

令和 5 年 9 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02971

研究課題名(和文) 地球環境変動下の作物生産に資するエピゲノムを介した環境記憶型種子の開発

研究課題名(英文) Development of environmental memory seed by regulation of epigenome in crop production under global environmental change

研究代表者

石橋 勇志 (Ishibashi, Yushi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50611571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：作物の子実登熟における環境が次世代の成長に影響するか否かを目的とした本課題は、イネを供試材料とし環境を高温ストレスとした場合、次世代成長において種子発芽、草丈、分けつ、出穂・開花、止葉の形態など様々な表現型に影響することを示した。さらに、高温ストレスを経験した種子からDNAを抽出し、全ゲノムメチル化解析を実施した結果、表現型に關与する遺伝子のDNAメチル化が關与することが示唆された。さらに、これらの表現型は、一度記憶されると数年間持続する形質とそうでない形質に分かれ、記憶の程度が存在することも示唆された。以上、本研究成果より、作物の登熟過程の環境は次世代成長へ影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、現在進行形で変動する地球環境変動において、農作物の子実登熟環境が次世代成長へ影響を及ぼすことを示唆した。特に分けつ特性など生産性に關与する形質がいくつも変動する点においては、今後さらに上昇する温暖化対策において、採種場所の登熟環境などを再検討する必要があると考えられる。また、環境記憶による次世代の表現型制御がDNAメチル化を介する可能性が示唆された。今後、環境記憶された種子のQCとして種子のDNAメチル化程度を利用できると考えられ、これまで外観と発芽率のみで議論されてきた種子品質の新たな基準を提案することができる。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to determine whether the environment during grain maturation affects the growth of the next generation of rice plants. When rice was used as the test material and the environment was subjected to high temperature stress, the heat stressed seeds showed various phenotypes such as seed germination, plant height, branching, heading/flowering, and morphology of the stop leaves in the growth of the next generation of rice plants. Furthermore, whole genome methylation analysis of DNA extracted from seeds that had experienced high temperature stress suggested that DNA methylation of genes involved in the above phenotypes was involved. Additionally, these phenotypes were divided into traits that persist for several years once memorized and those that do not, suggesting that there is a degree of memory. In summary, the results of this study suggest that the environment during the crop's ripening process influences the growth of the next generation.

研究分野：作物学

キーワード：種子 環境ストレス エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

土地利用型の作物栽培において栽培環境は毎年異なっており、特に近年の環境変動は激しく年々過酷になってきている。作物は栽培過程において、環境ストレスに遭遇しても最終的な収獲物(種子)は形態的に変化しない。では、生育期間の環境は、次世代の作物成長に影響しないのだろうか? ほ乳類では、幼児期の生活環境が成人しても影響することが知られ、DNA のメチル化やヒストン修飾などエピジェネティクス変化によるメタボリックプログラミングが関連することが報告されている。植物においても、モデル植物のシロイヌナズナを中心にエピジェネティクス変化について報告されているが、生育環境を記憶させた植物種子とエピゲノミクスの関係を調査した例は存在しない。これまで、植物の環境順化機構に着目した研究事例はいくつか存在するが、植物の種子に対して環境履歴を付加すること自体世界初の試みであり、繰り返し経験される生育環境に対して種子内のエピジェネティクス変化に及ぼす影響については報告されておらず、まして収穫後の表現型と合わせた考察などは皆無である。そこで本研究は、種子への記憶媒体として近年研究の革新が著しいエピジェネティクス制御に着目する。エピジェネティクスは、ゲノムに記された遺伝情報の発現を制御する仕組みであり、モデル植物のシロイヌナズナにおいて、環境ストレスがエピジェネティクス変化を引き起こすことが報告されている(Kim et al. 2008)。また、植物においてエピジェネティクス変化は次世代へ受け継がれることも報告されている(Cortijo et al. 2014)。そこで本研究は、種子への環境記憶媒体として近年研究の革新が著しいエピジェネティクス制御に着目し、種子への生育環境の記憶について明らかにしたい。

## 2. 研究の目的

昨今の急激な気候変動下における安定した作物生産は農業上重要な課題であり、特に精密な栽培環境制御が困難な土地利用型の作物栽培において、作物の安定生産に対する種子への依存度は極めて高い。加えて、2018年4月より、主要農作物種子法が廃止され、今後、主要穀物の種子は更にグローバル化することが明確であり、種子(穀類)科学分野に課せられた期待は大きい。本研究では、作物の生育環境を種子へ繰り返し記憶させる「環境記憶」制御をエピゲノムの側面から理解することで、環境制御が困難な土地利用型作物の安定生産システムを構築することを目的とする。これまで、栽培環境の履歴について証明した例は存在しない。しかしながら、登熟期の環境は次世代の種子発芽や開花等、その後の生育に確実に影響している。同一品種による表現型の違いは、塩基配列に依存するものではなく、DNA のメチル化やヒストン修飾などエピジェネティクス制御に依存する可能性が極めて高い。さらに、幼植物体を用いて繰り返し環境ストレスを経験させる、一般的なストレスメモリー機構とは異なり、種子へ生育環境を記憶させる点に置いて、こまでの研究とは一線を画す。

本研究課題では、登熟期の環境変動をエピジェネティクス変化によって種子へと繰り返し記憶させる「環境記憶」機構を明らかにし、栽培環境履歴エピゲノムマーカーを同定することを目的とする。本研究手法は、遺伝子組換え植物を使用せず、同一品種に生育環境を「記憶」させた種子を用いるため、生育方法を変えずに低コストかつ省力的な作物栽培が可能となる。本研究課題は、エピゲノムマーカーを用いた環境変動耐性種子の開発による土地利用型作物の安定生産を最終目標としており、研究結果は科学的な意義に止まらず、食糧生産現場への有意義な提言へとつながり、近い将来必ず重要な課題となる、環境変動と食糧生産問題に対する一つの解決策としても期待されることから、本研究課題を提案する。

## 3. 研究の方法

供試材料としてイネ(*Oryza sativa* L.)の日本晴を用いて、開花期までは自然条件において慣行栽培し、開花後に温度条件(対照区:25℃、高温区:30℃)に移し収穫後、次世代イネの農業形質について調査した。農業形質として、発芽率、草丈、分げつ、早晚性、収量および収量構成要素、高温登熟耐性(玄米品質)を調査項目とした。さらに、種子からDNAを抽出し、全ゲノムメチル化解析を実施し、個別の領域についてMeDIP-qPCRにより、DNAメチル化を定量的に評価した。さらに、Chip-qPCRによりヒストン修飾についても調査した。エピジェネティクスは変動が確認された遺伝子についてはqPCRにより発現解析を実施した。

## 4. 研究成果

イネの高温登熟が次世代の成長へ及ぼす影響について、主に表現型に着目して研究を推進した。高温登熟された種子は、発芽遅延の再現性を確認すると共に、草丈の抑制、分げつの促進、開花の促進、止葉の短縮及び葉厚の増加など様々な表現型に影響することが明らかとなった。次にこれら表現型に関与する遺伝子の発現解析を実施したところ、特に開花関連遺伝子の発現は、高温登熟した個体の葉で有意に促進していた。さらに高温登熟した種子からDNAを抽出し、開

花関連遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化について調査したところ、高温登熟した種子には低メチル化が確認され、遺伝子の発現と同調する結果となった。以上の結果は、高温登熟により子実内の DNA メチル化程度が変化し、次世代の成長へ影響を及ぼす可能性が示唆された。また、イネと同様にオオムギの高温登熟した種子の次世代成長を確認したところ、高温登熟した種子は葉のトライコームを増加させることが確認された。イネの止葉の形態変化と合わせ考察すると、イネ科作物の高温登熟は、次世代の草姿を変化させる可能性があると考えられた。

さらに、全ゲノムのメチル化程度 (WGBS) を確認したところ、高温登熟された種子において、メチル化程度が変化することが明らかとなった。特に注視 したい領域として抽出した DMR 解析では、環境ストレスに関連する遺伝子が含まれており、高温登熟下における子実内のストレス適応として、DNA メチル化が関与 する可能性が示唆された。また、登熟期を 4 ステージに分け高温処理を実施し、DNA メチル化関連遺伝子の発現解析を行った結果、特に登熟前半の高温により発現 変動が大きく、登熟初期の高温が子実への環境記憶にとって重要なステージであることが示された。また、先の WGBS 解析により、植物ホルモンに関する領域やトランスポゾンに関連する領域についてもメチル化の変動が見られ、本結果を参考にして、オオムギの高温登熟による種子休眠性についても確認したところ、高温登熟した種子は植物ホルモン関連遺伝子や活性酸素産生遺伝子の DNA メチル化により発現制御される可能性が示唆され、実際の植物ホルモン含量や活性酸素含量も変化した。

環境ストレスを経験した種子の WGBS 解析とその後の表現型の解析により、表現型に関わる特定の遺伝子領域における DNA メチル化程度について MeDIP-qPCR にて解析した。その結果、分げつ関連遺伝子や出穂・開花遺伝子のプロモーター領域のメチル化は環境ストレスを経験した種子において変動しており、その変動は分げつ期や出穂期まで維持されていた。また、定量的遺伝子発現解析の結果、DNA メチル化程度とその発現量が一致した。以上の結果は、登熟期間における環境ストレスが子実内の DNA メチル化を変動し、その世代の成長ステージまで影響が及ぶことを表しており、登熟環境が次世代へ影響を及ぼすことが明らかとなった。また、登熟期間における DNA メチル化転移酵素の発現変動を調査したところ、OsMET1 等の一部の遺伝子が環境ストレスにより変動することが示された。また、DNA メチル化以外のエピジェネテス変動としてヒストンのアセチル化およびメチル化を Chip-qPCR により解析した。その結果、多くの遺伝子コード領域に影響していることが示された。環境ストレスを繰り返し記憶させた種子においても WGBS 解析を実施し、こちらも回数を重ねるたびに DNA メチル化の変動が大きくなることが明らかとなり、これらの結果は、繰り返し記憶させた種子の次世代の表現型とも一致した。

以上の結果から、作物の登熟過程における環境変動は、エピジェネティック制御を介して、次世代成長に関与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chetphilin Suriyasak, Yui Oyama, Toshiaki Ishida, Kiyoshi Mashiguchi, Shinjiro Yamaguchi, Norimitsu Hamaoka, Mari Iwaya-Inoue, Yushi Ishibashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism of delayed seed germination caused by high temperature during grain filling in rice ( <i>Oryza sativa</i> L.)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 17378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74281-9	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 Yuki Sakai, Chetphilin Suriyasak, Miki Inoue, Norimitsu Hamaoka, Yushi Ishibashi	4. 巻 110
2. 論文標題 Heat stress during grain filling regulates seed germination through alterations of DNA methylation in barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant molecular biology	6. 最初と最後の頁 325-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-022-01278-5	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井優光、Suriyasak Chetphilin、井上未希、濱岡範光、石橋勇志
2. 発表標題 オオムギの高温登熟による子実内のDNAメチル化を介した種子発芽制御機構
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋勇志
2. 発表標題 農作物の環境適応から紐解く地球環境変動下における食料の安定生産
3. 学会等名 九州大学学術都市研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋勇志
2. 発表標題 地球温暖化の現状と今後
3. 学会等名 地域産学官と技術士との合同セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 涼, Suriyasak Chetphilin, 川口 颯介, 澤田 悠太, 濱岡 範光, 石橋 勇志
2. 発表標題 イネの高温登熟における背白粒発生に関わるアリューロン細胞分化関連遺伝子の探索
3. 学会等名 日本作物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 環境記憶型種子及びその利用	発明者 石橋勇志、Suriyasak Chetphilin、濱岡範光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、58473	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
研究 分 担 者	濱岡 範光  (Hamaoka Norimitsu)  (40778669)	九州大学・熱帯農学研究センター・准教授   (17102)	

#### 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
---------	---------