

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.