

## 研 究 報 告 書

### 「フィールドオミクスによる野外環境応答の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 永野 惇

#### 1. 研究のねらい

主たる農業生産の場であり、植物本来の生育場所である野外では、温度や光などが複雑に変動する。このような環境下で植物はどのように環境に対して応答しているのか？また、その応答はどのような遺伝的基盤によって支配されているのか？これらは未だ手つかずの問題である。一方、これまで分子生物学では、環境応答に関する膨大な知識が蓄えられてきた。しかし、それらは単純な実験室環境で得られた知見であるため、そこから野外での応答を推し量ることは難しい。そのため、分子生物学的な知識に基づいて候補遺伝子を選定し、導入する分子育種において、実験室での結果から期待されるパフォーマンスが実際の野外環境下では発揮されないという問題がしばしば起こっている。

そこで本研究では、野外での環境応答をそのまま捉え、理解するための方法として、“フィールドオミクス”を確立・発展させることを目指した。具体的には、野外で収集された大量のトランスクリプトームデータと気象データ(気温や日射量、降水量など)の統計モデリングによる統合を行う。これによって得られたモデルやパラメータを用いた解析から、遺伝子発現が、複合的に変動する野外環境や体内時計、植物の齢にどのように影響されているのかを明らかにする。さらに、前述の統計モデリングと量的遺伝学を融合させた手法を開発することで、野外環境応答の遺伝的基盤を明らかにする。同時に、これによって得られた遺伝子型情報を含んだモデルやパラメータを用いることで、任意の時刻、環境条件、遺伝子型におけるトランスクリプトームをシミュレーションすることを可能とする。最先端の生命科学と情報科学を用いて、野外と実験室のギャップを埋める本研究は、実験室で蓄積された知見を現実の問題解決に繋げるための基盤となる。なお、当初の計画ではトランスクリプトームに加え、メタボロームも対象として含んでいたが、研究資源を集中し成果を最大化するために、本研究ではトランスクリプトームを中心として進めることとし、メタボロームに関しては予備的な調査にとどめた。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、まず、野外トランスクリプトームデータと気象データとを統計モデリングにより統合的に解析する手法(フィールドオミクス)を開発し、野外におけるイネの葉のトランスクリプトーム変動における体内時計、環境要因、日齢の影響を定量的に明らかにした。さらにフィールドオミクスに量的遺伝学を組み合わせるための基盤技術の開発と概念実証を進めた。実験上の基盤技術として、大幅に多検体化・低コスト化した RNA-Seq ライブラリ調製手法を確立し

た。さらに、rRNA の選択的分解法をとりいれ、野外サンプルでしばしば見られるような分解を受けた RNA でも頑健に定量を行うことを可能とした。一方、データ解析上の基盤技術として、従来法を約 1000 倍高速化したプログラムを開発し、R のライブラリ(FieldTranscriptome3)として整備した。これらの基盤技術を用いて、イネを材料とした実証研究を行った。日本晴/コシヒカリ CSSL、BIL、コシヒカリ/タカナリ CSSL を 2013、2014、2015 年度に圃場で栽培し、合計約 4000 の葉サンプルを採集した。このうち、まず、日本晴・コシヒカリ CSSL 約 1000 サンプル分のトランスクリプトームデータを取得し、気象データと合わせて統計モデリングを行った。その結果、少数の遺伝子が品種間で異なるパラメータをもつことがわかった。今後は、CSSL の各系統のジェノタイプを考慮した解析を行うことで、品種間のパラメータの違いの原因と考えられるゲノム領域の特定と、トランスクリプトームの設計が可能になると考えられた。

並行して、野外での複雑な変動を再現しつつ高度にコントロールが可能な PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)を開発した。SmartGC では PC から、7 波長の高輝度 LED をそれぞれ独立に 0.1 秒ごとに 1000 段階の調光制御が可能であり、また温度、湿度は 1 分間隔で制御できる。この SmartGC を用いて野外で見られたなだらかな気温・光変化を再現したところ、トランスクリプトームの変化を野外で見られたものに近づけることが出来た。この結果は、光、気温を高度に制御することで、植物にとっての野外環境をある程度再現することが可能であり、野外と実験室の違いをもたらす大きな要因の一つは光、気温の変化パターンであるということを示している。

以上の研究から、野外環境における植物の遺伝子発現の環境応答の実態解明に近づくとともに、予測・設計する技術の確立に向かって前進できたと考えられる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「QTL 集団を利用した野外トランスクリプトームの遺伝学的基礎の解明」

野外トランスクリプトームデータと気象データとを統計モデリングにより統合的に解析する手法(フィールドオミクス)を開発し、イネの葉で発現する遺伝子の 97%について、野外での遺伝子発現における体内時計、気温など環境要因、日齢の影響を定量的に明らかにした(Nagano *et al.*, 2012, *Cell* 誌に掲載)。この研究はイネの標準系統である日本晴のみを対象としたモデルとなっており、遺伝的に異なった系統では何が起こるのかを予想することは難しい。そこで量的遺伝学とフィールドオミクスを組み合わせることで、遺伝子型をモデルに組み込むことを目指して技術開発を行った。

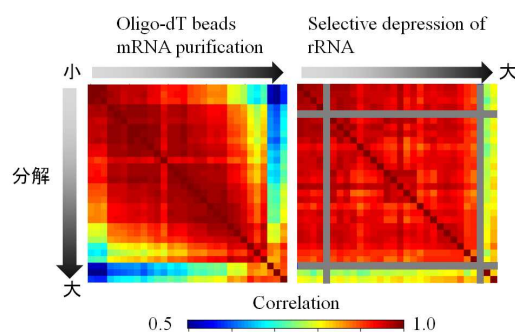
必要な基盤技術の一つとして、野外から得られた大量のサンプルから低コストかつ頑健にトランスクリプトームデータをを得る技術がある。そのためにまず、RNA-Seq の多検体化・低コスト化に取り組んだ。反応の小ボリュウム化や、3D プリンタなどを用いて独自に改造した機器を用いた磁気ビーズ精製の自動化など、様々な工夫を組み合わせることによって、大幅な多検体化・低コスト化を実現した。また、野外サンプルでしばしば unavoidable RNA の分解が、トランスクリプトームの定量に与える影響を実験的に検証したところ、従来のオリゴ dT ビーズによる mRNA 精製を用いた方法では影響が大きいことが確認された。そこで、耐熱性 RNaseH を用い

た rRNA の選択的分解法をとりいれ、分解を受けた RNA に対しても頑健な定量を可能とした(右図、Nagano *et al.*, 2015, **Methods in Molecular Biology** 誌に掲載)。さらにこの方法を応用し、イネの葉で特に高発現する数遺伝子の mRNA を選択的に除去することで、それ以外の大抵の遺伝子をより精度良く定量可能とする手法を確立した。

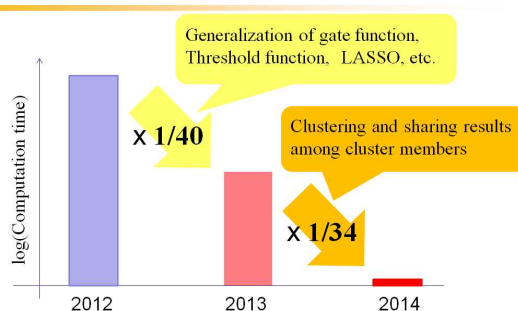
もうひとつの基盤技術として、トランスクリプトームデータと気象データとの統計モデリングがある。従来法では、非常に大きな計算時間を要していた。このままでは、そこにさらに遺伝子型データを加えた統計モデリングを行った場合、現実的な時間内に終了させることは出来ない。そこで、統計モデリングを行うプログラムの改良に取り組んだ。これまでに、LASSO 法、Affinity propagation によるクラスタリングの併用、コードのリファクタリングなどによって、従来の 1000 倍以上の高速化が可能となった(右図)。高速化したプログラムは R のライブラリ(FieldTranscriptome3)として、2015 年度中の公開を目指して準備中である。さらに従来法とは全く異なったアプローチでの解析手法の検討も行った。具体的には、最近、自然言語処理の分野で注目されているトピックモデルと呼ばれる手法が RNA-Seq データの解析にも適用可能であることを示した。従来法とトピックモデルの結果を比較したところ、それぞれ得意とする発現パターンが異なっていることが分かった。このことから、両者を併用することでより精度の高い発現予測が可能となると考えられる。

開発した基盤技術を用いてコンセプトの実証を行うためにイネを用いた研究を行った。日本晴/コシヒカリ CSSL、BIL、コシヒカリ/タカナリ CSSL を 2013、2014、2015 年度に圃場で栽培し、合計約 4000 の葉サンプルを取得した。このうち、まず、日本晴・コシヒカリ CSSL 約 1300 サンプルに集中し解析を進めることとした。これらのサンプルを用いて、前述した低コスト・多検体 RNA-Seq により約 1000 サンプル分のトランスクリプトームデータを得た。このトランスクリプトームデータ、気象データとこれまでに開発・高速化してきた統計モデリングプログラムを駆使して、日本晴背景、コシヒカリ背景、それぞれについての気象-トランスクリプトームモデリングを行った。その結果、日本晴とコシヒカリのそれぞれについて大部分の遺伝子についてモデリングを行うことが出来た。両品種のモデル・パラメータを比較したところ、少数の遺伝子が品種間で異なるパラメータをもつことがわかった。今後は、CSSL の各系統のジェノタイプを考慮した解析を行うことで、品種間のパラメータの違いの原因と考えられるゲノム領域の特定と、トランスクリプトームの設計が可能になると考えられた。

rRNAの選択的分解法を用いると  
分解に対して頑健に定量出来る



フィールドオミクスに必要な統計モデリングを  
約1000倍の高速化した



## 研究テーマ B「野外トランスクリプトーム、野外メタボロームにおける生物学的ノイズ」

フィールドオミクスによって、体内時計や気温など様々な要因の遺伝子発現への決定論的な影響に加えて、個体間での確率的な揺らぎ(生物学的ノイズ)の大きさを定量することが可能となった。生物学的ノイズの大きさと遺伝子機能の関連を調べたところ、内膜輸送など基本的な細胞機能に関わる遺伝子では生物学的ノイズが小さく、二次代謝など病虫害防御に関わる遺伝子では生物学的ノイズが大きいことが分かった。これらの結果をもとに非線形物理を専門とする栗津暁紀博士らと共同研究を進めたところ、多細胞植物では遺伝子発現の環境応答の大きさと生物学的ノイズの間に幅広く相関があることが明らかとなった(Hirao et al., 2015, **Journal of Theoretical Biology** 誌に掲載)。この結果は多細胞組織における遺伝子発現の揺らぎに関するある種の帰無仮説を与えるという意味で重要である。

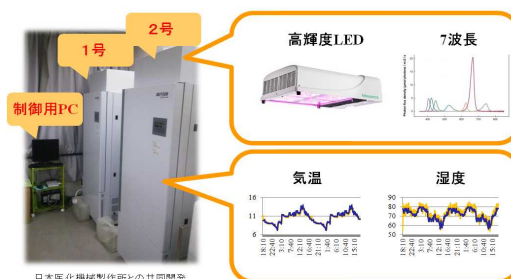
野外メタボロームの予備的解析として、約 100 サンプルからなる日周のメタボロームデータを取得し、解析を行った。その結果、トランスクリプトームと比較して、メタボロームでは気象、体内時計時刻によって規定される決定論的と思われる変動が小さく、個体間の生物学的ノイズが大きいことが明らかになった。非常に大きな生物学的ノイズが見られることそれ自体が興味深いことである。なぜメタボロームにこれほど大きな生物学的ノイズがあるなかで、圃場で見られるように均一な生育を示すのか、今後取り組むべき重要な問題が得られたことは成果といえる。

## 研究テーマ C「PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)の開発と野外環境再現」

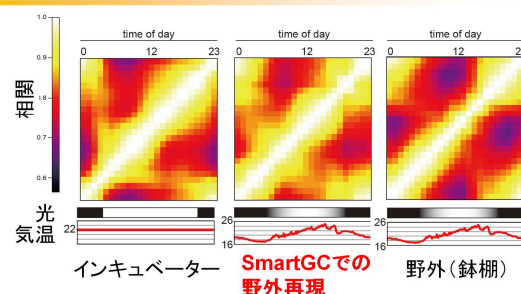
野外と実験室は植物にとって互いに異なった環境であることは明らかである。しかしながら、その違いが何によってもたらされているか、はこれまで明らかにされていない。この疑問に答えることは、野外と実験室のそれぞれから得られたデータの統一的な解釈のために極めて重要と考えられた。そこで、野外での複雑な変動を再現しつつ高度にコントロールが可能な PC 制御高機能グロースチャンバ(SmartGC)を開発した(右上図)。SmartGC では制御用 PC に設定したプログラムに従って、7 波長の高輝度 LED をそれぞれ独立に 0.1 秒ごとに 1000 段階の調光制御が可能であり、また温度、湿度は 1 分間隔で制御できる。

一般的なインキュベーターでの条件、野外(鉢棚)条件、SmartGC を用いて気温・光を野外に似せて変化させた条件で栽培を行

温度、光、湿度を高度にコントロールできる  
SmartGCを開発した



SmartGCによって  
野外のトランスクリプトームの  
日周変動に近いパターンが得られた





い、日周のトランスクリプトーム変化を測定した結果を示す(前項、右下図)。インキュベーター条件下では、朝、暗から明に切り替わったタイミングで急激なトランスクリプトーム変化が見られた。一方で、SmartGC を用いて野外で見られるような自然な気温・光変化を再現したところ、トランスクリプトームの変化を野外で見られた自然なものに近づけることが出来た。これらの結果は、光、気温を高度に制御することで、植物にとっての野外環境をある程度の水準で再現することが可能であり、野外と実験室の違いをもたらす大きな要因の一つは光、気温の変化パターンであるということを示している。

### 3. 今後の展開

本研究では、フィールドオミクスに関連する様々な基盤技術を整えることが出来た。加えて、SmartGC を開発し、野外環境をある程度再現しながら実験を行うことを可能にした。今後はこれらを活用して、野外環境における植物の遺伝子発現の環境応答の実態解明、予測・設計する技術の確立を進めて行きたい。また、本研究ではいくつか基礎生物学的に重要と思われる発見もあった。そのひとつに遺伝子発現における生物学的ノイズと環境応答性の関係がある。前述したように、この結果は多細胞組織における遺伝子発現の揺らぎに関するある種の帰無仮説を与えるという意味で重要である。今後はこれをもとに、遺伝子発現における生物学的ノイズが生物の環境応答においてどのように影響しているのかについても、研究を深めて行きたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、植物の野外環境応答の解明のために、フィールドオミクスの確立とその量的遺伝学との融合を目指した研究を行った。そのための基盤技術として、多検体・低コスト RNA-Seq システムの開発、統計モデリングのためのプログラムの高速化・高度化を行った。これらの基盤技術については、いずれも当初必要と考えたスペックを達成することが出来た。実証研究のためには、圃場での多数のサンプルの取得が必要となる。3 シーズンで合計 54 セットの 24 時間サンプリングという過酷なサンプリングを完了出来たのは、研究補助者、アルバイト、農業生物資源研究所圃場、京大農学部高槻圃場の様々な方々に協力いただいたことのおかげであったと考える。この場を借りて感謝の意を示したい。多検体・低コスト RNA-Seq の安定稼働が遅れたことなどから、実際のサンプルからまとまった量のデータが得られたのが研究期間の後半になってからであった。そのため、野外トランスクリプトームの系統間差の原因となるゲノム領域の絞り込みや、その結果を用いた設計まで十分に時間が取れなかった点は残念であった。しかしながら、サンプル、解析技術は揃っているため、今後も解析を続けることで近日中に最終的な結果を得られる見込みである。本研究の先にある野外トランスクリプトームの予測・設計を行う技術と、並行して開発しているトランスクリプトームから形質の予測を行う技術を組み合わせることで、将来的には野外環境下での植物の環境応答の予測・設計を行う技術の確立へとつなげていきたい。

研究テーマ A で確立した多検体・低コストな次世代シーケンスライブラリ調整システムを用

いて、RNA-Seqだけでなくゲノムワイド SNP 解析で用いられる RAD-Seq のライブラリも効率的に作成できるようになった。これらの技術をもちいた共同研究として、領域内では CREST の堤グループに技術移転を行ったことをはじめ、内藤健さがけ研究者、藤本龍さがけ研究者のサンプルの分析を行った。領域外も含めると、植物、動物、菌類問わず様々な生物種を対象とする研究者から、2013 年度は約 5000 サンプル、2014 年度以降は毎年 10000 検体以上のペースで RAD-Seq 解析を請け負っている。共同研究を通じて、様々な研究者と交流し、様々な研究に触れることが出来たことが自分にとって良い経験であったとともに、多くの研究に貢献できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

永野氏は、実験室と野外での実験環境の違いによる植物生育の状況のギャップを科学的に理解するために、フィールドオミックスという手法を導入し、野外環境下での気象条件などの環境要因と、トランスクリプトームなどのオミックス解析のデータを関連付け、ある環境下での発現パターンなどを予測できるモデルの構築を目指した。その結果永野氏は、膨大な試料について RNA-Seq にあらたな方法を導入し、統計モデリングの高度化に成功した。また、野外環境での遺伝子発現を再現しうる植物培養装置の開発などにも成功した。こうした成果は高く評価される。さらに永野氏は、本領域内の研究者ネットワークの形成や、多くの共同研究などを通じて、本領域に大きく貢献してきた。永野氏には、植物科学に新しい領域を開いていく研究者として、今後のいっそうの進展を期待したい。永野氏は、あらたな CREST の新規プロジェクトに採択されていることは、その中で、本さがけの研究成果をさらに大きな研究として、発展させて行く機会が与えられたものであり、期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hirao K, Nagano AJ, and Awazu A, Noise-plasticity correlations of gene expression in the multicellular organism *Arabidopsis thaliana*., **Journal of Theoretical Biology**, (2015) 387:13-22
2. Kubota S, Iwasaki T, Hanada K, Nagano AJ, Fujiyama A, Toyoda A, Sugano S, Suzuki Y, Hikosaka K, Ito M and Morinaga S, A Genome Scan for Genes Underlying Microgeographic-Scale Local Adaptation in a Wild Arabidopsis Species., **PLoS Genetics**, (2015) 14:11(7):e1005361.
3. Ushio M, Yamasaki E, Takasu H, Nagano AJ, Fujinaga S, Honjo NM, Ikemoto M, Sakai S and Kudoh H, Microbial Communities on Flower Surfaces Act as Signatures of Pollinator Visitation., **Scientific Reports**, (2015) 5: 8695.
4. Nagano AJ, Honjo MN, Mihara M, Sato M and Kudoh H, Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq, **Methods in Molecular**

*Biology*, (2015) 1236: 89-98.

(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)

- 4つの国際会議、31の国内会議・学会での招待講演を行った。
- 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2014.4)を受賞した。
- 「データ科学の発展と植物科学との融合」ワークショップ(2014.11)を企画した。
- 大規模生物現象研究会の立ち上げに参加した。
- さきがけ研究をきっかけに数理工学、非線形物理学、統計学の専門家との本格的な共同研究を始めることが出来た。
- さきがけ研究者交流会で知り合った宇野毅明准教授(情報学研究所)を起点として、情報科学の研究者との交流のきっかけを得ることが出来た。