

**「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」研究領域 領域活動・
評価報告書
－2018 年度終了研究課題－**

研究総括 岡田 清孝

1. 研究領域の概要

本研究領域では、フィールドにおける環境変化に適応し、安定的に生育する植物を分子レベルから設計するための次世代基盤技術の創出に関する研究を推進します。具体的には、植物の遺伝子(群)の挙動と表現型との関係性を時間的・空間的に定量的に解析し、環境に適応する植物の生理システムの包括的な理解を目指します。また、環境応答機構のモデルの構築やバイオマーカーなどの同定を行い、新しい植物生産の基盤技術を構築します。さらに、環境応答に関係する複雑な遺伝子(群)・遺伝子型の人工設計のための新たな遺伝的改良技術を開発し、多様な植物への応用展開を目指します。

研究領域の推進では、植物の環境応答機構の定量解析の観点から、植物の単一遺伝子の応答機構ではなく、多因子および QTL による複雑な応答機構の解明に主眼を置きます。また、各種大規模データの解析やモデル化、およびその実証の観点から、植物科学のみならず情報科学、工学などの多様な分野の個人研究者の参画を促します。さらに、本研究領域は戦略目標の達成に向けた成果創出を最大化すべく、CREST 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」やさがけ研究領域「情報科学との協働による革新的な農産物栽培手法を実現するための技術基盤の創出」とも連携した運営を行っています。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数: 11 件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出(フィールド植物制御)」領域に設けた選考委員 10 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info1150/index.html>(第二期))の他、以下の点を重視した。
 - ① 植物の環境応答機構の定量解析に関する研究
 - ② 環境応答機構に関する数理モデル構築やバイオマーカーの開発に関する研究
 - ③ 遺伝子改変と遺伝子導入の新たな技術に関する研究

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーの内 3 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	146 件	25 件	12 件

備考:

- 1) 2015 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・寺田 愛花研究者
研究を中止したため。

5. 研究実施期間

2015 年 12 月～2019 年 3 月

2016 年 4 月～2019 年 3 月（水多 陽子研究者）

6. 領域の活動状況

領域会議：7 回

第 4 回領域会議は、さががけ「情報協働栽培」と合同で開催

研究総括の研究実施場所訪問：14 回

JST CREST/さががけ植物4領域合同シンポジウム「植物の環境適応戦略をひもとく ―JST 植物科学のいま―」(2016 年 10 月 3－4 日、東京)を開催

植物関係領域合同若手研究会(2018 年 10 月 18－19 日、沼津)を開催

第 60 回日本植物生理学会年会シンポジウム「フィールドにおける植物の理解とその制御に向けた基盤技術創出」(2019 年 3 月 13 日、名古屋)を後援

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

2018 年 12 月 評価会開催

2019 年 1 月 研究総括による事後評価

2019 年 2 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

(1) 研究課題等の研究目的の達成状況

(2) 研究実施体制及び研究費執行状況

(3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さががけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

平成 30 年度に第 1 期生 11 名の研究課題が終了した。本領域は、植物が持つ環境応答能力を定量的に解析し、表現型を予測するバイオマーカーの開発や生育・環境応答予測モデルの構築など育種開発や栽培技術の高度化に向けた新たな手法を見出すことを目標としている。植物基礎科学、情報科学、農学(育種学、栽培学)など異なった研究分野の連携が重要であることから、いずれかの研究分野に一定の実績があり、その基盤の上に新たな研究分野を取り込む意欲を持った挑戦的な研究課題の提案を採択した。なお、情報科学研究者と農学・植物科学の研究者による連携提案システムを用いた提案は数件あったが、いずれも採択に至らなかった。採択課題の大部分はさががけ研究の目的を十分に達成する研究成果をあげたが、当初目標に対して十分な成果が得られなかった課題についても、それぞれの研究者が目標達成のために最大限の努力をし、今後の発展が期待される新たな知見を数多く得ている。領域会議などの場においてアドバイザーや総括のみならず研究者が互いに批評・助言することによって研究のレベルが向上し領域が活性化した。また、同時期に発足した CREST「植物頑健性」及びさががけ「情報協働栽培」の領域会議に参加し、共同して研究会を行うなどの密接な研究連携を行い、シナジー効果を示すことができた。研究期間の間に新たな上級ポストの獲得や受賞に至った研究者も多く、さががけ研究のもう1つの主目的である将来の主導的研究者の養成についても一定の役割を果たしてきたと考えている。しかし、当初採択した 12 名のうち 1 名の研究者が病気治療のために期間途中でさががけ研究を中止したことは極めて残念である。

本年度終了の 11 課題の中では、赤木研究者、岡本研究者、萩原研究者の 3 氏の研究は特に優れたものと評価する。赤木剛士研究者の「カキ属をモデルとした環境応答性の性表現多様化機構の解明」においては、花の多様な雌雄性を決定する原因遺伝子を同定し、エピジェネティックな制御機構が働いていることを初めて明らかにして、ゲノムの倍数化が植物の雌雄多様性の進化の原動力になったとの新たな提案を行うなど、果樹園芸学のみならず進化生態学に対しても大きな貢献となった。岡本昌憲研究者の「化学遺伝学的手法を利用した乾燥ストレス適応型作物設計」では、植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)の受容体の機能を強化する

ことによって、節水型乾燥耐性コムギを創出できることを明らかにし、穀物生産性を減らせずに節水性と乾燥耐性の双方を向上した作物を作出する品種改良の新しい方向を示した成果として高く評価される。萩原伸也研究者の「植物ホルモン受容の可視化技術」では、構造生物学やケミカルバイオロジーの手法を駆使して天然の植物ホルモンよりも何桁も低濃度で働き、かつ多様な植物ホルモン作用のうちの特定の機能のみに影響を与える誘導体と受容体を作成し、圃場で使用可能な技術基盤を開発した。主にアフリカで大きな被害を与えている寄生植物ストライガに汚染された農地を回復するための有効手段となる技術もあり、その成果は高く評価される。これら3課題の詳細については、以下個別課題の評価の項目で述べる。

1. 赤木 剛士 研究者「カキ属をモデルとした環境応答性の性表現多様化機構の解明」

赤木研究者は、六倍体栽培カキの花の雌雄性が環境依存的に変化する機構を解析し、それが small-RNA をコードする *OGI* 遺伝子とその標的遺伝子である *MeGI* 間の発現のバランスによって制御されていること、さらに、エピジェネティックな変化によって両方の遺伝子の発現が調整されていることを見出した。さらに、大量トランスクリプトームデータを用いた共発現ネットワーク解析によって、*MeGI* が雄性器官と雌性器官のそれぞれに独立した遺伝子経路を一括して逆向きに制御することにより、単一因子として単性花を成立させる機構を明らかにした。これらの成果は、植物の性決定因子の発現がエピジェネティックな揺らぎによって性表現の多様性として現れることを初めて明らかにしたもので、基礎科学及び作物学において極めて大きな成果である。同氏は、さらに、同じツツジ目に属し、カキ属とは独立した性別決定機構を持つマタビ属のキウイフルーツから性決定遺伝子を同定して *Shy Girl* と命名し、その生理機作がサイトカニンシグナルの抑制である事を明らかにした。この遺伝子は、ゲノム倍化後の急激な適応進化によって新たな機能を獲得したと考えられた。カキとキウイの性別決定因子の研究から、系統特異的な全ゲノム倍化(古倍数化)がカキ属の花の雌雄性の多様化を駆動する原因となったことを示した。これは、植物の雌雄多様性の進化様式についての新たな提案であり、国際的に注目を浴びている。ちょうど *OGI* 遺伝子と *MeGI* 遺伝子の単離同定がなされた直後に本さがけ研究がスタートすることになり、幸運でタイムリーな研究計画であったが、スタートダッシュの時期からの研究の進展速度がめざましい。原著論文や総説の発表も多く、当初の目標は十分達成されたと判断する。

今後新たに自身の研究室を持ち、研究の幅を広げることによって、植物種間で異なる性別決定の分子機構の解析という横方向の展開から、倍数化を鍵としたゲノム・エピゲノムの揺らぎ獲得による植物進化の一般化を探る研究が大きく発展すると期待する。一方、本研究によって得られた成果を有用作物の単性花形成や同株異花作物の雌雄花の割合の人工的制御など社会実装に向けた取り組みについても多くの農学研究者が望んでおり、その方向への努力も期待したい。

2. 市橋 泰範 研究者「植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

市橋研究者は、植物と土壌の膨大な微生物生態系-マイクロバイオータ-との共生を「超個体」として捉え、根圏の微生物環境が植物の成長に与える影響を網羅的に解析する系を独自に考案した。また、トマトを用いて共生する細菌群に対応した遺伝子転写系が植物に見られることを示し、太陽熱で処理した土壌でコマツナを栽培すると共生微生物の種類が変化することから、有機農法における成長促進にマイクロバイオータが関与していることを明らかにした。さらに、共生微生物のオミクス解析のハイスループット化を目的として、マイクロ流路システムを用いた微小液滴内で難培養性微生物を培養するシステムを考案した。今後の研究の大きな展開が期待される。

さがけ研究の開始当初は、「超個体」構想以外に予備解析などの結果はなく、一からの模索であったが、さがけ研究期間の間に産業界からの支援を取り付けて基礎的なデータを集め、アイデアの有効性を示すまでに至ったぶれない姿勢と実力を高く評価する。一方、研究内容は未だ萌芽的で、効果を示すマイクロバイオータの実体を把握するまでには至っていない。農業基盤技術としての可能性への期待は大きいので、研究を進める道筋をよく考えるとともに、論文によるしっかりした成果の発表を急いでほしい。また、安価でハイスループットな RNA-seq ライブラリー作成法である BrAD-seq を考案・改良して、本さがけ領域内外の多くの研究者との共同研究によって研究の進展に貢献したことも大きく評価する。2018 年度には独立した研究チームを立ち上げ、また、内閣府のスマートバイオ産業・農業基盤技術の課題に採択されるなど、今後の研究は順調な滑り出しとなっている。過激な競争が予想されるが、果敢な挑戦の一方でデータに基づいた堅実な研究を目指して欲しい。

3. 犬飼 義明 研究者「土壌水分変動適応型エピジェネティック情報を捉えたイネの分子デザイン」

世界的に気候が変化し干ばつが頻発する中で、根系の発育に優れ、乾燥に耐性を示すイネ品種を選抜す

ることは重要かつ緊急の課題である。本研究は、非乾燥ストレス下においても乾燥ストレス下と同様に根系の発育の良いイネ変異体を選抜し、その原因遺伝子がヒストン H3 テールの 27 番目のリジンにおけるトリメチル化 (H3K27me3) 修飾状態を制御する遺伝子であることを示したことから、このヒストン修飾機構に依存して乾燥ストレス耐性を発揮する QTL 遺伝子座を同定することによって、エピジェネティック制御システムを介したイネ品種の新たなデザイン法の開発を目指した意欲的な研究である。まず、日本晴と乾燥耐性品種 KDML105 の子孫についての ChIP-Seq 解析によって全遺伝子座の H3K27me3 状態の変動パターンを解析し、いずれかの親の遺伝子型のみ H3K27me3 状態を共通で高める領域を数力所同定することに成功した。ついで、土壌の乾燥やそれに伴う圧縮ストレスによって側根が可塑的に反応する性質に着目して実験系を考案し、側根系の発育を制御する QTL を絞り込み、さらにフィールドでの乾燥ストレス耐性試験から第 5 染色体上の QTL が乾燥耐性品種の作出に有用であるとの確証を得た。エピジェネティクスの指令遺伝子とその下流遺伝子を単離する難しい課題であるが、当初の計画に沿った堅実な実験によって QTL の同定に成功しており、目標はほぼ達成されたと評価する。今後、原因遺伝子を同定して、仮説を証明し、乾燥耐性イネの作出に向けた育種素材の作成に向かって進んで欲しい。

4. 大西 孝幸 研究者「核ゲノム－オルガネラゲノムの協調的改変による植物のエネルギー代謝系の至適化」

植物が新しい生育環境に適応するためには、核ゲノムにコードされた因子とオルガネラゲノムにコードされた因子が調和を保ちつつ変化し、光合成や呼吸といった生命活動を新たな環境条件に至適化する必要がある。本研究では環境に至適化した植物体の設計を目指して、細胞質置換システムのフィールドにおける光合成能と呼吸能の定量的解析を目的とした。栽培域が異なり、遺伝的距離が十分に離れたイネ祖先種 *O. rufipogon* またはアフリカ栽培イネである *O. glaberrima* 由来のオルガネラゲノムを保持するイネ F2 集団を圃場に展開し、さらにこれらの光合成速度と呼吸速度を表現型データとして QTL 解析を実施することで、呼吸や光合成の環境適応において重要な役割を担っている核ゲノム領域の同定を目指したが、圃場での表現型データが安定性に乏しかったため、残念ながら信頼性のある QTL が得られず、細胞質置換システムでは光合成能力に変化が見られるものの、バイオマスの変動に対する相関関係は明確にならなかった。イネのオルガネラゲノム置換システムは、基礎科学的にも育種の観点でも非常に魅力的な系であり、研究の続行を諦めるのは惜しいテーマと考える。フィールドでの農学・生態学研究者や情報科学研究者などと連携してデータの不安定性の理由を解明し、この分野の開拓者となることを期待する。一方、アブラナ科作物キャベツにアブラナ科近縁野生種 *Diplotaxis erucoides* のオルガネラゲノムを導入した細胞質置換系統群の中から、安定した雄性不稔性が生じるとともに、バイオマス増大の表現型を示す系統を選抜することに成功したことは、品種改良の可能性を示すもので興味深い成果である。しかし、その機構の解析はまだ途中であり、今後の進展を期待する。

5. 岡本 昌憲 研究者「化学遺伝学的手法を利用した乾燥ストレス適応型作物設計」

節水性と乾燥耐性の双方を向上した作物を作出することは、乾燥ストレスによる生産量の損失を軽減するための新たな品種改良の方向として注目を浴びている。岡本研究者は、ABA 受容体を過剰発現させた形質転換体コムギを作出し、葉からの蒸散量が低下しているにもかかわらず、光合成活性が向上したために、生育阻害が生じないことを見出した。この結果は、ABA 受容体を強化することによって、節水型乾燥耐性コムギを創出できることを示したもので、世界的に求められている作物育種の方向－穀物生産性を減らさずに水利利用効率を上げる－に合致した品種改良の基盤となる可能性がある。分子生物学の基礎研究から農業利用に直結する研究成果を得たことは、本さがけ領域の目標に合致する重要な成果である。論文発表もしっかり行われている。今後は、生育抑制の程度で選抜個体を評価するだけでなく、他の環境因子への反応や発芽、穂発芽などの作物として必須の形質の評価も同時に進めることが、作物育種への展開には必要である。

岡本研究者はさらに、フィールドで展開が困難な形質転換体を用いない方法を目指して、交雑によって実用化コムギ品種を生み出すために、多重合成コムギ集団から ABA 感受性が向上した系統を選抜し、乾燥耐性を示す実用品種と掛け合わせる準備を進めている。まだ萌芽的研究の段階であるが、遺伝的多様性が乏しいコムギに乾燥耐性を付与するための新たな育種に向けた基盤研究であり、他の作物への応用にも考慮しながら、さらに大きく展開することを期待する。コムギなどの乾燥被害は国内よりも海外でより広範囲で深刻であり、国際的な農業支援機関との連携がますます重要になると思われる。既にスーダンなどで共同研究を行っているが、国際的なネットワークを広げ、国内研究者と国外研究者とのハブとしての役割を担うことも考えてほしい。

6. 菅野 茂夫 研究者「組み換え遺伝子を利用しない新奇植物ゲノム編集法の開発」

「核酸以外の化合物」を用いて植物のゲノム DNA を自在に操作できれば、遺伝子組換えには該当しない新しい育種の基盤技術になりうる。本研究は、遺伝子組換えに該当しない新たな育種の基盤技術の確立を目標として、塩基配列に依存して DNA 分子に結合する Pyrrole-Imidazole-Polyamide(以下 PI-Polyamide)を用いて植物ゲノムの配列選択的な操作技術の開発を目指した。シロイヌナズナの根の細胞核への PI-Polyamide の導入効率を上げるために様々な条件を検討し、キャリアペプチドを併用すれば、再現よく導入されることが明らかになったが、残念ながら細胞へのダメージが大きく、PI-Polyamide 処理によって植物個体のトランスクリプトームを変動させるには至らなかった。PI-Polyamide が塩基特異的に DNA と結合することは動物細胞の系で示されていたが、植物細胞に用いて新たなゲノム編集法として確立する挑戦的なプロジェクトについては残念ながら明確な結果は得られなかった。しかし、様々な分子導入法を試み、植物細胞をプロトプラスト化して一過的に PI-Polyamide のライブラリーを導入することによってトランスクリプトームが変動することを見出した。また、電界誘起気泡による植物細胞への分子の導入法の可能性を示すなど、今後の展開に繋がる成果が得られたことは、多くの研究者と共同研究を進めてきた菅野研究者の積極的な努力の結果として評価する。さらに、シロイヌナズナのカルス培養時に生じる DNA 配列の変異を定量化するとともに、シロイヌナズナ芽生えに対して浸透性が高く、欠失挿入変異を高頻度で誘導させる化合物を発見したことは、今後の新たな研究展開を期待させる。今後、A-step の採択課題など新たな研究テーマを始めるにあたっては、様々な関連情報を収集して評価選別することや、研究補助者の適切な役割分担を決めるなど、さきがけ研究の経験を踏まえた運営を心がけてほしい。

7. 田野井 慶太郎 研究者「植物体内物質動態に関する表現型の定量評価基盤技術の構築」

水や無機物質の吸収と植物体内移動の様相をリアルタイムで観察し解析することは、環境ストレスに対応した植物の成長や代謝の機構解明のための基盤技術として重要である。本研究は、それまで小型の植物に限定されていた植物体内の放射性物質を非破壊で可視化する技術の対象を、イネやトウモロコシに拡大するとともに、作物中の物質動態の解析に数理モデルを導入し定量評価する基盤技術を創出することを目的とした。様々なプラスチックシンチレータの中から効率のよい素材・厚さを選択し、植物から出てくるバイオフィオンを遮光しつつ放射線は透過させる素材を選定して、60cm×60cm の視野で作物を撮像できる装置を独自に作製し、光や温度、CO₂ 濃度の制御ができる大型チャンバーに組み込んで、環境制御可能な作物用イメージング装置を開発した。この技術を用いて、十数種類のイオンの吸収と体内輸送の動態を継続的に観察し、根から吸収したマグネシウムやカルシウムなどの無機栄養素は蒸散速度によらず一定の速度で葉まで到達する一方で、リン酸は、葉鞘までは蒸散速度によらず、葉鞘から葉身に移行する際には蒸散が駆動力であることを示した。また、RI イメージングによって、イネ導管の中の Na⁺イオンが葉鞘を通過する際にイオン輸送体 OsHKT1;5 が Na⁺イオンを導管から排除し葉身に到達しないように働くことによって植物のナトリウムイオンの障害を回避していることを示すなど、既存の常識を破る多くの知見を得た。放射性同位体を用いる解析手法は精密・定量的で信頼性の高い技術であるが、扱える研究施設と研究者が減っている。このような状況の中にあって、田野井研究者は、数理モデル解析を試み、多数の研究者と共同研究を行うなど、本さきがけ研究のハブとして、放射性同位体を用いた可視化技術の植物科学利用に精力的に尽力したことを高く評価する。

8. 萩原 伸也 研究者「植物ホルモン受容の可視化技術」

植物ホルモンは、植物体内外の環境シグナルを感知して的確な応答を促すシグナル分子として機能している。本研究は構造生物学やケミカルバイオロジーの手法を駆使して植物ホルモンの受容を可視化する新規な分子プローブを開発し、植物ホルモン、特にオーキシンとストリゴラクトンの受容機構を制御することによって植物の環境応答機構を制御するシステムを開発し、フィールドでの使用が可能な技術の開発を目指す意欲的な研究である。オーキシンは発生、分化、成長など植物の生活環の全般にわたり重要な役割を果たす植物ホルモンであるが、多くの生理機能に関与しているため、副作用を避けて望みの効果を起こすには特定の器官のみに対して処理する必要がある。この作業は非常に手間がかかるため大規模農業には適さない。萩原研究者は、変異を導入して受容体の構造を改変し、この改変型受容体に結合するリガンドを設計する手法を用いることにより、天然オーキシンの 1 万分の 1 の低濃度で作用する人工オーキシンを与え、特定の器官のみに効果を与える系を開発した。さらに、ストリゴラクトンの受容体に結合する化合物をライブラリーからスクリーニングし、この化合物を誘導体化してより高い結合活性を示す化合物を見出すことに成功した。主にアフリカで作物収穫に大きな損害を与えている寄生植物ストライガは、近傍の植物の根から分泌される土中のストリゴラクトンを感じて発芽し、その植物に近寄って寄生する。本研究において開発されたストリゴラクトン受

容体に結合する新規化合物は、ストライガの発芽を阻害するので、ストライガによる汚染農地を回復する有効な手段となる可能性がある。さらに、ストリゴラクトン受容体の阻害化合物の中に、植物の枝分かれを増やす効果を示すものも見出している。これらの成果は、ケミカルバイオロジーと植物生理学の連携による典型的な成功例であり、植物生育調節手法の新たな展開に寄与するものとして、国際的にも高く評価されている。萩原研究者は、理研に新たにラボを構えるなど、さがけ研究から研究者としての次の段階に進んでおり喜ばしい。化学系の経歴を持つ萩原研究者が、さがけ研究において多数の植物研究者との連携研究が実を結ぶことになった経験を生かして、さらに研究の幅を広げた今後の活躍を期待する。

9. 水多 陽子 研究者「花粉管をベクターとした遺伝子改変技術の開発」

ゲノム編集技術は、育種改良スピードを飛躍的に高める方法として注目され、様々な改良がなされているが、アグロバクテリアの感染・カルス化などの時間のかかる過程を含むことも多い。本研究は、花粉にCRISPR/Cas9を導入して精細胞または受精卵を直接編集し、組織培養を経ずにゲノム編集個体を得る画期的な新手法の開発を目的とした。ボンバードメント法を用いてマーカー遺伝子をベンサミアナタバコの花粉に導入し、その一部は雄原細胞へ導入されたことを確認した。導入効率も実用化可能なレベルに近づいている。ついで、ゲノム編集用のプラスミドを導入した花粉内で、標的配列内にゲノム編集によると思われる塩基挿入や欠失、置換などの変異を複数種類確認した。これらの成果は、ボンバードメント法を用いた花粉管内でのゲノム編集法の有効性を示すもので、再分化を経ずにゲノムを次代へ伝えることができる技術として社会実装化が期待される。現状ではゲノム編集した個体が得られていないが、研究成果が進展して公表されれば、ゲノム編集が困難とされている植物や作物を対象とした応用研究が激しい競争となることが予想される。導入する花粉の準備、効率、導入によるダメージ、受精後の発生過程を経た種子の獲得など、一般的な技術とするまでには、まだ解決すべき問題が残されているので、1つずつ着実に克服し、論文発表につないでほしい。水多研究者は、当初のさがけ研究の目的を達成するために、必要な実験系を組み、試行錯誤を重ねて成果を得ており、この努力を高く評価する。既に複数の企業との共同研究や新たな発展型のプロジェクトが始まっており、特許申請も進んでいることは力強い。

10. 山口 暢俊 研究者「光環境によって獲得された形質が遺伝する分子基盤の解明と実用植物への応用」

植物が温度や日長などの環境情報を長期間記憶して成長のパターンに反映することが知られているが、その機構が解明された例は少ない。山口研究者は、ヒスチンメチルトランスフェラーゼ活性を欠失したシロイヌナズナの変異体(*sdg*)を長日条件下で生育した場合、植物の地上部も地下部も極めて矮小になるが、短日条件下で育てると野生型と同等の大きさに生育し、回復した形質は10世代にまで伝わることを見出した。本研究は、この顕著な環境記憶の分子機構を調べ、獲得形質継承の分子メカニズムの解明とその応用を目指す、意欲的な研究である。網羅的な遺伝子発現解析から、表現型と相関がある遺伝子を抽出し、その中に、DNAのメチル化を制御する遺伝子である *CHROMOMETHYLASE2* を見出した。この結果から、H3K36me3の修飾とDNAメチル化の相互作用が記憶の形成を制御する可能性が示唆された。さらに、長日条件下で生育した *sdg* 変異体の表現型を回復するサプレッサー株を多数単離し、H3K27me3を導入する働きをもつポリコム複合体の構成因子の1つである *CURLY LEAF* の変異体を見出した。これらの結果は、記憶の形成と維持には、H3K36me3の修飾だけでなく、DNAのメチル化、H3K27me3の修飾など複数の要因が関与することを証明するもので、国際的な過激な競争となっているこの分野における大きな成果である。データとストーリーを詰めた上で、完成度とインパクトの高い論文を早く発表することが望まれる。賞の獲得や学会のシンポジウムの企画など、対外的な活動も十分に行われている。山口研究者は、大学として遺伝子組換え実験が長期間止められるなどの苦境にも関わらず、難しいテーマに挑戦して当初の目的に沿った成果を得たことを高く評価する。一方、実用植物での記憶の利用について、ゲノム編集などの手法を用いたエピゲノムの書き換えなどの手法が実現できるのか、今後の展開についても留意しつつ、研究を展開することを期待する。

11. 吉田 健太郎 研究者「気候変動と病原菌の進化に頑強な作物設計システムの構築」

温暖化などの気候変動は植物免疫の不全をもたらし、その結果、植物の抵抗機構を打破した新たな病原菌の出現が危惧されている。本研究は、絶対寄生菌の寄生持続性に関わる機構を攪乱することによって作物の病害抵抗性を強化するという新たな手法の確立を目的としており、基盤的ではあるが、新たな植物病理学の展開を狙った意欲的で挑戦的な研究である。吉田研究者は、コムギ近縁野生種 *Aegilops umbellulata* の超罹病性系統を野外のムギ類うどんこ病菌に自然感染させ、長期間の時系列トランスクリプトーム解析から病

原菌と宿主植物の双方の遺伝子発現動態を網羅的に解析した膨大なデータを取得した。ついで、チャンバーを使った感染システムを用いて制御環境での時系列トランスクリプトーム解析をおこない、日周変動するエフェクターや連動する宿主遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子は、新たな抵抗性付与戦略における主要なバイオマーカーの候補と考えられるが、まだ機能解析が終わっておらず、バイオマーカーとしての同定に至っていない点が惜まれる。本研究は実際にフィールドで発現遺伝子の分子実態をみた数少ない研究の一つであり、信頼性の高い大量のデータが得られている。実際の圃場での年度毎比較から、感染アリル頻度と病原菌の有性生殖との相関を示したことは大きな成果であるが、病原菌の感染などの局所的な現象を追うためのサンプリングの方法にも、さらなる改良が必要であろう。今後のデータの精査解析によって本研究の大きな目的であった圃場におけるうどんこ病感染予測モデルの構築と活用に繋がると期待される。なお、本研究の進展において、さきがけ研究者の間の横の連携を図っていることは特記すべき点である。

10. 評価者

研究総括 岡田 清孝 龍谷大学 農学部 教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は 2019 年 3 月末現在)

磯部 祥子 (公財)かずさDNA研究所先端研究開発部 室長
 内田 誠一 九州大学大学院システム情報科学研究院 教授
 角谷 徹仁 東京大学大学院理学系研究科 教授／情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 教授
 工藤 洋 京都大学生態学研究センター 教授
 白須 賢 理化学研究所環境資源科学センター グループディレクター
 田中 和幸 タキイ種苗(株)研究農場応用研究グループ チーフ
 土岐 精一*1 農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門 ユニット長
 鳥居 啓子 ワシントン大学生物学部 教授／ハワードヒューズ医学研究所 インベスティゲーター
 福田 裕穂 東京大学 理事・副学長
 矢野 健太郎 明治大学農学部 教授
 矢野 昌裕 農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センター 所長

*1 2016 年 6 月から参画

(参考)

件数はいずれも、2019 年 3 月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	67	67
口 頭	172	51	223
その他	12	18	30
合 計	184	136	320

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
2	1	3

(3)受賞等

- ・岡本 昌憲
 - 2017 年 2 月 Highly Cited Researcher 2016
 - 2017 年 4 月 文部科学大臣表彰若手科学者賞
 - 2018 年 5 月 Highly Cited Researcher 2017
- ・萩原 伸也

2018 年 7 月 第7回三島海雲学術賞

・水多 陽子

2016 年 9 月 日本植物形態学会平瀬賞（論文賞）

2017 年 4 月 第 11 回 科学技術の「美」パネル展 優秀賞

2018 年 12 月 農学中手の会 第 4 回研究集会 中手賞 2018

・山口 暢俊

2018 年 4 月 文部科学大臣表彰若手科学者賞

(4)招待講演

国際 24 件

国内 66 件

別紙

「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(2019年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
赤木 剛士 (兼任)	カキ属をモデルとした環境応答性の 性表現多様化機構の解明 (京都大学大学院農学研究科)	京都大学大学院農学研究科 助教 (同上)	39
市橋 泰範 (兼任)	植物-マイクロバイオータ超個体の 生命活動ネットワーク解明 (理化学研究所バイオリソース研究 センター)	理化学研究所バイオリソース研究 センター チームリーダー (理化学研究所環境資源科学研究 センター 基礎科学特別研究員)	41
犬飼 義明 (兼任)	土壌水分変動適応型エピジェネティ ック情報を捉えたイネの分子デザイン (名古屋大学農学国際教育研究セン ター)	名古屋大学農学国際教育研究セン ター 教授 (名古屋大学農学国際教育協力研 究センター 准教授)	40
大西 孝幸 (兼任)	核ゲノム-オルガネラゲノムの協調 的改変による植物のエネルギー代謝 系の至適化 (宇都宮大学農学部)	宇都宮大学農学部 准教授 (横浜市立大学木原生物学研究所 特任助教)	40
岡本 昌憲 (兼任)	化学遺伝学的手法を利用した乾燥ス トレス適応型作物設計 (宇都宮大学バイオサイエンス教育 研究センター)	宇都宮大学バイオサイエンス教育 研究センター 助教 (鳥取大学乾燥地研究センター テ ニュアトラック助教)	43
菅野 茂夫 (兼任)	組み換え遺伝子を利用しない新奇植 物ゲノム編集法の開発 (立命館大学立命館グローバル・イノ ベーション研究機構)	立命館大学立命館グローバル・イノ ベーション研究機構 助教 (徳島大学農工商連携センター 特 任助教)	31
田野井 慶太 朗 (兼任)	植物体内物質動態に関する表現型 の定量評価基盤技術の構築 (東京大学大学院農学生命科学研究 科)	東京大学大学院農学生命科学研究 科 教授 (同上 准教授)	34
萩原 伸也 (兼任)	植物ホルモン受容の可視化技術 (理化学研究所環境資源科学研究セ ンター)	理化学研究所環境資源科学研究セ ンター チームリーダー (名古屋大学トランスフォーマティブ 生命分子研究所 特任准教授)	40
水多 陽子 (専任)	花粉管をベクターとした遺伝子改変 技術の開発 (名古屋大学トランスフォーマティブ生 命分子研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究 者 (名古屋大学大学院理学研究科 研究員)	40
山口 暢俊 (兼任)	光環境によって獲得された形質が遺 伝する分子基盤の解明と実用植物へ の応用 (奈良先端科学技術大学院大学先端 科学技術研究科)	奈良先端科学技術大学院大学先端 科学技術研究科 助教 (奈良先端科学技術大学院大学バ イオサイエンス研究科 助教)	41

吉田 健太郎 (兼任)	気候変動と病原菌の進化に頑強な 作物設計システムの構築 (神戸大学大学院農学研究科)	神戸大学大学院農学研究科 准教授 (神戸大学自然科学系先端融合研 究環 助教)	30
----------------	--	---	----

研究報告書

「カキ属をモデルとした環境応答性の性表現多様化機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研究者: 赤木 剛士

1. 研究のねらい

「性」の決定は生物がその進化の中で獲得した遺伝的多様性の維持のための最重要機構の一つである。しかし、性という概念は同じであっても、動物では一個体につき一つの性が与えられるが、植物では一個体の中で花単位に性が与えられるため、自然界における性表現様式は非常に多様化しており、多くの性表現において雌雄のバランスは内外の環境的要因に支配される。性表現は作物の収穫量や交雑の可否などを決定する律速因子であり、栽培・育種の両面において環境変化と関連して考慮すべき重要形質であるが、植物の性決定機構については知見の蓄積は非常に乏しい。条件・環境によらず植物の持ち得る潜在的な性表現を自由自在に操る技術は多くの課題を解決し、同時に、本来は存在しない性表現を誘導することで作物の新たな形質を開拓できる可能性がある。

本研究は植物において性別決定遺伝子が初めて同定されたカキ属をモデルとして、二倍体野生種の「画一的」な性決定システムから六倍体栽培ガキにおける「揺らぎのある」環境適応性の性表現への進化過程を紐解き、植物において潜在的に多様な性表現を人為的に制御する可能性を追求するものである。また、これは同時に、栽培化や倍数化といった植物の進化において重要な役割を果たすキーイベントにおいて性表現が可塑性・多様性を獲得していく適応進化過程を明らかにするものでもある。さらに本研究では、カキ属とは独立した性別決定因子を有する他科植物における性決定メカニズムおよびその性における環境適応性や進化機構を比較することで、植物の性決定における機作・進化の多様性と一般性を定義することも目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、植物の性表現多様化機構の解明に取り組んできた。ここでは、カキ属における「画一的」な個体単位の性表現が、倍数化・栽培化を経て、「可塑的」な花単位の性表現・両全性を成立させた要因を紐解くとともに、カキ属と同じツツジ目において独立した性決定機構を成立させたキウイフルーツ(マタビ属)における性別決定遺伝子を同定し、カキ属とのゲノムワイドな比較・進化学的な観点から植物における性決定多様化の要因を捉えた結果を報告する。

(i) カキ属における性表現の揺らぎを決定する要因の解明

六倍体の栽培カキにおける可塑的な花単位の性表現は、カキ属の性決定因子であり small-RNA をコードする *OIGI* とその標的である *MeGI* 間に潜在する DNA メチル化の発生・維持・解除に依存しており、このエピジェネティックスイッチは二倍体野生種では見られない、倍数体栽培カキに特異な現象であることを明らかにした。さらに、個体内の雌雄花比にバイアス

を生じる多様な品種群および交雑分離集団におけるゲノムワイドアソシエーション (GWAS) 解析によって、この *OGI/MeGI* のエピジェネティック制御の安定性に関与すると考えられる染色体領域およびその中に存在する候補遺伝子群を同定した。また、栽培カキの雌雄分化期花器官における大量トランスクリプトームデータを用いた共発現ネットワーク解析によって、*OGI/MeGI* の制御する分子経路を明らかにした。さらに、*MeGI* が雄性・雌性器官それぞれに独立した遺伝子経路を一括して逆向きに制御することにより、単一因子として単性花を成立させる機構を明らかにした。

(ii) カキ属とマタビ属における性の進化：植物の多様な性決定に潜む一般性

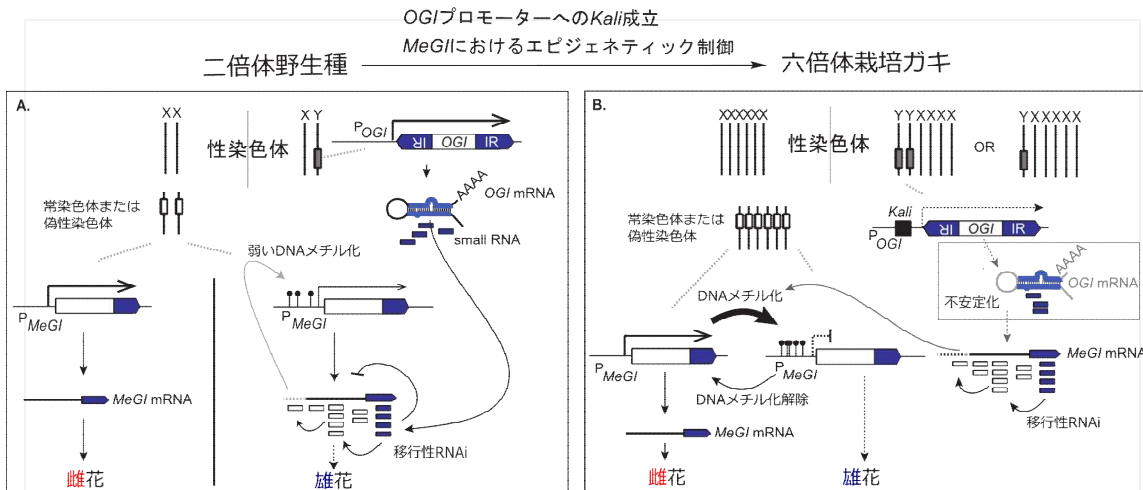
本研究ではキウイフルーツを含むマタビ属の性別決定因子の一つ *Shy Girl* を同定し、この遺伝子がマタビ属特異的な全ゲノム倍化とその後の適応進化における早急な新機能獲得に由来することを明らかにした。この性別決定因子の成立要因はカキ属にも共通するものであり、本研究では、全ゲノム解読によってカキ属における性の成立を積極的に駆動する原因となった系統特異的な全ゲノム倍化 (古倍数化) の存在を明らかにした。

(2) 詳細

「カキ属における性表現の揺らぎを決定する要因の解明」

カキ属における性別決定因子 *OGI* は雌化を統御する *MeGI* を trans-acting small-RNA によって分解することで性別を制御している。しかし、個体単位の性を持つ二倍体野生種とは異なり、六倍体栽培カキでは、*OGI* をゲノム中に有するにも関わらず、個体中に雌雄花の両者を着生し、環境依存的に両全花を着生する系統も存在する。

本研究では、この内外の環境要因に応答する「性表現の揺らぎ」の要因を解明するため、*OGI/MeGI* の発現の安定性、small-RNA の蓄積パターンを精査し、個体中の花単位の性表現がこれら二つの最上流因子における不安定性によって生じることを明らかにした。*OGI* を起点とする *MeGI* における small-RNA の蓄積パターンは二倍体-六倍体間において保存されていたが、六倍体では雄花運命をたどる原基でのみ small-RNA が蓄積しており、その発生・維持パターンから、DNA メチル化と small-RNA のポジティブフィードバックを中心とした *MeGI* の発現制御機構が考えられた。さらに、*OGI* の不安定性はプロモーター領域における SINE 様レトロトランスポゾン *Kali* の挿入とそれに伴う高度 DNA メチル化によって引き起こされていることが明らかになった。*Kali* は多様な六倍体栽培カキの *OGI* アレル全てにおいて保存されており、集団遺伝学的解析により、倍数化時の強いボトルネック要因となっている可能性が示唆された。以上により、倍数体栽培カキでは、第 1 図に示すような *OGI/MeGI* それぞれのエピジェネティックスイッチによって花単位の性運命が決定するモデルが考えられた。さらに、これらの *OGI/MeGI* におけるエピジェネティックスイッチの制御に関与する遺伝的因子の同定を目指し、本研究では個体内の雌雄花の比率にバイアスを生じる栽培カキ交雑分離集団および品種群における GWAS 解析を実施した。その結果、不活化した *OGI* の始動 (発現) に関わると考えられる 5 つの遺伝領域と、その中に存在し、雌雄分化期の花芽で有意に発現する候補遺伝子群を同定した。

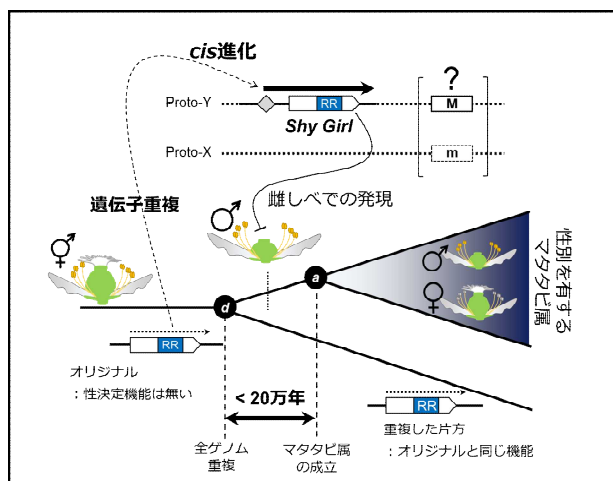


第1図: 二倍体野生種から六倍体栽培カキへの進化における可塑的性表現の成立モデル

また、六倍体栽培カキの雌雄分化期における花器官を用いたトランスクリプトーム解析によって、OGI/MeGI が雌雄器官発達を制御する分子機構を明らかにした。栽培カキの雌器官では class 1 *KNOX* 遺伝子群、*OVATE* family 遺伝子群およびそれに付随するサイトカニンシグナルを中心として雌雄間で発現差が生じており、これは MeGI がこれらの遺伝子群を直接的に正に制御しているためであると考えられた。一方、雄器官では、MeGI が直接的に正の発現制御を行う *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) が中核的な役割を果たし、下流の *PISTILATA* (*P*) などの Class B 遺伝子を負に制御するという分子機構が見出された。以上をまとめると、MeGI という単一因子による二方向性の雌雄器官制御モデルが考えられ、これは植物の性決定における代表的な進化モデルである二因子説 (Charlesworth and Charlesworth, 1978) とは異なる独自の進化様式を提案するものである。

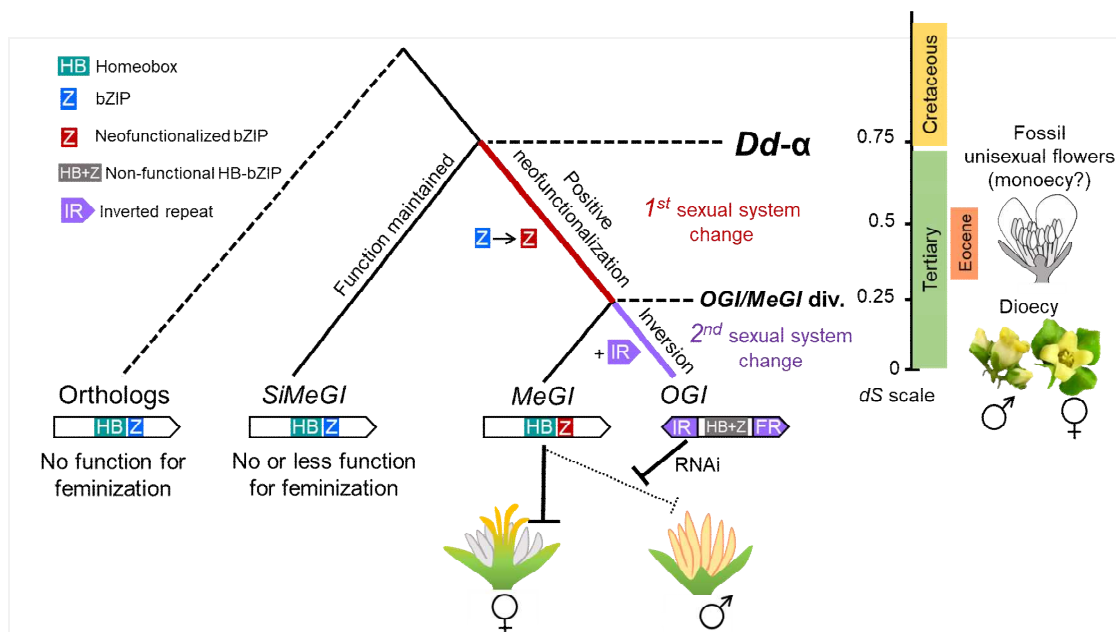
「カキ属とマタタビ属における性の進化: 植物の多様な性決定に潜む一般性」

本研究では、カキ属との比較研究のため、同じくツツジ目に属し、カキ属とは独立した性別決定機構を有するキウイフルーツ (マタタビ属) における性決定遺伝子の同定を行った。キウイフルーツにおいて *Shy Girl* と名付けた性別決定遺伝子を同定し、その生理機作がサイトカニンシグナルの抑制であることを明らかにした。*Shy Girl* はマタタビ属に特異な全ゲノム倍化とその後の積極的な発現パターン変化によって新機能を成立させた性別決定遺伝子であり (第



2 図)、その系統特異性は特異的古ゲノム倍化 (古倍数化) に依存していることが示唆された。

第2図: マタタビ属の性決定因子 *Shy Girl* の成立機構。系統特異的なゲノム倍化から性別を有するマタタビ属の成立まで僅かな時間しかなく、積極的に *Shy Girl* の新機能獲得が起こったことがうかがえる



第3図: カキ属における系統特異的な性別獲得の進化モデル

系統特異的な古ゲノム倍化 (*Dd-α*) に起因して *MeGI* は正の選択圧のもと、雌化の新機能を得て、単性花への進化に寄与したと考えられる

興味深いことに、同様の進化機構はカキ属でも見られ、カキ属の二倍体種であるマメガキの全ゲノム解読からカキ属に特異な古全ゲノム倍化の存在が明らかになり、*MeGI* はこのゲノム倍化によって生まれた重複遺伝子が正の選択圧を受けて積極的に性別決定という新機能を獲得した遺伝子であることが明らかになった(第3図)。つまり、カキ属とマタタビ属が比較的近縁であるにもかかわらず、独立した性決定機構を成立させている要因は、それぞれが独立した古ゲノム倍化によって性別決定因子を成立させているからであり、これは、植物に特徴的な「系統特異的かつ頻繁に起こった全ゲノム倍化・遺伝子重複」が性別の成立を駆動している進化理論を提案するものである。これまでに性別決定遺伝子(候補)の同定されているアスパラガス・野生イチゴにおいても同様に、ゲノム断片重複・トランスポゾン様重複断片が性別成立の鍵となっており、多様な性進化を駆動する一般性が提案されている。

3. 今後の展開

カキの多様な性表現を駆動しているエピジェネティックな揺らぎは倍数化によってもたらされたものであり、これはカキ属に限らず、植物一般においてみられる共通現象である。現在進めている GWAS 解析・遺伝子ネットワーク発現解析結果などを統合することにより、*OGI/MeGI* の個体内におけるエピジェネティックスイッチの制御機構および成立機構が明らかになり、さらに二倍体野生種との比較解析によって、倍数化を鍵としたゲノム・エピゲノムの揺らぎ獲得という、より大きな視野の研究分野に寄与できると考えている。

また、本研究では植物種間で多様な性別決定機構の分子機作を明らかにしてきたが、その多様性の中にあって、進化の共通性があることを見いだしており、さらに、その生理機作にも一定の共通点が見られている。例えば、キウイフルーツの性決定二因子はいずれも遠縁のモデル他科植物群においても性決定因子として機能することが分かっており、遺伝子編集など

を通して、本来は画一的に両全性を示す植物群であっても、潜在的に多様な性表現を再現することが可能であると考えられる。性表現の多様な方向性への人為的改変は実農業に寄与し、研究モデルとしての活用も考えられる。

4. 自己評価

研究全体としては予定通りに計画を達成できたと思われる。カキ属のエピジェネティックな揺らぎに關与する遺伝因子・環境因子の同定に關しては現在進行中であり、その結果は各因子の機能証明の後に公表予定である。また、本来は計画されていなかった植物の性別を生むゲノム進化の一般性に関しても結果が得られており、概ね順調に研究は遂行できたと考えている。

研究はさがけ採用期間全体で、合計 2 名の学生とともに実施しており、研究費の多くを計画されていた他種オミクスに充てることができたため、多角的な解析手法の検討が可能であった。申請者は本さがけ領域内および隣接領域(情報協働栽培)における共同研究も実施しており、その中では本来は申請者が専門外とする多くの技術・知識を習得することが出来た。これは、さがけ研究者として、研究成果以上の価値を持つものであると認識しており、今後はこれらの融合技術の発展・普及に努める責任も感じている。

本研究成果は、植物種間の多様な性別決定機構や、種内の進化における性の可塑性・多様化機構を明らかにしたものであり、その生理機作やゲノム進化には一般性が見え隠れしていた。植物の性別決定・性多様化に関する分子レベルの研究は始まったばかりであり、本研究はそれを先導するものであると自負しているが、今後は、多岐にわたる植物において、それらが共通して持つ潜在的な性表現多様化の可能性を明らかにするとともに、多様な性表現を人為的に引き出す技術を構築していきたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Takashi Akagi**, Isabelle M. Henry, Takashi Kawai, Luca Comai, Ryutaro Tao. Epigenetic regulation of the sex determination gene *MeGI* in polyploid persimmon. *Plant Cell*. 2016, vol. 28, p2905–2915.
2. **Takashi Akagi**, Takashi Kawai, Ryutaro Tao. A male determinant gene in diploid dioecious *Diospyros*, *OGL*, is required for male flower production in monoecious individuals of oriental persimmon (*D. kaki*). *Scientia Horticulturae*. 2016, vol. 213, p243–251.
3. **Takashi Akagi**, Isabelle M. Henry, Haruka Ohtani, Takuya Morimoto, Kenji Beppu, Ikuo Kataoka, Ryutaro Tao. A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *Plant Cell*. 2018, vol. 30, p780–795.
4. Yang Ho-Wen, **Takashi Akagi**, Taiji Kawakatsu, Ryutaro Tao. Gene networks orchestrated by *MeGI*: a single-factor mechanism underlying sex determination in persimmon. *Plant J*. 2019, <https://doi.org/10.1111/tpj.14202>.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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. 「キウイフルーツの性別決定遺伝子を発見 ―植物が「性別」を獲得した進化過程の解明へー」 2018 年 4 月 11 日(プレスリリース)
2. **Takashi Akagi**. Diversification of sexual system: insights from the persimmon genome. *The Society for Molecular Biology & Evolution* 2018. 2018 年 7 月 10 日(招待講演)
3. **Takashi Akagi**. The persimmon genome unveils lineage-specific paleoduplication events driving diversification of sexual systems. *Plant and Animal Genome Conference XXV*. 2018 年 1 月 14 日(招待講演)
3. **Takashi Akagi**. Evolution of flexible sex determination system in polyploid persimmon. XIX International Botanical Congress. 2017 年 7 月 24 日(招待講演)
4. Isabelle M. Henry, **Takashi Akagi**, Ryutaro Tao, Luca Comai. One hundred ways to invent the sexes: theoretical and observed paths to dioecy in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2018, vol. 69, p553–575. (総説)
5. **赤木剛士**. 種子植物における性決定の多様性. 化学と生物. 2017. vol. 55, p35–41. (著書)
6. **赤木剛士**. 「植物の性」. 遺伝子から解き明かす- 性の不思議な世界. 2019. P421–474. 田中実 編著, 一色出版(著書)

研究報告書

「植物－マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研究者: 市橋 泰範

1. 研究のねらい

農業の現場であるフィールドの土壌には、膨大な微生物で構成される生態系・マイクロバイオータが存在する。現在までの実験植物科学では微生物の影響を限りなく排除した環境下での知見が中心であるため、野外フィールドにおける植物の生命現象を包括的に理解し制御することは困難であった。一方で医学の分野においては、ノーベル賞受賞者 Lederberg 博士により、ヒトは真核細胞と原核細胞からなる「超個体」であり、ヒト細胞の機能だけでなく細菌叢の機能を含めた包括的な理解が必要であると提起している。実際に、細菌叢を整えることで疾患の治療に役立つ研究がいくつか報告され始めている。そのため、植物の根圏が地球上で最も微生物の活動が活発な空間であることを考えると、植物とマイクロバイオータとの共生現象の理解は近い将来の植物科学分野において最も重要な分野の一つになると考えられる。

そこで本研究では、植物とマイクロバイオータを一つの超個体として捉える分子生物学的研究を提案することで、従来の実験室での知見から将来的なフィールド研究への橋渡しを目指す。具体的には、植物の網羅的な表現型及び遺伝子発現データに加え、土壌に存在するマイクロバイオータのコミュニティ構成をネットワーク解析により統合し、植物－マイクロバイオータの超個体としての生命活動ネットワーク構造を明らかにする。加えて、本アプローチの大規模展開を見据えて、オミクス解析のハイスループット化を実現する技術開発を行う。さらに、マイクロバイオータによる植物形質デザインを可能とする技術開発も進めることで、植物－マイクロバイオータ超個体の分子生物学の中核基盤を確立することを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず植物－マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を可能とする植物－マイクロバイオータの実験系および解析手法を確立した。農業資材として利用されているマイクロバイオータとトマトの共生効果を実験室内で再現し、超個体のモデルとして解析した。オミクス解析により、植物の根圏環境がマイクロバイオータの多様性を維持し、マイクロバイオータの初期濃度に対して植物が免疫応答性の遺伝子発現の恒常的な変化を引き起こすことを明らかにした。また統合ネットワーク解析から、共生する細菌群に対応して複数の遺伝子転写制御系が植物ゲノムに存在することがわかり、植物－マイクロバイオータの超個体としての生命活動ネットワーク構造の一端を明らかにできた。

また本研究アプローチの有効性を農業現場のフィールドにて検証するため、土作りとして植物と微生物の調和が指摘されている有機農業を対象に解析を行った。その結果、有機農法の一つである太陽熱処理がコマツナの根圏に生息するマイクロバイオータの種類に大きく影響することがわかった。また統合ネットワーク解析から、コマツナ収量に強く関連した根圏微生物お

よび有機態窒素が明らかになり、特定の有機態窒素が栄養源や生理活性物質として収量を増加させることを証明した。本研究は、従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解明されていなかった、自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用がもたらす農作物への効果を明らかにし、有機態窒素を利用した新規農法の技術開発につながる植物栄養学上の新しい発見に至った。

さらに難培養微生物の培養に関して、環境中の細菌群が内包する共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステムを考案した。本システムは、マイクロ流路システムを用いた微小液滴技術と次世代シーケンサーを活用した技術基盤であり、難培養微生物の新規培養技術として本研究分野のブレイクスルーにつながる。期間内で本システムの完成には至っていないが、微小液滴によって細菌を1個体から複数個体での区画化培養、細菌が増殖した液滴をフローサイトメトリーによるソーティング、液滴から次世代シーケンサー解析用のライブラリー作成について個別の技術を整備した。

以上の研究から、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究のモデルケースを示し、本学問分野として必須になる中核基盤の確立に向かって前進できた。

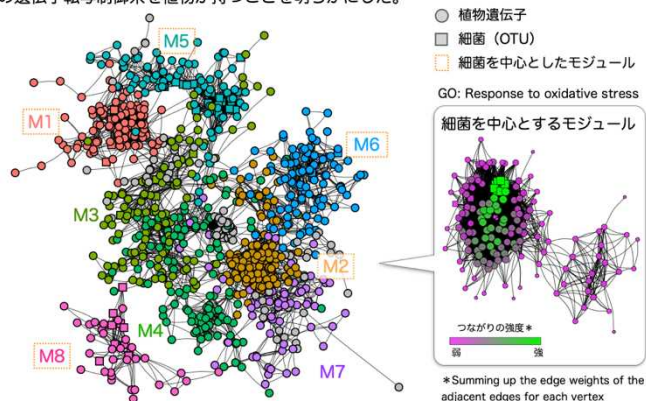
(2) 詳細

研究テーマ A 「植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

本テーマでは、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を可能とする植物-マイクロバイオータの実験系および解析手法を提案して(市橋ら、アグリバイオ、2017)、そのモデルケースとなる研究を実施した。農業資材として利用されているマイクロバイオータを対象として解析を進め、まず優占種が存在しない、150 種以上の様々な門に属するマイクロバイオータであることを確認した。このマイクロバイオータを使ってトマトへの接種実験から、トマトの根圏環境がマイクロバイオータの多様性を維持していることがわかり、トマトの主要な病気である青枯病に対する効果は検出されなかったが、トマトの成長を促進させていることがわかった。加えて、このマイクロバイオータは14種類以上の炭素源に対して代謝活性を持つことがわかった。トランスクリプトーム解析から、植物は接種するマイクロバイオータの初期濃度に対して免疫応答性の遺伝子発現の恒常的な変化を引き起こすことが明らかになった。またトランスクリプトームデータとマイクロバイオームデータの統合ネットワーク解析から、細菌を中心とする植物遺伝子で構成されたモジュールが複数検出され、共生する細菌群に対応して複数の遺伝子転写制御系が植物ゲノムに存在することが明らかになった。以上より、共生関係を築いている植物-マイクロバイオータの超個体を示す制御系として、植物遺伝子と細菌群との相互作用の一端を明らかにできた。

植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明

- 植物-マイクロバイオータの超個体を示す制御系として、共存する細菌に対応する複数の遺伝子転写制御系が植物が持つことを明らかにした。



さらに本アプローチの大規模展開を見据えて、オミクス解析のハイスループット化を実現する技術開発も行ってきた。安価でハイスループットな RNA-seq ライブラリー作成法である BrAD-seq を改良し(Ichihashi *et al.*, *Method in Molecular Biology*, 2018)、本技術を使った共同研究 36 プロジェクト(計 1,505 ライブラリー)を進め、その一部が論文としての成果につながった(Uemura *et al.*, *Plant reproduction*, 2017; Wu *et al.*, *Plant, Cell & Environment*, 2019)。また本技術を、DNA-seq や微生物を対象とした RNA-seq へ応用する技術開発も進め、その一部の成果は特許出願へと進んでいる。さらにネットワーク解析手法についても実績を積むことができた(Ichihashi *et al.*, *Plant and Cell Physiology*, 2018; An and Ichihashi *et al.*, *PLoS ONE*, 2016)。

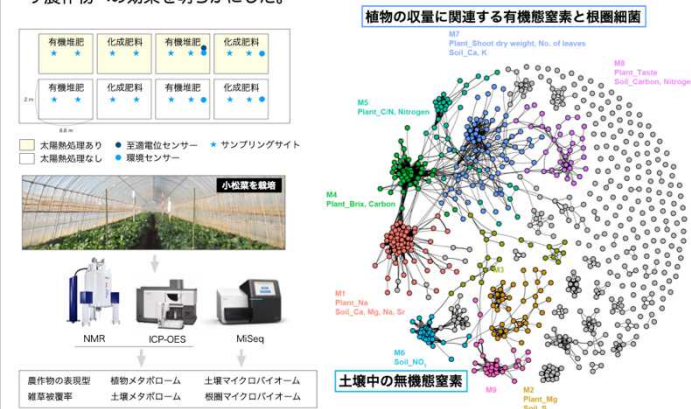
研究テーマ B 「フィールドでの植物-マイクロバイオータ超個体の生命活動ネットワーク解明」

植物とマイクロバイオータを同時に解析対象とする本研究アプローチの有効性を農業現場のフィールドにて検証するため、土作りとして植物と微生物の調和が指摘されている有機農業を対象にマイクロバイオータ解析およびメタボローム解析を行った(日本農業新聞 2017 年 8 月 29 日)。その結果、太陽熱処理が農作物の収量を 1.7 倍に増加させることが明らかになり、さらに翌年も太陽熱処理による成長促進効果が確認された。そのメカニズムを明らかにするため、土壌のメタボローム解析を行った結果、異なる処理による土壌特性が検出されるものの、アンモニア態および硝酸態の無機態窒素は太陽熱処理間で有意な違いはなく、現在の農学分野で主流であるリービヒの無機栄養説では今回の太陽熱処理による成長促進効果を説明できないことがわかった。興味深いことに、マイクロバイオータ解析から、太陽熱処理は土壌全体の微生物でなく、コマツナの根圏に生息する微生物の種類に大きく影響することがわかった。門レベルでの大きな影響が確認され、デインコックス・テルムス門やフィルミクテス門が太陽熱処理をした根圏で多くなること、特に植物の成長促進に関与する根圏バクテリアとしてパエニバシラス属とシュードモナス属が太陽熱処理により多くなることがわかった。これらの結果から、有機物と根圏微生物叢の相互作用が太陽熱処理による成長促進効果に関与していることが示唆された。そこで全データの統合したネットワーク解析を行ったところ、個別の比較解析では明らかにできなかった収量に強く相関した有機態窒素や根圏微生物の存在が明らかになった。そこで、検出された有機態窒素が太陽熱処理によって誘導された有機物と根圏微生物叢の相互作用の最終産物として植物の成長を促進させるという仮説を立て

検証実験を行った。その結果、特定の有機態窒素が栄養源や生理活性物質としてコマツナの収量を増加させることを明らかにし、さらにダブルラベルしたアミノ酸を使うことで、コマツナが直接アミノ酸を吸収・代謝していることを証明した。

有機農業園場における植物とマイクロバイオータの動態

- 現代農業を支える理論とは異なる、有機態窒素とマイクロバイオータの相互作用がもたらす農作物への効果を明らかにした。



現在の慣行農法はリービッヒの無機栄養説をもとに確立されているが、本研究の結果は、従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解析されていなかった、自然の物質循環である有機物と根圏微生物叢の相互作用がもたらす農作物への効果を強く示唆する。過去の研究で実験室レベルでは有機態窒素が植物に吸収されることは実証されているが、本研究により初めてフィールドレベルで有機態窒素が農作物の生育促進に関与していることを実証したケースとなった。本研究の発見から、有機態窒素を利用した新規農法の技術開発につながることを期待される(日本農業新聞 2018 年 3 月 28 日)。

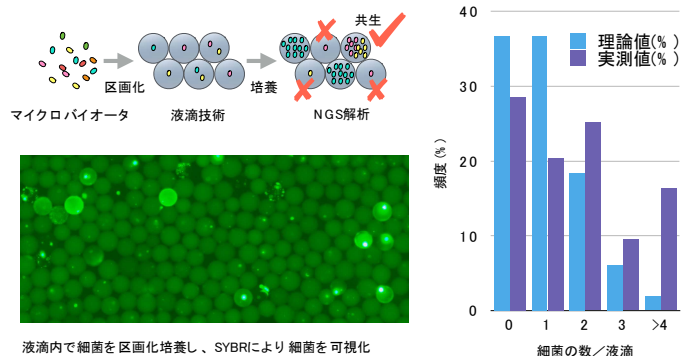
研究テーマ C 「マイクロバイオータによる植物形質デザインを可能とする技術開発」

マイクロバイオータによる植物形質デザインを実現するには、マイクロバイオータを使った検証実験が必要になり、微生物培養が必須となる。一方で、地球上にはおよそ 1 兆種の微生物が存在し、そのうち 99%以上は難培養性である。とくに進化の過程において微生物同士は複雑なネットワークを構築しているため、単独では生存できない共生関係を形成していることが多い。難培養性微生物の培養を可能にするには、個々の微生物間の共生関係を包括的に理解する必要がある。そこで本研究では、環境中の細菌群が内包する共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステムを考案した。具体的には、マイクロ流路システムを用いた微小液滴技術により微小液滴に細菌を 1 個体、もしくは複数個体に区画化し、培養する。液滴同士は物質の交換が無く、同じ液滴内に増殖の条件が揃う場合のみ細菌が増殖する。細菌が増殖した液滴をフローサイトメトリーでソートし、次世代シーケンサーで読み取ることにより、どの細菌がどの細菌と共生関係であるかを伺い知ることができる。現在までに本システムの構築には至っていないが、微小液滴による区画化培養、液滴のソーティング、液滴から次世代シーケンサー解析用のライブラリー作成の個々のプロセスについて技術的に実行可能とした。本システムが完成すれば、共生により培養が可能となる細菌群の組み合わせを網羅的に

解明することができ、難培養微生物の新規培養技術として本研究分野のブレークスルーにつながる。このような微小液滴技術を使ったマイクロバイオータの培養技術の実現により、微生物の機能を明らかにする検証実験が可能となり植物微生物共分野の理解ひいては農業への応用が期待される(Toju *et al.*, *Nature Plants*, 2018)。

マイクロバイオータの新規培養技術の開発

- ・ マイクロ流路を用いた微小液滴技術と次世代シーケンサーを活用して、共培養の最小ユニットを高効率に検出するシステム構築を考案した。
* システムの完成には至っていないが、個別の技術を整備した。



3. 今後の展開

本研究では世界にさがけて、植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究を実験室内及びフィールドにおいて実施し、超個体の制御系の特性を明らかにするとともに、農業分野の技術開発に貢献できる知見を得ることもできた。植物-マイクロバイオータ超個体の分子

生物学をさらに推し進めるため、単離したマイクロバイオータによる検証実験が最も重要な位置付けとなる。そこで今後は、微生物培養技術の開発を中心に進め、より洗練した実験系の確立を目指したい。さらに植物とマイクロバイオータを同時に対象とするフィールドオミクスにより、農業現場における情報整備を大規模に進めることで、研究成果を社会・経済に還元できる研究プロジェクトを開始している。

4. 自己評価

本研究は、アイデア先行で予備結果がない状態で開始したチャレンジングな課題である。そのため研究期間の前半は研究総括をはじめ、アドバイザーの先生、さがけ研究者メンバー、国内外の関連分野の研究者から多くの助言をいただき、多岐にわたる試行錯誤を繰り返して研究を進めた。当初計画していた実験の遂行以前に基盤整備に多くの時間と労力を費やしたが、本研究に参加していただいた研究補助者や学生、また共同研究者からの多大な協力のもと、さがけ研究でサポートされた研究費や研究者交流会を活用することで、最終的には植物-マイクロバイオータ超個体の分子生物学的研究のモデルケースとなるような実験室内およびフィールドでの研究を展開することができ、上述の研究成果を得ることができた。研究成果の論文文化に加えて、オミクス解析の新技术や微生物培養技術の確立まで研究期間内に完了することができなかったのは残念であるが、本研究をもとに 2018 年度から理化学研究所バイオリソース研究センターに新チームを立ち上げる機会をいただき、さらに内閣府の戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)スマートバイオ産業・農業基盤技術の課題へとつながった。これらは本さがけ研究の発展の機会を与えられたものと自負して、今後の研究に邁進していきたい。

また BrAD-seq 解析のアウトソーシングや技術開発の共同研究を通じて、様々な研究者と交流し、多くの研究課題に触れることで研究者として成長させていただく機会を得た。本さがけ研究を通して、研究アプローチや科学技術の開発ができたことは、本さがけ領域が目指す植物科学における次世代基盤技術の創出に貢献できると考え、今後も技術開発を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Wu J, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K, Yamaguchi N, Ito T. Absciscic acid-dependent histone demethylation during post-germination growth arrest in Arabidopsis. Plant, Cell & Environment. 2019, in press
2. Ichihashi Y*, Fukushima A, Shibata A, Shirasu K. High Impact Gene Discovery: Simple Strand Specific mRNA Library Construction and Differential Regulatory Analysis Based on Gene Co-expression Network. Methods in Molecular Biology. 2018, 1830, 163-189. *Corresponding author.
3. Ichihashi Y*, Kusano M, Kobayashi M, Suetsugu K, Yoshida S, Wakatake T, Kumaishi K, Shibata A, Saito K, Shirasu K*. Transcriptomic and Metabolomic Reprogramming from Roots to Haustoria in the Parasitic Plant, *Thesium chinense*. Plant and Cell Physiology. 2018, 59(4), 729-738. *Corresponding authors.

4. Uemura A, Yamaguchi N, Xu Y, Wee W, Ichihashi Y, Suzuki T, Shibata A, Shirasu K, Ito T. Regulation of floral meristem activity through the interaction of AGAMOUS, SUPERMAN, and CLAVATA3 in Arabidopsis. Plant Reproduction. 2018, 31(1), 89–105.
5. An CI*†, Ichihashi Y*†, Peng J, Sinha NR, and Hagiwara N*. Transcriptome Dynamics and Potential Roles of Sox6 in the Postnatal Heart. PLoS ONE, 2016, 11(11), e0166574.
*Corresponding authors, †Equal contribution.

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(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. Toju H, Peay KG, Yamamichi M, Narisawa K, Hiruma K, Naito K, Fukuda S, Ushio M, Nakaoka S, Onoda Y, Yoshida K, Schlaeppi K, Bai Y, Sugiura R, Ichihashi Y, Minamisawa K, Kiers ET, Core microbiomes for sustainable agroecosystems. Nature Plants. 2018, 4, 247–257.
2. 市橋 泰範, 石垣 祐二, 白須 賢. 植物と根圏微生物叢との相互作用. アグリバイオ. 2017 年 9 月号.
3. 「有機農業の土壌・作物 科学的に効果解明へ」日本農業新聞 2017 年 8 月 29 日
4. 「太陽熱処理後の作物生育 有機態窒素増が関与」日本農業新聞 2018 年 3 月 28 日

研 究 報 告 書

「土壌水分変動適応型エピジェネティック情報を捉えたイネの分子デザイン」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 犬飼 義明

1. 研究のねらい

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。これまでに我々は、様々なイネ品種・系統を対象にフィールドにて耐乾性程度を評価し、乾燥ストレス下において根系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。

一方、根系形成の分子機構の解明は、主に突然変異体を用いた解析によりめざましく進展してきた。また、近年ではイネ根系の伸長方向を決定する QTL も特定され、耐乾性育種への利用が進められている。しかしながら、根は土壌中に展開するため、刻一刻と変化する土壌環境に応答した根系形態の変化を捉えることが非常に難しく、特にフィールドにおける根系形態の環境応答機構に関してはほとんど解明できていないのが現状である。

これに関して我々は、近年、非ストレス下においてもストレス下と同様に根系の発育が優れる変異体の選抜に成功した。そこで、ポジショナルクローニング法により原因遺伝子の単離を試みた結果、本変異体はヒストン H3 テールの 27 番目のリジンにおけるトリメチル化 (H3K27me3) 修飾状態を制御する遺伝子であった。ヒストンテールの修飾には非常に多くの種類が存在するが、この内の H3K27me3 状態は遺伝子の転写抑制マークとして機能すること、また環境変動によりその状態が大きく変動することが知られている。そのため、乾燥ストレス下では標的遺伝子群の H3K27me3 程度が低下することでこれらの発現レベルが上昇し、最終的に根系形態の可塑的な反応が誘発されると想定される。

そこで本研究では、環境変動時に真っ先に状態変化が起こるであろう「個々の遺伝子座等の H3K27me3 程度を表現型データとした連鎖解析」に挑戦し、本修飾状態を制御する QTL の検出を通した新たなイネ分子デザイン法の開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

はじめに、土壌を用いた栽培下での根系を対象としたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法の確立を試みた。その結果、ChIP-Seq 解析に十分な量、および質の DNA 回収のための最適な条件が得られ、かつライブラリーの作成、ChIP-Seq 解析および、イネゲノムへのリードのマッピング率も問題ないことが判明し、本条件を今後の解析に用いることにした。

次に、野外水田にて育成し採種したイネの根系を対象に、上記条件において ChIP-Seq 解析を進めた。供試材料として、乾燥ストレス感受性品種である「日本晴」と耐性品種である「KDML105」を用い、土壌水分の変動する栽培条件下にて経時的にサンプリングして解析した結果、全遺伝子座を対象とした H3K27me3 状態の変動パターンを把握することに成功した。

続いて、日本晴/KDML105 の F₂ 個体群 (90 個体) を対象に、乾燥ストレス下での同ヒストン

修飾状態を ChIP-Seq 法により解析した。その結果、LOD 値 3.5 以上を QTL と判定した場合、全体の約 6%にあたる 2,055 個の遺伝子座の H3K27me3 状態を制御する QTL 群が検出可能であった。これらの個々の QTL のマップ位置を概観すると、いずれかの品種側の遺伝子型のみ H3K27me3 状態を共通で高める領域が複数存在していた。そこで、これらの QTL の検出をもたらした個々の遺伝子座について注目し、どのような遺伝子群がエピジェネティック制御を受け、実際に根系の可塑性を促すのかについて解析した結果、細胞壁の伸展性に関わる遺伝子群やホルモンのシグナル伝達に関わる遺伝子群、および各種転写因子群が存在していた。

加えて、日本晴/KDML105 の交雑後代系統(BC₃F₁ 世代)のゲノム全体に渡る遺伝子型を次世代シーケンサーにより決定し、検出された QTL の単離に適した系統を選抜した。現在はこれらを材料に、マップベースクローニング法により、根系形態の可塑的反応性のエピジェネティック制御に関わる QTL の単離を目指している。また、同材料を用いてフィールドにて耐乾性を評価した結果、特に第 5 染色体の QTL を有する系統が優れていることが判明し、本 QTL が有用であるとする実証を得た。

(2) 詳細

研究テーマ A「土壌から採取した根系を対象とした ChIP 解析法の確立」

まず、水耕栽培により育成したイネの種子根をサンプリングし、ホルムアルデヒドによる DNA-タンパク質の架橋、超音波処理による DNA の断片化、H3K27me3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)法による DNA 断片の精製・回収のための条件(サンプリングする根の量、DNA-タンパク質の架橋や DNA の断片化に最適な処理時間、および試薬の種類等)を確立した。次にこれに倣い、水田や土壌を充填したポットで育成したイネの根系をサンプリングし、同様に H3K27me3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)法による DNA 断片の精製・回収を試みた。その結果、ChIP-Seq 解析に十分な量、および質の DNA が回収できることが判明したため、ライブラリーの作成・ChIP-Seq 解析へと進め、イネゲノムへのリードのマッピングを行ったところ、問題なく解析出来ていることが判明し、本条件を今後の解析に用いることにした。

研究テーマ B「フィールド条件下での全遺伝子座を対象とした H3K27me3 修飾状態の変動パターンの解析」

野外水田にて育成し採種したイネの根系を対象に、上記条件において ChIP-Seq 法により解析を進めた。供試材料として、乾燥ストレス感受性品種である「日本晴」と耐性品種である「KDML105」を用い、土壌水分の変動する栽培条件下にて経時的にサンプリングして解析した結果、全遺伝子座を対象とした H3K27me3 状態の変動パターンを把握することが可能であった。

研究テーマ C「各遺伝子座における H3K27me3 修飾状態を制御する QTL の同定」

はじめに、ガラス室にて日本晴/KDML105 の F₂ 個体群(90 個体)をポット栽培し、乾燥ストレス下での同ヒストン修飾状態を ChIP-Seq 法により解析した。次に、ChIP-Seq で得られたリー

ドをイネゲノムへマッピングし、まずはイネの個々の遺伝子領域のリード数を表現型データとして捉え、全ての遺伝子座を対象とした QTL 解析を試みた。その結果、LOD 値 3.5 以上を QTL と判定した場合、全体の約 6% にあたる 2,055 個の遺伝子座の H3K27me3 状態を制御する QTL 群が検出可能であった。これらの個々の QTL のマップ位置を概観すると、いずれかの品種側の遺伝子型のみ H3K27me3 状態を共通で高める領域が複数存在しており、特に第 3 染色体長腕、第 5 染色体長腕、第 6 染色体短腕、第 7 染色体長腕、第 9 染色体長腕にそのような領域が観察された。

研究テーマ D「QTL 単離のための材料育成と QTL 候補の特定」

検出された QTL 領域のうち、どの領域に注目して解析を進めるのかを以下により決定した。まず、乾燥ストレス下で栽培した日本晴と KDML105 の根系をサンプリング後に RNA を抽出し、全遺伝子を対象に発現量を RNA-Seq により解析することで、親品種間で発現量が異なる遺伝子を選抜した。H3K27me3 修飾は遺伝子発現の抑制マークとして知られている。そのため、この修飾状態と遺伝子発現解析の結果が一致する遺伝子を特定し、その後の解析対象遺伝子群とした。

次に、これらのうちのどの領域に位置する QTL が実際に根系発育を制御しているのかについて情報を得るため、乾燥ストレスを処理した上述の F₂ 個体群の根系形質を対象に QTL 解析を行った。その結果、総根長や総側根長に関わる QTL が第 1 染色体長腕、第 3 染色体長腕、第 5 染色体長腕、第 7 染色体長腕、および第 10 染色体長腕の計 5 箇所に検出された。このうち、第 3、第 5、および第 7 染色体上の QTL は上記の H3K27me3 状態を対象とした QTL の領域と一致していた。そのため、これらの領域に QTL の検出をもたらした個々の遺伝子座について注目することとした。

さらに、その内のどの遺伝子座が重要であるかを明らかにするため、側根の可塑的反応性を簡易に解析できる評価法の確立を試みた。土壌の乾燥やそれに伴う圧縮ストレスにより、種子根や冠根といった主軸根の根端が障害を受けて伸長成長が阻害されると、障害を受けた主軸根の根端近傍には通常よりも太く、長く、高次の分枝を伴うタイプの側根が形成される。この現象に着目し、水耕法にて栽培したイネ実生の種子根を根端近傍で切断することで、側根形態の可塑的反応過程を簡便に捉えられる実験系（根端切除法）の確立に成功した（Kawai et al. 2017）。また、側根の発育に関わる突然変異体の解析から、どのような遺伝子が側根形態の可塑的反応性の分子機構に関わるかの知見を得ることができ（Inahashi et al. 2018; Shelly et al. 2018）、根端切除法を用いた発現解析とあわせて解析することにより、第 3、第 5、および第 7 染色体に QTL を検出させた個々の遺伝子座のうち、実際に側根の発育に関わるであろう遺伝子座を絞り込むことが可能であった。

加えて、日本晴/KDML105 の交雑後代系統 (BC₃F₁ 世代) のゲノム全体に渡る遺伝子型を次世代シーケンサーにより決定し、第 3、第 5、および第 7 染色体に検出された QTL の単離に適した系統を選抜した。現在はこれを材料に、マップベースクローニング法により、根系形態の可塑的反応性のエピジェネティック制御に関わる QTL の単離を目指している。また、これらを材料にフィールドにて乾燥ストレス耐性を評価した結果、特に第 5 染色体の QTL を有する系統が優れていることが判明し、耐乾性育種における本 QTL が有用であるとする実証を得た。

3. 今後の展開

現在はQTLを検出させた個々の遺伝子座のうち、実際に側根の発育に関わるであろう候補遺伝子座の同定を進めている。これを進める上では、上述の側根形態の可塑的反応過程を簡便に捉えられる実験系(根端切除法)が非常に有効であり、これによりメリステムサイズの異なる側根の発育過程を詳細に捉えることが可能になっている。現在はレーザーマイクロダイセクション法により各メリステムで特異的に発現する遺伝子の解析を進めており、この情報とあわせることで側根発育に関わる候補遺伝子座の同定が飛躍的に進むものと期待している。

また、本研究ではChIP-Seqデータを用いて遺伝子領域のリード数をもとにQTLの検出を行ったが、転写開始点近傍のみのリード数を対象としてQTL解析を試みた結果、前者を対象とした場合と共通した箇所に加えて、新たな領域にもQTLが同定されることが判明した。現在は同F₂個体を対象にRNA-Seqによる各遺伝子の発現量を制御するQTL(eQTL)の同定も進めており、これらをあわせて解析することにより、個々の標的遺伝子の発現レベルを最適に制御する上でどの領域のヒストン修飾が重要になるかが見出せると考えている。これらの情報を利用することにより、ヒストン修飾を捉えた新たなイネの分子デザインが可能になると期待している。

4. 自己評価

研究開始当初の懸念事項であった、土壌から採取した根系からChIP解析に値する量と質のDNAが回収できるのか、その解析は予算内で可能か、個々のヒストン修飾状態を制御するQTLは検出できるのかなどに関しては、結果的には問題なく進めることができた。また、検出されたQTLが実際に根の発育に関わるのかについても、概ね問題ないと考えられる結果が得られている。今回、初めて実験補助員を2名雇用しつつこれらの解析を行ってきたが、適切な指示を出しつつ着実に進めていくことができたと感じており、これらの点に関しては期待通りの成果が得られたと考えている。一方、これらの知見をもとにしたイネの分子デザインの開発に関しては、現在は異なる領域のヒストン修飾状態を捉えたQTLの利用も有効であると考えており、これにはRNA-SeqによるeQTLの検出結果も踏まえて精査していく必要があると実感している。このRNA-Seqについては、研究期間内に何とかデータを取得することに成功した。このデータを用いて解析することで、近い将来、本デザイン法が開発できるよう努力したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Inahashi, H., Shelley, I. J., Yamauchi, T., Nishiuchi, S., Takahashi-Nosaka, M., Matsunami, M., Ogawa, A., Noda, Y. and Inukai, Y. *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*. 2018, 164, 216–225.
2. Shelley, I. J., Watanabe, S., Ozaki, H., Nagasawa, N., Ogawa, A., Takahashi-Nosaka, M., Nishiuchi, S., Yamauchi, A., Kitano, H. and Inukai, Y. Analysis of the *rrl3* mutants reveals

the importance of arginine biosynthesis in the maintenance of root apical meristem in rice. *Journal of Plant Studies* 2018, 7, 36–46.

3. Kawai, T., Nosaka–Takahashi, M., Yamauchi, A. and Inukai, Y. Compensatory growth of lateral roots responding to excision of seminal root tip in rice. *Plant Root*, 2017, 11, 48–57.

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(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. Tsubasa Kawai, Misuzu Nosaka–Takahashi, Akira Yamauchi and Yoshiaki Inukai. Developmental analysis on compensatory growth of lateral roots responding to excision of seminal root tip in rice. 10th Symposium of the International Society of Root Research, 2018 July, Ma’ale HaHamisha, Israel.
2. Nonawin B. Lucob, Misuzu Takahashi–Nosaka, Akira Yamauchi and Yoshiaki Inukai. Functional Analysis of a Mutation Promoting Lateral Root Development via Carbohydrate Regulation in Rice. 10th Symposium of the International Society of Root Research, 2018 July, Ma’ale HaHamisha, Israel.
3. 河合翼・児島孝明・山内章・犬飼義明. イネ異形側根のメリステム形成における QHB/OsWOX5 遺伝子の役割. 第 48 回根研究集会. 2018 年 5 月. 前橋, 群馬.
4. 河合翼・児島孝明・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. 第 133 回育種学会講演会. 2018 年 3 月, 九州大学.
5. 河合翼・児島孝明・犬飼義明 2017. イネ根系に見られる表現型可塑性の分子機構解明を目指して. *アグリバイオ* 11: 47–50.

研 究 報 告 書

「核ゲノム－オルガネラゲノムの協調的改変による植物のエネルギー代謝系の至適化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 大西 孝幸

1. 研究のねらい

植物のエネルギー同化を担う“光合成”とエネルギー生産を担う“呼吸”において、それぞれ“葉緑体”と“ミトコンドリア”という細胞内小器官(オルガネラ)が重要な役割を果たすことが知られている。これらの生命活動は、核ゲノムとオルガネラゲノムにコードされている複数の遺伝子群が協調的に働くことで制御されている。植物が新しい生育環境に適応するためには、核ゲノムにコードされた因子とオルガネラゲノムにコードされた因子が調和を保ちつつ変化し、光合成や呼吸といった生命活動を新たな環境条件に至適化する必要がある。しかしながら、植物育種の歴史を振り返ると、核ゲノムの適応のみを目標とすることがほとんどであり、オルガネラゲノムの適応に関する試みはほとんど成されていない。

本研究は、イネのオルガネラゲノムのナチュラルバリエーションに着目し、細胞質置換系統のフィールドにおける光合成能・呼吸能を定量的に解析し、環境に至適化した植物体の設計を目指す。これを実現するため、イネの核ゲノム－オルガネラゲノム間の相互作用を遺伝子発現レベルで検出し、核ゲノム－オルガネラゲノムの親和性を判定するためのバイオマーカーや生物指標を探索する。さらに、最新の計測機器を用いたフィールドでのデータ採取に基づき、遺伝情報と環境情報から導かれるイネの光合成能・呼吸能を検証する。

本提案は、特定の作物に関する固有の問題に対応するものではなく、植物全般に共通する普遍的な生命原理(光合成と呼吸)に向き合い、環境に応じた植物のエネルギー同化能やエネルギー生産能を人為的に付与することで、植物の潜在能力を最大限引き出すことを目的とする。本研究成果によって、エネルギーや化学肥料を外部から投入する資源浪費型の農業から、植物体自身の自給自足を促した資源節約型の持続的農業への転換が期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

地球規模で進行する急激な環境変動に対して、作物の安定供給を実現させることが大きな課題となっている。本研究課題では、植物の光合成や呼吸といったエネルギー代謝を担うオルガネラゲノムに着目し、**オルガネラゲノムの実態を包括的に理解することを通じて、植物光合成の頑健性・生産性を強化するための技術創成に挑戦した。**

本研究の成果として、アブラナ科近縁野生種 *Diplotaxis erucooides* のオルガネラゲノムを導入したキャベツ系統において、安定した雄性不稔性が生じるとともに、バイオマスが増大するという有用特性が現れることを明らかにした(Fujita *et al.*, 2018)。このことから *D. erucooides* オルガネラゲノムを導入したキャベツ系統は、F₁ 種子を採種するための新規

CMS 系統 (De-CMS 系統)として十分に利用が見込めるだけでなく、オルガネラゲノムを対象とした品種改良の可能性を提示した。このバイオマス増大の要因として、光合成能力の向上や光合成関連遺伝子の高発現によって初期生育が旺盛になることが考えられた。

本研究成果は、既存の農資源の機能性を高め、日本がかつてから継承し守り続けた農作物の品種へのさらなる改良に繋がり、自立した持続的な農業生産体制を構築するための科学的基盤となり得る。

(2) 詳細

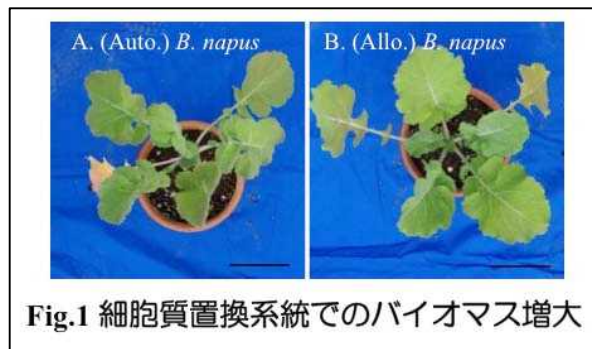
研究テーマ A 「オルガネラゲノムの機能的差の検出」

光合成能に関する QTL 解析として、当初の計画では屋外での大規模調査を想定していたが、環境要因による測定値の変動が大きいため、人工気象器内での定常環境下における解析に移行した。その結果、細胞質置換系統については、解析を実施できたが、QTL のような大量サンプルの解析データを必要とする実験については実施することができなかった。イネ細胞質置換系統やアブラナ科作物の細胞質置換系統については、光合成能力に変化を検出できた。しかしながら、バイオマスの変動に対する相関関係は乏しいため、光合成能力はバイオマスの変動の要因の1つでしかないと推察された。

研究テーマ B 「エネルギー代謝系の再構成」

顕著に栽培域が異なり、遺伝的距離が十分に離れた栽培イネの祖先種に該当する *O. rufipogon* 由来のオルガネラゲノムとアフリカ栽培イネである *O. glaberrima* 由来のオルガネラゲノムに注目し、これらのオルガネラゲノムを保持する F₂ 集団を圃場に展開し、これらの光合成速度と呼吸速度を表現型データとして QTL 解析を実施することで、呼吸や光合成の環境適応において重要な役割を担っている核ゲノム領域を同定する予定だったが、圃場での表現型データが安定性に乏しかったため、信頼性のある QTL が得られなかった。

上記のイネの実験計画に加えて、アブラナ科作物における細胞質置換系統群の中から、イネ細胞質置換系統と同じバイオマスの向上という表現型を示す系統を選抜し (Fig.1)、その外来性オルガネラゲノムをさまざまなアブラナ科植物に導入して、表現型と遺伝子発現を調査した。その結果、外来性オルガネラゲノムの導入により、光合成関連遺伝子の発現量が上昇し、初期生育が旺盛になっていることがわかった。



研究テーマ C 「バイオマーカーの探索」

人工気象器で栽培したイネとアブラナ科作物の細胞質置換系統から RNA をサンプリングし、トランスクリプトーム解析を行うことで、細胞質置換の影響を遺伝子発現レベルで検証した。発現の変動が見られた遺伝子の中には、光合成関連遺伝子が複数含まれていた。この

実験結果はシロイヌナズナの雑種強勢において提唱されている分子メカニズムと類似しており、シロイヌナズナの雑種強勢で提唱されている初期生育の向上によるバイオマス増大との相同性を示唆した。

3. 今後の展開

様々な研究機関が環境変動に適応できる農作物の開発に取り組んでいるが、その多くは遺伝子組換えに頼った手法である。食の安心・安全やモノカルチャー化防止のため、既存作物品種に対する慣行手法によるさらなる育種改良技術の開発が必要とされている。本研究課題をさらに推進し、外来性オルガネラゲノムの導入によるバイオマス向上の分子実態を解明することで、植物の生産性を強化するためのオルガネラゲノム育種という農業革新の創成に挑戦したい。学術的にもオルガネラゲノム育種は雑種強勢(ヘテローシス)に近い分子メカニズムが内包されていることが予測され、本研究の推進が雑種強勢の分子メカニズムの理解にも役立つことが期待される。今後の食糧生産体制の強化において、重要な役割を担っていると考えている。

4. 自己評価

本研究では、オルガネラゲノムのナチュラルバリエーションに着目し、細胞質置換系統の光合成能・呼吸能の解析を通して、環境に至適化された植物体の設計を目指した。特にオルガネラゲノムの機能的多様性に着目して研究を進めた。その結果、イネとアブラナ科作物において、特定の外来性オルガネラゲノムの導入によって、バイオマス増大の効果をもたらすこと、これらの系統において、光合成関連遺伝子の発現量や植物体の光合成能力に変化が見られることを明らかにした。しかし、まだ原因となる分子機構の解明には至っておらず、現象論の段階にとどまっていることは残念である。当初目的である環境に至適化した植物体の設計については十分な取り組みに至っていない。外来オルガネラゲノムがバイオマスを向上させる分子機構の解明にはまだしばらく時間がかかりそうだが、ぜひ突き止めたい。そのためには、オルガネラゲノム由来の次世代シーケンサーデータに関するバイオインフォマティクス解析や、光合成に関する生理学なアプローチなどに優れた研究者との多方面の共同研究がきわめて有効であり、さきかけ研究終了後も本テーマの完成に向けて基礎研究の側面で継続的に努力したい。

並行して、バイオマス向上という農業有用形質に着目し、穀類であるイネのみならず地上部バイオマスが可食部となる葉物野菜を研究材料に加え、葉物野菜においてもバイオマス増大効果をもたらすオルガネラゲノムを見出した。この成果をより早く社会実装に移せるような取り組みも行っていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshiaki Fujita, Atsushi Yag, Su-Hyeun Shim, Takayuki Ohnishi, Sang-Woo Bang. Production of a desirable *Brassica oleracea* CMS line using an alloplasmic *B. rapa* CMS line carrying *Diplotaxis erucoides* cytoplasm as a bridge plant. Plant Breeding. 2018. 137(2). 162-170
2. Takeshi Takamatsu, Marouane Baslam, Takuya Inomata, Kazusato Oikawa, Kimiko Itoh,

Takayuki Ohnishi, Tetsu Kinoshita, Toshiaki Mitsui. Optimized Method of Extracting Rice Chloroplast DNA for High-Quality Plastome Resequencing and de Novo Assembly. Front. Plant Sci., 2018. 266(9). 1-13

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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. Yoshiaki Fujita, Atsushi Yagi, Su-Hyeun Shim, Takayuki Ohnishi, Sang-Woo Bang
「Allopolyploidization induces partial remission of cytoplasmic male sterility within *Brassica napus* carrying *Diplotaxis erucoides* cytoplasm」 25th International congress on sexual plant reproduction, Gifu, Japan 2018.6.

研究報告書

「化学遺伝学的手法を利用した乾燥ストレス適応型作物設計」

研究タイプ：通常型

研究期間：2015年12月～2019年3月

研究者：岡本 昌憲

1. 研究のねらい

乾燥地にとって水は極めて重要な資源である。限られた水を有効的に利用することは、人間の生活のみならず、作物生産においても次世代農業を実現するためには必要不可欠である。地中に地下水が豊富に存在するような乾燥地では、深根性の形質を示す植物が乾燥地における水の獲得に有利であるが、地下水が存在しない乾燥地も広く存在し、このような乾燥地では、植物が根を地中深くに伸ばしても、水を獲得することができない。地下水の存在しない多くの乾燥地では、人工灌漑や雨水により、地表層に水を蓄え、農業に利用する。つまり、このような状況では、限られた貴重な水を無駄に使用せず、生長できる節水型乾燥耐性の形質が有効的である。植物の節水性と耐乾性を向上させる技術、あるいはそれらの性質を兼ね備えた作物が開発できれば、乾燥ストレスによる生産量の損失を軽減できるため、乾燥地における農業生産に対する影響は大きいものとなる。

植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は高等植物に普遍的に広く存在し、陸上植物の乾燥ストレス耐性に関わる重要なシグナル物質である。モデル植物のシロイヌナズナを中心に主要なABA代謝経路とシグナル伝達の概要が明らかにされているが、実用作物への展開は乏しく、モデル植物で得られた耐乾性を向上させる方法論を実際の作物で検証する必要がある。そこで、本研究では、世界の乾燥地で広く栽培されている重要作物のコムギを研究材料に用いて、耐乾性と節水性にABAがどれだけ寄与するかを検証するとともに、遺伝的多様性が乏しいコムギに耐乾性を付与するための新たな育種素材の選抜とQTLの同定を行い、少ない水資源で作物生産を可能とするための作物設計実現のための基盤研究を実施することとした。

2. 研究成果

(1) 概要

遺伝子組み換えが困難とされているコムギでABA受容体を過剰発現させた形質転換体(TaPYLox)の創出に成功し、分子的な特徴付け、および生理学的な評価を行った。次世代シーケンシング(NGS)を用いた解析によって、TaPYLoxは期待通りにABAに対して高感受性の性質を有することが明らかとなり、耐乾性が向上した。興味深いことに、TaPYLoxは、葉からの蒸散量が低下しているにもかかわらず、生育障害が生じなかった。この不思議な現象は、TaPYLoxではルビスコによる光合成活性が向上したために、気孔の開度が十分に開いていなくとも、炭酸固定が行えることに起因していた。そこで、葉で得られた節水性の形質が穀物の生産においても同様であるかを検証した結果、TaPYLoxは湿潤土壌では、種子の生産においては、コントロール(非形質転換体)と同等であったが、水の消費量が約20%抑えられていた。さらに、コントロール系統の種子生産に問題が生じる少ない水の量で生育させた場合は、TaPYLoxの種子生産性の減少は緩和された。以上のことから、ABA受容体を強化する

ことで、節水型耐乾性コムギが創出できることが示された。

世界の乾燥地で栽培されているコムギ品種から ABA の感受性が高い Halberd 品種を同定した。ABA 非依存的な形質で耐乾性を示す実用品種 Cham6 と交配し、ABA 依存的・非依存的な両者の性質を兼ね備えたコムギ創出を試みたが、F1 個体がネクロシスを生じてしまった。Halberd 品種の ABA 感受性は TaPYL_{ox} と比べマイルドである。より ABA 感受性が高いコムギを選抜するために、遺伝的多様性に富む多重合成コムギ(MSD)集団から ABA 感受性が向上した系統を選抜した。幾つかの系統に関しては、海外の実際の乾燥地(モロッコ)で収量試験を実施したが、2017~2018 年のモロッコでは、異常な多雨に見舞われ、乾燥地としての試験が成立しなかった。しかし、国内のハウスの擬似乾燥区で実施した試験では、コントロールの農林 61 号よりも、単離した系統の幾つかにおいては、種子の生産性が向上していた。さらに、ABA 感受性が向上した系統群は、共通のタルホコムギ由来の染色体断片を持つことから、これらの染色体断片が節水型耐乾性の QTL になり得ることが示された。

(2) 詳細

① ABA 受容体を過剰発現させたコムギ形質転換体(TaPYL_{ox})の分子生理学的解析

コムギから 9 種類の ABA 受容体を単離し、ABA 受容体の標的タンパク質である 6 種類の PP2C を単離して、生化学的な解析と遺伝子発現解析を行った。その結果、様々な組織で高い発現量を示し、ABA との結合親和性の高い受容体 TaPYL4 に標的を絞り、これを過剰発現させた形質転換体コムギ(TaPYL_{ox})を創出した。TaPYL_{ox} は、NGS を用いたトランスクリプトームからも ABA の感受性が期待通りに向上しており、乾燥ストレス実験においても耐乾性が向上していた。TaPYL_{ox} の耐乾性は、乾燥地での実用品種である Cham6, Nesser や Roelf-F2007 の近代品種よりも強いことが判明した。TaPYL_{ox} は気孔の開度がコントロール(非形質転換体; Null 系統)に比べ、約 25%程度閉じているにもかかわらず、植物体では生育阻害が観察されなかった。光合成測定装置 LI-6800 を用いた解析から、TaPYL_{ox} は葉からの蒸散量が低下しているにもかかわらず、CO₂ の炭酸同化速度(光合成速度)は低下していなかった。さらに光合成速度(A)と葉内二酸化炭素濃度(Ci)の関係性を明らかにできる A-Ci 曲線解析から、TaPYL_{ox} ではルビスコにおける最大カルボキシル化速度(V_{cmax})が向上していた。つまり、TaPYL_{ox} が水の消費量を抑えながら生育可能な理由は V_{cmax} が向上したことに起因していると考えられた。さらに、葉で得られた節水性の性質の理論が、最終的に個体全体あるいは穀物生産においても、同様に節水性を示すかどうかを解析した。湿潤土壌で育てた場合に、TaPYL_{ox} は植物体の地上部のバイオマスと種子生産量はコントロールと比較して差はなかったが、水の消費量は 20%抑制されていた。つまり、水消費量あたりの生産性は向上したことが明らかとなった。さらに、水の供給量を制限して、コントロール系統が種子生産性に問題(生産性の低下と不良形状の種子)が生じる限定的な水量においても、TaPYL_{ox} では種子の生産性の低下が、さらには、種子の不良形状も緩和されていた(図 1. A と B)。また TaPYL_{ox} の種子に含まれる成分を NMR で分析した結果、湿潤生育では、コントロールと TaPYL_{ox} の両者の種子成分に差がなかった。一方、乾燥環境下では、コントロールの種子成分が湿潤区栽培での種子成分と大きく異なるのに対して、乾燥環境下で生育させた TaPYL_{ox} の種子の成分は湿潤区に類似していた(図 1. C の NMR のプロット参照)。以

上の一連の研究から、ABA 受容体を強化することで、節水型耐乾性コムギが創出できることを明らかにした。

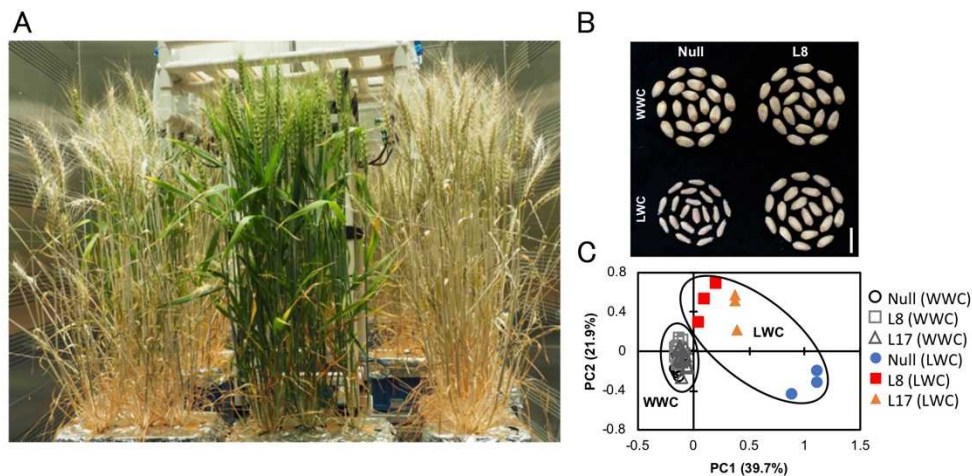


図1. ABA受容体を過剰発現させたコムギ(TaPLYox)の節水性評価

A. 少ない水で生育させた場合、中央がTaPLYoxのL8系統。B. コントロール(null)とTaPLYoxのL8系統の種子の形状。WWCは湿潤区、LWCは少ない水で生育させた環境(水量限定区)。C. NMRによる種子成分の比較。少ない水で生育させ生産されたTaPLYoxのL8系統の種子は、湿潤区と同等の成分である。

②ABA 非依存的なストレス耐性コムギ系統および、ABA 高感受性コムギ系統を利用したABA 非依存性・ABA 依存性ストレス応答機構の解明

CIMMYT などの国際研究機関には、従来の育種方法によって作成された、乾燥地で主要な品種となっているコムギが存在する。しかしながら、世界の乾燥地で栽培されているコムギ品種間での性質の一致点あるいは相異点が分子レベルで不明である。ABA の投与実験により、Halberd 品種が ABA に対して高感受性を示すことが明らかとなった。一方、Cham6 や Nesser などの乾燥地で栽培されている系統に関しては、ABA 非依存的な耐乾性系統であると推測された。これら性質の異なる系統の分子特徴を明らかにするために、メタボロームとトランスクリプトームの統合解析を進めていたが、所属機関の異動の問題や RNA のライブラリー調製時の問題などがあり、十分に解析ができなかった。また、ABA 依存的な耐乾性品種 Halberd と ABA 非依存的な Cham6 を掛け合わせ、両者の性質を兼ね備えたコムギの創出を試みたが、F1 植物が極矮性でかつ成長不良のため開花が起こらず F2 種子を得ることができず、この研究テーマはさきがけの期間内では低調であった。

③遺伝的多様性に富む多重合成コムギ(MDS)集団から単離した ABA 高感受性系統の表現型を支配する QTL の同定

約 8,500 年前に偶発的な交配により誕生したコムギは A, B, D のゲノムを持つ 6 倍性の作物であり、世界のパンコムギ品種はその当時に誕生したごく少数コムギを由来として育種されてきたために、他の作物種と比較して遺伝的多様性が乏しい。コムギの D ゲノムの一部だけを様々なタルホコムギの近縁野生植物由来に置換させ、従来のコムギに遺伝的多様性を持たせた多重合成コムギ(MDS)集団を利用し、ABA による感受性スクリーニングを行い、2 万個体を試験して、ABA 高感受性系統を選抜した。これらがどのタルホコムギの染色体断

片を持つかを NGS 解析により分析した結果、ABA 高感受性系統 8 系統は Synthetic40 系統(タルホキムギ KU-2098 系統)由来の D ゲノム断片を共通に保有していることが判明し、共通の複数の3箇所が ABA の感受性に関わることが推定された(図 2)。

一方、選抜した ABA 高感受性が実際のフィールドの乾燥地で生産性が向上するかどうかを検証するために、鳥取大学と国際乾燥地農業研究センター(ICARDA)の協力を経て、モロッコでフィールド試験を実施した。灌漑により湿润区を作成し、乾燥地は天水に依存した形で実施する予定であったが、2017-2018 年のモロッコは例年になく多雨に見舞われ、乾燥地としての収量解析が成立しなかった。一方、2017-2018 年の国内のハウスで灌漑コントロールにより作成した擬似乾燥地を使って実施した収量試験では、コントロールとなる農林 61 号比べて ABA 高感受性系統で収量が高い系統(Oka7 と Oka56 系統)があった。Oka56 に関しては、乾燥地の実用品種である Cham6 よりも収量が高かった(図 3)。

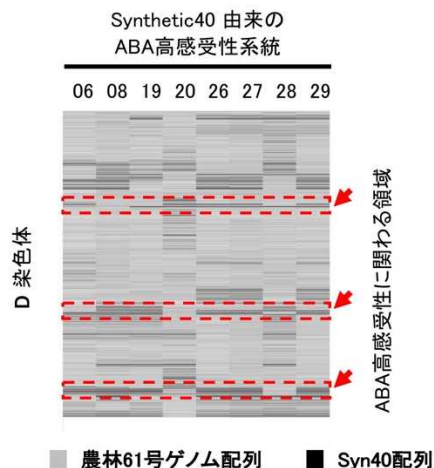


図2. ABA感受性に関わると考えるDゲノム領域

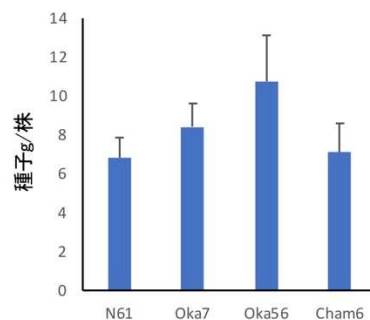


図3. 擬似乾燥区における種子の生産量
Synthetic29 由来のABA高感受性系統は
Cham6品種より種子の生産量が高かった。

3. 今後の展開

ABA の受容体を強化することで、節水型耐乾性コムギの創出が可能になったことが明らかとなった。本研究では、トウモロコシのユビキチンプロモーターを使った過剰発現の方法を用いたが、ABA 受容体に特定のアミノ酸を変化させるだけで、ABA 受容体自身の機能が高められることが報告されている。ゲノム編集穀物が米国やカナダで承認されれば、相同組換えにより、TaPLY4 にアミノ酸変異を起こして ABA 受容体を強化した節水型耐乾性コムギを創出したいと考えている。

また、さきがけの研究期間内では低調であった、トランスクリプトームとメタボロームの統合解析は、今後、低コストで実施可能なメタボローム解析(宇都宮大での GC-MS を利用)で乾燥ストレスと ABA の関係性を詳細に解析するとともに、異なる耐乾性系統の特徴をメタロボームの解析を中心に実施して、明確な特徴が見いだせれば、トランスクリプトームによる分子的な特徴付けを行いたい。

一方で、MSD から同定した ABA の感受性を向上させるタルホキムギ KU-2098 の断片を近代品種(Roelf-F2007 や BORLAUG100)に導入して、節水性が付与できるかを国内で試験し、国

内で有望な結果が得られた場合には、CIMMYT や ICARDA などの協力を経て、実際の乾燥地で収量試験を行う。また、近年は、地球温暖化がコムギ生産性の低下をもたらしているため、節水型形質が高温環境下ではネガティブに作用する可能性もあり、この点も検証していく必要がある。もし、ネガティブな影響が無ければ、耐暑性を持つ品種(NAVOJOA や Imam)に、節水型の形質を付与して、生産性が保たれるか否かを検証していく。耐暑性に関しては、鳥取大学とスーダン農業研究機構などと協力して実施していく予定である(地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム 2018-2022; 鳥取大学 辻本教授代表の分担研究として実施予定)。

4. 自己評価

本研究では、大きく分けて 3 つの課題を設定した。課題①では、コムギから 9 種の ABA 受容体を単理して性質を明らかにし、この情報を活用して、ABA 受容体を過剰発現したコムギ (TaPLYox) を創出した。その結果、耐乾性付与に加えて、節水性という性質も獲得していた。つまり、水消費量あたりの種子生産性が ABA 受容体の過剰発現によって向上できるということを示すものであり、得られた学術的意義は大きく、他の穀物への応用展開も考えられる。TaPYLox は遺伝子組換えコムギだが、節水型耐乾性コムギの育種を行っていく上でのモデルコムギとなりうるものであり、本課題では目標以上の成果が得られたと考えられる。課題②では、ABA 依存的・非依存的な耐乾性コムギ品種の分子的特徴を見いだせなかった。この点は、今後の課題で、メタボローム解析を中心に、ABA 依存的・非依存的な耐乾性コムギの違いを明らかにし、コムギ育種に利用可能な代謝物マーカーを作成することが今後の課題である。課題③では、MSD 集団から ABA 高感受性系統の選抜に成功して、海外の乾燥地におけるフィールド試験に挑むことができた。残念ながら、2018 年のモロッコにおける異常気象により乾燥地としての収量試験を成立させることはできなかった。しかし、ABA 高感受性系統はタルホコムギ KU-2098 の D ゲノム断片の 3 箇所を多く保有することが判明し、この領域が ABA の感受性に関わることを推定できたため、一定の目標には到達したと考えている。今後は、タルホコムギ KU-2098 の染色体断片を実用品種に導入し、国内での疑似乾燥地での収量評価も含め、節水性が実際の乾燥地で有効かどうかを海外の国際機関と共同で検証していく。また、高温環境下では、節水性の形質がネガティブになりうる可能性もあるため、この点も検証する必要がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Takeuchi J*, Okamoto M.* Mega R. Kanno Y. Ohnishi T. Seo M. Todoroki Y. (2016) Abscisinazole-E3M, a practical inhibitor of abscisic acid 8'-hydroxylase for improving drought tolerance. Scientific Reports. 14: 37060 *Co-first
2. Okamoto M. Cutler SR. (2018) Chemical control of ABA receptors to enable plant protection against water stress. Plant Chemical Genomics. p127-141
3. Dejonghe W*, Okamoto M.* Cutler SR. (2018) Small molecule probes of ABA biosynthesis and signaling. Plant Cell Physiology. 59: 1490-1499* Co-first
4. Mega R. Abe F. Kim JS. Tsuboi Y. Tanaka K. Kobayashi H. Sakata Y. Hanada K. Tsujimoto H. Kikuchi J. Cutler SR. Okamoto M.# (2019) Water-saving wheat: tuning water use

efficiency and drought tolerance using ABA receptors. Nature Plants. 5: 153–159

Corresponding

5. Fujika H. Samejima H. Suzuki H. Mizutani M. Okamoto M.[§] Sugimoto Y.[§] (2019) Aberrant protein phosphatase 2C leads to ABA insensitivity in parasitic Striga. (2019) Nature Plants. 5: 258–262 [§] Co-corresponding

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(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. 岡本昌憲 「アブシジン酸受容体に作用する人工化合物の開発とその利用」 第 8 回 植物ストレス科学研究シンポジウム. 2016 年 3 月 8 日 (招待講演)
2. Okamoto M. 「Enhancement of abscisic acid receptor improves water use efficiency in crop production」 International Symposium on Environmental Stress Adaptation & Memory in Plants. 2017 年 2 月 28 日 (招待講演)
3. Okamoto M. 「Chemical regulation in ABA metabolism and signaling」 ISHS 13th International Symposium 2017 年 8 月 30 日(招待講演)
4. 岡本昌憲 「アブシジン酸の代謝と受容に関する化学遺伝学的研究」 植物の生長調節 (2016) 51 (1): 16–23
5. 「干ばつに強く、水を節約して育つコムギの開発に成功」 2019 年 2 月 8 日(プレスリリース)

研 究 報 告 書

「組み換え遺伝子を利用しない新奇植物ゲノム編集法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研 究 者: 菅野 茂夫

1. 研究のねらい

遺伝子を改変する遺伝子組換え技術をフィールドへ適用する場合、最も大きな障壁に「組換え遺伝子を有している作物をフィールドに持ち込む際に、長期間の精査が必要」という、法的・倫理的問題がある。分子遺伝学的な技術を用いた育種を考えると、新しい育種技術の開発のためには、現在世界でし烈な研究開発競争が行われている CRISPR/Cas9 法の改良を行い「DNA フリーなゲノム編集を行う」アプローチがもっとも優れていると考えられるが、CRISPR/Cas9 法は、動作原理として核酸(guide RNA)を用いているため、パブリックアクセプタンスに問題が残る。より短期間で、植物ゲノムに改変を加えた品種をフィールドへ適用するためには、「核酸(組換え遺伝子)」も「植物防疫的課題を抱える手段(ウィルス・アグロバクテリア)」も利用しない、植物ゲノムへの配列選択的な操作技術を開発する必要がある。

そこで、本研究では、「化合物によるゲノム編集法」のアプローチを採用した。「核酸以外の化合物」を用いて植物のゲノム DNA を自在に操作できれば、遺伝子組換えには該当しないあたらしい育種の基盤技術になりうる。そのような化合物がフィールドにおいて種に非依存的に処理できる点を活かし、最終的には、作物のゲノム、エピゲノム状態を屋外で化合物処理により制御して、開花時期や高温応答・乾燥耐性を変化させる植物調整剤・あるいは育種用の変異源の開発を目指す。本研究領域の歴史は古く、植物育種に最適化された変異源としては「EMS (ethyl methanesulfonate)」が知られている。今まで、EMS 処理によってさまざまな有用品種がフィールドで単離されてきた。しかしながら、EMS が可能なのは植物ゲノムに対するランダムな変異の導入である。本研究では、EMS とは異なる、配列特異的な変異導入化合物の開発を目指す。

また、本研究提案では、新奇植物ゲノム編集技術の発明だけでなく、既存の CRISPR/Cas9 システムのフィールドに向けた最適化も行う。作物のゲノム編集は、組織培養を利用して行うが、その際にゲノム編集の際の off target 変異と共に、「培養変異」が大量に入ることが予想される。培養変異が多い場合、短時間培養で変異を導入できる条件や、DNA 修復系を制御することにより、培養変異を抑える手段を探索する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、配列特異的な変異源の開発のために、DNA 配列特異的に結合する化合物、植物ゲノム DNA に損傷を与える化合物、植物細胞の核に分子を導入するための化合物といった複数の化合物を組み合わせるアプローチをとった。特に、DNA のマイナーグルーヴに結合する Pyrrole-Imidazole-Polyamide(以下 PI-Polyamide)は「DNA 配列特異的に結合する化合物」の筆頭候補に挙げられた。シロイヌナズナの根の細胞への PI-Polyamide の導入を行ったとこ

ろ、一部の細胞で導入がみられた。導入効率を上げるために様々な条件を検討し、「植物細胞の核に分子を導入するための化合物」として、キャリアペプチドを併用すれば、植物細胞への導入が再現よくみられることが明らかになったが、細胞へのダメージが大きく、PI-Polyamide 処理によってトランスクリプトームを変動させるには至らなかった。PI-Polyamide のような特殊な化合物を植物細胞へ導入するためには、植物細胞をプロトプラスト化して PEG で導入する系が最も安定すると結論し、プロトプラストを用いて一過的に PI-Polyamide のライブラリーを導入する系を確立した。分子の導入系を調べていく中で、新規の物理原理の利用にも着手した。

次に、植物ゲノム DNA に損傷を与える化合物の選抜を行い、その結果、シロイヌナズナ芽生えに対して浸透性が高く、INDEL を高頻度で誘導させる化合物を発見した。興味深いことに、本化合物を処理した植物では TATA という配列の近傍で INDEL が誘導されていることが多かった。すなわち、本化合物はゆるやかな塩基配列選択性を有していると考えられた。以上により、植物の変異源として、EMS のような塩基置換を誘導する化合物以外の選択肢があり、特定の配列に変異を誘導する確率をあげることもできる、という可能性を示した。

並行して、シロイヌナズナのカルスを利用して、培養変異の定量化を行った。組織培養技術の不足から、シュート誘導後のシロイヌナズナの分析はできなかったが、70x 以上の深さで増幅フリーな全ゲノムシーケンスを行ってシロイヌナズナのカルスの培養変異を定量化した。培養変異は、EMS 処理に比べれば、ごくごく低頻度であることが明らかになった。カルスの培養変異を抑える手段としては DNA 修復経路に摂動を加えることが考えられる。本研究の副産物として、DNA 修復変異株を利用することで、13 kbp を 1/4 程度の効率で欠失させられることを見出した。本実験系については、領域内外に技術提供した。

(2) 詳細

◆テーマ A: 化合物による新奇植物ゲノム編集技術の開発

まず、最初に DNA の配列選択的に結合する化合物 PI-Polyamide の植物への適用を検討した。PI-Polyamide とは、Pyrrole と Imidazole がアミド結合した分子で、その配列の組み合わせによって、異なる塩基配列を認識する性質をもつ、DNA のマイナーグルーヴに結合する分子である。本分子が植物細胞に導入できれば「配列特異的変異源」の確立に大きな期待が持てる。本研究において、PI-Polyamide の合成は京都大学杉山弘教授、板東俊和准教授、河本祐介博士、橋谷かおりさんのご協力によって行われた。感謝申し上げます。

・ Pyrrole-Imidazole-Polyamide の植物細胞への導入

PI-Polyamide の植物への導入効率を評価するために、蛍光分子 FITC または TAMRA でラベルした PI-Polyamide をシロイヌナズナ芽生えの根に対して導入する実験を行った。溶媒に何も加えない場合、根の細胞に対して PI-Polyamide の導入はわずかしかなかったが、溶媒中の DMSO の濃度を上昇させる、EDTA を微量に加える、膜透過性ペプチド(キャリアペプチド)を加える、などの方法によって分子の導入が再現性良く観察された。特に、R9 ペプチド(キャリアペプチドの一種)を利用した場合、PI-Polyamide に対して膜透過性ペプチドのモル比が 1:10 となるような比率であれば、十分にモノマーヘアピン型 PI-Polyamide 分子の導入がみられることが明らかになった(図1)。

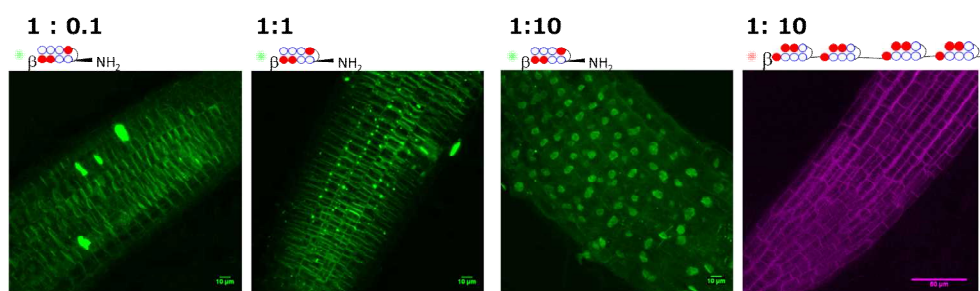


図1: PI-Polyamide とキャリアペプチド(R9)の比率を変化させた際の、シロイヌナズナの根に対する分子の送達具合。写真上部の概念図は PI-Polyamide の構造。

本条件では、EDTA などを加える破壊的な手段に比べて、RNA の分解も抑えられていたため、トランスクリプトーム解析を行った。利用可能な PI-Polyamide のうち、植物に導入した場合に変異導入および遺伝子発現変動が期待される、PI-Polyamide に indole-*seco*- CBI を結合させた化合物を導入したところ、無処理区に比べて、ごく少数の遺伝子に発現変動が見られた。発現変動がみられた遺伝子は低酸素応答の遺伝子群であり、PI-Polyamide 処理というよりは、シロイヌナズナ芽生えを溶媒で処理したことに起因すると疑われた。同一の反復実験を行い、qPCR などで発現変動を調べたが、再現性が見られなかった。R9 ペプチドを処理した植物細胞を観察すると生長の抑制が観察された。したがって、キャリアペプチドを利用した方法は、顕微鏡を用いた評価方法においては、PI-Polyamide の導入の効率をあげるものの、植物細胞を健全な形で維持できないのではないかと考えられた。研究当初は、キャリアペプチド、そして DMSO などの濃度変更により分子導入を行う予定であったが、上述のように、細胞に大きなダメージを与える形でしか PI-Polyamide の導入ができなかったため、異なる手段による分子導入の手法を複数検討した。

・電界誘起気泡による植物への分子の導入

本研究では植物個体を対象にして、フィールドで植物ゲノムを操作することを最終目標としているので、植物個体まるごとを扱える分子導入技術の利用が望ましい。そこで、さがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」研究領域の山西陽子研究者と共同研究を行った。具体的には、電界誘起気泡という新しい物理原理を利用して、微細な気泡を植物細胞の近辺で生じさせて、そのバブルが破断する衝撃によって、細胞に微小な穴をあけて分子を液体に溶解したまま導入する技術の利用を試みた。その結果、シロイヌナズナの芽生えの葉に GFP タンパク質の導入が見られた。本技術は、PI-Polyamide を導入して表現型を改変するためには導入できる細胞数が不十分であったが、植物細胞への「分子を液体に溶解させたまま」導入する例はマイクロインジェクション以外に類を見ないため、新しい分子導入技術として発展するポテンシャルを秘めている。

・プロトプラストを利用した PI-Polyamide ライブラリーの導入

植物細胞で PI-Polyamide が実際に遺伝子発現変動を起こすか否かを確認するため、植物培養細胞 MM2D、タバコ培養細胞 BY2 を利用して PEG 法を用いて PI-Polyamide の植物細胞への効果を評価することに注力した。プロトプラストを用いた場合、PEG 処理により細胞が死ぬものの、十分な数の植物細胞に PI-Polyamide の導入がみられた。PEG 処理を行った

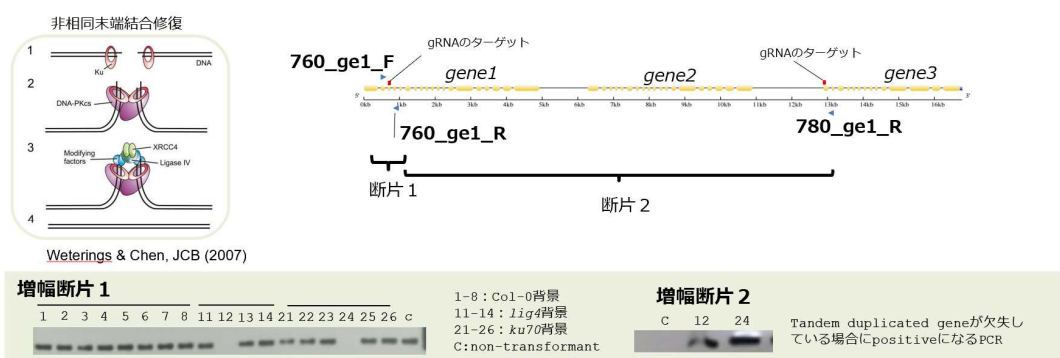
PI-Polyamide のライブラリー21 種類の中から、遺伝子発現変動を起こす PI-Polyamide を見出した。

・植物ゲノムに対する新しい変異導入化合物の探索

植物ゲノム DNA に変異を入れる新しい化合物であり且つ修飾しやすい分子を探索した。その過程で、PI-Polyamide に結合が可能という文献が存在する化合物が、興味深い性質を示した。本化合物を芽生えに処理したシロイヌナズナ (M1 plants) を花芽形成期まで育て、その植物体の地上部から DNA を抽出して Whole genome sequencing を行ったところ、本化合物を処理したシロイヌナズナゲノムでは、顕著に INDEL 数が増加しており、また、その INDEL の近傍では、ATAT が交互に繰り返す配列が多かった。本結果は、この化合物が植物において、EMS とは異なるタイプの変異を誘導しており、わずかながら塩基選択性を持つことを示している。

◆テーマ B: 培養変異の定量化

組織培養を用いて CRISPR/Cas9 法によりゲノム編集を行った場合、培養中にどの程度培養変異が入るのかを定量化することを目的に、シロイヌナズナをカルス誘導後 2 週間、1 ヶ月間、2 ヶ月間培養しそれぞれで増幅無しの全ゲノムシーケンスを行った。その結果、2 週間～1 ヶ月の間では培養変異が蓄積するが、それ以降では変異の数が増えなかった。一方、見られた培養変異は、EMS での変異誘導に比べれば、変異数は 1 桁以上少なかった。今後、シュート誘導を行い”T1”に相当する植物体の変異を解析し、比較する必要がある。培養変異が起こるのは、DNA 修復系に異常が起こるからである。DNA 修復系の変異体での培養変異を定量化するために準備したシロイヌナズナ *lig4* 変異株、*ku70* 変異株において、興味深い現象を確認した(図 2)。すなわち、これらの遺伝子型背景の下では、CRISPR/Cas9 法でゲノム上の 2 か所を切断すると、シロイヌナズナでは取得頻度が低い 13 kbp というサイズの欠失株も 1/4 程度の頻度で取得できることが分かった。本技術を利用することで、タンDEM重複遺伝子の破壊などが高速化できると考えられたので、共同研究を通して領域内外の多くの研究者に技術提供した。



非相同末端結合(NHEJ) に必須な遺伝子を破壊した株(*ku70*, *lig4*)を用いた場合、large deletionの取得効率が上がった。

図2: シロイヌナズナにおける DNA 修復系変異株を利用した効率的長鎖欠失誘導

3. 今後の展開

本研究において、EMS 以外の変異源が、植物において配列に指向性を持つ形で INDEL を

誘導するという知見が得られた。INDELを誘導しやすいということは、他の塩基置換誘導を行う変異源に比べてフレームシフトを誘導しやすいということに他ならない。また、誘導されたINDELの近傍の配列がATリッチであったことから、特にATリッチなプロモーター領域のcis領域への変異の導入が期待される。今後、本化合物に対して、その有効性を実用品種において調べていく。本化合物の誘導体に関しても、植物に透過性が高く、DNAに変異を誘導できることが明らかになってきている。そこで、本化合物を中心として様々な化合物を結合させていくことで、より塩基配列特異性を高めていくような発展が期待される。配列選択的にDNAに結合する化合物のライブラリーから遺伝子発現変動を示す分子のスクリーニング条件も整ってきている。それに加えて、植物細胞に分子を導入する新しい手段にも着手した。今後3～5年のスパンで、植物への効率的な分子導入、移行浸透性の高い配列選択的変異源の開発を目指していくつもりである。

研究テーマBにおいて確立したシロイヌナズナにおける長鎖欠失誘導系は、少ない労力で多くの長鎖欠失株を多数取得できる。本技術を用いて、長鎖欠失株の作出を大規模に行っていくことは、ゲノム中の全遺伝子の10%以上がタンDEM重複しているという植物ゲノムの特徴を解明していくツールとなるとともに、植物研究におけるひとつのリソースを提供できると考えている。

4. 自己評価

本さがけ研究のメインである研究テーマAにおいて、当初の計画では、新奇化合物により配列選択的に変異を誘導することを目指していたが、残念ながら、期間中に達成することはできなかった。分子の移行浸透性に対する見通しが甘く、実現にいたるための証拠集めも不十分な状態で研究期間が終了することが悔やまれる。今後の解析で詳細に明らかにしていきたい。後述の領域内外での共同研究も鑑みると、研究補助者をより多く雇用するべきだったと考えている。本研究の副産物として、植物に移行浸透性の高い変異源に着目して化合物を選抜し、INDELを誘導しやすい化合物を発見した。本化合物は、動物ではすでに作用が詳細に調べられており、臨床応用も試みられている。ヒトを含む副作用に関する知見が出そろっており、「ドラッグリポジショニング」を狙えて、応用可能性が高いと考えている。本化合物には弱いながら塩基配列選択性も認められることから、本化合物を起点として、さまざまな分子を結合させていくことで、DNA配列選択的なゲノム操作技術が作れるのではないかと期待している。また、PI-Polyamideの可能性を感じさせるデータや、分子導入技術に対する新たな展開に関する萌芽的データはいくつも取得することができた。本研究で得た知見と、領域内共同研究者との連携により、引き続き「化合物によるゲノム編集」を追求していこうと考えている。

研究テーマBの延長で確立した長鎖欠失の誘導および複数遺伝子の破壊技術は、研究機関の異動などにより一時的な停滞があったものの、多くの共同研究の提案をいただき、微力ながら領域に貢献できたのではと考えている。領域内外でのコラボレーションは、自分の価値観を広げた。また、安定に編集株を提供するうえで自分の不十分な点を痛感でき、得難い経験であった。今後は、植物科学分野において研究材料を提供してきた実績のある研究機関に異動する予定であり、より正確性と速度感のあるゲノム編集技術基盤を、コミュニティに提供していければと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shigeo S. Sugano, Ryuichi Nishihama, Makoto Shirakawa, Junpei Takagi, Yoriko Matsuda, Sakiko Ishida, Tomoo Shimada, Ikuko Hara-Nishimura, Keishi Osakabe, Takayuki Kohchi
Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*.
PLoS ONE, 2018, 13(10): e0205117.
2. Shun Sawatsubashi, Yudai Joko, Seiji Fukumoto, Toshio Matsumoto, Shigeo S. Sugano.
Development of versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing.
Scientific Reports, 2018, 12;8(1): 593.
3. Shigeo S. Sugano, Hiroko Suzuki, Eisuke Shimokita, Hirofumi Chiba, Sumihare Noji, Yuriko Osakabe & Keishi Osakabe
Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system
Scientific Reports, 2017, 28;7(1): 1260.
4. Yumiko Sakai, Shigeo S. Sugano, Takashi Kawase, Makoto Shirakawa, Yu Imai, Yusuke Kawamoto, Hiroshi Sugiyama, Tsuyoshi Nakagawa, Ikuko Hara-Nishimura, Tomoo Shimada.
The chemical compound bubblin induces stomatal mispatterning in *Arabidopsis* by disrupting the intrinsic polarity of stomatal lineage cells.
Development, 2017, 144: 499–506.
5. Satoru Fujimoto, Shigeo S. Sugano, Keiko Kuwata, Keishi Osakabe and Sachihiko Matsunaga
Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in *Arabidopsis thaliana*
Journal of Experimental Botany, 2016, 67: 6101–6110.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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. 菅野茂夫, 西浜竜一, 白川一, 松田頼子, 高木純平, 西村いくこ, 刑部敬史, 河内孝之
High throughput genome editing in a haploid dominant species, *Marchantia polymorpha*
日本植物学会第 80 回年会, 沖縄コンベンションセンター, 2016 年 9 月 18 日
2. 菅野茂夫 半数体生物のゲノム編集—ゼニゴケとウシグソヒトヨタケを例に—
第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム、鹿児島大学郡元キャンパス 2017 年 3 月 17 日
3. 菅野茂夫 ゲノム編集を利用した植物のハイスループット遺伝学に向けた技術基盤

生物資源研究センターアカデミックセミナー, 立命館大学びわこくさつキャンパス 2018 年 7 月 21 日

4. 菅野茂夫 簡便・高効率なゲノム編集細胞作製技術とゲノム編集のホットトピックス
第 91 回生化学会大会 バイオインダストリーセミナー 2018 年 9 月 25 日

5. Shigeo S. Sugano, Ryuichi Nishihama
CRISPR/Cas9-Based Genome Editing of Transcription Factor Genes in *Marchantia polymorpha*.
Methods Mol Biol. 1830, 109–126 (2018).

研 究 報 告 書

「植物体内物質動態に関する表現型の定量評価基盤技術の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 田野井 慶太郎

1. 研究のねらい

本研究では、植物体内の放射性物質を非破壊で可視化する技術の対象を作物に拡大すること、および作物中の物質動態の解析に数理モデルを導入し定量評価する基盤技術を創出することを目的とした。

作物生産を考える上で水・肥料は基本的な事項であり、植物は物質として無機物(CO₂を含む)と水のみで成長する。これらの存在量に関連した環境ストレスは多く、そのため食料安定供給に向けての耐性植物の選抜や耐性・感受性機構の解明が進められている。これまでは、無機栄養素や有害元素に対する植物の耐性・感受性を評価する際、バイオマス量や地上部全体での元素濃度が示されることが一般的であり、その植物のどこがどの程度の欠乏・過剰状態なのか等、対象元素や物質の体内分布・濃度・移行の詳細が示されていないことが多かった。この状況下では、生理学的応答の大枠を捉えることができる一方、局所的な応答解析の感度が下がった研究となりがちである。ある無機栄養素やある物質の分布・動態とともにその物質に関与がある生理現象を解析することが、詳細な生理メカニズム解析の上で不可欠であると考えた。

そこで本研究では、作物としてイネを材料とし、物質動態・分布解析の高度化に焦点をあてた。最初に、(1)放射性同位体を用いた可視化技術について、作物用にシステムを再構築することにより、物質動態・分布という重要な「表現型」を把握する技術とすることを目指した。その際、放射性同位体のイネへの投与方法について、経根・経導管に加えて、師管への直接投与方法を目指した。次に、(2)こうして得られた画像情報に対して、数理モデルとシミュレーションを組み合わせることで、物質動態を構成する因子(師管・導管輸送中の輸送体の機能等)の抽出を目指した。さらに、(3)物質分布が明らかとなった画像データを元に、物質動態・分布において特徴のある箇所を画像取得したサンプルそのものから採取し、網羅的遺伝子発現解析等を行うことで、その箇所で行っている物質動態イベントが担う植物の生理現象の解析を目指した。具体的には、CO₂およびその光合成産物、また無機栄養素としてマグネシウムおよび多量にあると有害であるナトリウムを解析対象とした。

2. 研究成果

(1)概要

研究テーマ (1)「RI 可視化撮像装置の改良と RI イメージングの作物研究応用」

本研究の基礎となるイメージング装置の改良については、作物を解析対象とできること、植物の生育環境をコントロールできる状態でイメージングできることの 2 つを目標とした。その前段階として、シロイヌナズナの花茎においてイオン種により移行の様式が大きく異なる

ことをライブイメージングで示した(Sugita et al. 2016)。続いて、視野拡大の改良において、放射線を光に変換する素材(シンチレータ)を、加工の容易さや価格の低さからプラスチックを採用して行うこととした。様々なプラスチックシンチレータの中から効率のよい素材・厚さを選択し、さらに植物から出てくるバイオフィオンを遮光しつつ放射線は透過させる素材を選定した結果、60cm×60cmの視野で作物を撮像できる装置を作製することができた(Sugita et al. 2018)。この装置は、光や温度、CO₂濃度の制御ができる大型チャンバーを元に組み立てたことから、環境制御可能な作物用イメージング装置となった。続いて、植物へのアイソトープ投与方法を様々検討する中で、師管から直接アイソトープを導入する挑戦を行ったが、残念ながら成功しなかった。一方、植物におけるアイソトープイメージング技術を用いた共同研究を複数行い、それぞれのプロジェクトにおいて直接的エビデンスが得られるアイソトープトレーサー実験の利点を活かした成果を得ることができた。

研究テーマ (2) 「RI イメージングと数理モデルによるイオン動態解析」

RI イメージングで得られる画像を基にイオン輸送を担う因子を理解する解析系の構築を目指し、イネにおけるナトリウムイオンの導管内輸送に焦点をあてて解析を行った。導管の中の Na⁺イオンが葉鞘を通過する際に Na⁺イオンを導管から排除し葉身に到達しないように働く作用を発見し、OsHKT1;5 がその機能を担うことを RI イメージングで示すことができた(Kobayashi et al. 2017)。この知見を参考に、OsHKT1;5 の植物体内での Na⁺イオン排除輸送に関する親和性や速度を数理モデルで算出することを目指した。イネ葉鞘の細胞配列に基づく cell データを構築し、輸送体による能動輸送を考慮した単純核酸方程式による数理モデルでイオン輸送をシミュレーションするとともに、そのシミュレーション結果を RI イメージングによる実際のイオン動態に近似するよう、輸送体の能力や細胞間輸送に関する因子を決定していく解析を試みた。

(2) 詳細

研究テーマ (1) 「RI 可視化撮像装置の改良と RI イメージングの作物研究応用」

本システムは、10cm×10cm で市販されている CsI シンチレータを用いて構築した。まずは、当概シンチレータを2枚利用することで視野を10cm×20cmとし、シロイヌナズナの花茎における各イオンの輸送動態を非破壊で24時間ライブイメージングした。その結果、多くの核種において可視化が可能であり、さまざまなイオンがそれぞれの輸送様式において花茎に分布していく様子を経時的に観察することができた(図1)。

続いて、本システムを作物の大きさでも対応可能にするための大型化を試みた。光、温度に加えて CO₂ 濃度もコントロールできる大型チャンバーを準備し、放射性同位体イメージングを取得するためのフォトンカウンティングカメラを設置する加工を行い、さらに光漏れがなくなるよう、大型チャンバー全体を暗幕で囲った。次に、視野拡大を目指し、シンチレータを改良した。安価かつ加工が容易なプラスチックシンチレータを複数入手し放射線-光変換効率や解像度を評価すること

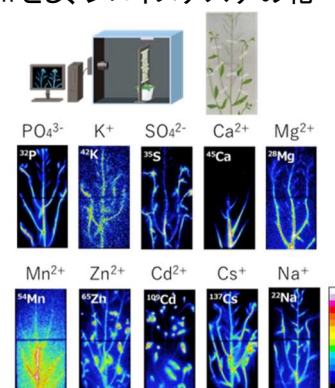


図1 各イオンの24時間後の分布像。Sugita et al. 2016 PCP より改変。

で、効率のよい素材および厚さを選定した。選定したシンチレータにおいて、植物由来の生物発光を遮光する一方で植物中からの放射線はできるだけ遮蔽しない工夫を施した結果、視野およそ 60cm×60cm での撮像系を構築することができた。 $^{14}\text{CO}_2$ を投与したイネおよびトウモロコシを 24 時間測定したところ、ソースである各葉から ^{14}C 標識光合成産物が流出する様子を観察することができた(図 2)。

RI ライブイメージングを用いて、環境中の無機栄養が根から吸収し葉に到達するまでの過程において、蒸散が寄与する割合についてイネを用いて解析した結果、マグネシウムやカルシウムといった無機栄養素は蒸散速度によらず一定の速度で葉まで到達することが分かった。一方、リン酸については、葉鞘までは蒸散速度によらないが、葉鞘から葉身に移行する際には蒸散が駆動力であることを示すことができた(図 3)。この現象は非破壊かつ経時的な観察系だからこそ見出せた知見であると言える。

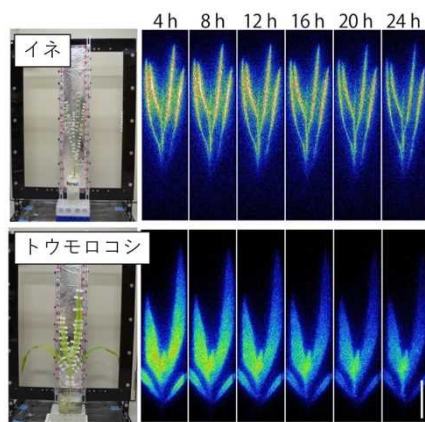


図 2 $^{14}\text{CO}_2$ を投与したイネおよびトウモロコシにおける光合成産物動態のライブイメージング。図中の bar は 10cm を表す。Sugita et al. 2018 JRNC より改変。

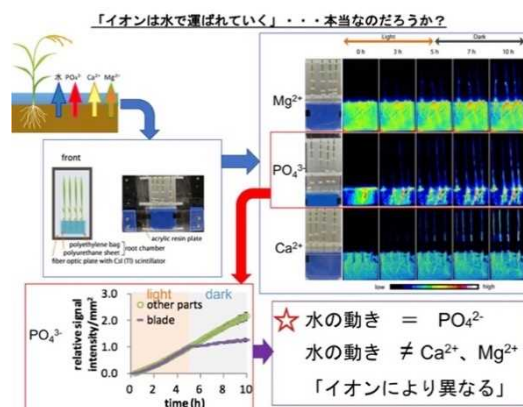


図 3 イオン輸送における蒸散の寄与, Sugita et al. 2017JRNC より改変。

研究テーマ (2) 「RI イメージングと数理モデルによるイオン動態解析」

本研究テーマでは、RI イメージングで得られる情報を基に数理モデルを活用してイオン輸送を担う因子を理解する解析系の構築を目指した。すなわち、特定の細胞において輸送体による能動輸送を考慮した上での単純拡散方程式による数理モデルによりイオン輸送をシミュレーションする時、そのシミュレーション結果を RI イメージングによる実際のイオン動態に近づくように、輸送体の能力や cell to cell 輸送速度に関する因子を決定していく解析を試みた。この際、それぞれの因子の数値は、可能性のある範囲内をランダムに発生させ、それぞれランダムに発生させた数値セット毎にシミュレーションを実施し、実際の RI イメージング像に近いセットの抽出を試みた。今回は、イネの葉におけるナトリウムの輸送に着目した。大量のナトリウムは有害であることから、植物は光合成の場である葉身に到達する前に導管から排除する機能を有する。その排除は主に根で行われるとされていたが、イネ葉鞘にお

いても排除機能があることが示された(Kobayashi et al, 2017 Plant J)。ここで葉鞘から $^{22}\text{Na}^+$ を投与し、葉身に到達するまでに導管から排除される様子について RI イメージングにより観察し、さらに葉鞘の組織観察から葉鞘組織を構成する細胞や細胞間連絡を模倣した細胞列情報を構築し、それぞれの細胞間およびアポプラスト輸送において単純拡散方程式で Na^+ 輸送を表現した。研究期間内では完結しなかったものの、現在取り組んでいる、導管から Na^+ の排除を担う OsHKT1;5 が null である変異体を得た後は、上記 RI イメージング実験およびシミュレーションを行い、OsHKT1;5 が担う寄与度について数値的情報を得ることができると考えている。

本課題では、RI イメージングを行ったサンプルにおいてオミクス解析を行うことが当初の狙いとしてあったが、RI 投与サンプルはたとえ核酸を抽出しても放射線管理区域から持ち出すことが出来ないため、nanopore の Minion を導入することとした。

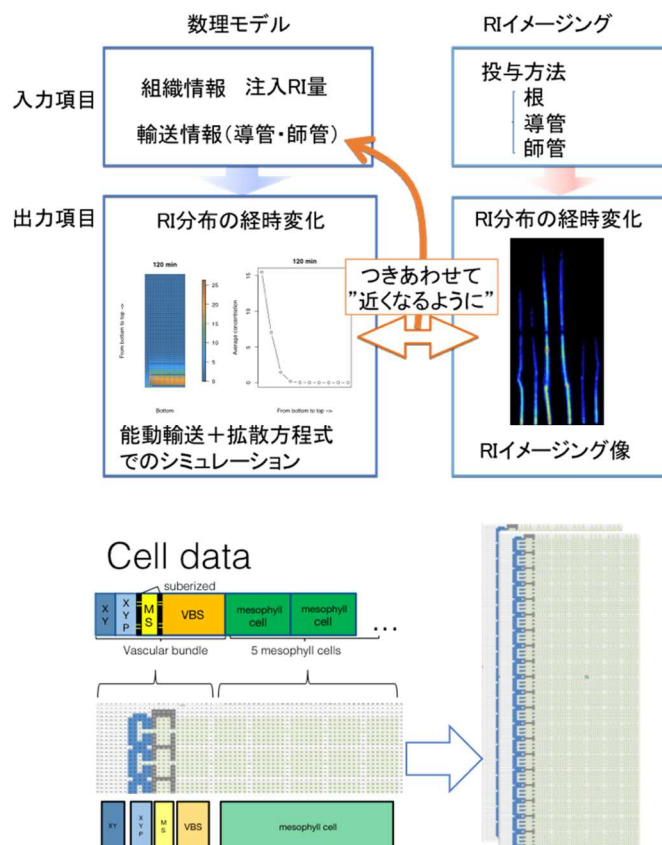


図4 植物組織観察から作成した cell data をもとにイオン輸送のシミュレーションをした結果を、実際の RI イメージング結果と付き合わせることで、輸送を担う輸送体の能力を数値化する試み。

3. 今後の展開

本研究により、60cm × 60cm という大きな視野により植物体内の物質動態をライブイメージング解析することができるようになった。この実験系は、乾燥や高温、高 CO_2 、アルカリ土壌など気候変動により問題となる要因が作物の栄養や生理に与える影響全般について活用することができる。今後、広く研究者にこの実験環境を開放し、イオンや光合成産物の動態を追跡しながら気候変動時代の植物生理学的諸問題に取り組んでいく所存である。本さがけや関連CREST研究者と既に一部はスタートしており、今後はネットワークを広げていきたい。

このライブイメージング装置で物質動態を解析する際、生じた生理学的応答を理解する上で、観察した組織そのものでRNA-seqできる環境は必須不可欠なものであると考えている。RIラベルしたサンプルを管理区域から持ち出せない壁があったが、RI管理区域内でRNA-seqでき

る技術を導入することができた。今後は、イオンや光合成産物の動きを捉えるとともにその組織でのRNA-seqを早々に行いたい。

様々なライブイメージングデータを数理モデルで解析する場合については、汎用的な解析方法の難しさを学んだので、今回取り組んだ輸送体による能動輸送と単純拡散を仮定したモデルを基本としつつ、それぞれのケースに合わせた解析をすることとしたい。

本研究では視野の拡大を行った。次は高解像度化がターゲットであると考えている。高解像度化には、現在の方式には限界がある。可視化手法の原理から変更する必要があると考えており、新たなイメージング技術の構築を目指したい。

4. 自己評価

（研究目的の達成状況、研究の進め方） 当初の研究目的は、主に、①作物での撮像系の開発 ②数理モデルを駆使した輸送機構の解析技術の確立 ③撮像データに基づく特定組織でのオミクス解析の3つであった。①については、フィールド植物として作物を想定し、作物における物質動態解析ができる実験系を組み立てることができた。一方で、②については計画通りには進まなかった。当初、汎用性の高いシステム構築を目指していたが、実験ごとにケースバイケースの対応が必要であることなど、作業を進める過程で、汎用性を高めることが困難であることを認識した。③についても計画通り進まなかった。当初はアイソトープの動態を元にした組織でのオミクス解析、特に網羅的発現解析を目指していたが、アイソトープを投与した植物における核酸を放射線管理区域外へ持ち出すことの難しさがあった。幸い、アドバイザーの先生からどこでもRNA-seqができるチップの紹介をいただいたので、さきがけ研究の期間内に技術を得ることが出来た。これら当初の目的に加えてウンカの嘴を利用したアイソトープの植物への師管への直接投与方法について挑戦したが、結果として師管液を得ることはできたものの、その師管を逆流させてアイソトープを流し込む実験技術の確立は困難であった。しかし、師管液を採取する技術やそもそもウンカを測定することで師管中のアイソトープ量の評価ができることから、今後活用できる装置が得られたものと考えている。

（研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果） 本研究で確立した技術が科学技術に貢献するには至っていない。一方で、アイソトープを利用することによる直接的アッセイ手法は未だ求められることが多く、多くの共同研究によりアイソトープイメージング技術がそれぞれの研究をサポートする事ができたと考えている。このさきがけ研究でのサポートにより、 $^{14}\text{CO}_2$ を含むアイソトープ標識化合物やイオンを用いる実験を適正に実行できる環境を整えることができたのは、多くのバイオサイエンス研究の下支えにつながったものと考えている。

（今後の見込み） 今回のさきがけ研究により手がけた挑戦はどれも道半ばであるが、それぞれ確立した後は植物体内の物質動態解析技術において世界でも例を見ないプラットフォームを築けるものと考えている。現在手がけているRI投与サンプルでのRNA-seq解析や数理モデルによる物質動態解析技術を完遂することを目指すとともに、新たなアイソトープ可視化技術の開発や異分野との連携を図っていききたい。岡田研究総括から、「田野井さんの場合はマッチングが重要だね」とコメントいただいたことが心に残っている。学術の発展にどのような協働により貢献ができるのか、常に考えていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugita R, Kobayashi NI, Hirose A, Saito T, Iwata R, Tanoi K, Nakanishi TM. Visualization of Uptake of Mineral Elements and the Dynamics of Photosynthates in Arabidopsis by a Newly Developed Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS). *Plant Cell and Physiology*. 2016, 57(4):743–753.
2. Sugita R, Kobayashi NI, Hirose A, Iwata R, Suzuki H, Tanoi K, Nakanishi TM. Visualization of how light changes affect ion movement in rice plants using a real-time radioisotope imaging system. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2017, 312(3):717–723.
3. Kim J-M, To TK, Matsui A, Tanoi K, Kobayashi NI, Matsuda F, Habu Y, Ogawa D, Sakamoto T, Matsunaga S, Bashir K, Rasheed S, Ando M, Takeda H, Kawaura K, Kusano M, Fukushima A, Endo TA, Kuromori T, Ishida J, Morosawa T, Tanaka M, Torii C, Takebayashi Y, Sakakibara H, Ogihara Y, Saito K, Shinozaki K, Devoto A, Seki M. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants* 2017, 3(7):17097.
4. Kobayashi NI, Yamaji N, Yamamoto H, Okubo K, Ueno H, Costa A, Tanoi K, Matsumura H, Fujii Kashino M, Horiuchi T, Nayef MA, Shabala S, An G, Ma JF, Horie T. OsHKT1;5 mediates Na⁺ exclusion in the vasculature to protect leaf blades and reproductive tissues from salt toxicity in rice. *Plant Journal*. 2017, 91(4):657–670.
5. Ogura T, Kobayashi NI, Suzuki H, Iwata R, Nakanishi TM, Tanoi K. Magnesium uptake characteristics in Arabidopsis revealed by ²⁸Mg tracer studies. *Planta*, 248(3):745–750.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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. Tanoi, K.; Sugita, R.; Hirose, A.; Kobayashi, N.I.; Nakanishi, T.M., “Tools for analysing a long transport system in plant using radiotracer.”, The 17th International Workshop on Plant Membrane Biology (IWPMB2016) (Maryland, USA) T1p-6 (2016, Jun. 5–10).
2. 田野井慶太郎, “放射性トレーサーを用いた植物における物質分布の可視化技術の開発”, 第 12 回トランスポーター研究会年会(JTRA12) (2017, Jul. 9). (招待講演)
3. 田野井慶太郎, 杉田亮平, 小林奈通子, “植物体内物質動態に関する表現型の定量評価基盤技術の構築” 第 60 回日本植物整理学会年会、名古屋大学、2019 年 3 月 13 日

研 究 報 告 書

「植物ホルモン受容の可視化技術」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 萩原 伸也

1. 研究のねらい

植物は、周囲の状況を感じ、その情報を内外の各所へ伝達することで、環境への応答を起こす。この過程で、植物ホルモンは感知した情報を植物全体に伝えるシグナル分子として働く。これまでに、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシシン酸、エチレン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸、ストリゴラクトンなど様々な植物ホルモンが発見され、その役割が明らかにされてきた。例えば、植物はリンや窒素が欠乏すると、ストリゴラクトンの合成量を増やし、分枝を抑制するとともに菌根菌との共生を促進することで、貧栄養状態を脱しようとする。このような環境応答は、複数の遺伝子がはたらいって起こる複雑な生理機能であるが、局所間のシグナル伝達は多くの場合限られた数の植物ホルモンが行っている。最近、各植物ホルモンの受容体が続々と同定され、こうしたシグナル伝達の分子機構が明らかになってきた。今後は、これらの受容体がいつ・どこで機能するのか、さらには他の植物ホルモンとのクロストークを明らかにし、植物機能の人工的な制御へ展開することが求められている。

将来的な作物生産への発展性を見据えると、こうした解析にはモデル植物に限定されず、フィールド展開可能な手法を用いるのが理想的である。植物に限らず遺伝子の機能解析には、ノックアウトなど遺伝学的手法がこれまで多く用いられてきた。しかし、フィールドで組換え体を用いた解析を実施するには、乗り越えるべき問題が多々存在する。このため、フィールドで植物の生命現象を解明するには、従来多用されてきた遺伝学的手法にとらわれない革新的な方法の開発が望ましい。

こうした背景から、本研究では植物ホルモンの受容を可視化する分子プローブを開発し、これを用いた植物の環境応答機構の解明・制御を行う。本手法は、植物の示す複雑な生理作用を定量的に解析し、理解するうえで極めて有用であり、ここから得られる成果は、将来的に環境適応型植物を分子レベルで設計するうえで基盤的な技術・情報となることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究期間は、最も古くから知られている植物ホルモン「オーキシシン」、最も新しく発見された植物ホルモン「ストリゴラクトン」に関する取り組みを行った。

オーキシシンは発生、分化、成長など植物の生活環の全般にわたり重要な役割を果たす植物ホルモンである。例えば、黄化芽生えが短時間で著しく伸長生長したり光の方向へ屈曲したりする現象は、オーキシシンによって引き起こされる。オーキシシンの働く仕組みが分子レベルで明らかになってきたのは 21 世紀に入ってからで、2005 年によくオーキシシンの受容体 TIR1 が同定された。TIR1 は、F-box タンパク質の一種で、オーキシシンの結合により転写抑制因子 Aux/IAA の分解を促進する。これによりオーキシシン応答性の転写因子 ARF が活性化さ

れ、生理応答を引き起こすと考えられている。一方、黄化芽生えの伸長生長などオーキシンによって引き起こされる応答は極めて速いものが多いことから、遺伝子発現制御を介さない別のシグナル伝達機構の存在も示唆されている。本課題では、こうしたオーキシンの分子機構の謎に迫るべく、合成化学的アプローチから研究を行なった。

ストリゴラクトンは、ブテノライド構造をもつ一連の化合物群の総称で、2008 年に植物の分枝を抑える植物ホルモンであることが示された。そもそも、ストリゴラクトンは 1960 年代に寄生植物ストライガの発芽誘導物質として発見された化合物である。ストライガは穀物の根に寄生して宿主を枯らす有害植物で、宿主が放出するストリゴラクトンを感知して寄生する。我々はこれまでに、ストリゴラクトン受容体が働く瞬間を可視化する分子 YoshimulactoneGreen (YLG) を開発することで、ストライガのストリゴラクトン受容体 10 種類を同定している。本研究では、YLG を用いた化合物スクリーニングにより、ストリゴラクトン受容体の機能を阻害してストライガの発芽を制御する分子の開発を行った。この分子はストライガの農業被害を軽減する新規農薬としての展開が期待される。また、非寄生植物のもつストリゴラクトン受容体を標的とした化合物スクリーニングから、シロイヌナズナやイネにおいてストリゴラクトンシグナルを阻害することで枝分かれを誘起する分子の開発を行った。本化合物は新規植物成長調整物質としての応用が期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「オーキシン受容体の応答解析」

オーキシンの生理作用は古くから植物成長調整剤として農業利用されてきた。例として、トマトの着果促進がよく知られている。ただし、オーキシンは多くの生理機能に関与しているため、副作用を避けて望みの効果を起こすには特定の器官(花、花房)のみに対して処理する必要がある。この作業は非常に手間がかかるため大規模農業には適さない。このため、現状では植物ホルモンのもつ多彩な機能を植物成長調整剤として有効活用できていない。そもそも、オーキシンの示す多様な効果のそれぞれを分子レベルで解明すること自体困難であり、未解明な部分が多く残されていた。

この課題を解決するため、私は Bump-Hole 法(凸凹法)を用いることでオーキシンの作用を受容体レベルで制御する新技術を開発した。凸凹法とは、変異を導入して受容体の構造を改変し、この改変型受容体に結合するリガンドを設計することで、天然型のリガンド-受容体ペアとは独立にシグナル伝達を誘起する人工ペアを作る手法である。まず、受容体 TIR1 のオーキシン結合ポケットに1アミノ酸の変異を導入し、天然オーキシンに結合しない改変型 TIR1(凹 TIR1)を作成した。そして、この凹 TIR1 へ選択的に結合する人工オーキシン(凸オーキシン)を合成した。凸オーキシンは、凹 TIR1 を発現させた植物でのみオーキシン応答(根の伸長阻害など)を起こすことから、凹 TIR1-凸オーキシンのペアが天然の仕組みとは独立に植物体内で機能することがわかった。これは個体レベルで凸凹法を実現した初の例である(*Nat. Chem. Biol.*, 2018)。

シロイヌナズナには TIR1およびそのファミリータンパク質が 5 種類存在し、互いに機能を相補している。このため、単独変異体では表現型が明確に見られない。また、これらのファミリー全てを欠損させると成長が著しく悪くなるため、これまで TIR1と様々なオーキシン応答との関

連を明確にする手法は存在しなかった。一方、本手法を用いると、解析対象とするオーキシン応答が TIR1 を介したシグナル伝達であるか否かを明確にすることができる。実際に、凹 TIR1 を発現する植物に凸オーキシンを作用させたところ、黄化芽生えの迅速な伸長生長が確認された。すなわち、このオーキシン応答は TIR1 を介して誘導されることが明らかになった。さらに、我々はこの手法を用いて、オーキシンによる根の可逆的な伸長抑制も TIR1 を介して誘導されることを明らかにした(*Nat. Plants.*, 2018)。

さらに、我々は本手法の将来的な農業応用を目指し、より低濃度で効果を示す凹 TIR1-凸オーキシンペアの開発を行った。凹 TIR1 に導入するアミノ酸置換や凸オーキシンの構造を検討することで、天然のオーキシン-TIR1 ペアと比べて1万倍低濃度で相互作用を起こす凹 TIR1-凸オーキシンペアを見出した(*Plant. Cell. Physiol.*, 2018)。例えば、この凹 TIR1 を花で特異的に発現するトマトに対して凸オーキシンを散布すれば、着果促進を選択的に誘起することが可能と考えられ、農業を効率化する新規植物成長調整剤としての応用が期待される。

研究テーマ B「ストリゴラクトン受容体の機能制御」

ストライガは、穀物の根に寄生して養分を吸い取り、収穫高を激減させる有害植物である。ストライガに汚染された土壌はアフリカのサハラ沙漠以南を中心に年々広がっており、その面積は4千万ヘクタール(日本の総面積に相当)にのぼる。これによる農業被害は年間1兆円を超えると見積もられ、アフリカの飢餓・貧困の要因の一つとなっている。ストライガを抑え、こうした土地を農地活用できれば、飢餓地域における作物生産量を向上し、世界的な食糧需給バランスの確保に大きく貢献すると考えられる。こうした背景のもと、私はストライガの発芽を選択的に抑える薬剤の開発を目指した。

通常の植物は季節や水分などを感じ取り発芽を開始する。これとは異なり、ストライガは寄生先となる穀物が土壌中に放出する植物ホルモン「ストリゴラクトン(SL)」を感知することで発芽する。このストライガ特有の仕組みを担うタンパク質は、ストライガ制圧に向けた分子標的の有力候補である。しかし、50年以上もの間、このタンパク質「SL 受容体」は見つかっていなかった。私は、ストライガが SL を受容する際に加水分解するという現象に着目し、加水分解されると蛍光性を示す SL 様分子「ヨシムラクトングリーン(YLG)」を開発した。この分子を使うことにより受容活性の可視化が可能となり、世界に先駆けてストライガの SL 受容体の同定に成功した。さらに YLG を用いたライブイメージングにより、ストライガが発芽時にいつ・どこで SL を受容するのかを明らかにし、発芽機構の全容解明を大きく前進させた(*Science*, 2015)。

本研究課題ではこうした成果を基盤に、SL 受容体に結合しストライガの発芽を制御する分子の開発に取り組んだ。YLG は、SL 受容体に結合すると加水分解を受け蛍光を発する。この蛍光を抑える、すなわち SL 受容体の機能を抑える化合物には、ストライガの発芽を抑制する作用が期待される。実際に、SL 受容体による YLG 加水分解を阻害する分子を ITbM 化合物ライブラリーから探索したところ、22 個のヒット化合物が得られた。このうちの一つの化合物 SGI-1 には、SL によって誘導されるストライガの発芽を阻害する効果が見られた。さらに、この化合物を誘導体化することで、より高活性な化合物 SGI-3 が得られた。本ストライガ発芽阻害分子は、ストライガによる農業被害を抑え、食糧難地域に農地を回復する突破口になると期待される。

一方、通常植物(非寄生植物)のもつ SL 受容体 DWARF14(D14)は、枝分かれを抑制することが知られている。本課題では、YLG の蛍光を指標とした化合物スクリーニングを D14 に対しても実施し、4 化合物を D14 の競合阻害剤として同定した。この中で最も阻害活性の強い化合物(DL1)の存在下でシロイヌナズナを生育したところ、枝分かれの増加が確認された。また、イネにおいても同様の効果が見られた(*ACS Central Science*, 2018)。植物の枝分かれの数は農作物の収量やバイオマス生産量と相関することから、DL1は新規植物成長調整剤としての応用が期待される。

3. 今後の展開

研究テーマ A「ストリゴラクトン受容体の機能制御」

SGI-3 はストライガ被害を軽減する農薬として、DL1 は新規植物成長調整剤として、それぞれ応用が期待される。今後はこれらの化合物の安全性試験を実施するとともに、ポット試験や圃場試験を行い、社会実装に向けた取り組みを進める。

研究テーマ B「オーキシン受容体の応答解析」

本手法をフィールドへ展開するため、凹 TIR1を部位特異的に発現する実用植物(トマトなど)の作成を行っている。これらの植物を用いた試験を進めるとともに、凸オーキシンの安全性評価を行い、本技術実用化への取り組みを進める。また、オーキシン以外の植物ホルモンについても、同様の手法で応答を精密に制御する系を確立し、様々な植物の機能を自在にコントロールする汎用的手法を構築する。

4. 自己評価

植物科学は、これまで遺伝学や分子生物学といった生物学的手法を基盤に進められてきた。これにより、植物の環境応答や成長の仕組みなどに関する膨大な知見が蓄積している。一方、冗長性などの問題により、遺伝学的手法では手付かずになっていた領域も存在する。また、変異体や組換え体の作成法が確立されていない植物種も存在しており、過去にモデル植物を用いて得られてきた知見を有用作物へ展開するうえでの足かせとなっている。本研究のねらいは、植物科学にケミカルバイオロジーを融合することで、このような課題を解決できる可能性を示すことにあった。特に、植物研究者が多く集う本さがけ領域においてこうした研究を遂行することで、新たな共同研究を生み出すとともに、気鋭の植物研究者とケミカルバイオロジー的手法の有用性を共有することを目指した。本研究期間中に化合物を提供した領域メンバーは 9 名にのぼり、概ねこの目的は達成されたとと言える。

個別の研究課題を進めるにあたっては、化合物の化学合成に必要な装置や植物での評価に必要な顕微鏡など、設備面での充実に予算を執行し、3 名の大学院生が参画した。その結果得られた成果は、化学、植物科学、ケミカルバイオロジーの各分野におけるトップジャーナルに掲載されている。このうち一報(*Nat. Plants.*, 2018)は、本研究成果が即座に海外との共同研究へ発展したものであり、本研究の学術的波及効果の高さを示している。また、さがけ研究を含め、我々の開発した化合物群は、植物の環境適応を補助する農薬となるだけでなく、植物がもつ環境適応の仕組みを分子レベルで解明するためのツールとしても利用可能であり、産学ともに新たな連携の構築が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Ryotaro Yamada, Masahiko Yoshimura, Takaho A. Endo, Seisuke Kimura, Hua Zhang, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara*, and Keiko U. Torii* Chemical hijacking of auxin signaling with an engineered auxin-TIR1 pair <i>Nat. Chem. Biol.</i> , 2018 , <i>14</i> , 299–307.
2.	Masahiko Yoshimura, Ayato Sato, Keiko Kuwata, Yoshiaki Inukai, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Yuichiro Tsuchiya, and Shinya Hagihara Discovery of shoot branching regulator targeting strigolactone receptor DWARF14 <i>ACS Central Science</i> , 2018 , <i>4</i> , 230–234.
3.	Matyáš Fendrych, Maria Akhmanova, Jack Merrin, Matouš Glanc, Shinya Hagihara, Koji Takahashi, Naoyuki Uchida, Keiko U. Torii & Jiří Friml Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signaling <i>Nat. Plants.</i> , 2018 , <i>4</i> , 453–459.
4.	Ryotaro Yamada, Keiichiro Murai, Naoyuki Uchida, Koji Takahashi, Rie Iwasaki, Yasuomi Tada, Toshinori Kinoshita, Kenichiro Itami, Keiko U. Torii, Shinya Hagihara A super strong engineered auxin-TIR1 pair <i>Plant. Cell. Physiol.</i> , 2018 , <i>59</i> , 1538–1544.
5.	Hiroyuki Kitano, Jae-Hoon Choi, Ayaka Ueda, Hideto Ito, Shinya Hagihara, Toshiyuki Kan, Hirokazu Kawagishi, Kenichiro Itami Discovery of Plant Growth Stimulants by C-H Arylation of 2-Azahypoxanthine <i>Org. Lett.</i> , 2018 , <i>20</i> , 5684–5687.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

(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. “Small molecules that regulate plant hormone signaling”
The 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Kyoto, 2017.12.14. (招待講演)
2. 「植物ホルモン受容体を介したシグナル伝達の精密制御」
第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 2018.6.27. (招待講演)
3. 「植物ホルモンシグナルの人工的制御」
日本農芸化学会 2018 年度大会, 名城大学, 2018.3.16. (招待講演)
4. 「有機化学と合成生物学を駆使して植物ホルモンの作用をハイジャック ～化学の力でダーウィンの見つけた植物の運動の謎に迫る～」 2018.1.23. (プレスリリース)

研 究 報 告 書

「花粉管をベクターとした遺伝子改変技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 4 月～2019 年 3 月

研 究 者: 水多 陽子

1. 研究のねらい

農作物の生産現場では、気候変動に伴う品質低下や病害虫の蔓延など、世界中で食糧危機に直結する多くの問題が生じている。国内においても農業従事者と耕作面積の減少、価格・嗜好の多様性など、時代背景や環境変化に合わせた農作物の作出が急務となっている。一方、かけ合わせなど従来の育成方法は、膨大な手間と時間が育種改良の障壁となっている。よって、時代や社会のニーズに合わせ狙った形質を持つ品種を簡単かつ迅速に得る方法が求められている。

近年、育種改良スピードを飛躍的に高める方法として、新植物育種技術の一つであるゲノム編集が注目を浴びている。このうち CRISPR/Cas9 システムでは、RNA 誘導型ヌクレアーゼ (Cas9) とガイド RNA (gRNA) を細胞に導入することで、狙った遺伝子の情報を書き換えることができる。植物細胞への CRISPR/Cas9 の導入は一般的にアグロバクテリウム法を用いておこなわれる。しかしこの方法には以下のような問題点がある。

- ① アグロバクテリウムの非宿主植物の場合、カルス化や再分化など組織培養が必要なことがある。組織培養の工程は手間と時間がかかり、予期せぬ突然変異が生じることもある。
- ② 植物の遺伝的背景に依存して成功率が大きく異なり、アグロバクテリウムの感染や組織培養自体が困難な植物も多い。
- ③ 作出された植物は一時的に遺伝子組換え体 (GMO) となる。わが国で得られた新品種を農作物として利用するには、カルタヘナ法や食品衛生法、飼料安全法等による規制をクリアする必要がある。

このように、植物におけるゲノム編集を用いた育種改良は、従来技術では超えられない多くの課題を抱えている。これらを解決すべく、本課題では CRISPR/Cas9 を花粉へ導入することで、狙った遺伝子を書き換えた種子を効率的に作出する新しい育種改良技術の開発をおこなった。被子植物の花粉は植物の生殖細胞、すなわち精細胞を含み、卵細胞へと運ぶ役割を持つ。つまり、花粉に CRISPR/Cas9 を導入すれば、精細胞または受精卵といった次世代へ伝わるゲノムを直接編集することができる。また、この花粉を受粉させれば、組織培養を経ずにゲノム編集個体を直接得ることができる。以上より、本課題の技術の確立により、これまで育種改良が困難であった植物において、品種改良の質とスピードを飛躍的に高めうる画期的な技術となることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

植物細胞へ分子を導入する方法はいくつか知られている。そのうち、ボンバードメント法では微細な金属粒子に分子を付着させ、ガス圧により高速で射出する。この方法を用いること

で、固い細胞壁を持つ植物細胞にも分子を導入することが可能である。本課題ではこの方法を用いて、花粉に Cas9 と gRNA 及び蛍光タンパク質の配列を含むプラスミド DNA の導入を試みた。その結果、導入後に蛍光タンパク質の発現を指標に花粉への導入効率を評価することで、最適なプロモーターを決定することができた。また、ナス科のモデル植物の一つであるベンサミアナタバコを用い、花粉への導入効率を明らかにした。導入された花粉のうち、次世代に伝わる雄原細胞への導入は約 1/6 であった。

導入された花粉におけるゲノム編集の有無を確認するため、蛍光を指標にベンサミアナタバコの導入花粉管を採取し、ゲノム DNA を抽出して標的配列を調査した。その結果、標的配列内にゲノム編集によると思われる塩基挿入や欠失、置換などの変異を複数種類確認することができた。また、蛍光を指標に導入効率を簡便に評価できる方法も併せて確立した。よって、これら本技術の要となる一連の手法について出願した。

以上より、CRISPR/Cas9 を花粉に導入することで、簡便に花粉管内でゲノム編集が可能であることが明らかになった。本成果は出願済の特許を基盤に、社会実装化を見据えた技術としても注目され、企業 2 社を含む 4 件の共同研究、ならびに新たな発展型のプロジェクトの採択にも繋がっている。今後は導入効率の向上や、導入花粉によるゲノム編集個体の評価を進め、論文など成果を発表するとともに、継続して研究を進める予定である。

(2) 詳細

研究テーマ A 「花粉へのプラスミド DNA の導入方法の確立」

まず初めに、成熟花粉へ CRISPR/Cas9 を導入可能な方法を探索した。研究開始当初にベンサミアナタバコ、タバコ、トマト、トウモロコシ、ソルガムならびシロイヌナズナの花粉を用いて導入方法の検討を行った。その結果、ボンバードメント法では再現性の高い花粉への導入が可能であった。よって、以降の実験はボンバードメント法を用いて行うこととした。

ボンバードメント法による花粉への導入効率は植物種によって異なり、今回用いた中ではベンサミアナタバコにおいて最も効率が高く、花粉の取り扱いも容易であった。よって以降は主にベンサミアナタバコを用いて実験を行った。Wang ら(2011, Nat. Protoc.)の方法などを参考に蛍光タンパク質を発現するプラスミド DNA を用いて導入条件を検証し、花粉へのダメージが最も少なく、導入花粉数が最多となる条件を決定した。その結果、一回の撃ち込みで数十～数百の花粉へ導入できる条件を見出した(永原ら, 生命科学系学会合同年次大会, 2017)。

研究テーマ B 「最適なプロモーターの選択、ならびに花粉への導入効率の評価」

花粉内で Cas9 を高発現可能なプロモーターを探索した。ウィルス、またはシロイヌナズナ由来の複数種類のプロモーター配列を用いて、蛍光タンパク質を含むプラスミドを構築し、蛍光強度を指標にプロモーター活性を評価した。その結果、安定的に高発現を示すプロモーターを選抜することができた。なお、アグロバクテリウム法による形質転換体では花粉で発現を示さないプロモーターでも、ボンバードメント法では強い発現を示すものが複数見出された。このことから、ゲノムに組み込まれた導入遺伝子と一過的に導入された遺伝子では、発現制御が異なることが示唆された(水多ら, 2018 日本植物形態学会第 30 回大会ならびに日本植物学会第 82 回大会)。

ベンサミアナタバコの花粉は内部に雄原細胞を含む。次世代に伝わるゲノムを持つのは雄原細胞であることから、ゲノム編集個体の獲得のためには雄原細胞へ CRISPR/Cas9 の分子を導入する必要がある。ベンサミアナタバコの花粉における花粉及び雄原細胞への導入数（導入効率）の報告はなかったことから、上記プロモーターを用いて一回の撃ち込みにおける花粉及び雄原細胞への導入効率について、蛍光を指標に評価した。その結果、一回の撃ち込みで約 1.2% の花粉へ導入され、そのうち 1/6 にあたる約 0.2% の花粉で雄原細胞へも導入されることが分かった（水多ら, 2018 日本植物形態学会第 30 回大会ならびに日本植物学会第 82 回大会）。併せて、植物は重複受精をおこなうため、本法によりゲノム編集個体を効率的に獲得するには、精細胞に分裂前の前駆細胞である雄原細胞を持つ種、つまり二細胞性花粉の種を用いるのがより望ましいと考えられた。

研究テーマ C 「花粉におけるゲノム編集効率の評価」

上記で確立した方法及び選抜したプロモーターを用いて、Cas9 と gRNA を含むプラスミド DNA を構築し、導入することで、花粉でゲノム編集が可能であることを調査した。標的遺伝子は *NbPDS3* 遺伝子とし、すでに実績と報告のある標的配列（Li et al. 2013 Nat. Biotech.; Nekrasov et al. 2013 Nat. Biotech.）を用いた。ボンバードメントで導入後、ゲノム DNA を抽出し、標的配列を含む領域を PCR 増幅してクローニングした。その結果、gRNA の標的配列内にゲノム編集によるものと思われる複数の変異を確認することに成功した。なお、一連の手法ならびにゲノム編集効率を効率的に評価する方法については、特許を出願した。以上より、ボンバードメント法を用いて CRISPR/Cas9 の分子を導入することで、花粉でのゲノム編集が可能であることが示された。

3. 今後の展開

本課題の成果により、CRISPR/Cas9 の分子をボンバードメント法により簡便に花粉へ導入することで、ゲノム編集が可能であることが明らかとなった。一方、本技術を社会実装化に向けて発展させるには、花粉への導入効率を向上させ、ゲノム編集された花粉または植物体のみを効率的に選抜する手法の開発が望ましい。今後はこれらを解決する方法に注力し、引き続き研究を進める必要がある。また、本課題では主にベンサミアナタバコを用いて検討を行ったが、花粉の構造や特徴などは被子植物に共通している。本技術が他の植物にも応用可能となれば、これまで従来技術では遺伝子導入が困難であった植物において、効率的にゲノム編集植物を獲得できる画期的な方法となるかもしれない。引き続き、花粉への導入とゲノム編集が可能かなど、複数の植物を用いて調査していく予定である。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究課題では、花粉へのゲノム編集分子の導入方法の確立と、導入花粉を用いた効率的かつ簡便なゲノム編集個体の作出に取り組んだ。花粉への導入方法については、研究開始年次に時間の多くを割くことになってしまったが、結果的にはナス科植物を用いて再現性があり安定した花粉への CRISPR/Cas9 システムの導入方法を確立することに成功した。また、導入花粉におけるゲノム編集も証明でき、一連の過程は特許出願にも繋がった。一方、未だ

導入花粉由来のゲノム編集個体の獲得には至っていない。それは、導入花粉数が少なく、ゲノム編集個体を効率的に選抜する方法がないためである。本技術を社会実装化に向けて発展させるには、花粉への導入効率を向上させ、ゲノム編集された花粉または植物体のみを効率的に選抜する手法が必要であると考えられる。今後はこれらを解決する方法に注力して研究を進める予定である。また、三年という期間の中では、ナス科のモデル植物以外の様々な植物へ本方法を展開・検証することはできなかった。本方法は、特に遺伝子改変が困難な非モデル植物で効果を発揮する。しかし、そのような植物は一年に一回しか花が咲かないなど世代が長いことも多く、手法を確立させるのは困難であった。今後様々な植物で本方法を検証するには、まずは本方法に適した種の選定とその植物の専門家の協力、そしてある程度の研究期間が必要であると考えられる。

【研究体制と研究費の執行について】

研究体制は研究期間全般を通じて、さがけ研究者の水多と研究補助員 1 名で実験をおこなった。水多が方向性を定めて研究補助員に実験内容を指示し、研究を推し進めることで、過不足のない体制で成果に繋げることができた。研究を進めるにあたっては、ボンバードメント用の機器やサーマルサイクラー、観察に必要な蛍光顕微鏡など各種実験機器を購入した。これらの機器は高額であるが、研究を進める上で不可欠であり今後解決すべき課題も明確にすることができた。学内における研究スペースの確保や温室など、本研究に優先的に使用できる場所や体制を整えたことも、効果的に成果を得ることに繋がり、研究室の運営に関わる情報や知識も得ることができた。また、各学会やシンポジウムなどにも積極的に参加し成果を発表するとともに、本研究を推進するのに必要な情報や人脈を広げることに繋がった。

【研究成果の発信について】

得られた成果を基盤として、出願や発表などを行うことで、当初は想定し得なかった多彩な分野との共同研究や産学連携プロジェクトに発展した。さがけ期間に限定された単なるツール開発の研究に留まるのではなく、更なる発展に繋がる研究となりつつあることは、予想外の喜びである。今後も各機関、研究者、分野と連携し、より効果的な方法を確立し応用展開できるよう研究に邁進する所存である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数： 1 件

(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. Yoko Mizuta, Tetsuya Higashiyama. Chemical signaling for pollen tube guidance at a glance. J. Cell Sci. 2018, 131, jcs208447.
2. Yoko Mizuta, Katsutoshi Tsuda. Three-dimensional multiphoton imaging of transcription factor by ClearSee. Springer protocols, Plant Transcription Factors, Yamaguchi Nobutoshi (Ed.), 2018, 257-268, ISBN:978-1-4939-8656-9.

3. 水多陽子、永原史織、東山哲也. 花粉のゲノム編集. 日本植物学会第 82 回大会. 2018 年 9 月 16 日.
4. 栗原 大輔, 水多 陽子. 透明化技術を用いた植物組織蛍光観察のすすめ. Plant Morph., 2017, 29, 81-86.
5. 永原 史織、栗原 大輔、東山 哲也、水多 陽子. パーティクルボンバードメント法による植物生殖細胞への CRISPR/Cas9 の導入. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 2017 年 12 月 9 日.

研 究 報 告 書

「光環境によって獲得された形質が遺伝する分子基盤の解明と実用植物への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 山口 暢俊

1. 研究のねらい

植物の形態形成は環境情報の読み取りから始まる。その情報を記憶し、伝達するしくみを知ることができれば、フィールドで環境が変化した場合でも安定的に育成する植物を分子レベルで設計することが可能になる。これまでに植物が週単位での環境の情報を記憶しているという知見はいくつか得られているが、分子的なメカニズムが不明なものも多く、獲得形質や遺伝子発現のような情報が次世代にまで伝わることを報告している例はこれまでにほとんどない。本研究では、そのような分子メカニズムを明確に理解し、人工的に植物を設計する手がかりを得ることをねらいとしている。

植物が環境情報を記憶する仕組みの1つとして、クロマチンの役割に着目した。クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを構成するヒストンは、様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。ヒストンの修飾はクロマチンの構造変化とエピジェネティックな遺伝子発現に大きな影響を与える。なかでも、ヒストンのメチル化による修飾は半減期の長い安定な修飾であり、長期間の遺伝子発現制御“記憶”に必要な不可欠なものであると予想される。ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基のメチル化は、種を超えて遺伝子の活性化状態と明確な正の相関を示し、進行中の転写領域をマークして分布する。シロイヌナズナでは、ヒスチンメチルトランスフェラーゼに共通する SETドメインをもつ SET DOMAIN GROUP タンパク質が冗長的に機能し、ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基をメチル化する。本さきがけ研究では、光環境依存的に形態が変化する *sdg* 多重変異体に着目した。興味深いことに *sdg* 多重変異体では、環境によって獲得した形質は次の世代にまで伝達するようになる。このことは、ヒストン修飾を介して植物は環境の変化を次世代に伝えることが可能であることを示唆する。そこで、自然環境の変化に左右されない植物の創出の鍵となると考えられる獲得形質の継承の分子メカニズムの解明とその応用を目指す研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

フィールドにおける環境変化に適応し、安定的に生育する植物を分子レベルから設計するために、本プロジェクトでは環境の情報をインプットさせて、頑健に生育する植物を創出する方法を確立することを目指した。この目標を達成するために、ヒスチンメチルトランスフェラーゼが機能しない *sdg* 変異体に注目した。*sdg* 変異体を長日条件下で生育した場合には、多くの遺伝子の活性化が起こらないために植物は極めて矮小になる。しかし、短日条件下で *sdg* 変異体を育てると、表現型の大部分が回復して、野生型と同等の大きさに生育する。さらに、回復した形質は 10 世代にまで伝わるということがわかった。

網羅的な遺伝子発現解析から、表現型と相関がある遺伝子を抽出した。予想したとおり、光

の受容や光合成など光環境によって発現が変化する遺伝子が多かった。その中に、DNA のメチル化を制御する遺伝子である *CHROMOMETHYLASE2* (*CMT2*)を見出した。この結果から、H3K36me3 の修飾と DNA メチル化の相互作用が記憶の形成を制御する可能性が示唆された。

記憶を人為的に調節するには、SDG の機能解析も必要不可欠である。SDG は植物体全体で働くこと、AP2 や MYB タイプの転写因子と相互作用して、DNA 上にリクルートされて、下流の遺伝子を活性化するように働くことがわかった。

記憶を制御する遺伝子を同定するために、長日条件下で生育した *sdg* 変異体の表現型を回復させたサプレッサーの単離を行った。その原因遺伝子の1つに、H3K27me3 を導入する働きをもつポリコーム複合体の構成因子の1つをコードする *CURLY LEAF*(*CLF*)があった。このことから H3K27me3 と H3K36me3 の相互作用が記憶の形成に重要であることが示唆された。

これらの解析から、*sdg* 変異体で起こる H3K36me3、DNA のメチル化、H3K27me3 などエピジェネティックな修飾の総合的な変化が記憶の分子実態であると予想している。

(2) 詳細

研究テーマ A 「経世代的な *sdg* 変異体の表現型の解析」

sdg 変異体を長日条件下で生育した場合、植物の地上部も地下部も極めて矮小になった。しかし、短日条件下で *sdg* 変異体を育てると、表現型の大部分が回復して、野生型と同等の大きさに生育した。さらに、回復した形質は 10 世代にまで伝わった。表現型が回復するのは、細胞の大きさと数の両方の形質が回復するためであった。器官のサイズや細胞分裂を制御する遺伝子群の発現と、器官のサイズには相関が認められた。

研究テーマ B 「SDG の下流の遺伝子から探る記憶の形成の分子基盤の解明」

記憶の分子基盤を調べるために、*sdg* 変異体を用いてトランスクリプトーム解析を行った。GO term 解析から、光応答、ストレス応答、代謝など様々な遺伝子の発現が変化することがわかった。またエピジェネティックな現象を制御する遺伝子の発現も変化していた。その中に、DNA のメチル化を制御する遺伝子である *CMT2* を見出した。DNA のメチル化は、世代を超えた記憶を制御することがわかっている。この結果から、H3K36me3 の修飾と DNA メチル化の相互作用が環境情報の記憶の形成を制御する可能性が示唆された。遺伝学的な解析により、*CMT2* 遺伝子の記憶における役割を調べることで、記憶の分子基盤を解明できると考えられた。

研究テーマ C 「SDG を DNA 上にリクルートする分子基盤の解明」

SDG の役割を知るために、その機能を解析した。*sdg* 変異体では表現型が植物体全体で出る結果と一致して、SDG は植物体全体で強く発現していた。その発現自体には、光の影響は観察されなかった。そのため、光の影響は SDG の蓄積自体に影響するのではなく、下流の遺伝子の発現によるものであると予想できる。SDG タンパク質が DNA 上にリクルートされる分子基盤を知るために、Y2H を行って相互作用因子を同定した。これまでに、56 個の転写因子と SDG が相互作用することを明らかにしている。中でも、AP2 や MYB タイプの転写因子を、それ

それぞれ 15 個及び 6 個同定している。

研究テーマ D 「*sdg* 変異体のサプレッサーから探る記憶の形成の分子基盤の解明」

記憶を制御する遺伝子を同定するために、長日条件で生育した *sdg* 変異体の表現型を回復するサプレッサーの単離を行った。長日条件で生育した矮小になる *sdg* 変異体の表現型を回復させるサプレッサーに *clf* 変異が見いだされた。*sdg clf* 変異体では、地上部と地下部のどちらの表現型も回復する。そのため、抑制的ヒストン修飾である H3K27me3 と促進的ヒストン修飾である H3K36me3 のバランスによって遺伝子発現と形態が制御されているのではないかと考えている。CLF が導入する H3K27me3 は遺伝子発現を抑制する働きがあるだけでなく、動物では世代を超えて引き継がれる例も報告されている。植物でも獲得形質が世代を超えて伝わる仕組みを示すことができれば、インパクトの高い研究成果として報告できる。

3. 今後の展開

本さがけ研究を通して、*sdg* 変異体で起こった H3K36me3 のヒストン修飾の変化が光環境の記憶に重要であることが明らかになった。また H3K27me3 や DNA のメチル化との相互作用を介して記憶となるということが示唆された。記憶における *CMT* や *CLF* 遺伝子の重要性を評価するためには、*sdg cmt2* や *sdg clf* 多重変異体でのエピジェネティックな修飾状態の変化を経代的に調べる必要がある。経代的解析には時間がかかるが、必要十分な記憶の分子実態を突き止めてから研究成果として報告したい。その分子基盤を利用して、実用植物で応用するのが今後の展開となる。

本さがけ研究は SDG の機能という側面からも興味深い。SDG が AP2 や MYB タイプの転写因子と相互作用して DNA 上にリクルートされることが示唆された。機能欠損変異体での表現型、タンパク質の結合部位、遺伝子の発現部位など複数の共通点を見出したものをリクルーターとして報告する予定である。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

研究は総じて順調に進行した。研究のねらいにあげた分子基盤の一端は明らかにすることができたため、一定の評価はできる。今後は研究成果をまとめて、公表を進めたい。また、記憶を消し去る方法を明らかにするという新しい課題も見えた。さらに実際に人為調節をして記憶の期間を人為的に調節することにも挑戦し、記憶の形成に必要な要因を解明することは今後の最重要課題である。さらに当初計画していたように、モデル植物以外にも研究の幅を広げた解析も展開していく予定である。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

本さがけ研究には、さがけ研究者の山口と大学院生 2 名、研究補助者 2 名が参加した。私自身はさがけ兼任研究者であり、大学院学生の教育、他の研究と並行して本さがけ研究を推進した。さがけ研究に参加した学生は私と積極的に議論しただけでなく、学生同士でも密に交流し、研究を進めてくれた。研究補助者は経験者と未経験者を採用した。奈良先端大で研究補助員として勤務した経験があったものは、即戦力として本学の実験機器を使用し、データの取得に大きく貢献した。未経験者であったものも、理系の大学を卒業しており、研

究関連の仕事をしていたため、飲み込みは早かった。研究を行った人数は決して多くない中で、重要な知見を得ることができた。また、さきがけのメンバー・アドバイザー・統括は非常に協力的であり、必要に応じて共同研究・材料提供・情報交換・書類の準備などをサポートしていただいた。

奈良先端大の花発生分子遺伝学研究室の伊藤教授が研究室を立ち上げ、私は最初の助教として着任した。それ以前には私はアメリカでポスドクをしており、立ち上げ直後の所属研究室には実験設備がほとんどなかった。さきがけの研究費を利用して、分子遺伝学・生化学・組織学を行う上で必要不可欠な設備を揃えることができた。

以上のように、さきがけの研究費を利用して、アメリカからの帰国後すぐに研究体制を整え、研究者ネットワークを形成することができた。本学における形質転換植物実験の停止措置によって半年間は形質転換植物が使用できないなど、全く予想しない遅れもあった。そんな中でも、立ち上げ直後のラボから 2 年でさきがけメンバーと一流誌に論文を発表することができた。これはさきがけで構築した研究体制や設備がなければ到底成しえないものであった。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)】

獲得形質の遺伝は約 200 年前から議論されている大きな疑問である。例としてよくあげられるのが小麦を使った春化の実験である。しかしながら、植物において環境の変化によって得られた獲得形質が次の世代まで伝わる例はなく、その分子基盤は不明である。本研究が完成し、分子基盤を明らかにした報告をすれば、高いインパクトを与えることができるだろう。

sdg 変異体で形成される記憶は安定なものであり、実効性はあると判断している。また、これまでの進捗状況から、農学的な波及効果も大きいと考えている。実用植物を用いた実験から、その有用性を評価し、課題も明確にしていきたい。

【その他領域独自の評価項目】

主に本さきがけ領域で開催される領域会議で、同じ戦略目標を持って研究に取り組むやや異なる専門分野の研究者と交流することができた。私の専門ではない分野を専門とする研究者、私よりも優れた技術を持つ研究者との交流によって、すでに論文を 3 報 (Yamaguchi et al., 2018; Nature Communications, Yamaguchi et al., 2017 Nature Communications, Uemura et al., 2018 Plant Reproduction)、著作物を 1 報(Nishizawa-Yokoi and Yamaguchi, 2018 MiMB)公表している。また、受理済みのもも 1 報ある(Wu et al., in press)。それ以外にも、現時点で 6 プロジェクトをさきがけメンバーと共同して進めている状況にある。さらに私がオーガナイザーとなり、さきがけメンバーを中心としたシンポジウムも企画している。これからもこのネットワークを使い、研究の成果発表と研究活動の推進をしたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamaguchi, N., Huang, J., Tatsumi, Y., Abe, M., Sugano, S. S., Kojima, M., Takebayashi, Y., Kiba, T., Yokoyama, R., Nishitani, K., Sakakibara, H., and Ito, T. Chromatin-mediated feed-forward auxin biosynthesis in floral meristem determinacy. *Nature Communications*. 9: 5290.
2. Uemura, A., Yamaguchi, N., Xu, Y., Wee W.Y., Ichihashi, Y., Suzuki, T., Shibata, A., Shirasu, K.,

Ito, T. (2018) Regulation of floral meristem activity through the interaction of <i>AGAMOUS</i>, <i>SUPERMAN</i>, and <i>CLAVATA3</i> in <i>Arabidopsis</i>. <i>Plant Reproduction</i> 31: 89–105.
3. Yamaguchi, N., Huang, J., Xu, Y., Tanoi, K., and Ito, T. (2017) Fine-tuning of auxin homeostasis governs the transition from floral stem cell maintenance to gynoecium formation. <i>Nature Communications</i>. 8: 1125.
4. Yamaguchi, N., Jeong, C.W., Nole-Wilson, S., Krizek, B.A., and Wagner, D. (2016) <i>AINTEGUMENTA</i> and <i>AINTEGUMENTA-LIKE6/PLETHORA3</i> induce <i>LEAFY</i> expression in response to auxin to promote the onset of flower formation in <i>Arabidopsis</i>. <i>Plant Physiology</i> 170: 283–293.

(2)特許出願

研究期間累積件数： 0 件

(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. Yamaguchi, N. (2017/11/5) Floral meristem development in *Arabidopsis*. Taiwan-Japan Plant Biology 2017. Academia Sinica. Taiwan (招待講演)
2. Yamaguchi, N. (2017/2/27) Heat acclimation in plants: Adaptation to different environmental conditions by epigenetic memory. International symposium on environmental stress adaptation and memory in plants. RIKEN. Japan (招待講演)
3. Yamaguchi, N. ed. (2018) Plant Transcription Factors. Methods in Molecular Biology. 1830: 1–396.
4. 「植物ホルモンオーキシンは花幹細胞の増殖を止めて、果実づくりを促すスイッチとしてはたらくー花が実をつくるために必要なメカニズムを解明・食糧の増産に期待ー」 2017 年 10 月 24 日(プレスリリース)
5. 「花がめしべづくりを開始するための DNA の折りたたみ構造変化を解明ー食糧増産や安定供給に期待ー」 2018 年 12 月 11 日(プレスリリース)

研 究 報 告 書

「気候変動と病原菌の進化に頑強な作物設計システムの構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 12 月～2019 年 3 月

研 究 者: 吉田 健太郎

1. 研究のねらい

気候変動に伴い新たな植物病原菌株が出現し、既存の作物品種がもつ抵抗性が崩壊し、穀物供給の障害になることが懸念されている。特に、世界における主要作物コムギでは、すでに温暖化に適応し、既存の抵抗性を打破した病原性の強いさび病菌の出現が報告されている。また、異常気象による高温と低温は、植物免疫の不全をもたらす。そのため、これらの絶対寄生菌に対する抵抗性を付与し、なおかつ異常気象にも頑強な栽培品種の確立が求められている。

本研究では、病害抵抗性のコムギ育種と絶対寄生菌による抵抗性崩壊という軍拡競争の悪循環を断ち切るために、従来の感染初期による病害抵抗性の設計と全く別の「絶対寄生菌の寄生持続性の攪乱による病害抵抗性強化」というコンセプトの下、「気候変動と絶対寄生菌の進化に頑強なコムギ設計システムの構築」を目指す。そして、このシステムを実現するために必要なバイオマーカーを単離することをさきがけ研究期間における達成目標とする。

植物病原菌は、エフェクターを宿主植物内へ分泌し、宿主の防御応答を妨げ、宿主細胞上で生活環を完遂する。一方、宿主植物は、一部のエフェクターを認識し、防御反応を誘導する抵抗性遺伝子を介在させた植物免疫機構を進化させてきた。植物は、防御応答遺伝子の発現を日周依存的に変化させ、病原菌の侵入に備えるために明け方に発現を上昇させることが報告されている。ところが、フィールドでは、絶対寄生菌は、数ヶ月にわたり宿主に寄生している。私は、この観察から絶対寄生菌は、持続的な宿主寄生を実現するために、エフェクターを分泌し、宿主の防御応答を抑制し、かつ防御応答の日周変動を攪乱していると仮定した。もしそうであるならば、その抑制・攪乱された植物の防御応答の遺伝子群を強化することで、提案するコンセプトを実証できるのではないかと考えた。

そこで、本研究の目的を、フィールドにおける①絶対寄生菌が制御する宿主植物の防御応答遺伝子群の遺伝子発現動態の解明と②遺伝子発現モデルの構築とした。このモデルを使うことによって、エフェクターが標的因子に与える防御応答ネットワークへの寄与率を予測できるようにするとともに、将来的には、寄与率の高い標的遺伝子を改変し、気候変動に適応可能な防御応答を強化したコムギの設計を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

フィールドにおけるムギ類うどんこ病菌の罹病葉における時系列トランスクリプトーム解析によって、今まで明らかにされなかった実験環境下で再現困難な複雑な環境変化の中における、かつ長期間にわたるムギ類うどんこ病原菌と宿主植物の双方の遺伝子発現動態を網羅的に明らかにした。また、制御環境における時系列トランスクリプトーム解析からも、今まで知

れていなかった日周変動するムギ類うどんこ病菌の分泌タンパク質遺伝子群を単離した。これらの分泌タンパク質遺伝子群は、植物病原菌が、寄生植物への感染確立と感染状態の維持に大きな役割を果たすとされるエフェクター遺伝子の候補と考えられる。そして、時系列相互相関解析によりネットワークを構築し、エフェクター候補遺伝子と関連する宿主遺伝子群を同定した。野外環境と実験環境の双方からバイオマーカーの候補となる遺伝子を選抜し、現在、これら遺伝子の機能解析を鋭意進めているところである。

野外環境において、宿主の遺伝子発現パターンと病原菌の遺伝子発現パターンが、ムギ類うどんこ病菌の感染レベルの変化に大きく依存することを突き止めることができた。2018 年の調査では、罹病葉の遺伝子発現パターンを、変化期と定常期に明確に分けることができ、変化期においては、ムギ類うどんこ病菌のエフェクター遺伝子と多くの宿主遺伝子の発現量が連動して変化していることが明らかになった。一方、2016 年は、2018 年と比較し、緩やかに感染レベルが上昇したため、罹病葉の遺伝子発現パターンを、変化期と定常期に明確に分けることはできなかった。このように遺伝子発現パターンは、年によって大きく異なるが、同一の環境下であれば、共通の遺伝子群が発現していることを示唆する解析結果も得られた。

フィールドにおけるエフェクター遺伝子の遺伝子発現量が、宿主遺伝子の遺伝子発現量に与える寄与率を評価するために、時点間の宿主遺伝子の発現量予測モデルを構築した。構築するにあたっては、機械学習とクラスタリング解析を組み合わせた Clustering-based Ensemble Regression(CER)法を提案し、感染レベル、生育ステージ毎に重要となる説明変数の変化に対応できるようにした。これによって、宿主遺伝子の発現に対するエフェクター遺伝子の重要度を評価しながら、宿主遺伝子の発現量変化と他環境要因の関係をモデル化することが可能になった。

(2) 詳細

研究テーマ A「感染安定期における網羅的遺伝子発現解析における防御応答ネットワークの構築」

人工気象器を用いた制御環境下におけるコムギうどんこ病菌と宿主植物の相互作用時における遺伝子発現動態を明らかにするために、温度 20 度、12 時間明期、12 時間暗期という制御された条件下で、RNA-seq による接種 10 日後の罹病葉の網羅的遺伝子発現解析を実施した。日周変動するコムギうどんこ病菌エフェクター様遺伝子を特定し、その多くは、21 時から 0 時までの間に遺伝子発現が上昇し、その後、減少することを突き止めた。温度 10 度、28 度環境下でも同様の実験を実施したが、エフェクター様遺伝子の日周変動が観察され、温度変化に頑健であることが明らかになった。更に、そのような日周変動が、うどんこ病菌と宿主相互作用時において、どのタイミングで起こるのかを評価するために接種してから 7 日間にわたり 3 時間毎に罹病葉のサンプリングをおこない RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、感染直後からエフェクター様遺伝子の日周変動が開始されることが明らかになった。これら日周変動するエフェクター様遺伝子と宿主遺伝子の遺伝子発現量に基づく時系列間の類似度を相互相関関数で評価し、これらエフェクター様遺伝子と類似した時系列遺伝子発現動態を示す宿主遺伝子を特定した。そして、相互相関関数に基づき、これらエフェクター様遺伝子と宿主遺伝子の関係性をネットワークとして捉えることに成功した。

研究テーマ B 「フィールドにおけるバイオマーカー遺伝子の遺伝子発現モデル」

宿主が異なる複数のムギ類うどんこ病菌に感染できるコムギ近縁野生種 *Aegilops umbellulata* の超罹病性系統 KU-4017 を野外環境に植え、野外のムギ類うどんこ病菌に自然感染させた。標徴(肉眼で観察できる葉面上に展開するうどんこ病菌の菌糸)が、確認できる2月下旬より罹病葉を採取し、mRNA と全 DNA を抽出した。BrAD-Seq 法 (Townsend, Convington, Ichihashi et al. 2015)による RNA-Seq を実施した。罹病葉には、病原菌と宿主由来の RNA が含まれているので、RNA-Seq によって、宿主と病原菌の双方の遺伝子発現量を網羅的に測定することが可能である。ムギ類うどんこ病菌のアクチン遺伝子由来の DNA 量を全 DNA を鋳型にした qPCR 法によって測定することにより、採取した罹病葉 DNA の中に含まれるムギ類うどんこ病菌の DNA 量を推定した。この量は、採取した罹病葉におけるムギ類うどんこ病菌の感染レベルとみなすことができる。

感染レベルの変化は、年によって異なるが、上昇傾向であり、宿主植物が枯死する前に最大になる。気温、植物齢も同様に正の方向に動くが、多次元尺度法による解析によって、感染レベルは、気温と植物齢から明確に分けられ、気温と植物齢だけでは、感染レベルの変化を捉えることはできない。このことは、気温と植物齢だけでは、感染レベルの変化を完璧に予測できないことを示唆する。

ムギ類うどんこ病菌は、無性生殖によって増殖するが、宿主植物が枯死する前に、有性生殖を行い、閉子のう殻をつくる。有性生殖の際には、二つの異なる Mating type (雄と雌に相当する)が必要である。3年間のフィールド実験で、2016 年のみ閉子のう殻が観察された。その原因を探るために、罹病葉から抽出した DNA を鋳型にした qPCR 法によって、Mating type を決定している遺伝子のアレル頻度を求めた。その結果、2016 年のみ2つの異なるタイプのアレルが中間頻度で検出され、2017 年と 2018 年は、どちらかの異なるタイプのアレルしか検出できなかった。これにより、フィールド環境下において、Mating type の両アレルの存在と有性生殖との関連が明らかになった。

主成分分析により、宿主と病原菌の遺伝子発現動態は、感染レベルに強く影響されることが明らかになった。感染レベルによって罹病葉における全体の遺伝子発現動態を変化期と定常期に分けることができる。変化期において、エフェクター遺伝子と多くの宿主遺伝子の発現量が連動して変化していることが2018年のフィールド研究によって明らかになった。2018年においては、感染レベルが急激に上昇し、その後、感染レベルが飽和し、枯死するまで大きな変化がなく、変化期と定常期が明確に別れた。一方、定常期においては、宿主遺伝子と病原菌エフェクター遺伝子の発現量の変化は、連動する傾向よりもむしろ独立する傾向にあった。宿主遺伝子において、変化期では、防御応答関連遺伝子の発現量の変化が検出されるが、定常期では、むしろ老化に関わる遺伝子の発現量の変化が検出された。定常期と変化期を分けるバイオマーカーとなりうる宿主遺伝子を特定した。一方、2016 年は、2018 年と比較し、緩やかに感染レベルが上昇したため、罹病葉の遺伝子発現パターンは、変化期と定常期に明確に分けることはできなかった。このように遺伝子発現パターンは、年によって大きく異なるが、共発現する遺伝子群の遺伝子構成に変化はなかった。このことは、野外では、気温、光、湿度といった環境要因とうどんこ病菌の感染からくるストレス強度は、時事刻々と変化するた

め、月単位で見ると遺伝子発現パターンに共通性を見出すことはできないが、同じストレス強度下で比較すれば、年が異なっても、宿主植物は、必要な遺伝子群を発現させ、ストレスにตอบสนองしていることを示唆している。

機械学習の手法によって、環境要因から時点間の遺伝子発現量変化を予測するモデルを構築した。気温、湿度、日照時間、日の出、日の入り、植物齢、感染レベルを説明変数にし、時点間の宿主遺伝子の発現量変化を目的変数にした。そして、ランダムフォレストによるモデルによって宿主遺伝子の時点間の遺伝子発現量を予測することを可能にした。また、それぞれの遺伝子の遺伝子発現量変化モデルにおける環境要因の重要度を明らかにすることができた。

研究テーマ C 「統合モデルの構築」

制御された環境下で構築したネットワークモデルとフィールドにおけるバイオマーカー遺伝子の遺伝子発現モデルを統合する予定であったが、制御された環境とフィールドにおける宿主遺伝子と病原菌遺伝子の発現動態が必ずしも一致しないため、当初提案していた方法とは異なるやり方で、エフェクターが標的因子に与える防御応答ネットワークへの寄与率を予測する方法を構築することにした。そこで、2016 年からの 3 年間のフィールドでの網羅的遺伝子発現データのみを使用して、エフェクターの遺伝子発現変化が、宿主遺伝子の遺伝子発現変化に及ぼす影響を機械学習の手法で評価する方法を開発した。宿主遺伝子のネットワークとして評価できないが、CER を提案することで、時点間、生育ステージ毎に重要となる説明変数の変化に対応させることができた。CER は、前処理として分割基準変数によって学習データのクラスタリングをおこない、各クラスに特化した予測モデルを構築する。エフェクターの遺伝子発現による宿主遺伝子の発現変化の重要度を推測するために、環境要因に加え、説明変数にエフェクター遺伝子の発現量を導入し、弱学習器に決定木又は Random forest を用いた。これによって、宿主遺伝子の発現に対するエフェクター遺伝子の重要度を分析しながら、宿主遺伝子の発現と他要素の複雑な関係をモデル化することが可能になった。

3. 今後の展開

本研究によって、フィールドにおける宿主植物とムギ類うどんこ病原菌に相互作用の鍵となる宿主遺伝子と病原菌遺伝子候補を明らかにした。現在、これらの遺伝子の実際の機能を解明する実験を実施している。特に機械学習によって推定されたエフェクター遺伝子の重要度がどれくらい実際の宿主遺伝子の発現量変化に影響されているのかを実験的に評価する必要がある。

2018 年の野外サンプルについては、アブシジン酸とサリチル酸量の季節変化を調べた。その結果、これら植物ホルモンと感染レベル、遺伝子発現パターンとの間に関連性が明らかにされた。今後は、遺伝子発現量変化だけでなく、植物ホルモン量を測定することで、多面的に野外における植物と病原菌の相互作用を調べていくつもりである。更に、野外研究に用いた野生近縁種 *Ae. umbellulata* の超罹病性系統 KU-4017 と圃場抵抗性系統 KU-4043 の組換え自殖系統と準同質遺伝子系統を作出しており、遺伝解析と本研究で得られた野外トランスクリプトームデータを組み合わせることにより圃場抵抗性遺伝子の単離を目指す。また、*Ae. umbellulata* と二粒系栽培コムギ *Triticum durum* を交雑して合成 6 倍体を作出しており、パンコ

ムギと交配させることにより、圃場抵抗性を導入したパンコムギを作出することで、ムギ類うどんこ病菌に頑健なパンコムギを作る予定である。

4. 自己評価

研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)については、さがけフィールド植物制御と情報協働栽培の研究者と共同研究することで、自分一人ではできない研究成果が得られたことは大きく、さがけのバーチャル研究所というコンセプトを十分に活かすことができたと思っている。具体例をあげると、当初は、実験室での制御された環境下における罹病葉の網羅的遺伝子発現解析を実施し、少数の遺伝子でフィールド研究を行う予定であったが、同じフィールド植物制御の市橋研究者が開発した BrAD-Seq 法によって、フィールドにおいても網羅的遺伝子発現解析が可能になった。また、さがけ情報協働栽培の峰野研究者との共同研究によって、フィールド環境における複雑な遺伝子発現変化のモデル化を実現することができた。ただ、非モデル植物でかつフィールド環境での研究ということで、当初想定していた以上に困難を伴い、多くの時間をゲノム情報の整備と遺伝子導入実験による遺伝子機能評価に時間を割かざるを得なかった。1 年次、2 年次、4 年次は、研究技能員と一緒に実験を進めることができたが、3 年次は、一人で実施したため、フィールドサンプリングと RNA-seq ライブラリーの作成に追われ、思ったように研究を進めることができなかったことから、研究実施体制に問題があった。また、最終年度も、フィールド調査を実施したために、さがけ研究期間の最終年度前半までに論文として研究成果を発表できなかった点も反省すべき点である。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、本研究は、フィールドにおける植物病原菌と宿主植物遺伝子の分子レベルの相互作用を長期間にわたって、遺伝子発現量を指標にして観察した研究であるため、実験・解析手法について肯定的、否定的両面で今後のフィールドにおける植物—病原菌相互作用研究の一つの基準になると考えている。コムギとムギ類うどんこ病菌におけるハイスループットな遺伝子機能解析手法が確立することを目指しているが、この手法が確立されれば、本研究で特定したバイオマーカー遺伝子の機能を評価することができ、ゲノム編集等を用いた病害抵抗性コムギ作出へつながると考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Moeko Okada, Kentaro Yoshida*, Ryo Nishijima, Asami Michikawa, Yuka Motoi, Kazuhiro Sato, Shigeo Takumi. RNA-seq analysis reveals considerable genetic diversity and provides genetic markers saturating all chromosomes in the diploid wild wheat relative *Aegilops umbellulata*. BMC Plant Biology. 2018, 18:271

*corresponding author

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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. 吉田健太郎、溝尾直子、市橋泰範、植村亜衣子、宅見薫雄 コムギへの Breath Adapter Directional sequencing (BrAD-Seq)法の適用 日本育種学会第 130 回講演会 2016 年 9 月 25 日, 鳥取 |
| 2. 吉田健太郎 DNA・RNA が刻む病原菌と植物＋人の攻防 NGS 現場の会 2017 年 5 月 24 日, 仙台 |
| 3. 吉田健太郎 The diary of a filamentous pathogen in field. Plant biotic interaction workshop, 2017 年 8 月 11 日, China |
| 4. 吉田健太郎 トランスクリプトームで記述する植物－絶対寄生菌の相互作用 第1回 植物インフォマティクス研究会 東京 2018 年 9 月 10 日 |

「柿」から紐解く植物の「性」の進化

赤木 剛士（京都大学 大学院農学研究科・助教）

研究課題名：「カキ属をモデルとした環境応答性の性表現多様化機構の解明」 研究期間：2015.12～2019.3

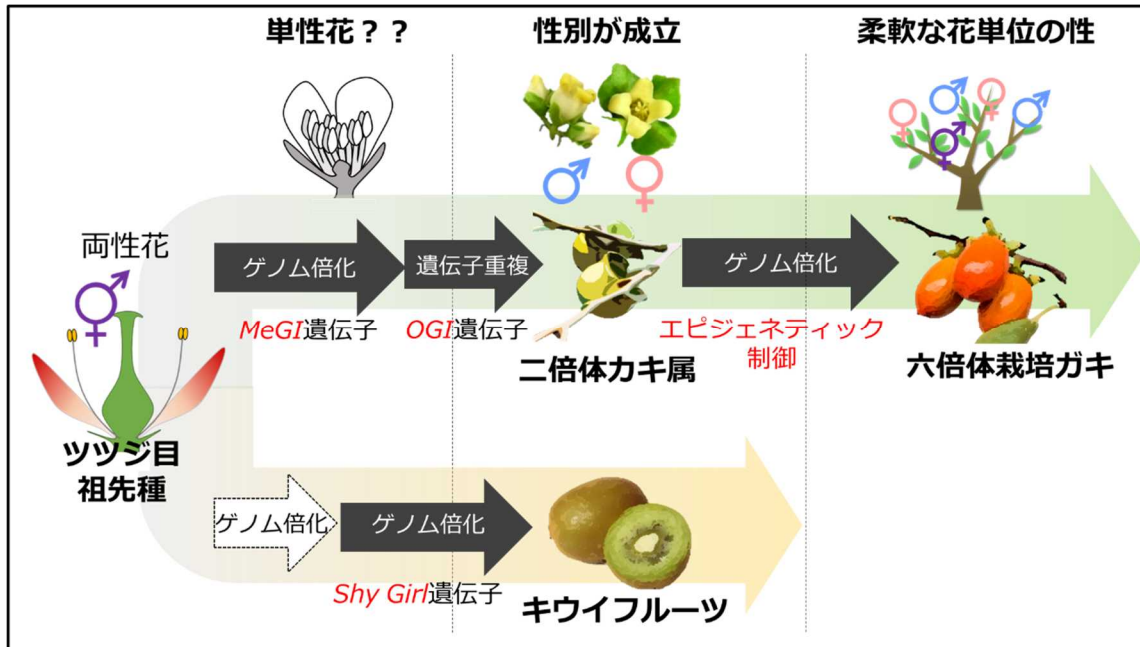


図 カキ・キウイフルーツにおける性表現と進化と新しい遺伝子・制御の成立

カキとキウイフルーツは同じツツジ目に含まれ、両全性の共通祖先から進化していますが、それぞれの種が、独自のゲノム倍化・遺伝子重複を起点として新しい性別決定遺伝子を手に入れました。さらに、私たちが食べている「柿(栽培ガキ)」では、性別決定遺伝子へのエピジェネティック制御を進化させて、揺らぎを持つ性表現を成立させました。

植物はその多くが両性花のみを着花しますが、いくつかの植物は独自に様々な性別・性表現を進化させてきました。しかし、その進化を司る遺伝子やその仕組みはこれまで 100 年以上も謎に包まれていました。そんな中つい最近になって、植物の性別決定遺伝子が、日本人にはなじみの深い「柿」において初めて発見されました。本研究では、この「柿」や、同じくツツジ目に含まれるキウイフルーツが、どのようにして様々な性表現を成立させてきたのかについて研究を進めてきました。その結果、それぞれの種に特異な歴史的ゲノム倍化や遺伝子重複が鍵となって種に独自の遺伝子進化が起こっていることや、エピジェネティック制御と呼ばれる DNA への修飾によって性表現に揺らぎをもたらしている仕組みが明らかになりました。これらの知見から、植物の性決定が潜在的に多様であることが分かり、今後、人為的に性表現を改変する技術も開発されてくるでしょう。

論文

1. Akagi T., et al., Science. 2014, 346, 6209, 646-650
2. Akagi T., et al., Plant Cell. 2016, 28, 2905-2915
3. Akagi T., et al., Plant Cell. 2018, 30, 780-795
4. Henry I. and Akagi T., et al., Ann Rev Plant Biol. 2018, 69, 553-575

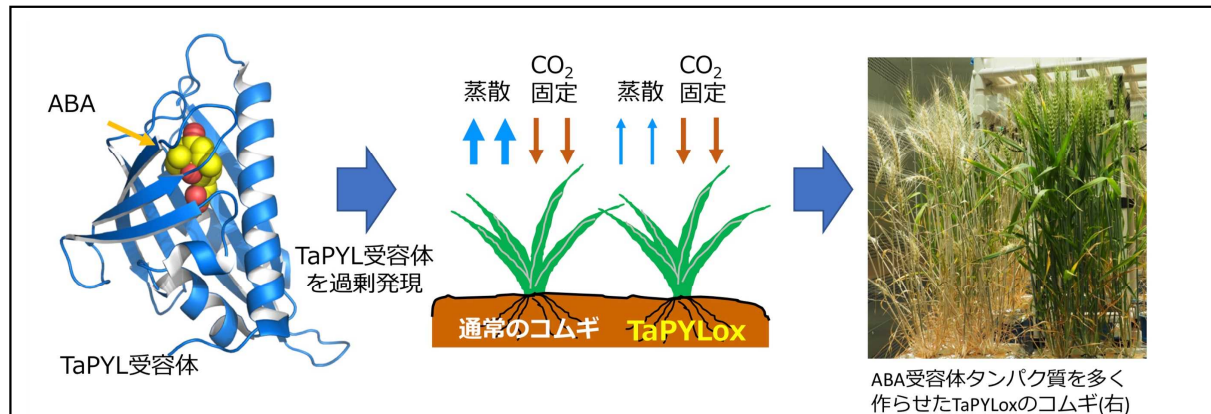
プレスリリース

1. 「キウイフルーツの性別決定遺伝子を発見～植物が「性別」を獲得した進化過程の解明～」(2018 年 4 月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20180406/index.html>

干ばつに強く、水を節約して育つコムギの開発

岡本 昌憲（宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター・助教）

研究課題名：「化学遺伝学的手法を利用した乾燥ストレス適応型作物設計」 研究期間：2015.12～2019.3



アブシシン酸(ABA)の受容体(TaPYL)を過剰発現させた節水型耐乾燥性コムギの特性

植物の乾燥ストレス応答に重要な役割を果たすアブシシン酸(ABA)を受容する受容体(TaPYL)を植物体で多く作らせるように操作したコムギ(TaPYLx)は、葉からの蒸散量は低下するが、光合成による CO_2 の固定効率は低下しないため、少ない水でも枯れずに、種子生産が可能な節水型耐乾性の性質を示した。

近年の気候変動による砂漠化などの乾燥地の拡大は、農作物の生産性低下の主要因となっており、世界で増え続ける人口を養うための食糧の生産と確保が懸念されています。コムギは先進国だけでなく、経済発展に伴ってアフリカなどの発展途上国でも需要が増加しています。そのため、将来にわたって世界的な食糧の安定供給を実現するには、乾燥地でも育つ耐乾性に優れたコムギを開発することが急務となっています。

植物ホルモンの一つであるアブシシン酸(ABA)は植物の耐乾性に関与することが知られています。ABAを受容する受容体は陸上植物に普遍的に存在することから、耐乾性作物の開発においてABA受容体の利用が有効であると考えました。そこで、コムギからABA受容体(TaPYL)の遺伝子を見つけ出し、その受容体タンパク質を植物体内に多く蓄積（過剰発現）することができるコムギ（以下、TaPYLx）を世界で初めて開発することに成功しました。その結果、TaPYLxは、水やりを止めて水分欠乏状態にしても、通常のコムギよりも萎れにくく、期待通りに耐乾性を示しました。この耐乾性の形質は葉からの蒸散量が抑制された結果に依存するものですが、驚くべきことに、光合成効率は

低下していませんでした。このことは、水消費量あたりの光合成効率が高いことを意味しています。そこで、通常コムギが枯れて種子が十分にできないような少量の水で栽培したところ、今回開発したコムギ TaPYLx は最後まで種子を生産し、「節水型耐乾性」の能力を獲得したことが明らかとなりました。

本研究成果は、降水量が少ないために耕作が困難であった乾燥地や干ばつが多発する地域における食糧生産の切り札になることが期待されます。

>>参考情報

> 論文

1. Mega R., et al.. *Nature Plants* Vol5, p153-159 (2019)

> 受賞

1. 「2016 高被引用論文著者」(2016)
2. 「2017 高被引用論文著者」(2017)
3. 「文部科学大臣表彰若手科学者賞」(2017)

> プレスリリース

1. 「干ばつに強く、水を節約して育つコムギの開発に成功」(2019年2月)

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190209/index.html>

鍵と鍵穴の改変で植物の機能を自在に制御

萩原 伸也（理化学研究所 環境資源科学研究センター・チームリーダー）

研究課題名：「植物ホルモン受容の可視化技術」 研究期間：2015.12～2019.3

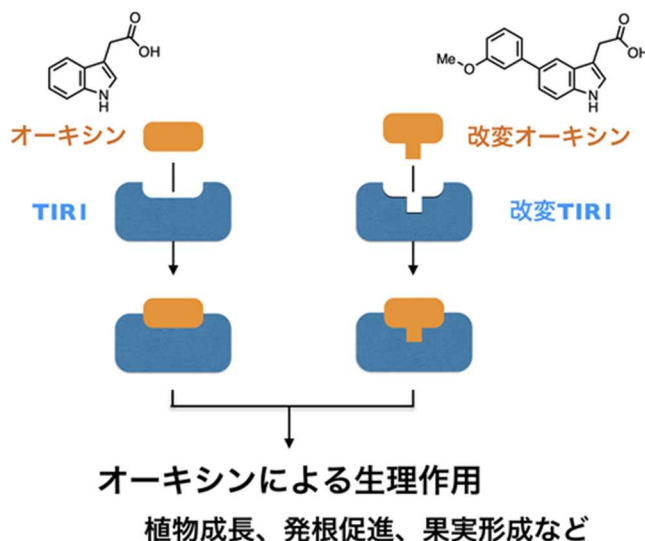


図 改変オーキシシンと改変受容体 TIR1 を用いた植物の生理機能制御

改変オーキシシンは、改変 TIR1をもつ細胞や器官でのみ、オーキシシンと同じ作用を引き起こす。植物体内でのオーキシシンののはたらきは多種多様で解析が困難だが、この仕組みを使うと TIR1 を介したオーキシシンの作用を明確にできる。また、改変 TIR1の発現場所を制御することで、部位特異的な作用を引き起こすことができる。

植物は、自身の成長を制御するための信号物質として様々な分子を用いています。こうした分子群は、植物ホルモンと呼ばれており、それぞれ特定のタンパク質(受容体)に結合することで生理作用を引き起こします。植物ホルモンと受容体の関係は鍵と鍵穴の関係に例えられ、それぞれの植物ホルモンは極めて選択的に各受容体に認識されます。我々は、植物ホルモンの一つ「オーキシシン」とその受容体「TIR1」の構造を改変し、新しい鍵と鍵穴を作ることによって、植物の生理機能を自在に制御する仕組みを開発しました。

この方法を用いることで、これまで曖昧にされてきた TIR1 の関わる植物の生理機能を明確にできました。また、オーキシシンは着果促進効果をもちますが、副作用を避けるため花にだけオーキシシンをスプレーする必要があります。我々の手法を用いると、オーキシシンの作用を部位特異的に制御することが可能で、植物全体に噴霧しても副作用無く果実形成を誘導できると考えられます。

>>参考情報

➤ 論文

1. Shinya Hagihara, et al., *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **2018**, 47, 32-37.
2. Keiko U. Torii, et al., *New Phytologist*, **2018**, 220, 417-424.
3. Ryotaro Yamada, et al., *Plant Cell Physiol.*, **2018**, 59, 1538-1544.
4. Matyáš Fendrych, et al., *Nat. Plants.*, **2018**, 4, 453-459.
5. Naoyuki Uchida, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **2018**, 14, 299-307.

➤ 受賞

1. 「三島海雲学術賞」(2018)

➤ プレスリリース

1. 「有機化学と合成生物学を駆使して植物ホルモンの作用をハイジャック ～化学の力でダーウィンの見つけた植物の運動の謎に迫る～」(2018年1月)

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2018/01/bump-and-hole.php>