

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明
と応用に向けた基盤技術の創出」
研究課題「野外環境と超並列高度制御環境の統合
モデリングによる頑健性限界の解明と応用」

研究終了報告書

研究期間 2015年12月～2021年3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究代表者：永野惇
(龍谷大学 農学部、准教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、野外環境と制御環境における遺伝子発現の統合的理解と、トランスクリプトームの介した形質予測のための基盤技術の確立を目指した。

まず基盤技術として、永野グループを中心として、多検体 RNA-Seq の新規手法 (Lasy-Seq) や、少ないリード数から精度よく発現を定量するための手法 (nesage) を確立し、数千検体のトランスクリプトームデータをルーティンに取得可能となった。また、大川グループを中心として、イネのコシヒカリ/タカナリ染色体断片置換系統を大規模に圃場で栽培し、栽培期間を通じて毎週、2時間おき 24 時間の日周サンプリングを実施した。これらのサンプルを前述の手法で解析し、6 シーズン分、9000 サンプル以上の野外トランスクリプトームデータを取得した。永野グループで、これらのデータと気象データから、独自に開発したライブラリ (FIT) によって気象-トランスクリプトーム間の回帰モデルを得た。さらに、このモデルによって、学習に用いていない時点、地点、遺伝子型のトランスクリプトームを予測可能であることを示した。また、新規に開発された迅速光合成測定装置 (MIC-100) を用い、大川グループで 3 シーズンの生育期間網羅的光合成測定を行い、15000 データ点以上のガス交換の測定値を得た。これらの光合成の測定値と、FIT による予測トランスクリプトームデータから、時期、系統の違いによる光合成の違いを予測できることを示した。

一方、渡邊グループでは、多条件の温度、光を並列に制御できるグロースチャンバシステムを開発した。温度条件に関しては、周辺温度マイナス 15°C~プラス 15°C の範囲で制御が可能であり、光条件に関してはイネの生育に十分な光量の出力を可能とした。9 ユニットある LED ユニットの種々の波長のものに交換することで波長特性の変更も可能な設計になっている。また、庫内にセンサー接続用コネクタを 54 個有しており、温度、湿度、光量、土壌水分、CO₂ などのセンサーを接続することで庫内の環境を精密にモニタリングすることが可能である。このグロースチャンバを用いて、永野グループ、渡邊グループで共同して、様々な明期温度、暗期温度、日長の組合せの 73 条件における日周トランスクリプトームデータ、約 1000 サンプル分を取得した。このデータと、野外圃場で得たトランスクリプトームデータを用いて、それらの両方を学習に用いた時に、環境データからトランスクリプトームを予測する精度が向上するか、検討を行った。その結果、適切なデザインで取得した野外データと制御環境データを組み合わせることで、より少ない学習サンプル数でより頑健な予測が可能なモデルが得られることが分かった。

また、令和元年度から野田口グループが参加し、小型迅速診断デバイスの開発を行った。小型流体操作装置と専用の診断用マイクロ流体チップの開発を行い、植物破碎液から複数種の miRNA を同時に迅速・高感度に検出できることを示した。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け、6 か月間研究期間を延長し、新潟県上越市において、コシヒカリ、タカナリなどの系統を栽培し、光合成測定、トランスクリプトーム解析を行った。これらのデータを用いて、初期成育時の低温環境における予測精度の検証を進めた。

以上のような開発した技術をもとに、将来的には、遺伝的最適化、栽培管理の最適化の両方を同じスキームの上で行う実用技術へと発展していくことが期待される。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

Awazu A, Tanabe T, Kamitani M, Tezuka A, Nagano AJ, (2018) Broad distribution spectrum

from Gaussian to power law appears in stochastic variations in RNA-seq data, **Scientific Reports**, 8(1): 8339

概要:

フィードバックループを持つ確率的な転写制御ネットワークの単純なモデルから導出されるガウス-パワー混合分布を提案した。また、シロイヌナズナを用いて、8条件、各21~27反復のRNA-Seqデータを取得し、それらを解析することで、ガウス-パワー混合分布が実際にRNA-Seqデータの生物学的反復における誤差の分布を良く説明することを示した。ガウス-パワー混合分布を用いることで、反復の誤差分布から各遺伝子の発現制御ネットワークのトポロジカルな情報の取得が可能であることが期待される。

2.

Kashima M, Sakamoto RL, Saito H, Ohkubo S, Tezuka A, Deguchi A, Hashida Y, Kurita Y, Iwayama K, Adachi S, Nagano AJ (2021) Genomic basis of transcriptome dynamics in rice under field conditions, **Plant and Cell Physiology**

概要:

イネのコシヒカリ/タカナリ染色体断片置換システムを用いて、栽培シーズンを通じた約1000サンプル分の野外トランスクリプトームデータを取得し、気象データ・遺伝子型データと合わせて解析することで野外環境下における遺伝子発現変動の系統間差を説明するゲノム領域を多数同定した。また、気象データ・遺伝子型データから任意の時点、遺伝子型におけるトランスクリプトームを予測するモデルを開発した。

3.

Adachi, S., Tanaka, Y., Miyagi, A., Kashima, M., Tezuka, A., Toya, Y., Kobayashi, S., Ohkubo, S., Shimizu, H., Kawai-Yamada, M., Sage, RF., Nagano, AJ., Yamori, W. (2019) High-yielding rice Takanari has superior photosynthetic response under fluctuating light to a commercial rice Koshihikari. **Journal of Experimental Botany** 70(19), 5287-5297.

概要:

多収性イネ品種タカナリは、日本の標準品種であるコシヒカリに比較して変動光条件下における光合成応答が鋭敏であることを示した。さらに経時的な葉のガス交換測定、クロロフィル蛍光測定、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析の融合により、タカナリは光に応答した速やかな気孔開口、速やかな電子伝達効率の上昇、そしてRubiscoの速やかな活性化によって、優れた光合成応答を示すことを明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

特開 2018-139043, トピックモデルを用いた遺伝子情報推定装置, 岩山幸治, 永野 惇 (2017)

概要:

トピックモデルの一種であるNeSAGE (Negative-Binomial Sparse Additive Generative Model)を開発した。RNA-Seqデータに代表されるような次世代シーケンスによるオミクスデータのもつ、負の二項分布に従う誤差、スパース性などの統計的性質を織り込んだモデルになっている。そのため、少ないリード数のデータからでも精度よく真のシグナルの値(例えばRNA-Seqの場合は発現量)を推定することが可能となった。

2.

特開 2020-150937, cDNA の製造方法, 鹿島誠, 永野 惇 (2019)

概要:

植物体を破碎したライセートから直接逆転写を行う手法を開発した。高濃度の DTT を含むバッファを用いてライセートを調製することで、植物内在の RNase の活性を阻害しつつ、逆転写酵素の活性を維持できることが分かった。これによって、RNA 抽出のコストを削減しつつ、精製した RNA を用いた場合と同様の精度で RNA-Seq ができた。このバッファを用いると、ゼブラフィッシュや酵母など他の生物種でもライセートからの直接逆転写が可能となることを確認している。

3.

特願 2019-190996, 植物物質検出用流路チップおよび植物物質検出装置, 野田口理孝, 川勝弥一 (2019)

概要:

植物の生体内 small RNA およびタンパク質を簡易検出するシステムを開発した。植物の粗抽出液を泳動し、その内部に含まれる標的分子を固相化プローブにより検出する領域を持つマイクロ流体チップと、マイクロ流体チップの送液操作を自動で行うための送液操作装置からなるシステムである。複数の検体、複数の標的分子を一度に扱うことができるシステムであるため、短い時間(2 時間程度)で高効率に植物検体を解析することが可能となった。

<代表的な論文>

1.

Iwayama K, Aisaka Y, Kutsuna N, Nagano AJ (2017) FIT: Statistical modeling tool for transcriptome dynamics under fluctuating field conditions., **Bioinformatics**, btx049

概要:

トランスクリプトームと気象の統合モデリングのための世界初の R パッケージ “FIT” を作成し、CRAN から公開した。Nagano et al., (2012) Cell で使用したモデルを、adaptive LASSO や変分ベイズを取り入れて改良し、パッケージとして整備した。このアルゴリズム上の改良とコードのリファクタリングなどによって、モデリングに必要な計算時間を一般的な PC で実行可能なレベルまで大幅に削減できた。

2.

Nagano AJ, Kawagoe T, Sugisaka J, Honjo MN, Iwayama K, Kudoh H, (2019) Annual transcriptome dynamics in natural environments reveals plant seasonal adaptation, **Nature Plants**, 5, 74-83

概要:

ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* subsp. *gemifera*) の野生集団を用いて、年周トランスクリプトーム (2 年間、毎週測定) と、春分、夏至、秋分、冬至の日周トランスクリプトームをおよそ 1000 検体の RNA-Seq により明らかにした。さらに約 1 年間のグロースチャンバ実験によって、トランスクリプトームにみられる年周性は主として気温の変化によって引き起こされること、日長と気温の年周性にみられる 1.5 か月の位相ズレに植物が適応していることなどを明らかにした。

3.

Kamitani M, Kashima M, Tezuka A, Nagano AJ, (2019) Lasy-Seq: a high-throughput library preparation method for RNA-Seq and its application in the analysis of plant responses to fluctuating temperatures, **Scientific Reports**, 9 (1), 1-14.

概要:

バルクのトータル RNA に対してサンプルインデックスを持つプライマで逆転写を行うことで、容易に多検体の RNA-Seq ライブラリの作成が可能となるプロトコルを確立した。このようなプレプール型プロトコルでは、PCR 中のテンプレートスイッチによってリードの由来するサンプルの誤判定率が高まる可能性があるが、本研究で開発したプロトコルではポストプール型のライブラリと同等の誤判定率であることを確認した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 永野グループ

研究代表者: 永野 惇 (龍谷大学農学部、准教授)

研究項目

- ・全体の統括
- ・要素技術開発 (多検体 RNA-Seq、気象-系統-発現モデル、環境制御ポット)
- ・統合解析手法開発 (野外-制御環境の統合モデリング、発現時系列からの形質予測)
- ・実証研究 (植物工場での二次代謝制御、圃場での収量関連形質の予測、頑健性限界の解明)

② 渡邊グループ

主たる共同研究者: 渡邊 博之 (玉川大学農学部、教授)

研究項目

- ・要素技術開発 (環境制御ポット)
- ・実証研究 (植物工場での二次代謝制御、頑健性限界の解明)

③ 大川グループ (2017 年 9 月まで齊藤大樹 (京都大学) が主たる共同研究者、2017 年 10 月から 2019 年 9 月まで安達俊輔 (東京農工大) が主たる共同研究者)

主たる共同研究者: 大川 泰一郎 (東京農工大学大学院農学研究院、教授)

研究項目

- ・要素技術開発 (気象-系統-発現モデル)
- ・実証研究 (圃場での収量関連形質の予測、頑健性限界の解明)

④ 野田口グループ (2019 年 4 月から追加)

主たる共同研究者: 野田口 理孝 (名古屋大学 生物機能開発利用研究センター、准教授)

研究項目

- ・小型迅速診断デバイスの開発

(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

CREST 領域内の他チームや関連さきがけ領域の研究者から、多数の RNA-Seq 解析を引き受けている。

複数の企業と RNA-Seq のデータ解析に関する共同研究を開始した。