



Title	熱活性型レトロトランスポゾンの転写制御解析
Author(s)	野沢, 紘佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14831号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14831
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85988
Type	doctoral thesis
File Information	Kosuke_Nozawa.pdf



博士学位論文

熱活性型レトロトランスポゾンの転写制御解析

野沢 紘佑

北海道大学大学院生命科学院

令和4年3月

目次

目次	P2
要旨	P3
序論	P4-8
結果	P9-17
考察	P18-21
材料と方法	P22-27
謝辞	P28
参考文献	P29-35
Figure legends	P36-43
Figure & Table	P44-61

要旨

DNA メチル化は、トランスポゾンの抑制やゲノムの整合性に重要な役割を果たしている。CHROMOMETHYLASE3 (CMT3)は、植物特異的な DNA メチル化酵素であり、CHG (H=A、T、C)コンテクストにおける DNA メチル化を触媒する。筆者は、熱ストレスによるレトロトランスポゾン *ONSEN*の活性化に CMT3 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。興味深いことに、CMT3 の機能喪失変異により、*ONSEN*の CHH メチル化が増加した。*cmt2*変異体および *cmt2 cmt3*二重変異体では CHH メチル化が大幅に減少し、*ONSEN* の転写が増加したことから、CHH メチル化は CMT2 によって媒介されていることがわかった。さらに、*cmt3* 変異体では、野生型に比べて *ONSEN*遺伝子座のクロマチンに CMT2 が多く結合しており、熱ストレス下で H3K9me2 が異所的に蓄積していることから、熱による *ONSEN* の活性化を防ぐために H3K9me2 と CHH のメチル化が協調的に作用していることが示唆された。以上、本研究では、トランスポゾンのサイレンシングを妨げる CMT3 の新たな役割を明らかにするとともに、DNA メチル化酵素がトランスポゾンの転写を制御する仕組みについて新たな知見を得た。

序論

トランスポゾン(TE)は、半世紀以上前に Barbara McClintock 氏らによってトウモロコシで発見された(McClintock 1951)。トランスポゾンは真核生物のゲノムに広く分布しており、シロイヌナズナゲノムの 15%、トウモロコシゲノムの 85%を占める要素であり、植物ではゲノムを構成する主要素の一つになっている。(Feschotte et al. 2002)。TE は、その転移様式によって、「カット&ペースト」型のメカニズムで転移する DNA トランスポゾンと、RNA の中間体を介して「コピー&ペースト」型のメカニズムで転移するレトロトランスポゾンの 2つのクラスに分けられる。DNA トランスポゾンは末端に Terminal inverted repeats 配列を持ち、逆転写ステップを必要としない。レトロトランスポゾンは、その転写メカニズムや構造から、さらに非 LTR 型レトロトランスポゾンと LTR 型レトロトランスポゾンの 2つのグループに大別される。

LTR 型レトロトランスポゾンは、配列の両端に Long terminal repeats(LTR)と呼ばれる同じ向きの長い反復配列を持ち、植物に最も多く存在するトランスポゾンファミリーである(Vitte and Bennetzen 2006)。LTR 型レトロトランスポゾンの翻訳部位には、Gag と Pol と呼ばれる少なくとも 2つの遺伝子が含まれている。Gag 遺伝子はキャプシド様タンパク質をコードし、Pol 遺伝子はプロテアーゼ、逆転写酵素、RNase H、インテグラーゼ活性を担うポリタンパク質をコードしている(Kumar and Bennetzen. 1999、 Feschotte et al. 2002)。LTR 型レトロトランスポゾンは、コードする遺伝子の順番によって、さらに 2つの要素に分けられる。これらのトランスポゾンには挿入箇所の嗜好性が報告されており、Ty3/gypsy 型レトロトランスポゾンは、ペリセントロメア領域のヘテロクロマチンを含む遺伝子間領域に多く蓄積している(Jiang et al. 2003)。一方、Ty1/copia 型レトロトランスポゾンは、ユークロマチン領域に多く蓄積している(Kumar 1996)。

トランスポゾンの活性は、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾によって制御されており (Jacobsen and Henderson, 2007、 Scortecci et al. 1997、 Slotkin and Martienssen, 2007、 Zhang et al. 2006、 Lisch, 2009、 Chandler and Walbot V. 1986、 Bennetzen, 1987)、トランスポゾンなどの反復配列では、ゲノムの他の領域に比べて高いレベルで DNA がメチル化されている (Rabinowicz 2003、 Tran 2005)。

植物の DNA メチル化酵素は、CG、CHG、CHH(H=A、C、T)の 3 つの異なるコンテキストでシトシンをメチル化する。シロイヌナズナでは、DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2(DRM2) が RNA-directed DNA methylation(RdDM)経路を介して、*de novo* DNA methylation を行う。この経路では、RNA POLYMERASE IV(PolIV)によって non-codingRNA が転写された後、RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2(RDR2)によって二本鎖 RNA が合成され、続いて DICER-LIKE 3(DCL3)によって標的 TE の DNA メチル化を引き起こす小分子干渉 RNA(siRNA)に加工される (Pontier et al. 2005、 Mosher et al. 2008、 Zhang et al. 2007)。この siRNA は、ARGONAUTE 4 (AGO4)を含む RNA-induced silencing complex に結合し、PolIV と相互作用することで DRM2 が標的 DNA 配列にリクルートされ、DRM2 により DNA メチル化が行われる。(Cao and Jacobsen 2002、 Matzke and Birchler 2005)。CHG と CHH のメチル化の維持は、主に CHROMOMETHYLASE3 (CMT3)と CHROMOMETHYLASE2 (CMT2)がそれぞれ自己強化機構を介して行っている。具体的には、CMT2 と CMT3 は、Bromo adjacent homology(BAH)ドメインと Chromo ドメインを介して、H3K9 ジメチル化(H3K9me2)を含むヌクレオソームに結合することで、DNA をメチル化する。一方、ヒストンメチル化酵素 SUVH4/KYP、SUVH5、SUVH6 は、CMT3 にメチル化された CHG 配列や CMT2 にメチル化された CHH 配列と結合し、H3K9 に 2 つのメチル基を付加する

(H3K9me2)。また、CMT3、CMT2 は主にヘテロクロマチンに存在する長い TE の Body 領域で CHG 配列、CHH 配列のメチル化を触媒する傾向があり、これらのメチル化が TE の転写抑制につながる。一方、DRM2 は、短い TE または LTR などの長い TE の末端領域、およびユークロマチン領域に存在する繰り返し配列で CHH のメチル化を維持する(Chan et al. 2005)。また、植物では SWI2/SNF2 様のクロマチンリモデリングタンパク質である DECREASE IN DNA METHYLATION 1 (DDM1)が DNA メチル化状態の維持に必要であることも報告されている(Vongs et al. 1993、Jeddeloh et al. 1999、Brzeski and Jerzmanowski. 2003)。シロイヌナズナでは、*ddm1* の変異により、いくつかのトランスポゾンの転写および転移の活性化が誘導される(Hirochika et al. 2000、Miura et al. 2001、Martienssen et al. 2001)。レトロトランスポズンはその転移様式から爆発的にコピーを増やすことが可能であり、自家受粉した *ddm1* 変異体では、gypsy ファミリーや copia ファミリーなどの LTR レトロトランスポゾンのコピー数が増加することが報告されている(Tsukahara et al. 2009)。

ほとんどの TE は DNA メチル化によってエピジェネティックにサイレンシングされているが、環境ストレスによって TE やヘテロクロマチンのサイレンシングが一時的に解除されることがある。トウモロコシの *ZnMI 1* は、低温ストレスによって活性化することが報告されている(Steward et al. 2002)。一方、タバコの *Tnt1* および *Tto1* レトロトランスポズンは、組織培養、創傷、病原体感染などの生物的ストレスや、サリチル酸やジャスモン酸などの非生物的ストレスによって活性化されることが報告されている(Hirochika et al. 1993、Peschke et al. 1987、Pouteau et al. 1994、Takeda et al. 1998)。

これまでの研究で、シロイヌナズナでは *ONSEN* と名付けられた Ty1/copia 型レトロトランスポズンが、熱ストレスによって活性化されることが明らかになった(Ito et al. 2011)。さらに転移中間体である染色体外 DNA の産生を引き起こす(Cavrak et al.

2014)。また興味深いことに *ONSEN* は、DNA の低メチル化状態を引き起こす変異体や RdDM 因子を欠損した変異体においても、熱ストレスを与えないと転写が活性化しないことが明らかになっている (Ito et al. 2011)。

ONSEN は、シロイヌナズナの代表的なエコタイプである Columbia (Col-0) のゲノム上に 8 つのコピーが存在する。そのうちの 3 つは、5' と 3' の LTR 配列が同一であることから、近代に挿入されたものであることが示唆されている。また、シロイヌナズナのエコタイプでは、生息地域によって全く異なる遺伝子座への *ONSEN* の挿入が確認されており (Masuda et al. 2015)、比較的近代に転移したことを支持する結果となっている。さらに興味深いことに、これらの転移は環境要因との相関性が見られ、生息地域の年間平均気温が高いエコタイプほど、*ONSEN* のコピー数が高い傾向がある (Dubin et al. 2015)。近年の研究で *ONSEN* はユークロマチン領域を優先的に標的とし、遺伝子発現に影響を与えることが報告されており、Col-0 ではゲノムに存在する全 8 コピーのうち 7 コピーがユークロマチン領域に挿入している。また、先行研究より、アブシジン酸 (ABA) 応答性遺伝子 *ABI5* に *ONSEN* が新たに挿入されると、ABA 非感受性の表現型が生じることが報告されている (Ito et al. 2015)。さらに、これまでの研究でシロイヌナズナに限らずアブラナ科を中心に広い植物で *ONSEN* 様配列が確認されており、アブラナ科植物、マメ科植物では熱ストレスによる転写活性も保存されている (Nozawa et al. 2017)。これらのことから、*ONSEN* は熱条件下で活性化するというユニークなメカニズムによって自然界ではゲノムの多様化に貢献してきたことが考えられる。*ONSEN* の完全長の転写産物は、37°C で 24 時間の熱ストレスを与えた植物に検出され、PolIV のサブユニットであり、siRNA の生合成や RdDM 経路の鍵となる因子である NRPD1 の変異体では、熱ストレスによって誘発される *ONSEN* の転写量が顕著に増加したことから、*ONSEN* の転写抑制に siRNA 経路が関与していることが示唆された。また、*ONSEN* は野生型において、熱ストレスで完全長の転写産

物及び染色体外 DNA の産生が観察されるが、次世代の個体で転移は観察されない。一方で siRNA の生合成を欠損させた植物に熱ストレス処理を施した個体の子孫では、*ONSEN* の新規挿入が高頻度で観察されることから siRNA は転写抑制とは別に転移制御にも関与していることが示唆されている(Ito et al. 2011)。*ONSEN* は熱ストレス条件下では、HSFA2 を含む熱応答性転写因子が *ONSEN* の LTR 内に存在する Heat shock element(HSE)と呼ばれるシス配列を認識することで *ONSEN* の転写が活性化されることが明らかになっている、しかしながら、熱ストレス条件下における *ONSEN* 遺伝子座でのエピジェネティックな修飾の変化など、*ONSEN* の制御には不明な点が多く、熱ストレス下での *ONSEN* の活性化における分子メカニズムは明らかになっていない。

本研究では、*drm1 drm2* 変異体、*cmt2* 変異体、*cmt3* 変異体といった DNA メチル化酵素の変異体における *ONSEN* の転写を調べた。驚くべきことに、熱ストレス下の *cmt3* 変異体では、熱ストレス下の野生型に比べ *ONSEN* の転写量が減少することを発見した。CMT3 の機能を喪失すると、*ONSEN* の CHH メチル化が増加する。このメチル化は CMT2 が媒介しており、*cmt3* 変異体で CMT2 を機能欠損させると、熱ストレス下での *ONSEN* の転写量増加を伴う CHH メチル化の減少が見られる。*cmt3* 変異体で TE の発現が低下する現象は、CMT3 がトランスポゾンのサイレンシングを媒介するという既報の知見とは異なる。また、*cmt3* 変異体の *ONSEN* 遺伝子座では、非ストレス下において CMT2 の結合量が増加し、熱ストレス下において野生型に比べ高い H3K9me2 レベルを維持することを発見した。これらの結果は CMT2 と CMT3 が *ONSEN* 遺伝子座で H3K9me2 への結合をめぐって競合状態にある可能性を示しており、本研究では、CMT3 が TE サイレンシングを妨げる新しい役割を果たしていることを明らかにするとともに、トランスポゾンの転写制御に対する DNA メチル化の新たな制御機構を明らかにするものである。

結果

*cmt3*変異体では熱ストレス下の *ONSEN*の転写量が低下する

先行研究では、熱ストレスが *ONSEN* の転写を活性化し、siRNA の生合成経路の変異体では、熱ストレス条件下において *ONSEN* の転写量がさらに増加することを明らかにした(Ito et al. 2011)。siRNA は RdDM 経路を介して相同配列を含む標的遺伝子座の DNA メチル化を誘導し、転写抑制を行う(Zhang et al. 2018)。熱ストレス下での *ONSEN* の転写における DNA メチル化の役割を明らかにするため、DNA メチル化酵素を欠損した変異体の転写量を Quantitative reverse transcription PCR(RT-qPCR)で調べた。以前に報告された結果と同様に、熱ストレス下では野生型と比較して、*drm1 drm2(drm1/2)*変異体および *cmt2* 変異体で *ONSEN* の転写量が高いことが確認された(Fig.2)。驚くべきことに、*cmt3-11t(cmt3)*変異体では、熱ストレス下の野生型と比較して、*ONSEN* の転写量が 50%以上減少していた(Fig.1A および Fig.2)。同様の結果は、Landsberg erecta(Ler)の *cmt3-7*変異体でも観察された(Fig.1A)。これらの結果は、CMT3 が熱ストレス下での *ONSEN* の転写制御に重要な役割を果たしていることを示唆している。

CMT3 は CHG メチル化を介して多くのトランスポゾンファミリーを負に制御していることが報告されている。熱ストレス下においても CMT3 が他のトランスポゾンファミリーを負に制御しているかどうかを調べるために、非ストレス下と熱ストレス下の2つの条件で野生型と *cmt3* 変異体を High-throughput RNA-seq を用いてトランスクリプトーム解析を行った(S1 Table)。しかしながら、*cmt3* 変異体では熱ストレス下においても多くのトランスポゾンファミリーが活性化されており、熱ストレス下において野生型と比較して *cmt3* 変異体で転写量が低下したトランスポゾンファミリーは他に見当たらなかった。したがって *ONSEN* は、熱ストレス下の *cmt3* 変異体で転

写量の低下を示した唯一の熱誘導性トランスポゾンファミリーであった(Fig.1B および 1C)。さらに、CMT3 が他の熱誘導性トランスポズンを制御しているかどうかを調べるために、熱ストレス下の *cmt3* 変異体において、2つの代表的な熱応答性トランスポゾンファミリーである *ROMANIAT5* と *AtCOPIA37*(Pietzenuk et al. 2016)の転写量を調べた。その結果、*AtCOPIA37* の転写量には有意な変化が見られず、*ROMANIAT5* の転写量は *cmt3* 変異体でわずかに減少しただけであった(Fig.3)。これらの結果から、熱ストレス下での CMT3 依存的なトランスポズンの転写量の増加は、*ONSEN* に特異的であることが示唆された。

CMT3 は熱応答経路とは独立して *ONSEN* の転写を制御する

熱応答性転写因子と熱応答性タンパク質は、熱ストレスに対して応答する代表的な遺伝子である。熱応答性転写因子 HSFA2 は、*ONSEN* の LTR に結合し、*ONSEN* の転写を直接的に制御している。HSFA2 の変異体では *ONSEN* の転写量が顕著に減少することから、熱ストレス下の *ONSEN* の転写活性化に必須であることが明らかになっている。そこで筆者は、*cmt3* 変異体における熱ストレス下の *ONSEN* 転写量の低下は、熱応答経路の機能不全によるものかを調べた。野生型と *cmt3* 変異体を用いて、HSFA2 と HSP90.1 の2つの熱応答性遺伝子の転写量を調べた。発現解析の結果、熱ストレス処理を施した野生型と *cmt3* 変異体の間で HSFA2 と HSP90.1 の発現量に差は見られなかった(Fig.4)。このことから、CMT3 は熱応答性経路とは独立して *ONSEN* の転写を制御していることが考えられる。

熱ストレスはクロマチンの脱凝縮を引き起こし、一部のトランスポゾンファミリーの活性化を誘導することが報告されている。CMT3 は熱応答経路とは独立して *ONSEN* の転写を制御していることが示唆されたため、*cmt3* 変異体における熱ストレス下の *ONSEN* 転写量の減少は、熱ストレス後のクロマチンの凝縮状態が関係してい

るという仮説を立てた。筆者は核の 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)染色を行い、クロマチンの凝縮性を可視化し、その状態の定量化を行なった。核の DAPI 染色によるクロマチンの可視化はゲノムの全体的な凝縮状態を判別する指標となる。また、DAPI 染色ではセントロメア領域がもっともよく染色される。シロイヌナズナのセントロメア周辺領域には多くのトランスポゾンが蓄積していることから、トランスポゾンの抑制状態を把握する指標にも利用される。DAPI 染色の結果、熱ストレス処理した植物体では、野生型で約 80%の核が分散しており(Fig.5)、熱によってセントロメリックなクロマチンが脱凝縮していることが確認された。熱ストレス処理した *cmt3* 変異体においても、熱ストレス処理した野生型と比較して同程度の割合の核が分散しており、有意な差は見られなかった(Fig.5)。このことから、野生型と *cmt3* 変異体では熱ストレスによる全体的なクロマチンの脱凝縮には差がないことが示唆され、CMT3 による *ONSEN* 転写量の制御は *ONSEN* 遺伝子座特異的に行われている可能性が考えられる。

***ONSEN*の活性化には CMT3 の BAH、Chromo、Catalytic ドメインが必要である**

CMT3 は、CHG メチル化を媒介する DNA メチル化酵素であり、BAH ドメインと Chromo ドメインの両方を介してヒストンメチル化 H3K9me2 を認識、結合している(Du et al. 2012)。CMT3 による *ONSEN*の転写制御における BAH ドメインと Chromo ドメインの重要性を調べるために、FLAG タグ付き CMT3 トランスジェニックラインを用いて、BAH ドメイン(FLAG-CMT3bah)と Chromo ドメイン(FLAG-CMT3chr)に H3K9me2 との結合を欠損する変異を導入した(Du et al. 2012)。次に、これらの植物を熱処理を施したところ、野生型 CMT3(FLAG-CMT3)を導入した *cmt3* 変異体は熱ストレス処理した野生型と同程度まで発現量が回復した。

一方、BAH ドメインや Chromo ドメインに変異を加えた FLAG タグ付き CMT3 を導入した *cmt3* 変異体では *ONSEN* 転写量の回復は見られなかった(Fig.6)。この結果は、CMT3 は *ONSEN* 転写量を正に制御しており、その制御には CMT3 の H3K9me2 結合活性が必要であること示唆している。

CMT3 が CHG-H3K9 メチル化ループを介して DNA メチル化を維持するためには BAH ドメインと Chromo ドメインが必要である。前述の結果から CMT3 が *ONSEN* の転写量を正に制御するには CMT3 の H3K9me2 結合活性が必要であることは示唆されたが、Catalytic ドメインがこの制御に関与しているか不明である。そのため、熱ストレス下での *ONSEN* の活性化に CMT3 のメチル化触媒活性が必要であるかどうかを調べた。まず、野生型 CMT3(Myc-CMT3)または Myc-CMT3 の Catalytic ドメインに C460A の変異を加えた触媒作用のない CMT3 変異体(Myc-CMT3cat)を *cmt3* 変異体バックグラウンドに挿入し、その Myc タグ付き CMT3 トランスジェニックラインで熱ストレス下の *ONSEN* の転写量を調べた。その結果、*cmt3* 変異体で減少した *ONSEN* 転写量は、野生型 CMT3(Myc-CMT3)を導入した *cmt3* 変異体では回復したが、Myc-CMT3cat を導入した *cmt3* 変異体では回復しなかった(Fig.6)。このことから、CMT3 が熱ストレス下の *ONSEN* の転写量を正に制御するには CMT3 の CHG メチル化触媒活性が必要であることが示唆され、CMT3 が触媒する DNA メチル化の関与も示唆された。

***cmt3* 変異体での *ONSEN* 遺伝子座における CHH メチル化レベルの増加は CMT2 が媒介する**

熱ストレス下の *ONSEN* の転写量増加には、CMT3 を介した DNA メチル化が関与している可能性から、以前に発表された Bisulfite-sequencing(BS-seq)データを用いて、*ONSEN* 配列の DNA メチル化レベルを調べた。その結果、野生型では *ONSEN*

遺伝子座(*ONSEN2*, *AT3G61330*)でメチル化された CHG サイトの数が少ないことがわかった(Fig.7A)。興味深いことに、CHH 配列は *ONSEN* 配列全体で高レベルにメチル化されており(Fig.7A)、*ONSEN* の LTR には CHH のメチル化しか存在しなかった(Cavrak et al. 2014)。さらに、*cmt3* 変異体では、*ONSEN* の TE body 領域を中心に、CHH のメチル化レベルが野生型に比べて大きく上昇していた(Fig.7B および 7C)。また、Differentially methylated region(DMR)解析により *ONSEN* 以外にも、*cmt3* 変異体で CHH メチル化の増加が見られる TE が確認された(Fig.8A)。さらに、これらのトランスポゾン、DNA や DNA/MuDR などの TE ファミリーに集中しており、ゲノム上のすべての TE と比較して、CHG 含量が有意に少なく、CHH 含量が多いことが特徴であることがわかった(Fig.8B および C)。また、*ONSEN1(AT1G11265)* と *ONSEN2(AT3G61330)* の ORF 領域の Bisulfite Sanger-sequencing でも、*cmt3* 変異体で CHH メチル化が増加していることが確認された(Fig.7D)。これらの結果を総合すると、CMT3 で制御されている *ONSEN* の転写は、CHH のメチル化と高い相関関係があることが明らかになった。

シロイヌナズナの TE の CHH メチル化は、RdDM 依存性の DRM2 と RdDM 非依存性の CMT2 メチルトランスフェラーゼの両方によって維持されている。DRM2 は、ユークロマチンに存在するトランスポゾンや LTR などの配列の長いトランスポゾンの末端をメチル化する傾向があり、CMT2 は、ペリセントロメアのヘテロクロマチンに位置するトランスポゾンをメチル化する傾向がある。次に、*cmt3* 変異体における *ONSEN* での CHH メチル化の増加が、DRM2 と CMT2 のどちらによって媒介されているかを調べた。*cmt2* 変異体、*cmt2 cmt3* 変異体、*drm1/2* 変異体、*drm1/2 cmt3* 変異体の公開されている BS-seq データを解析し、*ONSEN* での CHH メチル化レベルを調べた(Stroud et al. 2012)。その結果、*drm1/2* 変異体では *ONSEN* の LTR 領域で CHH メチル化が減少していたが、*cmt2* 変異体では TE body を中心にほぼ完全に

CHH メチル化が消失していた(Fig.7C)。また、*cmt3* 変異体で CMT2 を欠損させると (*cmt2 cmt3* 変異体)、CHH のメチル化が完全に失われたが、*cmt3* 変異体で DRM1 と DRM2 を欠損させても (*drm1/2 cmt3* 変異体)、TE body では変化が見られなかった (Fig.7B-7D)。シロイヌナズナでは、CMT2 が CWA コンテキスト (CTA または CAA) の DNA メチル化を優先的に触媒することが報告されている (Gouil et al. 2016)。次に、*ONSEN* の全 8 コピーの ORF 上の CWA と非 CWA の CHH のメチル化レベルを解析したところ、*cmt3* 変異体では野生型に比べて CWA のメチル化レベルが有意に高かった ($P=0.013$) (Fig.7E)。これらの結果を総合すると、CMT2 は *ONSEN* 遺伝子座の CHH メチル化を担う主要な DNA メチル化酵素であることが示唆される。

CHH メチル化レベルの変化が転写量の違いと関連しているかどうかを評価するために、熱ストレス下の *cmt2* 変異体、*cmt2 cmt3* 変異体、*drm1/2* 変異体、*drm1/2 cmt3* 変異体における *ONSEN* の転写量を RT-qPCR で調べた。熱ストレス下の *ONSEN* の転写量は *cmt2* 変異体で有意に増加し (Fig.7F および Fig.8)、CHH のメチル化レベルが低下と連動していた。*cmt2 cmt3* 変異体では、*cmt3* 変異で減少した *ONSEN* 転写量が *cmt2* 変異体と同程度のレベルまで回復したが、*drm1/2 cmt3* 変異体では *ONSEN* の転写量がわずかに上昇したものの、*drm1/2* 変異体よりも有意に低かった (Fig.2、Fig.7F、Fig.9)。これらの結果から、*cmt3* 変異体における熱ストレス下の *ONSEN* 転写量の減少は、CMT2 が媒介する CHH メチル化の増加に大きく起因することが明らかになった。

CMT3 が CMT2 の *ONSEN* 遺伝子座のクロマチンへの結合を妨げる

CMT3 が CMT2 による *ONSEN* 配列の CHH メチル化を制御する分子メカニズムを理解するために、まず、*cmt3* 変異体で見られる *ONSEN* 遺伝子座の CHH メチル化の増加が、CMT2 の発現増加によるものかを調べた。その結果、*cmt3* 変異体で

は CMT2 の発現量が野生型と比較して変化しておらず(Fig.10A)、*cmt3* 変異体における *ONSEN*での CHH のメチル化の増加が CMT2 の発現増加に起因する可能性が低いことが示唆された。

CMT2 と CMT3 では H3K9me2 結合能が類似していることから、*ONSEN* 遺伝子座の H3K9me2 結合において CMT3 が CMT2 と競合しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、まず、*cmt3* バックグラウンドの FLAG タグ付き CMT3 変異体を用いて、Chromatin immunoprecipitation coupled with quantitative PCR(ChIP-qPCR)を行い、*ONSEN* 遺伝子座における CMT3 の結合量を調べた。その結果、CMT3 は確かに *ONSEN* に局在していることが確認された(Fig.11A および 11B)。次に、CMT2 が *ONSEN* 遺伝子座に局在しているかどうかを調べるために、*cmt2* バックグラウンドで FLAG タグと融合した全長 CMT2 を発現するエピトープタグ付き CMT2 トランスジェニックラインを作製した(CMT2-FLAG/*cmt2*)。CMT3 と同様の ChIP-qPCR を行ったところ、非ストレス下では *ONSEN* 遺伝子座に CMT2 が局在していることがわかった(Fig.11C)。CMT3 が *ONSEN* 上の CMT2 の結合に与える影響をさらに調べるため、CMT2-FLAG/*cmt2* 変異体を *cmt3* 変異体と交配し、*cmt2 cmt3* バックグラウンドでのホモ接合の CMT2-FLAG 変異体(CMT2-FLAG/cc)を作製した。また、ウエスタンブロッティング(WB)で CMT2 のタンパク質量が、CMT3 の変異によって影響を受けないことを確認した(Fig.10B)。続いて、ChIP-qPCR を行ったところ、CMT2-FLAG/cc では、CMT2-FLAG/*cmt2* 変異体に比べて *ONSEN* 遺伝子座の CMT2 の結合が増加していたが(Fig.11C)、ネガティブコントロールとして用いたリボソームサブユニットをコードする *AT4G00810* では CMT2 の結合量が増加していなかった(Chen et al. 2018)。この結果は、CMT3 の存在により *ONSEN* 遺伝子座のクロマチンにおける CMT2 の占有率が低下することを示唆している。

次に、*ONSEN* 遺伝子座における CMT3 と CMT2 の局在に対する熱ストレスの影響を調べた。熱ストレスは *ONSEN* の染色体外 DNA の生成を促進するため、ORF 領域と LTR の外側に位置するプライマーを用いて、ChIP-qPCR を行った(Fig.11A)。熱ストレス処理した FLAG-CMT3 においても、*ONSEN* 遺伝子座に CMT3 が結合していることが確認されたが、その結合量は減少していた(Fig.11B)。一方で CMT2-FLAG/*cmt2* 変異体と CMT2-FLAG/*cc* 変異体では、熱ストレス処理後に CMT2 の結合が検出されなかった(Fig.11C)。次に、CMT2-FLAG 変異体において各熱処理時間ごとの CMT2 タンパク質量を調べた。驚くべきことに、CMT2 タンパク質量は、植物を熱処理すると速やかに減少しており、その半減期は約 2.7 時間であった(Fig.11D、Fig.12A、Fig.12B)。また、CMT3 と DRM2 のタンパク質量には、熱ストレス処理後も顕著な変化は見られなかった(Fig.12C および 12D)。さらに、熱ストレスに伴う CMT2 の発現量を調べたところ、CMT2 の転写量は 3 時間の時点で半減し、その後、熱ストレス処理の時間を伸ばしても CMT2 の転写量に大きな変化は見られなかった(Fig.12E)。

***cmt3*変異体における熱ストレス下での *ONSEN*での H3K9me2 の異所的蓄積**

CMT2 が媒介する CHH のメチル化は、H3K9me2 に依存している(Du et al. 2015)。*cmt3* 変異体における *ONSEN* 遺伝子座への CMT2 の結合の増加が、H3K9me2 の蓄積量と相関しているかどうかを調べるために、以前に報告された ChIP-seq データを用いて *ONSEN* 遺伝子座での H3K9me2 レベルを調べた。その結果、野生型では *ONSEN* で H3K9me2 が豊富に存在するが、SUVH4、SUVH5、SUVH6 の H3K9 メチルトランスフェラーゼ欠損変異体(*suvh456*)では大幅に減少することがわかった(Fig.13A)。さらに、*suvh456* 変異体では、*ONSEN* の TE body 領域において、CHH のメチル化が野生型に比べて大幅に低下していた(Fig.13B、13C)。さらに、*ONSEN* の 8 コピーすべての ORF の CWA および非 CWA の CHH メチル化を解析し

たところ、*cmt3*変異体では CWA メチル化レベルが野生型や *svh456*変異体と比較して有意に上昇していた(Fig.13D)。また、熱ストレス後には、*cmt2* 変異体と同様に、*svh456* 変異体では野生型と比較して *ONSEN* の転写量が大きく増加していた(Fig.13E)。*cmt3*変異体で SUVH4、SUVH5、SUVH6 を機能欠損させると、熱ストレス下の *ONSEN*の転写量は *svh456*変異体と同程度まで上昇した(Fig.13E)。これらの結果から、H3K9me2 は、熱ストレス下における CMT3 を介した *ONSEN*の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に野生型、*cmt3*変異体、*cmt2*変異体で H3K9me2 と H3 の ChIP-qPCR を行い、非ストレス下と熱ストレス下での H3K9me2 の存在量を比較した。非ストレス下では、*cmt2*変異体の *ONSEN*における H3K9me2 レベルが野生型に比べて有意に低いことがわかった(Fig.13F)。これは CMT2 の欠損により、CHH メチル化が大きく減少し、CHH-H3K9 メチル化ループの働きが弱くなったためと考えられる。熱ストレス下では、野生型では *ONSEN*と TA3 遺伝子座の両方で H3K9me2 レベルが有意に低下した(Fig.13F、Fig.14A、Fig.14B)。この H3K9me2 の減少は、H3K9me2 がヘテロクロマチン領域に局在することから、熱ストレスによるクロマチンの脱凝縮と関連していると考えられる(Probst et al. 2015)。また、長時間の熱ストレス(37°C、30 時間)を受けた *ONSEN*で H3K9me2 が減少したという過去の報告(Pecinka et al. 2010)や、野生型と *cmt3* 変異体の両方で熱ストレス下で多くの TE が活性化されたこと(Fig.1C)(Pietzenuk et al. 2016、Sun et al. 2020)とも一致する。驚くべきことに、野生型と *cmt3* 変異体は非ストレス下において H3K9me2 レベルが同程度であるにもかかわらず、熱ストレス処理後の *ONSEN*遺伝子座での H3K9me2 レベルは、*cmt3*変異体で野生型よりも有意に高いことがわかった(Fig.13F および Fig.14A)。また、*cmt3* 変異体では *ONSEN*の転写活性化が野生型に比べて非常に遅いのに対し、*cmt2*変異体では *ONSEN* の転写活性化が非常に速いことも明らかになった(Fig.15)。以上のことから、H3K9me2 と CHH のメチル化は、熱による *ONSEN* の転写を制御する上で協調的に機能していると考えられる。

考察

DNA メチル化は、植物や動物においてトランスポゾンの活性化を抑制し、ゲノムの完全性を維持することが知られている。本研究では、植物特異的な DNA メチル化酵素である CMT3 が、熱ストレス下における特異なトランスポゾンファミリーの転写抑制を妨げるの役割を果たしていることを明らかにした。CMT3 は、H3K9me2 と CMT2 を介した CHH のメチル化の両方を制御することで、熱による *ONSEN* の転写活性化を調節するというモデルを提案した。非ストレス下では、CMT3 の欠損により、CMT2 を介した CHH のメチル化が増加する。熱ストレス下では、野生型では H3K9me2 が減少しているのに対し、*cmt3* 変異体では *ONSEN* 遺伝子座の CHH メチル化と H3K9me2 が高い状態を維持しており、*cmt3* 変異体では熱ストレス下の *ONSEN* の転写量が低下している (Fig.16)。*cmt2* 変異体では非ストレス下においても CHH のメチル化と H3K9me2 のレベルが低い。さらに、熱ストレスにより H3 が大きく減少しクロマチンが緩むことで *ONSEN* の転写量が増加している (Fig.16)。

CMT3 は CHG のメチル化とトランスポゾンのサイレンシングを担い、そのパラログである CMT2 は主に DRM2 と共同で CHH のメチル化を担っている (Du et al. 2012, Zemach et al. 2013)。今回、筆者は、レトロトランスポゾン *ONSEN* のサイレンシングを防ぐために、CMT3 が非正規の役割を果たしていることを明らかにした。CMT3 が熱ストレス下で *ONSEN* の転写を制御するのは、主に CMT2 を介した CHH のメチル化によるものであることを、複数の結果から明らかにした。まず、*ONSEN* の CHH のメチル化は、主に CMT2 によって媒介されている (Fig.7-7E)。*cmt2* 変異体では CHH のメチル化が低下しているが、*drm1 drm2* 変異体では特に TE body 領域で低下が観察されない (Fig.7B-7E)。同様に、*cmt2 cmt3* 変異体では *ONSEN* の CHH メチル化が劇的に減少したが、*drm1 drm2 cmt3* 三重変異体では減少が見られなかった。また、*cmt3* 変異体では野生型と比較して TE body 領域に存在する CWA コンテキストの CHH メチル化が有意に増加していた。これらの結果は CMT2 が *ONSEN* の TE body 領域の CHH メチル化を触媒していることを支持している。次に、CHH メチル

化レベルが *ONSEN* の転写と負の相関関係にあることを示した(Fig.7F)。 *cmt3* 変異体では *ONSEN* の発現が低下していたが、CMT2 を機能欠損させると、 *cmt2 cmt3* 変異体に見られるように、 *ONSEN* の発現が有意に上昇した。なお、 *drm1/2 cmt3* 変異体でも野生型に比べ *ONSEN* の転写量がわずかに増加しているが、これは LTR 領域での CHH メチル化が減少しているためと考えられる。 RdDM 経路が LTR 領域における *ONSEN* の CHH メチル化を制御し、CMT2 が TE body のメチル化に寄与している可能性が考えられる。これは、COPIA ファミリーを含む長い TE body のメチル化に CMT2 が必要であることを示した以前の報告と一致している(Zemach et al. 2013)。また、最近の研究では、熱ストレス応答におけるヒストン H1 を介した *ONSEN* の抑制に、DNA のメチル化が必要であることが判明した(Liu et al. 2021)。DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、熱処理した *h1* 変異体における *ONSEN* の活性化を阻害することが示されている。筆者の発見と同様に、 *ONSEN/COPIA78* は、熱処理された *cmt2* 変異体で発現が上昇していた (Liu et al. 2021)。さらに、2つの異なる温度で栽培されたシロイヌナズナの品種における CHH のメチル化の変化は、自然の CMT2 の変化と関連していることが報告されている(Dubin et al. 2015)。今回の研究は、熱ストレス下での CMT3 による *ONSEN* の転写制御における CMT2 を介した CHH メチル化の役割を例証するものである。

CMT2 と CMT3 はともに、BAH ドメインと Chromo ドメインを保持しており、それらによって H3K9me2 を認識し、H3K9me2 を含むヌクレオソームに結合することで、それぞれ CHH と CHG のメチル化を引き起こすことができる(Du et al. 2012、Stroud et al. 2014)。今回の結果から、 *ONSEN* 遺伝子座では、CMT2 と CMT3 が H3K9me2 への結合をめぐる競合している可能性が示唆された。また筆者は、CMT3 と CMT2 の両方が *ONSEN* 遺伝子座のクロマチンに局在していることを示した(Fig.11B および 11C)。CMT3 が H3K9me2 に結合することで、CMT2 がアクセスできる H3K9me2 の量が制限され、その結果、CHH の低メチル化が起こると考えられる。今回の研究では、CMT3 が *ONSEN* 遺伝子座に局在することで、CMT2 と競合しているモデルを提唱しているが、Myc-CMT3cat で *ONSEN* の発現が低下するメカニ

ズムはまだ明らかになっていない。Myc-CMT3cat は触媒部位に C460A の変異が入った変異体であり、DNA メチル化活性を失っている。*ONSEN* 遺伝子座で CMT3 と CMT2 が競合している可能性が示唆されていることから、CMT3 の触媒活性が H3K9me2 への結合や局在する時間に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、*ONSEN* の CHG コンテキストは、平均的な TE に比べて著しく少ない(Fig.8C)。一方、*ONSEN* では他の TE に比べて CHH コンテキストが多く(Fig.8C)、CMT3 の結合が CMT2 を介した CHH のメチル化を負に制御している可能性がさらに示された。CMT3 が存在しない場合、*ONSEN* 上での CMT2 の結合はわずかに増加し(Fig.11C)、CHH メチル化量の増加と、熱ストレス下での高い H3K9me2 レベルを伴っていた(Fig.7 および 13F)。

熱ストレスは一部のトランスポゾンを変性させるが、これにはクロマチンの状態が大きく関係しているとされている。近年の報告では、熱ストレスによりクロマチン相互作用が減少し、クロマチン構造が再編成されることが報告されており、この再編成と TE の活性化に強い相関関係があることも報告されている。今回筆者は、野生型、*cmt3* 変異体、*cmt2* 変異体において非ストレス下と熱ストレス下の *ONSEN* 遺伝子座での H3K9me2 レベルを調べた。その結果、*ONSEN* 遺伝子座では熱ストレスによって H3 と H3K9me2 が減少することを明らかにした。また、*cmt3* 変異体では野生型に比べ、熱ストレスによる H3、H3K9me2 の減少量が低く、高い H3K9me2 レベルを維持していることが明らかになった。一方で *cmt2* 変異体では非ストレス下において H3K9me2 の顕著な減少が見られ、熱ストレスによって H3 が半減することが明らかになった。この *cmt3* 変異体での熱ストレスによる H3、H3K9me2 の減少量の低下は非ストレス下での DNA メチル化レベルと H3K9me2 レベルが関係していると考えられる。一般的に、DNA メチル化レベルと H3K9me2 が蓄積している領域ではクロマチンがヘテロクロマチン化されていることが知られている。*ONSEN* 遺伝子座では、*cmt3* 変異体で CHH メチル化量が増加することから野生型や *cmt2* 変異体に比べ最もヘテロクロマチン化され、クロマチンが凝縮された状態にあることが予想される。そのため、熱ストレスによってクロマチン相互作用が減少してもクロマチンが凝縮され

た状態が維持され、クロマチン再編成が起きにくくなっていることが考えられる。しかしながら、熱ストレスによるクロマチンの脱凝縮や再編成の分子メカニズムは未だ明らかになっておらず、*ONSEN*の転写制御の解明には熱ストレスによるクロマチン制御のさらなる解明が必要である。

材料と方法

植物材料と熱ストレス処理

シロイヌナズナの野生型および変異体は、Landsberg erecta(Ler)バックグラウンドの *cmt3-7* 変異体(CS6365)を除き、すべて Columbia(Col-0)エコタイプバックグラウンドのものを使用した。*kyp-4 (suvh4) suvh5-2 suvh6-1 (suvh456)* 変異体(Ebbs et al. 2006) を *cmt3-11t* 変異体と交配し、*cmt3 suvh456* の四重変異体を作製した。*drm1 drm2 (drm1/2)*変異体、*cmt2 cmt3* 変異体、*drm1 drm2 cmt3 (dd cmt3)*変異体、*drm1 drm2 cmt2 cmt3 (ddcc)* 変異体は、Steven Jacobsen 博士の研究室から贈られたものを使用した。

種子は 70%エタノール+0.01% Triton X-100 で 15 分間表面殺菌した後、100%エタノールで 2 回洗浄し、1/2 Murashige and Skoog (1/2 MS)培地と 0.8%の agar を含むプレートに播種した。播種した種子は 4°Cの暗所で 3 日間安置した後、24h 22°Cで 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の light intensity で生育した。熱ストレスについては、10 日目の seedling を 37°Cで 24 時間処理した。タイムコースの熱処理については、7 日目の seedling を 37°Cで指定された時間だけ処理し、各時点でサンプルを採取した。試料は熱ストレス直後に採取し、速やかに液体窒素で凍結した。

トランスジェニック植物の作製

Col-0 のゲノム DNA を鋳型として、CMT2 のゲノム配列(1.36kb のプロモーターを含む)を増幅した。プライマーのリストは S2 Table に示した。PCR 産物を SacI および XmaI で処理した後、C 末端に 3x FLAG タグを付けた pCAMBIA1306 にライゲーションした。このプラスミドをアグロバクテリウム GV3101 株に形質転換し、組換え株を floral dip 法により *cmt2-3*バックグラウンド(*SALK_012874*)に形質転換した。種

子はハイグロマイシンプレート(35mg/L)で選別した。ホモ接合の単一挿入株(T2 におけるハイグロマイシン耐性対非耐性の比率が 3 : 1)を用いた。 *cmt2 cmt3* バックグラウンドで gCMT2-FLAG を生成するために、gCMT2-FLAG/*cmt2-3* のホモ接合体ラインを *cmt3-11t* 変異体(*SALK_148381*)と交配した。F2 植物は、ホモ接合の *cmt2-3 cmt3-11t* バックグラウンドの遺伝子型を決定した。ホモ接合の gCMT2-FLAG/*cmt2-3 cmt3-11t* F3 植物を、ハイグロマイシン選択によりスクリーニングした。FLAG-CMT3/*cmt3* 変異体、FLAG-CMT3*bah3/cmt3* 変異体、FLAG-CMT3*chr3/cmt3* 変異体、Myc-CMT3/*cmt3* 変異体、および Myc-CMT3*cat/cmt3* 変異体は (Du et al. 2012) に記載されたとおりである。また、DRM2-FLAG トランスジェニックラインについては(Jiang et al. 2021)に記載されたとおりである。

クロマチン免疫沈降(ChIP)

H3K9me2 および H3 ChIP は、(Qian et al. 2018)に記載された方法で行った。10 日目の非ストレスおよび熱ストレス処理した野生型の Col-0、*cmt3-11* 変異体、*cmt2-3* 変異体の seedling 2g を粉末にし、1%ホルムアルデヒドを含む nuclei isolation buffer(10mM HEPES pH8、1M sucrose、5mM KCl、5mM MgCl₂、5mM EDTA、0.6% Triton X-100、0.4mM PMSF、protease inhibitor cocktail (Roche;14696200) 1tablet /25ml)中で、室温で 15 分間架橋した。最終濃度 125mM の glycine を加えて架橋をクエンチし、懸濁液を Miracloth(Millipore;475855)で濾過した。4000rpm で 20 分間、4°Cで遠心分離して核をペレット化した。ペレットを nuclei isolation buffer II (0.25 M sucrose、10 mM Tris-HCl、pH 8、10 mM MgCl₂、1% Triton X-100、1 mM EDTA、5 mM β -mercaptoethanol、0.4 mM PMSF、protease inhibitor cocktail tablet 1tablet /25ml)で再懸濁し、0.3mL の nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8、10 mM EDTA、1% SDS、0.4 mM PMSF、protease inhibitor cocktail 1tablet /25ml)を加

え、氷上で 10 分間保持した。ライセートを 1.7 mL の ChIP dilution buffer (1.1% Triton X-100、1.2 mM EDTA、16.7 mM Tris-HCl pH 8、167 mM NaCl、0.4 mM PMSF、protease inhibitor cocktail tablet 1tablet /25ml)で希釈した後、Covaris S220 focused-ultrasonicator (Covaris 社)を用いて超音波処理を行い、クロマチンを剪断した。spike-in control として、ヒト H3.2-FLAG-HA クロマチン(〜300 ng)を上澄み液に加えた。この混合物を 2 つに分け、それぞれ 5 μ g の H3 抗体(Abcam;ab1791)と 5 μ g の H3K9me2 抗体(Abcam;ab1220)を用いて、4°Cで一晩回転させながらインキュベートした。この抗体を、25 μ L の Dynabeads Protein G (H3K9me2 に使用、Invitrogen;10003D)または Protein A (H3 に使用、Invitrogen;10001D)とともに 4〜6 時間インキュベートした。low-salt buffer (150 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8)、high-salt buffer (500 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris-HCl pH 8)、LiCl buffer (0.25 M LiCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl pH 8)、TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8、1 mM EDTA)で順次洗浄した。elution buffer (1% SDS、0.1 M NaHCO₃)を用いて DNA-タンパク質複合体を溶出した後、200mM NaCl を加えて 65°Cで 6 時間インキュベートすることで reverse cross-link させた。RNase と Proteinase K で順次処理した後、フェノール・クロロホルム法で DNA を精製した。

CMT2-FLAG および CMT3-FLAG の ChIP は(Chen et al. 2018)に記載された方法で行なった。10 日目の非ストレス、および熱ストレス処理した seedlings 2g から核を分離し、上述と同じ方法で架橋した。ペレットを nuclei isolation buffer II で洗浄後 MNase buffer (50 mM Tris-HCl、pH 7.5、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、5 mM CaCl₂、10% glycerol、0.1% Nonidet P-40、0.11 mM PMSF、protease inhibitor cocktail tablet 1tablet /25ml)で再懸濁し、超音波処理で剪断した後、37°Cで 15 分間 MNase 処理を行った。その後、MNase 活性を止めるために EDTA と EGTA を 5mM になるように加

えた。spike-in control としてヒト H3.2-FLAG-HA クロマチン(〜300 ng)を上清に加え、anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich; M8823)と一緒に 4°Cで一定のスピードでローテーションさせて一晩インキュベートした。MNase buffer、300 mM NaCl を含む high-salt MNase buffer、LiCl buffer、TE buffer で順次洗浄した。洗浄後、DNA-タンパク質複合体を elution buffer に溶出し、上述と同じ方法で reverse cross-link を行なった。

RNA の抽出と RT-qPCR

PureLink RNA mini Kit (Invitrogen; 12183025)を用いて Total RNA を抽出した。1 μ g の RNA を DNase I (NEB; M0303)で処理し、ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis (NEB; M0368)を用いて cDNA に逆転写した。Quantitative PCR は、CFX96 Real-Time System(Bio-Rad)により、SYBR Green Master Mix(Bio-Rad ; 1725125)試薬を用いて行った。

ライブラリ作成、シーケンス、データ解析

NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB; E7770)、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB; E7490)、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB; E6609)を用いて、抽出した RNA を cDNA ライブラリに変換した。ライブラリは NextSeq500 プラットフォーム(Illumina)でシーケンスされ、各ライブラリで約 1,000 万のリードが得られた。低品質のリードは、Trimmomatic version 0.39 (Bolger et al. 2014)により、以下のパラメータ「"LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36"」を用いて除去した。トリミングしたリードは、HISAT2 version 2.1.0 のデフォルトパラメータ(Kim et al. 2019)を用いて、シロイヌナズナリファレンスゲノム(TAIR10)にマッピングし、リードはトランスクリプトモデル

でカウントを行なった。発現変動遺伝子は、edgeR version 3.20.9(Robinson et al. 2010)を用いて計算した adjusted P-value によって抽出した。

BS-seq では、NCBI GEO(GSE39901)からシーケンスの row データをダウンロードした。アダプター配列と低品質リードは FASTP でトリミングし(Chen et al. 2018)、BSMAP 2.90 を用いて、以下のパラメータ ["-w100 -v2 -n1 -r1"] でシロイヌナズナ TAIR10 ゲノムにアライメントした。各シトシンにおけるメチル化は、BSMAP の methratio.py スクリプトを用いて、ユニークなリードのみを処理し、重複したリードを除去することで決定した。Differentially Methylated Region (DMR)は MethylKit (Akalin et al. 2012)を用いて検出した。各配列コンテキストにおける DMR の閾値メチル化差は、mCG では 40%、mCHG では 20%、mCHH では 10%に設定した。DMR は $q < 0.01$ で有意とした。TE 内に存在する DMR をを見つけるために、TAIR10 からの DMR と全 TE のリストを BEDtools(Quinlan et al. 2010)を用いて比較し、重複領域を検出した。

ChIP-seq については、NCBI GEO(GSE51304)からシーケンスの row データをダウンロードした。低品質のリードは、Trimmomatic version 0.39 で以下のパラメータ ["LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:25"] を用いてトリミングした。トリミングしたリードは、Bowtie2 version 2.4.1 のデフォルトのパラメータを用いてシロイヌナズナ TAIR10 ゲノムにアライメントした(Langmead et al. 2012)。ChIP-seq のピークは、MACS2 version 2.2.6 のピークコールを用いて検出した (Zhang et al. 2008)。

Bisulfite Sanger-sequencing

illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction kits (GE Healthcare; RPN8510)を用いて、10 日目の seedling からゲノム DNA を分離した。Methylcode

Bisulfite Conversion Kit (Invitrogen; MECOV50)を用いて、メーカーのプロトコルに従い、Bisulfite conversion と desulfonation を行った。各処理および以下の PCR 分析に 400ng のゲノム DNA をスタートインプットとして使用した。プライマーは S2 Table に記載した。各領域について 20 クローンの配列を決定した。

謝辞

本研究を行うにあたりご指導をいただきました北海道大学形態機能学 3 研究室の加藤敦之教授、伊藤秀臣准教授、副査の藤田知道教授に深く御礼申し上げます。また、共同研究にご助力いただいた岡山大学植物資源科学研究所の池田陽子准教授、ウィスコンシン大学の Xuehua Zhong 研究室の皆様、東京大学角谷研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。また、Bisulfite-sequencing 解析にご協力いただいた沖縄科学技術大学院大学の佐瀬英俊准教授に感謝申し上げます。最後に様々な面でお世話になりました形態機能学 3 研究室のスタッフ、学生の皆様にご感謝の意を表し謝辞とさせていただきます。

参考文献

1. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 2007;8: 272–285.
2. Zhang H, Lang Z, Zhu JK. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19: 489–506. doi:10.1038/s41580-018-0016-z
3. Du J, Zhong X, Bernatavichute Y V., Stroud H, Feng S, Caro E, et al. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell.* 2012;151: 167–180. doi:10.1016/j.cell.2012.07.034
4. Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, et al. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21: 64–72. doi:10.1038/nsmb.2735
5. Wendte JM, Zhang Y, Ji L, Shi X, Hazarika RR, Shahryary Y, et al. Epimutations are associated with CHROMOMETHYLASE 3-induced de novo DNA methylation. *Elife.* 2019;8: e47891. doi:10.7554/eLife.47891
6. Stroud H, Greenberg MVCC, Feng S, Bernatavichute Y V., Jacobsen SE. Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the Arabidopsis methylome. *Cell.* 2013;152: 352–364. doi:10.1016/j.cell.2012.10.054
7. Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, et al. The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell.* 2013;153: 193–205. doi:10.1016/j.cell.2013.02.033

8. Bucher E, Reinders J, Mirouze M. Epigenetic control of transposon transcription and mobility in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15: 503–510.
9. Fultz D, Choudury SG, Slotkin RK. Silencing of active transposable elements in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;27: 67–76.
10. Pietzenuk B, Markus C, Gaubert H, Bagwan N, Merotto A, Bucher E, et al. Recurrent evolution of heat-responsiveness in Brassicaceae COPIA elements. *Genome Biol.* 2016;17: 209. doi:10.1186/s13059-016-1072-3
11. Cavrak V V., Lettner N, Jamge S, Kosarewicz A, Bayer LM, Mittelsten Scheid O. How a Retrotransposon Exploits the Plant's Heat Stress Response for Its Activation. *PLoS Genet.* 2014;10: e1004115. doi:10.1371/journal.pgen.1004115
12. Ito H, Gaubert H, Bucher E, Mirouze M, Vaillant I, Paszkowski J. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature.* 2011;472: 115–119. doi:10.1038/nature09861
13. Ito H, Kim JM, Matsunaga W, Saze H, Matsui A, Endo TA, et al. A Stress-Activated Transposon in *Arabidopsis* Induces Transgenerational Abscisic Acid Insensitivity. *Sci Rep.* 2016;6: 1–12. doi:10.1038/srep23181
14. Masuda S, Nozawa K, Matsunaga W, Masuta Y, Kawabe A, Kato A, Ito, H. Characterization of a heat-activated retrotransposon in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* 2017, 91 (6), 293-299. DOI: 10.1266/ggs.16-00045.
15. Nozawa K, Kawagishi Y, Kawabe A, Sato M, Masuta Y, Kato A, Ito H. Epigenetic Regulation of a Heat-Activated Retrotransposon in Cruciferous Vegetables. *Epigenomes* 2017;1: 7. doi: 10.3390/epigenomes1010007.

16. Lisch D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2009;60: 43–66.
17. Naito K, Zhang F, Tsukiyama T, Saito H, Hancock CN, Richardson AO, et al. Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature.* 2009;461: 1130–1134.
18. Charng Y, Liu H, Liu N, Chi W, Wang C, Chang S, et al. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2007;143: 251–262.
19. LIU H, LIAO H, CHARNG Y. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 2011;34: 738–751.
20. Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, et al. *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol Genet Genomics.* 2011;286: 321–332.
21. Leng L, Liang Q, Jiang J, Zhang C, Hao Y, Wang X, et al. A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 2017;130: 349–363. doi:10.1007/s10265-016-0900-6
22. Matsunaga W, Ohama N, Tanabe N, Masuta Y, Masuda S, Mitani N, et al. A small RNA mediated regulation of a stress-activated retrotransposon and the tissue specific transposition during the reproductive period in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 2015;6: 48.
23. Masuda S, Nozawa K, Matsunaga W, Masuta Y, Kawabe A, Kato A, et al.

- Characterization of a heat-activated retrotransposon in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst.* 2016; 16–45.
24. Probst A V, Scheid OM. Stress-induced structural changes in plant chromatin. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;27: 8–16.
 25. Lämke J, Bäurle I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol.* 2017;18: 124.
 26. Gouil Q, Baulcombe DC. DNA methylation signatures of the plant chromomethyltransferases. *PLoS Genet.* 2016;12: e1006526.
 27. Chen X, Lu L, Qian S, Scalf M, Smith LM, Zhong X. Canonical and Noncanonical Actions of Arabidopsis Histone Deacetylases in Ribosomal RNA Processing. *Plant Cell.* 2018;30: 134–152. doi:10.1105/tpc.17.00626
 28. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16: 519–532. doi:10.1038/nrm4043
 29. Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N, Scheid OM. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2010;22: 3118–3129. doi:10.1105/tpc.110.078493
 30. Sun L, Jing Y, Liu X, Li Q, Xue Z, Cheng Z, et al. Heat stress-induced transposon activation correlates with 3D chromatin organization rearrangement in Arabidopsis. *Nat Commun.* 2020;11: 1886.
 31. Liu S, De Jonge J, Trejo - Arellano MS, Santos - González J, Köhler C, Hennig L.

- Role of H1 and DNA methylation in selective regulation of transposable elements during heat stress. *New Phytol.* 2021;229: 2238–2250.
32. Dubin MJ, Zhang P, Meng D, Remigereau M-SS, Osborne EJ, Paolo Casale F, et al. DNA methylation in *Arabidopsis* has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. *Elife.* 2015;4: e05255. doi:10.7554/eLife.05255
 33. Popova O V, Dinh HQ, Aufsatz W, Jonak C. The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 2013;6: 396–410.
 34. Naydenov M, Baev V, Apostolova E, Gospodinova N, Sablok G, Gozmanova M, et al. High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem.* 2015;87: 102–108. doi:10.1016/j.plaphy.2014.12.022
 35. Zhang C, Du X, Tang K, Yang Z, Pan L, Zhu P, et al. *Arabidopsis* AGDP1 links H3K9me2 to DNA methylation in heterochromatin. *Nat Commun.* 2018;9: 4547.
 36. Zhou W, Liang G, Molloy PL, Jones PA. DNA methylation enables transposable element-driven genome expansion. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117: 19359–19366.
 37. Ebbs ML, Bender J. Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell.* 2006;18: 1166–76. doi:10.1105/tpc.106.041400
 38. Chan SWL, Henderson IR, Zhang X, Shah G, Chien JSC, Jacobsen SE. RNAi, DRD1, and histone methylation actively target developmentally important Non-CG DNA methylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2006;2: 0791–0797. doi:10.1371/journal.pgen.0020083

39. Henderson IR, Jacobsen SE. Tandem repeats upstream of the Arabidopsis endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. *Genes Dev.* 2008;22: 1597–1606. doi:10.1101/gad.1667808
40. Jiang J, Liu J, Sanders D, Qian S, Ren W, Song J, et al. UVR8 interacts with de novo DNA methyltransferase and suppresses DNA methylation in Arabidopsis. *Nat Plants.* 2021;7: 184–197. doi:10.1038/s41477-020-00843-4
41. Qian S, Lv X, Scheid RN, Lu L, Yang Z, Chen W, et al. Dual recognition of H3K4me3 and H3K27me3 by a plant histone reader SHL. *Nat Commun.* 2018;9: 2425. doi:10.1038/s41467-018-04836-y
42. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30: 2114–2120.
43. Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol.* 2019;37: 907–915.
44. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11: R25.
45. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34: i884–i890.
46. Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, et al. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* 2012;13: R87.
47. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing

- genomic features. *Bioinformatics*. 2010;26: 841–842.
48. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9: 357.
 49. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008;9: 1–9.

Figure legends

Fig.1. *cmt3*変異体では、熱によって誘導される *ONSEN*の転写が抑制される

(A) Columbia-0(Col-0)および Landsberg erecta(Ler)由来の *cmt3* 変異体において、非ストレス下(NS)および熱ストレス下(HS)で *ONSEN* の RT-qPCR を行った。*ONSEN* 転写量は 18S rRNA で正規化した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を示す。P-value は Student's t-test を用いて算出した。*は $P < 0.05$ を示す。

(B) 野生型と *cmt3* 変異体の非ストレス下(上)と熱ストレス下(下)における protein-coding 遺伝子とトランスポゾン(TE)の 100 万リードあたりのカウント数(CPM)を散布図に示した。破線は 2 倍の変化を示す。

(C) 野生型と *cmt3-11t* 変異体の非ストレス下および熱ストレス下における発現変動 TE のヒートマップ。カラーバーは Z-score を示す。

Fig2. *cmt3*変異体では、熱ストレス下で *ONSEN*の転写が低下している

RT-qPCR により、熱ストレス下における各変異体の *ONSEN* の相対的な転写量を示す。すべての棒グラフは 3 つのバイオロジカルレプリケートの平均値+SD を示す。*ONSEN*の相対的な転写量は、18S rRNA に正規化し、次に野生型に対して正規化した。P-value は Student's t-test によって算出した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

Fig.3 熱ストレス下の野生型と *cmt3*変異体における ROMANIAT5 と AtCOPIA37 は同様の転写レベルを示す

RT-qPCR を用いて相対的な転写レベルを定量し、ACT7 と野生型で正規化した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルリプリケイトから得られた平均値+SD を示す。P-value は Student's t-test によって算出した。

Fig.4 熱応答性転写因子 HSFA2 と熱応答性タンパク質 HSP90.1 の発現レベルは野生型と *cmt3*変異体で同等である

転写量は RT-qPCR で定量し、18S rRNA で正規化した。すべての棒グラフは、4 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を示す。P-value は Student's t-test によって算出した。ns は有意でないことを示す。NS は非ストレス、HS は熱ストレスを示す。

Fig.5 野生型および *cmt3* 変異体における核の 4'、6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 染色

(A)DAPI 染色による核の凝縮した染色体、中間的な染色体、分散した染色体の代表的な画像を示す。(B) 野生型と *cmt3*変異体における condensed(凝縮型)、intermediate(中間型)、dispersed(分散型)の割合を示す棒グラフ。N は数えた核の総数を示す。NS は非ストレス、HS は熱ストレス。* および ns は有意でないことを示す。

Fig.6. CMT3 の BAH、Chromo、Catalytic ドメインは熱による *ONSEN* の転写に必要である。

野生型、*cmt3-11t* 変異体、および野生型 CMT3(FLAG-CMT3)、BAH ドメイン変異体(FLAG-CMT3bah)、Chromo ドメイン変異体(FLAG-CMT3chr)、野生型 CMT3(Myc-CMT3)、および Catalytic ドメイン変異体(Myc-CMT3cat)を *cmt3-11t* 変

異体バックグラウンドで発現させたトランスジェニックラインにおける熱ストレス下での相対的な *ONSEN* の転写量を棒グラフで示した。転写量は、まず ACT7 で正規化し、次に野生型で正規化した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルリプリケイトから得られた平均値+SD を示す。a と b の表記は両者の間で有意な差($P < 0.05$)があることを示す。P-value は Student's t-test によって算出した。

Fig 7. *cmt3*変異体の *ONSEN*における CHH メチル化の増加は、CMT2 によって媒介される

(A) 野生型の *ONSEN2(AT3TE92525/AT3G61330)*における CHG と CHH のメチル化レベル。

(B) 野生型、*cmt3-11* 変異体、*cmt2-3* 変異体、*cmt2 cmt3* 変異体、*drm1/2* 変異体、*drm1/2 cmt3* 変異体における *ONSEN2*内の CHH メチル化レベル。

(C) 対応する変異体における 8 つの *ONSEN* コピーの平均 CHH メチル化を示すメタプロット。-2kb は開始部位の上流 2000bp、2kb は終了部位の下流 2000bp を示す。

(D) 非ストレス下(NS)と熱ストレス下(HS)での対応する変異体において、熱ストレスで高誘導される 2 つの *ONSEN* コピーである *ONSEN1* と *ONSEN2* の ORF の CHH メチル化レベルをバイサルファイトサンガーシーケンス法で調べた。

(E) 野生型、*cmt2-3* 変異体、*cmt3-11* 変異体の *ONSEN* 全 8 コピーの ORF の CWA コンテキスト(CAA および CTA)および非 CWA コンテキストの CHH メチル化レベルを示す箱ひげ図。P-value は Wilcoxon 検定によって算出した。

(F) 非ストレス下および熱ストレス下での対応する変異体における *ONSEN* の RT-qPCR。すべての棒グラフは、2 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を示す。*ONSEN* 転写量は 18S rRNA で正規化した。P-value は Student's t-test、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、ns は有意でないことを示す。

Fig.8 *cmt3*変異体で CHH メチル化が増加しているトランスポゾン

(A) *cmt3*変異体の hyper CHH DMR を含むゲノム上の各トランスポゾン(TE)ファミリーの割合を棒グラフで示した。P-value は Fisher's exact test を用いて算出し、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ を示す。(B) *cmt3*変異体で CHH のメチル化が増加している TE のゲノムブラウザのスナップショット。(C) *cmt3* 変異体で CHH のメチル化が増加している *ONSEN* と他の TE におけるシトシンコンテキスト(CG、CHG、CHH)の割合。P-value は Fisher's exact test を用いて算出した。

Fig.9 *cmt2 cmt3*変異体では *cmt2*変異体と比較して *ONSEN*転写量の減少しない

RT-qPCR により、熱ストレス下の野生型、*cmt3-11t* 変異体、*cmt2-3* 変異体、*cmt2 cmt3* 変異体における *ONSEN* の相対的な転写量を示した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を示す。*ONSEN* は、まず ACT7 で正規化し、次に野生型の発現量で正規化した。P-value は Student's t-test によって算出した。**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

Fig.10 *cmt3* 変異体では、CMT2 の転写およびタンパク質量は野生型と比較して変化しない

(A) 熱ストレス下における野生型、*drm1 drm2* (*drm1/2*)変異体、*cmt2-3* 変異体、*cmt3-11t*変異体の DRM2、CMT2、CMT3 の相対的な転写量を RT-qPCR で示した。転写量は、まず ACT7 で正規化後、野生型で正規化した。データは 3 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を示す。P-value は Student's t-test によって算出した。**は $P < 0.01$ を示す (B) *cmt2*変異体(CMT2-FLAG/*cmt2*)および *cmt2 cmt3* 変異体バックグラウンドの CMT2 タグ付きトランスジェニックライン(CMT2-FLAG/cc)における CMT2 タンパク質の WB 解析。矢印は CMT2-FLAG タンパク質を示す。Actin はローディングコントロールとして使用した。

Fig.11. *cmt3*変異体では *ONSEN*遺伝子座への CMT2 の結合が増加している

(A) *ONSEN* の構造と ChIP-qPCR 増幅領域の位置を示す。LTR は Long terminal repeat、ORF は Open reading frame、HSE は Heat-shock element を意味する。

(B) 野生型および CMT3 タグ付き *cmt3-11t* 変異体(FLAG-CMT3)において、非ストレス(NS)および熱ストレス(HS)条件下で ChIP-qPCR を行ったところ、*ONSEN* 遺伝子座への CMT3 の結合が見られた。インプット DNA に対して正規化した後、ChIP サンプルをさらにそれぞれの Spike-in human chromatin に対して正規化した。TA3 はポジティブコントロールとして、ACT7 はネガティブコントロールとして使用した。すべての棒グラフは、2つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を表す。P-value は Student's t-test によって算出した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

(C) 野生型および CMT2 タグ付きラインの *cmt2* 変異体(CMT2-FLAG/*cmt2*)および *cmt2 cmt3* 変異体(CMT2-FLAG/cc)において、非ストレスまたは熱ストレス条件下における *ONSEN* 遺伝子座への CMT2 の結合量を示す ChIP-qPCR。インプット DNA に対して正規化した後、ChIP サンプルをさらにそれぞれの Spike-in human chromatin に対して正規化した。ネガティブコントロールとして *AT4G00810* を用いた。棒グラフは、2回(NS)または1回(HS)のバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SD を表す。P-value は Student's t-test によって算出した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

(D)熱ストレス処理(37°C)の時間経過に伴う CMT2 タンパク質レベルの変化。one-phase decay モデルを用いて近似曲線を作成し、半減期を算出した。

Fig.12 熱ストレス下での CMT2、CMT3、DRM2 のタンパク質存在量

(A、B) *cmt2* 変異体(A)および *cmt2 cmt3* 変異体(B)バックグラウンドの CMT2-FLAG のタンパク質存在量の変化を示す。

(C、D) CMT3-FLAG(C)と DRM2-FLAG(D)の熱処理によるタンパク質量の変化を示した。7 日目の seedling に 37°Cの熱処理を供し、各時間ごとに 2 つのバイオロジカルレプリケートを作成した。Actin およびポンソー染色はローディングコントロールとした。(E) 野生型を 37°Cの熱で処理したときの CMT2 および CMT3 の相対的な転写量。転写レベルは ACT7 で正規化した。データは各時点での 3 つのテクニカルレプリケートの平均値+SD を示す。

Fig.13 CMT3 による *ONSEN*の活性化は、H3K9 のメチル化によって制御されている

(A) 野生型、SUVH4、SUVH5、SUVH6 の機能喪失変異体(*suvh456*)における *ONSEN* 遺伝子座での H3K9me2 の蓄積量を示す。

(B) 野生型、*cmt3-11t* 変異体、*suvh456* 変異体における *ONSEN2* での CHH メチル化レベル。

(C) 全 8 個の *ONSEN* コピーの平均的な CHH メチル化を示すメタプロット。-2kb は開始部位の上流 2000bp、2kb は終了部位の下流 2000bp を示す。

(D) *ONSEN8* コピーの ORF の野生型、*cmt3-11t* 変異体、および *suvh456* 変異体における CWA(CAA および CTA)および非 CWA の CHH メチル化レベルを示す箱ひげ図。P-value は Wilcoxon 検定によって算出した。

(E) 非ストレス下(NS)および熱ストレス下(HS)における対応する変異体の相対的な *ONSEN* 転写量。*ONSEN* 転写量は 18S rRNA で正規化した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルレプリケートからの平均値+SD を表す。P-value は Student's t-test によって算出した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示す。

(F) 野生型、*cmt3* 変異体、*cmt2* 変異体の非ストレス下および熱ストレス下における *ONSEN* 遺伝子座での H3K9me2 レベルを ChIP-qPCR で定量した。H3K9me2 ChIP サンプルは、まず H3 ChIP で正規化し、次にそれぞれの Spike-in human chromatin で正規化した。ACT7 はネガティブコントロールとして使用。TA3 はポジティブコントロールとして使用した。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SEM を表す。P-value は Student's t-test によって算出した。* は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

Fig.14 熱ストレス下での H3K9me2 レベル

ChIP-qPCR により、非ストレス下および熱ストレス下の野生型、*cmt3* 変異体、*cmt2* 変異体における *ONSEN* での H3K9me2(A)および H3(B)の存在量を示した。ChIP サンプルは、まずインプット DNA に対して正規化し、次にそれぞれの Spike-in human chromatin に対して正規化した。ACT7 はネガティブコントロールとして、TA3 はポジティブコントロールとして用いた。すべての棒グラフは、3 つのバイオロジカルレプリケートから得られた平均値+SEM を表す。P-value は Student's t-test によって算出した。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ 、ns は有意でないことを示す。

CMT2-FLAG/*cmt2* 変異体(A)および CMT3-FLAG/*cmt3* 変異体(B)における H3 および H3K9me2 の WB 解析。7 日目の seedling を 37°Cで熱ストレス処理を行い、各時間ごとに 2 つのバイオロジカルレプリケートを作製した。

Fig.15 熱ストレスの時間経過に伴う *ONSEN* の転写の変化

7 日目の seedling を 37°Cで指定の時間処理し、転写量を解析した。各時点でのデータは、3 つのテクニカルレプリケートの平均値+SD を示す。同時期の野生型に対して Student's t-test を行い P-value を算出した。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

Fig.16. 熱による *ONSEN* の活性化における CMT3 の機能のワーキングモデル

非ストレス下(NS)では、CMT2 と CMT3 は自己強化ループを介して H3K9me2 により *ONSEN* 遺伝子座にリクルートされる。野生型(WT)では、*ONSEN* 遺伝子座の CMT3 が CMT2 の結合を抑制する。CMT3 の機能を喪失すると、CMT2 を介して CHH のメチル化が増加する。熱ストレス(HS)を受けると、熱応答性転写因子(HSF)によって *ONSEN* の転写が活性化される。*cmt3* 変異体では、*ONSEN* クロマチンの CHH メチル化と H3K9me2 レベルが高い。熱ストレス下においても高い H3K9me2 レベルが維持され、野生型と比較して *ONSEN* の転写量が低下する。*cmt2* 変異体では、非ストレス下においても CHH のメチル化と H3K9me2 レベルが低い。熱ストレスにより H3 が顕著に減少し、クロマチンが緩むことで野生型と比較して *ONSEN* の転写が増加している。CMT2 タンパク質は、熱ストレスによって分解される。

S1 Table RNA-seq の統計データ

S2 Table 本研究で使用したプライマー一覧

Fig.1

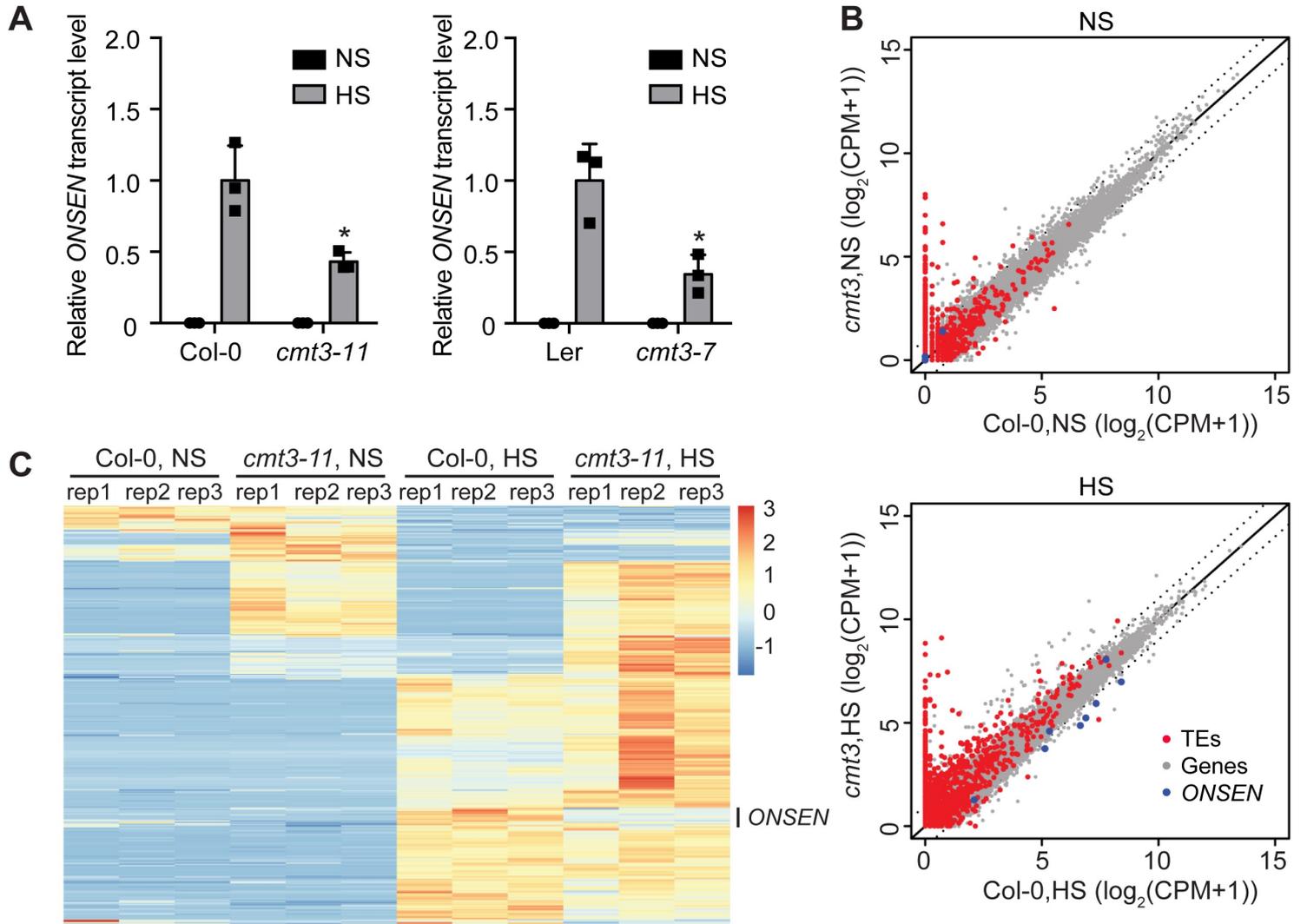


Fig.2

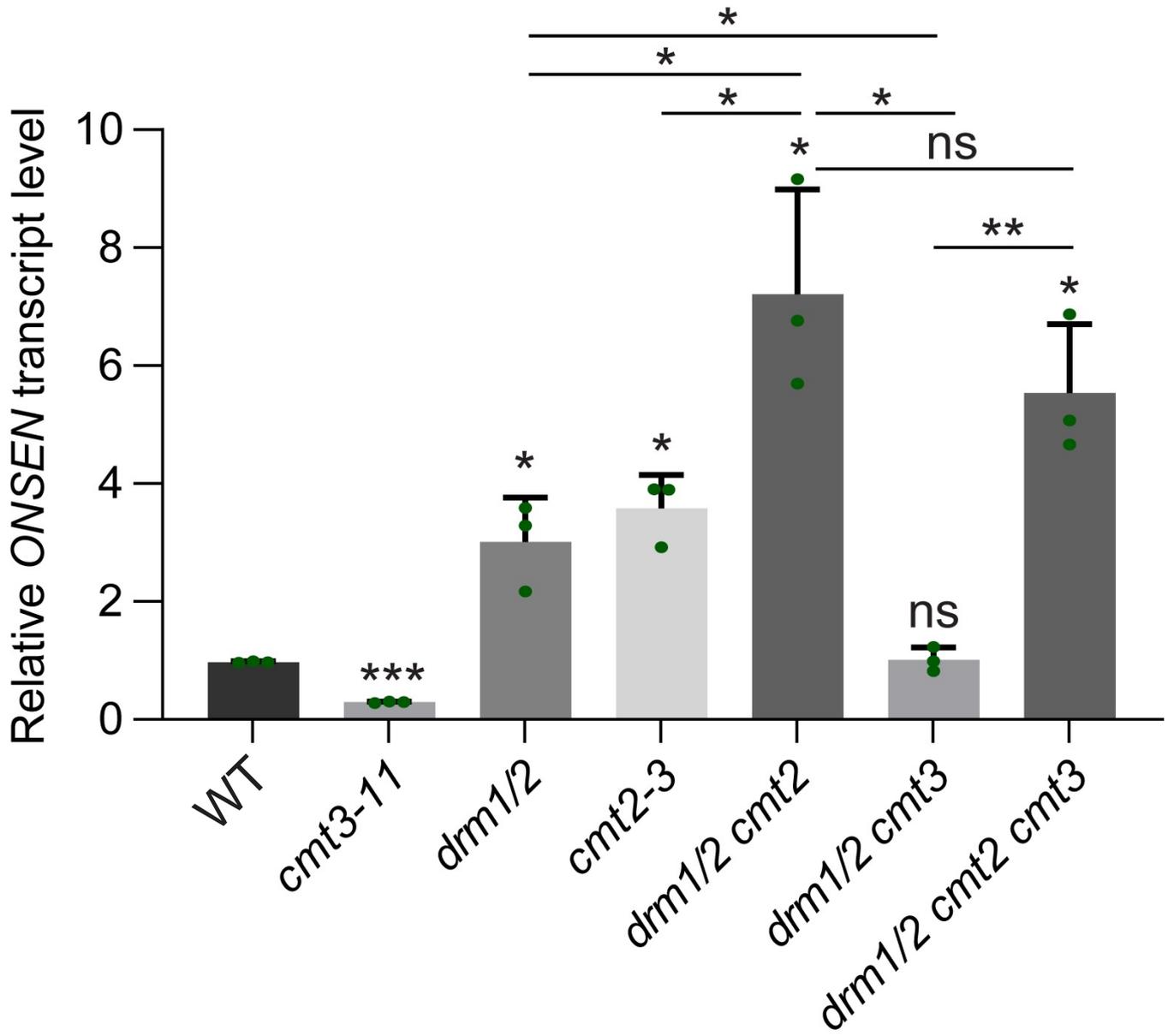


Fig.3

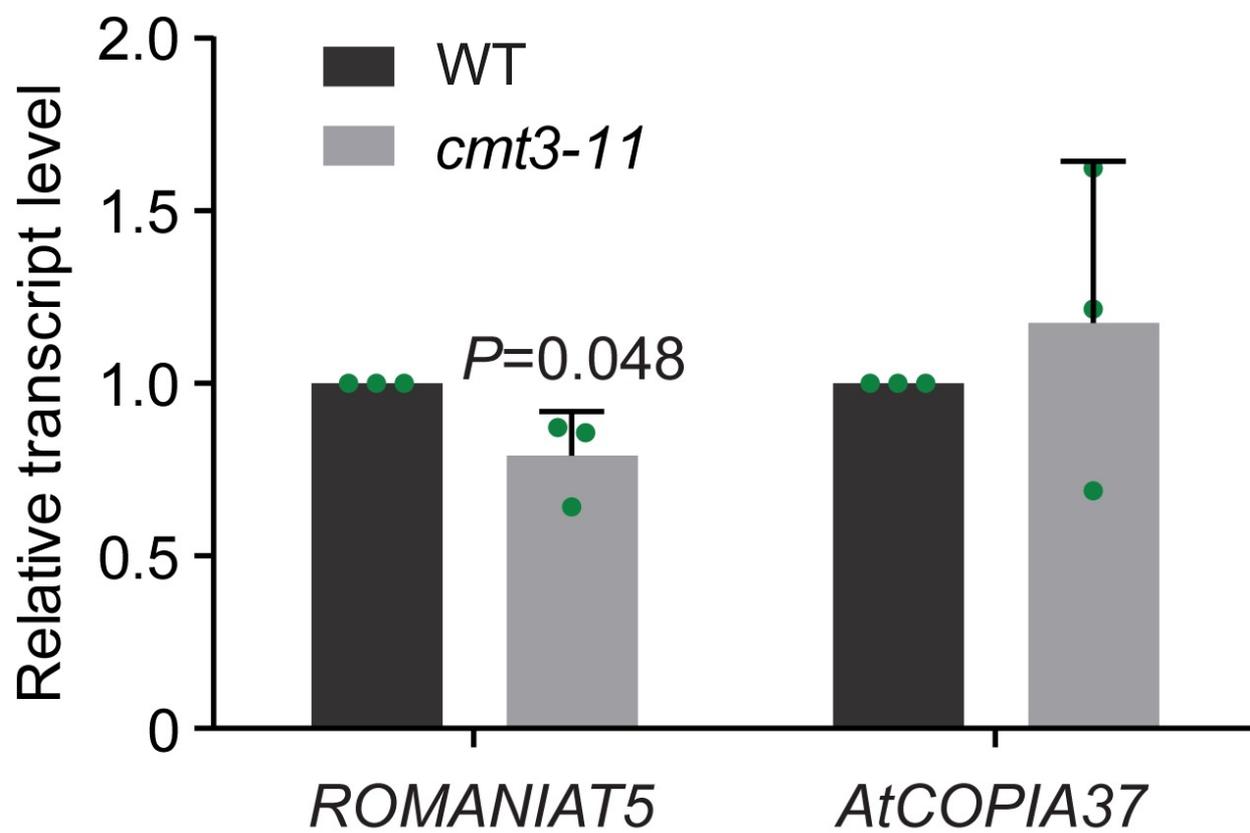


Fig.4

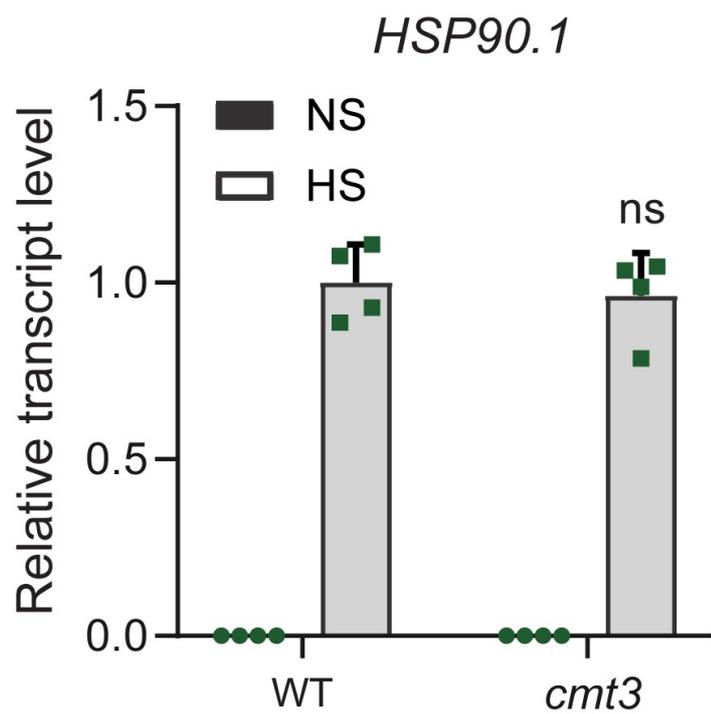
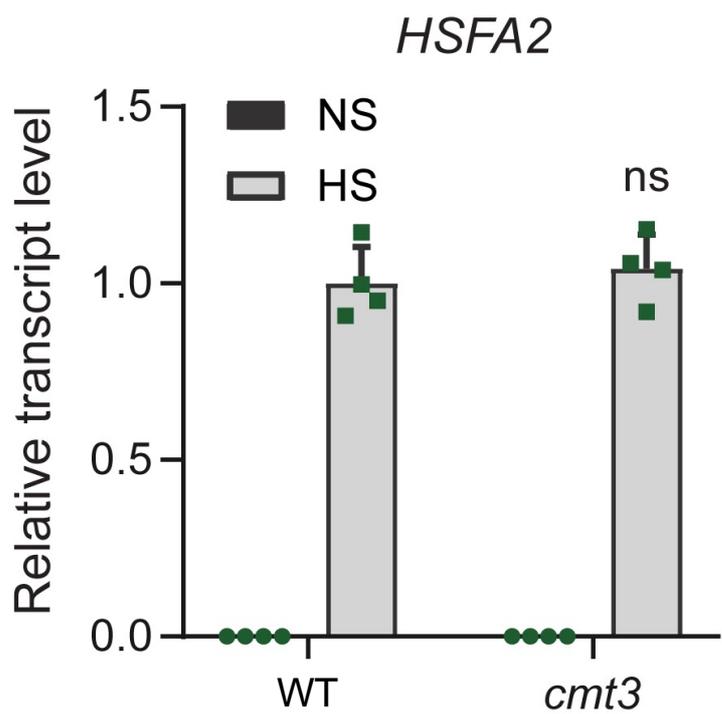
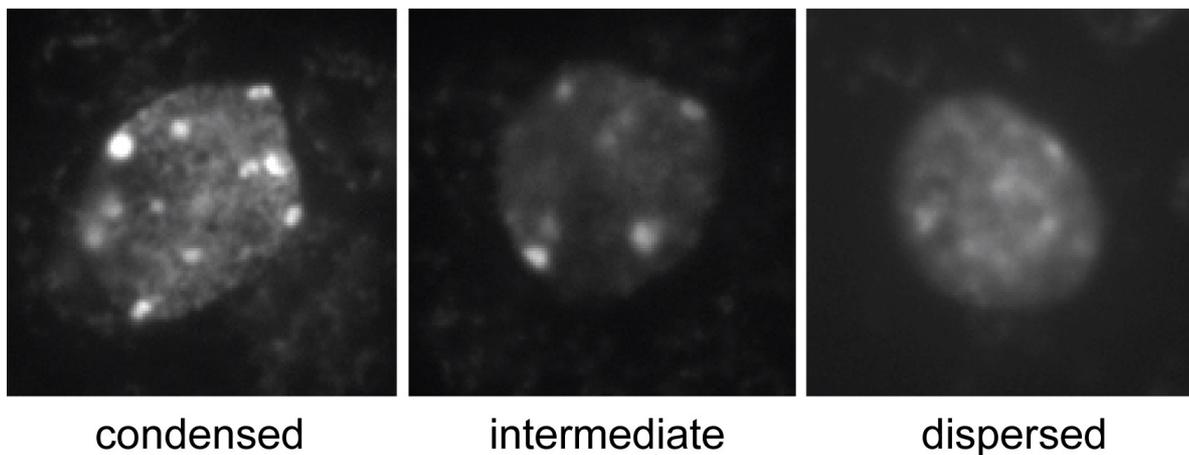


Fig.5

A



B

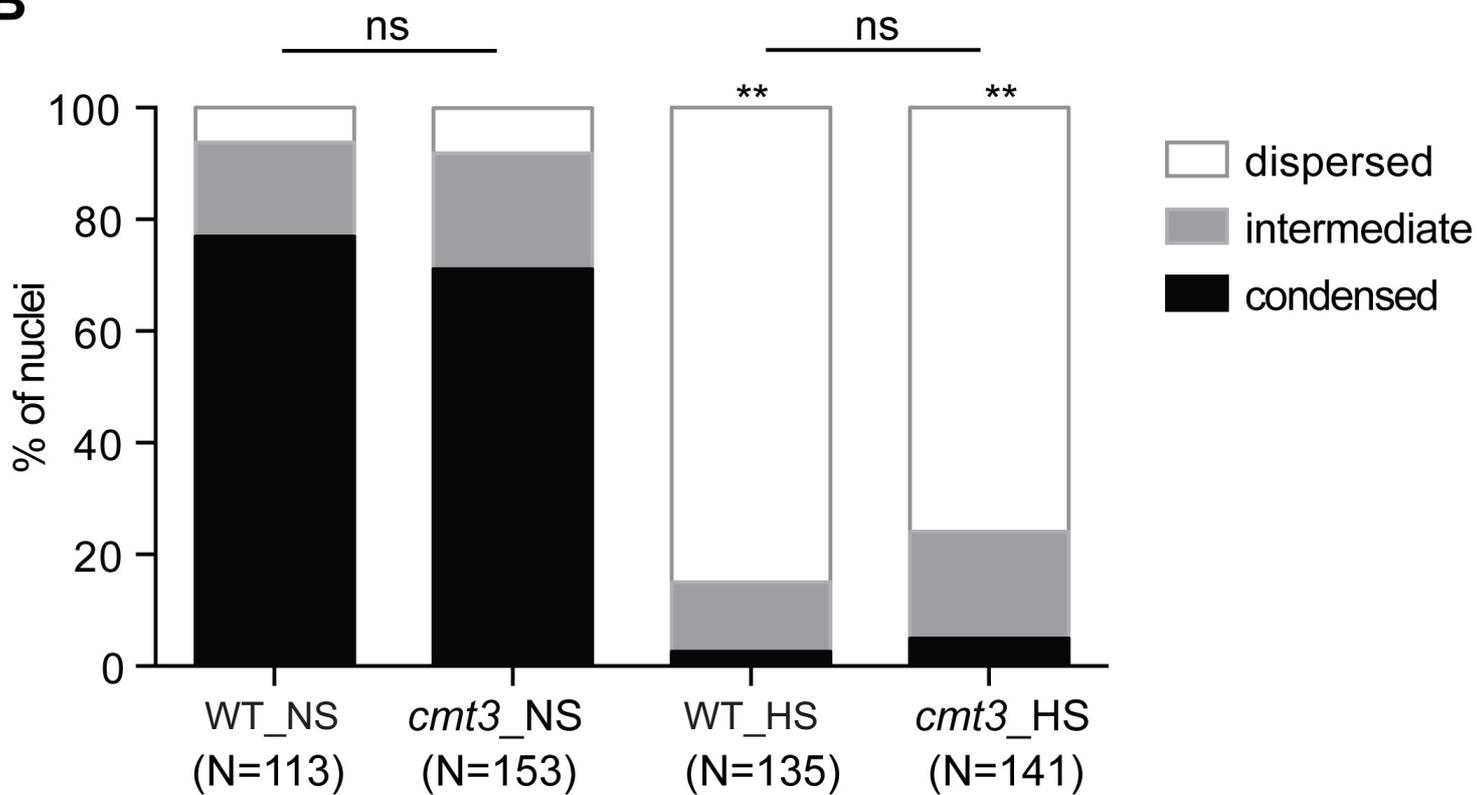


Fig.6

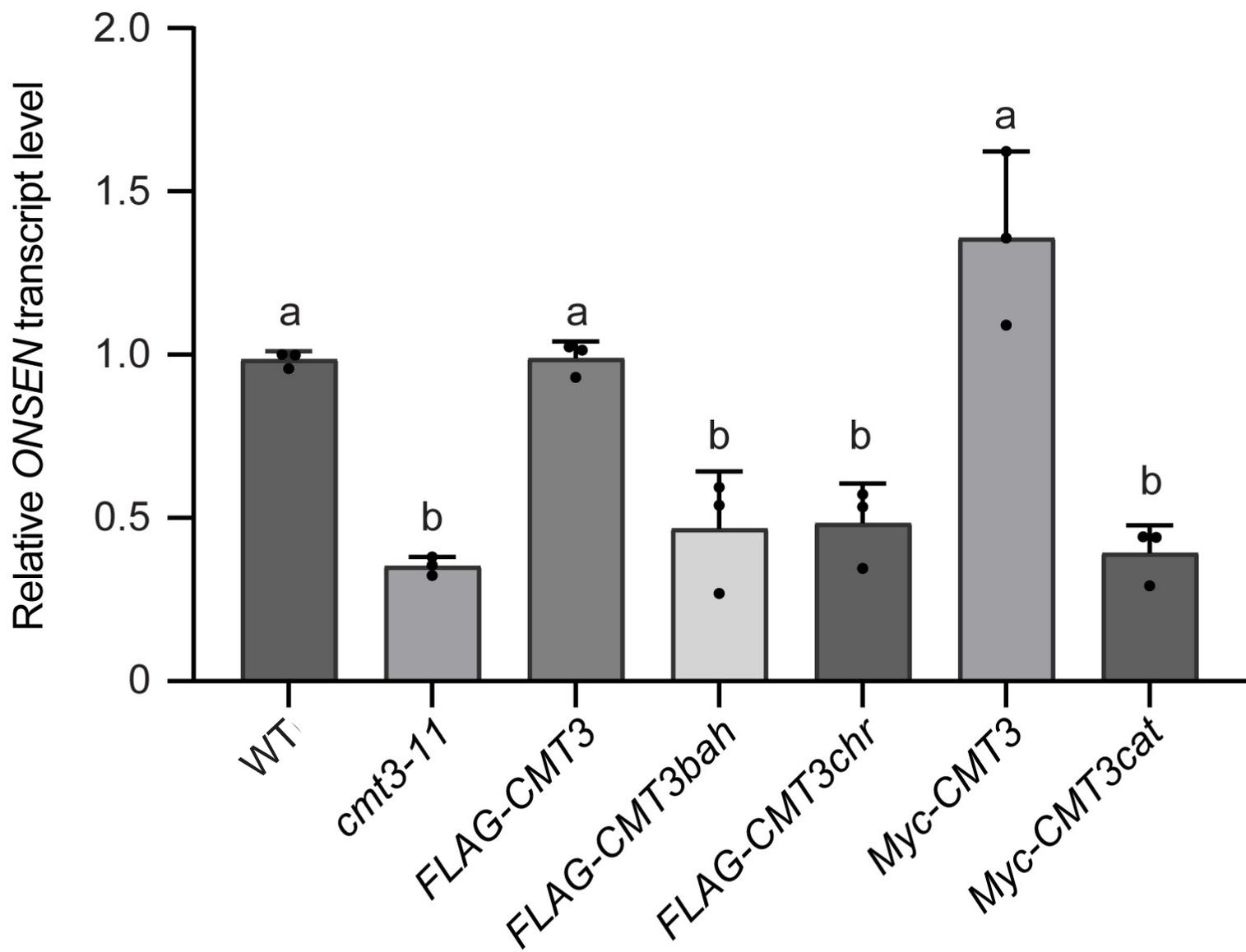


Fig.7

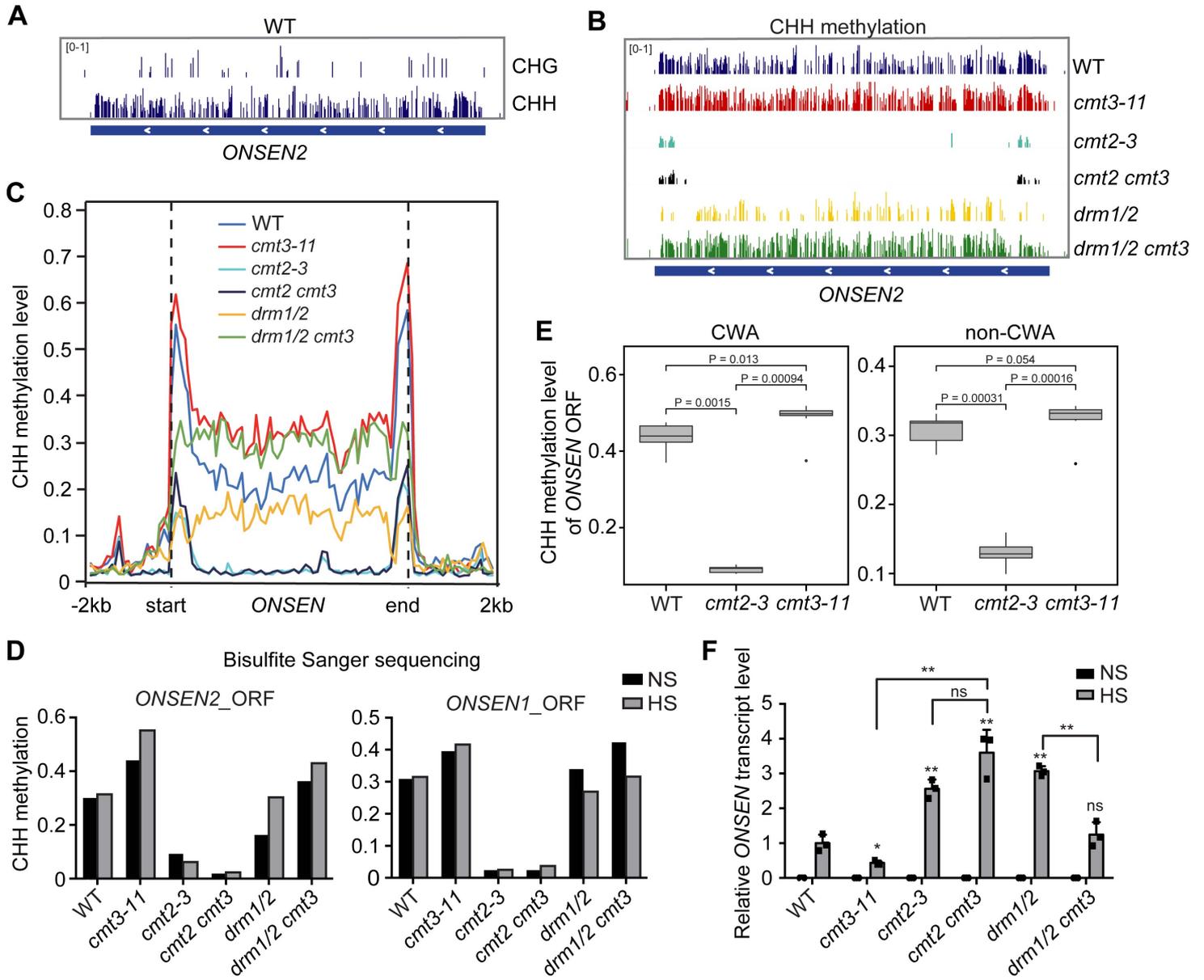


Fig.8

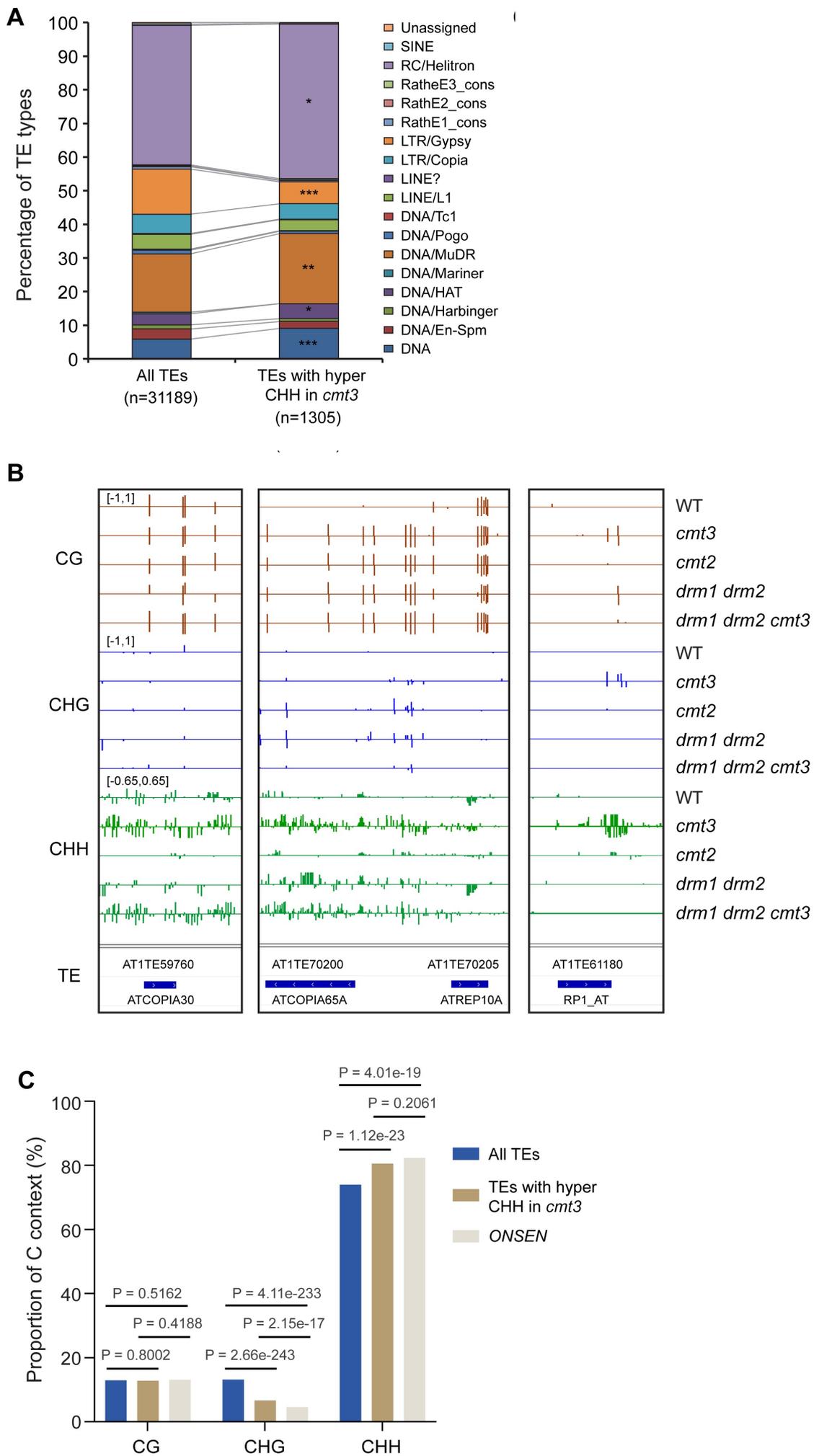


Fig.9

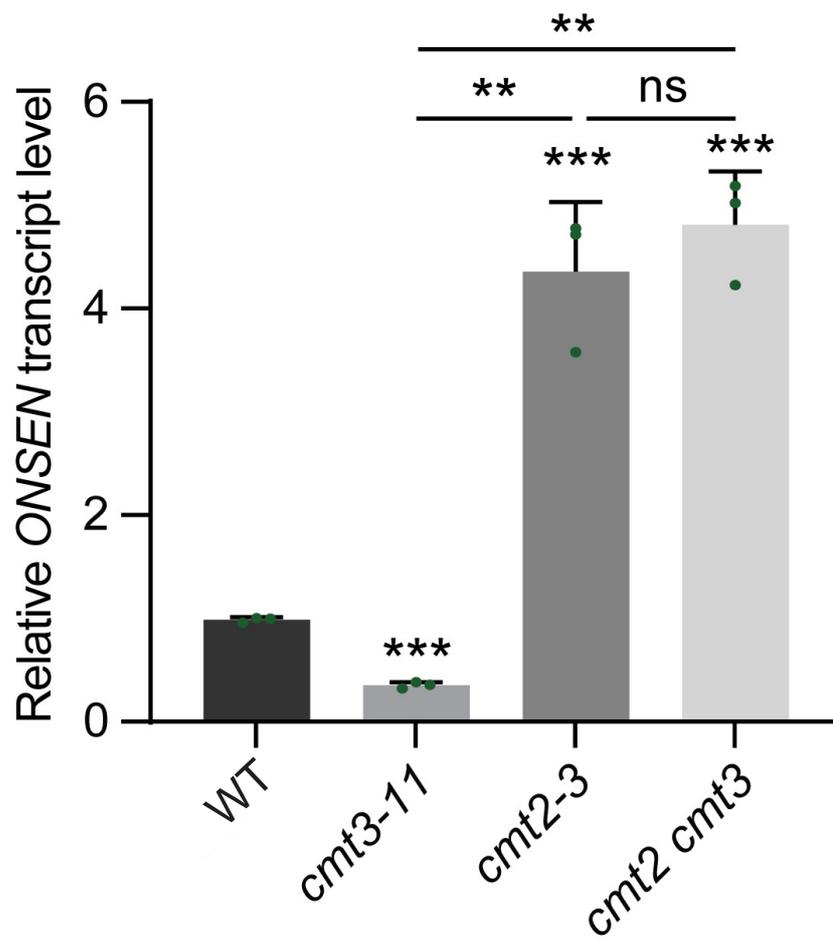
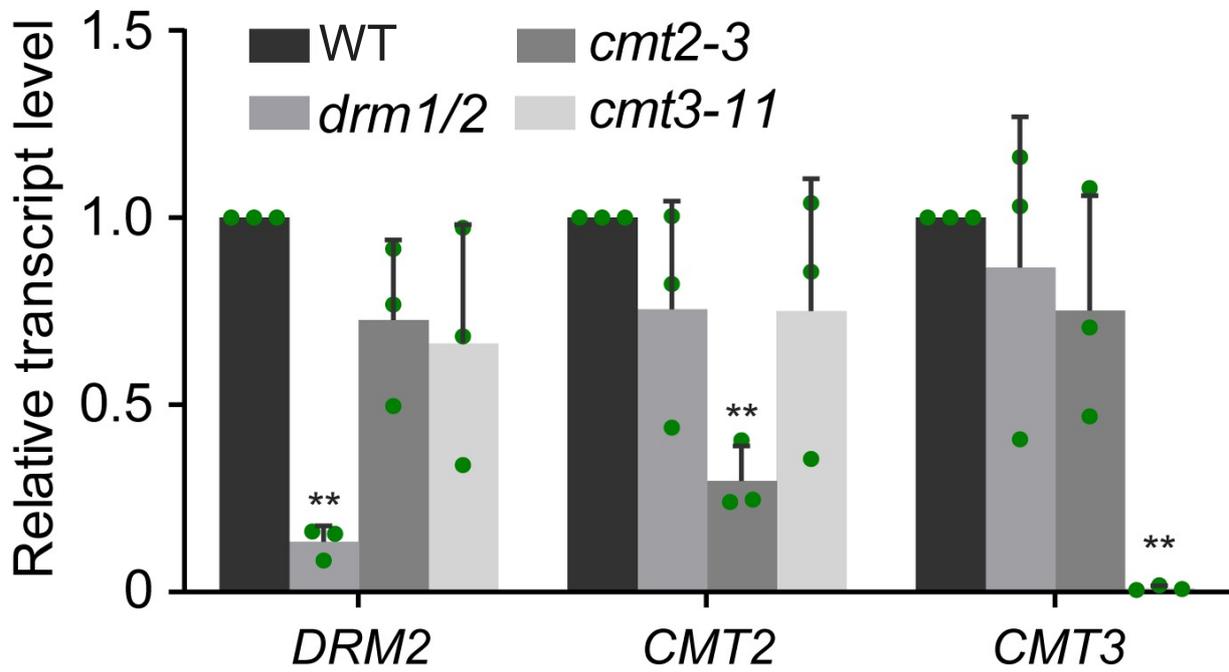


Fig.10

A



B

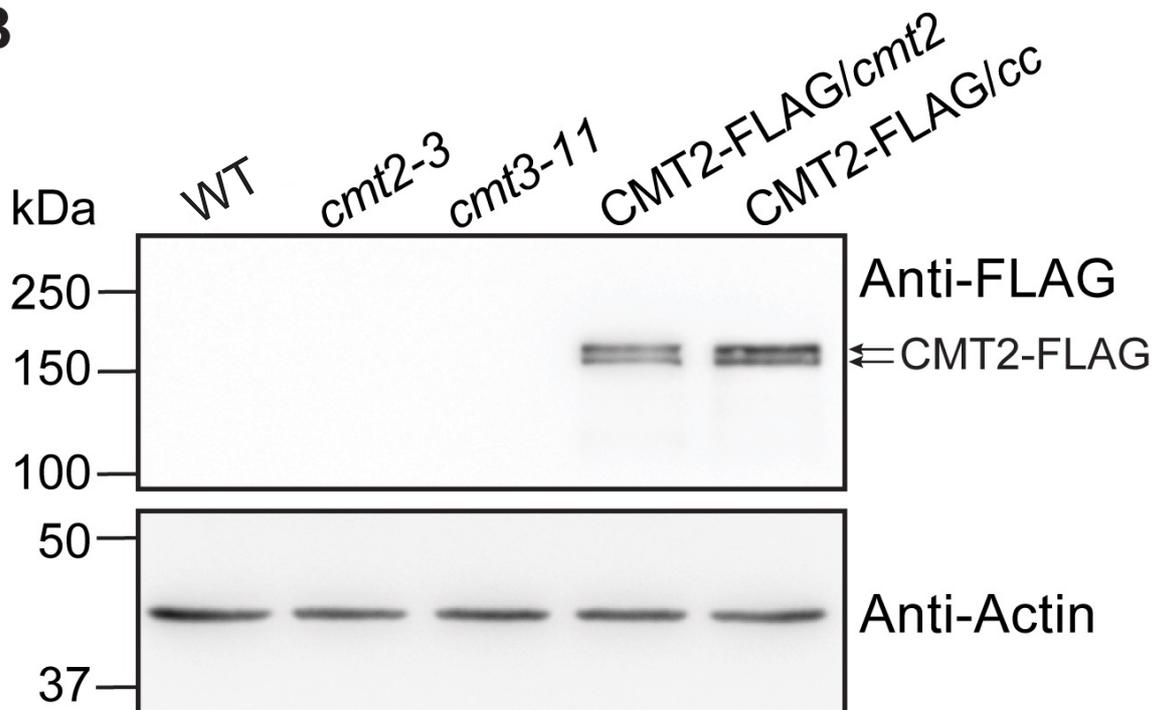


Fig.11

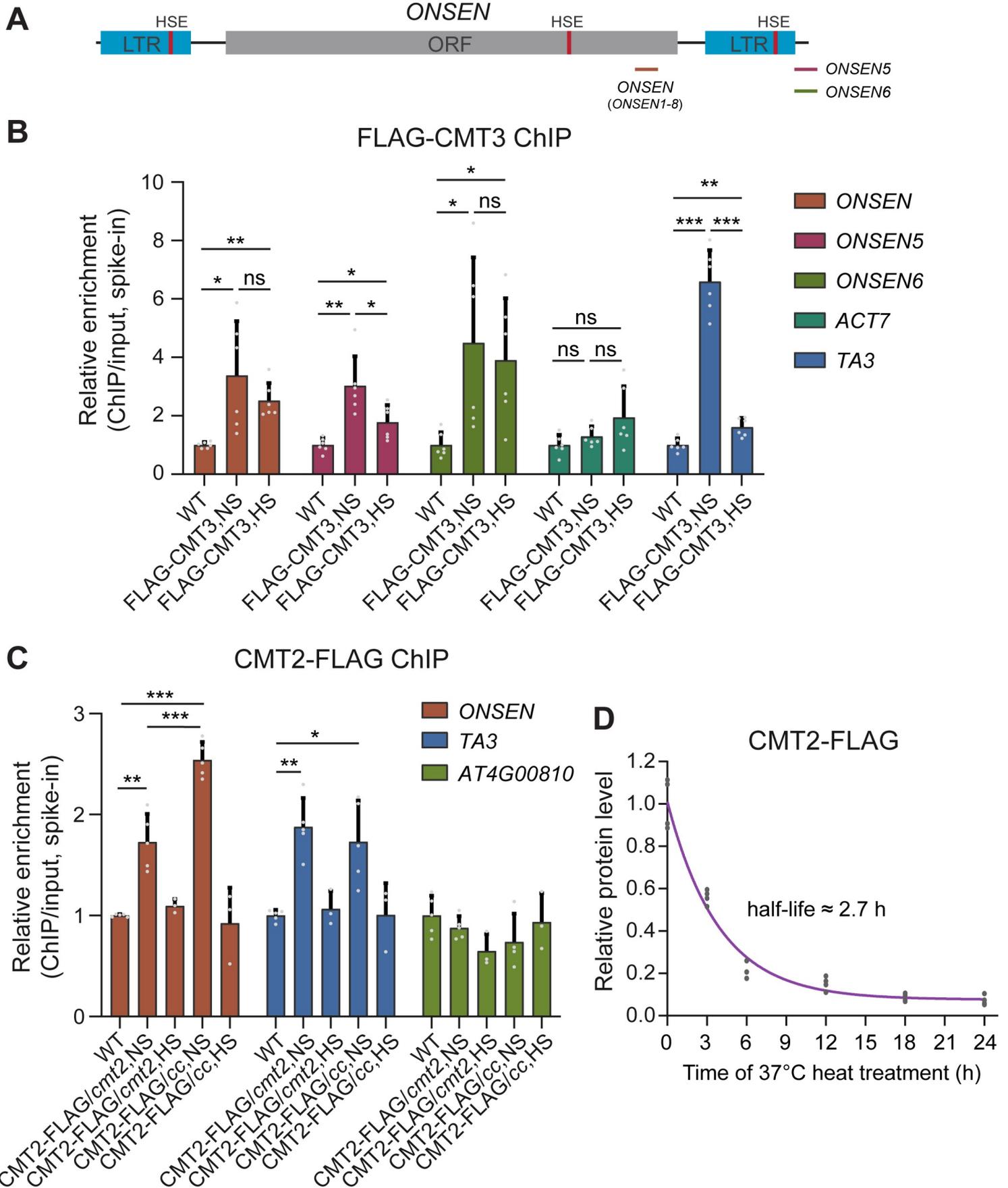


Fig.12

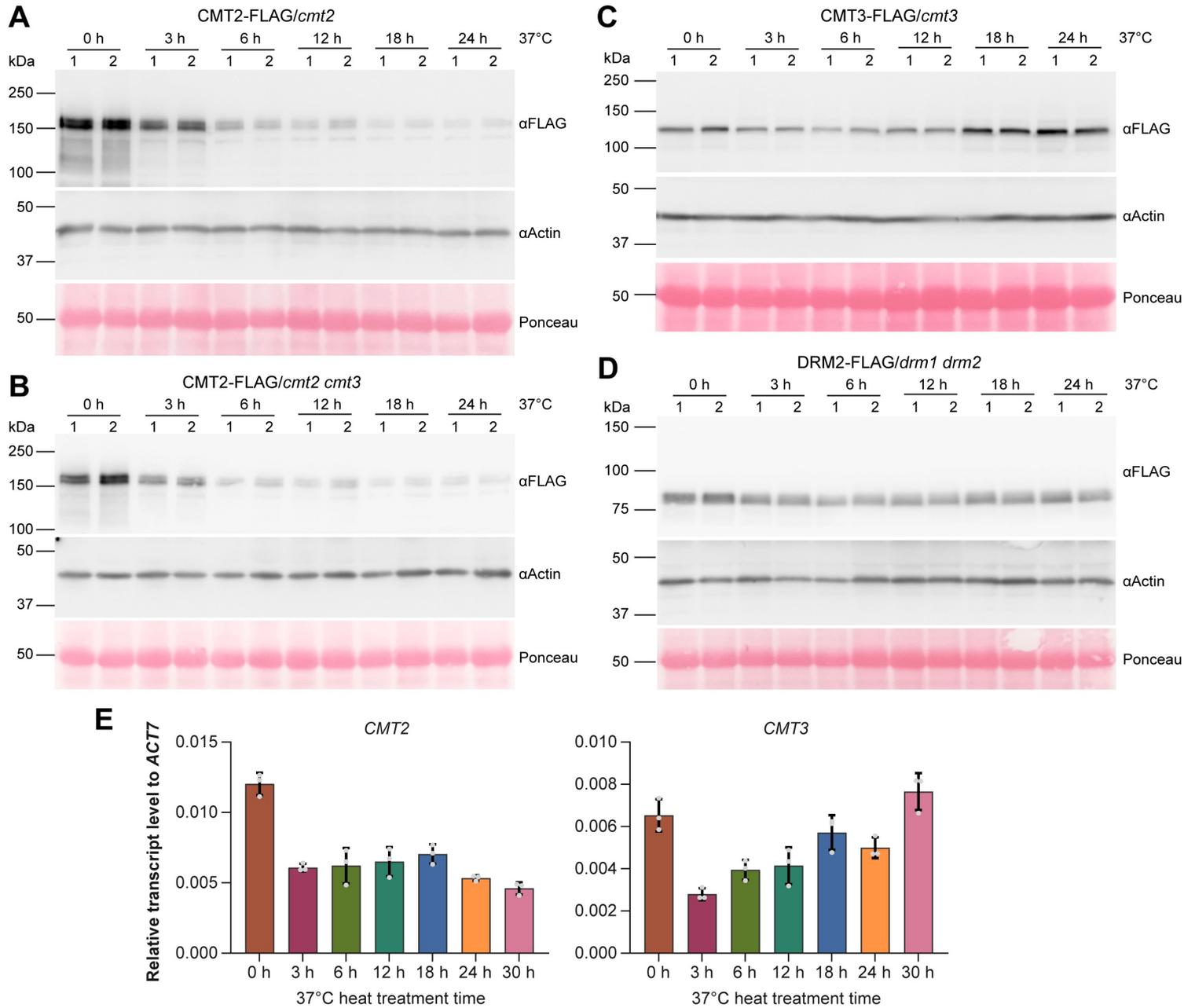


Fig.13

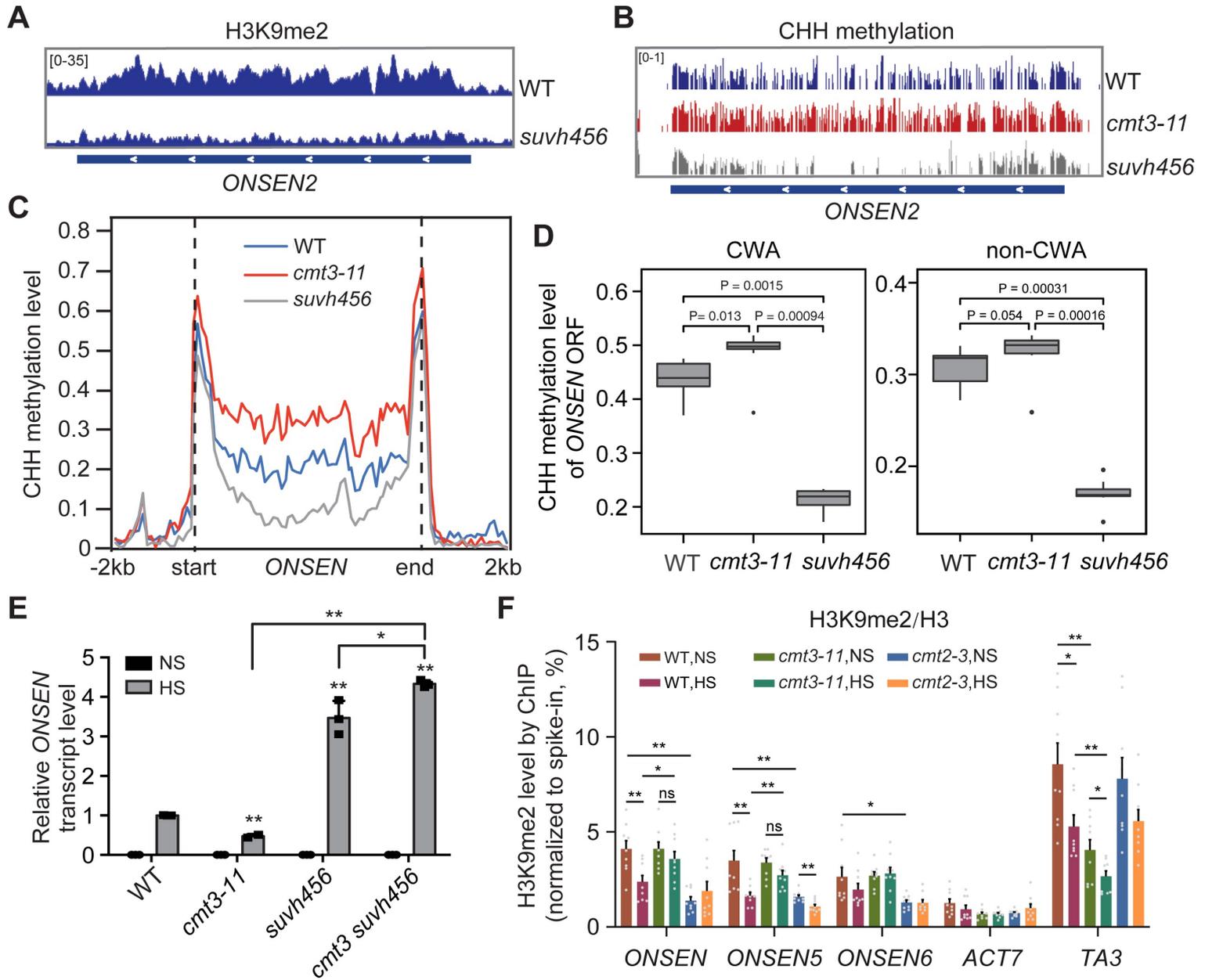


Fig.14

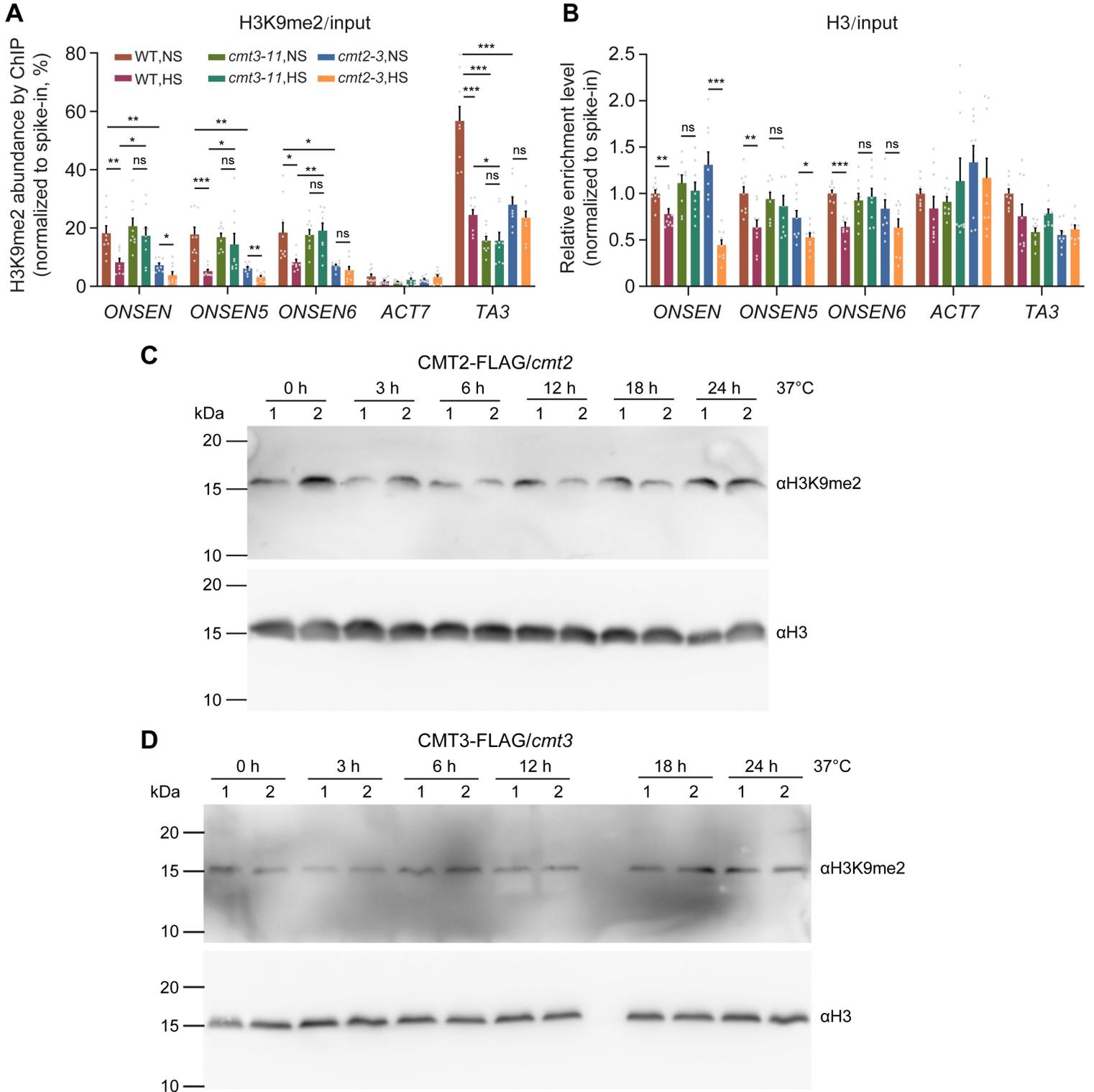


Fig.15

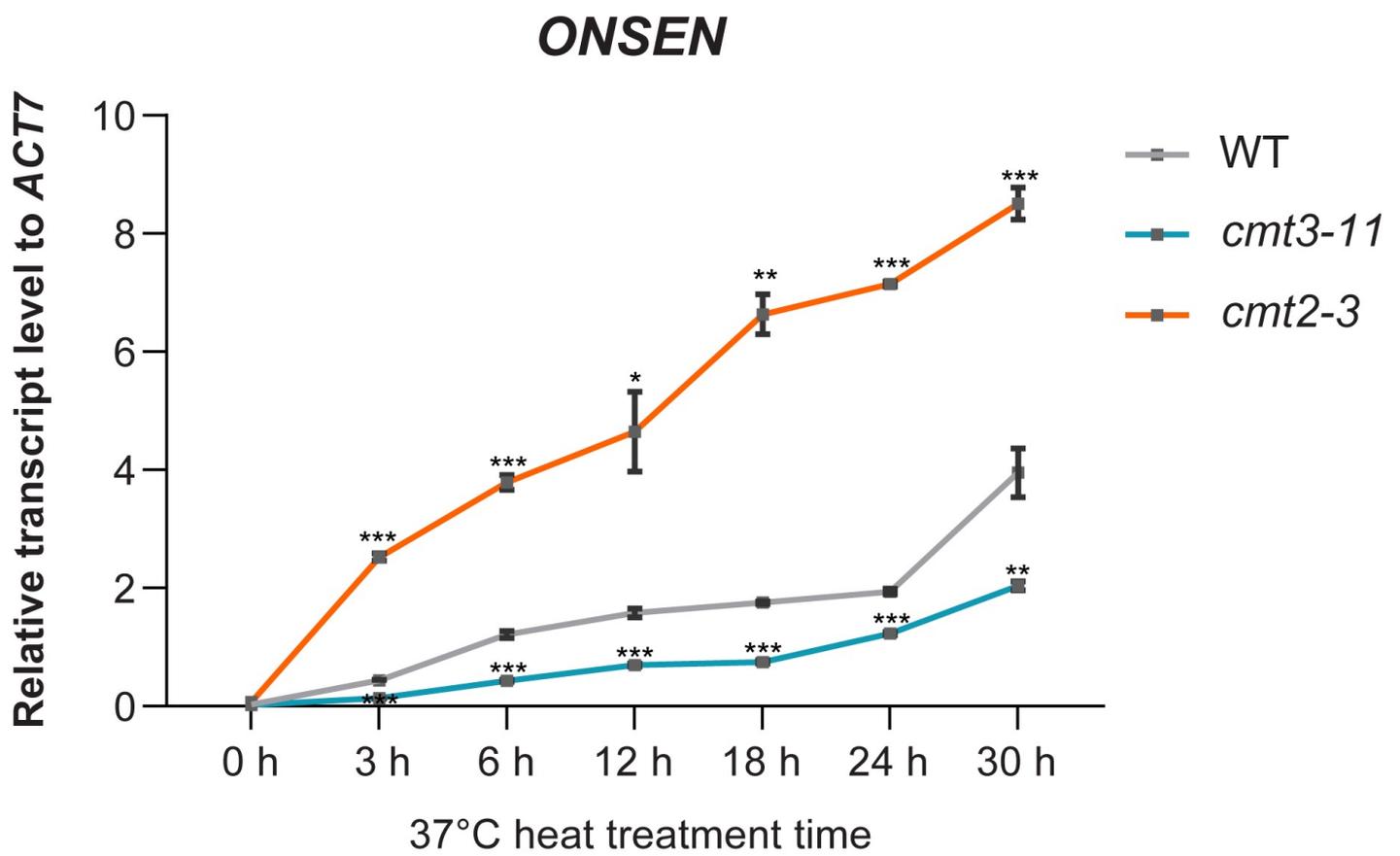
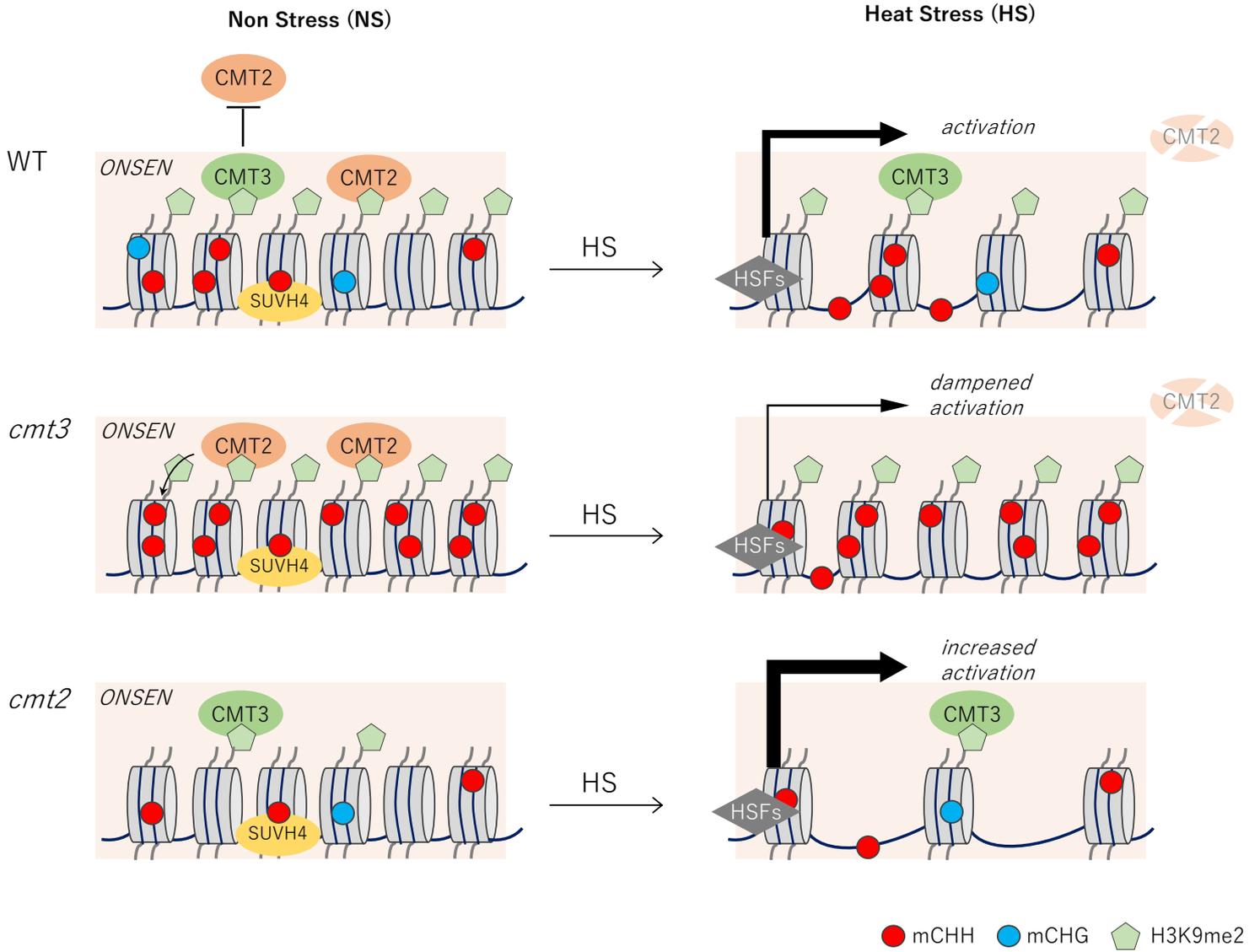


Fig.16



S1 Table

Sample name	Raw Reads	Total Reads	Mapped Reads(unique)	Mapped Reads(non-unique)	%Mapping
WT NS1	8858221	7260980	4804128	2233350	96.92
WT NS2	15282164	12702688	10946940	1386704	97.09
WT NS3	11906163	9599282	8272112	987342	96.46
WT HS1	9739392	7825497	6835311	696938	96.25
WT HS2	9981693	8186516	6742930	1169856	96.99
WT HS3	9752489	7951372	6809919	871235	96.6
<i>cmt3</i> NS1	15465639	14859327	8979546	5787451	99.38
<i>cmt3</i> NS2	14501445	13991641	9470971	4437281	99.4
<i>cmt3</i> NS3	11232820	10582934	6618766	3872712	99.14
<i>cmt3</i> HS1	15061190	14514464	10249337	4155449	99.24
<i>cmt3</i> HS2	12042610	11422433	10596834	701050	98.91
<i>cmt3</i> HS3	15162349	14628795	12179149	2324284	99.14

S2 Table

Name	Sequence	Additional Information	
CMT2_3F2	GGTATACTCTTACACT	genotyping	
CMT2_3R1	CGTGTGGTTTGACCT		
CMT3_11tF2	CTTTCAATTGTGCAGA		
CMT3_11tR2	GACGCAGAACAACATA		
KYP-4-F	CATGTGGTCAGCTCACCTGT		
KYP-4-R	GACACATTTTGGCCACACC		
suvh5-2-F	CTGTGAGTACGCAGGAGAGC		
suvh5-2-R	AGTGACATAGTGGATCCCATAGC		
SUVH6GAR1	CCTGTGCGAAGAACATCACGTG		
SUVH6F3	CTGAAAGAGCCTGAAGACC		
SALK_021316(DRM1_LP)	GAGCCGTCTCATCAAAGTAC		
SALK_021316(DRM1_RP)	TTGCAGGAGCAAATATGGAAC		
AT5G14620-31 (from kato, drm2-2)	ATCCTCTCATCCTCGCACGTAC		
AT5G14620-51 (from kato, drm2-2)	TTTTGACTTGACAGGTAGTGCTC		
LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC		
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG		
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		
HsfA2_qPCR_F	TGGGATTCTCATAAGTTCTCAACA		qPCR, ChIP-qPCR
HsfA2_qPCR_R	TGGATCAATCTTTCTGAATCCAT		
HSP90.1-qPCR-F	CAACAAAGAAATCTTCTCCGTGAG		
HSP90.1-qPCR-R	CATCGAGCTTGCTCTTATCCGTTA		
18Sr-FW	CGTCCCTGCCCTTTGTACAC		
18Sr-RV	CGAACACTTCACCGGATCATT		
PP2AA3 Rf	GACCAAGTGAACCAGGTTATTGG		
PP2AA3 Rr	TACTCTCCAGTGCCTGTCTTCA		
DRM2_F	TTTTGAAGGACTTTTGGGAGC		
DRM2_R	ACCCTTCGATTGTGTCATTAGT		
CMT2_F	TATTCTGCGTATGGACAAAGGT		
CMT2_R	CTGGATCGAAATTGGGAAAG		
CMT3_F	GCATAGCTTCTCCACTCCT		
CMT3_R	AAATGGGCTGTTGACATGA		
ROMANIA5_F_ZP2582	TTGTCACTTGAACGAATGTATTGCACC		
ROMANIA5_R_ZP2583	GCCAACAAGAATATATGAAGATAATGC		
COPIA37_F_ZP2584	AGCTTAACTACAGAAGGGAAGGA		
COPIA37_R_ZP2585	CTCTCCAATCTCTCATTTTCTCG		
COPIA78-4129F (ONSEN, ORF)	CCACAAGAGGAACCAACGAA		
COPIA78-4300R (ONSEN, ORF)	TTCGATCATGGAAGACCGG		
ONSEN5_F (flanking border)	TCAAGGATTAGATGAAGATACG		
ONSEN5_R (flanking border)	AAACCCTAACTGCAACGGAAAC		
ONSEN6_F (flanking border)	GCAAAGTAATAAAAGTTCTATTTC		
ONSEN6_R (flanking border)	ATATCGCACCCAGAGTTTCTAAG		
GAPDH_F	TCCATGACAACTTTGGTATCGTG		
GAPDH_R	GGAGCCAGTCTTGGATGAGAAAG		
TA3_F	TGGAATCTCAGGGTCAAGG		
TA3_R	CCTTCTGAGGTGAGGGACA		
AT4G00810_F_ZP1193	TGCATGATGGACCACGGTAG		
AT4G00810_R_ZP1194	GGAAGCCCAGATGAGAGTGT		
AT1G11265 BS F1	GGTTGAAGGGTYAAAGAGTAAATYATAAG	BS-seq	
AT3G61330 BS F2	TGGTATAAAGTGTGTATYTYTATAYG		
COPIA78 BS R2	ATTCTCACATCATCTARCTTCTCCTTT		
CMT2_ZP1899	GACGAGCTCCGACATGAGGAAGAGTCTGAAGG	CMT2 cloning	
CMT2_ZP1900	GACCCCGGTATGAGGAATGGTTTCTTGAAGCTG		