

研究終了報告書

「植物免疫のエピジェネティック制御機構の解明とその人為的制御」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 稲垣 宗一

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、gene body のクロマチン修飾を介したエピジェネティック制御による、植物の免疫機構の分子メカニズムおよび、その植物の表現型に及ぼす影響を明らかにするとともに、エピジェネティックな情報を人為的に改変することで生物的ストレス環境における植物の表現型を改良する技術を創出することにある。

病原体に対する植物の防御機構は、植物・病原体相互作用による進化的軍拡競争で形成されてきており、感染する病原体の種や系統などに応じて非常に複雑な機構になっている。病原体感染時には病原体や環境に応じて複数の経路を活性化させ、大規模な遺伝子発現パターンの変化を引き起こす。その結果、Pathogenesis-related (PR) 遺伝子群のような病原体抵抗性遺伝子の活性化や、自発的な細胞死である過敏感反応などを通して、病原体の拡大を防ぐ。一方で、一度病原体の感染を経験した植物は、感染が過ぎ去った後もその“記憶”を保存し、二度目の感染に対しより速く、強く防御反応を引き起こし、病原体への抵抗性が増すという、priming と呼ばれる現象が知られている。priming は過去のストレス経験のみならず、ある種の化合物処理によっても引き起こされる。更に priming 状態は次世代に引き継がれる場合があることも報告されている。このような病害応答における priming は植物の成長・生理へのトレードオフを最小限にしなが、病原体に迅速に対応する優れた生存戦略であり、その機構の解明は病害抵抗性作物の作出へ向けて非常に重要である。

本研究では、これまでに我々が見出した gene body クロマチン修飾と病害応答機構のリンクを足がかりに、1) 病害ストレスの記憶に関わるクロマチン制御の実体を明らかにし、また 2) その制御のターゲットとなる遺伝子群を同定する。さらに、3) クロマチン制御による病害抵抗性遺伝子(R 遺伝子)の発現制御の詳細な機構と、その生物学的意義を解明する。そしてこれらの研究から得られた知見をもとに、4) エピジェネティックな情報を人為的に改変することで生物的ストレス環境における植物の表現型を改良する技術を創出することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

2つの大きなテーマに沿って研究を行った。1つ目の「gene body クロマチン制御による病害ストレス priming 機構の解明とその人工制御」では、gene body に抑制的なヒストン修飾が蓄積するのを防ぐ IBM1 というヒストン脱メチル化酵素の変異体において病害応答性遺伝子発現が活性化されており、また病害応答に関わる植物ホルモンであるサリチル酸に対する応答性が高まっている、すなわち priming 状態にあるという結果をもとに、本機構がどのように病害 priming 機構に関わるのか、その詳細な分子機構を明らかにすることを目指した。具体的には、病害シグナルの中でどのように IBM1 が関わるクロマチン上の分子機構が変化

するのか、また、クロマチン上で特定の遺伝子の発現が制御されるメカニズム、そしてどの遺伝子の変動が実際に priming を引き起こすのか、の3点に特に着目してそのメカニズム解明を目指した。興味深いことに、サリチル酸のアナログである 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA)を処理した植物の茎頂分裂組織周辺の組織において IBM1 の全長の転写物が減少しており、それは IBM1 の第7イントロンに存在する DNA メチル化領域が関与することを見出した。一方で、ゲノムワイドなクロマチン修飾解析と遺伝学的解析から *ibm1* 変異体において観察される priming 機構に拮抗する anti-priming の存在を見出した。さらに、クロマチン制御をうけるターゲット遺伝子に関しては、クロマチン修飾解析と発現解析を組み合わせた絞り込み、遺伝学的解析による候補遺伝子の解析により、複数の生物学的経路に関わる遺伝子群をターゲット遺伝子候補として見出した。

2つ目の、「gene body クロマチン制御による抵抗性遺伝子の発現制御機構の解明とその応用」では、我々が独自に見出したヒストン H3 リジン4 (H3K4)モノメチル化酵素遺伝子 (H3K4me1ase と呼ぶ)が非常に多くの病害抵抗性遺伝子 (NB-LRR; NLR 遺伝子)の転写を正に制御するという結果をもとに、クロマチン制御を介した NLR 遺伝子の転写制御機構とその生物学的意義を明らかにし、またこの制御を改変することで免疫機構を活性化する技術の創出を目指した。H3K4me1ase を様々なレベルで発現する形質転換植物を作出し、PAMP 誘導免疫を引き起こす flg22 ペプチドに対する応答機構をゲノムワイドに調べ、H3K4me1ase の発現量と免疫活性化の程度に概ね正の相関があることが確かめられた。さらに同さきがけ領域の峯研究者との共同研究により、H3K4me1ase による抵抗性遺伝子の制御機構は温度環境に応じた免疫機構の変動に関わっていることが示唆された。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、INA を処理した植物体の次世代個体を使って INA 応答性遺伝子発現解析を実施した。mRNA-seq 解析の結果、INA 処理した個体の次世代の個体では、priming 応答が確認された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「gene body クロマチン制御による病害ストレス priming 機構の解明とその人工制御」

シロイヌナズナの *IBM1* 遺伝子は JMJ ファミリーに属するヒストン脱メチル化酵素をコードしており、変異体においては、3000 を超える遺伝子の gene body 領域においてヒストン H3 リジン 9 のジメチル化 (H3K9me2) を蓄積し、そのうち一部の遺伝子の転写が抑制される。*ibm1* 変異体においては器官形成異常、不稔などの表現型が示されるが、その原因の少なくとも一部は *ibm1* 変異体において病害応答性遺伝子が活性化されていることにある。実際に *ibm1* 変異体は病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 に対して高い抵抗性を示した(未発表)。一方で、*ibm1* 変異体の形態異常を抑圧する変異体の原因遺伝子は LSD1 ファミリーに属するヒストン脱メチル化酵素をコードしており、*ibm1* 変異体で異所的に蓄積する H3K9me2 の下流で H3K4me1 を除く働きをしている (Inagaki et al 2017 EMBO J)。つまり、gene body における H3K9me2 の蓄積は H3K4me1 の減少を招き、一部の遺伝子が抑制される。結果として、病害応答性遺伝子が活性化し、発生異常が引き起こされる。本結果が示唆するのは、gene body におけるクロマチン修飾を介したエピジェネティックな仕組みにより、病

原菌応答の“記憶”、つまり priming 機構が制御されているのではないかという可能性である。そこで、本テーマでは、本分子機構が病害 priming 機構に関わるという仮説のもと、その詳細を明らかにし、エピジェネティックな情報を人為的に改変することで生物的ストレス環境における植物の表現型を改良する技術を創出することを大きな目標とした。

まず、本分子機構の上流、下流、またクロマチン上での分子機構の 3 つに問題を切り分け、それぞれに関してメカニズムの解明を目指した。まず、上流に関して、サリチル酸のアナログである 2,6-dicloroisonicotinic acid (INA) を処理した植物を成熟葉と茎頂周辺組織に切り分け RNA-seq 解析を行い、茎頂周辺組織において IBM1 の全長発現が減少することを見出した。IBM1 の全長発現はこれまでに第 7 イントロンにおける DNA メチル化領域によって制御されていることが報告されており、その関与を調べるために、DNA メチル化領域を CRISPR で欠失させた植物を作製し、INA 処理を行ったところ、IBM1 の全長発現は低下せず、その関与が確かめられた。様々な植物種で IBM1 ホモログ遺伝子のイントロンにおける DNA メチル化は見られることから、病原菌感染時に IBM1 の全長発現を低下させる機構に重要な生物学的意義があることが示唆される。

次に下流に関して、H3K9me2、H3K4me1 および RNA のゲノムワイド解析から、*ibm1* 変異体でクロマチン制御をうけて発現が低下する遺伝子を絞り込んだ。候補となる遺伝子は 100 遺伝子以上存在したが、興味深いことにこれらの遺伝子の中には DNA 修復系の遺伝子と表皮の分化に関わる遺伝子が顕著に濃縮していた。またこれまでに免疫の負の制御因子として報告されている MAPKKK 遺伝子も含まれていた。DNA 損傷応答機構はこれまでに病害応答機構とのクロストークが報告されており、DNA 修復系の遺伝子の発現低下により DNA 損傷の蓄積を経て、病害応答機構が priming されている可能性考えられた。一方で、表皮のクチクラ層の形成と病害抵抗性との関連もこれまでに報告されており、実際に *ibm1* 変異体ではクチクラ層の形成が部分的に欠損していることから、関連が示唆される。これらの候補遺伝子の関与を確かめるために、これらの遺伝子の変異体、多重変異体において INA 応答性遺伝子発現を解析したところ、一部の遺伝子の変異体において応答性が上昇していることが確かめられた。

最後に、クロマチン上での分子機構について、3000 を超える遺伝子に H3K9me2 が蓄積するのにも関わらず、その中で H3K4me1 が減少するのは 1000 遺伝子未満であり、実際に発現が低下するのは 100~200 遺伝子程度であることに着目し、H3K9me2 による H3K4me1 の低下によって引き起こされる silencing に拮抗する anti-silencing 因子が存在するのではないかと予想し、ゲノムワイド解析や機械学習などを用いて探索した。興味深いことに 2 つの有力な anti-silencing 因子の候補が見つかり、そのうち 1 つは遺伝学的解析から anti-silencing 因子として振る舞うことを支持する結果を得た。また、この anti-silencing 因子は H3K9me2 の蓄積に付随した priming に拮抗する anti-priming 因子として振る舞うことが示唆される。

ここまでをまとめると、gene body のクロマチン修飾を介した病害 priming メカニズムの姿が見えてきたと言える。しかし、切り分けて行った解析から得られたピースがどのようにつながるのかに関しては今後の課題である。例えば、茎頂周辺組織で IBM1 の全長発現が低下することによって、実際に priming が引き起こされるのかということは今後検証していく必要があ

る。予想外の発見として anti-priming というコンセプトが得られたのは、エピゲノム情報の改変による priming の人為的制御に向けた知見としてとても重要であると考えられる。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、INA を処理した植物体の次世代個体を使って INA 応答性遺伝子発現解析を実施した。INA 非処理植物と2つの濃度で INA 処理した植物体から得られた種子を使い、INA 処理の影響が次世代の植物に伝承されるかを mRNA-seq 解析によって調べたところ、INA 処理を施した植物体の次世代の個体では、非処理植物の次世代個体に比べて、顕著に強い INA 応答を示す傾向が見られた。さらに、このメカニズムを明らかにするために次世代植物の DNA メチル化解析を行った。シーケンスデータが得られ次第、解析を行う。

研究テーマ B 「gene body クロマチン制御による抵抗性遺伝子の発現制御機構の解明とその応用」

研究テーマ A でもあったように、H3K4me1 は活性に転写されている gene body に蓄積しているヒストン修飾である。我々はこれまでに、ヒストン H3 リジン4 (H3K4) モノメチル化酵素遺伝子を同定してきた(未発表)。その中の一つ(H3K4me1ase と呼ぶ)は gene body の後半部分(3'側)で H3K4me1 を制御していることがわかっている。興味深いことに、H3K4me1ase の変異体では多くの病害抵抗性遺伝子(NB-LRR; NLR 遺伝子)において、H3K4me1 が減少しており、その一部は転写レベルも顕著に低下していた。本テーマでは、gene body におけるクロマチン修飾 H3K4me1 が NLR 遺伝子の転写を制御することの意義を明らかにし、さらにこれを人為的に制御することで植物の免疫機構を活性化する系を確立することを目指した。

H3K4me1ase を様々なレベルで発現する形質転換植物を作出し、PAMP 誘導免疫を引き起こす flg22 ペプチドに対する応答機構をゲノムワイドに調べた。H3K4me1ase の変異体では、野生型植物に比べ flg22 応答性遺伝子発現が全体的に弱く、一方で、H3K4me1ase を野生型レベルよりも高発現する植物では、野生型では見られないような大規模な遺伝子発現変化が見られた。発現量と免疫活性化の程度に概ね正の相関があることが確かめられた。また、H3K4me1ase を高発現する植物では花成が遅延する傾向が見られたが、植物の発生には概ね影響は見られなかったことから、H3K4me1ase 高発現による免疫活性化の発生への影響は大きくないと考えられた。

同さきがけ領域の峯研究者との共同研究により、H3K4me1ase による抵抗性遺伝子の制御機構は温度環境に応じた免疫機構の変動に関わっていることが示唆された。AvrRpm1 および AvrRpt2 エフェクターを持つ *Pseudomonas syringae* への抵抗性において、22°C 生育条件では野生型と H3K4me1ase の変異体で変化がなかったが、27°C で生育した場合 H3K4me1ase 変異体は高感受性を示した。この結果は、高温条件におけるエフェクター誘導免疫機構において H3K4me1ase による制御が顕在化することを示唆している。さらに 22°C、27°C 条件で感染した植物の葉におけるゲノムワイド遺伝子発現解析から、H3K4me1ase によって制御される NLR 遺伝子の発現パターンが生育温度で影響を受けることが明らかになった。

さらに、H3K4me1ase と拮抗して働く H3K4me1 脱メチル化酵素をコードする FLD 遺伝子の解析を進め、FLD はアンチセンス転写をしている遺伝子領域から H3K4me1 を除き転写の伸

長を制御するという興味深い結果が得られた(*Nature Plants* 2021)。このことからアンチセンス転写とクロマチン制御というこれまでリンクがわかっていなかった部分の一端が明らかになり、植物の免疫機構や環境適応機構においても重要な役割を果たすことが推察される。

本テーマでは H3K4me1 の量的制御により、NLR 遺伝子を含む免疫制御遺伝子の発現を大きく変化させることが可能であることが示された。今後はさらにより詳細な分子機構の理解と、ストレス条件下での表現型に与える影響を明らかにしていきたい。

新型コロナウイルス感染症の影響による 6 ヶ月間の研究期間延長の間に、H3K4me1ase を含む H3K4me1 メチル化酵素群の同定とその制御機構の解析結果をプレプリントとして *bioRxiv* に発表した。

3. 今後の展開

当面の課題として、本研究で見出した病害シグナル下での IBM1 遺伝子の全長発現の制御がどのように免疫機構やその記憶に関わるのか、それがどのような生物学的意義を持つのかを明らかにすること、また、anti-silencing および anti-priming 機能の詳細とその意義を明らかにすることが挙げられる。さらに、H3K4me1ase 発現量上昇による免疫活性化が表現型レベルで観察されるかの検証も進める必要がある。H3K4me1 による NLR 遺伝子の転写制御にはまだ明らかになっていない意義やメカニズムが背後に隠されているはずであり、これを追求することで、免疫制御の新たな側面が見えてくることを期待する。今後はこれらの検証や解析を進めるとともに、他の植物でも同様な分子機構が保存されているか、他の植物でも人為的な制御が可能かについての研究も展開していきたい。クロマチン修飾による植物の環境適応機構の研究は始まったばかりであり、今後も驚くような発見が相次ぐことが期待される。

4. 自己評価

生命現象の理解やその制御を目的とした研究では、現象や目的とする形質からスタートしその分子機構に迫るという方針で研究が進められることが多いが、私の場合は目的とする分子機構からスタートしその分子機構の背後にある生物学的意義を探るという姿勢で研究を進めたが、研究の中心に据えたゲノムワイド解析によるデータ駆動型アプローチの強力さを思い知ることが出来た。これまで植物科学で積み上げられてきた知識とゲノムワイド解析を組み合わせることで、目的とする分子機構と現象の予想外のつながりを見出すことができるというのは今後とても有効であると考えます。当初の達成目標を達成できたとは言えないが、潤沢な研究費と優秀な研究補助員の方に恵まれ、思う存分研究を進めることが出来た。研究の進め方については、読みが甘かった部分やトラブルも多く当初計画していた方向には必ずしも進まなかった部分も多いが、anti-priming や温度との関係など当初予想していなかったような興味深い結果もたくさん得られており、それらをしっかりと検証し報告していきたい。まだ一端が見えてきただけだが、本さきがけ研究で挑んだ植物免疫のエピジェネティック制御機構が解明されれば学術的・社会的波及効果はとて大きいと考えられるので、その解明に向けて邁進したい。またさきがけ研究の間に異動があったが、異動の際にスタートアップ支援を受けることが出来、新しい所属先で植物を生育する設備やクロマチン解析用機器を導入することが出来たのでスムーズに研究を始めることが出来た。さらに、同年代の優秀な研究者の中に身を置くことで、自分がこれからどのようにオリジナリティーを形成していくかという課題に関しても考えることが出来たのは、

さがけ研究で得た収穫である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. Soichi Inagaki, Mayumi Takahashi, Kazuya Takashima, Satoyo Oya, Tetsuji Kakutani. Chromatin-based mechanisms to coordinate convergent overlapping transcription. *Nature Plants* 7:295-302 (2021).

H3K4me1 脱メチル化酵素 FLD は、ゲノム中でアンチセンス転写をしている数多くの遺伝子領域から H3K4me1 を除く働きをもつことを見出した。多くの場合において FLD のターゲットはコンバージェントに遺伝子が転写されているような領域で、そのような領域でアンチセンス転写が起きやすく、双方向に転写が起きることによる潜在的な問題をクロマチン制御によって解決していることが推察される。また本機構はアンチセンス RNA の COOLAIR を転写する FLC 遺伝子座の転写制御を介して花成制御に関わることから、同機構によって他の生命現象が制御されている可能性も推察される。

2. Satoyo Oya, Mayumi Takahashi, Kazuya Takashima, Tetsuji Kakutani, Soichi Inagaki. Transcription-coupled and epigenome-encoded mechanisms direct H3K4 methylation. *bioRxiv* doi: 10.1101/2021.06.03.446702 (2021). ※コロナ延長時の成果

H3K4 の 3 つのメチル化状態を制御するヒストンメチル化酵素を同定した。H3K4me1 を制御するメチル化酵素が染色体上にリクルートされる仕組みを明らかにする目的で、それぞれの酵素が染色体上で局在する位置を決め、そのデータをもとに、機械学習を用いてその局在を説明するゲノム・エピゲノム情報を探索した。その結果、一つのメチル化酵素は転写装置 PolII と強い共局在性を示し、別のメチル化酵素は他のヒストン修飾や特定の DNA 配列によってリクルートされている可能性を示唆する結果を得た。これらの結果から、H3K4 メチル化を制御する仕組みには転写共役型と(エピ)ゲノム情報に導かれる型の2つが存在することが示唆された。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Soichi Inagaki “Control of convergently transcribed genes through modulating gene-body chromatin modification” Gordon Research Conference on Epigenetics, Holderness, USA 2019 年 7 月 24 日(口頭発表)
2. 稲垣宗一、高橋まゆみ、高嶋和哉、角谷徹仁、「遺伝子内クロマチン修飾制御によるコンバージェント遺伝子の転写制御」日本遺伝学会第 91 回大会、福井、2019 年 9 月 13 日(口頭発表)
3. 稲垣宗一、高橋まゆみ、高嶋和哉、大矢恵代、角谷徹仁、「アンチセンス転写を介したクロマチン制御と植物の環境応答」日本植物学会第 84 回大会シンポジウム「植物環境応答の頑健性と柔軟性」、オンライン開催、2020 年 9 月 20 日(招待講演)

4. 稲垣宗一、「エピゲノムによる植物の環境応答制御」日本植物生理学会第62回年会シンポジウム「フィールドでの植物応答の制御に向けた植物環境適応機構の解明」、オンライン開催 2021年3月15日(招待講演)
5. プレスリリース「遺伝子が密に並んだゲノム上で転写を調節する仕組み」東京大学大学院理学系研究科 2021年3月2日