

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26450054

研究課題名（和文）エピジェネティック変異の人為的方向づけによる耐病性植物の作出

研究課題名（英文）Development of disease resistant plants by artificial orientation of epigenetic mutation.

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） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、特殊な処理（RE処理）を施して作製されたイネ個体のゲノム全体に広範なメチル化状態変化が引き起こされることを手掛かりとして、エピジェネティック変異の方向付けによる耐病性イネの作製を試みた。本研究により開発された方法により、エピジェネティック変異による世代を超えた抵抗性状態の維持に成功した。本研究により開発された方法は、エピジェネティック変異を利用した新規育種技術に繋がる可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抵抗性誘導剤処理によって獲得されたイネの病害抵抗性が後代の植物に伝達される現象が見出され、その原因がエピジェネティック変異であることが確認された。従来は遺伝しないと考えられてきた獲得形質が簡単な方法で人為的に導入可能であり、次世代以降に伝わることを見出したことは学術的に大きな意義がある。また、獲得された抵抗性は、世代を超えたプライミング状態の維持に起因すると考えられた。したがって、本研究によって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新規の育種技術開発に繋がる可能性が高く、社会に与える影響から見ても画期的な研究成果であると言える。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, it was revealed that vast change of DNA methylation state in rice plants with RE treatment, which is specific treatment developed by our group. We tried to produce disease resistant rice plants by artificial orientation of epigenetic mutation with the RE treatment. As a result, we succeeded in produce rice plants with trans-generational disease resistance state. The results suggest that the method we developed may contribute to novel breeding technique applied with epigenetic mutation.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ エピジェネティクス 病害抵抗性育種

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つつある。これまで信じられてきた進化の常識では、獲得形質は遺伝しないと考えられてきたが、例えば植物が病原菌や害虫からの攻撃にさらされると、獲得された抵抗性が後代の植物に伝達される現象が、最近の研究から数多く明らかになってきた [Luna et al. (2012), Slaughter et al. (2012), Rasmann et al. (2012)]。エピジェネティクスによる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、遺伝子のプロモーター領域が高度にメチル化されると遺伝子発現が抑制されることは良く知られている [Finnegan et al. (2000), Domcke et al. (2015)]。重要なことに、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して知られている [Kalisz and Purugganan (2004)]。すなわち、植物において獲得形質が遺伝する現象は、エピジェネティクスにより説明できると考えられている。

次世代シーケンサーを用いた我々の最近の研究により、特殊な処理 (RE 処理) を施すことにより作製されたイネ個体 (RE 個体) のゲノム DNA メチル化状態を野生型と比較した結果、ゲノム全体に広範なメチル化状態変化が引き起こされることが明らかになった。さらに、野生型イネと RE イネ個体において遺伝子発現を比較したところ、顕著な発現変化を示す遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化されていることも明らかになった。

2. 研究の目的

RE 個体の *LTP2* 遺伝子プロモーター領域は高い頻度で完全に脱メチル化されていた。この脱メチル化変異は、数代にわたって遺伝することが確認され、安定したエピジェネティック変異であることが明らかになった。さらに、この遺伝子は種子および RE 個体作製過程で高発現することから、細胞において高い発現を示す遺伝子に選択的にメチル化状態変化が起こる可能性が示唆された。一方、最近の研究から、病原菌接種によって誘導される遺伝子発現がDNA メチル化によって制御されることが明らかになってきた。例えば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 [Downen et al. (2012)] や PAMP 処理による防御遺伝子発現が RNA 依存的 DNA メチル化 (RdDM) により制御されること [Yu et al. (2013)] が明らかになっている。このことは、防御応答に関連する重要な遺伝子の発現はゲノム DNA のメチル化状態変化によって制御されていることを示している。さらに、抵抗性が準備状態となる「ブ

ライミング」はDNA メチル化状態の変化に起因する可能性も指摘されている [Pieterse (2012)]。

以上のことを総合すると、防御関連遺伝子の発現を強く誘導する条件下で RE 個体を作製すると、防御応答に関連する多くの遺伝子のメチル化状態が変化し、プライミング状態が維持された RE 植物を作出できることが期待される。予備試験を行った結果、このような処理をしたイネ RE 個体にはいもち病抵抗性が高まることが明らかになり、エピジェネティック変異が方向づけられる可能性が強く示唆された。

本研究では、以上のような事実および予備試験の結果を踏まえ、植物ゲノム DNA のメチル化状態を人為的に方向づけることによる植物の耐病化を試みる。また、全ゲノムのメチル化状態変化と防御関連遺伝子の発現変化との相関を調べ、エピジェネティック変異が人為的に誘導されたことを証明し、これらの変異の遺伝的安定性を検討して実用的な耐病性植物作出の可能性を探る。

3. 研究の方法

研究期間を通して、材料にはイネ (品種: 日本晴) を用いた。また、イネのいもち病抵抗性を定量化するために、GFP を発現するよう形質転換したイネいもち病菌を用いた。いもち病抵抗性の程度は、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡によるいもち病菌感染部位の詳細な観察によって調べることとした。具体的な実験は以下の方法により実施した。

(1) RE 個体作成過程における防御遺伝子発現の誘導および RE 条件の検討

RE 過程において防御関連遺伝子の発現を誘導するため、RE 前期過程または RE 後期過程あるいはその両方に抵抗性誘導剤を7日間処理し、抵抗性関連遺伝子の発現を指標として防御応答の発現をモニターした。この方法により防御関連遺伝子の発現が最も強く誘導され、最も効率的に RE 個体が得られる条件を検討した。また、対照 RE 個体として、RE 過程において抵抗性誘導剤を処理しない個体 (RE-0 個体) を作製した。

(2) RE イネ個体のいもち病抵抗性の検討

RE 処理によって得られたイネ個体を2~3週間栽培後、植物体から葉鞘を切り出し、内腔に GFP 発現イネいもち病菌を接種して48時間後のいもち病菌感染菌糸の伸長を蛍光顕微鏡により観察した。同様の方法により育成した野生型イネあるいは RE-0 個体と比較することにより、抵抗性を獲得したか否かを検討した。また、RE イネ個体を圃場で栽培して十分量の種子を採種し、次世代におけるいもち病抵抗性を確認するとともに、次年度以降の実験に用いた。

(3) RE 個体に獲得されたいもち病抵抗性の遺伝的安定性の検討

前年度に栽培したイネの種子を用い、(2)と同様の方法により RE イネ個体のいもち病抵抗性を継続的に調査した。平成 26 年度から 3 年間にわたって調査を継続し、R0 個体 (RE 当代) から R2 個体 (次々世代) においていもち病抵抗性が遺伝的に安定であるかを検討した。

(4) RE イネ個体における防御関連遺伝子の発現解析

いもち病抵抗性を獲得した RE 個体、野生型イネ個体および RE-0 個体にイネいもち病菌を接種し、12、24 および 48 時間後における *PBZ1*、*PR1* 等の mRNA 発現を比較した。

さらに RE 個体と野生型イネ個体との間の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較するため、接種後 0 時間および 24 時間の各個体から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。

(5) RE イネ個体および野生型イネ個体の全ゲノム DNA メチル化解析

バイサルファイト・NGS 法 [Krueger et al. (2012)] を用いて、RE イネ個体のゲノム全体におけるメチル化状態を野生型イネ個体あるいは RE-0 個体と比較することにより、特にプロモーター領域のメチル化状態が変化した遺伝子を網羅的に探索した。また、バイサルファイト・サンガーシーケンス法 [Fraga and Esteller (2002)] により、これらの遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態変化の状態を確認した。

さらに、(4)の結果と総合して、防御関連遺伝子の発現変化とそれらの遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化状態変化との相関を検討することにより、エピジェネティクス制御が人為的に方向づけられたことがいもち病抵抗性の獲得に関与するか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) RE 処理過程で防御関連遺伝子の発現を誘導するため、RE 処理前期または RE 処理後期あるいはその両方に抵抗性誘導剤を 7 日間処理し、RE イネ個体が得られる条件を検討した。この結果、いずれの処理によっても RE 個体は得られるが、前期課程、後期課程共に高濃度の抵抗性誘導剤を与えた場合には RE 植物の形成率が低下することが明らかになった。

(2) (1) により作製された RE 植物を用いて、いもち病抵抗性を予備的に検討した結果、RE 過程前期に抵抗性誘導剤を処理するのみで、耐病化した RE 植物個体 (RE 当代個体; RE0) が得られることが明らかになった。さらに、自殖後代 (RE1) のいもち病抵抗性を確認したところ、いずれの個体においてもい

もち病抵抗性が維持され、この表現型が後代に遺伝する可能性が示唆された。

そこで、抵抗性誘導剤を RE 処理前期のみ (50-0 および 150-0 系統) RE 処理後期のみ (0-50 および 0-150 系統) あるいはその両方 (50-50 および 150-150 系統) に添加し、独立に作製された 5~10 系統を得た。これらの系統群および抵抗性誘導剤処理をせずに対照系統群 (0-0 系統) について、いもち病抵抗性の強さを検討した結果、プロベナゾール処理した再生系統は全て有意ないもち病抵抗性を示し、これらの系統の第 2 代 (RE2) および第 3 代 (RE3) も R0 と遜色ないいもち病抵抗性を示すことが明らかになった (図 1)。これらの結果は、カルスを抵抗性誘導剤処理することによりいもち病抵抗性イネを作出することが可能であり、この抵抗性は世代を超えて安定的に遺伝することを強く示唆した。

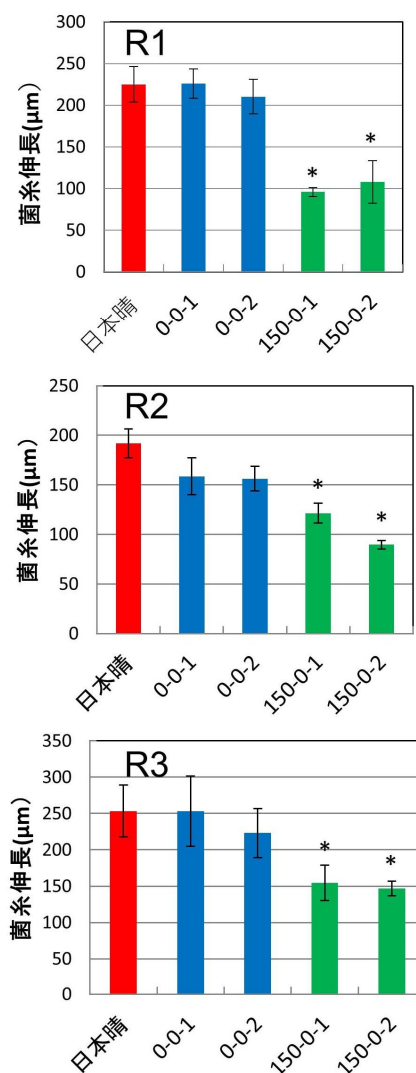


図 1 RE 植物の自殖第 1 代 (R0) から第 3 代 (R3) イネのいもち病抵抗性

0-0: RE 処理において抵抗性誘導剤を処理しなかった対照イネ系統

150-0: RE 処理過程前期において抵抗性誘導剤を処理したイネ系統

*: 日本晴に比べて有意差あり (P < 0.05)

(3) RE 処理イネ個体において DNA メチル化状態が変化する機構の手掛かりを得るため、RE 処理過程のイネと常法で栽培したイネにおける遺伝子発現と作製された RE 植物における DNA メチル化状態変化の関係を調べた結果、RE 植物においてプロモーター領域の脱メチル化が生じた遺伝子は RE 処理過程のイネにおいて高発現する遺伝子であることが明らかになった(図2)。

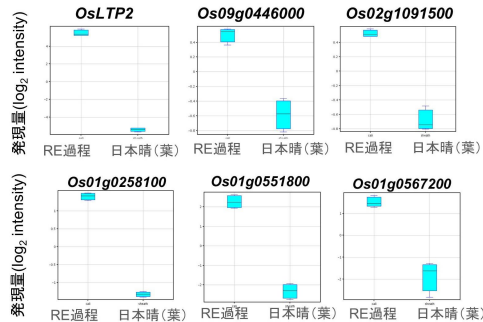


図2 REイネ個体においてプロモーター領域が低メチル化変化した遺伝子のRE過程およびイネ植物体における発現

この結果は、RE 処理過程において特定の遺伝子セットを高発現させることにより、エピジェネティックな状態を人為的に制御できる可能性を強く示唆した。

(4) RE 処理過程で抵抗性誘導剤を処理することにより得られたいもち病抵抗性イネ(150-0 系統の R2 植物)と抵抗性誘導剤処理を施さなかった対照植物(0-0 系統の R2 植物)および日本晴の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に比較した。

この結果、対照である 0-0 系統と比較して、150-0 系統で有意に発現上昇している遺伝子が 535 個見いだされ、上位 50 のうち 27 遺伝子は thionin、thaumatin、chitinase 等を含む、良く知られた抗菌性タンパク質をコードする防御関連遺伝子であった。また、これらの遺伝子発現は、いもち病接種によって顕著に発現上昇したが、接種 24 時間後の発現量には、150-0 系統、0-0 系統および日本晴の間に差異が認められなかった(図3)。

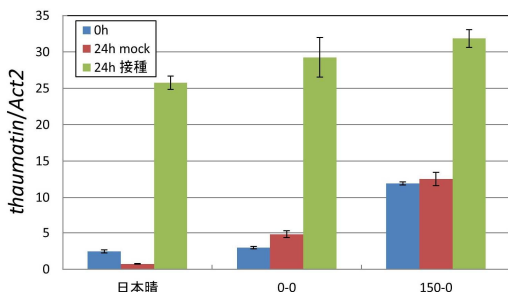


図3 いもち病菌接種前及び接種後の日本晴、0-0および150-0イネにおけるthaumatin遺伝子の発現

Thaumatin遺伝子の発現量は、Actin2遺伝子を内部標準としてこの遺伝子の発現量に対する比で表した。

これらの結果は、RE 処理過程で抵抗性誘導剤処理することにより抵抗性プライミング状態が誘導され、作製された RE イネ個体にこの状態が維持され、少なくとも2世代にわたってこの状態が安定的に遺伝することが明らかになった。以上のように、RE 処理過程で誘導された抵抗性プライミング状態が植物体に安定的に遺伝したことから、RE イネ系統に認められた表現型方向付けは、エピジェネティック変異の結果であることが示唆された。

(5)(4)の結果より、RE 処理過程における抵抗性誘導剤処理は、後代まで安定的に遺伝するエピジェネティック変異を誘導し、RE イネ系統の表現型が方向づけられることを示唆した。そこで、パイサルファイト・NGS 法を用いて、RE イネ系統(150-0 系統、対照である 0-0 系統)および日本晴のゲノム全体におけるメチル化状態を解析した。

この結果、(4)の結果から見出された 150-0 系統で発現上昇した遺伝子(プライミング状態を示す遺伝子)のうち、防御応答に直接関与する遺伝子のプロモーター領域には、DNA メチル化パターンの変化は認められなかった。しかしながら、有意に発現上昇した遺伝子のうち、転写因子をコードするいくつかの遺伝子プロモーターには、明瞭な DNA メチル化変化が認められた(図4)。

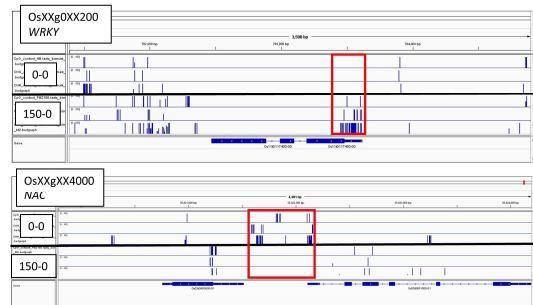


図4 150-0系統において有意な発現上昇を示した転写因子をコードする遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化変化

0-0および150-0のCG(上段)、CHG(中段)およびCHH(下段)モチーフのメチル化率を示す

赤枠:150-0系統において0-0に比べ有意な発現上昇を示したWRKY(上図)およびNAC遺伝子(下図)のプロモーター領域を示す。

以上の結果は、RE 処理過程におけるエピジェネティック変異の方向付けは、直接的に防御に関係する抗菌性タンパク質等をコードする遺伝子の近流で発現制御の鍵となる転写因子に誘導されていることが示唆された。このような DNA メチル化変化は、イネのいもち病抵抗性に決定的に重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる。

これまで、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きた(それは「順化」であり「適応」ではない)。本研究により、RE 処理中に抵抗性誘導剤を処理すると、作製されたイネが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、抵抗性誘導剤で処理したイネとほぼ同等の抵抗性が少なくとも継代2代目まで遺伝的に維持されたことから、本法によればこれまでの常識とは異なる性質をもつ植物を作製できる可能性が示唆された。

以上に述べてきた通り、これらの RE イネ個体において、いもち病抵抗性が遺伝する現象は、エピジェネティック変異の人為的誘導により説明できると考えられる。興味深いことに、抵抗性獲得 RE 個体にイネいもち病菌を接種 24 時間後には、代表的な防御関連遺伝子である PBZ1 や PR1a の発現に野生型との差は認められない。しかし、接種前の植物では、接種後に発現誘導されるいくつかの防御関連遺伝子が有意に発現上昇しており、プライミング状態にあることが明らかになった。したがって、この方法で作製された植物が示すいもち病抵抗性は、防御応答を制御する転写因子に誘導されたエピジェネティック変異による世代を超えたプライミング状態の維持に起因すると考えられる。抵抗性を獲得した RE 植物は、野生型の日本晴と比較して、圃場での生育や収量に特に遜色は認められなかった。この結果は、これらの RE 植物が抵抗性をフルに維持することによる余分なフィットネスクストを払っていないことを示している。

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育種技術開発に繋げられる可能性が極めて高いと考えられる。

<引用文献>

- Domcke S et al. (2015) Nature 528:575-79.
Downen RH et al. (2012) PNAS 109: E2183-E2191.
Finnegan EJ et al. (2000) Curr. Opin. Genet. Dev. 10:217-223.
Kalisz S, Purugganan MD (2004) Trends Ecol. Evol. 19:309-314.
Luna E et al. (2012) Plant Physiology 158:844-853.
Pieterse C (2012) Plant Physiology 158:545.
Rasmann S et al. (2012) Plant Physiology 158:854-863.
Slaughter A et al. (2012) Plant Physiology 158:835-843.
Yu A et al. (2013) PNAS 110:2389-2394.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- Asai Y, Kobayashi Y, Kobayashi I, (2016) Increased Expression of the Tomato *SISWEET15* Gene During Grey Mold. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 査読有, 7, 1-8.

doi:10.4172/2157-7471.1000329

[学会発表](計5件)

小林裕子、小林一成, エピジェネティック変異の人為的方向付による耐病性育種の可能性, 平成 27 年度日本植物病理学会関西支部会, 2015 年 09 月 29 日~2015 年 09 月 30 日, あわぎんホール(徳島県徳島市).

Furihata T, Ito A, Kobayashi Y, Kobayashi I, Genome-wide changes of DNA methylation of regenerated rice and possibility of the artificial orientation. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 03 月 16 日~2015 年 03 月 18 日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区).

Furihata T, Kobayashi Y, Kobayashi I, Genome-wide changes of DNA methylation of regenerated rice and possibility of the artificial orientation. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日~2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区).

Furihata T, Kobayashi Y, Kobayashi I, Genome-wide Changes of DNA Methylation of Regenerated Rice and Possibility of the Artificial Orientation. The Sixth International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2014), 2014, Oct 16-17, Mie Univ. (Tsu).

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)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: 9 0 2 0 5 4 5 1

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小林 裕子(KOBAYASHI, Yuhko)