遺伝子発現変化を伴わない潜在的分子メカニズム—エピジェネティック・プライミング—による植物再生

松永幸大

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

要旨：エピジェネティック・プライミングは遺伝子発現変化を伴わずに、遺伝子発現前の待機状態を創り出す潜在的な分子メカニズムである。ヌクレオソームを解きクロマチンをオープンな状態にすることで将来の遺伝子発現に備える状態を創り出す。エピジェネティック・プライミングは、幹細胞の分化や細胞のガン化の前段階や薬物中毒の進行段階に見られるが、植物再分化への関与の報告はなかった。今回、私達はシロイヌナズナの変異体スクリーニングによって、植物のエピジェネティック・プライミング因子として、ヒストン脱メチル化酵素 LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1-LIKE 3 (LDL3) を同定した。カルス形成中に、LDL3 は H3K4me2 を取り除くことで、将来のシュート誘導に備えてシュート形成遺伝子群を遺伝子発現の待機状態にする。今回の研究から、植物の再生力を支える分子機構に、エピジェネティック・プライミングが関与することがわかった。

Plant regeneration by epigenetic priming

Sachihiro Matsunaga

Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

Author for correspondence: S. Matsunaga, sachi@edu.k.u-tokyo.ac.jp

Summary: Epigenetic priming is one of the potential systems that genes are poised for activation by external signal inputs. Although the priming does not alter the gene expression, it is considered to induce the open structure of chromatin and the poised state for the future transcription. This priming is involved in stem cell differentiation, cancer development and drug action but remains unclear in plant regeneration. Through integrated analysis of genome-wide histone modifications and gene expression profiles, we successfully identified an epigenetic priming by a histone demethylase LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1-LIKE 3 (LDL3) that specifically eliminates H3K4me2 during formation of callus derived from roots of *Arabidopsis thaliana*. While LDL3-mediated H3K4me2 removal does not immediately affect gene expression, it does facilitate the later activation of genes that act to form shoot progenitors after shoot induction. This finding gives insights into plant regenerative competency with epigenetic priming.

Key words: epigenetic priming, histone demethylation, histone modification, plant regeneration, shoot regeneration

はじめに

エピジェネティクスは「DNA塩基配列自体の変化を伴わず、細胞分裂後も継承される核内変化」と捉えることができる。この約30年のDNA修飾・ヒストン修飾・クロマチン構造変化・核内三次元構造などのエピジェネティクス研究により、DNAからタンパク質への「一方通行の流れ」を表したセントラルドグマは、多様で柔軟性のある「遺伝情報と表現型の双方向性」を表す分子システムへと変貌を遂げた。

エピジェネティクスにより、獲得形質の世代を超えた継承例が見つかるとともに、ゲノム的には全く同一な一卵性双生児の性格や健康状態の違いなど、従来の遺伝学では説明できない現象が説明できるようになりつつある。中でも遺伝子発現の分子メカニズム解明に、エピジェネティクスの概念が導入されることで、研究手法そのものが大きく変わってきた。

従来研究では、環境刺激や分化誘導により、表現型に大きく変化が起こった時に、その前後で遺伝子発現を比較してきた。例えば、変化前と変化後の細胞・組織・器

官を集めてきてmRNAを抽出しライブラリーを構築して、RNA-seqにかけてupregulation(発現が上昇した)やdownregulation(発現が減少した)遺伝子群を比較解析する手法である。しかし、生命現象の解明には時間軸を考慮することが重要である。例えば、変化後の状態と比較する「変化前」という状態は、1分前・1時間前・1日前・1週間前でも異なる。また、生物は将来を予測して、プログラミングされた遺伝子発現に従って、成長・分化していく場合もある。生物は周囲の環境から、絶えず刺激と影響を受け続けており、その反応は表現型として現れずとも、潜在的に生体内で蓄積されている可能性が高い。

この表現型が現れない、つまり遺伝子発現を伴わない、細胞核内で起こる潜在的分子メカニズムが「エピジェネティック・プライミング」である。

最初の報告は、様々な血球系細胞に分化する造血幹細胞(hematopoietic stem cell)の研究によってもたらされた。造血幹細胞から赤血球系造血細胞(erythroid cell)に分化するときに、βグロブリン遺伝子の急激な発現上昇がみられる。ところが、その分化前(遺伝子発現上昇前)の造血幹細胞

の時から、 β グロブリン遺伝子座のクロマチン内に、遺伝子発現が上昇するときに見られるヒストン修飾が検出された。このヒストン修飾は、ヌクレオソームを解きDNAを露出させ、クロマチンを構造的に開くとともに、その場所にRNAポリメラーゼIIを呼び込むための土台となる基本転写因子群を結合させている。つまり、あらかじめ将来の遺伝子発現に備えて、特定の遺伝子座のヒストンが修飾されることが報告されたのである。

この遺伝子発現前のヒストン修飾変化の報告以前には、分化前のマクロファージ系前駆細胞や神経前駆細胞において、分化後に働くマクロファージや神経特異的な遺伝子群の上流転写制御領域に基本転写因子群があらかじめ結合することが報告されていた (Kontaraki et al. 2000, Leferve et al. 2003)。従来、基本転写因子群は、遺伝子発現のための刺激や分化スイッチ後に、特定遺伝子群の上流域に結合すると考えられていたが、一部の遺伝子の上流域には基本転写因子群が分化刺激前からあらかじめ結合して待機状態を創る可能性が示唆されていたのである。

その後、このような分化刺激前からあらかじめヒストン修飾変化により遺伝子発現の待機状態を創り出すことを「エピジェネティック・プライミング」と呼ぶようになり、血球の分化 (Waleter et al. 2008)、ヒト幹細胞の分化 (Spivakov and Fisher 2007, Liber et al. 2010, Dillon 2012)、ヒトの胚発生 (Wang et al. 2015)、ガン化 (Vicente-Duenas et al. 2018)、薬物中毒発症 (五十嵐 2017, Mews et al. 2018) など、様々な現象に関与する分子機構として知られるようになった。今回、私達はエピジェネティック・プライミングによって植物再生が制御されることを見出した (Ishihara et al. 2019)。

エピジェネティクス因子LDL3の同定とイメージング解析

植物のシュート再分化現象におけるエピジェネティック制御機構に興味を持ち、シロイヌナズナのヒストン修飾酵素

の変異体を用いて分子機構の解明を試みた。シロイヌナズナの根をカルス誘導培地に置いて14日間カルスを誘導した後、シュート誘導培地に移してシュートを再分化させるシステムを用いた。このシステムを用いてヒストン修飾変異体をスクリーニングした。その結果、カルスは正常に形成されるが、シュート誘導培地に移して21日経過した後でもシュートの再分化が起こらない変異体として、ヒストン脱メチル化酵素LDL3 (Lysine-specific Demethylase Like 3) の変異体 *ldl3* を同定した (Ishihara et al. 2019) (図1)。

ヒストン脱メチル化酵素はヒストンのメチル化リシン残基を脱メチル化する反応を触媒する。真核生物のヒストンメチル化酵素は、フラビン依存性のモノアミン酸化酵素であるLSDファミリー (Shi et al. 2004)、jumonji domainを持つJMJファミリー (Takeuchi et al. 1995, Yamane et al. 2006) の二つに大別される (Shi and Tsukada 2013)。LDL3は前者のLSDファミリーに属している。ヒトのLSDファミリーに属するLSD1は、ガン化の引き金因子として解析が進んでおり、LSD1をターゲットとした制癌剤の開発が盛んに行われている (Ota and Suzuki 2018)。

シロイヌナズナのLSDファミリーにはLDL1, LDL2, LDL3, FLD (Flowering Locus D) の4つのパラログがある。これらの変異体はいずれも早咲き (early flowering) の表現型を示す (Martignago et al. 2019)。また、LDL2は遺伝子内部 (gene body) のH3K4me1を減少させることで、転写抑制を引き起こすことが報告されている (Inagaki et al. 2018)。*ldl1*, *ldl2*, *fld* 変異体は、シュート再生に異常がみられないことから、LSDファミリー中、シュート再生に関与する因子はLDL3のみであることがわかった。

LDL3の植物脱分化過程および再分化過程における発現パターンを解析した。LDL3プロモーター下にLDL3-GFPを繋いだpLDL3::LDL3-GFPベクターを *ldl3* 変異体に導入し、二光子顕微鏡によるディープイメージングを行った (図2)。その結果、根では維管束周辺の内鞘細胞 (pericycle)

図1 カルス形成とシュート再生のシステムと *ldl3* 変異体の表現型。右写真はシュート誘導培地21日目のカルスを示す。

図2 二光子顕微鏡によるLDL3発現のディープイメージング解析。根(0d)からカルス誘導培地14日目(14d)のカルス、シュート誘導培地1日目(1d)から7日目(7d)のカルスを解析した。マゼンダはPI染色、緑はGFP蛍光を示す。14dの右上に右下白線内の拡大図を示す。

cells) でLDL3は主に発現していた。カルス誘導培地上の根由来のカルスでは、LDL3の発現パターンは徐々に広がり、カルス誘導培地14日目では、カルス全体にその発現が見られた。また、カルス誘導培地から移植したシュート誘導培地7日目のカルスには、シュートが生じる茎頂分裂組織 (SAM) 原基でLDL3の発現が多く検出された。このようなカルス全体からSAM原基に集中する発現パターンから、LDL3がシュート再生に関与することを裏付けることができた。

LDL3はカルスにおける根端分裂組織の遺伝子群の発現減少には関与しない

組織や器官は細胞分裂によって構築される。細胞分裂しても、分化を裏打ちする遺伝子発現の特異性が失われないことから、組織や器官の特異性も失われることはない。このような遺伝子発現の継承のことを細胞記憶と呼ぶ(田中, 2011)。また、iPS細胞は、それが由来する細胞の遺伝子発現情報をエピジェネティクスとして温存している。そのため、由来する細胞に分化する効率が非由来細胞に分化する効率よりも高い(Hu et al. 2010, Kim et al. 2010)。このように細胞が遺伝子発現情報をエピジェネティクスとして細胞記憶することをエピジェネティック記憶と呼ぶ。iPS細胞を継代培養すると、由来する元の細胞のエピジェネティック記憶は消去される(Luu et al. 2018)。

根から脱分化して形成されたカルスは、根の細胞記憶を維持している。また、由来がどのような器官であってもカルスは、根端分裂組織の遺伝子発現を維持していることが知られている(Sugimoto et al. 2010, Sugimoto et al. 2011)。カルスからシュートが再分化するときに、根端分裂組織の遺伝子群の発現が減少し、SAMの遺伝子群の発現が上昇することで、SAM原基が形成される。*ldl3*変異体のカルスでSAM原基が形成されない理由として、根端分裂組織の遺伝子発現減少が起こらない、SAM形成に関与する遺伝子の発現が上昇しない、さらにはその両方がうまくいかないことが考えられた。

そこで、カルス誘導培地14日目のカルス(シュート誘導培地に移す直前のカルス)、シュート誘導培地に移して1日目と7日目のカルスにおける遺伝子発現を、野生型と*ldl3*変異体で比較解析した。その結果、根端分裂組織の遺伝子群の発現抑制には差はなかった。このことは、*ldl3*変異体においても根の細胞記憶消去は起こっていることを示

しており、LDL3が根端分裂組織の遺伝子群の発現減少に関与していないことがわかった。一方、シュート誘導培地移行後1日目および7日目の野生型のカルスでは、SAMの形成に関与する遺伝子群の発現上昇がみられるが、*ldl3*変異体のカルスでは発現上昇が見られなかった。つまり、*ldl3*変異体でSAM原基が形成されない理由は、シュート誘導培地に移植してもSAM遺伝子群の遺伝子発現が上昇しないからである。

LDL3によるヒストン脱メチル化によってエピジェネティック・プライミングが起きる

次に、クロマチン免疫沈降を用いて、根、カルス誘導培地14日目のカルス、シュート誘導培地に移してから1日目のカルスでヒストンH3K4meの状態を比較した。野生型と*ldl3*変異体の間で、H3, H3K4me1, H3K4me3の差はなかったが、H3K4me2は*ldl3*変異型カルス特異的に蓄積していた。驚いたことに、そのH3K4me2蓄積パターンは、カルス誘導培地14日目のカルスとシュート誘導培地に移してから1日目のカルスの間で、ほとんど同じであった(図3)。つまり、H3K4me2のヒストン修飾は、カルス誘導培地からシュート誘導培地に移植しても変化しなかったのである。これは、シュート培地に移行する前のカルスの段階から、LDL3はH3K4me2を取り除いており、分化誘導が起こってから取り除くわけではないことを意味している(図4)。つまり、LDL3はカルスの段階からH3K4me2を脱メチル

図3 クロマチン免疫沈降による野生型と*ldl3*変異体のH3K4meの比較。

図4 LDL3によるシュート形成遺伝子群のエピジェネティック・プライミング。

化し、シュート誘導に備えて遺伝子発現の待機状態を創り出すエピジェネティック・プライミング因子であった。

そこで、カルス中に起こるH3K4me2の減少が起こる遺伝子座を同定したところ、シュート形成に関わる既知の遺伝子群の他に、シュート再生への関与が未報告のハウスキーピング遺伝子がみつかった。それらの遺伝子は、アンモニウム代謝酵素、ユビキチン化タンパク質、グルタミン酸合成酵素などをコードしていた。それらの変異体を用いて、シュート再生の表現型を調べた。その結果、この表現型は*ldl3*変異体に比較して弱い表現型であったが、いずれの変異体もシュート再生の頻度が低くなった。このことは、従来の分化誘導刺激前後の比較発現解析では見出せない分化に関与するハウスキーピング遺伝子群も、エピジェネティック・プライミングを指標に同定できることも示している。

私達が発見したLDL3によるH3K4me2の除去を基盤としたエピジェネティック・プライミングは、動植物を通じて初めて「ヒストン修飾のイレイサー」がプライミングに関与することを示した報告となった。今後、LDL3と相互作用する因子を同定し、植物再生のエピジェネティクス・プライミング複合体の解析を進めていきたいと考えている。

おわりに

エピジェネティック・プライミングの研究は開始されたばかりである。動物細胞の分化遺伝子のエンハンサーは、遺伝子発現前にオープンクロマチンの状態になり、H3K4me1修飾されて、エンハンサーRNAが転写される(Suzuki et al. 2017)。この一連の過程は、エピジェネティック・モジュレーションと呼ばれるが、プライミングやパイオニア転写因子との関係は不明なままである。転写開始のための基本転写因子群やRNAポリメラーゼのリン酸化との関係など、遺伝子発現待機状態を創り出すエピジェネティック・プライミングは、更にその分子メカニズムの研究が必要である。遺伝子発現の前に起こる潜在的なメカニズムによって生命現象を新しい側面から説明できるようになることを期待したい。

謝辞

本研究は、石原弘也氏、杉本薫博士、稲垣宗一博士、乾弥生博士、坂本卓也博士、鈴木孝征博士、関原明教授、角谷徹仁教授、ポール・ター博士、エリオット・マイロビッツ教授との共同研究成果である。科研費19H03259および15H05962の支援を受けた。Figureはすべてクリエイティブ・コモンズ・ライセンス(表示4.0 国際)のもとに改変して作成した。 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

引用文献

Bottardi, S., Aumont, A., Grosveld, F., and Milot, E. (2003) Developmental stage-specific epigenetic control of human β -globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood* 102: 3989-3997.

Dillon, N. (2012) Factor mediated gene priming in pluripotent stem cells sets the stage for lineage specification. *Bioessays* 34: 194-204.

Hu, Q., Friedrich, A. M., Johnson, L. V., and Clegg, D. O. (2010)

Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells* 28: 1981-1991.

Inagaki, S., Takahashi, M., Hosaka, A., Ito, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Tarutani, Y., and Kakutani, T. (2017) Gene-body chromatin modification dynamics mediate epigenome differentiation in *Arabidopsis*. *EMBO J* 36: 970-980.

Ishihara, H., Sugimoto, K., Tarr, P. T., Temman, H., Kadokura, S., Inui, Y., Sakamoto, T., Sasaki, T., Aida, M., Suzuki, T., Inagaki, S., Morohashi, K., Seki, M., Kakutani, T., Meyerowitz, E. M., and Matsunaga, S. (2019) Primed histone demethylation regulates shoot regenerative competency. *Nat Commun* 10: 1786.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunliffe, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P., and Daley, G. Q. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467: 285-290.

Kontaraki, J., Chen, H. H., Riggs, A., and Bonifer, C. (2000) Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev* 14: 2106-2122.

Lefevre, P., Melnik, S., Wilson, N., Riggs, A. D., and Bonifer, C. (2003) Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo. *Mol Cell Biol* 23: 4386-4400.

Liber, D., Domasch, R., Holmqvist, P. H., Mazzarella, L., Georgiou, A., Leleu, M., Fisher, A. G., Labosky, P. A., and Dillon, N. (2010) Epigenetic priming of a pre-B cell-specific enhancer through binding of Sox2 and Foxd3 at the ESC stage. *Cell Stem Cell* 7: 114-126.

Luu, P. L., Geroovska, D., Schöler, H. R., and Araúzo-Bravo, M. J. (2018) Rules governing the mechanism of epigenetic reprogramming memory. *Epigenomics* 10: 149-174.

Martignago, D., Bernardini, B., Polticelli, F., Salvi, D., Cona, A., Angelini, R., and Tavladoraki, P. (2019) The four FAD-dependent histone demethylases of *Arabidopsis* are differently involved in the control of flowering time. *Front. Plant Sci.* 10: 669.

Mews, P., Walker, D. M., and Nestler, E. J. (2018) Epigenetic priming in drug addiction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 83:131-139.

Ota, Y., and Suzuki, T. (2018) Drug design concepts for LSD1-selective inhibitors. *Chem Rec* 18: 1782-1791.

Shi, Y. G., and Tsukada, Y. (2013) The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a017947.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase

- homolog LSD1. *Cell* 119: 941-953
- Spivakov, M. and Fisher, A. G. (2007) Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 8: 263-271.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P., and Meyerowitz, E. M. (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* 21: 212-218.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., and Meyerowitz, E. M. (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18: 463-471.
- Suzuki, H. I., Young, R. A., and Sharp, P. A. (2017) Super-enhancer-mediated RNA processing revealed by integrative microRNA network analysis. *Cell* 168: 1000-1014.
- Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J., and Higashinakagawa, T. (1995) Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* 9: 1211-1222.
- Vicente-Dueñas, C., Hauer, J., Cobaleda, C., Borkhardt, A., and Sánchez-García, I. (2018) Epigenetic priming in cancer initiation. *Trends Cancer* 4: 408-417.
- Walter, K., Bonifer, C., and Tagoh, H. (2008) Stem cell-specific epigenetic priming and B cell-specific transcriptional activation at the mouse Cd19 locus. *Blood* 112: 1673-1682.
- Wang, A., Yue, F., Li, Y., Xie, R., Harper, T., Patel, N. A., Muth, K., Palmer, J., Qiu, Y., Wang, J., Lam, D. K., Raum, J. C., Stoffers, D. A., Ren, B., and Sander, M. (2015) Epigenetic priming of enhancers predicts developmental competence of hESC-derived endodermal lineage intermediates. *Cell Stem Cell* 16: 386-399.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006) JHDM2A, a JmJC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125: 483-495.
- 五十嵐勝秀, 大塚(出田) まき, 成田年 (2017) エピジェネティック毒性研究の現状と今後の展開 薬学雑誌 137: 265-271.
- 田中知明 (2011) 「細胞の記憶」, エピジェネティクスと疾患～細胞と個体, 複雑なシグナルとエピジェネティクスを結びつける「生老病死」の分子生物学～. 日老医誌 48, 305-311.

Received: 15 January 2020 / Accepted: 9 March 2020