

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07339

研究課題名(和文) 植物はSAMSを介したエピジェネティック制御により、アルミニウム耐性となるか？

研究課題名(英文) Can plants be tolerant to Al stress by a SAMS dependent epigenetic gene-regulation?

研究代表者

江崎 文一 (EZAKI, BUNICHI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：まずシロイヌナズナでは、Alストレス下でエピジェネティックな遺伝子発現応答がゲノム全体で見られた。また、エピジェネティック発現機構関連遺伝子AvSAMS(メリケンカルカヤ由来S-adenosyl methionine synthase)やSuvh4(Histone H3 methyltransferase)の2つが、Alストレスでの「DNAとヒストンのメチル化状況の変動」に、強く関わることも明らかにした。さらに同様の制御機構は、Alストレス下のイネ(日本晴)でも「DNAのメチル化状況の変動」として確認され、広範囲の植物でのこの機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A genome-wide dynamic gene-response mechanism, epigenetic gene-regulation, was observed under aluminum (Al) stress in *Arabidopsis thaliana*. We furthermore confirmed that two general key-genes in epigenetic gene-regulation, AvSAMS1 (*Andropogon virginicus* S-adenosyl methionine synthase) and Suvh4 (Histone H3 methyltransferase), are actually related to the alteration of methylation status in both DNA and histone H3 protein under Al stress in this plant. Since an alteration of methylation status in DNA was also observed in rice genome (cultivar Nipponbare) under this stress, we strongly suggest an existence of similar epigenetic gene-regulation systems in various plants under Al stress.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：アルミニウムストレス エピジェネティック遺伝子発現応答 ストレス耐性機構 DNAメチル化 ヒストンメチル化 SAMS遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、これまでに酸性土壌特有の植物生育障害をもたらすアルミニウム (Al) ストレスで誘導される 5 遺伝子を見つけ、それらを高発現するシロイヌナズナ形質転換体を創生して Al 耐性になることを示した。さらにそれらが関与する耐性機構を明らかにしてきた。最近では Al 高耐性の有用野生植物としてメリケンカルカヤとススキを選抜し、それらが持つ耐性機構を詳細に解析するとともに、重金属毒性や酸化ストレスにも耐性であることを示した。現在、これらの耐性機構に関する遺伝子レベルでの解析を進めており、Al 誘導性や耐性遺伝子として其々 ABC transporter 遺伝子 (*AvABCG1*) と SAMS 遺伝子 (*AvSAMS1*) 等を単離した。Al ストレスで前者は根と地上部の両方で、後者は根でのみ誘導されることも明らかとなり、耐性との関わりの上で興味深い。

(2) SAMS (S-adenosyl methionine syntase) により合成される SAM はポリアミン合成やエチレン合成などの重要な中間産物である。植物ではこれらの合成系に用いられる SAM は全体の 10% 程度に過ぎず、残り 90% は染色体 DNA 等のメチル化に使われるという報告もある。これは遺伝子のエピジェネティック制御 (塩基配列の変更を伴わぬ後天的な修飾での発現制御) に必須な機能であり、ストレス下で SAM により多数の遺伝子の発現が総括的に制御される可能性があるが、SAM とストレス耐性についての解析はほとんど無い。

2. 研究の目的

地球環境の改善や食糧問題の解決のために、環境の劣悪化から生じた広大な問題土壌を農業面で有効利用することは重要である。それには金属ストレスや酸化ストレス等に耐性を示す植物を創生できるかが、鍵となる。そのためにこれらのストレスに耐性の植物は何か? その耐性機構は何か? 高い耐性機構に関連する遺伝子群はどれか? 等を順序立てて解明していく必要がある。本研究では上記の多種のストレスに耐性を示すメリケンカルカヤに着目してその有用な耐性機構とそれに関連する遺伝子を解析し、耐性植物を構築することを目的としている。今回は特にこの植物由来の *AvABCG1* 遺伝子と *AvSAMS1* 遺伝子に焦点を当てて検討することにした。

3. 研究の方法

(1) 植物材料と生育条件

本研究では、*Arabidopsis thaliana* (和名シロイヌナズナ) の Col-0 株、及び *Andropogon virginicu* (和名メリケンカルカヤ) 由来の *AvSAMS1* 遺伝子 (cDNA) の発現株を用いた。さらにこれらの植物は 25 °C で明期 16 時間、暗期 8 時間の照明条件下で土耕栽培または水耕栽培された。なお水耕栽培にはシロイヌナズナの場合、

Murashige-Skoog 培地を 6 倍希釈し、pH を 5.7 に調整して用いた。またイネの場合は、0.5 mM CaCl₂ 溶液 (pH 5.7) を用いた。

(2) ストレスの処理方法

マイクロアレイ実験のための Al ストレス負荷では、培養土から根を痛めないように静かに分離した土耕栽培の植物体 (発芽後約 3 週目) を用いた。これらの根を十分量のストレス負荷用培養液 (前述の水耕用培地と同じ組成で pH 4.2 に調整) に 6 時間、浸漬した。処理した植物体は total RNA 抽出に用いるまで、- 80 °C で保存した。

またストレス感受性試験を行う場合は、発芽後 10 ~ 14 日後の水耕栽培の植物体を其々のストレスサーを含む培養液中に 2 日間根を浸漬した後、根長を測定した。ストレスの負荷条件は 300 μM AlCl₃ である。感受性は未処理区の植物体の根長と比較して、相対的根伸長度 (%) として表した。

(3) マイクロアレイ解析

Total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出した。得られた RNA の純度は Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) で確認後、Cy3 または Cy5 で標識し (cRNA 標識) DNA マイクロアレイスキャナ G2565CA #003 (Agilent Technologies 社製) で解析した。なお今回はシロイヌナズナのマイクロアレイ (Agilent Technologies 社製) を用いた。

(4) バイサルファイト処理と CG 配列を多数含む遺伝子 DNA 断片の調製

2 日間の 300 μM AlCl₃ 処理 (または未処理) した植物体からゲノム DNA を抽出後、2 μg 相当量を用い、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Takara 社製) でバイサルファイト処理を行い、未メチル化状態の C を T へ変換処理した。処理した DNA は、メチル化 DNA 用の遺伝子特異的な PCR プライマーを用いて PCR 反応により増幅した。なおプライマーの設計には Methyl Primer Express Software v1.0 (free soft supplied by Applied Biosystem) を用いた。PCR 増幅した DNA 断片はアガロースゲル電気泳動で分離し、回収精製後、配列の決定に供した。

(5) DNA 配列決定とメチル化状況の解析

塩基配列決定は外部委託で行った (Operon DNA シーケンス受託サービス)。オリジナルの配列における C の塩基部分に注目し、その塩基部分の波形がどのようにバイサルファイト処理で変化したかを 1 塩基ずつ目視で解析した。各 C についてメチル体 (CM) かフリー体 (CF) か、さらにはこれらの混合物か、その大まかな割合によって以下の 5 つにさらに細分類した (CM, 100% メチル体; M>F, メチル体の方が多く; M=F, メチル体とフリー体がほぼ同等; M<F, フリー体の方が多く;)

CF, 100%フリー体)。

(6) ヒストン蛋白のメチル化状況の確認
今回はChIP法とRT-PCR法を併用することで、間接的なヒストン蛋白質のメチル化状況の確認を行った。まず抗メチル化ヒストン抗体を用いた免疫沈降処理(CHIP法)で、メチル化ヒストンH3を特異的に回収した。さらにそれらと特異的に結合するDNA量をRT-PCR法で定量することで、AIストレスの有無によるヒストンH3のメチル化の状況を間接的に比較した

4. 研究成果

(1) AI処理下でのエピジェネティック発現制御機構の存在確認

AvSAMS1 遺伝子発現シロイヌナズナ形質転換株と非形質転換株(Col-0)を用い、AI処理下でのSAMSを介したエピジェネティックな発現制御の有無をマイクロアレイ(スキャナープロット解析)で確認した。その結果、前者ではCol-0株に比べ、AI処理で強く発現誘導または抑制される遺伝子数がともに2倍前後に増加した。これらの結果は*AvSAMS1*がゲノムDNAのメチル化を高め(またはメチル化の状態に変化を与え)、エピジェネティック制御に関与することを示唆した。

(2) *AvSAMS1* 遺伝子高発現株を用いた AI ストレス下での DNA メチル化レベルの変化

前記のマイクロアレイの結果で、AIストレス条件下でCol-0株より*AvSAMS1*発現株の方で特異的に発現量が大きく変化する(誘導型、抑制型)遺伝子群を各々6個、2個選び出した。これらの遺伝子では特にプロモーター領域やN末端領域においてC位がメチル化されてエピジェネティックな制御を受ける可能性が高いと考えられた。そこでAI処理した形質転換株より、ゲノムDNAを抽出し、AIストレスによってDNAのメチル化状況がどのように変化するのか、バイサルファイト処理後のDNA塩基配列で検討した。また同様の解析をCol-0株でも行った(Fig. 3)。その結果、同じDNA領域でも*AvSAMS1*発現形質転換株とCol-0株の間でC位毎に波形の違いとして大きな差異を検出することができた。このことはバイサルファイト処理後のDNAの塩基配列決定がDNAのメチル化状態の微細な違いを検討するのに大変有効な手段であることを示している。そこでこの方法を用いてAI処理または未処理のCol-0、*AvSAMS1*両株由来の上記の8個の遺伝子について部分塩基配列を決定した。さらにその中に存在するCG、CHG、CHHにおけるC位のメチル化の状況をAI処理下または未処理下で比較解析し、5つのカテゴリーに分類した(Fig. 4; 結果の一部を提示)。その結果、AI処理によって両シロイヌナズナでは誘導型、抑制型のどれでもDNAのメチル化と脱メチル化が起こることが

明らかとなった。これらは、AIストレス下ではDNAのメチル化修飾に変化が起ることを示している。このような遺伝子発現の制御機構の存在はAIでは初めて報告である。ところで当初、6個の抑制型遺伝子では、*AvSAMS1*発現株の方がAI処理でDNAのメチル化が高頻度には起こるのではないかと予想したが、この予想に反するものもあった(Fig. 4 At4g12330 遺伝子や At5g26280 遺伝子など)。メチル化と脱メチル化の部位の総数やこれらの修飾の密度等が遺伝子の発現制御には重要な意味を持つのかもかもしれない。

(3) *AvSAMS1* 高発現株を用いた AI ストレス下でのヒストン蛋白のメチル化状況の解析

ChIP法とRT-PCR法を併用で、間接的なヒストン蛋白質のメチル化状況の確認を約40遺伝子のプロモーター領域を指標に個別に定量解析した。その結果、ヒストンH3の4番目または9番目のリジンのそれぞれメチル化(H3K4me3, H3K9me3)の状況についてもAIストレス下で2つの株とも変化が見られ、しかもその変動量には2株間で差があった。これらのことから、*AvSAMS1*遺伝子の高発現で促進されるようなエピジェネティック制御がAIストレスに存在することが強く示唆された。

さらにヒストンH3のメチル化体に対する4つの異なる抗体を用いて、Col-0株と*AvSAMS1*発現株から抽出したヒストン蛋白質画分のウエスタンブロットングを行い、AIストレス下で、ヒストンH3のメチル化の状況に変動が起こること、更にその変動には2つの株の間で違いが見られることを確認した。このことは、個々の遺伝子の発現レベルだけでなく、ゲノム構造全体においてもヒストンH3のメチル化状況に変動が有ること、さらにその変動に*AvSAMS1*遺伝子が関与することを示唆する。

(4) AI ストレス下での *Suvh4* 遺伝子とエピジェネティック発現制御との関わり

AvSAMS1 以外の遺伝子群の関わりについて、エピジェネティック発現制御に強く関連すると言われる5つの遺伝子 *Met1*, *Suvh4*, *Atx1*, *Atx2*, *Cmt3* について解析を進めた。まず其々の欠損変異株を用いてAI感受性試験を行ったところ、前者2つの遺伝子は、若干ではあるが、AI感受性に関与していることが分かった。そこでシロイヌナズナのCol-0株、*Met1*変異株、*Suvh4*変異株についてマイクロアレイ法で解析した。その結果、*Suvh4*変異株では野生型株(Col-0)に比べて、AIストレスにより多くの遺伝子に発現変動が起きることを見出した。一方、*Met1*変異株ではこの様な大きな変動は見られなかった。さらに*Suvh4*遺伝子変異株と野生型株では、DNAのメチル化状況の変動に違いが見られた。これらのことは、この遺伝子がAIストレス下でのエピジェネティック発現制御に強く関わってい

ることを示唆している。

(5) イネにおける Al ストレスとエピジェネティック発現制御との関わり

シロイヌナズナで見られた Al ストレス下でのエピジェネティック発現制御は、他の植物でも見られるのであろうか？最終年度ではこの点に焦点を合わせて解析した。単子葉植物のイネ(日本晴れ)を材料にして、Al 処理と未処理の植物体より、total RNA を抽出し、マイクロアレイを2度行った。再現性良く Al 誘導性、又は Al 抑制性を示す遺伝子群を選抜し(各 20 遺伝子ずつ)、それらの遺伝子のプロモーター部位を中心とする領域について、Al 処理区と未処理区の植物体間で、DNA のメチル化の変動の有無やその変動の状況を比較した。今回もバイサルファイト処理後の DNA 塩基配列を1塩基ずつ目視で解析した。その結果、Al 誘導性、又は Al 抑制性を示す遺伝子群の多くで DNA のメチル化状況に変動が見られた。一般に DNA のメチル化は、ストレス抑制型遺伝子で見られると言われるが、今回は抑制型のみならず、誘導型の多くの遺伝子にも見られた点は興味深い。今回は極一部の領域のメチル化状況を解析した結果なので、遺伝子の発現型との関連性を考える場合は遺伝子全体のメチル化状況を検討することが必要なのかもしれない。

いずれにせよ、今回の結果からシロイヌナズナのような双子葉植物でもイネのような単子葉植物でも Al ストレス下では、エピジェネティック発現制御機構が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Ezaki, B., Higashi, A., Nanba, N., Nishiuchi, T., 2016. An S-adenosyl Methionine Synthetase (SAMS) Gene from *Andropogon virginicus* L. Confers Aluminum Stress Tolerance and Facilitates Epigenetic Gene Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 7:1627. doi: 10.3389/fpls.2016.01627 査読有り

(2) Ezaki, B., Takahashi, K., Utsumi, K. and Higashi, A. 2015. A half-type AvABCG1 transporter derived from *Andropogon virginicus* L. confers aluminum tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 118: 21-31. 査読有り

(3) Aggarwal, A., Ezaki, B. and Tripathi, B. N. 2015. Two detoxification mechanisms by external malate detoxification and anti-peroxidation enzymes cooperatively confer aluminum tolerance in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ. Exp. Bot.* 120 43-54. 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Ezaki, B., A., Nanba, N., Nishiuchi T. Aluminum stress leads an epigenetic gene-regulation in *Arabidopsis* -Biological functions of

the *AvSAMS1* gene and *Suvh4* gene-. *Plant Biology* 2017, Hawaii, USA, June 24-27, 2017

(2) 江崎文一、南葉典恵、西内巧 S-アデノシルメチオニン合成酵素 (SAMS) 遺伝子による Al ストレス耐性の付与とエピジェネティックな発現制御の促進について 日本植物生理学会年会, 鹿児島, 3月16~18日, 2017.

(3) 江崎文一、南葉典恵 Al ストレス下でのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構についての解析 日本土壌肥料学会年会, 佐賀, 9月19-22日, 2016.

(4) Ezaki, B., Higashi, A., Nanba, N., Nishiuchi T. An S-adenosyl methionine synthetase (SAMS) gene from *Andropogon virginicus* L. facilitates epigenetic gene regulation under aluminum (Al) stress in *Arabidopsis thaliana*. The 27th International Conference on Arabidopsis Research, Gyeong Ju, Korea, June 29-July, 3, 2016.

(5) 江崎文一、南葉典恵、内海かおり. Al ストレス下での *AvSAMS1* 遺伝子によるエピジェネティックな遺伝子発現制御について. 日本土壌肥料学会年会. 9月9~11日, 2015年. 京都.

(6) Bunichi Ezaki, Kaori Utsumi, Mari Inada, Norie Nanba. Characterization of epigenetic gene-regulation through the *AvSAMS1* gene derived from a poaceae wild plant *Andropogon virginicus* L. in Al tolerance. International Conference of Arabidopsis Research (ICAR) 2015. 5th July ~ 9th July, 2015. Paris, France

(7) Bunichi Ezaki, Kaori Utsumi, Mari Inada, Norie Nanba. *AvSAMS1* gene of *Andropogon virginicus* L. is related to an epigenetic gene-regulation under Al stress and confers Al tolerance. VISCEAIII Austropa Interconvention (Plant Abiotic Stress Tolerance III). 29th June ~ 1st July, 2015, Vienna, Austria

〔図書〕(計 1 件)

(1) Aggarwal, A., Ezaki, B., Munjal, A. and Tripathi, B. N. 2015. "Physiology and Biochemistry of Aluminum Toxicity and Tolerance in Crops" in "Stress Responses in Plants" (書名). p35-58. Springer, ISBN 978-3-319-13367-6 ISBN 978-3-319-13368-3 (eBook) DOI 10.1007/978-3-319-13368-3.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/research/pgm-hp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 文一 (EZAKI BUNICHI)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：90243500

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし