

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「二酸化炭素資源化を目指した
植物の物質生産力強化と生産物活用のための
基盤技術の創出」
研究課題「エピゲノム制御ネットワークの理解に基づく
環境ストレス適応力強化および有用バイオマス産生」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者氏名：関 原明
(国立研究開発法人理化学研究所
環境資源科学研究センター、
チームリーダー)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

我々のチームは、環境ストレス適応におけるエピジェネティックな制御機構の解明を通して環境ストレス適応力や物質生産力に関与する新規な制御ネットワークを発見し、さらにそのネットワークを活用することにより、環境変化に強く有用バイオマスを生産する植物の創出法の開発を目指して、3つのグループ(理研、農研機構、理科大)が連携して研究を進めた。理研グループは、環境ストレス耐性に関与するシロイヌナズナのエピゲノム制御因子や化合物[エタノール、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤など]を新たに約20個同定し、農研機構グループは理研グループにより得られたシロイヌナズナの知見をイネで検証し、理科大グループはイメージング解析システム(Mintbody、植物透明化手法 TOMEI など)を開発し本研究に活用した。本研究で開発した技術の幾つかに関して、国内外の研究機関や民間企業と連携しながら研究を進めた。

乾燥・塩などのストレス耐性に関与するエピゲノム制御因子(ヒストン脱アセチル化酵素 HDA6、HDA19 など)を同定し機能解析を行った(理研、農研機構、理科大)。通常条件下では HDA6 の結合により酢酸合成系遺伝子が抑制状態にあり、乾燥ストレス刺激を受けると HDA6 が酢酸合成系遺伝子領域から乖離することで、酢酸合成系遺伝子領域でヒストンアセチル化を伴うクロマチンの活性化を生じる。これにより、酢酸合成系遺伝子の転写が促進され、解糖系を介した糖代謝経路の流れが、ピルビン酸からアセトアルデヒドを経て酢酸の合成へ向かう反応経路に変わり、酢酸が産生し植物に乾燥耐性を付与する(理研)。シロイヌナズナ、イネ、キャッサバの HDA6 に関して、理科大グループが開発した TOMEI を使用して時空間特異的発現パターンを明らかにした(理科大、農研機構)。12 個のヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤がシロイヌナズナやキャッサバにおいて塩ストレス耐性を付与することを発見した(理研、理科大)。そのうち、Ky-2 は、ナトリウムイオンの排出に機能する *SOS1* 遺伝子を活性化し、塩排出能の向上により耐塩性が強化されることを明らかにした。HDAC 阻害剤の作用機序を解明するため遺伝学・生化学的な解析を進め、*hda19* 変異体が塩ストレスに加え乾燥、高温ストレスに対しても耐性を示すことを見出し、一方で、クラス II HDAC(*HDA5/14/15/18*)の4重変異体が塩・乾燥ストレスに対して感受性を示すことを見出した。4重変異体で H2B のアセチル化が強く誘導されていること、この H2B の脱アセチル化は HDA15 が主要制御因子であることを明らかにし、クラス間(HDA19 はクラス I)で見られた相反するストレス応答の基盤に、異なるヒストン修飾サイトを利用したストレス応答制御機構が存在するものと予測された(理研)。

酢酸前処理による乾燥ストレス耐性付与がシロイヌナズナ以外にイネ、コムギ、トウモロコシ、ナタネ、キャッサバにおいても有効であることを実証した(理研、農研機構、理科大)。シロイヌナズナでは酢酸処理により導管液の pH が上昇し、ヒストンのアセチル化やジャスモン酸応答経路遺伝子が活性化され、乾燥ストレス耐性が付与されることを明らかにした(理研、理科大)。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析から酢酸のトランスポーターを初めて同定した(理研)。イネでは 根端でジャスモン酸シグナルを抑制する因子 RSS3 の変異体が乾燥ストレス耐性を示すことを見いだした(農研機構)。RSS3 とイネの HDA6 ホモログ(HDA705)が直接結合することを明らかにした(農研機構)。イネの HDA705 がストレス応答性遺伝子近傍に存在する反復配列の CHH メチル化に抑制的に働くことを明らかにした(農研機構)。エタノールが耐塩性(シロイヌナズナ、イネ)、乾燥耐性(シロイヌナズナ、トウモロコシ、イネ)、高温耐性(シロイヌナズナ、サニーレタス)を付与することを明らかにした(理研、農研機構、理科大)。エタノール処理により活性酸素種が除去され耐塩性が強化されることを見出した(理研、農研機構)。葉の画像から植物の乾燥ストレス耐性を評価する手法を開発し、乾燥ストレス耐性の評価に活用した(理科大、農研機構)。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害剤である FSL0260 で処理することによりミトコンドリア代替呼吸経路が活性化され、活性酸素の蓄積が抑制されることにより耐塩性が強化されることを明らかにした(理研)。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 概要:

酢酸による乾燥ストレス耐性付与がシロイヌナズナ以外に、世界の主要作物であるイネ、コムギ、トウモロコシ、バイオ燃料の原料として活用されているナタネ、重要なデンプン資源作物であるキャッサバにおいても有効であることを実証した。酢酸生合成を活用した新規乾燥耐性機構は植物界に広く保存されており、シロイヌナズナではヒストン脱アセチル化酵素 HDA6 により制御され、酢酸によりヒストンのアセチル化やジャスモン酸応答経路遺伝子が活性化され、乾燥ストレス耐性が付与されることを明らかにした。

2. 概要:

環境ストレス応答制御におけるHDACアイソフォーム間での機能分担について詳細な解析を進め、クラスII HDAC 4 重変異体 (*hda5/14/15/18*) が塩・乾燥に感受性、*hda19* 変異体が塩・乾燥・高温に耐性を示すことを明らかにした。*hda5/14/15/18* では H2B のアセチル化が強く誘導されていることや、H2B の脱アセチル化は HDA15 が主要制御因子であることも見出した。本研究により、植物で初めてH2Bアセチル化による遺伝子発現制御機構の存在を明らかにした。

3. 概要:

エタノールが耐塩性(シロイヌナズナ、イネ)、乾燥耐性(シロイヌナズナ、トウモロコシ、イネ)、高温耐性(シロイヌナズナ、サニーレタス)を付与することを明らかにした。エタノール処理により活性酸素種が除去され耐塩性が強化されることを見出した。エタノールによる高温耐性付与に関しても解析を進め、エタノールが熱ショック転写因子 HsfA2 を介して耐性を強化する可能性が示唆された。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 概要:

酢酸生合成を利用した新規乾燥耐性機構、エタノール合成を利用した新規塩・乾燥・高温耐性機構、が植物界に広く保存されていることを明らかにした。ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が塩耐性付与に有効であること、種々のエピゲノム制御因子の変異体が塩や乾燥に耐性または感受性を示すことを明らかにした。上記阻害剤・変異体の研究やケミカルスクリーニングからストレス耐性に関与する新規な遺伝子・代謝産物(FSL0260 など)を同定した。それらを活用したストレス耐性植物作出法の開発を進めた。

2. 概要:

植物の組織や器官をまるごと透明化する方法 TOMEI (Transparent plant Organ Method for Imaging)を開発した。TOMEI は1日以内に透明化を終了する世界最速の透明化技術であり、作物の深部組織の細胞数や細胞体積を解析できることから国内外に大きなインパクトを与えた。様々な農作物のバイオマス定量解析に適用可能であり、独創的なイメージング技術として位置づけられる。(株)東京化成工業によるTOMEIキットの国内・米国販売が開始され、実用化された。

3. 概要:

モバイルコンピュータと軽量スキャナを用いて、圃場等の自然光下で生育する作物(イネ、トウモロコシ、ダイズなど)の葉を非破壊的に撮像して、画像解析により葉色や環境ストレス耐性を定量的に評価する技術を確認し、特許出願を行った。出願特許について民間企業一社と実施許諾契約を締結し、製品化に向けた更なる技術改良を進めるとともに、生産現場における検証実験を行った。さらにスキャナを用いない簡便な葉色補正法を新規開発し、特許出願に向けた技術改良を進めた。

<代表的な論文>

1. Kim, J.M., To, K.T., Matsui, A., Tanoi, K., Kobayashi, N.I., 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, A.T., Kuromori, T., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Torii, C., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Ogihara, Y., Saito, K., Shinozaki, K., Devoto, A. and **Seki, M.** (2017) Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. **Nature Plants** 3: 17097.
2. Ueda, M., Matsui, A., Tanaka, M., Nakamura, T., Abe, T., Sako, K., Sasaki, T., Kim, J.M., Ito, A., Nishino, N., Shimada, H., Yoshida, M. and **Seki, M.** (2017) The distinct role of RPD3-like histone deacetylases between class I and II in salinity stress response. **Plant Physiol.** 175:1760-1773.
3. Nguyen, H.M., Sako, K., Matsui, A., Suzuki, Y., Mostofa, M.G., Ha, C.V., Tanaka, M., Tran, L.S.P., **Habu, Y.** and **Seki, M.** (2017) Ethanol enhances high-salinity stress tolerance by detoxifying reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* and rice. **Front. Plant Sci.** 8: 1001.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「関」グループ

- ・研究代表者: 関 原明 (国立研究開発法人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)
- ・環境ストレス耐性に関与するシロイヌナズナのエピゲノム制御因子の同定および機能解析
- ・エピゲノム操作や酢酸などの化合物の活用などによるストレス耐性植物作出法の開発

② 「土生」グループ

- ・主たる共同研究者: 土生 芳樹 (国立研究開発法人農業・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)
- ・ストレス耐性関連エピゲノム因子のイネホモログの機能解析
- ・シロイヌナズナで見出されたストレス耐性植物作出法のイネでの検証

③ 「松永」グループ

- ・主たる共同研究者: 松永 幸大 (東京理科大学理工学部 教授)
- ・エピゲノム制御のイメージング定量解析
- ・環境ストレス耐性植物の定量評価解析

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

理研グループ:

- ・同定した化合物や遺伝子の活用による環境ストレス耐性植物の開発に関して民間企業や国内外の研究機関との打ち合わせ・連携の検討を進めた。
- ・酢酸の吸収後活性化されるヒストンのアセチル化およびジャスモン酸のシグナル伝達経路に関して、ジャスモン酸受容体 *COII* の変異体を用いた解析をロンドン大学 Alessandra Devoto 准教授と連携して進めて論文発表した。
- ・酢酸による乾燥ストレス耐性付与のコムギにおける応用に関して、横浜市立大学木原生物学研究所・川浦香奈子准教授と連携して進めて論文発表した。

- ・塩ストレス耐性付与の分子機構の解析に関して、東京農業大学・太治輝昭教授および理研環境資源科学研究センター(CSRS) 生産機能研究グループ・井藤賀操上級研究員と連携して研究を進め、論文発表した。
- ・SAHAによるキャッサバへの塩ストレス耐性付与の分子機構の解析に関して、タイ・マヒドン大学理学部・Jarunya Narangajavana 助教授と連携して進めて論文発表した。
- ・耐塩性付与する新規化合物の探索に関して、理研 CSRS ケミカルバイオロジー研究グループ・長田裕之グループディレクターと連携を進めた。環境にやさしい耐塩性化合物の探索を目指して、理研 CSRS ケミカルバイオロジー研究グループ・清水猛上級研究員に新規化合物を合成して頂き耐塩性の評価を進めた。
- ・FSL0260 の機能解析に関して東京薬科大学・野口航教授と連携研究を進めた。
- ・環境ストレス耐性付与する HDAC 阻害剤の同定および HDAC によるアセチル化修飾を受ける新規のタンパク質とその修飾サイトの同定に関して、理研 CSRS ケミカルゲノミクス研究グループ・吉田稔グループディレクター、伊藤昭博専任研究員、理研 CSRS 生命分子解析ユニット・堂前直ユニットリーダーらと連携研究を進めて論文発表した。
- ・孔辺細胞での HDAC の機能解析に関する連携研究を名古屋大学理学研究科・木下俊則教授と進めた。
- ・作成したシロイヌナズナのエピゲノム制御因子の破壊ラインを用いた新たな共同研究を国内の研究グループと進めた。
- ・CREST 共催シンポジウムなどを積極的に開催し、我が国における環境ストレス適応・エピゲノム制御・バイオマス分野の研究ネットワークを強化した。

農研機構グループ:

- ・酢酸によるイネ乾燥ストレス耐性獲得過程での植物内および導管液中の化学物質組成変化、外来性の酢酸の代謝産物同定、および土壌微生物由来の有機酸による作物のストレス耐性付与に関して、京都大学農学部化学生態学研究室・森直樹教授と連携研究を進めている。
- ・根のジャスモン酸シグナルによるイネ乾燥ストレス耐性機構に関して、ジャスモン酸シグナルの生成機構とその実用利用の可能性について、名古屋大学農学部植物細胞機能研究分野・武田真准教授と連携研究を進めている。
- ・画像解析による乾燥ストレス耐性評価法について、農研機構・次世代作物研究センターの石本政男ユニット長らと共同でダイズ病害抵抗性の定量解析に応用した方法を確認し、農林水産省技術会議主催のワークショップで民間企業・大学・地方自治体の研究者に毎年紹介している。
- ・農研機構グループ・東京理科大グループが開発した画像解析による乾燥耐性評価法(特許出願済)に関して、民間企業と実施許諾契約を締結し、製品化に向けた更なる改良を進めている。

理科大グループ:

- ・TOMEI の市場投入に向けて、東京化成工業(株)と製品化を目指して販売戦略に関して連携しキット化して販売した。
- ・TOMEI による細胞体積定量や画像解析・画像分類による植物のバイオマス測定に関して、理化学研究所・白須賢ディレクターと連携研究を進めた。
- ・植物の土壌ストレス応答を制御するエピジェネティクス因子の解析に関して、東京大学農学部・藤原徹教授と連携研究を進め、論文発表を行った。
- ・植物のシュート形成を促進するエピジェネティクス因子の解析に関して、東京大学理学部・角谷徹仁教授と連携研究を進めた。
- ・蛍光イメージングによる植物バイオマス定量に関して、名古屋大学農学部・伊藤正樹准教授と連携研究を進めた。
- ・ヒストン修飾ライブイメージングに関して、東京工業大学・木村宏教授と連携研究を進めて論文発表を行った。