

戦略的創造研究推進事業 C R E S T
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明
と応用に向けた基盤技術の創出」
研究課題「フィールド・エピジェネティクス：
環境変動下での頑健性の基盤」

研究終了報告書

研究期間 2015年12月～2021年3月

研究代表者：工藤 洋
(京大大学生態学研究センター、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

自然生育地における野生植物の集団は、人間による播種・植え付け・施肥・病害虫管理を受けることなく継続的に維持されており、そこで見出される頑健性のしくみは、「地球環境が変動する中での極端気象にも対応できる持続的農業」が取り入れるべきしくみとして有望である。また、地球上のバイオマスや炭素収支の相当部分を野生植物が占めるため、「地球環境の変化による生態系サービスの劣化に対応」する観点から、自然生態系での植物頑健性を理解することの重要度は高い。野生植物が複雑な自然環境下で頑健な応答を達成するために持っているエピジェネティックな機構を明らかにし、それを植物の設計・改良をはじめとする様々な技術に利用するのが本研究のねらいである。

「野外条件において分子生物学研究をおこない、植物の頑健性を理解する」という研究の動きは、我が国、そして世界的にも本 CREST 領域が先導している。英国のジョン・イネス研究所では、研究戦略プロジェクト「Genes in the Environment」が始まり、またドイツのマックス・プランク研究所、米国ではイネ科モデル植物を対象に「自然環境下における植物の応答理解」を目的としたプロジェクトが始まった。本チームの研究計画においては、基礎科学としての新規性を出発点として、領域の先駆性がもたらした植物科学における国際競争力が終了時においても保たれることを強く意識した。そこで、真に新しいデータに基づく発見を重視し、工藤グループは世界初めてとなる野外生物集団での長期統合エピゲノムデータ取得を、角谷グループでは動植物を通じてほとんど研究されていないエピゲノム修飾を狙った分子遺伝学的エピゲノム解析を実施した。その結果、植物の頑健性を理解するための新事実が次々と発見された。

その代表は、(1)短期安定と長期変動が両立した季節変動型ヒストン修飾 (Nishio et al 2020 Nature Plants)、(2)長期環境応答に方向性を与えるラチェット制御 (Nishio et al 2020 Nature Com.)、(3)変動環境中でも安定発現を保つエピゲノム構造 (未発表)、(4)ヒストン修飾介在プロモーター (未発表)、(5)トランスクリプトームの日内変動が停止する環境 (未発表)、(6)ウイルス継続感染による季節依存的病徴と防御 (Honjo et al 2019 ISME J)、(7)ヒストン修飾による防御の季節調節 (未発表)、(8)配列特異的な DNA メチル化喪失を引き起こすタンパク質 (Hosaka et al 2017 Nat Com.)、(9)コード領域における抑制クロマチンの機能における H3K4me1 の役割 (Inagaki et al 2017 EMBO J)、(10)近接して逆方向に転写される遺伝子における H3K4me1 の役割 (Inagaki et al 2021 Nature Plants)、(11)コード領域の抑制クロマチン確立機構 (To et al. 2020 Nature Plants) である。

これらの新規制御機構はエピゲノム設計・改変の両面で役に立つ。特に(8)の配列特異的な DNA メチル化喪失機構は、従来法に比べて脱抑制の範囲が非常に大きいことが特徴であり、任意の配列のエピゲノム編集に用いることができる(特許)。また、中間評価において、実際にエピゲノムを変化させて植物を改変してみせることと、実用が得意な研究者との連携が求められた。そこで(4)のヒストン修飾介在プロモーターをターゲット遺伝子につないでシロイヌナズナに形質転換した結果、レポーター遺伝子や花成関連遺伝子に長期低温応答性が付与された。これにより、ヒストン修飾を改変して新たな性質を遺伝子に付与できることが確かめられた。ついで、(5)のマジック温度で予冷処理することが植物工場レタス出荷後の店舗での品質維持を向上させるというアイデアに基づき、さきがけより福田グループを加え予冷効果の最適化を目指した。また、(6)に基づき、ウイルス量の教師付きトランスクリプトームデータを 2000 近く保有することに着目し、英国の Zhou 博士とともに、機械学習によりトランスクリプトームから感染ウイルス量を推定するプラットフォームを構築した。このプラットフォームの汎用性は高く、作物やヒトに感染するウイルスの予測にも使うことができる。さらに、CREST 内の三宅チームと連携し、ウイルス感染の早期検出に対する ROS デバイスの有効性評価をすすめている。

今回発見したエピゲノムの設計原理については、今後新たな研究計画において、順次実験的に検証する。中でも(3)変動環境中でも安定発現を保つエピゲノム構造や(7)ヒス

トン修飾による季節ゲーティングなどは、遺伝子発現調節の技術として重要と考えられる。また、当チームのヒストン修飾検出技術にも波及効果があり、イネの冷害における温度記憶、ササの 60 年周期開花の記憶の共同研究に活用されている。今後、作物や野生植物のエピゲノム研究にさらに貢献することを計画している。最も波及効果が大きいのは、論文発表後に公開するエピゲノム・トランスクリプトーム統合季節動態データベースである。これにより、個々の研究者が、研究対象としている特定の遺伝子についての発現とエピゲノムの長期変化のデータを即座に得ることができる。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 長期統合エピゲノムデータベース

概要：シロイヌナズナ属ハクサンハタザオの自然集団を対象として、エピゲノム・トランスクリプトームデータを 2 週間に 1 回 2 年間にわたって取得した。エピゲノム動態は、遺伝子間領域を含むゲノム全体が対象となることや、抗体を利用とした免疫沈降が必要となるために野外で動態を捕捉することは困難であった。これにより動植物を通じて世界で初めて全遺伝子の発現と 8 種のエピゲノム修飾の季節動態データが得られた。類似のデータセットは知る限り存在しない。

2. ヒストン修飾による季節調節の発見

概要：上記データの解析により、植物の防御機構うち特定の生合成経路の一群の遺伝子に、冬の間、抑制ヒストン修飾が蓄積することが明らかとなった。植物体が傷つけられると、様々な防御機構が発動するが、その一部は食害昆虫の活性が低い冬の間、シャットダウンされていることを示唆する結果である。今回の発見は、植物に、プライミングよりも長い季節的時間スケールで防御の発動を上位にオン/オフする新規機構が存在することを示唆している。

3. ヒストン修飾介在プロモーターの発見

概要：自然条件下でのエピゲノムの季節時系列解析によりヒストン修飾介在プロモーターを発見した。当該プロモーターは、2 週間の低温に応答して遺伝子を発現させる一方で、24 時間の低温にはほとんど応答しない。プロモーター領域におけるヒストン修飾変化による遺伝子発現調節はいまだ報告がなく、重要な発見である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. トランスクリプトームから植物の状態を推定するプラットフォーム

概要：多検体トランスクリプトームと機械学習の技術を組み合わせ、植物ウイルス一宿主系を対象に、感染の有無、組織内のウイルス数を判定することを目的とした機械学習プラットフォームの開発をおこなった。アブラナ科植物ハクサンハタザオの遺伝子発現データから、カブモザイクウイルスの感染の有無と内在ウイルス量を推定することに成功した。汎用性の高いプラットフォームであり、トランスクリプトームデータに広範な機械学習法をあてはめて生物の状態を評価することができる。

2. VANDAL における配列特異性を持った遺伝子発現制御機構

概要：DNA メチル化の低下する変異体で可動化されるトランスポゾン的一种 VANDAL において、このトランスポゾンの各ファミリーがコードする VANC が、同じファミリーの VANDAL をトランスポゾン全体にわたって特異的に脱抑制することを見出した。9 塩基の固有のモチーフが配列特異性を規定することが明らかとなった。特定の領域のエピゲノム編集への応用が可能で、従来法に比べて、脱抑制の範囲が非常に大きいことが特徴であり、特許を取得した。

3. ヒストン修飾介在プロモーターによる植物性質の改変

概要：ヒストン修飾介在プロモーターをターゲット遺伝子につないでシロイヌナズナに形質転換をすると、長期低温応答性が付与され、このプロモーターは温度変化の長期傾向にตอบสนองして発現する性質を遺伝子に付与することが確かめられた。さらに当該プロモーターの欠失実験により、ヒストン修飾呼び込み配列候補の特定も進めている。これは、ヒストン修飾の変化を利用した植物の遺伝子発現調節技術を初めて開発することとなる。この技術は、他の植物にも即座に適用できる。

<代表的な論文>

1. Nishio H, Buzas DM, Nagano AJ, Iwayama K, Ushio M, Kudoh H (2020) Repressive chromatin modification underpins the long-term expression trend of a perennial flowering gene in nature. *Nature Communications* 11: 2065.

概要：ヒストン修飾がダイナミックに季節変化することを自然環境下で初めて測定し、花成抑制遺伝子 *AhgFLC* の 6 週間の温度記憶の実体が H3K27me3 抑制修飾であることを示した。この遺伝子は秋から冬にかけて寒さを経験するとアンチセンス RNA の転写により発現が抑制されるが、春には H3K27me3 が遺伝子座全域をカバーすることにより秋と同じレベルの寒さを経験しても発現が抑制されないことを見出した。これがラチェットのように働くことで変動環境下でも頑健な季節応答がなされることが示された。

2. Nishio H, Nagano AJ, Ito T, Suzuki Y, Kudoh H (2020) Seasonal plasticity and diel stability of H3K27me3 in natural fluctuating environments. *Nature Plants* 6: 1091–1097

概要：H3K27me3 抑制修飾の季節動態と日内動態をゲノムワイドに解析し、H3K4me3 活性修飾と比較した。その結果、H3K27me3 は日内では比較的安定的であるが、季節的にはダイナミックに変化することで、ゲノムワイドに遺伝子発現の季節調節に働くことが示めされた。発生や細胞のガン化において重要な役割をもつ当該ヒストン修飾が、長期環境応答でも重要であることが明らかとなった。

3. To TK, Nishizawa Y, Inagaki S, Tarutani Y, Tominaga S, Toyoda A, Fujiyama A, Berger F, Kakutani T (2020) RNA interference-independent reprogramming of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* in press.

概要：抑制クロマチンの確立機構として、コード領域ではヒストン H2A のバリエーションやヒストン脱メチル化が鍵であることを見出した。非コード領域の RNAi による抑制クロマチンの確立経路が植物でも動物でも良く研究されているが、見出されたのはこれとは独立の新規経路である。H2A のバリエーションは、遺伝子発現の応答性と関わっており、この新たな経路が動物にまで保存されているかにも興味もたれる。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「工藤」グループ

研究代表者: 工藤 洋(京大大学生態学研究センター・教授)

研究項目: 長期フィールド・エピジェネティクス解析による植物頑健性の理解と設計基盤の構築

植物の遺伝子発現の季節調節を対象としてフィールド・エピジェネティクス研究を進める。それにより、植物が、複雑な環境からどのような機構で季節シグナルを取り出し、頑健な応答を達成しているかを明らかにすることが目的である。ハクサンハタザオを対象に、フィールドにおける長期エピゲノムデータを取得し、エピジェネティック制御を含んだ遺伝子発現の設計原理を抽出し、頑健性の基盤を理解する。さらに、設計原理の一つを用いて植物を改変する。

② 「角谷」グループ・東京大

主たる共同研究者: 角谷 徹仁(東京大学大学院理学系研究科・教授)

研究項目: DNAトポロジーと修飾の解析を中心としたエピゲノム頑健性の理解と設計基盤の構築

エピゲノムによる遺伝子発現制御は頑健性の基盤として重要である。一般に DNA メチル化はヒストンの変化と比べ、より長期の記憶として働く。本グループは、主に DNA メチル化と DNA トポロジーとの関わりを遺伝学的に調べる。また、野外植物集団を材料に、DNA メチル化の変動を調べることで、頑健性理解に貢献する。

③ 「角谷」グループ・遺伝研

主たる共同研究者: 角谷 徹仁(国立遺伝学研究所・教授)

研究項目: DNAメチル化変動のゲノムワイド解析を中心としたエピゲノム頑健性の理解と設計基盤の構築

エピゲノムによる遺伝子発現制御は頑健性の基盤として重要である。一般に DNA メチル化はヒストンの変化と比べ、より長期の記憶として働く。本グループは、主に野外植物集団を材料に、DNA メチル化の変動を調べる。また、DNA メチル化と DNA トポロジーとの関わりを遺伝学的に調べることで、頑健性理解に貢献する。

④ 「福田」グループ・大阪府立大学

主たる共同研究者: 福田 弘和(大阪府立大学大学院工学研究科・教授)

研究項目: 植物工場レタスの収穫・予冷インパクトに対するエピゲノム動態の解明と栽培技術への展開

植物工場は最も工業化が進んだ食料生産システムであり、最近では、出口を担う大手コンビニ等の参入が相次ぎ、技術開発が活発になっている。近年では、栽培と流通を連結した植物の生理学的状態の操作技術が重要となっている。そこで本研究では、「予冷」と呼ばれる収穫直後の低温処理に対し、エピジェネティクスの観点から管理技術の最適化をめざす。レタスなどの葉物野菜は、収穫直後に 7°C 程までに予冷することで、常温に戻しても鮮度が保持される。この効果をエピゲノムおよび遺伝子発現で捕捉しモデリングする。

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

国内

- ・東北大・岩手大との共同研究: 本課題で整備した ChIP-Seq, BrAD-Seq 多検体解析をイネに適用し、幼苗期の前歴温度環境が冷害耐性に及ぼす効果に関する研究を開始した。基盤研究 A 「イネ冷害におけるエピジェネティックな制御機構の解明」研究代表者東谷篤(2018 年度~2022 年度)に分担者として参加。
- ・名古屋大との共同研究: 本課題で整備したハクサンハタザオの自然生育地において、川からの距離が異なる場所において気孔数の長期的季節変化をモニターするとともに RNA-Seq を実施し、気孔数調節の表現型可塑性を研究する。基盤研究 B 「異種ゲノムの重複がもたらす植物の表現型可塑性を担う発生システムの構成的理解」研究代表者金岡雅浩(2016~2019 年度)に分担者として参加。
- ・京都大理学研究科との共同研究: 本課題で整備したハクサンハタザオの自然生育地における光生理学研究を実施する。自然条件下での光環境のモニタリングを担当するとともに、既存の RNA-Seq データを活用する。挑戦的研究(萌芽)「植物生理学と生態学の融合による野外光応答の実態解明と原理探求」研究代表者長谷あきら(2017~2019 年度)に分担者として参加。

国外

- ・英国ジョン・イネス・センターとの共同研究: 本課題で整備したハクサンハタザオの自然生育地の研究およびシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究を組み合わせ、自然環境における核から葉緑体への移行シグナル、また、逆方向のシグナルにおける概日ゲーティングを研究する。Leverhulme 財団(英国) 'The adaptive significance of circadian gating' 代表者 Prof. Antony Dodd (Sep, 2018-Aug, 2021) に共同研究者として参加。この研究はブリストル大学との共同研究として始まったが、Dodd 博士の異動に伴い、ジョン・イネス・センターとの共同研究となった。2020 年度に国際強化支援を受けて共同でフィールド調査を実施する予定であったが、コロナ禍のために半年の延長が認められ、現在実施の可能性を検討中である。
- ・英国ケンブリッジ作物研究所・アラム研究所との共同研究: 2017 年 12 月に東京で開催された JST International Workshop on Field Phenotyping and Modeling for Cultivation の招待講演者であった Prof. Ji Zhou(フェノミクスグループのリーダー)と共同研究を開始した。2019 年度の国際強化支援を受けて共同研究を実施し、ハクサンハタザオのウイルス感染・非感染個体の RNA-Seq データを用いた機械学習による判定を行うとともに、トランスクリプトームデータに対する汎用的プラットフォームを構築した。