

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04435

研究課題名(和文) 乾燥回避に寄与するイネ根系の表現型可塑性をもたらすエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of root phenotypic plasticity contributing drought avoidance in rice

研究代表者

犬飼 義明 (Inukai, Yoshiaki)

名古屋大学・農学国際教育協力研究センター・准教授

研究者番号：20377790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主軸根の伸長阻害に応答した側根の補償生長機構、およびメリステムサイズの大きなL型側根の形成に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。はじめに、土壌の圧縮などにより主軸根の伸長が阻害された時に、障害を受けた根端近傍での側根発育が促進される現象に着目し、人為的に種子根の根端を切除しL型側根を発生させることで側根原基の発生過程と側根メリステムサイズ変化の関係性を捉えられる実験計の確立を目指した。次に、この根端切除による側根形態の変化に基づいて、ゲノムワイドに遺伝子のヒストン修飾レベルを解析するChIP-Seq法によって、L型側根の発生に関わる遺伝子や分子機構の解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Development of lateral roots (LRs) is promoted when parental root elongation is suppressed. Promotion of LR growth compensates for parental root growth, which contributes to the maintenance of total root length. However, the developmental processes underlying the compensatory growth of LRs are still unclear. In this study, we induced LR compensatory growth in rice by surgical excision of a parent root tip, and analyzed the morphological and anatomical changes in LRs. Our analysis revealed that the morphological and anatomical changes of LRs that are induced by the root-tip excision of the parent vary continuously, and are dependent on both the developmental stage of LR primordia at the site of root-cutting and the distance from the cut site. Then, by using this method, we also tried to understand the important genes that regulate LR development epigenetically through ChIP-Seq analysis with Histone H3K27me3 antibody.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 根系形成 分子機構

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的な干ばつが頻発する中、根系改良による耐乾性育種が注目されている(例えば, Ahmadi *et al.* 2014)。これまでに我々は、様々な水稻品種・系統を対象に耐乾性程度を評価し、ストレス下において側根の発達が著しく優れる品種・系統群が高い耐乾性を示すことを明らかにした(Tran *et al.* 2014, Kano-Nakata *et al.* 2013, Niones *et al.* 2013)。興味深いことに、土壌水分が潤沢に存在する環境下では耐性品種群と感受性品種群の側根発達程度の間には大きな差異が認められなかったため、低土壌水分状態に応答した根系形態の可塑的応答が乾燥ストレス回避にとって重要であると考えられる。イネの側根にはメリステムサイズの大きなL型側根と小さなS型側根が存在し、前者のみが長く伸長でき、かつさらに高次の側根を発生させる能力を持つため、ストレス下において側根の発達を高めるにはL型側根化(側根メリステムサイズの増加)を促す必要がある。しかしながら、このような側根メリステムサイズの可塑性をもたらす分子機構は全く解明されていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、主軸根の伸長阻害に応答した側根の補償生長機構、およびL型側根の形成に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした。はじめに、土壌の圧縮などにより主軸根の伸長が阻害された時に、障害を受けた根端近傍での側根発育が促進される現象に着目し、人為的に種子根の根端を切除しL型側根を発生させることで側根原基の発生過程と側根メリステムサイズ変化の関係性を捉えられる実験計の確立を目指した。次に、この根端切除による側根形態の変化に基づいて、ゲノムワイドに遺伝子のヒストン修飾(H3K27me3)レベルを解析するChIP-Seq法によって、L型側根の発生に関わる遺伝子や分子機構の解析を試みた。

### 3. 研究の方法

種子根の根端切除に応答した側根形成パターンの解析

水耕法により栽培した播種4日後のイネ品種「台中65号」の種子根を根端近傍で切除し、切除10日後に種子根に形成された側根の直径、根長、分枝の有無について調査した。側根原基の観察では、播種4日後の種子根をTOMEI-I(Hasegawa *et al.*, 2016)により透明化処理し、微分干渉顕微鏡を用いて側根原基の直径及び長さを測定した。

側根基部の内部構造は樹脂切片またはビブラトーム切片を作製して観察した。種子根切断処理の4日後に切断部位から根端からの相対距離10%以内に生じた側根の中で、最も直径の大きな側根の基部を樹脂切片作製時はFAA溶液中、ビブラトーム切片作製時にはdH<sub>2</sub>O中に回収し、バキュームポンプ

で30分間脱気した。

樹脂切片作製では、その後FAA溶液を新たなものに交換し、24時間4°Cにて浸漬した。その後、脱水のためFAA溶液を70%、80%、90%、95% EtOHにそれぞれ順に1時間ごとに交換し、さらに100%EtOHに1時間ごとの交換を2回したのち、Technovit 7100(Heraeus Kulzer, Germany)を用いて樹脂へ置換した。樹脂への置換では、主剤100mlに対して硬化剤Iを1袋加えた浸透液、浸透液と硬化剤IIを15:1の割合で混合した重合液を用いた。まず、100%EtOHを100%EtOH:浸透剤=1:1の混合液に交換し、一晚4°Cにて浸漬した。その後、1日ごとの浸透液交換を4-6回し、包埋した。穴の開いたアルミ板にセットしたポリエチレンキャップに重合液を分注し、サンプルを容器中に沈めて、ピンセットで方向を整えた。その後、アルミ板ごと容器をラップで包み、一晚室温にて硬化させた。容器から取り出した試料ブロックを、接着面が平らになるようにのこぎりで切り、アルミブロックに接着剤で貼り付けた。その後、試料ブロックをのこぎりでトリミングし、ミクロトーム(RM2125 RTS, Leica, Germany)を用いて6µmの切片を作製した。切片をスライドガラス上の水に回収し、室温にて乾燥させた。

一方、ビプラトーム切片の作製では120°C、10分間のオートクレーブにより溶かし、十分に冷ました4%伊那寒天中に脱気したサンプルを包埋し、寒天が冷え固まったのち、カミソリにより試料を含む寒天ブロックを切り出した。その後、ビプラトーム(VT 1200S, Leica, Germany)により75µmの横断切片を作製した。その後、光学顕微鏡を用いて作製した切片の画像を取得した。画像処理ソフト(LIAforWin32)を用いて、維管束直径と基本組織(外皮、厚壁組織、皮層、内皮)の厚さを測定し、また基本組織の層数を計測した。

根端切除に応答してH3K27me3レベルが変動する遺伝子群の同定

異なる環境下で栽培した根の細胞をサンプリングし、ホルムアルデヒドによりDNA-タンパク質を架橋した。次に、超音波によりDNAを断片化し、H3K27me3を対象としたChip(クロマチン免疫沈降)法により同抗体回収したDNA断片を高速シーケンサーにかけて塩基配列を解読した。

ChIP-seqにより得られたリードをBowtie2により日本晴リファレンスゲノム(RAP-DB, Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0, <http://rapd.b.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>)にマップングした。得られたSAMファイルをSAMtoolsにより、BAM形式に変換した後、インデックス化を行った。

MACS2によりH3K27me3レベルの異なるゲノム領域を検出した。まず、サンプルTC-cut, TC+cutのそれぞれについてDNA断片

の長さを macs2 callpeak で 2 反復まとめて推定した。次に、macs2 callpeak の -B オプションにより TC - cut, TC + cut のそれぞれについて、2 反復のマッピングデータをまとめた全ゲノム領域のリード数を含む bedgraphfile を作成した。この時、extsize は TC - cut, TC + cut で推定された値の中間値を用いた。次に、作成した bedgraphfile をもとに、macs2 bdgdiff によって TC - cut, TC + cut で異なる H3K27me3 レベルのゲノム領域 検出した。この時、最小の検出ピークサイズを -l オプションで 200 bp、最大のギャップ領域サイズを -g オプションで 100 bp、likelihood の閾値を -c オプションで 10<sup>-3</sup> とした。次に、検出された H3K27me3 レベルが処理区間で異なるゲノム領域から遺伝子領域に重なる領域を検出した。まず、RAP-DB の Gene structure information in GFF format (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/download/irgsp1.html>) から全遺伝子の TSS および TTS サイトの情報を抽出した。次に、BEDtools の intersectbed コマンドを用いて、検出されたゲノム領域の中から、TSS から 1,000 bp 上流まで、TTS から TSS, TTS から 1,000 bp 下流までのいずれかの領域に重なる領域を検出し、領域のアノテーションおよび処理区間で H3K27me3 レベルの異なる遺伝子の同定を行った。同定された遺伝子群に関して、AGRIGO の Singular Enrichment Analysis (SEA) によって、Gene Ontology (GO) 解析を行い、p-value または FDR が 0.05 以下の GO タームを検出した。

#### 4. 研究成果

##### 種子根の根端切除にตอบสนองした側根形成パターンの解析

側根原基の発生段階は、未だ側根が現れていない根端-側根の長さを 100 とした場合、根端からの相対距離と密接な関係があることから、種子根を様々な根端からの相対距離にて切断し、根端切除後に形成された側根の形態を調査することで、側根原基の発生段階と根端切除へのตอบสนอง性の関係を調査した。その結果、根端からの相対距離 60% までの側根原基 (直径 ~70 μm) が根端切除にตอบสนองして分枝を形成する性質を保持しており、より発生段階の進んだ側根原基も根端切除にตอบสนองして、直径を増加させる能力をもつと考えられた。

次に、根端切除の影響が切断部位からどこまで離れた位置の側根原基に及ぶのかを調べるため、根端切除後、切断部位からの距離別に側根形態の変化を調査した。その結果、切断部から 2.0 cm 以内の側根で直径増加が見られ、1.0 cm 以内に分枝を伴った側根が形成された (図 1)。

側根原基の発生段階と根端切除へのตอบสนอง性には密接な関係があり、側根の直径、長さ、分枝の有無は異なる発生段階において決定されると考えられた。また、根端切除による

側根原基の直径増加はオーキシン以外の因子により引き起こされる一方、直径の大きい側根の分枝形成や伸長にはオーキシンが正に働いているものと予測される。今後は、根端切除によって生じる側根の直径増加がどのような要因により引き起こされるのかを検証していきたい。

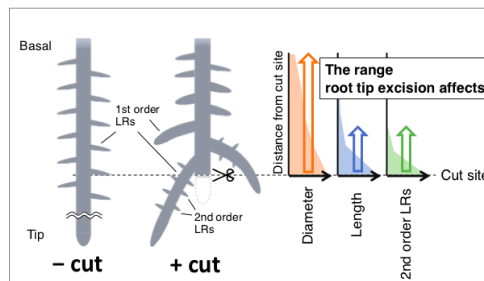


図 1. 根端切除にตอบสนองした側根形態の変化

##### 根端切除にตอบสนองして H3K27me3 レベルが変動する遺伝子群の同定

野生株 TC65 号を用いて根端切除後 24 時間の L 型側根原基を含む種子根 (TC + cut) と根端切除しない S 型側根原基を含む種子根 (TC - cut) を 2 反復ずつサンプリングし、それぞれのサンプルから H3K27me3 抗体で免疫沈降して得た DNA と免疫沈降しない Input の DNA を ChIP-seq 解析に用いた。次世代シーケンサーによるシーケンス解析によりそれぞれ 8 サンプルから 100-120 万の生リードを得た。Bowtie2 によるマッピングでは各サンプルで計 90% 以上のリードがリファレンスゲノムにマッピングされた。次に、ヒストンのメチル化など広範囲のピーク検出に用いられる MACS2 により、マッピングされた H3K27me3 および Input のリードから H3K27me3 標識領域を検出し、根端切除の有無で H3K27me3 レベルの異なるまたは同じ領域を検出した。その結果、根端切除の有無で共通して同程度 H3K27me3 化されているゲノム領域が約 31,000、根端切除区に比べてコントロール区で有意に H3K27me3 レベルの高い領域が約 800、その逆の根端切除区で H3K27me3 レベルが高い領域が約 1,200 検出された (表 1)。これらの領域についてアノテーションを試みたところ、根端切除の有無で同程度に H3K27me3 化されている領域から約 19,000、根端切除区に比べてコントロール区で有意に H3K27me3 レベルの高い領域から約 300、その逆の根端切除区で H3K27me3 レベルが高い領域から約 01,000 が遺伝子 (TSS から 1 kb 上流-TTS から 1 kb 下流) にアノテーションされた。また、アノテーションされた領域と 遺伝子との位置関係に着目すると、根端切除の有無で共通して同程度に H3K27me3 化されているゲノム領域、根端切除区に比べてコントロール区で有意に H3K27me3 レベルの高いまたは低い領域のいずれにおいても、遺伝子の Gene body に位置

する領域の割合が多く、特に根端切除区で有意に H3K27me3 レベルの高い領域では 67.7%と最もその割合が大きかった。コントロール区で有意に H3K27me3 レベルの高い領域では、2 番目に Upstream (24.1%)、3 番目に Downstream (22.7%)に位置する領域の割合が大きかった。次に、これら領域がアノテーションされた遺伝子数を算出したところ、約 12,000 遺伝子は根端切除の有無で同程度に H3K27me3 化されている一方、根端切除によって 246 遺伝子で H3K27me3 レベルが低下し、また 946 遺伝子で上昇していた(表 1、図 2)。

表 1. MACS2 により同定された領域数と遺伝子にアノテーションされた領域数および処理区間で H3K27me3 レベルが共通または異なる遺伝子数

	Total regions	Annotated regions	Genes	
Common	30,734	18,960	11,937	
TC - cut_enriched	781	278	246	
TC + cut_enriched	1,170	1,063	946	

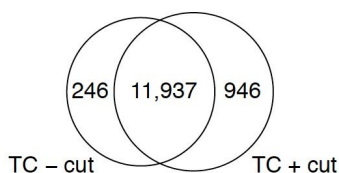


図 2. 非ストレス区および根端切除区における H3K27me3 化された遺伝子数の比較

GO 解析により、根端切除によって H3K27me3 レベルが低下または上昇する遺伝子群にどのような働きをもつ遺伝子が多く含まれるか解析した。根端切除により H3K27me3 レベルが低下、上昇するいずれの遺伝子群においても、Biological process のオントロジーで “regulation of transcription”, “transcription”, “regulation of gene expression”, Molecular function のオントロジーで “transcription regulator activity”, “transcription factor activity” といった遺伝子の転写やその制御に関わる GO タームが有意に濃縮されており、Cellular component のオントロジーにおいても “nucleus” が有意に共通して濃縮されていた。また、”regulation of nitrogen compound metabolic process”, “regulation of biosynthetic process”, “regulation of macromolecule biosynthetic process”, “regulation of cellular biosynthetic process” など、Molecular function のオントロジーで “hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds”, “hydrolase activity, acting on glycosyl bonds” といった生体分子の生合成やその制御に関わる GO タームも共通して有意に濃縮されていた。

根端切除により H3K27me3 レベルが低下する遺伝子群では、Biological process および Molecular function のオントロジーでは

H3K27me3 レベルが上昇する遺伝子群にも含まれる GO タームのみが濃縮されていた一方、Cellular component では “intracellular membrane-bounded organelle”, “membrane-bounded organelle” といった膜に局在するタンパク質を示す GO タームが特異的に濃縮されていた。一方、根端切除により H3K27me3 レベルが上昇する遺伝子群では、低下する遺伝子群と比較してより多くの GO タームが特異的に濃縮されていた。Biological process のオントロジーでは、 “peptide transport”, “oligopeptide transport” といったペプチドの輸送タンパク質の GO タームが濃縮されていた。また、H3K27me3 レベルが上昇する遺伝子群では、細胞壁の合成や構成に関わる GO タームが有意に濃縮されており、細胞壁の物性の変化が側根メリステムサイズの制御に関与している可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

Ahmadi, N. et al. 2014. The roots of future rice harvests. *Rice* 7: 29.

Tran, T. et al. 2014. Nitrogen application enhanced the expression of developmental plasticity of root system triggered by mild drought stress in rice. *Plant Soil* 378: 139-152.

Kano-Nakata, M. et al. 2013. Functional roles of the plasticity of root system development in dry matter production and water uptake under rainfed lowland conditions. *Field Crop. Res.* 144: 288-296.

Niones, J. M. et al. 2013. Roles of root aerenchyma development and its associated QTL in dry matter production under transient moisture stress in rice. *Plant Prod. Sci.* 16: 205-216.

#### 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 5 件)

Inahashi, H., Shelley, I. J., Yamaiuchi, T., Nishiuchi, S., Takahashi-Nosaka, M., Matsunami, M., Ogawa, A., Noda, Y. and Inukai, Y. 2018. OsPIN2, which encodes a member of the auxin efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation patterns via the regulation of auxin distribution in rice. *Physiologia Plantarum.* (in press) doi: 10.1111/ppl.12707. < 査読有り >

Suralta, R., Kano-Nakata, M., Niones, J. M., Inukai, Y., Kameoka, E., Thiem, T. T., Menge, D. M., Mitsuya, S. and Yamauchi, A. 2018. Root plasticity for maintenance of productivity under abiotic stressed soil environments in rice: Progress and prospects. *Field Crops Research*, 220: 57-66. < 査読有り >

Shelley, I. J., Watanabe, S., Ozaki, H., Nagasawa, N., Ogawa, A., Takahashi-Nosaka, M., Nishiuchi, S., Yamauchi, A., Kitano, H. and Inukai, Y. 2018. Analysis of the rrl3 mutants reveals the importance of arginine biosynthesis in the maintenance of root apical meristem in rice. Journal of Plant Studies 7: 36-46. <査読有り>

Kawai, T., Nosaka-Takahashi, M., Yamauchi, A. and Inukai, Y. 2017. Compensatory growth of lateral roots responding to excision of seminal root tip in rice. Plant Root 11: 48-57. <査読有り>

仲田(狩野)麻奈・犬飼義明・山内章 2015. イネの可塑的な根系発育による水ストレス適応機構. 根の研究 24: 53-62. <査読無し>

[学会発表](計9件)

河合翼、兒島孝明、山内章、犬飼義明：イネにおける種子根の根端切除が側根形成に及ぼす影響．札幌コンベンションセンター、北海道、2018年3月

河合翼、兒島孝明、山内章、犬飼義明：イネの根端切除時における側根形態の可塑的反応機構の解析．九州大学、福岡県、2018年3月

河合翼、兒島孝明、山内章、犬飼義明：イネにおける根端切除法を用いた側根メリステムサイズ制御に関わる遺伝子の探索．大阪府立大学、大阪府、2017年10月

長谷川友美、柴田晃秀、高橋(野坂)美鈴、西内俊策、鮫島啓彰、菊田真由美、槇原大悟、山内章、犬飼義明：根系発育を促すイネ our1 遺伝子の根における発現解析と有用性評価．富山大学、富山、2017年6月

高橋(野坂)美鈴、佐藤(永澤)奈美子、松原 健一郎、犬飼 義明：イネ種子根における OSHB 遺伝子の発現解析 .日本育種学会第131 回講演会、名古屋大学、名古屋市、2017年3月

河合 翼、高橋(野坂)美鈴、山内 章、犬飼 義明：イネにおける種子根の根端切除に 応答した側根の補償生長．日本育種学会第131 回講演会、名古屋大学、名古屋市、2017年3月

犬飼義明. 土壌水分・窒素濃度とイネの根の成長. 第2回植物の栄養研究会、名古屋大学、名古屋、2016年9月

高橋(野坂)美鈴、佐藤(永澤)奈美子、松原健一郎、犬飼義明：イネ種子根における OsHB 転写産物の解析．イネ遺伝学・分子生

物学ワークショップ2016、名古屋大学、名古屋市、2016年7月

Inukai, Y., Nosaka-Takahashi, M., Kano-Nakata, M. and Yamauchi, A. 2015. Functional roles of root developmental plasticity and its contribution to dry matter production under soil moisture fluctuation in rice. The 9th International Symposium of the ISRR. "Roots down under - Belowground solutions to global challenges". Oct. 6-9, 2015. Canberra, Australia. 招待講演

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://icrea.agr.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

犬飼義明 (INUKAI, Yoshiaki)

名古屋大学・農学国際教育協力研究センター・准教授

研究者番号：20377790

(2)研究分担者

高橋実鈴 (TAKAHASHI, Misuzu)

名古屋大学・生命農学研究科・特任助教

研究者番号：20738091

(3)連携分担者

兒島孝明 (KOJIMA, Takashi)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：40509080