

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K05644
研究課題名（和文）エピジェネティック変異を利用した耐病性イネの開発と社会実装に向けた実用性の検証

研究課題名（英文）Development of disease-resistant rice plants using epigenetic mutations and verification of their practical use

研究代表者
小林 一成（Kobayashi, Issei）
三重大学・地域イノベーション推進機構・教授

研究者番号：90205451
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、病害抵抗性誘導剤で処理したカルスから植物を再生させることにより、イネのエピジェネティック変異を方向付ける方法を開発した。本研究では、この方法によって付与された抵抗性がエピジェネティック変異に起因することを証明するとともに、その遺伝的な安定性と実用性を実証することを目的に実験を行った。日本晴および各系統のメチル化状態を解析した結果、抵抗性獲得系統は特有のメチル化変化を獲得していることが明らかになった。この結果をRNA-seqの結果と比較したところ、プロモーター領域のメチル化と遺伝子の発現が相関する3つの遺伝子が特定された。以上の成果を根拠として、本法による植物作出方法を国際特許出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
世界の人口増加と新興国における畜産物の需要拡大は食料事情の逼迫を招き、2050年までに食料生産を倍増させる必要があるとされている。一方、地球環境の急激な変化は、生物的・非生物的ストレスを作物に与え、食料生産の重大な脅威となっている。したがって、将来の食料確保にはストレス耐性植物の開発が急務であると言える。しかし、現行の交配育種はゲノムDNAにランダムに生じる突然変異に依存するため、長い開発期間と莫大なコストを要する。我々の発見は、エピジェネティック変異を利用して目的とするストレス耐性形質に標的を狙って改善することが可能な世界初の技術に発展する可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method for orienting epigenetic variation in rice by regenerated plants from callus treated with a plant activator. In this study, we conducted experiments to prove that the resistance conferred by this method is due to epigenetic mutation and to demonstrate its genetic stability and practicality. Analysis of the methylation status of Nipponbare and each line revealed that the resistant lines acquired specific DNA methylation changes. By comparing these results with RNA-seq results, we identified three genes whose expression changes correlated with DNA methylation changes in promoter regions. Based on these results, we have applied for an international patent for the method of plant production using this method.

研究分野：植物保護科学

キーワード：病害抵抗性 イネ エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA の塩基配列変化を伴わず、DNA やクロマチンの化学修飾を通じた遺伝形質制御の実態が次第に明らかになりつつあり、このような研究領域は「エピジェネティクス」として急速に発展してきた。病原菌からの攻撃や様々なストレスにさらされた植物では、エピジェネティック記憶の仕組みによって耐病性のプライミングやストレス順化が誘導されることが明らかになっている [Luna et al.(2012), Lämke et al.(2016)] しかしながら、病害ストレスや環境ストレスによって獲得された性質は、後代の植物に遺伝しないと考えられており(それは「順化」であり「適応」ではない) エピジェネティクスを利用した耐病性植物の作出法は未だ確立されていない。一方、最近の我々の研究により、イネのカルスに適切な条件で抵抗性誘導剤を処理すると、再生させたイネ植物体はいもち病抵抗性を獲得することが明らかになった。驚くべきことに、これらの個体には、いもち病抵抗性が少なくとも 2 世代にわたって維持され、これまでの常識とは異なる性質を示した。

エピジェネティクスによる遺伝子制御の重要な仕組みの 1 つは DNA のシトシンメチル化であり、一般に遺伝子のプロモーター領域のメチル化は遺伝子発現を抑制する。植物では、遺伝的変異を引き起こす DNA のメチル化状態変化が後代に伝わることもあり、これらはエピジェネティック変異と呼ばれる [Kalisz and Purugganan (2004)] 最近の研究から、シロイヌナズナでは、病原菌接種やサリチル酸処理により、ゲノム DNA のメチル化状態が大規模に変化することが明らかにされている [Yu et al.(2013)] 我々が開発した方法によって作出されたいもち病抵抗性獲得イネ個体には、野生型と比べてゲノムに特徴的なメチル化レベルの変化が認められたことから、抵抗性獲得に DNA メチル化が関与する可能性が強く示唆された。

さらに、抵抗性誘導剤を処理したカルスおよびいもち病抵抗性を獲得した後代個体において、薬剤処理や病原菌接種をしなくても発現上昇が認められ、生物的・非生物的ストレス応答に関与する遺伝子が顕著に多く含まれていた。これらの結果は、作出されたいもち病抵抗性イネには、抵抗性誘導剤処理しなくてもプライミング状態が維持されることを強く示唆している。

以上のような最近の我々の研究成果を背景として、本研究の核心をなす学術的な問いは、(1) 本法で作出されたいもち病抵抗性はエピジェネティック変異に起因するか、(2) エピジェネティック変異した遺伝子のうちプライミングに決定的な役割を果たす遺伝子は何か、(3) 作出されたいもち病抵抗性イネは実用的な抵抗性を示すか、の 3 点である。

2. 研究の目的

本研究は、本法によって付与された耐病性のメカニズムがエピジェネティック変異に依拠することを証明するとともに、その遺伝的な安定性と実用性の実証を目的としている。

研究の背景でも述べた通り、近年エピジェネティクスに関する研究は急速に進歩しているが、外部からの刺激によって誘導されたエピジェネティック変異が世代を超えて安定的に遺伝する「適応性の獲得」に関して、植物においては実験レベルでの観察があるのみである。エピジェネティック変異を人為的に方向付け、作物に実用的かつ安定的な表現型を付与する方法の確立はこれまで例がなく、我々の研究は独自性の高いものであると言える。したがって、エピジェネティック変異の人為的方向付けの証明は、学術的な価値が極めて高いのみならず、エピジェネティック変異を利用した育種技術の開発につながる可能性が高い。

そこで本研究では、この方法によって付与された耐病性がエピジェネティック変異に起因することを証明し、その遺伝的な安定性と実用性を実証することを目的に実験を行った。

3. 研究の方法

本研究では、以上のような事実および我々のこれまでの実験結果を踏まえ、我々の見出した「エピジェネティック変異の方向付け」によって作出されたいもち病抵抗性獲得イネについて、各世代の個体における全ゲノムのメチル化状態、クロマチン修飾および全遺伝子の発現変化を調べた。各個体・各世代に共通した変化を捕捉することにより、獲得された抵抗性がエピジェネティック変異の人為的誘導に起因する確実な証拠を得るとともに、エピジェネティック変異の方向付けがどの時期に起こるか、実用的な抵抗性レベルにあるかを明らかにすることとした。

(1) 再生個体の全遺伝子発現解析およびエピジェネティック変異と相関する発現変化の特定
次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により、各再生個体の全遺伝子の発現を検討し、いもち病抵抗性獲得と高い相関を示す遺伝子発現変化の特定を試みた。

(2) 耐病性獲得イネ個体における全ゲノムメチル化状態の解析

バイサルファイト・次世代シーケンズ法 [Krueger et al.(2012)] により、各個体の全ゲノムメチル化状態変化を検討する。各世代および各個体に共通して認められるメチル化変化領域を特定するとともに、バイサルファイト・サンガーシーケンズ法 [Fraga and Esteller (2002)] によりそのメチル化変化を再確認した。

(3) イネカサの脱分化・再分化過程におけるエピジェネティック変異獲得時期の特定
 イネカサのエピジェネティック変異の方向付け処理過程各段階において、プロベナゾール (PBZ) 処理によって獲得される特異的なエピジェネティック変異の獲得時期を特定するため、カサ誘導培地上の 0、3、5、7 日目および再分化培地上の 5、10、15 日目における全ゲノム DNA メチル化状態をバイサルファイト・次世代シーケンス法を用いて調べた。

(4) イネ個体に獲得された病害抵抗性の実用性の検証
 室内試験においてもち病抵抗性を確認した再生イネ第 2 世代以降の個体を、PBZ 処理したイネにおける抵抗性と比較し、エピジェネティック変異の方向付けによって獲得された病害抵抗性が実用レベルであるかを検証した。

4. 研究成果

(1) 再生個体の全遺伝子発現解析およびエピジェネティック変異と相関する発現変化の特定
 抵抗性獲得系統 (150-0 系統) と日本晴との間の表現型を比較したところ、可視的表現型や圃場での収量には差異は認められず、病害抵抗性以外の変異は認められなかった。150-0 系統が獲得した病害抵抗性の分子機構の一端を明らかにするため、RNA-seq 解析により遺伝子発現を網羅的に調べ、150-0 系統と対照系統 (0-0 系統) との間のトランスクリプトームを比較した。この結果、病原菌接種をしなくても 150-0 系統では 222 遺伝子が有意に発現上昇しており、これらの遺伝子セットの遺伝子オントロジー解析を行ったところ、生物的・非生物的ストレス応答に関与する遺伝子が有意にエンリッチされていた (表 1)。PBZ を含む植物の抵抗性誘導剤は、植物に可視的な表現型や収量の低下を招くことなく植物を病害抵抗性にする。イネに病原菌を接種した場合に比べ、PBZ を処理しても、限られた防御関連遺伝子が比較的弱く発現誘導されることから、これらの薬剤は植物を防御応答の準備状態、すなわちプライミング状態にすると考えられている [Katz et al. 1998, Worrall et al. 2012]。これと同様に、150-0 系統に認められた限定的な遺伝子発現の変化は、150-0 系統が PBZ 処理したイネに類似したプライミング状態にあることを強く示唆した。

表 1 0-0系統に比べ150-0系統で発現上昇した遺伝子セットの遺伝子オントロジー解析

GO_acc	term_type	Term query item	FDR
GO:0006950	P	response to stress	1.10E-12
GO:0050896	P	response to stimulus	1.60E-12
GO:0009607	P	response to biotic stimulus	1.70E-08
GO:0009719	P	response to endogenous stimulus	4.00E-05
GO:0009628	P	response to abiotic stimulus	0.0027
GO:0008152	P	metabolic process	0.0083
GO:0009987	P	cellular process	0.022

(2) 耐病性獲得イネ個体における全ゲノムメチル化状態の解析
 150-0 系統のイネを作出する過程において、脱分化・再分化過程に PBZ 処理を加えても、カサからの再分化は阻害されず、カサに形成される分裂組織数や再生植物の出現率には、抵抗性誘導剤を加えない場合との間に顕著な差異は認められなかった。また、再生された 150-0 系統の R0 個体は、選抜することなく接種実験に供試したにもかかわらず、すべての個体が有意ないもち病抵抗性を示した。これらの結果は、150-0 系統に認められる病害抵抗性が選抜の結果得られたものでないことを強く示唆している。一方、(1) に示した通り、150-0 系統では複数の防御関連遺伝子が同時に発現上昇していたことを考え合わせると、ゲノム DNA に生じた塩基配列の変化に基づく突然変異ではこの現象を説明できない。そこで、150-0 系統にエピジェネティック変異が誘導されたと考え、日本晴、0-0 および 150-0 系統のうち独立の再生植物として得られた各 4 株について全ゲノムメチル化解析を行い、150-0 系統に発現変化が認められた遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を比較した。

この結果、各プロモーター領域は次のように分類された。

- タイプ A : いずれの系統においてもメチル化状態に変化が認められない
- タイプ B : 抵抗性獲得系統群の全ての系統に脱メチル化変化が認められる
- タイプ C : 抵抗性獲得系統群の一部の系統に脱メチル化変化が認められる
- タイプ D : いずれの系統群においても一部の系統に脱メチル化変化が認められる

このうち、0-0 系統および 150-0 系統の少なくともいずれかにおいてプロモーター領域が脱メチル化変化した遺伝子は 22 個であった。また、この 22 個の遺伝子のうち、タイプ B、タイプ C およびタイプ D に属す遺伝子はそれぞれ 3 個、4 個および 15 個であった。特にタイプ C の遺伝子は 150-0 系統が抵抗性プライミングを獲得するために極めて重要な役割を果たしていると考えられた。これらの遺伝子のうち、このうち RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE (RLCK) をコ

ードする遺伝子のプロモーター領域は、広範囲に明瞭な脱メチル化変化が認められた（図1）。

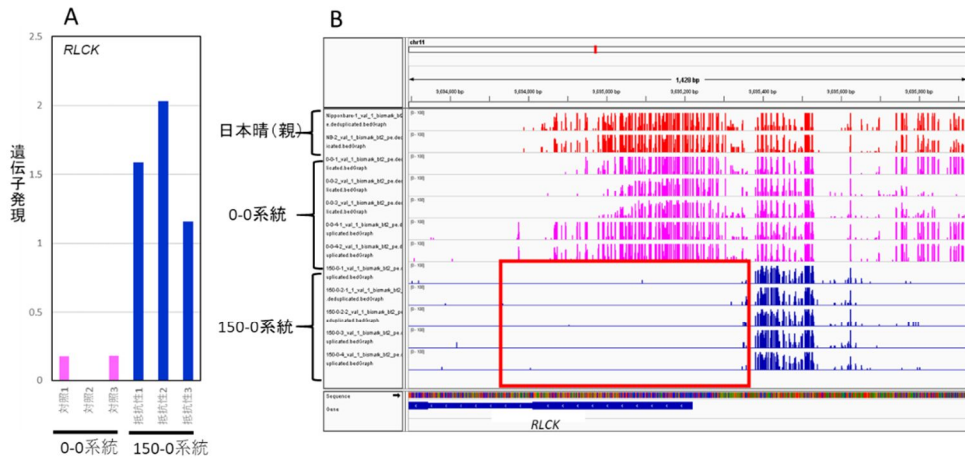


図1 RLCK遺伝子の発現上昇とプロモーター領域のメチル化状態

A：RLCK遺伝子の発現状態。0-0系統において発現がほとんど認められないのに対して150-0系統では顕著な発現が認められた。

B：日本晴、0-0および150-0系統におけるRLCK遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化状態。日本晴および0-0系統の4株では赤枠の領域が高度にメチル化されているが、150-0系統の全ての株において共通して、同じ領域がほぼ完全に脱メチル化していた。

また、この領域についてバイサルファイト・サンガーシーケンス法によりそのメチル化変化を再確認したところ、いずれの株も次世代シーケンサー解析と同様のメチル化パターンを示した。したがって、エピジェネティック変異の方向付け処理により、特定の遺伝子プロモーター領域にメチル化変化が生じ、遺伝子発現が変化したことにより 150-0 が病害抵抗性を獲得することは明らかであると考えられた。

(3) イネカルの脱分化・再分化過程におけるエピジェネティック変異獲得時期

(2)の結果より、全ての抵抗性獲得系統においてプロモーター領域に脱メチル化変化が認められた3つの遺伝子が特定された。このうちRLCKのプロモーター領域は、広範囲に明瞭な脱メチル化変化が認められた（図1）。そこで、RLCKのプロモーター領域に着目し、PBZによるエピジェネティック変異の方向付け処理過程において、この領域のメチル化状態がどのように推移するのか、全ゲノムバイサルファイトシーケンシングにより経時的に調べた。

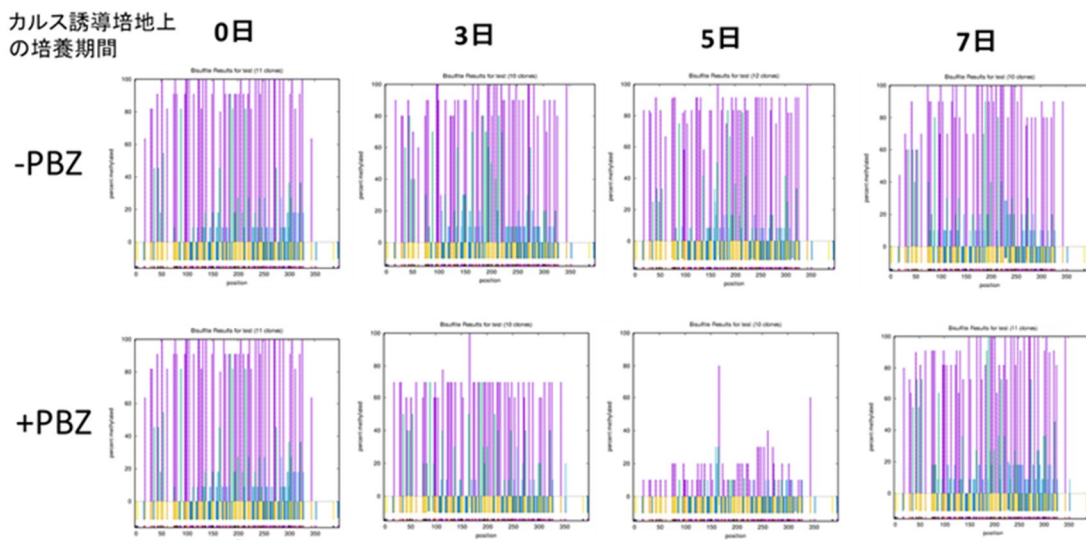


図2 誘導培地上のプロベナゾール(PBZ)処理および無処理のカルスにおけるRLCKプロモーター領域メチル化の経時的推移

PBZ添加および無添加のカルス誘導培地上における培養0、3、5および7日目のカルスにおけるRLCKプロモーター領域のメチル化状態。DNAメチル化はバイサルファイト・サンガー法により解析し、各区とも20以上のDNAシーケンスからメチル化率を算出した。

-PBZ：プロベナゾール無処理；+PBZ：プロベナゾール処理

PBZによるエピジェネティック変異の方向付け処理後0、3、5、7（以上は3週間のカルス誘導後に新鮮なカルス誘導培地に移植してからの日数）、12、17および22日目（以上は再生培地上

に移植し 5、10 および 15 日目) のカルスにおける *RLCK* プロモーター領域のメチル化状態を調べた。この結果、PBZ 無処理の対照カルスでは、カルス誘導培地上 (培養 0~7 日目) ではメチル化状態に変化は認められなかったのに対して、PBZ 処理したカルスでは 5 日目のカルスのメチル化状態に顕著な差異が認められ、この領域全体にわたってほぼ完全な脱メチル化変化が認められ、7 日目にはメチル化状態が回復していた (図 2) 。

以上の結果より、カルスの PBZ 処理は、培養 5 日目に *RLCK* プロモーター領域全体にわたる脱メチル化変化を引き起こし、150-0 系統に認められる *RLCK* プロモーター領域の脱メチル化を方向づけることが示唆された。

(4) イネ個体に獲得された病害抵抗性の実用性の検証

いもち病抵抗性を確認した 150-0 系統の R4 個体を用いて、PBZ 処理した日本晴および 0-0 系統と比較することにより、いもち病抵抗性が実用レベルであるか否かを検討した (図 3) 。日本晴においては、いもち病菌の平均菌糸伸長が 278 μm であったのに対して、PBZ 処理では 138 μm となり、菌糸伸長は約 50% 抑制された。0-0 系統でも同様に PBZ 処理では 120 μm まで抑制され、無処理の日本晴との間に有意な差が認められた。一方、150-0 系統では、PBZ 処理した場合に 101 μm と強い抑制が認められたが、PBZ 無処理でもほぼ同様に 107 μm となり、PBZ 無処理の日本晴と比較して、それぞれ 64% および 61% とほぼ同様の抑制効果を示した。以上の結果より、150-0 系統は、日本晴に PBZ を処理した場合と同等以上のいもち病抵抗性を示し、室内試験の結果から見る限り十分な実用性があると考えられた。

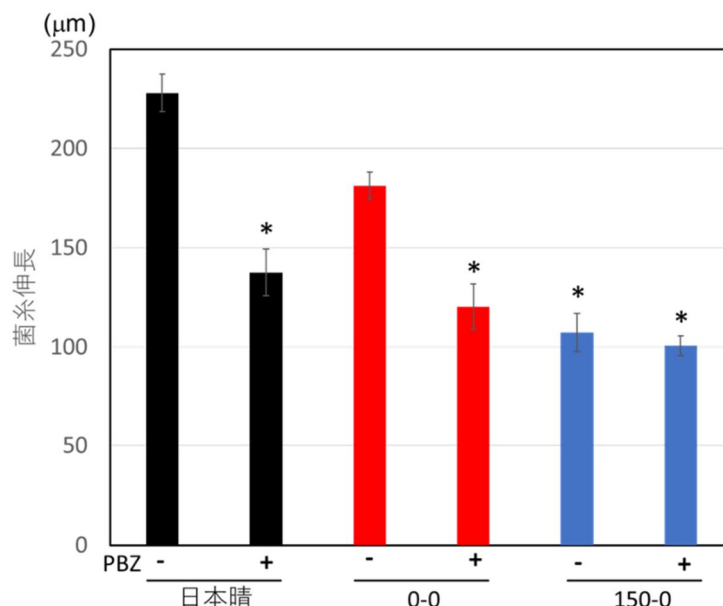


図3 プロベナゾール(PBZ)処理した日本晴、0-0系統および150-0系統イネにおけるいもち病菌感染菌糸の伸長

プロベナゾール処理および無処理の日本晴、0-0系統および150-0系統の3週齢葉鞘にGFP発現いもち病菌を接種し、48時間後の感染菌糸伸長を蛍光顕微鏡下で観察した。デジタルイメージを撮影し菌糸長を測定した。

PBZ-：プロベナゾール無処理；PBZ+：プロベナゾール処理

*：Dunnett検定によりPBZ無処理の日本晴との間に有意差あり ($P < 0.05$)

以上の結果を総合すると、本研究により我々が開発した方法は、エピジェネティック変異を利用した世界初の育種技術開発につながる可能性が極めて高いと考えられる。

< 引用文献 >

- Fraga MF, Esteller M (2002) *Biotechniques* 632:636-649.
- Kalisz S, Purugganan MD (2004) *Trends Ecol. Evol.* 19:309-314.
- Katz VA et al. (1998) *Plant Physiol.* 117:1333-1339.
- Krueger F et al. (2012) *Nature Methods* 9:145-151.
- Lämke J et al. (2016) *EMBO J.* 35:162-175.
- Luna E et al. (2012) *Plant Physiology* 158:844-853.
- Worrall D et al. (2012) *New Phytol.* 193:770-778.
- Yu A et al. (2013) *PNAS* 110:2389-2394.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 昂志、小林 裕子、小林 一成
2. 発表標題 植物へのエピジェネティック変異の人為的方向付けに関与する分子機構
3. 学会等名 地域イノベーション学会第9回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀田裕作、小林裕子、小林一成
2. 発表標題 エピジェネティック変異の人為的誘導によるいもち病抵抗性イネの作出
3. 学会等名 地域イノベーション学会第8回学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 遺伝子の発現が誘導された非天然の植物を生産する方法	発明者 小林一成	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-83683	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 遺伝子の発現が誘導された非天然の植物およびその生産方法	発明者 小林一成	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/017159	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------