

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06719

研究課題名(和文)植物の環境に応じた表現型可塑性におけるDNAメチル化の役割

研究課題名(英文)Role of DNA methylation in phenotypic plasticities for environmental changes in plants

研究代表者

西村 泰介(Nishimura, Taisuke)

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10378581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化の変化によって環境応答や形態形成に関連する表現型を引き起こしたと考えられる3種類のエピ変異体の表現型解析と原因遺伝子の同定を行い、以下の成果が得られた。(1)脱分化・再生過程に関わる機能未知の新規遺伝子を見出した。この遺伝子は系統間で多様なメチル化パターンを示したことから、この過程で観察される系統間の違いを反映している可能性がある。(2)病原菌抵抗性を示すエピ変異体は感染時にのみ免疫関連遺伝子の発現が野生型より上昇していた。(3)オーキシン信号伝達に関連する葉の形態異常を示すエピ変異体では原因候補遺伝子を1番染色体と4番染色体上のそれぞれに2-3遺伝子まで特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで報告されているエピ変異体は自然界に存在するものや偶発的に得られたものがほとんどであった。本研究によりエピ変異体のリソースとしてエピジェネティック組換え自殖系統群を用いることで、特定の表現型を示すエピ変異体の単離が可能であり、このようなエピ変異体では表現型が安定に遺伝することから、連鎖解析で原因遺伝子座を特定できることが示された。また病原菌抵抗性を示すエピ変異体では病原菌に感染した時のみ免疫関連遺伝子の発現が野生型より高く、従来の突然変異体や遺伝子組換え植物のように常に免疫機能を改変させ通常の生育にも影響を及ぼす植物とは異なる特性をもつ植物を得られた。

研究成果の概要(英文)：By phenotypic analyses and identification of causative genes of three kinds of epi-alleles, which are predicted to have caused phenotypes related to environmental responses and morphogenesis through changes in DNA methylation pattern, we obtained the following results. (1) A novel gene involved in the process of de-differentiation and regeneration was identified. This gene showed diverse methylation patterns among accessions. (2) In an epi-allele exhibiting pathogen resistance phenotype, expression of immune-related genes was increased only upon pathogen infection compared to the wild-type plant. (3) We identified two to three candidate causal genes of an epi-allele showing leaf morphological abnormalities related to auxin signaling on chromosomes 1 and 4.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 エピ変異体 シロイヌナズナ 表現型可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の環境変化に応じた表現型可塑性における DNA メチル化の関与

動物において、環境変化に応じた表現型の可塑性、つまり環境変化に応じた遺伝子の発現パターンの維持・記憶に DNA メチル化が作用することが知られているが、植物ではこのような例はほとんど知られていない。しかしながら、DNA メチル化量が著しく低下したシロイヌナズナ DNA メチル化維持酵素変異体 *met1* では、植物ホルモンによって誘導される脱分化・再分化の効率、および病原菌に対する抵抗性などに影響がみられる⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。この結果は植物でも DNA メチル化が環境に応じた表現型可塑性に関与する事を示唆しているが、どの遺伝子の DNA メチル化の変化がこれらの細胞応答に関与しているかは明らかになっていない。

(2) エピ変異体によって明らかになる DNA メチル化の役割

個々の遺伝子における DNA メチル化の様々な細胞応答に対する役割を明らかにするためにはエピ変異体の利用が有効である。エピ変異体は、DNA メチル化の変化により特定の表現型が引き起こされる変異体であり、これまでもトマトのエピ変異体の原因遺伝子が同定され、その解析から追熟過程に特定の遺伝子の脱メチル化が作用することが明らかにされた⁽⁴⁾⁽⁵⁾。しかしこれまでに報告されているエピ変異体は、全て偶発的に単離されたか、元々自然界に存在する例だけである。

(3) エピジェネティック組換え自殖系統群を利用したエピ変異体の単離

研究代表者は *met1* 変異体と野生型を交配することで確立された、ゲノム上の各部位で DNA メチル化のパターンが系統ごとにそれぞれ異なる、エピジェネティック組換え自殖系統群⁽⁶⁾をエピ変異体のリソースとすることを試みた。その結果、エピジェネティック組換え自殖系統群の中から脱分化組織(カルス)からの高いシュート再生効率を示す系統(A471)、病原菌抵抗性の高い系統(MH011)、及び葉の形態が異常となる系統(e16)を単離することにすでに成功している。これらのエピ変異体系統候補を利用することで、どの遺伝子の DNA メチル化の変化が脱分化・再分化過程、病原菌抵抗性、及び葉形成過程に関与しているかを明らかにすることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題ではすでに単離している脱分化・再分化過程、病原菌抵抗性、及び葉形成過程に異常が観察されるエピ変異体系統候補を利用し、これらの細胞応答にどの遺伝子における DNA メチル化が関与するかを明らかにする。さらに同定した遺伝子の細胞応答過程における発現変化およびエピジェネティックな変化を明らかにすることでその役割の詳細を明らかにするとともに、アクセッション(近交系統)間における DNA メチル化の変化から系統間での細胞応答の違いを生み出すメカニズムを探ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 連鎖解析および発現解析・DNA メチル化解析により脱分化・再分化過程、病原菌抵抗性、及び葉形成過程に異常が観察されるエピ変異体系統候補の原因遺伝子を明らかにする。

(2) 同定された遺伝子に対してそれぞれに対応する細胞応答過程における発現および DNA メチル化の変化を明らかにするとともに、アクセッション間の DNA メチル化の変化を検証する。

4. 研究成果

(1) 高いシュート再生効率を示す A471 系統はカルス(脱分化)誘導条件下で緑化を始める

A471 系統では高いシュート再生効率とともに、カルス誘導条件下において緑化するという表現型を示す。RNA-seq 解析によりカルス誘導条件下で A471 系統において野生型より発現が上昇している遺伝子群を検証したところ、シュート再生過程で発現が上昇する遺伝子⁽⁷⁾が多く含まれることが明らかになり、カルス誘導条件下にもかかわらずシュート再生に関与する遺伝子が発現することで緑化すると考えられた。

(2) A471 系統の原因遺伝子の同定

研究開始時点で A471 系統は優性変異で表現型には少なくとも 1, 3, 5 番染色体上の 3 遺伝子座が関与することが明らかにされていた。連鎖解析、RNA-seq 解析、BS-seq 解析により 1 番染色体の原因遺伝子の候補として A471 系統でメチル化が減少し、発現が上昇している *At1g30060* 遺伝子が同定された。この遺伝子の 5' 領域(第 1 エキソン)を標的とした CRISPR/Cas9 コンストラクトを作製し、A471 系統背景で遺伝子機能を破壊することで表現型が消失するかの検証を行ったが、誘導した変異のヘテロ接合体は得られるものの、ホモ接合体を得ることができなかった。

このことから *At1g30060* 遺伝子は発生の初期の段階で生存に必須な機能を持つと考えられた。また *At1g30060* 遺伝子を野生型背景で強制発現する系統を作出したところ、いくつかの系統では A471 系統に似た表現型を示したが、今後、他の原因遺伝子も強制発現させて検証する必要がある。

5 番染色体上の原因遺伝子座も連鎖解析により約 1.1Mb の領域に同定し、A471 系統で野生型に比べて発現上昇し、メチル化が変化していた遺伝子を 15 まで絞り込むことに成功した。

(3) *At1g30060* 遺伝子は脱分化過程に関与する

At1g30060 遺伝子のコードするタンパク質は機能未知であり、核移行シグナルと予想される配列を持つ。カルス誘導条件下での発現変化を野生型系統と A471 系統で比較したところ、24 時間を経過したところから A471 系統では発現が誘導され、48 時間目では野生型でも発現が誘導されるものの、A471 系統では 3.5 倍ほど発現が高いことが明らかになった (図 1)。これまで脱分化・再分化過程に関わる遺伝子の同定は試みられてきたが、*At1g30060* 遺伝子はエピ変異体を利用することによって初めて同定することができたと考えられる。

またシロイヌナズナでは多くのアクセッションにおける DNA メチル化パターンが報告されているが⁽⁸⁾、*At1g30060* 遺伝子のメチル化が消失しているアクセッションがいくつか同定された。そのうちの NFA-10 アクセッションでは標準の野生型として使用される Col-0 アクセッションよりも高いシュート再生効率を示した。今後は *At1g30060* 遺伝子との関わりを調べていく必要がある。

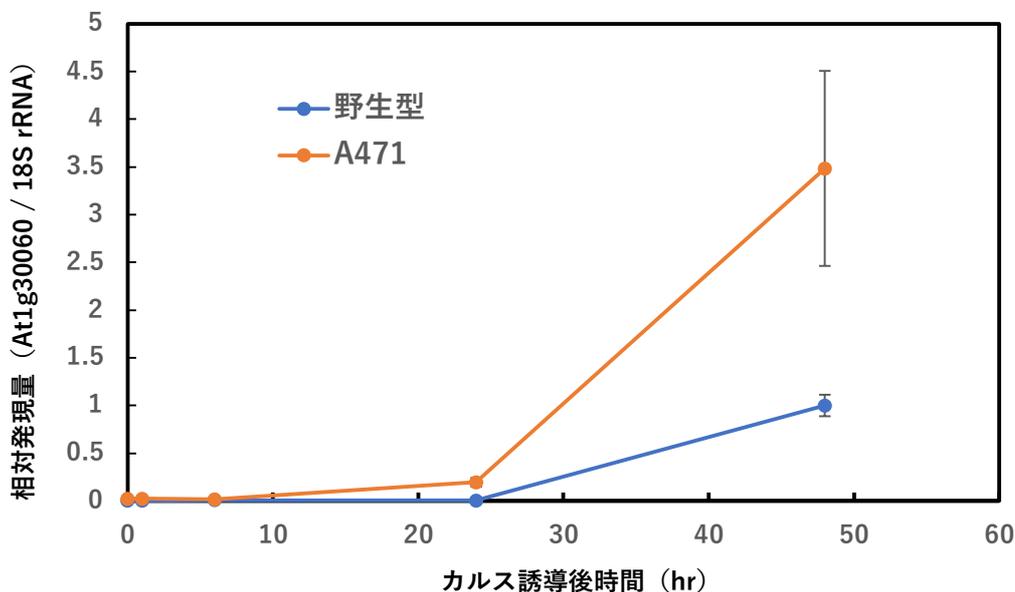


図1 カルス誘導条件下での*At1g30060* 遺伝子の発現量解析

カルス誘導後、0、1、6、24、48時間後のそれぞれでA471系統と親株である野生型系統からRNAを抽出し、*At1g30060* 遺伝子の定量的RT-PCRを行った。縦軸は18S rRNAに対する相対発現量で、各値は48時間後の野生型系統における相対発現量を1として相対値を表している。エラーバーは3バイオリピートの標準偏差。

(4) MH011 系統の病原菌抵抗性は安定に遺伝する

MH011 系統は野生型の代わりに新規 DNA メチル化酵素変異体 *drm2* と *met1* 変異体を交配することで確立したエピジェネティック組換え系統から単離された系統で、新規 DNA メチル化活性が低下しているため、DNA メチル化の変化 (エピ変異) がより安定に遺伝することが期待された。MH011 系統の病原性細菌 *Pseudomonas syringae* に対する抵抗性は F5 世代まで安定に引き継がれ、この表現型を引き起こすエピ変異は安定に遺伝することが示唆された。

(5) MH011 系統では感染後に免疫関連遺伝子の発現が上昇する

MH011 系統において免疫関連遺伝子の発現を解析したところ、感染前は有意差が観察されなかったのに対して、感染後は多くの免疫関連遺伝子で親株の *drm2* 変異体より高い発現が観察された (図 2)。植物でも動物と同じく 1 度目の感染を記憶し、2 度目の感染でより高い抵抗性を示すプライミングと呼ばれる現象が知られており⁽⁹⁾、DNA メチル化が遺伝子上の記憶として作用す

るなら MH011 系統では 1 度感染を受けたのと同じ状態になっている可能性があり大変興味深い。

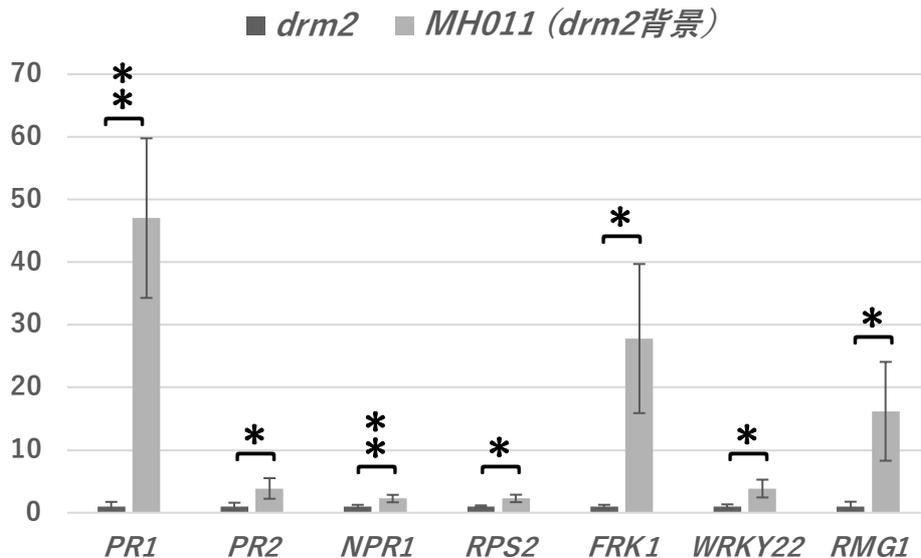


図2 免疫関連遺伝子の発現量解析

Pseudomonas syringae 感染後 5 日目の MH011 系統と親株である *drm2* 変異体から RNA を抽出し、免疫関連遺伝子の定量的 RT-PCR を行った。縦軸は 18S rRNA に対する相対発現量で、各遺伝子 *drm2* 変異体における相対発現量を 1 として相対値を表している。エラーバーは 3 バイオロジカルリピートの標準偏差。

* は $p < 0.05$, ** は $p < 0.01$ 。

(6) e16 系統では葉の下偏成長に加え側根数の減少も示す

e16 系統は葉が上側に屈曲する（下偏成長）表現型を示す系統として単離したが、地下部の表現型を観察したところ、側根の数が減少していることが明らかになった。これらの葉や根の表現型はオーキシン信号伝達に関わる遺伝子の突然変異体で観察される表現型であり、e16 系統でもオーキシン信号伝達に異常がある可能性が示唆された。

(7) e16 系統の原因遺伝子の同定

e16 系統は優性変異であることから、DNA メチル化が消失することで発現上昇されることが研究開始時点で示唆されていた。また表現型には少なくとも 1, 4 番染色体上の 2 遺伝子座が関与することが明らかにされていた。本研究課題における連鎖解析、発現解析、DNA メチル化解析によって 1 番染色体上では 3 遺伝子、4 番染色体上では 2 遺伝子まで候補原因遺伝子を絞り込むことに成功した。今後は CRISPR/Cas9 によって e16 系統において各候補原因遺伝子の機能を欠失させ表現型が消失するかを検証する。

(8) まとめ

エピジェネティック自殖系統群をリソースとして特定の表現型を示すエピ変異体を単離し、原因遺伝子を同定するという試みはこれまで行われてこなかった。本研究により、この方法で得られたエピ変異体の表現型は安定に遺伝すること、連鎖解析を用いることで遺伝子同定も可能なことを示した。A471 系統の解析からは脱分化・再分化過程に関与する遺伝子として新たに *At1g30060* 遺伝子が同定され、通常の塩基配列の変化による突然変異体では同定できない新規遺伝子の同定も可能であることも示した。*At1g30060* 遺伝子における DNA メチル化はアクセッションによって様々なパターンを示し、多様に変化することを示唆している。今後、環境変化によってこの遺伝子における DNA メチル化が変化しうるのか、他のエピジェネティック修飾との関連も含めて解析を進める必要がある。

病原菌抵抗性を示す MH011 系統では、通常では免疫関連遺伝子の発現は野生型と同じであるが、病原菌を感染させた後は、野生型より高い発現が誘導されることが明らかになった。MH011 系統で特定の遺伝子座で DNA メチル化が変化することで、病原菌を感染した経験と同じ効果を獲得したならば、植物の記憶のメカニズムを DNA メチル化の観点から明らかにできるかもしれない。

本研究により、環境に応じた表現型可塑性に関わる遺伝子の候補を多数得ることができたが、

これらの遺伝子のエピジェネティック制御の解明までは残念ながら至らなかった。まずは本研究で得ることができた候補遺伝子がエピ変異体の原因遺伝子であることを示し、これらの遺伝子の発現と DNA メチル化の関連を明らかにしていくことで、環境に応じた表現型可塑性に関わる DNA メチル化の役割を明らかにすることが可能であると考えられる。

<引用文献>

- ① Berdasco et al. 2008, *PLoS One* **3**, e3306.
- ② Li *et al.* 2011, *PLoS Genet.* **7**, e1002243.
- ③ Downen et al. 2012, *PNAS* **109**, E2183-E2191.
- ④ Manning et al. 2006 *Nature Genet.* **38** 948-952.
- ⑤ Zhong et al. 2013, *Nature Biotech.* **31**, 154-159.
- ⑥ Reinders et al. 2009, *Genes & Dev.* **23**, 939-950.
- ⑦ Ishihara et al. 2019, *Nature Commun.* **10**, 1786.
- ⑧ Kawakatsu et al. 2016, *Cell* **166**, 492-505.
- ⑨ Ramirez-Prado et al. 2018, *Trends in Plant Sci.* **23**, 833-844.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牛澤美樹、星野愛海、西村泰介
2. 発表標題 葉の形態が変化するエピジェネティック組換え自殖系統の解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前地弘基、平沢巽、太田英恵、山本章子、佐瀬英俊、永野惇、武田真、服部束穂、西村泰介
2. 発表標題 シュート再生効率に関するエピ変異の同定
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村泰介
2. 発表標題 多様な表現型を引き起こすエピ変異
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若林荘太郎、前地弘基、平沢巽、太田英恵、西脇優作、佐瀬英俊、永野惇、武田真、服部束穂、西村泰介
2. 発表標題 シロイヌナズナのシュート再生効率に関するエピ変異の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤和、和田瑞希、牛澤美樹、星野愛海、西村泰介
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける葉の形成に関与するエピ変異の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	佐瀬 英俊 (Saze Hidetoshi)		
研究協力者	石賀 康博 (Ishiga Yasuhiro)		
研究協力者	前地 弘基 (Maeji Hiroki)		
研究協力者	牛澤 美樹 (Ushizawa Miki)		
研究協力者	伊佐 猛 (Isa Takeru)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	若林 荘太郎 (Wakabayashi Sotaro)		
研究協力者	黒澤 和 (Kurosawa Nook)		
研究協力者	西脇 優作 (Nishiwaki Yusaku)		
研究協力者	和田 瑞希 (Wada Mizuki)		

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