

# 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、GER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。GER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、各クラスタ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倍体を作成しており、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、さき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、さき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、さき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、さき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ブ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   |