

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 10 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：2021～2023

課題番号：21K05596

研究課題名（和文）エピジェネティック変異を応用した新規病害抵抗性育種の分子基盤解明と多作物への展開

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of novel disease resistance breeding through the application of epigenetic mutation and its application to multiple crops.

研究代表者

小林 一成（Kobayashi, Issei）

三重大学・研究基盤推進機構・教授

研究者番号：90205451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、イネの脱分化・再分化過程において、特定の時期にプライミング誘導剤を処理することにより、病害抵抗性イネを作出できることを見出した。本研究では、エピジェネティック変異誘導の分子機構を明らかにするとともに、他の植物種にこの方法が応用可能かを実証するため実験を行った。この結果、抵抗性を獲得したイネ系統は特有のエピゲノムパターンを有すること、および、イネ以外の作物を同様に処理したところ、防御関連遺伝子の上昇が認められ、イネに類似したエピジェネティック変異誘導が確認された。以上の結果から、エピジェネティック変異誘導の分子機構が明らかになるとともに、本法を多植物に展開できる可能性が強く示唆された。

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。さらに、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、食料生産に対する脅威が一層厳しいものとなっている。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。我々の発見は、エピジェネティック変異を人為的の方向付け、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であり、特にマイクロプロパゲーションによって苗を生産するバナナのような作物には直ちに本法を適用できることから、今後は本法が爆発的に普及する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have found that disease-resistant rice plants can be produced by treating rice plants with priming inducers at specific times during the de- and re-differentiation process. In this study, we conducted experiments to reveal the molecular mechanism of epigenetic mutation induction and to demonstrate whether this method can be applied to other plant species. The results showed that the rice lines that acquired resistance had a specific epigenomic pattern and that similar treatments of crops other than rice showed an increase in defence-related genes, confirming epigenetic mutation induction similar to that in rice. These results clarify the molecular mechanism of epigenetic mutation induction and strongly suggest that the method could be extended to multiple plants.

研究分野：植物保護科学

キーワード：病害抵抗性 エピジェネティクス DNAメチル化 ヒストン修飾 イネ マイクロプロパゲーション

1. 研究開始当初の背景

最近、我々は、イネの脱分化・再分化過程において、特定の時期にプライミング誘導剤を処理することにより、病害抵抗性イネを作出できることを見出した。この方法を用いると、病害抵抗性に関与する特定のゲノム領域にエピジェネティック変異が誘導され、イネのプライミング状態が世代を超えて維持される病害抵抗性イネを作出できる。近年、様々なストレスに対する植物の順化へのエピジェネティック記憶の関与が続々と明らかになっており、この機構が我々の見出した現象の分子基盤となっている可能性が高い。この現象は様々な作物種に応用できる可能性が高く、作物に迅速かつ低コストで病害抵抗性を付与できることが期待される。そこで本研究では、イネの脱分化・再分化過程におけるエピジェネティック変異誘導の分子機構を明らかにするとともに、他の植物種にこの方法が応用可能であることを実証し、この現象を技術として社会実装するための基盤の確立を目指して実験を行った。

ゲノム DNA の塩基配列変化はランダムに生じることから、突然変異を人為的に方向付けて望みの表現型を示す作物を作出することは不可能であり、優良な品種の作出には選抜過程が不可欠である。したがって、作物の育種には膨大な数の候補個体から優良個体を選抜する過程が必要であるが、この過程には莫大な時間的・費用的コストを要する。一方、ゲノム DNA やヒストンの後生的修飾を通して遺伝子発現を調節する「エピジェネティクス」の機構は、農業上有用な形質に関するエピジェネティック変異が安定的に遺伝すれば、作物の育種に有力な選択肢を提供すると考えられる [Pieterse, *Plant Physiol.* 158:545 (2012), Walters et al. *Plant Cell* 64:1263-1280 (2024)]。DNA メチル化などのエピジェネティックな調節機構は開花時期や胚乳の発育調節など [Finnegan et al., *Curr Opin Genet Dev.* 10:217-223 (2000)]。植物の発生機構に関与するのみでなく、病原菌からの攻撃や様々なストレスに曝された植物において、エピジェネティック記憶によるプライミングを通して防御応答に深く関与することが明らかになってきた [Lämke et al., *EMBO J.* 35:162-175 (2016), Luna et al., *Plant Physiol.* 2012 158:844-853 (2012), López Sánchez et al., *Plant J.* 88:361-374 (2016)]。動物とは異なり、植物ではゲノム DNA のメチル化状態変化などのエピジェネティック変異が有性生殖を超えて遺伝することが以前より知られているが [Kalisz and Purugganan *Trends Ecol Evol.* 19:309 (2004)]。病害ストレスやプライミング誘導剤処理によってエピジェネティックに獲得された病害抵抗性は、次世代に伝わるがあっても、2 世代目以降に安定して遺伝する例は知られていないとされている [Ramirez-Prado et al. *Trends Plant Sci.* 23:833-844 (2018)]。したがって、病害抵抗性植物の作出にエピジェネティック変異を利用することは困難であると考えられてきた。

これに対して、我々は、イネの脱分化・再分化過程の適切な時期にプライミング誘導剤を処理することにより、再生植物に「エピジェネティック変異の方向付け」が可能であることを見出した。エピジェネティック変異を方向付けた再生イネでは、少なくとも 5 世代にわたって病害抵抗性が安定的に遺伝し、この現象の鍵と考えられる遺伝子群に特異的なメチル化変化が誘導された。この方法を用いれば、短期間かつ低コストに病害抵抗性植物を作出することが可能となり、病害抵抗性育種の飛躍的な効率化が期待できる。

2. 研究の目的

外的な刺激によって、安定的に遺伝するエピジェネティック変異が特定のゲノム DNA 領域に誘導される現象はこれまで知られておらず、この現象には未知のメカニズムが介在すると考えられる。また、特定の表現型を獲得するエピジェネティック変異をゲノム DNA に安定的に導入する研究は、これまでのところ我々以外には成功していない。特定の転写因子を体細胞に発現させ、無性生殖的に作出された植物では親植物のエピジェネティックな状態が維持されることを利用し、遺伝的に安定なエピジェネティック変異体を作出できることが報告されているが [Wibowo et al., *PNAS* 115:E9145-E9152 (2018)]。エピジェネティック変異を人為的に誘導するものではなく、親植物のエピジェネティックな状態をそのままに引き継ぐ点が我々の研究と決定的に異なる。本研究は、我々が独自に見出した「エピジェネティック変異の方向付け」という際立った現象の分子機構を明らかにすることを目的の 1 つとしており、学術的に極めて独自性が高い。また、この現象をイネ以外の植物にも応用可能であることが示されれば、作物に病害抵抗性を付与する方法として広く用いることが可能となり、広範な応用展開が期待できる。したがって、本研究は、我々が発見した現象を社会実装に直接つなげられる可能性が高いという点から、極めて創造性が高いと言える。

我々の方法により病害抵抗性を獲得したイネは、脱分化・再分化過程におけるプライミング誘導剤処理によって抵抗性を獲得することから、特定のゲノム DNA 領域へのメチル化変化やヒストン修飾の誘導は、この処理以降のエピジェネティックな調節機構を介していると考えられる。また、エピジェネティックな調節機構は動植物を通して多くの部分が共通していることから、我々が開発した方法は多くの植物種に利用できる可能性が高い。そこで本研究では、我々が開発した「エピジェネティック変異の方向付け」に関与する調節機構を明らかにするとともに、この方法が他の植物にも適用可能であるかを検証し、この方法を技術として社会実装するための学

術的・技術的基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、イネの脱分化・再分化過程におけるエピジェネティック変異の誘導機構を明らかにするとともに、他の植物種への応用可能性を実証する。具体的には以下の実験を行った。

1. エピジェネティック変異誘導の分子機構解明

(1-1) エピジェネティック変異の方向付けにおけるゲノム DNA メチル化状態変化の経時的推移

エピジェネティック変異の方向付け処理により抵抗性を獲得したイネを全ゲノムメチル化解析したところ、ゲノム DNA の特定領域に低メチル化変化が見出された。この変化はイネの脱分化・再分化過程のいずれかの時期に誘導されると考えられる。そこで、脱分化・再分化過程のプライミング誘導剤処理過程において、抵抗性獲得イネのゲノムに認められた DNA メチル化変化がいつ誘導されるのかを全ゲノムメチル化解析により明らかにする。

(1-2) メチル化状態変化が認められた領域のヒストン修飾状態変化の解析

DNA メチル化状態の変化は、ヒストン修飾の状態変化によって相互に調節されている。そこで、低メチル化変化が認められたゲノム領域におけるヒストン修飾状態をヒストン ChIP 解析する。具体的には、遺伝子発現の正の調節と世代を超えたエピジェネティック変異の維持に関与すると考えられている H3K4me [Li et al. Nat. Plants 6:661-674 (2020)] について調べた。

2. エピジェネティック変異の方向付け処理の多植物への適用可能性検証

(2-1) 他の植物種へのエピジェネティック変異の方向付け処理による病害抵抗性の付与

栽培においてマイクロプロパゲーションによる苗の生産が行われており、世界的に病害が問題化している重要作物であるバナナについて、脱分化・再分化過程にプライミング誘導剤を処理し、得られた再生植物 (150-0) の病害抵抗性を対照植物 (0-0) と比較し、イネと同様に抵抗性が獲得されるか否かを確認した。

(2-2) 病害抵抗性獲得植物における遺伝子発現の網羅的解析

(2-1)により病害抵抗性の獲得が確認された植物について、RNA-seq により遺伝子発現を網羅的に調べ、GO 解析等によりイネと同様なプライミング誘導の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) エピジェネティック変異の方向付けにおけるゲノム DNA メチル化状態変化の経時的推移

全ゲノムメチル化解析の結果、脱分化・再分化過程を経たイネには PBZ 処理の有無にかかわらずメチル化変化が生じたが、PBZ 処理はそのセットを変化させることが明らかになった。また、再生植物で発生するメチル化変化の多くはカルスにおける一過的なメチル化変化を経ることが示されたのみでなく、PBZ の有無にかかわらず再生植物にメチル化変化が生じる際には、カルスにおける一過的なメチル化変化が認められることが明らかになった (図 1)。以上の結果は、イネの脱分化・再分化過程におけるエピジェネティック変異の方向づけにはカルスにおける一過的なメチル化変化が必要であり PBZ はこの過程に干渉して再生植物のメチル化変化に新たな遺伝子セットを付加するという驚くべき現象が明らかになった。

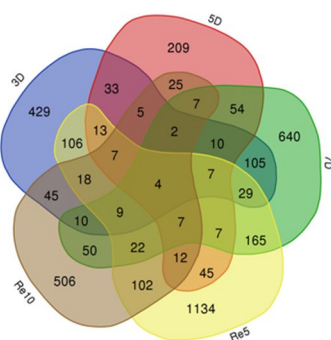


図1 脱分化・再分化過程の各時期におけるカルスに見出された PBZ処理特異的なhypo-DMGの重なりを示したベン図

3D、5Dおよび7D:カルス誘導培地上で培養3、5および7日後、Re5およびRe10:再分化培地上で培養5および10日後

(2) メチル化状態変化が認められた領域のヒストン修飾状態変化

抵抗性を獲得したイネでは多くの遺伝子の H3K4me3 ヒストン修飾が増加しており (図 2)、遺伝子発現が上昇しているものも多数含まれていた。この結果から、PBZ 処理したカルスから再生した抵抗性獲得イネでは、発現変化した遺伝子の多くに H3K4me3 濃縮が増強されており、これらがエピジェネティック変異の方向付けによる病害抵抗性の獲得に密接に関わっていることが明らかになった。また、H3K4me3 ヒストン修飾が世代を超えたエピジェネティックな継承に関与す

る可能性が示唆された。

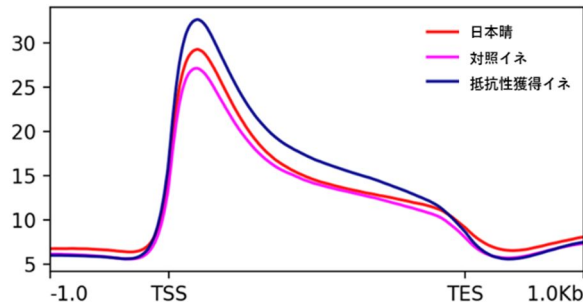


図2 遺伝子座周辺領域におけるH3K4me3の分布を示すメタプロット

メタプロットは全 38749 遺伝子の本体および転写開始点 (TSS) から 1kbp 上流、転写終結点 (TES) から 1kbp 下流までの H3K4me3 濃縮率の平均値を示している。

(3) エピジェネティック変異の方向付け処理のバナナへの適用

エピジェネティック変異の方向付けにより付与される病原菌に対する抵抗性の強さを評価するために、無処理株 (0-0) および処理株 (150-0) の根をバナナ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum Schlechtendal*) を接種し、病徴や感染程度を観察した。

病原菌を接種して 19 日後の各株の外観を観察すると、0-0 株は下位葉から黄化や枯死が見られたのに対し、150-0 の葉は 0-0 で見られたレベルの病徴が認められなかった (図 3a)。また、接種 19 日目の各植物葉の SPAD 値を測定して黄化程度を定量したところ、0-0 では SPAD 値が有意に低下して顕著に黄化が認められたのに対して、150-0 では黄化が全く認められなかった (図 3b)。以上の結果から、無処理対照株である 0-0 には病原菌が感染したのに対して、エピジェネティック変異の方向付けを行った 150-0 株には病原菌が感染せず、顕著な抵抗性を示すことが明らかになった。

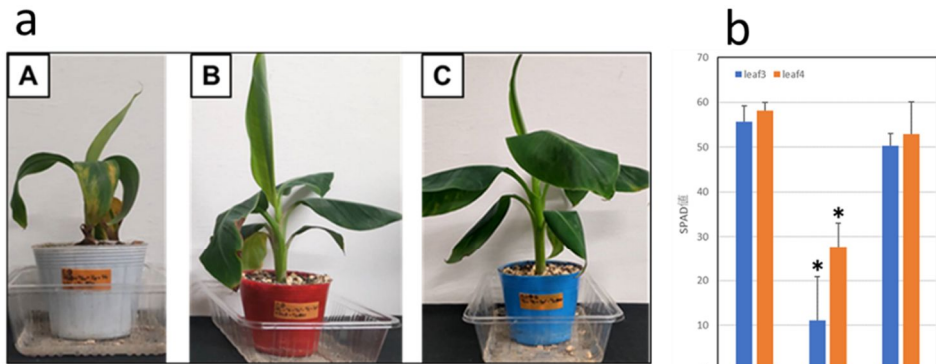


図3 接種19日目における対照処理植物 (0-0)、抵抗性獲得植物 (150-0) における病徴

- (a) 接種19日目における0-0 (A)、150-0 (B) および疑似接種植物 (C) の外観。
 (b) 接種19日目における各植物の第3葉及び第4葉のSPAD値

(4) 病害抵抗性を獲得したバナナにおける遺伝子発現の網羅的解析

バナナ (リファレンスゲノム *Musa acuminata*) の 35171 個の遺伝子のうち、0-0 と比べて 150-0 において有意に発現上昇した遺伝子は 22 個であり、150-0 において有意に発現上昇した 22 個の遺伝子をトランスクリプトーム比較解析したところ、Pathogen infection、Fungi infection、Virulent infection などの生物学的プロセスに関連する遺伝子が 7 個確認された。これらの結果から、150-0 では病害応答に関連する遺伝子が特異的に発現上昇していることが明らかになった。

以上の結果から、我々の方法により病害抵抗性を獲得したイネには、特定のゲノム DNA 領域におけるメチル化変化や H3K4me3 ヒストン修飾が誘導されることが明らかになった。この結果は、エピジェネティック変異の方向付けは、PBZ 処理以降のエピジェネティックな調節機構を介していると考えられた。さらに、我々が開発した方法はバナナにも適用可能であることが明らかになり、特に苗の増殖にマイクロプロパゲーションを用いる多くの植物種に直ちに適用できる可能性が高いと考えられる。

本研究の結果により、我々が開発した「エピジェネティック変異の方向付け」に關与する調節機構の概要が明らかになっただけでなく、日本および米国において特許を取得できたことから、この方法を技術として社会実装するための堅固な基盤が確立できたとと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 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、特許第7475701号	取得年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 UNNATURAL PLANT SHOWING INDUCED GENE EXPRESSION AND METHOD FOR PRODUCING SAME	発明者 ISSEI KOBAYASHI	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第11985932号	取得年 2024年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------