

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05960

研究課題名(和文) HDACの遺伝的・化学的変化による環境ストレス応答最適化法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the method fine-tuning response to environmental stress through chemical and genetic manipulation of HDAC activity

研究代表者

上田 実 (Ueda, Minoru)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：30632541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生命の遺伝情報を刻むDNAを折り畳む働きを有するヒストンは、そのN末端で起こるアセチル化等の化学修飾を介して、遺伝子発現を制御する。植物の環境ストレス応答でもその化学修飾を介して重要な役割を果たすことが知られている。代表者はヒストンの脱アセチル化を触媒するHDACの一つ、HDA19の機能抑制がシロイヌナズナの環境ストレス耐性を高めることを見出している。本研究では、HDA19の構造変化によりストレス耐性を高めつつ、結実性低下等の不良形質を回避できることを示した。また、HDA19の酵素活性測定系やクラスI HDAC活性阻害を可視化する系の確立により、HDA19等へ作用する化合物探索を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物処理という一過的な活性調節は、不稔などの農業上の不良形質の顕出を抑制する効果が期待できる。本研究で確立したin vivoやin vitroでのアッセイ系を利用することで、新規の化合物探索が可能となった。今後はよりオフターゲットの少ない、植物HDACにのみ作用する化合物の探索を進め、より緻密なストレス耐性操作方法の確立が期待できる。また、本研究期間内に国際共同研究も展開できており、HDA19が非ヒストンタンパク質の脱アセチル化修飾にも関与することが示唆されている。更なる解析を進めることで、新規のストレス耐性付与機構の同定が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Histone proteins act to package DNA encoding genetic information of living organisms, which wraps around the eight core histones. N-terminus of histone proteins are subjected to a variety of chemical modifications such as acetylation and methylation. These chemical modifications play a pivotal role in response to environmental stresses in plants. Representative researcher has already revealed that the inhibition of HDA19 (an isoform in histone deacetylase gene family) increased tolerance to abiotic stress in Arabidopsis. In this study, the alteration of genomic primary structure of HDA19 increased tolerance to salinity stress with fertility. Establishment of in vivo and in vitro systems measuring inhibitory effect of chemical compounds on HDA19 or class I HDAC activity enables to find novel compounds for the manipulation of response to abiotic stress in plants.

研究分野：エピゲノム制御

キーワード：ヒストンアセチル化修飾 ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC阻害剤 シロイヌナズナ 環境ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

エピゲノムを構成するエピジェネティック制御因子として、DNAメチル化、regulatory RNA、ヒストンの化学的修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化等によるヒストン修飾）、ヒストンバリエーションが挙げられ、これらの制御因子が多様な生命現象に深く関与することが明らかとなっている。近年、シロイヌナズナを中心に、植物での環境ストレス応答に関わるエピジェネティック制御因子の同定が世界レベルで進められており、代表者は特にヒスアセチル化制御因子を対象とした研究を展開している。ヒストンのアセチル化レベルは一般に、転写活性と正の相関があると考えられている。そして、そのレベルは、アセチル化反応を触媒する HAT と脱アセチル化反応を触媒する HDAC の二つの酵素の働きのバランスにより制御されている。代表者は HDAC の機能抑制により誘発される高アセチル化が、ストレス耐性に関わる遺伝子発現を強く誘導することで、植物に環境ストレス耐性を付与可能と考え研究を進めてきた。このような状況下、代表者はこれまでに、HDAC 酵素活性を阻害する化合物である HDAC 阻害剤が植物の塩ストレス耐性を高めることを明らかにし、さらにシロイヌナズナで遺伝子ファミリー(18 遺伝子)を形成している HDAC のうち、その一つである HDA19 の変異体 (*hda19*) が塩ストレスに加えて、高温と乾燥ストレスに対しても耐性を示すことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

hda19 では環境ストレス耐性に関与することが知られている ABA シグナル経路に関わる遺伝子の発現が強く誘導されていた。そのため、ABA シグナル経路の過剰な誘導は糖代謝の異常等による生育阻害や花粉の不稔を誘発することが知られているように、*hda19* も著しい不稔の表現型も示した。代表者の研究も含め環境ストレス耐性強化の副産物として頻りに顕出する生育阻害や不稔性を回避する手法の開発が長年求められていた。本研究では、ゲノム編集 *hda19* 変異体 (*hda19-7*) 後代から出現した、*hda19* 稔性復帰個体(RF *hda19*: Reverted fertility in *hda19*、図 1)における稔性回復の機構を明らか

にする遺伝学的な解析を進め、遺伝学的な手法によりストレス耐性を維持しつつ稔性を高めることが可能であることを示すことを第一の目的とした。これと並行し、化合物処理による一過的な HDAC 活性の阻害は、恒常的に HDAC 活性阻害してしまう変異体で誘導される生育阻害などを回避する有効な手段となり得る。そこで、ストレス耐性強化に関わる HDA19 の活性を阻害する化合物の探索を可能とするアッセイ系の確立を第二の目的とした。

3. 研究の方法

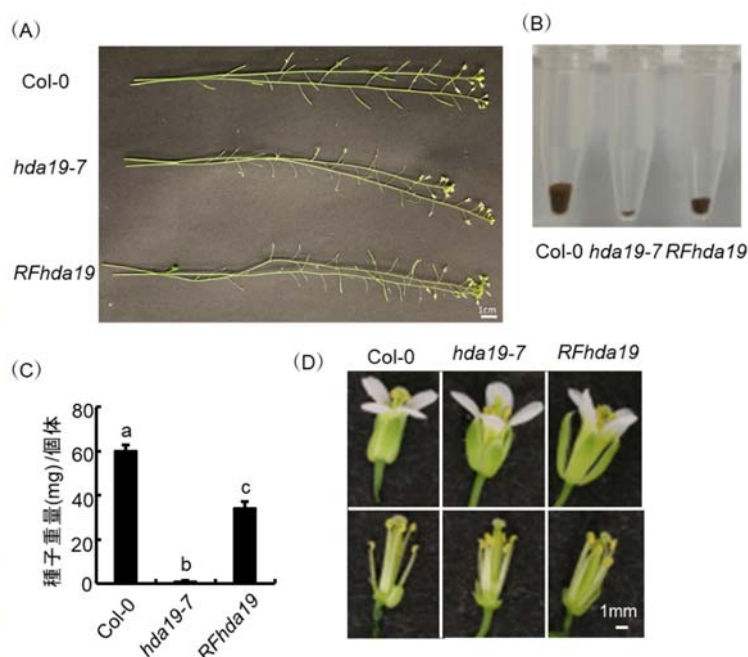


図 1. RF*hda19* の表現型

(A) *hda19* 稔性復帰個体(RF *hda19*: Reverted fertility in *hda19*) の単離 (B) 1 個体分の総種子量 (C) 1 個体あたりの種子の総重量比較 (mg) (n=3, one-way ANOVA, P< 0.05) (D) Stage14 (Smyth et al.1990) での雌蕊と雄蕊の伸長差の比較

(1) *Rfhda19* における遺伝学的解析

相補性検定により *Rfhda19* が *HDA19* 遺伝子座における 1 つの潜性アリルであることを確認する。潜性アリルであることを証明後、*RFhda19* での *HDA19* 遺伝子座におけるゲノム構造を決定する。

(2) *HDA19* 酵素活性測定系の開発

活性のある *HDA19* タンパク質を調製し、*HDAC* 酵素活性を調節し得る化合物を探索するためのアッセイ系を確立する

4. 研究成果

(1) *Rfhda19* の構造決定

HDA19 のタンパク質コード領域に、プロモーター・ターミネーター領域と予想される配列を含むゲノム断片を用いて、*Rfhda19* の相補性検定を行った。その結果、*Rfhda19* の塩ストレス耐性は野生株並みに戻り、*Rfhda19* は *HDA19* の一潜性アリルであるということが示唆された (図2)。*Rfhda19* の塩ストレス耐性は *HDA19* 遺伝子座に連鎖することが判明したので、*Rfhda19* での *HDA19* 遺伝子座のゲノム構造について TAIL-PCR を用いて決定した。その結果、第1イントロンの一部とタンパク質 N 末端領域 (19 アミノ酸) を含む配列の欠失と、外来 DNA (バイナリーベクター配列と高い相動性を示す) の挿入が確認された (図 3A)。外来 DNA に由来する配列上から予想翻訳開始コドンを見出し、その領域が転写されていることも確認できた (図 3B)。この結果から、外来 DNA の挿入によるゲノム再編成が *HDA19* の構造を改変し、ストレス耐性を維持しつつ稔性を回復させる潜性アリルを創出したことが示唆された。

(2) *HDA19* 酵素活性測定系の開発

HDAC 活性を有する組換えタンパク質調製のため、まず大腸菌の発現系を用いた *HDA19* 組換えタンパク質の発現を試みたが、活性をもつタンパク質を調整できなかった。そこで、共同研究者である工藤博士の協力により、ヒト培養細胞の発現系でタンパク質調製を試みたところ、活性型 *HDA19* 組換えタンパク質の調製に成功した。さらに、*HDA19* とは分類されるクラスが異なり、カウンターアッセイ用の *HDAC* として調製を試みた *HDA15* タンパク質についても活性型の組換えタンパク質の調製に成功した。これまでシロイヌナズナ *HDAC* を対象にして、市販

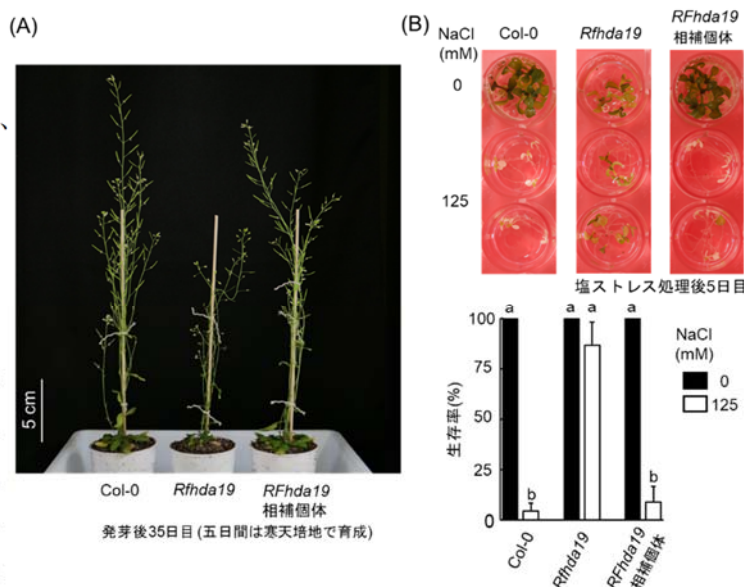


図 2. *RFhda19* の相補性検定

(A) *RFhda19* に野生株の *HDA19* ゲノム断片を導入した *T3* 個体での生育比較 (B) 相補個体の塩ストレス耐性評価 (n=3, 1n=15 plants, one-way ANOVA, P < 0.05)

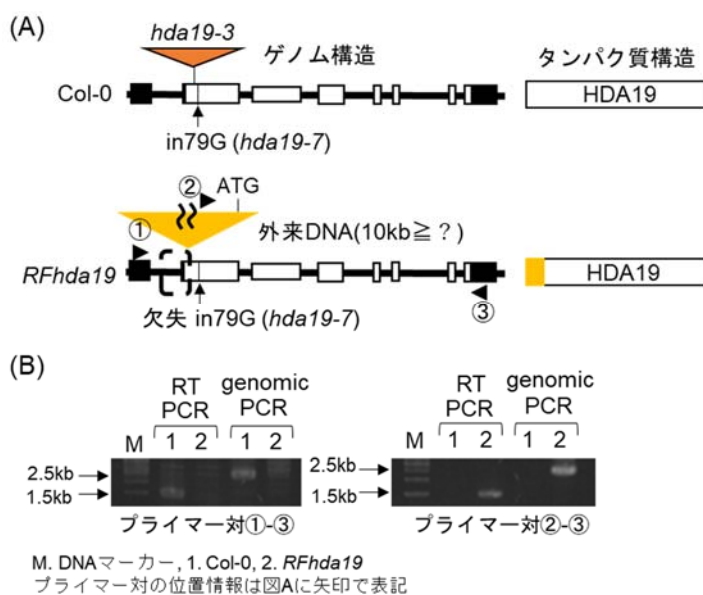


図 3. *RFhda19* で起こったゲノム再編成

(A) *RFhda19* と野生株のゲノム構造比較 (B) *HDA19* 遺伝子座で生じたゲノム再編成領域での遺伝子発現。ゲノム再編成で生じた配列特異的なプライマーで行った RT-PCR により遺伝子発現を確認できた (右図)

される HDAC 阻害剤のクラス選択性を評価した報告は存在しないため、調製したタンパク質を用いたクラス選択性の評価を進めた (表 1)。その結果、このアッセイ系は *in vivo* を反映する評価系であることと、

表 1. シロイヌナズナ HDAC に対する各 HDAC 阻害剤の IC₅₀

HDA19 (クラス I HDAC) については、Trapoxin が、HDA15 (クラス II HDAC) については、Tubastatin A がそれぞれのクラス HDAC へ *in vivo* で高い選択性を示すことを明らかにした (論文投稿中)。

| 化合物 (HDAC阻害剤分類) | HDA15 (クラスII) | HDA19 (クラスI) | クラスI HDAC への選択性 (HDA15/HDA19) |
|---------------------------------|---------------|--------------|-------------------------------|
| FK228 (cyclic peptides) | >100 | 0.057 | >2000 |
| HC-toxin (cyclic peptides) | 4.611 | 0.013 | 352 |
| JNJ-26481585 (hydroxamic acids) | 0.023 | 0.05 | 0.5 |
| LBH589 (hydroxamic acids) | 0.005 | 0.003 | 1.6 |
| MGCD0103 (aminobenzamides) | >100 | 4.4 | >25 |
| MS-275 (aminobenzamides) | >100 | 6.2 | >15 |
| SAHA (hydroxamic acids) | 0.382 | 0.157 | 2.4 |
| Tubacin (hydroxamic acids) | 1.5 | 1.2 | 1.2 |
| Trapoxin A (cyclic peptides) | 0.397 | 0.0005 | 761 |
| TSA (hydroxamic acids) | 0.006 | 0.005 | 1.2 |
| Tubastatin A (hydroxamic acids) | 0.073 | 8.5 | 0.009 |

(3) クラス I HDAC 阻害を GFP 蛍光で評価可能なレポーターラインの作出

各種 HDAC 阻害剤を植物体に処理したサンプルを材料にマイクロアレイ解析を行ったところ、生殖細胞特異的な発現パターンを示す *ASY1* を、HDAC 阻害剤処理が体細胞でも発現誘導することを見出した。*asy1* 欠損株にオウンプロモーター発現制御下の *ASY1:GFP* を導入したところ、*asy1* で観察された生殖器官形成異常が野生株並みに回復することを確認できた。この *asy1* 欠損相補ラインでの各 HDAC 阻害剤処理下での GFP 蛍光を観察したところ、マイクロアレイ解析と同様に、クラス I HDAC 阻害剤を処理した個体でのみ蛍光が確認できた (図 4)。この結果から、*ASY1:GFP* ラインを用いてクラス I HDAC の活性を阻害する新規化合物の探索に有用であることが示唆された。また、植物内生の天然化合物がヒットした場合はその化合物の生合成系の同定が期待できる。

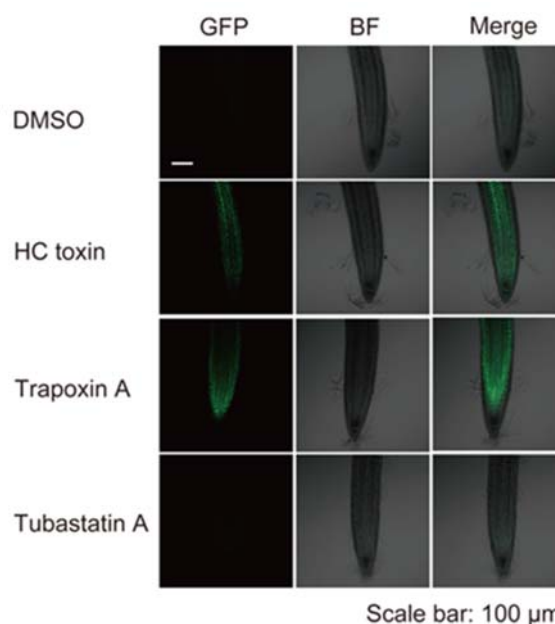


図 4. クラス I HDAC 阻害を可視化するレポーターラインの作出
オウンプロモーターで発現制御下にある *ASY1:GFP* はクラス I HDAC 阻害剤処理により発現が誘導される

(4) 国際共同研究によるアセチローム解析

Rfhda19 が *HDA19* 遺伝子座の潜性アリルであることが明らかとなったことから、*Rfhda19* を材料に多くの植物材料を必要とする大規模なプロテオーム解析が可能となった。この利点を生かし、ドイツ ミュンスター大学の Iris Finkemeier 教授のグループとの共同研究によりアセチローム解析を進め、*hda19* の活性抑制により誘導される新規アセチル化サイトを見出すことに成功している。予想に反し、非ヒストンタンパク質のアセチル化レベルが上昇していることが示唆されており、今後は新たに見出したアセチル化サイトの機能解析を進め、*HDA19* が関わるストレス応答制御機構の分子機序の解明を進めていく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Onosato, Haruki; Fujimoto, Genya; Higami, Tomota; Sakamoto, Takuya; Yamada, Ayaka; Suzuki, Takamasa; Ozawa, Rika; Matsunaga, Sachihito; Seki, Motoaki; Ueda, Minoru; Sako, Kaori; Galis, Ivan; Arimura, Gen-ichiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Sustained defense response via volatile signaling and its epigenetic transcriptional regulation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Plant Physiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/PLPHYS/KIAC077 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Ueda Minoru, Matsui Akihiro, Watanabe Shunsuke, Kobayashi Makoto, Saito Kazuki, Tanaka Maho, Ishida Junko, Kusano Miyako, Seo Mitsunori, Seki Motoaki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Transcriptome Analysis of the Hierarchical Response of Histone Deacetylase Proteins That Respond in an Antagonistic Manner to Salinity Stress | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/FPLS.2019.01323 | 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 Ueda Minoru, Seki Motoaki | 4. 巻 182 |
| 2. 論文標題 Histone Modifications Form Epigenetic Regulatory Networks to Regulate Abiotic Stress Response | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Plant Physiology | 6. 最初と最後の頁 15~26 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/PP.19.00988 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 上田 実、松井 章浩、渡邊 俊介、小林 誠、斉藤 和季、田中 真帆、石田 順子、草野 都、瀬尾 光範、関 原明 |
| 2. 発表標題 Transcriptome characterization of salinity stress response coordinated by histone deacetylase proteins that respond in an antagonistic manner |
| 3. 学会等名 31st International Conference on Arabidopsis Research（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上田 実、工藤 紀雄、松井 章浩、中田 明子、田中 真帆、高橋 聡史、石田 順子、佐々木 卓、吉田 稔、関 原明 |
| 2. 発表標題 HDAC阻害剤のシロイヌナズナHDACに対する選択性評価と可視化 |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上田 実、松井 章浩、渡邊 俊介、小林 誠、齊藤 和季、田中 真帆、石田 順子、草野 都、瀬尾 光範、関 原明 |
| 2. 発表標題 相反する塩ストレス応答を担うヒストン脱アセチル化酵素群による階層的制御の解明に向けたトランスクリプトーム解析 |
| 3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 |
| 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 工藤 紀雄 (Kudo Norio) (80632421) | 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員 (82401) | |

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 | | |
|---------|----------|--|--|
| ドイツ | ミュンスター大学 | | |