

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H03947

研究課題名(和文) イネ冷害におけるエピジェネティックな制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of epigenetic control in low-temperature injury of rice plants

研究代表者

東谷 篤志 (Higashitani, Atsushi)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40212162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネの幼穂と出穂期の葯においては、多数の遺伝子のヒストンH3修飾が大きく変化し、花粉特異的な遺伝子発現に関わるエピジェネティックな制御が存在することを明らかにした。また、このエピジェネティック修飾は冷害が発生する19℃の低温により低下すること、それは低温感受性の品種においてより顕著であることが示された。これまで低温により、葯壁タペート細胞の肥大や葯特異的なジベレリン活性化酵素遺伝子はじめ多くの遺伝子群の発現に変調を来すことが知られていたが、今回の発見は、それらの上位にエピジェネティックな修飾が低温により不調となることがイネ冷害の原因であることを強く示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ低温障害(冷害)は穂ばらみ期の低温により花粉形成が不全となり、著しく収量が低下する雄性不稔現象である。低温による葯壁タペート細胞の肥大が主な原因として知られ、また近年私たちは、このタペート細胞崩壊を制御する葯特異的ジベレリン活性化酵素遺伝子の発現が低温により抑制されることを見出してきた。しかし、その他の葯特異的遺伝子群の発現も変調を来すことから、より上流の制御に要因があると考えられていた。今回、新たにイネ花粉形成におけるエピジェネティック制御機構の存在を明らかにし、それが低温により不調となることを世界に先駆けて明らかにし、イネ冷害の発生メカニズムの根本要因に一步近づけたものと評価している。

研究成果の概要(英文)：The histone H3 modifications of a number of genes were significantly altered in anthers' development in rice plants, indicating the presence of epigenetic regulation of pollen-specific gene expression. The epigenetic modifications were also shown to be suppressed by low temperatures (19°C), which is more pronounced in cold-sensitive cultivars. Low temperatures are known to cause abnormal enlargement of anther wall tapetum cells and altered expression of many genes, including the anther-specific gibberellin activating enzyme gene. The present findings strongly suggest that the low temperature-induced malfunction of these higher epigenetic modifications is an upstream cause of low-temperature injury in rice plants.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：イネ低温障害 エピジェネティック制御 温度ストレス 生殖成長 穂ばらみ期耐冷性 水温

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネの低温障害(冷害)は穂ばらみ期における低温により花粉形成が不全となり、著しく収量が低下する雄性不稔現象である。東北地方の太平洋側において、「やませ」による冷害は、イネの大幅な収量低下につながり、江戸時代における享保・天明・天保の3大飢饉、近年で平成5年の冷害時において収穫量が大幅に不足し、タイ米などを緊急輸入したことは記憶に新しい。昭和初期から半世紀を越える長い期間にわたり、冷害の要因とその克服に向けた研究がなされてきた。その結果、低温により葯壁タペト細胞の肥大が生じることが主な原因であること、また近年、私たちは、このタペト細胞の崩壊を制御する葯特異的なジベレリンの活性化酵素遺伝子の発現が低温により抑制されることを見出してきた(参考論文1)。しかしながら、その他の葯特異的な遺伝子群の発現も変調を来すことから、より上流の制御に要因があることが示唆されていた。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究ではイネの花粉形成における葯特異的なエピゲノム変化が存在し、それらが低温により不調となること、その結果、葯特異的な遺伝子発現に影響が生じるという作業仮説を構築し、その仮説を検証することを研究目的とした。

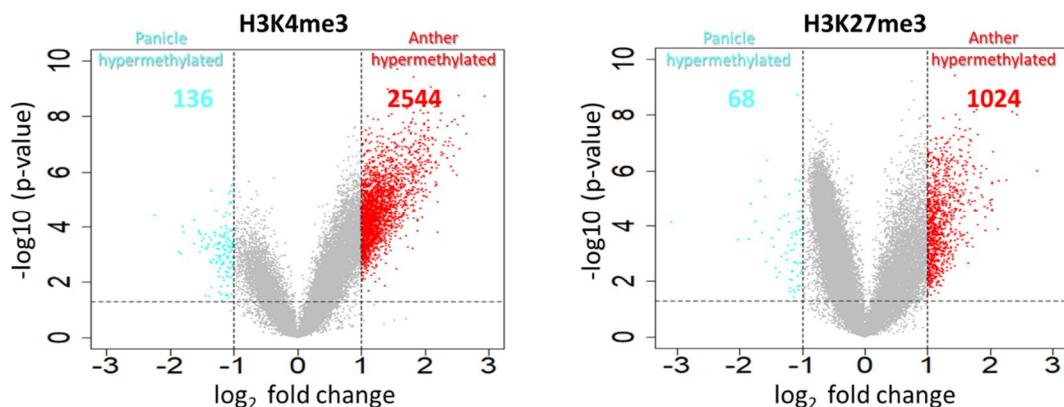
### 3. 研究の方法

古川農業試験場(宮城県大崎市古川)との共同により、2019年から2022年の4年間、冷水かけ流し圃場(水温19℃)と常温圃場にて、耐冷性の極端な品種「ひとめぼれ」、および耐冷性の弱い品種「ササニシキ」の栽培を行った。それぞれから幼穂(長さが5mm~10mmであるもの)、および穂ばらみ期の葯(発達ステージが花粉1細胞期、花粉2細胞期であるもの)を回収し、ドライアイスを用いて素早く凍結させた。凍結サンプルは解析まで-80℃にて保存した。

幼穂(約800mg)、葯(約500mg)からクロマチン画分を抽出し、ヒストンH3のN末端側のリジン4トリメチル化(H3K4me3)またはヒストンH3のリジン27トリメチル化(H3K27me3)に対する抗体を用い、Chromatin Immunoprecipitation sequencing法(ChIP-seq)による解析を行った。また、幼穂と葯からそれぞれRNAを抽出し、RNAシーケンス(RNA-seq)解析を行った。

### 4. 研究成果

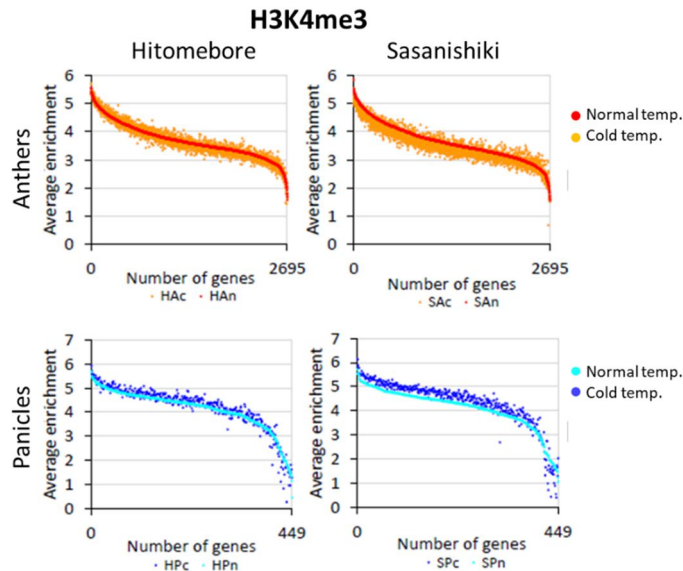
東北大学の研究チームでは、研究分担者の京都大学と共に、イネの幼穂と出穂期の葯におけるH3K4me3とH3K27me3修飾について、「ひとめぼれ」ならびに「ササニシキ」を用いて全染色体レベルで解析を行った。H3K4me3は転写活性化においてよく観察される染色体エピゲノム修飾で、一方、H3K27me3は条件的ヘテロクロマチンを基盤とする染色体不活性化エピゲノム修飾、すなわち発生時期依存的な不活性化に関わることが知られている。ChIP-seqにより、H3K4me3修飾が幼穂で優位な136遺伝子群、葯で優位な2544遺伝子群、H3K27me3修飾が幼穂で優位な68遺伝子群、葯で優位な1024遺伝子群を同定することに成功した(図1)。



(図1) 常温で生育させたイネ幼穂ならびに穂ばらみ期葯におけるヒストン H3K4 ならびに K27 トリメチル化修飾が、それぞれで亢進した遺伝子群

なかでも、H3K4me3 の Hypermethyl 化された 2544 遺伝子には、農水生研機構が公開した RiceXpro イネ発現データベース (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) にみられる薬特異的な発現遺伝子群が多く含まれていた。すなわち、幼穂から薬へ発生分化する過程で、染色体レベルでの大規模なエピゲノム変化が組織特異的な遺伝子発現の制御に関わっていることが明らかになった。さらに、この 2544 遺伝子に加えて低温処理した薬で H3K4me3 が誘導された全 2695 遺伝子ついて、低温耐性が極強の「ひとめぼれ」と弱の「ササニシキ」での比較解析を行った。低温 19 かけ流し圃場（宮城県古川農業試験場）において、「ササニシキ」においてより優位に、薬における H3K4me3 のエピジェネティックな修飾が抑制されることを見出した（図 2）。

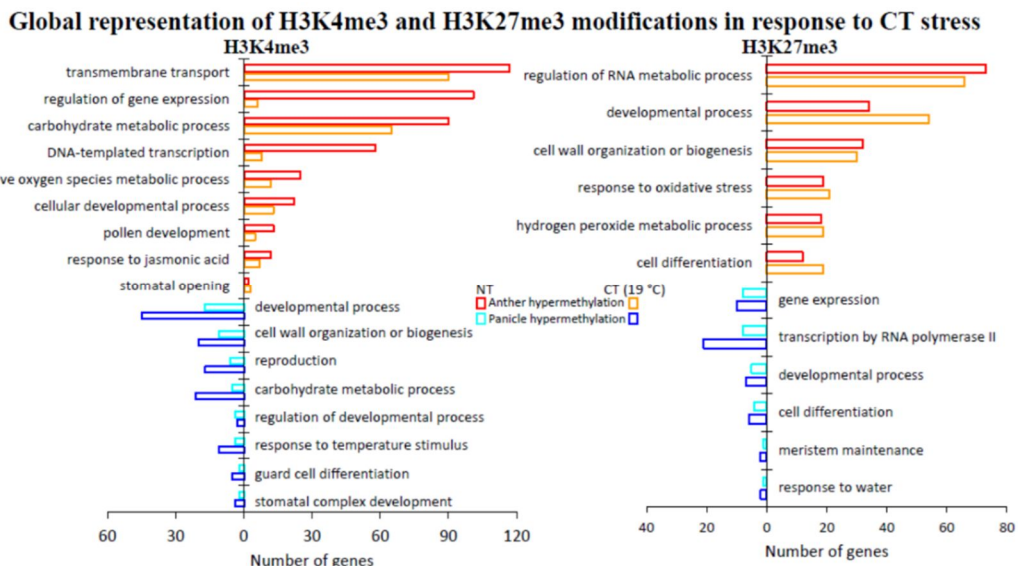
さらに、幼穂において H3K4me3 が優位にみられた 136 遺伝子に加えて低温処理した幼穂で H3K4me3 が誘導された全 449 遺伝子については、興味深いことに、「ササニシキ」において、低温により、優位に、幼穂での修飾が増強されることが明らかになり、幼穂期における染色体のエピゲノム状況がより強く継続されることが示唆された（図 2）。



(図 2) H3K4me3 修飾の常温ならびに低温処理における系統間差

一方、H3K27me3 のエピジェネティックな修飾は、薬において優位な 1024 遺伝子の低温による変化はいずれの系統においても有為な変動傾向は観察されず、幼穂において優位な 68 遺伝子の低温による変化は、「ひとめぼれ」において低温により上下変動がより大きく生じていたが、「ササニシキ」との統計的有意差はみとめられなかった。

また、図 3 では、幼穂ならびに薬で優位な H3K4me3 化された遺伝子群の GO 解析結果、ならびに H3K27me3 化された遺伝子群の GO 解析結果をそれぞれ示した。



(図 3) H3K4me3 ならびに H3K27me3 修飾の常温ならびに低温処理にみられる遺伝子群の GO 解析

以上の結果から、低温耐性が弱い品種「ササニシキ」においては、低温により、幼穂から葯への発生分化に伴う特に H3K4me3 のエピゲノム修飾が、幼穂期では亢進し、葯では低下・抑制されることが明らかになった。

さらに、エピジェネティックな修飾が低温により攪乱された遺伝子群のなかで網羅的な transcriptome 解析から、「ササニシキ」で遺伝子発現が低温により変調を来す複数の鍵遺伝子（花粉形成特異的な転写制御因子など）を見出すことに成功した。

また、上述の研究を進めるなかで、ササニシキとひとめぼれのゲノム遺伝子間でササニシキにおいて特異的な欠失領域（*Pi54* 病害抵抗性遺伝子を含む）を見出した。これら欠失の起源を明らかにし、本研究から派生した研究成果として発表を行った（参考論文 2：本成果）。

また、研究分担者の岩手大学農学部の研究チームでは、京都大学の研究チームとともに、栄養成長期の高温処理がその後の穂ばらみ期の冷害処理に及ぼす影響を RNA seq ならびに ChIP-seq 解析により調べた。いずれの実験からも、それぞれユニークな遺伝子発現の変動とヒストン H3 のエピジェネティックな修飾の変化を捉えることができた。また、多窒素施用で穂ばらみ期耐冷性が低下することを見出し、この現象にもエピジェネティックな制御機構が関与すると考えられた。

また施肥窒素の効果には品種間差異があることが考えられたため、世界ならびに日本のイネ 450 品種の施肥に対する応答性に関して、生殖器官の形態に及ぼす影響からその品種間差を評価した。その結果、多窒素施用により葯長の短縮程度が大きい品種「ササニシキ」と短縮しにくい「蒙古稲」を候補品種として選定することに成功した。

さらに、イネ穂ばらみ期耐冷性が多窒素施用で低下するエピジェネティック機構の解明として、(1)多窒素によるシンクサイズとしての籾数の増加による 1 籾あたりの資源競合の影響に加えて、同一のシンクサイズでもその効果が持続することから質的な効果もあることを明らかにした。(2)多窒素施用による応答性に違いのある品種「ひとめぼれ」と「蒙古稲」の組み換え近交系を用いた QTL 解析の結果、少肥条件では第 1、9 染色体上に、多肥条件では第 7 染色体と窒素条件による異なる領域に QTL を検出すること、「ひとめぼれ」と「ササニシキ」の組み換え近交系を用いた QTL 解析の結果、同様に、少肥条件で第 7、8、11 染色体に、多肥条件で窒素条件による異なる領域に QTL を第 7、11 染色体検出することができ、第 8 染色体の領域が窒素応答性の候補となることを明らかにした。

#### <参考文献>

1. Sakata T, Oda S, Tsunaga Y, Shomura H, Kawagishi-Kobayashi M, Aya K, Saeki K, Endo T, Nagano K, Kojima M, Sakakibara H, Watanabe M, Matsuoka M, Higashitani A. Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice. *Plant Physiol.* 2014 Apr;164(4):2011-9. doi: 10.1104/pp.113.234401.
2. Zhang L, Nakagomi Y, Endo T, Teranishi M, Hidema J, Sato S, Higashitani A. Divergent evolution of rice blast resistance *Pi54* locus in the genus *Oryza*. *Rice* (N Y) 2018 Dec 5;11(1):63. doi: 10.1186/s12284-018-0256-8.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 東谷篤志、畠山隆平、寺西美佳、村中智明、濱野郁哉、下野裕之、工藤洋	4. 巻 4
2. 論文標題 イネ冷害におけるエピゲノム変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 576-580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Lin, Nakagomi Yusuke, Endo Takashi, Teranishi Mika, Hidema Jun, Sato Shusei, Higashitani Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Divergent evolution of rice blast resistance Pi54 locus in the genus <i>Oryza</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12284-018-0256-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maria Isabel Fuentes-Merlos, Masaru Bamba, Shusei Sato, Atsushi Higashitani	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparative transcriptome analysis of grafted tomato with drought tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11151947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keriman Sekerci, Nahoko Higashitani, Rengin Ozgur, Baris Uzilday, Atsushi Higashitani, Ismail Turkan	4. 巻 175
2. 論文標題 A stratagem for primary root elongation under moderate salt stress in the halophyte <i>Schrenkiella parvula</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 e13937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ppl.13937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Gonul Dundar, Zhenhua Shao, Nahoko Higashitani, Mami Kikuta, Masanori Izumi, Atsushi Higashitani	4. 巻 456
2. 論文標題 Autophagy mitigates high-temperature injury in pollen development of Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 190-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.08.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤玲央、菅原夏美、松波麻耶、下野裕之
2. 発表標題 多窒素施用によるイネ穂ばらみ期耐冷性の低下における品種間差
3. 学会等名 日本作物学会第255回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤玲央、阿部陽、松波麻耶、下野裕之
2. 発表標題 イネ葯長の施肥窒素への応答性 - 「ササニシキ」と「ひとめぼれ」の組み換え近交系を用いて
3. 学会等名 日本作物学会第253回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山隆平、村中智明、西尾治幾、本庄三恵、石森裕貴、遠藤貴司、寺西美佳、工藤洋、東谷篤志
2. 発表標題 イネ冷害におけるエピジェネティックな変化の影響
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張琳、寺西美佳、佐藤修正、中込祐介、遠藤貴司、日出間純、東谷篤志
2. 発表標題 イネいもち病抵抗性遺伝子Pi54の起源とジャポニカイネにみられる消失
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張琳、中込祐介、遠藤貴司、寺西美佳、日出間純、佐藤修正、東谷篤志
2. 発表標題 いもち病抵抗性遺伝子Pi54座のイネ属における分子進化
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maria Isabel Fuentes Merlos, Makoto Endo, Shusei Sato, Atsushi Higashitani
2. 発表標題 Effect of Grafting on Drought Tolerance in Solanum lycopersicum
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱野郁哉、塩井健一朗、下野裕之
2. 発表標題 イネ穂ばらみ期耐冷性のエピジェネティックな制御を評価する手法の検討
3. 学会等名 第247回日本作物学会 2018年度全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱野郁哉、宮本海、塩井健一朗、高橋克幸、高木浩一、颯田尚哉、下野裕之
2. 発表標題 異なる生育時期における高電圧パルスがイネの生産性に及ぼす影響
3. 学会等名 第246回日本作物学会 2018年度全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimono H
2. 発表標題 Strategies for improving crop productivity under a changing climate: A case study in Japan.
3. 学会等名 Korean Crop Science Society, Cooperation for improving North Korea food productivity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤洋
2. 発表標題 フィールド・トランスクリプトミクス/エピゲノミクス：分子フェノロジーにみる植物の長期環境応答
3. 学会等名 第50回種生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤洋
2. 発表標題 抑制型ヒストン修飾 H3K27me3におけるエピジェネティックランドスケープの季節変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 工藤洋
2. 発表標題 Field epigenetics: seasonal analyses of histone modifications in a natural plant population.
3. 学会等名 4th East Asia Agricultural Genome Scientists Forum. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺西 美佳  (Teranishi Mika)  (10333832)	東北大学・生命科学研究科・助教   (11301)	
研究分担者	下野 裕之  (Shimono Hiroyuki)  (70451490)	岩手大学・農学部・教授   (11201)	
研究分担者	工藤 洋  (Kudo Hiroshi)  (10291569)	京都大学・生態学研究センター・教授   (14301)	削除：2021年12月24日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
トルコ	Ege University		