

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 世代にまで伝わるのがわかった。

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事がわかった。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.,

<p>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.</p>
<p>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.</p>
<p>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.</p>

(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)