プロモーターでは、ヒストン修飾の顕著な変化が誘導されていない (表 3)。このことから筆者は、siRNA によるクロマチンの不活化を阻害する分子機構のひとつに、ヒストン修飾を阻害もしくはブロックする機構あるいは現象があるのではないかと推測している。

それでは、なぜ、本研究では siRNA 依存的なヒストン修飾が誘導されなかったのだろうか？その理由となる可能性を 3 つ挙げる。ひとつめの可能性は、内在遺伝子のターゲット領域内のシトシン含量が、ヒストン修飾を誘導するために十分ではないということである。他の解析で用いられているターゲット領域のシトシン含量は、100 bp あたり 26 個以上のシトシン残基を含んでおり、これらの遺伝子は RNA-mediated TGS によりサイレンシングされる (表 4)。本研究のターゲット領域の中でその数値を超えたものは、35S プロモーターのみであり 27.3 個である。しかし、他 7 個の内在遺伝子のターゲット領域内のシトシン含量は、14.6-19.1 個であった (表 1)。したがって、siRNA 依存的なヒストン修飾は DNA メチル化の下流に存在し、メチル化されたシトシン残基の含量が高い方が、誘導されやすいのかもしれない。実際に、シロイヌナズナにおいて、H3K9me2 の修飾が CpG メチル化の下流に位置するという報告がある (Mathieu et al, 2005)。しかし、本研究において H3K9me2 が誘導された 35S プロモーターの CpG 配列の数は、他の内在遺伝子と比較してあまりかわらない。そのかわり、CpHpH 配列の数がきわめて多い (表 1)。CpHpH パターンの DNA メチル化は、RNA Pol

IV や DRD1 が関与する RdDM のホールマークであることが示唆されている (Kanno et al, 2005; Kanno et al, 2004)。さらに、最近シロイヌナズナのコピー数増殖抑制因子 H3K9 メチラーゼ KRYPTONITE が SRA ドメインを介して CpHpG および CpHpH パターンのシトシンメチル化と *in vitro* で結合することが報告された (Johnson et al, 2007)。したがって、35S プロモーターのターゲット領域には、豊富な siRNA のシグナルが到達し、KRYPTONITE イネホモログがリクルートされた結果、H3K9me2 が誘導されクロマチンが不活化されたと考えられる。

ふたつめの可能性は、ターゲット遺伝子座がリピート配列に富んだ環境であるかどうかということである。これまでに報告されている RNA-mediated TGS の実験系では、いくつかの内在遺伝子がサイレンシングされているが、それらの多くはリピート配列に富んだ遺伝子座である。例えば、ペチュニアの報告で用いられた *dfrA* 遺伝子はプロモーター上に 2 コピーのダイレクトリピートを有しており (Sijen et al, 2001)、シロイヌナズナの報告で用いられた *S15a* 遺伝子座には、それ自体のプロモーター配列を含むダイレクトリピートが 2 コピー、さらには *PAI1-PAI4* の Inverted repeat が存在する (Melquist & Bender, 2003)。また、前述した RNA Pol IV 依存的な siRNA により誘導される “constitutive heterochromatin” の遺伝子座は、リピート配列に富む環境である (Huettel et al, 2006)。本研究で用いた 3 つの *OsRac* 遺伝子座は、レトロトランスポゾンやダイレクトリピートを含まない (図 3)。そのため、プロモーター siRNA は、ヒストン修飾やクロマチンの不活化を誘導できなかったのかもしれない。*Se5* 遺伝子座も、リピート配列に富む環境ではない (図 3)。しかし、*Se5* プロモーターでは、siRNA 依存的にヒストン修飾が誘導され、アクティブなヒストン修飾が減少した (表 3)。前述した “silent, potentially reversible” の遺伝子座は、リピート配列に富む環境ではないが、H3K27me1 のヒストン修飾が誘導されている (Huettel et al, 2006)。そのため、*Se5* プロモーターが示した “Intermediate chromatin” は、“silent, potentially reversible” と類似した状態なのかもしれない。一方、3 つの *Cen8* 遺伝子座はセントロメア内に存在し、リピート配列に富む環境と言えるが、いずれの場合もサイレンシングは誘導されなか

った (表 3、図 3)。しかし、サイレンシングが誘導された内在遺伝子 *dfrA* と *S15a* では、ターゲット領域内にリピート配列を有しているが、3 つの *Cen8* 遺伝子のターゲット領域はリピート配列を含まない。したがって、siRNA によるクロマチン不活化では、ターゲット領域内にリピート配列が存在することがひとつの重要な因子なのかもしれない。イネにおいては、*dfrA* や *S15a* のようなモデルとなる遺伝子が報告されれば、RNA-mediated TGS によりそれらのサイレンシングを試みたい。また、本研究で用いた内在遺伝子のプロモーターをタンデム連結したキメラ遺伝子を導入し、RNA-mediated TGS のターゲット遺伝子とする実験系なども興味深い。

最後に挙げる可能性は、H3K4me2 がクロマチンをアクティブな状態に維持しているということである。H3K4me2 は、ユークロマチンやアクティブな転写活性と関連している (Shilatifard, 2006)。また、ショウジョウバエなどでよく知られているが、Trithorax によるホメオ遺伝子の活性化において、H3K4me2 は重要なファクターである (Shilatifard, 2006)。さらに、筆者は出芽酵母における報告を注目している。その報告では、ヘテロクロマチンであるテロメア領域のヘテロクロマチン化に関わる因子が隣接するユークロマチン領域に拡大しないように、H3K4me2 がそれを防いでいるというものである (Schneider et al, 2005)。これらの知見から、筆者は H3K4me2 が siRNA 依存的なヒストン修飾が誘導されないように防いでおり、クロマチンの状態をアクティブに維持しているのではないかと推測している。図 11 に示すのは、WT における各ターゲットプロモーター領域の H3K4me2 レベルである。他の 6 つの内在遺伝子と比較して、siRNA 依存的に "Intermediate chromatin" を示した *Se5* のレベルが明らかに低い。つまり、他の 6 つの内在遺伝子においては、H3K4me2 が不活化傾向を示すヒストン修飾の誘導を防いでいたのかもしれない。

4-2. siRNA vs ゲノム

本研究では、siRNA が存在しても、それだけでは内在遺伝子のクロマチンは不活

化されないことを示唆した。この現象の生物学的意義は、有害となる siRNA の活性からゲノムを守る現象であると筆者は考えている。

近年、シロイヌナズナやイネを含むさまざまな生物種において、内在性 siRNA がクローニングされている (Lu et al, 2005; Qi et al, 2006; Sunkar et al, 2005; Xie et al, 2004; Nobuta et al, 2007)。それらの数は膨大であり、特に RdDM に関与する 24 nt の内在性 siRNA が多い。また、リピート配列だけではなく、そうではない配列も含んださまざまなゲノムの領域が、siRNA のターゲットに成り得る。もし仮に、全ての内在性 siRNA が相同なゲノム領域に対して活性を示すならば、ゲノムは正常に機能しないであろう。おそらく、ゲノムは siRNA によって容易に不活化されないように何らかの機構によって制御もしくは防御されていると思われる。

ひとつの可能性としては、ROS1 による DNA 脱メチル化に依存した防御機構である。ROS1 の機能は、DNA メチル化を除去することにより、siRNA 依存的なクロマチンの不活化を妨げる (Gong et al, 2002)。ROS1 に関する詳細な分子機構は明らかになっていないが、本研究のターゲット内在遺伝子では機能していないと思われる。ふたつめの可能性としては、siRNA 産生段階の制御機構が関与していることを挙げる。分裂酵母では、内在性 siRNA の産生が、RITS と RDRC の複合体に制御されている (Martienssen et al, 2005)。さらに、内在性 siRNA が、産生された遺伝子座以外の場所に拡散しないように、リボヌクレアーゼである Eri1 が余分な siRNA を分解していることが推測されている (Buhler et al, 2006)。したがって、分裂酵母では、RITS、RDRC、そして Eri1 の制御により、siRNA の産生段階でその活性を制限していることが考えられる。また、シロイヌナズナにおいても、内在性 siRNA の一部の産生が、RNA pol IV 依存的な分子機構により制御されており (Herr et al, 2005; Kanno et al, 2005; Onodera et al, 2005)、この制御が分裂酵母のように siRNA の活性を制限しているかもしれない。みつつめの可能性は、本研究が浮き彫りにしたヒストン修飾レベルでの防御機構である。本研究の結果によれば、内在遺伝子に対する siRNA 依存的なクロマチンの不活化は、ヒストン修飾の段階で、何らかの機構により妨げられていることが考えられる。

その機構は全く不明であるが、H3K4me2 などのアクティブなヒストン修飾が関与しているかもしれない (図 24)。本研究の実験系では、プロモーターと相同な siRNA は RNA Pol IV の機構ではなく、IR のサイレンサーから人工的に産生させたものである。そのために、siRNA の産生段階依存的な機構を避けることができ、ヒストン修飾依存的な機構を観察することができたのかもしれない。最近、ゲノムタイリングアレイの手法を用いて、シロイヌナズナの全ゲノムをカバーする DNA メチル化マップが作製され、DNA メチル化と低分子 RNA の関係を調査した論文が報告された (Zhang et al, 2006)。そのため、そのような手法を用いて、内在性 siRNA とヒストン修飾の関係を解析すれば、ヒストン修飾依存的な防御機構の存在をサポートできるかもしれない。

V. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学講座 島本 功 教授に深く感謝いたします。

川崎 努 助教授ならびに一色 正之 博士 (現 横浜市立大)、横井 修司 博士 (現 岩手大学) から、本研究に適切な御助言、技術的御指導を賜りました。心から御礼申し上げます。

梅村 賢司 博士 (明治製菓・ヘルス・バイオ研究所) よりピアラホスを、神山 康夫 博士 (三重大学 生物資源学部) および橋爪 不二夫 博士 (三重県科学技術振興センター) より M65 バイナリーベクターを譲渡していただきました。ここに御礼申し上げます。さらに、長岐 清孝 博士 (岡山大学 資源生物科学研究所) からは ChIP 法のプロトコール譲渡ならびに実験技法の御指導を賜りました。心から御礼申し上げます。

三木 大介 博士には、本研究を行なうにあたり、日々の実験指導、ディスカッション、RNAi 関連分野の御教授をしていただきました。心から感謝いたします。

小橋 佐和子さん、玉置 優子さん、樹 咲子さんには、形質転換イネの作製を行なっていただきました。心より御礼申し上げます。

植物分子遺伝学講座の構成員の皆様には、日々の実験やその他いろいろなことについて相談にのっていただきました。楽しかったです。ありがとうございました。

最後に、ここまで育てて頂いた両親に深く感謝いたします。ありがとう。

平成 19 年 8 月 28 日 記

VI. 参考文献

- 1) Aufsatz W., Mette M. F., van der Winden J., Matzke A. J., and Matzke M. (2002).
RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A 99,
16499-16506.
- 2) Buhler M., Verdel A., and Moazed D. (2006). Tethering RITS to a nascent transcript
initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. Cell 125, 873-886.
- 3) Cao X., Aufsatz W., Zilberman D., Mette M. F., Huang M. S., Matzke M., and Jacobsen S.
E. (2003). Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA
methylation. Curr Biol 13, 2212-2217.
- 4) Castanotto D., Tommasi S., Li M., Li H., Yanow S., Pfeifer G. P., and Rossi J. J. (2005).
Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the RASSF1A gene
promoter in HeLa cells. Mol Ther 12, 179-183.
- 5) Chan S. W., Henderson I. R., and Jacobsen S. E. (2005). Gardening the genome: DNA
methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet 6, 351-360.
- 6) Chandler V. L. (2007). Paramutation: From Maize to Mice. Cell 128, 641-645.
- 7) Cigan A. M., Unger-Wallace E., and Haug-Collet K. (2005). Transcriptional gene silencing
as a tool for uncovering gene function in maize. Plant J 43, 929-940.
- 8) Elmayan T., Proux F., and Vaucheret H. (2005). *Arabidopsis* RPA2: a genetic link among

- transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr Biol* 15, 1919-1925.
- 9) Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R. R., Roldan-Arjona T., David L., and Zhu J. K. (2002). ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111, 803-814.
- 10) Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., and Baulcombe D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21, 4671-4679.
- 11) Hashizume F., Tsuchiya T., Ugaki M., Niwa Y., Tachibana N., and Kowayama Y. (1999). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and the usefulness of a synthetic GFP reporter gene in leading varieties of Japonica Rice. *Plant Biotechnol* 16, 397-401.
- 12) Herr A. J., Jensen M. B., Dalmay T., and Baulcombe D. C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118-120.
- 13) Hiei Y., Ohta S., Komari T., and Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6, 271-282.
- 14) Huettel B., Kanno T., Daxinger L., Aufsatz W., Matzke A. J., and Matzke M. (2006). Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *EMBO J* 25, 2828-2836.
- 15) Jackson J. P., Lindroth A. M., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG

- DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556-560.
- 16) Johnson L. M., Bostick M., Zhang X., Kraft E., Henderson I., Callis J., and Jacobsen S. E. (2007). The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol* 17, 379-384.
- 17) Jones L., Ratcliff F., and Baulcombe D. C. (2001) RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 11, 747-757.
- 18) Kanellopoulou C., Muljo S. A., Kung A. L., Ganesan S., Drapkin R., Jenuwein T., Livingston D.M. and Rajewsky K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19, 489-501.
- 19) Kanno T., Huettel B., Mette M. F., Aufsatz W., Jaligot E., Daxinger L., Kreil D. P., Matzke M., and Matzke A. J. (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat Genet* 37, 761-765.
- 20) Kanno T., Mette M. F., Kreil D. P., Aufsatz W., Matzke M., and Matzke A. J. (2004). Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 14, 801-805.
- 21) Li L., Wang X., Stolc V., Li X., Zhang D., Su N., Tongprasit W., Li S., Cheng Z., Wang J., and Deng X. W. (2006). Genome-wide transcription analyses in rice using tiling

- microarrays. Nat Genet 38, 124-129.
- 22) Lippman Z., May B., Yordan C., Singer T., and Martienssen R. (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. PLoS Biol 1, E67.
- 23) Lu C., Tej S. S., Luo S., Haudenschild C. D., Meyers B. C., and Green P. J. (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. Science 309, 1567-1569.
- 24) Martienssen R. A., Zaratiegui M., and Goto D. B. (2005). RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Trends Genet 21, 450-456.
- 25) Mathieu O., Probst A. V., and Paszkowski J. (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. EMBO J 24, 2783-2791.
- 26) Matzke M., Aufsatz W., Kanno T., Daxinger L., Papp I., Mette M. F., and Matzke A. J. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. Biochim Biophys Acta 1677, 129-141.
- 27) May B. P., Lippman Z. B., Fang Y., Spector D. L. and Martienssen R. A. (2005). Differential regulation of strand-specific transcripts from Arabidopsis centromeric satellite repeats. PLoS Genet 1, e79.

- 28) McElroy D., Rothenberg M., Reece K. S., and Wu R. (1990). Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Mol Biol* 15, 257-268.
- 29) Melquist S., and Bender J. (2003). Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 17, 2036-2047.
- 30) Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., and Matzke A. J., (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19, 5194-5201.
- 31) Miki D., and Shimamoto K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol* 45, 490-495.
- 32) Miki D., Itoh R., and Shimamoto K. (2005). RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* 138, 1903-1913.
- 33) Mishiba K., Nishihara M., Nakatsuka T., Abe Y., Hirano H., Yokoi T., Kikuchi A., and Yamamura S. (2005). Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in *gentian*. *Plant J* 44, 541-556.
- 34) Morris K. V., Chan S. W., Jacobsen S. E., and Looney D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289-1292.
- 35) Murray M. G., and Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acids Res* 8, 4321-4325.

- 36) Mutskov V., and Felsenfeld G. (2004). Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J* 23, 138-149.
- 37) Nagaki K., Cheng Z., Ouyang S., Talbert P. B., Kim M., Jones K. M., Henikoff S., Buell C. R., and Jiang J. (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* 36, 138-145.
- 38) Nobuta K., Venu R. C., Lu C., Beló A., Vemaraju K., Kulkarni K., Wang W., Pillay M., and Green P. J., Wang G., Meyers B. C. (2007). An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. *Nat Biotechnol* 25, 473-477.
- 39) Onodera Y., Haag J. R., Ream T., Nunes P. C., Pontes O., and Pikaard C. S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120, 613-622.
- 40) Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. and Elgin, S.C. (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, **303**, 669-672.
- 41) Pontes O., Li C. F., Nunes P. C., Haag J., Ream T., Vitins A., Jacobsen S. E., and Pikaard C. S. (2006). The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* 126. 79-92.
- 42) Qi Y., He X., Wang X. J., Kohany O., Jurka J., and Hannon G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*

443, 1008-1012.

- 43) Reinhart B. J., and Bartel D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 297, 1831.
- 44) Schneider J., Wood A., Lee J. S., Schuster R., Dueker J., Maguire C., Swanson S. K., Florens L., Washburn M. P., and Shilatifard A. (2005). Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Mol Cell* 19, 849-856.
- 45) Shilatifard A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243-269.
- 46) Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J. N., and Kooter J. M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 11, 436-440.
- 47) Sunkar R., Girke T., and Zhu J. K. (2005). Identification and characterization of endogenous small interfering RNAs from rice. *Nucleic Acids Res* 33, 4443-4454.
- 48) Ting A. H., Schuebel K. E., Herman J. G., and Baylin S. B. (2005). Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet* 37, 906-910.
- 49) Tsuji H., Saika H., Tsutsumi N., Hirai A., and Nakazono M. (2006). Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at

submergence-inducible genes in rice. *Plant Cell Physiol* 47, 995-1003.

- 50) Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S. I., and Moazed D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672-676.
- 51) Wassenegger M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 122, 13-16.
- 52) Weinberg M. S., Villeneuve L. M., Ehsani A., Amarzguioui M., Aagaard L., Chen Z. X., Riggs A. D., Rossi J. J., and Morris K. V. (2006). The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA* 12, 256-262.
- 53) Xie Z., Johansen L. K., Gustafson A. M., Kasschau K. D., Lellis A. D., Zilberman D., Jacobsen S. E., and Carrington J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2, E104.
- 54) Yamada K., Lim J., Dale J. M., Chen H., Shinn P., Palm C. J., Southwick A. M., Wu H. C., Kim C., Nguyen M., Pham P., Cheuk R., Karlin-Newmann G., Liu S. X., Lam B., Sakano H., Wu T., Yu G., Miranda M., Quach H. L., Tripp M., Chang C. H., Lee J. M., Toriumi M., Chan M. M., Tang C. C., Onodera C S., Deng J. M., Akiyama K., Ansari Y., Arakawa T., Banh J., Banno F., Bowser L., Brooks S., Carninci P., Chao Q., Choy N., Enju A., Goldsmith A. D., Gurjal M., Hansen N. F., Hayashizaki Y., Johnson-Hopson C., Hsuan V. W., Iida K., Karnes M., Khan S., Koesema E., Ishida J., Jiang P. X., Jones T., Kawai J., Kamiya A., Meyers C., Nakajima M., Narusaka M.,

- Seki M., Sakurai T., Satou M., Tamse R., Vaysberg M., Wallender E. K., Wong C., Yamamura Y., Yuan S., Shinozaki K., Davis R. W., Theologis A. and Ecker J. R. (2003). Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* 302, 842-846.
- 55) Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S. W., Chen H., Henderson I. R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S. E., and Ecker J. R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126, 1189-1201.
- 56) Zilberman D., Cao X., and Jacobsen S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.
- 57) 岡野 陽介 (2004). プロモーターdsRNA によるジーンサイレンシングとそのエピジェネティックな影響. 奈良先端科学技術大学院大学修士論文.

表 1 ターゲット遺伝子

Target gene ^a	Function	Trigger length	No. cytosines per 100 bp in the trigger			
			CpG	CpNpG	CpHpH	Total
<i>35S-GFP</i>		271 bp	4.1	2.2	21.0	27.3
<i>Se5</i>	Heme oxygenase	276 bp	3.6	1.5	10.1	15.2
<i>OsRac1</i>	Rac GTPase	287 bp	1.7	2.1	10.8	14.6
<i>OsRac3</i>	Rac GTPase	304 bp	1.6	2.3	12.5	16.4
<i>OsRac4</i>	Rac GTPase	310 bp	1.3	1.0	13.2	13.5
<i>Cen8-9</i> ^b	Putative poly(A)-binding protein	286 bp	4.5	3.5	9.4	17.5
<i>Cen8-11</i> ^b	Putative CBS domain containing protein	304 bp	2.6	1.6	14.8	19.1
<i>Cen8-18</i> ^b	Putative ribosomal protein L15	285 bp	4.6	4.2	8.8	17.5

^aAccession numbers of target genes are AK068856 (*Se5*), AK071126 (*OsRac1*), AK069345 (*OsRac3*), AK061102 (*OsRac4*), AK065167 (*Cen8-9*), AK121969 (*Cen8-11*) and AK073645 (*Cen8-18*).

^b*Cen8-9*, *Cen8-11* and *Cen8-18* are described as 6729.t00009, 6730.t00011 and 6827.t00018 in Nagaki et al., 2004.

表2 プライマー

Target	Primer	Sequence (5' – 3')	Methods
35S-GFP	35S-ds-f	GAATTAATTCCCGATCCTATCTGTCA	Construct
	35S-ds-r	GAGGAAGGGTCTTGCGAAGG	Probe for siRNA
	GFP-rt-f	CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC	RT-PCR, Real-time
	GFP-rt-r	TTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGC	RT-PCR, GFP probe for Southern
	35S-bs-F01	TTTTCAACAAAGGGTAATATCGGG	Bisulfite sequencing
	35S-bs-R01	ATCTCAAGAAGCCTGTCTCTCC	
	35S-cp-F01	GAAACCTCCTCGGATTCCAT	ChIP (5' region)
	35S-cp-R01	GCCTTTCCTTTATCGCAATG	
	35S-cp-F02	CAACCACGTCTTCAAAGCAA	ChIP (3' region)
	35S-cp-R02	GCCTGTCCTCTCCAAATGAA	
OsRac1	Rac1-ds-f	GTGTGTCTGTACTCTTGTGTGTTCC	Construct
	Rac1-ds-r	GGCACTAATAAAAACTAATTACACAATCC	Probe for siRNA
	Rac1-rt-f	AGATAGGGCCTATCTTGCTGATCATC	RT-PCR
	Rac1-rt-r	CTAGAAGTTTCCTCCTAGCTGCAAGC	
	Rac1-real-f	TAGTACAGCAACCAGCAAGAACAAA	Real-time RT-PCR
	Rac1-real-r	ACTTGATGAACCTCGTCGCC	
	Rac1-so-F01	TAAATTCAAGCACGAAGCAAAGTGC	Probe for Southern with <i>AcII</i> digestion
	Rac1-so-R01	GTAAAAGTTTTACTCGTGCTTACGTGG	
	Rac1-so-F02	TGAACCCTATACAACATATAATATAATAGC	Probe for Southern with <i>RsaI</i> or <i>SfaNI</i> digestion
	Rac1-so-R02	TTCTTTGTTCTTGCTGGTTGC	
	Rac1-bs-F01	TGTGTGTCTGTACTCTTGTGTGTT	Bisulfite sequencing
	Rac1-bs-R01	CACTCTAGCTCTGCCTCCAGCTCC	
	Rac1-cp-F01	GCACTCGCAACCATCCAT	ChIP (5' region)
	Rac1-cp-R01	CGTTTGATGTGACAGGATGAA	
	Rac1-cp-F02	TTTGCTAATGAGGGATTAATTAGG	ChIP (3' region)
	Rac1-cp-R02	CCAGTGGCCTAAAGTTTTAACG	
OsRac3	Rac3-ds-f	GAAGAAGTTATCGTTTAGACAGAAGACC	Construct
	Rac3-ds-r	AAACTGTCTAATGTTTGGCACTACC	Probe for siRNA
	Rac3-rt-f	CATGATACCTGTTACCACAGC	RT-PCR
	Rac3-rt-r	CTCTACCAGCACATTCAGACTCC	
	Rac3-real-f	CCTCCTCCCATCTTGTCTCCT	Real-time RT-PCR
	Rac3-real-r	TCACTCCCGTTTCACCGAG	
	Rac3-so-F01	TTTTGCATGACATGCCACTTAGACC	Probe for Southern

	Rac3-so-R01	TCTTCTGTCTAAACGATAAATTCTTC	
	Rac3-bs-F01	ATTTTATCTATTACATGGTTAAAGAAAATTAG	Bisulfite sequencing
	Rac3-bs-R01	CTTCTTCCCCCTCGCCCCCTC	
	Rac3-cp-F01	CACACCAITTAGCGGTTTGA	ChIP (5' region)
	Rac3-cp-R01	TAGATAGCGGGATCTTTTGC	
	Rac3-cp-F02	TGATTAAGGGCTTGTTTGGTTT	ChIP (3' region)
	Rac3-cp-R02	TGAAATTTGGCTCTCAATTAACG	
OsRac4	Rac4-ds-f	CCTTCTTGCCTTAATCTACACTCTC	Construct
	Rac4-ds-r	CAGTCTTTAGAAATACTCCTTCCATCTC	Probe for siRNA
	Rac4-rt-f	GGGACCAAATTGGATCTTCGTG	RT-PCR
	Rac4-rt-r	CCATTCTGAGATGTAGGGAGTGC	
	Rac4-real-f	CGCTTCACCAAGAAGCCATC	Real-time RT-PCR
	Rac4-real-r	GCCGGCCGAATCGAG	
	Rac4-so-F01	ATATCTACAGCATGATGCCATGATGC	Probe for Southern
	Rac4-so-R01	TCTTTTGCTTGGAAGTTTGCTGC	
	Rac4-bs-F01	AAAAAGAGAGAGAGAGAGAGGAGAAAAAG	Bisulfite sequencing
	Rac4-bs-R01	TTCAGTCTTTAGAAATACTCCTTCCATCTC	
	Rac4-cp-F02	TGCTAATCCTTGGCAGAACA	ChIP (5' region)
	Rac4-cp-R02	GACCACATGGACCATTATAATTTATTC	
	Rac4-cp-F03	TCTTTCAAAGGACTAGGTTGC	ChIP (3' region)
	Rac4-cp-R03	TTGGTTTCTGGTTGTCTAGTGC	
Se5	Se5-ds-f	CATTATGTATAGATCAAATGTTGCGG	Construct
	Se5-ds-r	TTTGGAACAAAACAGTTGTTATCTAGAGG	Probe for siRNA
	Se5-rt-f	TGATTGGGAAGAAGGTCTCTGAG	RT-PCR,
	Se5-rt-r	TGCAGCAGCTGGGACAGAT	Real-time RT-PCR
	Se5-bs-F01	AATGTTTCAGCAATTATACTCGTGATGTTT	Bisulfite sequencing
	Se5-bs-R01	CTCCTCCATGTCCATGTCCTCTTTTTTAGTTC	
	Se5-cp-F001	ATTGCAACAAATCACCCACA	ChIP (5' region)
	Se5-cp-R001	TGAAACATTTTGCTGCAACG	
	Se5-cp-F002	CGTTGCAGCAAAATGTTTCA	ChIP (3' region)
	Se5-cp-R002	TCGCCCATTCTAACTGTCC	
Cen8-9	9-ds-f	CACCGCTCCAATGGAAGAATCGAG	Construct
	9-ds-r	CAAACACCACCTGAAGGTCA	Probe for siRNA
	9-rt-f	AGAGGCAGCAGATAAGAACCAG	RT-PCR
	9-rt-r	CCATAGGACGCATTTGTGAGAA	
	9-bs-F01	AATTAAGGATTTTATAAAATTTAAAAGAGAG	Bisulfite sequencing
	9-bs-R01	GTATGAAATTTTCTATGTGAAAGTTGTT	
Cen8-11	11-ds-f	CACCTGGCTAAACGACGAATGACA	Construct

	11-ds-r	GTGCATTGTTGATGCAAACC	Probe for siRNA
	11-rt-f	ACCAATTTGCCTGAACTGTC	RT-PCR
	11-rt-r	GTGCGTGAAACTACTAACCT	
	11-bs-F01	AGGTAGGATATGTGTGTTTTTATAATAATAAG	Bisulfite sequencing
	11-bs-R01	AGATTGACGAGTGGAAG	
Cen8-18	18-ds-f	CACCTGCTGTCTTGTTAGGTCTGA	Construct
	18-ds-r	CGGGTTCAAGGTGTGTCAGT	Probe for siRNA
	18-rt-f	TTTGCAATTTTCCCCAGACCAC	RT-PCR
	18-rt-r	GCTCGCCTCATCCTTATCCTAC	
	18-bs-F01	ATGCATAATGTTGTATTAGAGTATTAG	Bisulfite sequencing
	18-bs-R01	GAAGGTTATTTTGTGGTTATTG	
Ubq	Ubq-rt-f	CCAGGACAAGATGATCTGCC	RT-PCR
	Ubq-rt-r	AAGAAGCTGAAGCATCCAGC	
	Ubq-real-f	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	Real-time RT-PCR
	Ubq-real-r	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA	
5S rRNA	5S-f	GATCCCATCAGAACTCCGAAGTTAAGC	Probe for control
	5S-r	GGGATGCAACACGAGGACTTCC	
Rice actin1	Ac1-cp-F01	ATGGGGCTCTCGGATGTAG	ChIP
	Ac1-cp-R01	TAGTGCCCTTTTCCCCTCTT	
Region 31	31-u	TGTCAATTCTATCAACCATCAG	ChIP
	31-l	CAAATCATCTATCCTCAAGTCC	(Nagaki et al., 2004)

表 3 発現解析、DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析のまとめ

Target gene	Silencing	DNA methylation	H3 deace ^a	H4 deace ^b	H3K4 deme2 ^c	H3K9me2
<i>35-GFP</i>	+++	+++	+++	+	-	+++
<i>Se5</i>	+	++	++	+	++	-
<i>OsRac1</i>	-	+	-	-	+	-
<i>OsRac3</i>	-	++	++	-	-	-
<i>OsRac4</i>	-	+++	+	-	-	-
<i>Cen8-9</i>	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Cen8-11</i>	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Cen8-18</i>	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

+++ , Exceptionally strong; ++ , strong; + , moderate; +/- , poor; - , none; n.a. , not analyzed

^aH3 deacetylation

^bH4 deacetylation

^cH3K4me2 demethylation

表 4 他の報告のターゲット遺伝子

Target promoter	Reference	Trigger length	No. cytosines per 100 bp in the trigger			
			CpG	CpNpG	CpHpH	Total
<i>NOS</i>	Mette et al., 2000	297 bp	6	5.1	14.8	26.3
α'	Kanno et al., 2004	270 bp	3	2.6	27.4	33
<i>MS45</i>	Cigan et al., 2005	390 bp	3.6	3.8	20.3	27.7
<i>bs7</i>	Cigan et al., 2005	303 bp	4.3	5.9	15.5	25.7

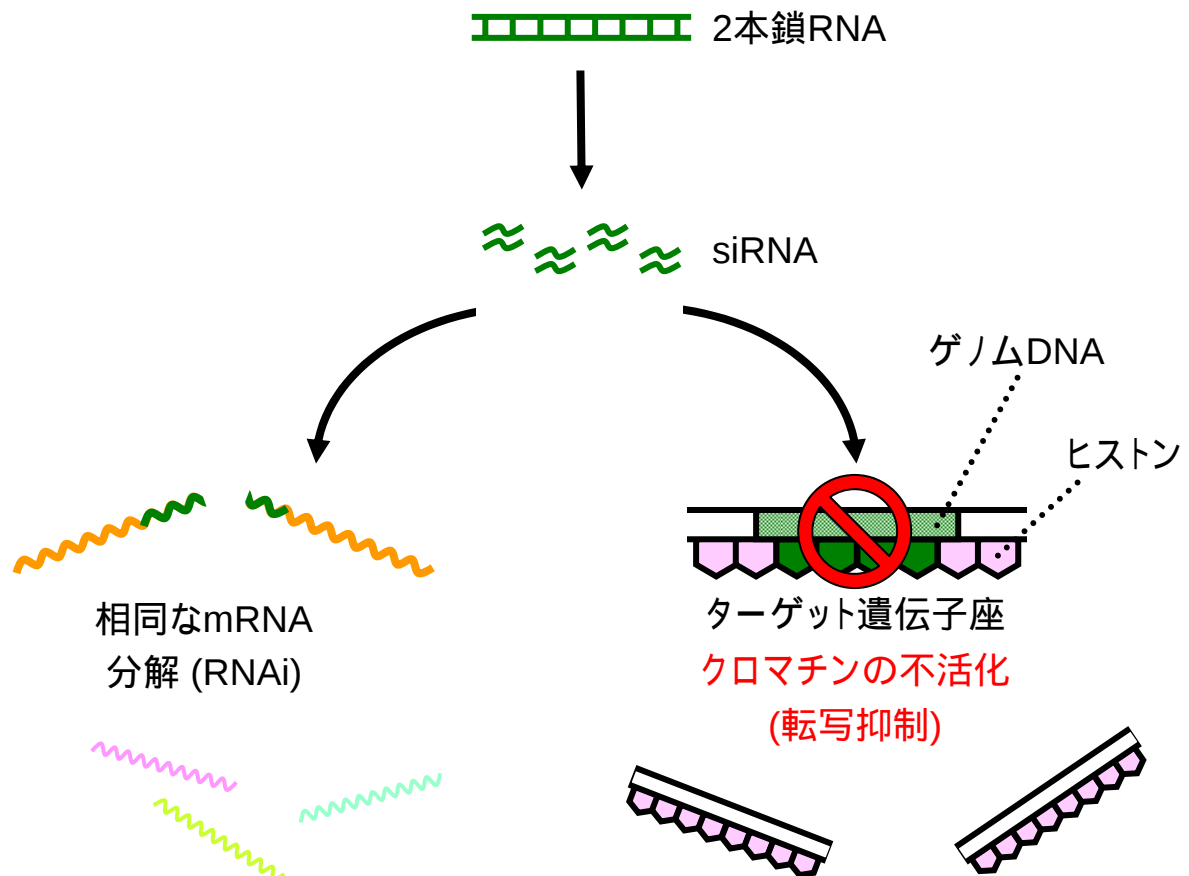


図1. siRNAの2つの機能

siRNA (small interfering RNA) は、二本鎖RNA (double-stranded RNA; dsRNA) から生じる21-26 ヌクレオチドの短いRNAであり、主に2つの機能が存在する。ひとつは、細胞質で相同なmRNAの分解、RNA interference (RNAi) を引き起こすことである。もうひとつは、核内における機能であり、相同なゲノムDNAにDNAメチル化やヒストン修飾を誘導し、クロマチンの不活化を引き起こすことが考えられている。

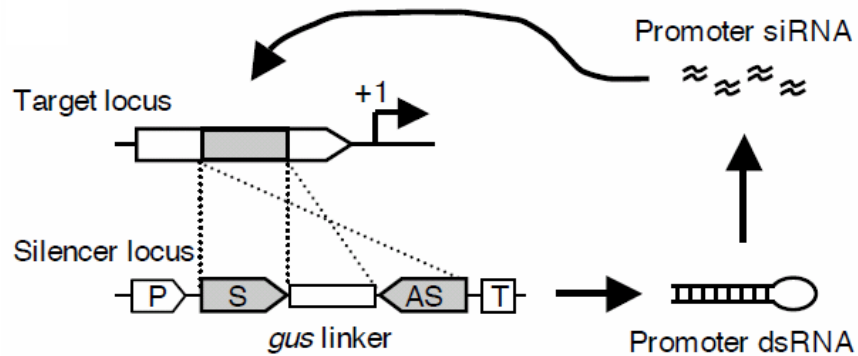
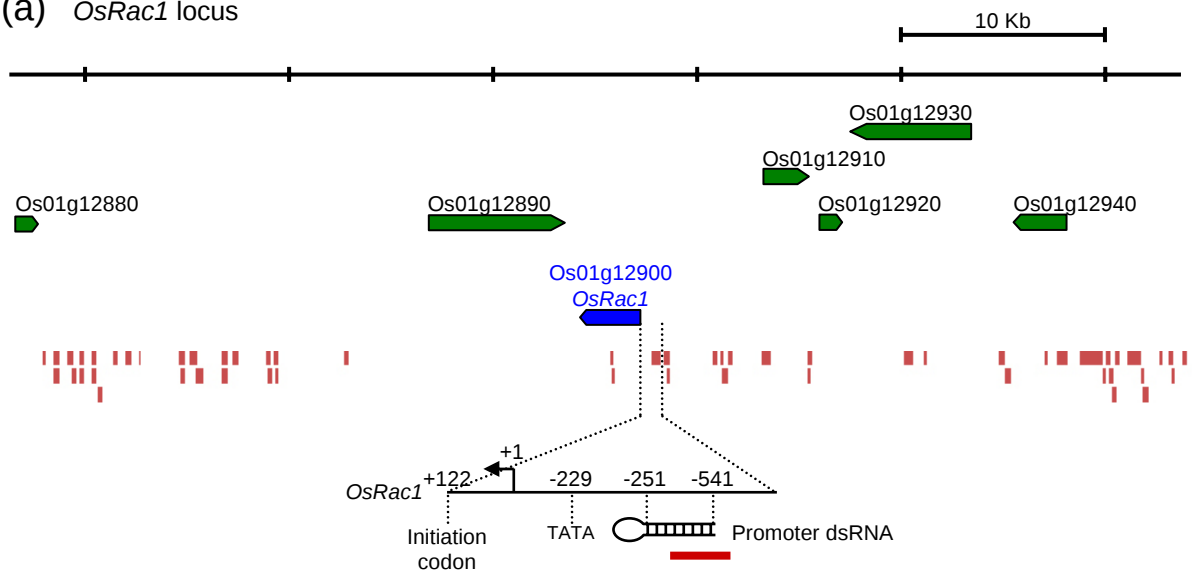


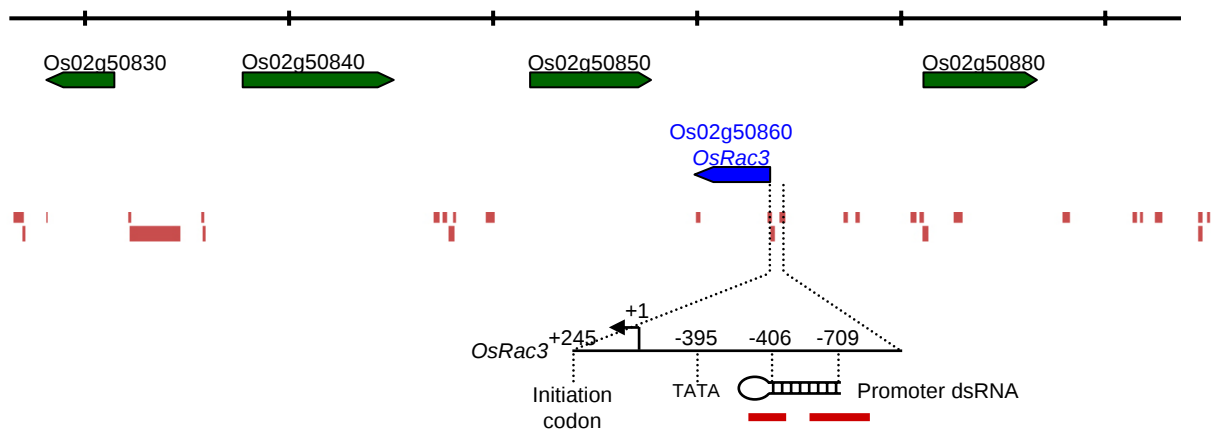
図2. RNA-mediated TGSの実験系

ヘアピン型の外来遺伝子は2本鎖RNAを転写する。2本鎖RNAは、細胞内の2本鎖RNA特異的エンドヌクレアーゼ (Dicer) 活性によりsiRNAへプロセッシングされる。RNA-mediated TGSでは、siRNAを供給するサイレンサーに、そのヘアピン型の外来遺伝子を用いている。また、サイレンサーのグレーの領域に、ターゲット遺伝子のプロモーター領域を用いることにより、そのプロモーター配列と相同なsiRNA (プロモーター-siRNA) を細胞内に高蓄積させる。プロモーター-siRNAは、ターゲット遺伝子のプロモーター領域にDNAメチル化などのエピジェネティック修飾を誘導し、クロマチンの不活化に伴う転写抑制を引き起こすことが予想される。なお、Sはセンス (sense) 方向、ASはアンチセンス (Anti-Sense) 方向を表す。

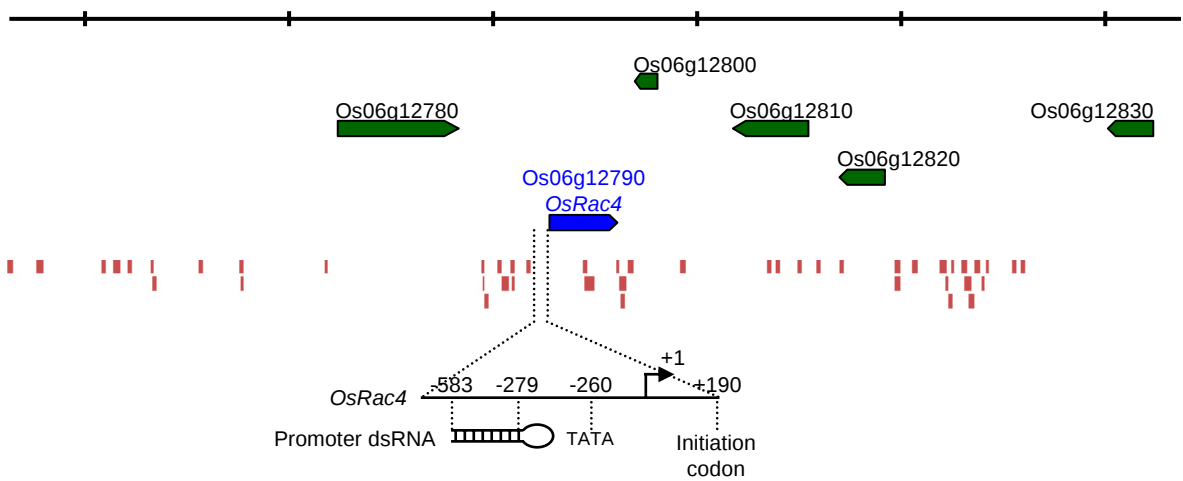
(a) *OsRac1* locus



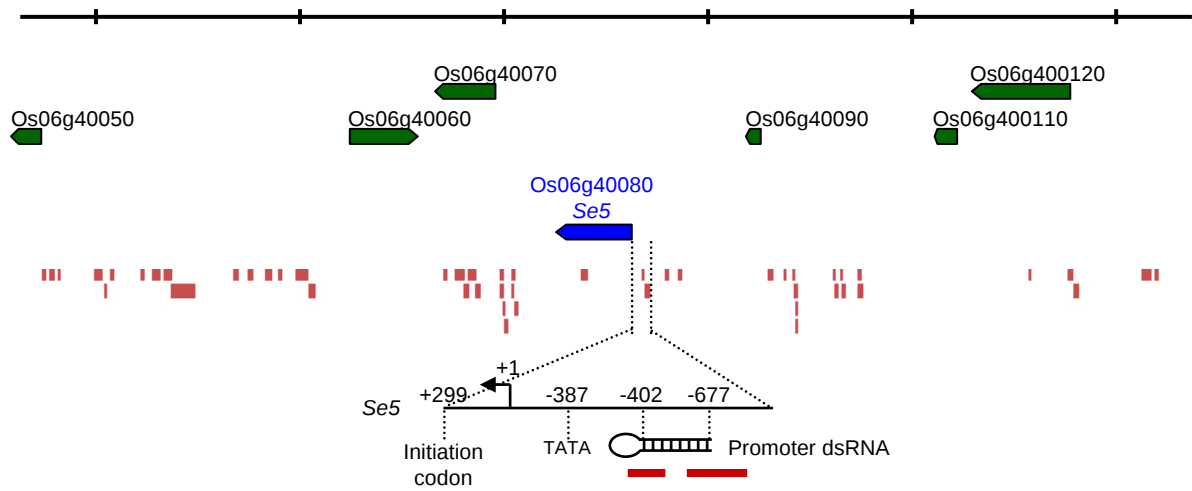
(b) *OsRac3* locus



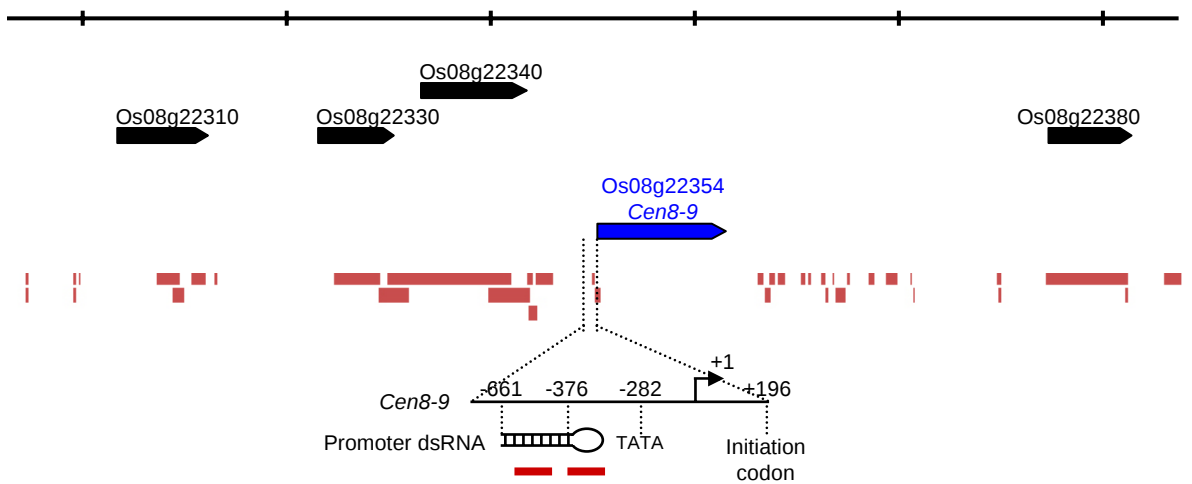
(c) *OsRac4* locus



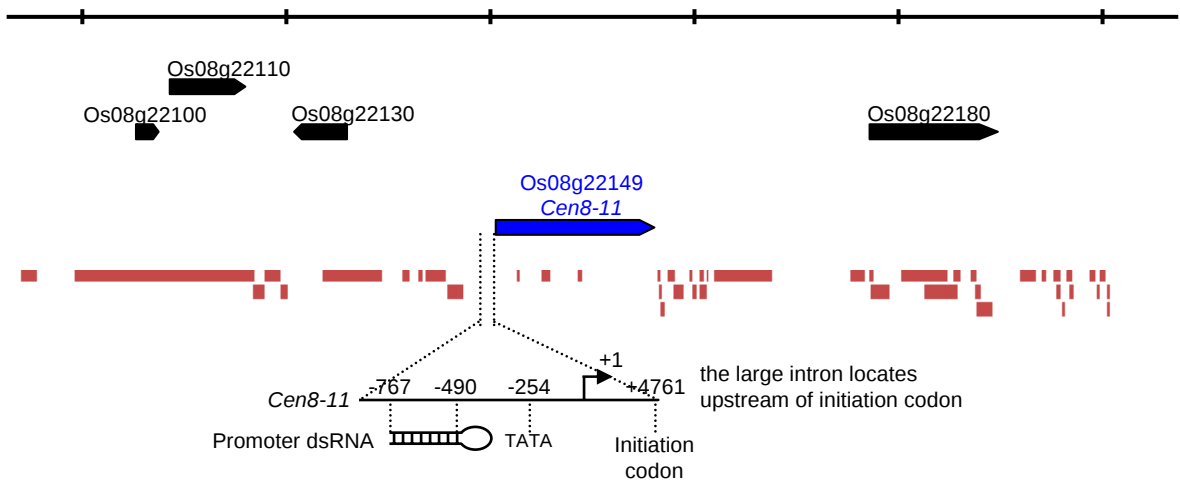
(d) *Se5* locus



(e) *Cen8-9* locus



(f) *Cen8-11* locus



(g) *Cen8-18* locus

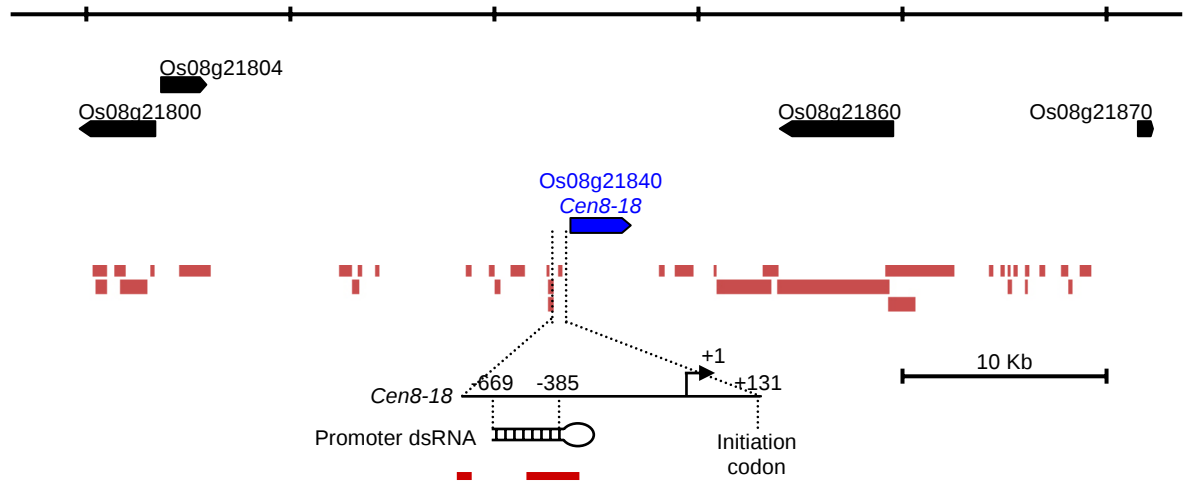


図3. ターゲット遺伝子座

ターゲットした7つの内在遺伝子座を示す。ターゲット遺伝子を青、発現している遺伝子を黒、リピート配列を赤で示す。図中には、推定転写開始点 (+1)、ターゲット領域、推定TATAボックス、そして開始コドンの位置をそれぞれ示す。

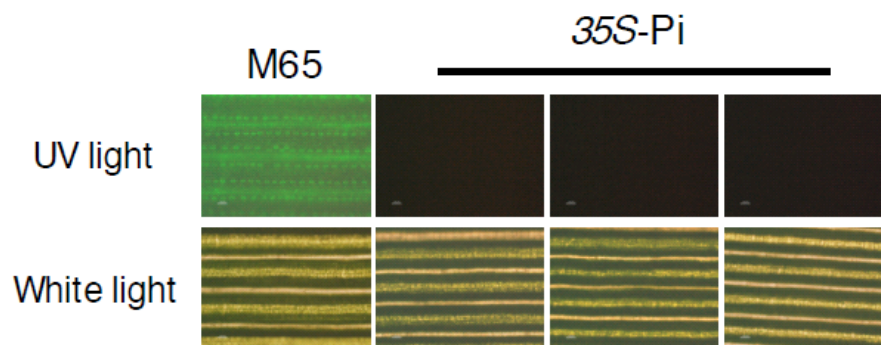


図4. M65および35S-Piラインの葉身のGFP蛍光

M65および35S-Piラインの T_0 世代の葉身におけるGFP蛍光を観察した。解析には35S-Piラインの独立の3個体を解析した。

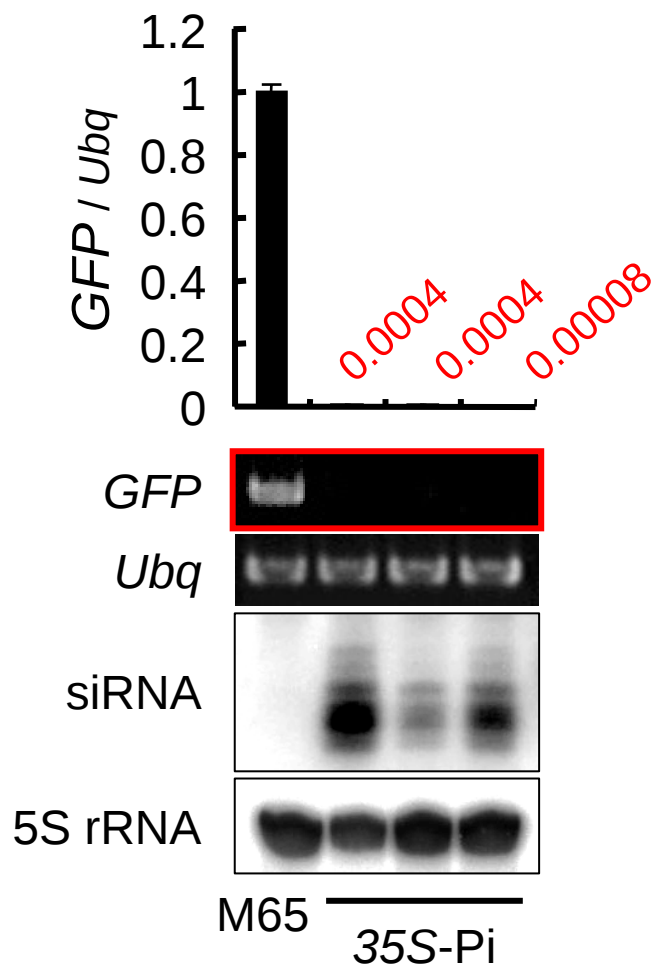


図5. ターゲット遺伝子の35S-GFPの発現解析とsiRNAの検出

M65および35S-PiのT₀世代におけるGFP mRNAの発現解析と35SプロモーターsiRNAの検出を行なった。図中の解析には、35S-Piラインの独立3個体を用いた。グラフはreal-time RT-PCRの結果であり、中央のパネルはRT-PCRの結果を示す。siRNAのノザン解析の結果は最下のパネルである。5S rRNAはノザン解析のコントロールである。

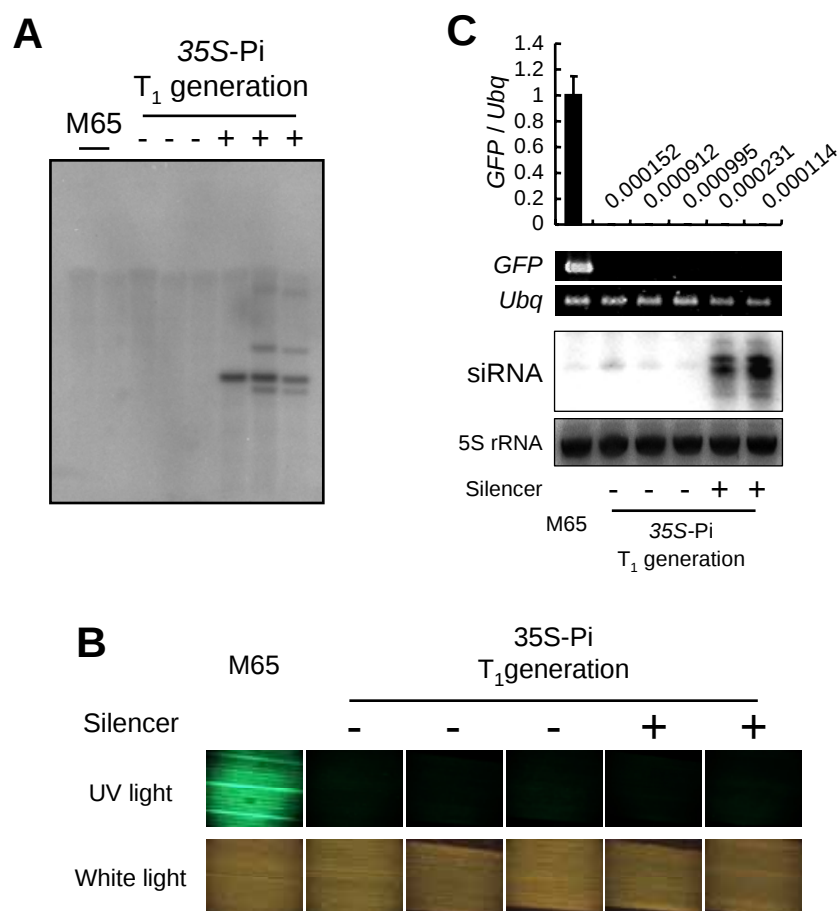


図6. 35S-PiラインのT₁世代における35S-GFPの発現解析

(A) はゲノムサザンによる35S-PiラインのT₁世代の遺伝子型の解析を示す。サイレンサー遺伝子座が分離しサイレンサーを有していない個体を -、サイレンサー遺伝子座が維持されている個体を + で示す。プローブには*gus* liker領域を用いた。また、制限酵素には*KpnI*を用いた。*KpnI*は、サイレンサー上に一箇所そのサイトが存在する。

(B) はM65および35S-PiラインのT₁世代の葉身のGFP蛍光を示す。

(C) はM65および35S-PiラインのT₁世代における35S-GFPの発現解析を示す。グラフはreal-time RT-PCRの結果であり、中央のパネルはRT-PCRの結果を示す。siRNAのノザン解析の結果は最下のパネルである。5S rRNAはノザン解析のコントロールである。

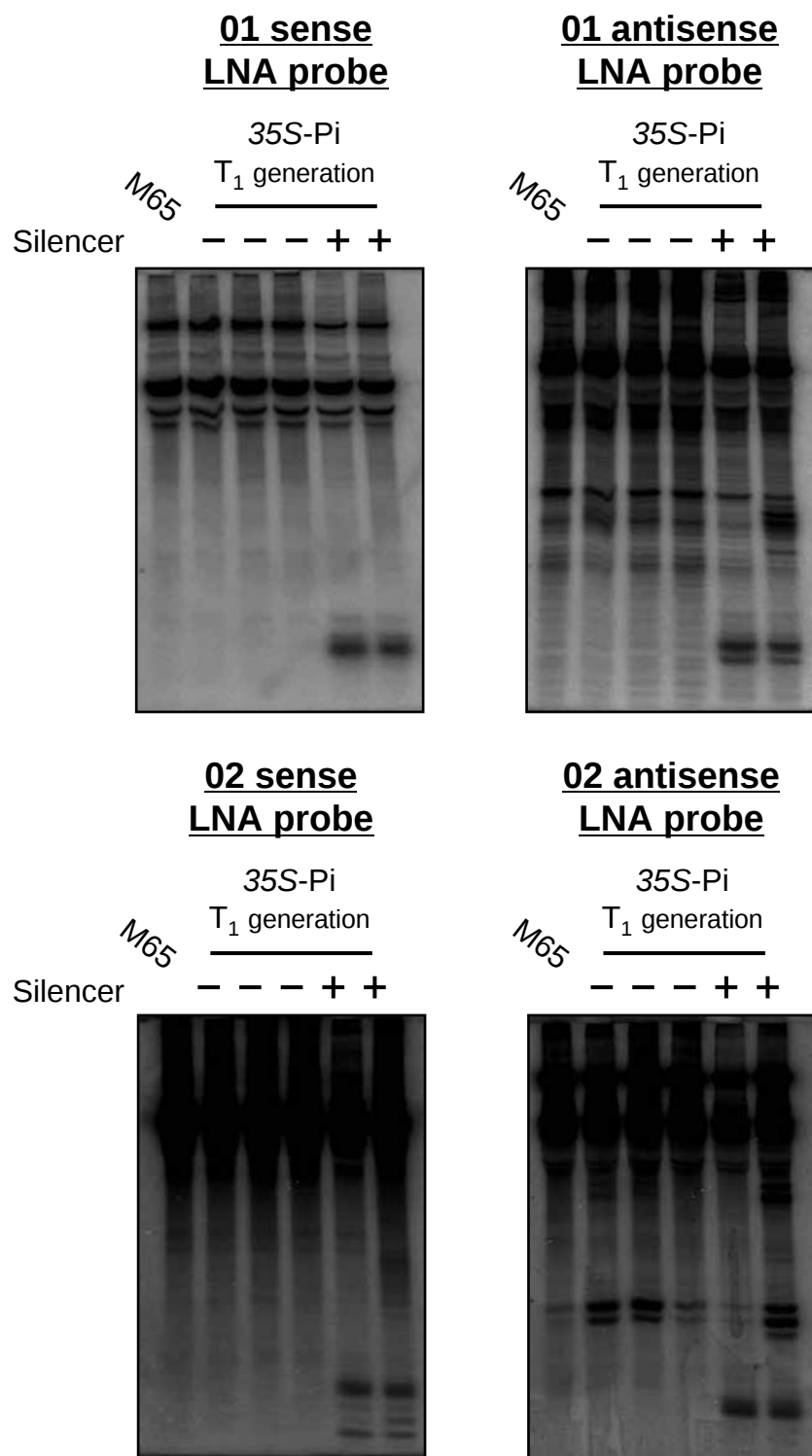


図7. 35S-PiラインのT₁世代におけるLNAプローブを用いたsiRNAの検出

35S-PiラインのT₁世代の個体について、DNAプローブやRNAプローブよりも高感度であるLNAプローブを用いたsiRNAのノザン解析を行なった。プローブに用いたLNAは材料と方法に示した。サイレンサー遺伝子座が分離しサイレンサーを有していない個体を-、サイレンサー遺伝子座が維持されている個体を+で示した。

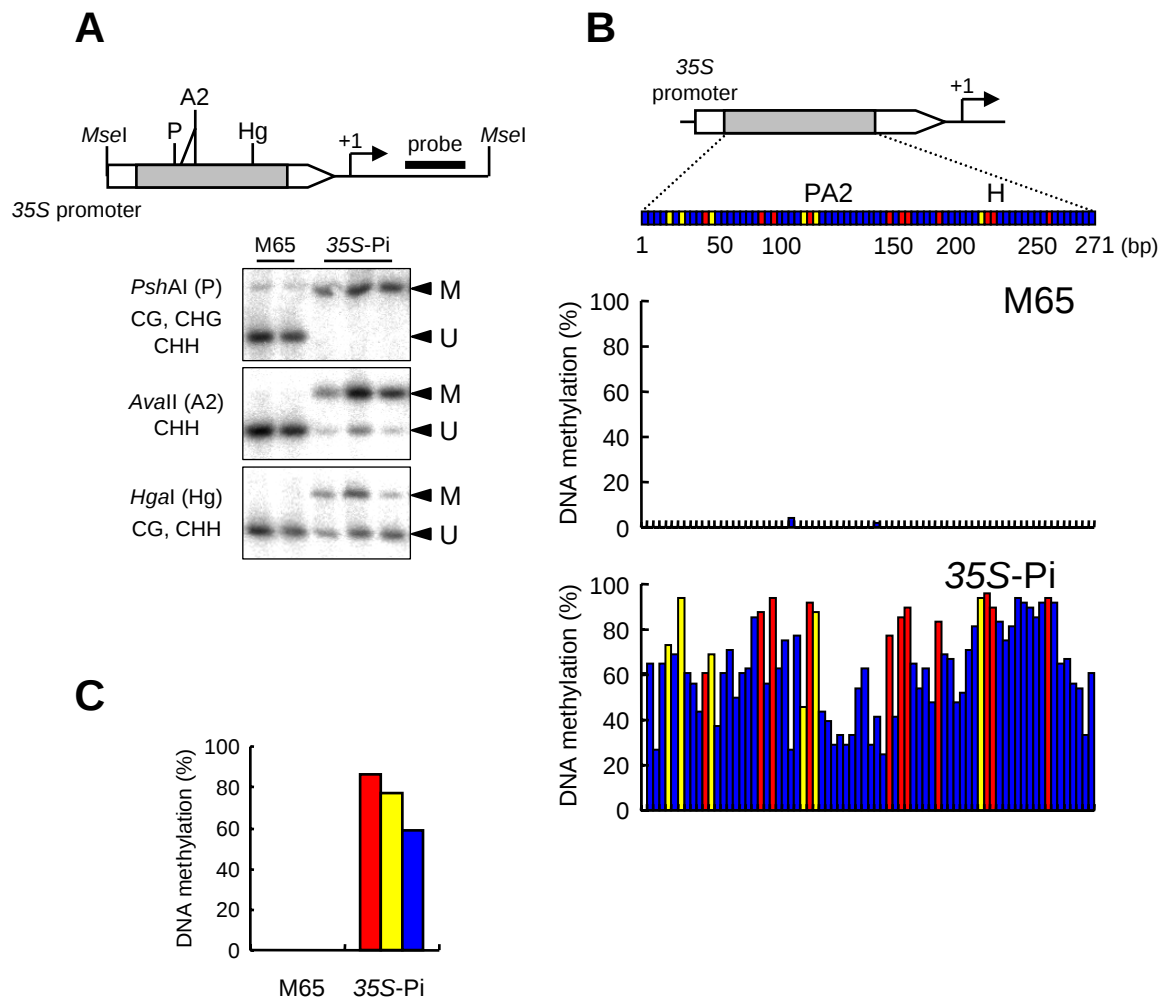


図8. 35Sプロモーター領域のDNAメチル化解析

(A) は、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン法による35Sターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析を示す。本解析では、MseI処理後のゲノムにメチル化感受性制限酵素PshAI、Avall、Hgalをそれぞれ処理した。図中に、プローブ、各制限酵素の位置は示した。なお、Mはメチル化された断片を、Uはメチル化されていない断片の位置を示す。

(B) は、35Sターゲットプロモーター領域内の全てのシトシン残基のメチル化レベルを示す。CpGパターンは赤、CpHpGパターンは黄、CpHpHパターンは青で示した。

(C) は、35Sターゲットプロモーター領域における各シトシン残基パターンごとのメチル化レベルの平均値を示す。

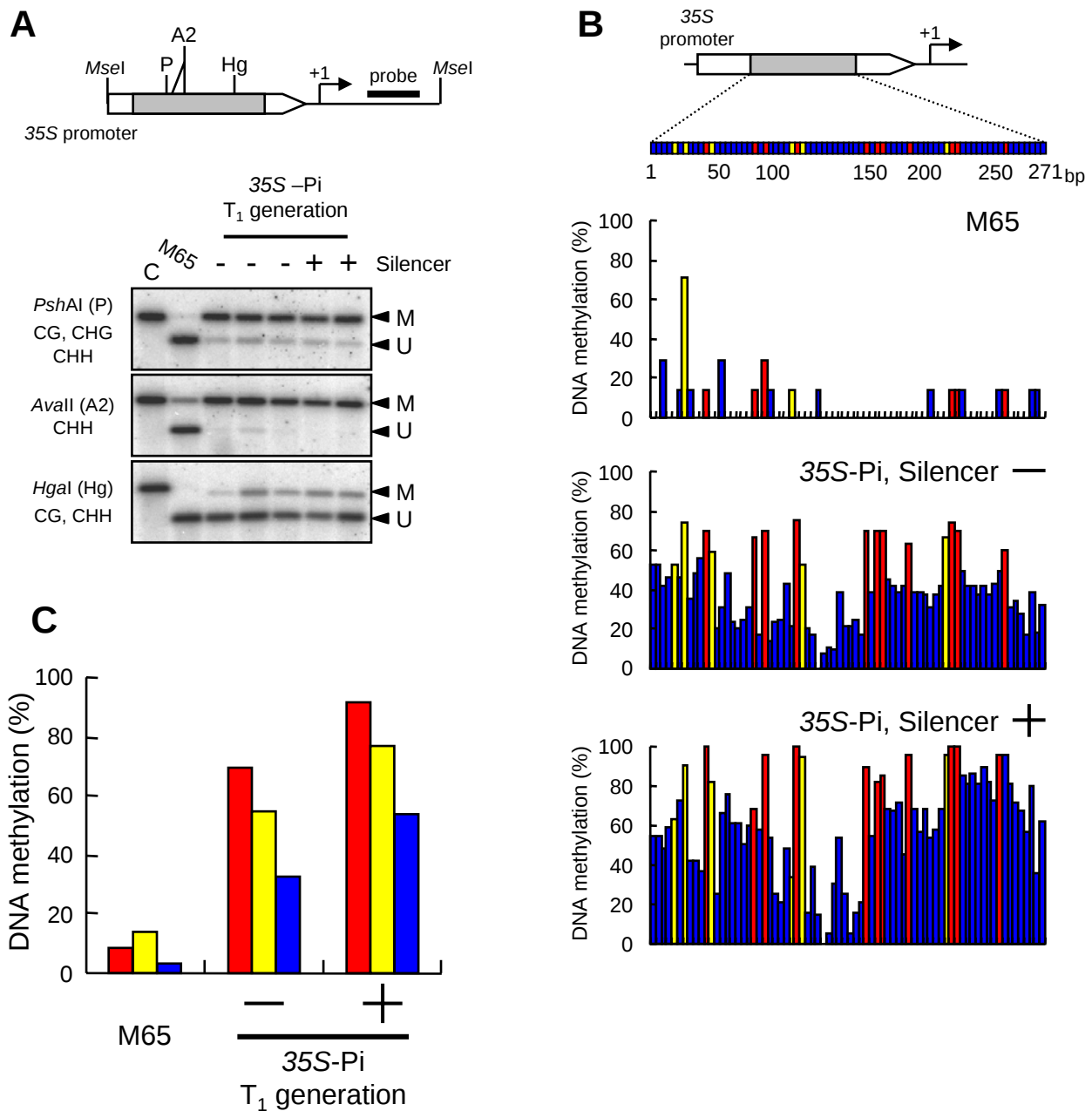


図9. T₁世代における35Sターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析

(A) は、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン法による35Sターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析を示す。サイレンサー遺伝子座が分離しサイレンサーを有していない個体を -、サイレンサー遺伝子座が維持されている個体を + で示した。35Sプロモーターの解析では、MseI処理後のゲノムにメチル化感受性制限酵素PshAI、AvaII、HgaIをそれぞれ処理した。また、CはMseIのみの処理を行なったコントロールである。図中に、プローブ、各制限酵素の位置は示した。なお、Mはメチル化された断片を、Uはメチル化されていない断片の位置を示す。

(B) は35Sターゲットプロモーター領域内の全てのシトシン残基のメチル化レベルを示す。CpGパターンは赤、CpHpGパターンは黄、CpHpHパターンは青で示した。

(C) は、35Sターゲットプロモーター領域における各シトシン残基パターンのメチル化レベルの平均値を示す。

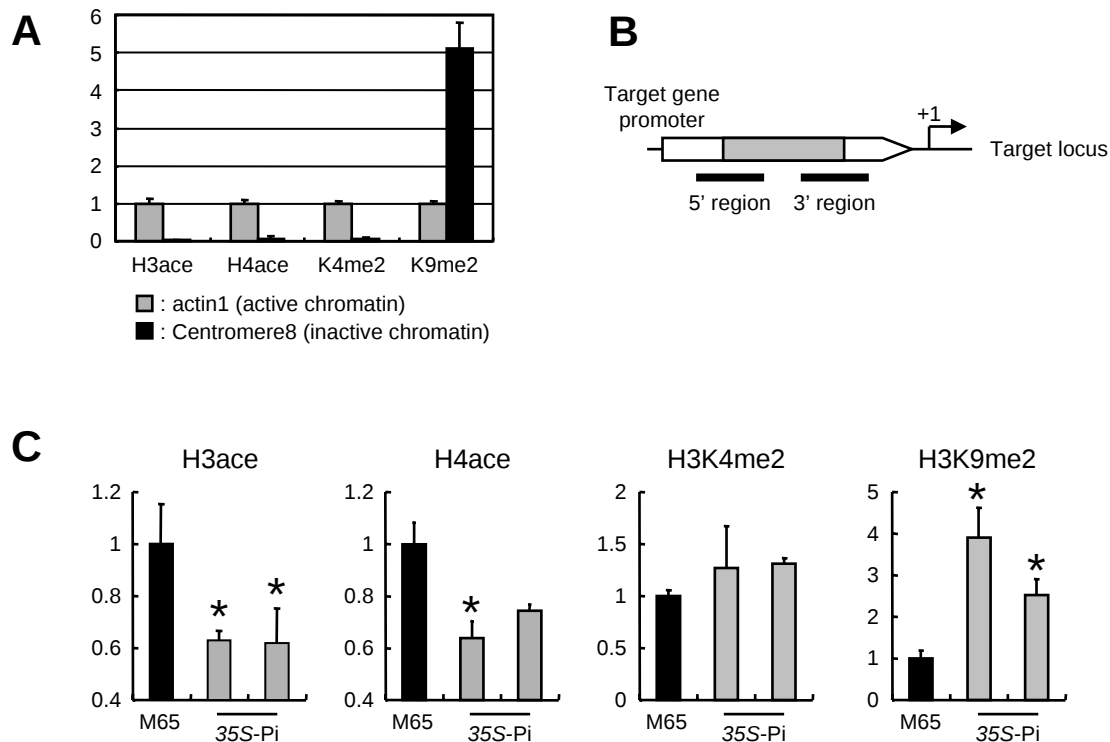


図10. 35Sターゲットプロモーター領域のヒストン修飾の解析

(A) は、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析のコントロール実験を示す。グラフは、それぞれactin1の相対値を示す。

(B) は、ChIP解析を行なったターゲットプロモーター領域を示す。

(C) は、35Sターゲットプロモーター領域のヒストン修飾の解析結果を示す。グラフは、それぞれ親株M65と比較した相対値を示す。また、各解析には独立2個体の35S-PiラインのT₀世代を用いた。アスタリスクは、Student's t test $P < 0.05$ を示す。

H3K4me2

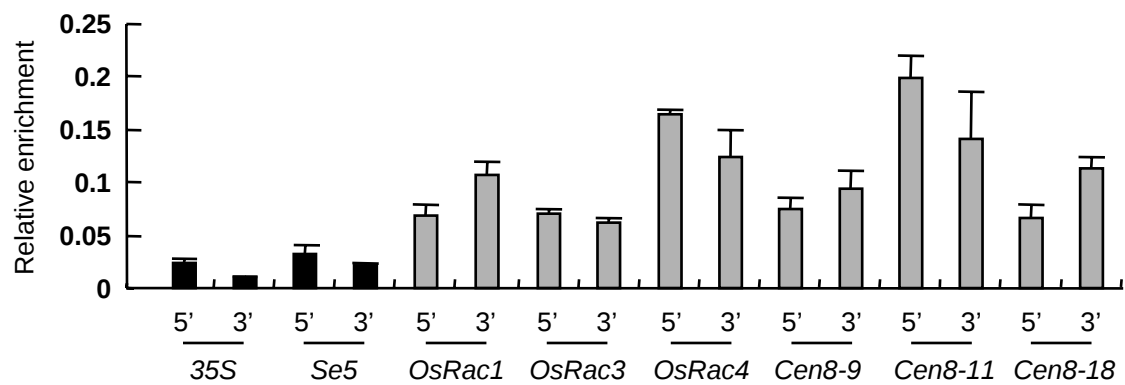


図11. M65あるいはWTにおける各ターゲットプロモーター領域のH3K4me2

図は、各形質転換イネの親株であるM65あるいは野生型 (WT) における各ターゲットプロモーター領域のH3K4me2レベルを示す。5'と3'は、それぞれ図10Bの5'regionと3'regionを示す。

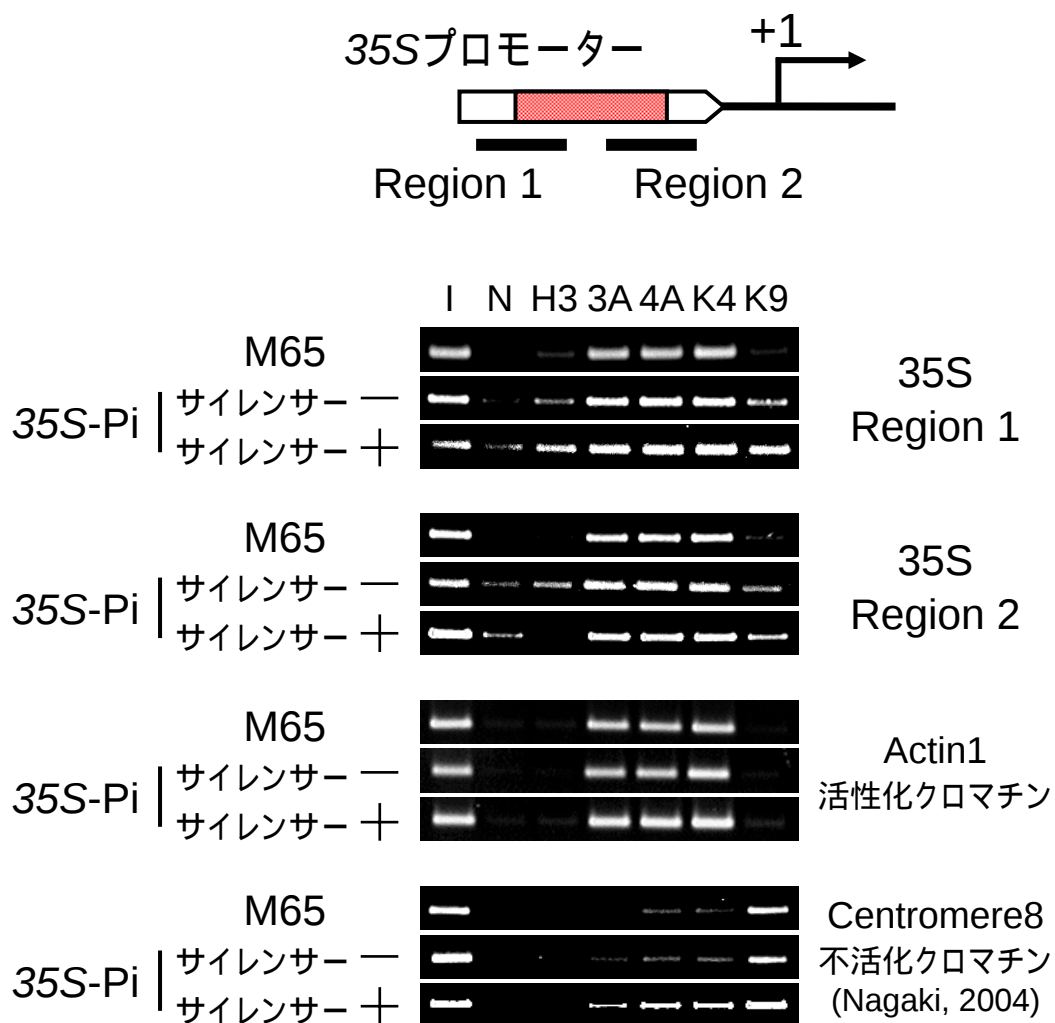


図12. 35S-PiラインのT₁世代における35Sターゲットプロモーター領域のヒストン修飾

図は、35S-PiラインのT₁世代における35Sターゲットプロモーター領域のヒストン修飾を示す。本ChIP解析では、ヒストンH3 (H3)、ヒストンH3のアセチル化 (3A)、ヒストンH4のアセチル化 (4A)、ヒストンH3K4me2 (K4)、そしてヒストンH3K9me2 (K9)を調べた。また、IはInput、NはNo anti-bodyを示す。図中に、解析した35Sプロモーター領域を示した。なお、Actin1は活性化クロマチン、Centromere8は不活化クロマチンのコントロールとして用いた。

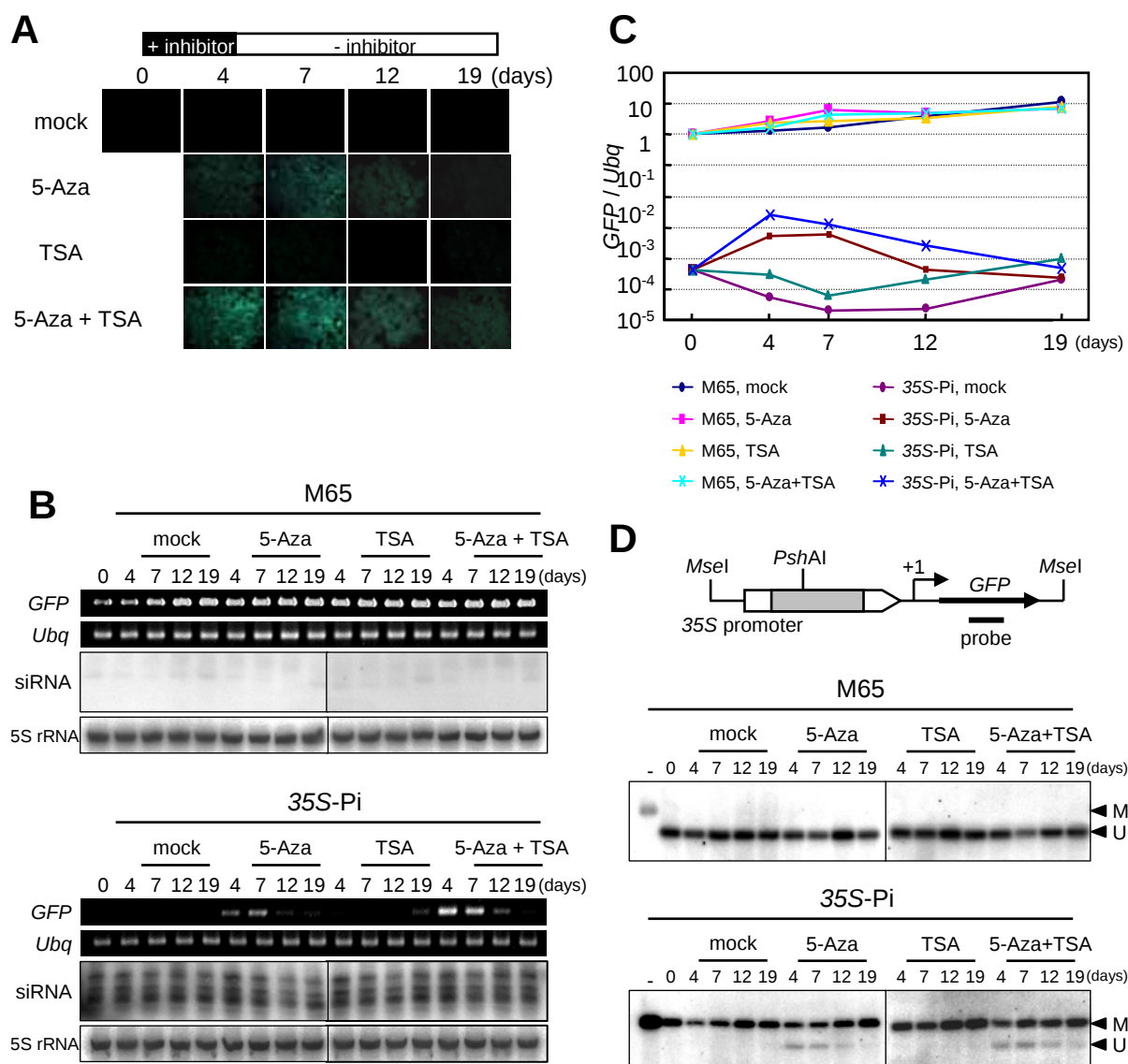


図13. 35S-Piラインのイネ培養細胞における阻害剤を用いた解析

(A) では、35S-Piラインのイネ培養細胞に、DNAメチル化阻害剤 (5-Aza)、ヒストン脱アセチラーゼ阻害剤 (TSA)、5-AzaとTSA (5-Aza + TSA)、0.1%エタノール (mock) を処理し、それらのGFP蛍光を観察した。阻害剤の処理は始めの4日間行ない、その後は阻害剤を添加していない通常の培地で培養した。また、培養スタート時から、4、7、12、19日目にサンプリングを行なった。

(B) では、阻害剤処理を行なったM65および35S-Piラインのイネ培養細胞におけるGFP mRNAの発現をRT-PCRにより解析した。また、ノザン解析により、各実験区における35Sプロモーター siRNAの検出を行なった。

(C) では、(B) のGFP mRNAをreal-time RT-PCRにより定量した。

(D) では、サザン解析により、各実験区における35Sターゲットプロモーター領域のDNAメチル化レベルを解析した。メチル化感受性酵素にはPshAIを用いた。PshAIのサイトおよびプローブの領域は図中に示した。解析には、MseIで切断後PshAI処理したゲノムDNAを用いた。MseI単独処理のものはコントロールである。また、MはDNAメチル化されている、UはDNAメチル化されていないフラグメントをそれぞれ表す。

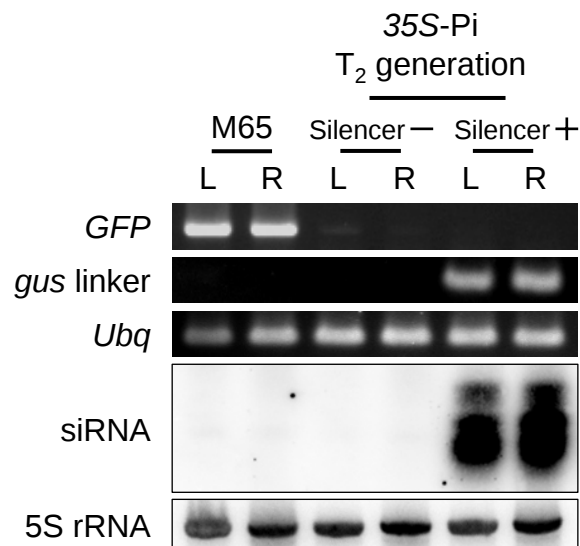


図14. 35S-PiラインのT₂世代における葉身および根における35S-GFPの発現解析とsiRNAの検出

35S-PiラインのT₂世代における35S-GFPの発現解析と35SプロモーターsiRNAの検出を行った。サイレンサーが分離した個体はSilencer -、サイレンサーが維持されている個体はSilencer + で示している。また、Lは葉身、Rは根からの実験区をあらわす。なお、*gus* linkerは、サイレンサーの発現の指標である。

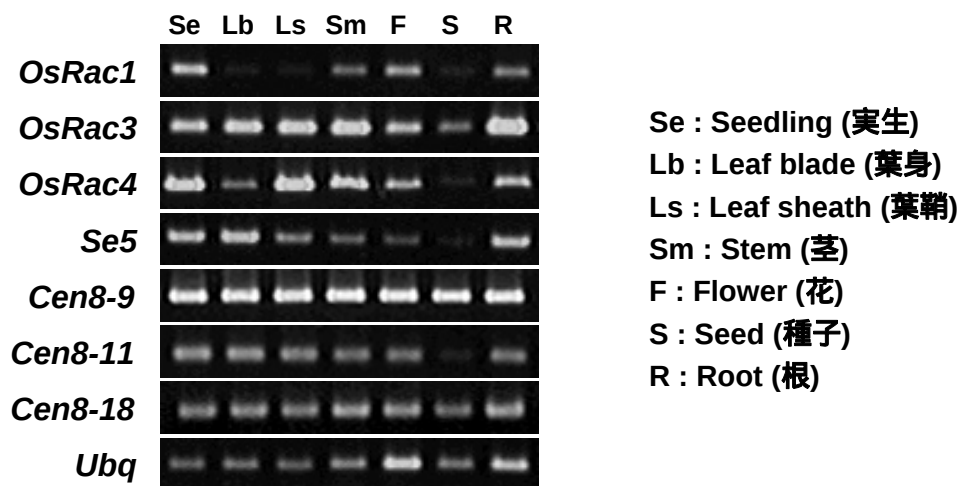
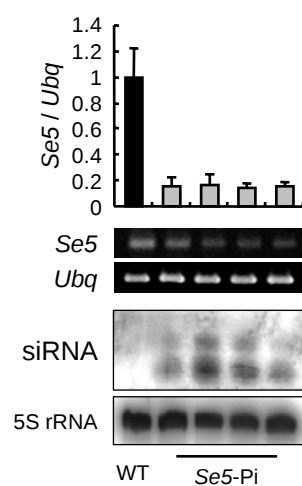


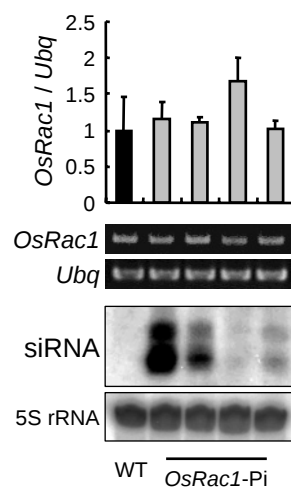
図16. 野生型におけるターゲット遺伝子の組織別の発現

野生型における7つのターゲット内在遺伝子の組織別発現をRT-PCRにより解析した。組織は図中に示す。

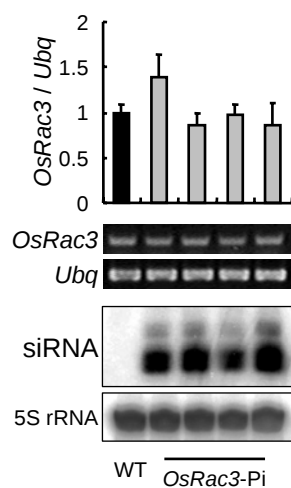
A Se5



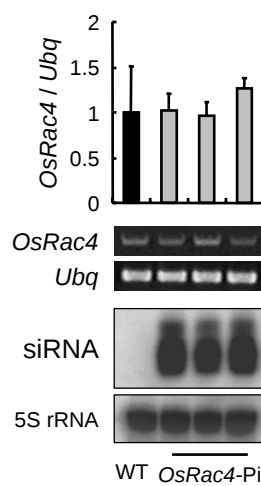
B OsRac1



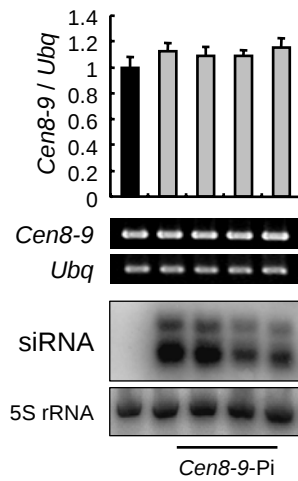
C OsRac3



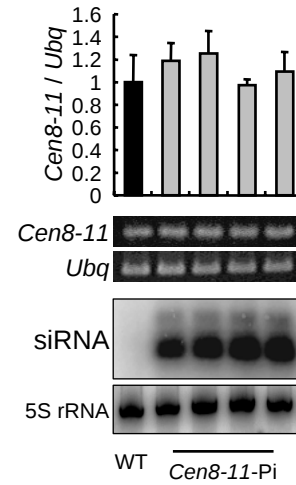
D OsRac4



E Cen8-9



F Cen8-11



G Cen8-18

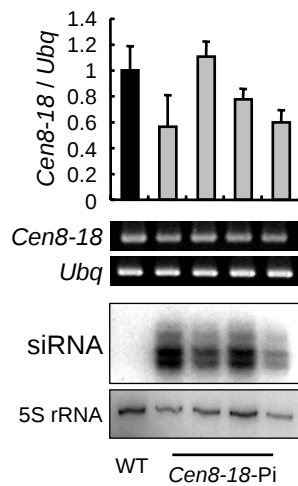


図17. ターゲット内在遺伝子の発現解析とsiRNAの検出

各形質転換イネにおけるターゲット内在遺伝子の発現解析と目的のプロモーター siRNAの検出を行なった。(A) はSe5-Pi、(B) はOsRac1-Pi、(C) はOsRac3-Pi、(D) はOsRac4-Pi、(E) はCen8-9-Pi、(F) はCen8-11-Pi、(G) はCen8-18-PiラインのT₀世代の解析を示す。図中の解析には、それぞれ独立の形質転換イネ3-4個体を用いた。グラフは real-time RT-PCRの結果であり、中央のパネルはRT-PCRの結果を示す。siRNAのノザン解析の結果は最下のパネルである。5S rRNAはノザン解析のコントロールである。

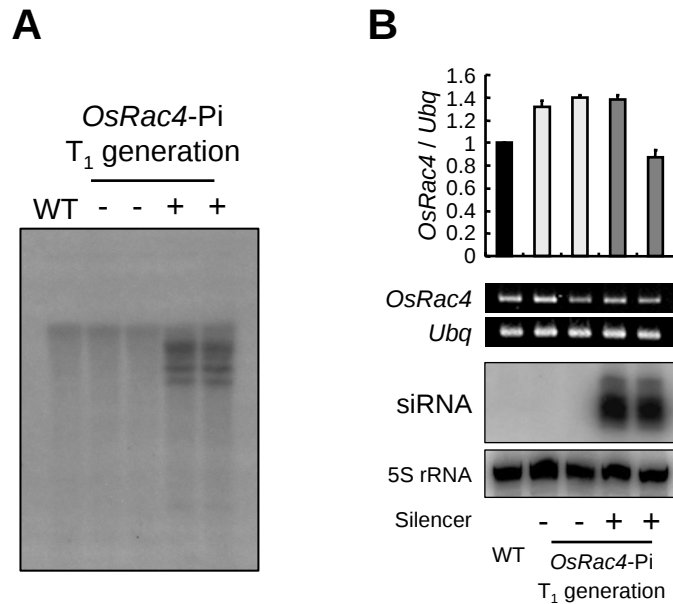


図18. *OsRac4*-PiラインのT₁世代における*OsRac4*の発現解析

(A) はゲノムサザンによる*OsRac4*-PiラインのT₁世代の遺伝子型の解析を示す。サイレンサー遺伝子座が分離しサイレンサーを有していない個体を -、サイレンサー遺伝子座が維持されている個体を + で示す。プローブには*gus* liker領域を用いた。また、制限酵素には*KpnI*を用いた。*KpnI*は、サイレンサー上に一箇所そのサイトが存在する。

(B) は*OsRac4*-PiラインのT₁世代における*OsRac4*の発現解析を示す。グラフはreal-time RT-PCRの結果であり、中央のパネルはRT-PCRの結果を示す。siRNAのノザン解析の結果は最下のパネルである。5S rRNAはノザン解析のコントロールである。

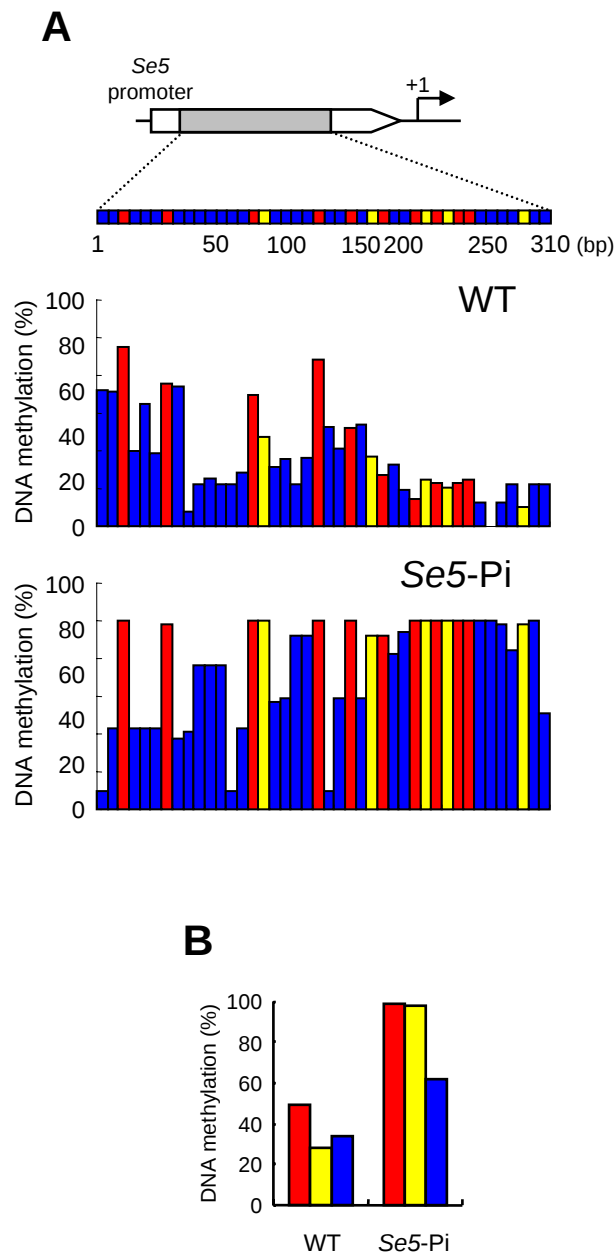


図19. Se5プロモーター領域のDNAメチル化解析

(A) は、Se5ターゲットプロモーター領域内の全てのシトシン残基のメチル化レベルを示す。CpGパターンは赤、CpHpGパターンは黄、CpHpHパターンは青で示した。

(B) は、Se5ターゲットプロモーター領域における各シトシン残基パターンごとのメチル化レベルの平均値を示す。

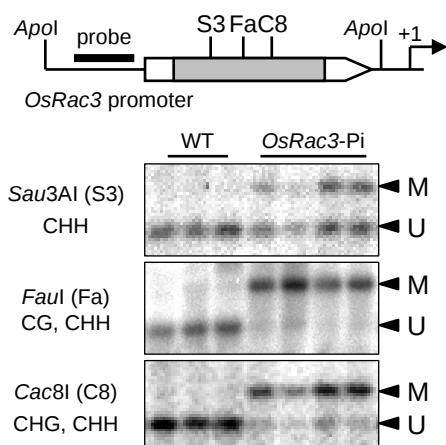
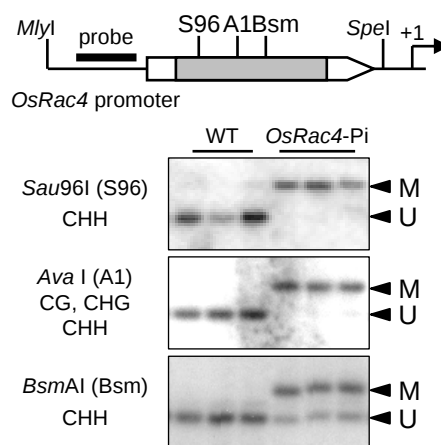
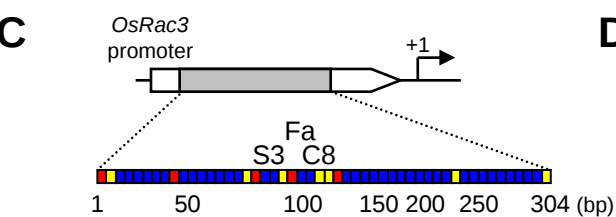
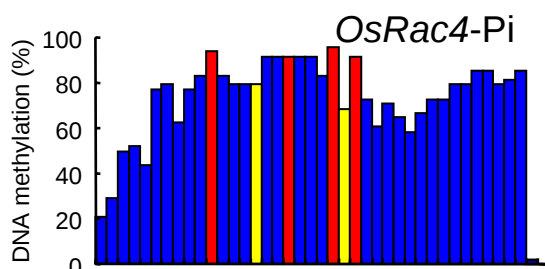
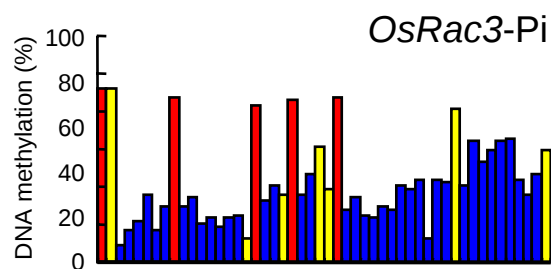
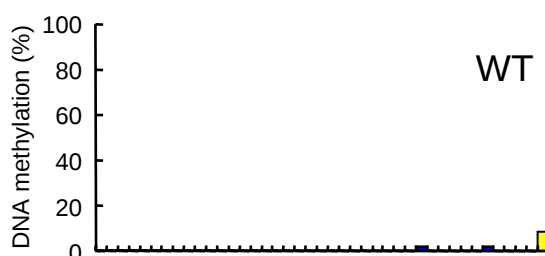
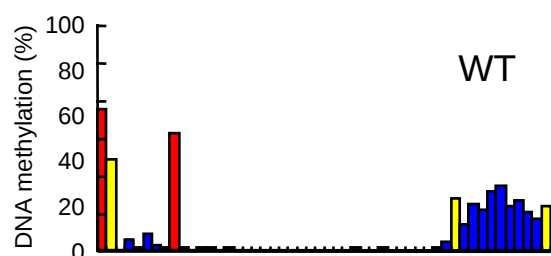
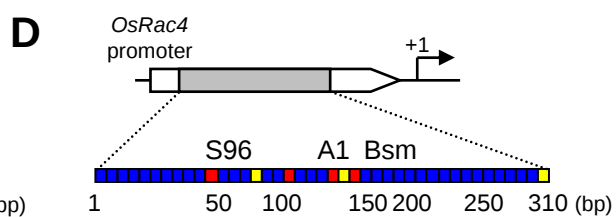
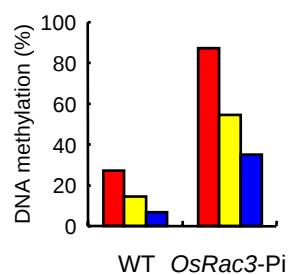
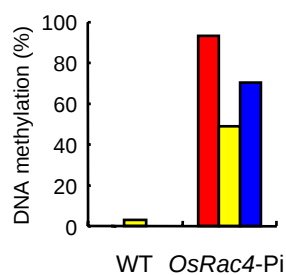
A**B****C****D****F****G**

図20. *OsRac3*および*OsRac4*ターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析

(A) および (B) では、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン法による*OsRac3*、*OsRac4*のターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析を行なった。*OsRac3*プロモーターの解析では、*ApoI*処理後のゲノムにメチル化感受性制限酵素*Sau3AI*、*FauI*、*Cac8I*をそれぞれ処理した。*OsRac4*プロモーターの解析では、*MlyI*、*SpeI*処理したゲノムに、メチル化感受性酵素*Sau96I*、*AvaI*、*BsmAI*をそれぞれ処理した。図中に、プローブ、各制限酵素の位置は示した。なお、Mはメチル化された断片を、Uはメチル化されていない断片の位置を示す。

(C) および (D) では*OsRac3*および*OsRac4*のターゲットプロモーター領域内の全てのシトシン残基のメチル化を示す。CpGパターンは赤、CpHpGパターンは黄、CpHpHパターンは青で示す。

(E) および (F) では、*OsRac3*および*OsRac4* のターゲットプロモーター領域における各シトシン残基パターン毎のメチル化の平均値を示す。

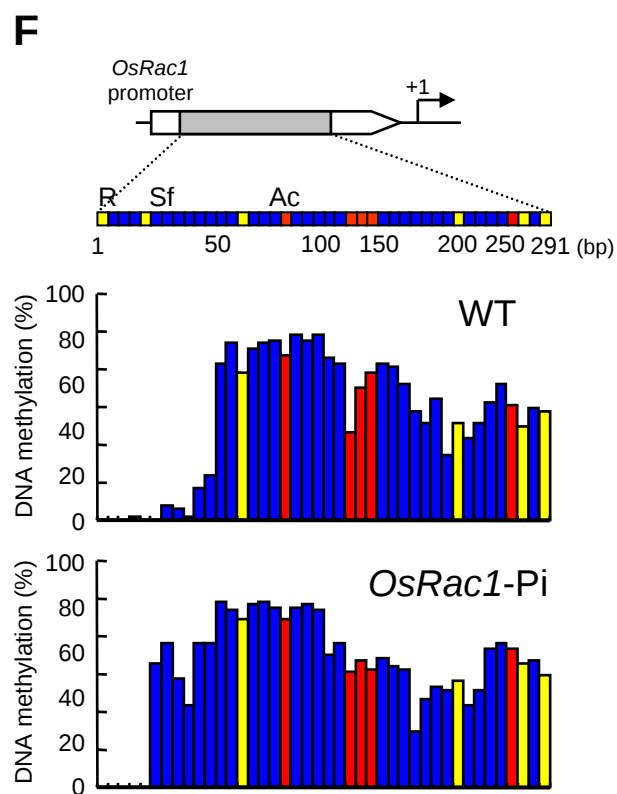
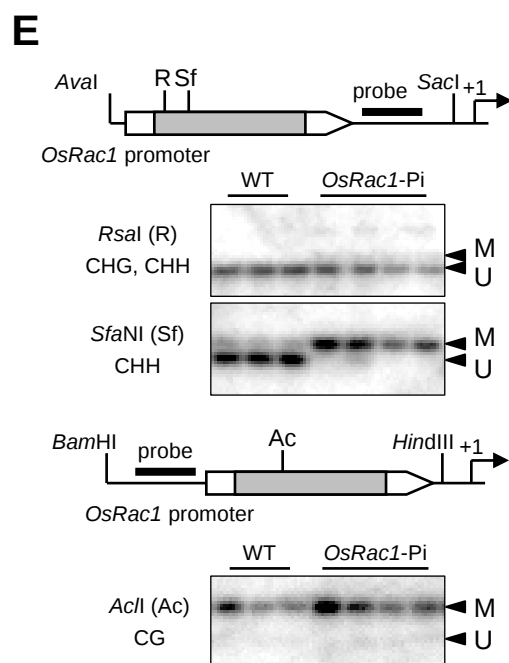
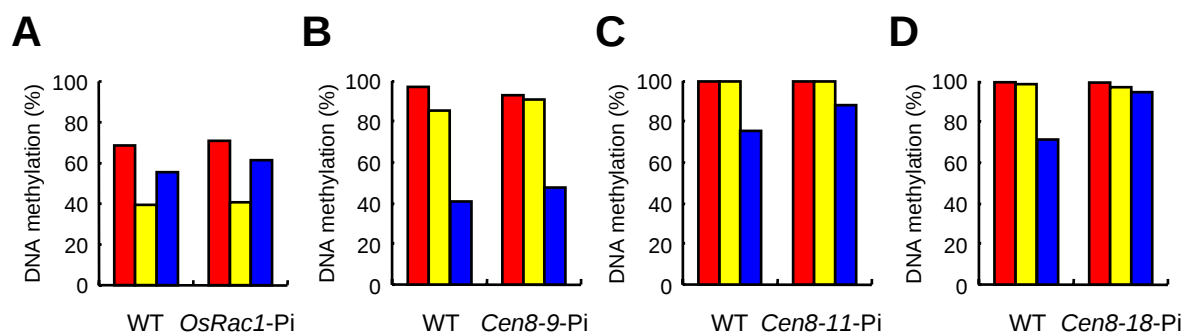


図21. *OsRac1*、*Cen8-9*、*Cen8-11*、*Cen8-18*ターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析

(A) - (D) は、*OsRac1* (A)、*Cen8-9* (B)、*Cen8-11* (C)、および*Cen8-18* (D) のターゲットプロモーター領域における各シトシン残基パターンのメチル化レベルの平均値を示す。

(E) は、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン法による*OsRac1*ターゲットプロモーター領域のDNAメチル化解析を示す。*OsRac1*プロモーターの解析では、*Ava*I、*Sac*I処理後のゲノムにメチル化感受性制限酵素*Rsa*I、*Sfa*NIを、あるいは、*Bam*HI、*Hind*III処理後のゲノムにメチル化感受性酵素*Acl*Iをそれぞれ処理した。図中に、プローブ、各制限酵素の位置は示した。なお、Mはメチル化された断片を、Uはメチル化されていない断片の位置を示す。

(F) は、*OsRac1*ターゲットプロモーター領域内の全てのシトシン残基のメチル化を示す。CpGパターンは赤、CpHpGパターンは黄、CpHpHパターンは青で示す。

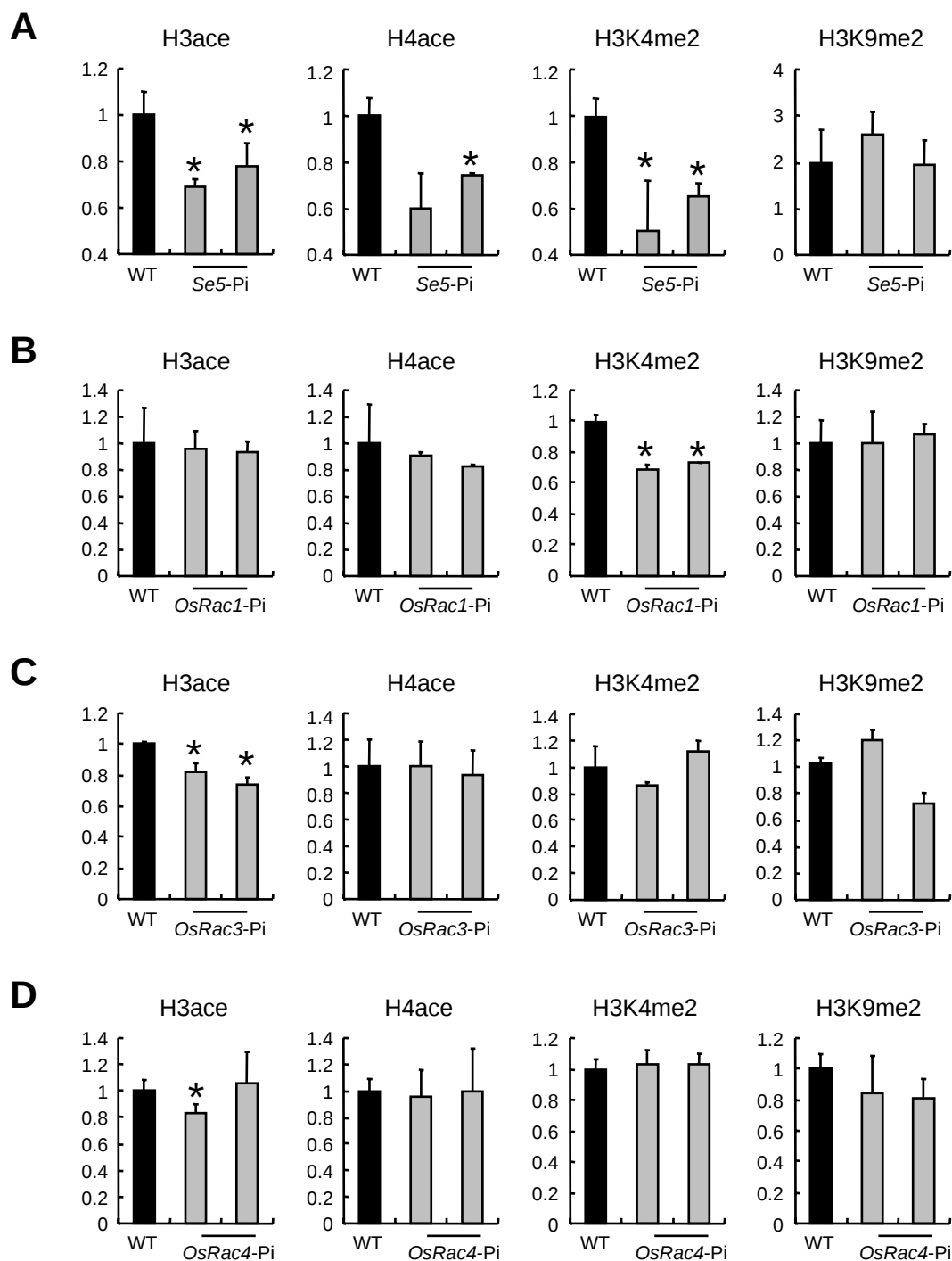


図22. *Se5*, *OsRac1*, *OsRac3*, *OsRac4*ターゲットプロモーター領域のヒストン修飾の解析

Se5-Pi (A), *OsRac1*-Pi (B), *OsRac3*-Pi (C), *OsRac4*-Pi (D) における各ターゲットプロモーターのヒストン修飾の解析を行なった。それぞれ、WTと比較した相対値を示す。また、各解析には独立2個体の形質転換イネを用いた。アスタリスクは、Student's t test $P < 0.05$ を示す。

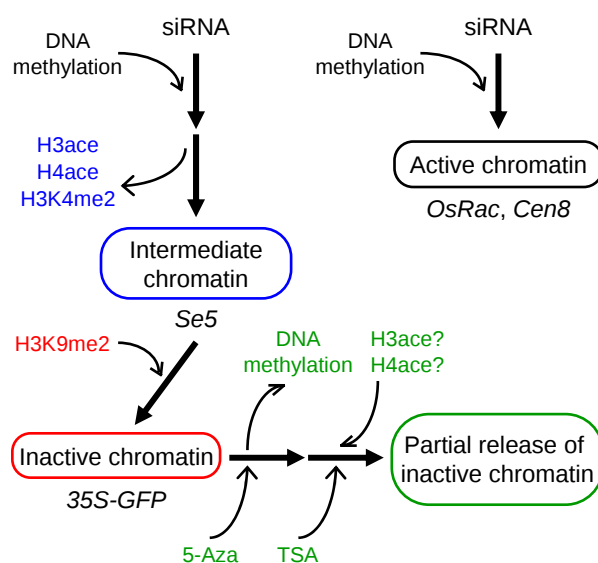


図23. プロモーターsiRNAによるターゲット領域へ影響

35SプロモーターsiRNAは、DNAメチル化、アクティブクロマチンを示すヒストン修飾の減少を引き起こす。さらに、ヘテロクロマチンマーカ―のH3K9me2を誘導する。その結果、35Sプロモーターは不活化される“Inactive chromatin”。35Sプロモーターの“Inactive chromatin”は5-AzaとTSAの阻害により、一部解除される。内在遺伝子OsRacとCen8プロモーターは、プロモーターsiRNAによりDNAメチル化は誘導されるが、ヒストン修飾はほとんど影響を受けない。そのため“Active chromatin”の状態を示す。しかし、内在遺伝子Se5プロモーターでは、アクティブなヒストン修飾が減少し、“Intermediate chromatin”の状態を示す。

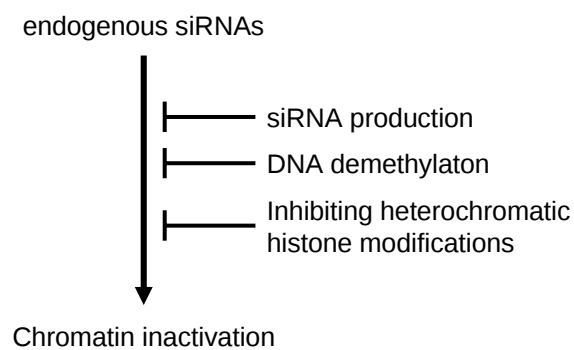


図24. siRNAの活性に対するゲノムの防御機構の仮説

siRNA productionは、siRNA産生段階におけるsiRNAの活性を制限する機構。

DNA demethylationは、ROS1によるDNA脱メチル化の機構。

Inhibiting heterochromatic histone modificationsは、ヒストン修飾レベルでの防御機構。