

# 研 究 報 告 書

## 「野外の生物群集ネットワークを利用した植物の動態予測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 潮 雅之

### 1. 研究のねらい

本研究のねらいは、メカニズムが複雑/未知な系での植物形質の変化を高精度に予測するため、圃場生態系の生物群集情報と新規な時系列解析法 (Empirical Dynamic Modeling; EDM) を組み合わせた研究枠組みを確立することである。本研究は野外の実験水田生態系を対象として、(A) 環境 DNA 分析によるイネを取り巻く生物群集の網羅的かつ高頻度な時系列データの取得、(B) 非線形時系列解析による相互作用ネットワークの再構築、(C) ネットワークに基づいた動態予測とイネに影響する生物の特定、の3つのステップからなり、さらに A～C までは成功した場合には (D) 統計予測に基づいたイネ動態の野外制御実験、を行う。

まず、水田生態系での植物を取り巻く生物群集の時系列データを環境 DNA 分析法を用いて網羅的・効率的に取得する。次に取得した時系列データに対して、時系列解析の革新的なツールとみなされつつある EDM の枠組みを適用し、圃場の生物種間の因果関係ネットワークを描く。生物種間の因果関係の検出には、EDM の中でも特に Convergent Cross Mapping と呼ばれる手法を用い、因果が検出された種の組み合わせに対しては多変数 S-map 法によって相互作用強度を定量する。これらの解析によって、注目する植物の形質を制御する相互作用ネットワークの再構築を行う。最後に、描かれた生物群集のネットワークをもとに、イネに影響をもつ生物の情報を利用してイネの動態 (成長速度など) の予測の高精度化を達成する。また、イネ以外のどのような生物がイネ (の形質) に影響を及ぼすのかをネットワークの情報を利用して予測し、その予測に基づいてイネ動態の野外での制御を試みる。

本研究では全体を通して、圃場生態系はその支配原理が明らかではなく、農作物がそのような系の一要素として挙動しているという概念のもとで研究を行う。その概念のもとで、環境 DNA 法と EDM を高度に統合し、変動環境下での作物の成長・病気発生などの予測を高精度に行うための枠組みを確立し、その制御を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

研究期間内に野外の実験水田生態系を対象として、以下の4つの研究を実施した: (A) 環境 DNA 分析を利用した水田生物群集の網羅的・高頻度な時系列データの取得、(B) 非線形時系列解析によるイネー生物間の相互作用ネットワークの再構築、(C) ネットワークに基づいた動態予測とイネに影響する生物の特定、(D) 統計予測に基づいたイネ動態の野外制御実験。成果の概要は以下の通りである。

(A): まず、環境 DNA 分析による水田生物群集の網羅的かつ高頻度のモニタリングを達成するために効率的なサンプル採集および DNA 抽出の手法開発を行った。開発した方法を用いて 2017 年 5 月 23 日～9 月 22 日の間、実験水田から 1 日 1 回の頻度で環境 DNA サン

ブルの採集とイネの成長率の測定を行った。その結果、実験水田に生育する 1196 種の生物とイネの成長速度の時系列が取得できた。

(B): 得られた 1196 種の生物とイネの時系列データを非線形時系列解析の1種である Empirical Dynamic Modelig (EDM) で解析した。まず、EDM の中でも2変数間の因果関係を検出する手法である Convergent Cross Mapping で生物間の因果関係を検出し、その後 S-map 法により1日毎に変化していく生物間相互作用の強さの定量を行い、イネを取り巻く生物群集の相互作用ネットワークを再構成した。

(C): 再構成したネットワークを解析し、野外環境でイネに影響を与える生物を特定した。特定された生物の内、10 種は種レベルで確からしい同定ができ、かつ真核生物であり培養や単離を経て野外での操作に利用できる可能性があった。また、ここで検出されたイネに影響を与える生物の時系列動態をイネの動態予測に組み込むことで、イネの動態予測の精度が向上した。

(D): (A)~(C) までの研究を受け、2019 年度に野外でのイネの成長操作実験を試みた。操作を行う候補種 10 種の中からウスイロユスリカ (*Chironomus kiiensis*) と卵菌類である *Pythium nunn* を選定し、生育途中のイネに 6 月下旬に実験水田から *C. kiiensis* の除去と *Pythium nunn* の添加を行った。その後イネの成長速度と RNA 発現量を測定した結果、どちらについても野外操作実験による一定の変化が確認された。

(E): (A)~(D) までの研究成果を裏付けるため、複数の追加データを取得した。2017 年には京都府の農家水田からイネ成長データおよび環境 DNA データを、2018 年には実験水田からイネの成長データと RNA 発現データ・環境 DNA データを取得し、(A)~(D) と矛盾しない結果を得た。

## (2) 詳細

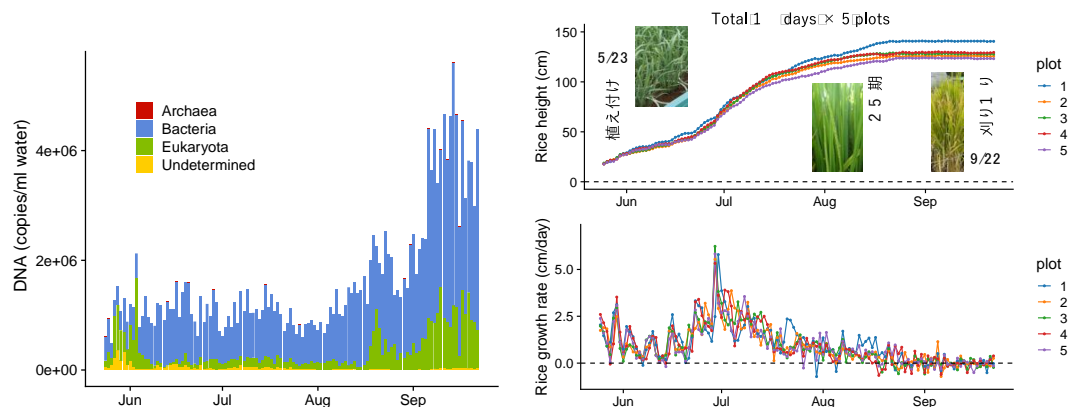
### 研究テーマ A 「環境 DNA 分析を利用した水田生物群集の網羅的・高頻度な時系列データの取得」

水中に残存する DNA を利用して生物を検出するためには、フィルターによる水のろ過とフィルター上に残った DNA の抽出が必須である。しかし、従来法では DNA 抽出における効率の低さと抽出にかかる時間が問題であった。そこで、ステリベクス (Sterivex) と呼ばれるカートリッジ型フィルターの内部に細胞組織破碎用のビーズを加えて破碎処理することで DNA 抽出効率の向上と抽出時間の短縮を試みた。海洋・湖沼・河川・池の4種類の野外生態系の水サンプルを用いて、考案した抽出法の効率を検討した結果、どの水サンプルにおいても考案手法が既存手法よりも高いパフォーマンスを示した。本結果は特許出願を行い、生態学の手法を掲載する論文で最も著名な *Methods in Ecology and Evolution* 誌で発表した (Ushio 2019)。本プロジェクトでは一貫してこの手法を採用した。

2017 年 4 月に京大生態学研究センターの実験圃場に小規模実験水田を設置した。実験水田は 90cm × 90cm、深さ 34 cm で内部に 16 個のワグネルポットを設置した (以下、プロットと呼ぶ)。1 つのワグネルポットに3個体のヒノヒカリを植えた。開発した手法を用いて 2017 年 5 月 23 日~9 月 22 日の間、1 日 1 回の頻度で 5 つの野外実験水田から水サンプルを取得した。また、同時にプロット中心のイネ4個体について草丈・SPAD をイネの成長の指標として測

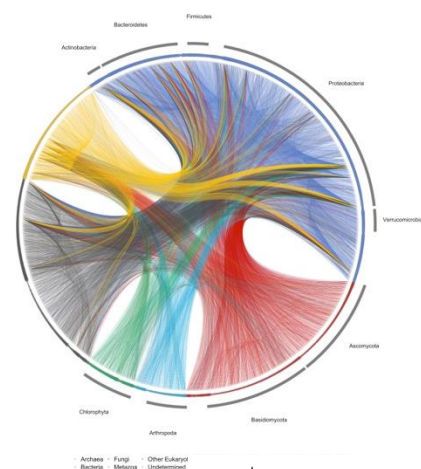
定した。環境変数については気温・相対湿度・照度を自動計測した。

122 日間にわたり 5 つのプロットをモニタリングして合計 610 サンプルを得た。それらについて、原核生物(16S rRNA)、真核生物(18S rRNA)、真菌(ITS)、動物(COI)、それぞれの解析対象 DNA 領域を増幅して生物の DNA を網羅的に解析した。その結果、610 サンプルから合計1万種を超える生物種を検出し、DNA 濃度や検出頻度を基準として時系列解析に耐えうる 1196 種を選定した。下図の左が生物群集の時系列データ、右図がイネの成長時系列データを示している。



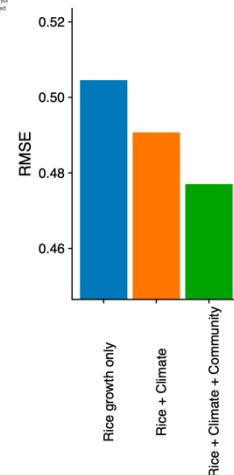
## 研究テーマ B 「非線形時系列解析によるイネー生物間の相互作用ネットワークの再構築」

得られた生物群集の網羅的・高頻度時系列データを EDM により解析した。まず、1196 種×1196 種の組み合わせで種間の因果関係を CCM により検定した (Sugihara et al. 2012 *Science*)。その結果、合計 7166 組み合わせの因果関係を検出した。それらについて多変数 S-map 法 (Deyle et al. 2016 *PRSB*) および正則化 S-map 法 (Censi et al. 2019 *Methods in Ecology and Evolution*) を適用し、一日毎に変化する相互作用ネットワークを描くことに成功した (右図: 調査期間・プロットを平均した相互作用ネットワーク。円周上に生物種が示され、線の色が因果を持つ生物の分類群を示している)。



## 研究テーマ C 「ネットワークに基づいた動態予測とイネに影響する生物種の特定」

描いた相互作用ネットワークの情報を元に、まずイネの成長動態の予測を試みた。Root Mean Square Error (RMSE) を基準にして3種類のデータセットを用いてイネの成長を EDM で予測した。用いたデータは (i) イネの成長データのみ、(ii) イネの成長データ+気象データ、(iii) イネの成長データ+気象データ+イネに因果がある生物の時系列データ、である。予測した結果、予測誤差は (iii) のデータセットを用いたときが

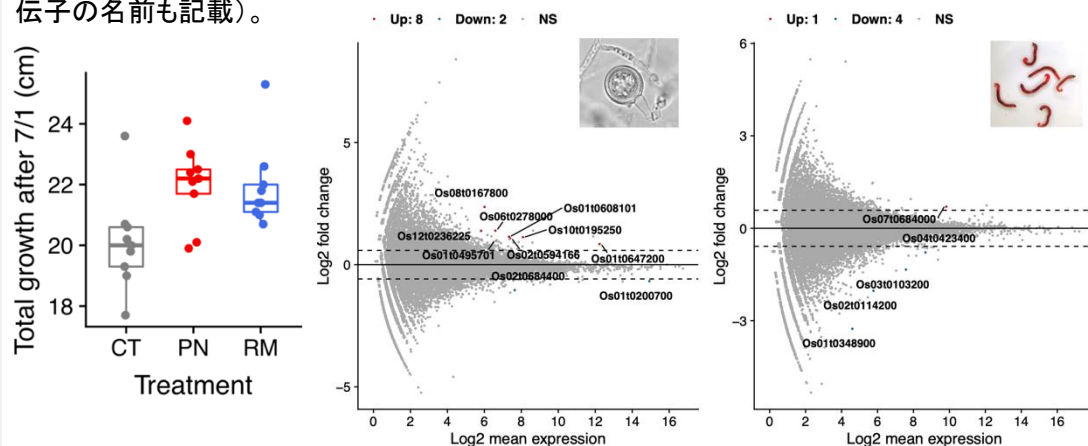


最も小さく(右図の緑色のバー)、イネや気象データに加えてイネの周りの生物群集がイネの成長予測に寄与していることが判明した。

さらに、(B)で得られた相互作用ネットワークから野外においてイネの成長に寄与している生物を特定し、その中から野外での操作実験に利用できる可能性のある種をリストアップした。真核生物10種類がリストアップされ、その中には真核微生物・緑藻・真菌・卵菌類・昆虫などが含まれた。

#### 研究テーマD「統計予測に基づいたイネ動態の野外制御実験」

(C)でリストアップされた生物種を吟味し、実際に野外操作実験で使用する種として昆虫のウスイロユスリカ (*Chironomus kiiensis*) と卵菌類の *Pythium nunn* を選定した。EDMによる予測に基づいて2019年の6月下旬、*C. kiiensis* の除去及び *P. nunn* の添加を行い、その後のイネの成長率とRNA発現量の変化を測定した。その結果、*C. kiiensis* 区と *P. nunn* 区では対照区と比べて成長が良くなった(下図の左: 操作後10日間の積算成長)。また、いくつかの遺伝子についてRNAの発現量が変化していた(下図: 中、右のパネルがそれぞれ操作実験後の *P. nunn* 区、*C. kiiensis* 区の遺伝子発現量の変化。FDR補正後に有意な変化を示した発現遺伝子の名前も記載)。



#### 研究テーマE「その他の成果」

- 生物群集がイネに影響を及ぼす経路をより詳細に調べるために2018年度に3日に1度のモニタリングを行い、イネの成長・RNA発現パターン・水田生物群集のネットワークを再構築した。ウスイロユスリカがイネRNA発現パターンに与える影響を調べたところ、2019年度の操作実験と矛盾しない結果を得ることができた。*P. nunn*は2018年度の出現頻度が低く、詳細な解析は不可能であった。
- また、今回実験水田で見られたパターンが実際の農家圃場にも適用可能かどうかを調べるために2017年に京都府の農家水田でのサンプリングも行った。長期間無施肥無農薬でも一定の収量を保っている圃場では、*Pythium*の仲間が多く、またユスリカが少ないという興味深いパターンが見られた。土壌栄養が慣行農法の圃場と比べて低いため、イネの生育と水田生物群集の関係については注意深い解析・考察が必要であるが、生物群集とイネの生育との関係を考える上で興味深いパターンであると言える。
- 2017年のモニタリングで得られた生物群集の時系列データは世界的に見ても貴重なもので



生物群集の成立過程で働くルールを調べるために利用できると考えられる。実際、イネの成長データとは独立に生物群集データを解析することで、生物群集の多様性や動態を決定するルールを発見した。また、その他、微生物の培養可能性(Ushio in press, *Ecol Res*)や生物の定着に関する観点(スタンフォード大との共同研究)からもデータ解析を進めている。

### 3. 今後の展開

今回の研究成果は、一連の「網羅的生態系モニタリング→時系列解析→野外操作実験」の枠組みが水田生態系の予測や制御において機能しうることを示している。従って、本研究で採用した研究枠組みを他の系で実施することでそれらの系の動態予測や制御が可能になる可能性がある。また、その際には近年発展が著しい植物の高スループットなフェノタイピングの技術を組み合わせるとより効果的であると考えられる。例えば、ダイズやジャガイモの畑において土壌微生物群集の定量的モニタリングと草姿草型のフェノタイピング・病徴のモニタリングを実施すれば、作物の生育状態の制御や病原菌の発生予察・制御が可能になるかもしれない。さらに、本研究枠組み「モニタリング→時系列解析→制御」は農業だけでなく、魚介類の養殖や醸造といったシステムにも適用できる可能性がある。

また、今回検出した「野外でイネに影響を与える生物群」の農業における利用可能性はさらに検証する価値があると考えている。すなわち、今回の研究で 2019 年度に検証した 2 種の生物(ウスイロユスリカと卵菌類)以外にも潜在的にイネに影響を与える生物を数十種類特定しているため、それらを添加もしくは除去するような操作実験を行うことで、新たな生物資材の発見に繋がる可能性が期待できる。

### 4. 自己評価

3年半の研究期間を通じて「網羅的生態系モニタリング→時系列解析→野外操作実験」の枠組みが水田生態系の予測において機能しうることを示すことができた。これらを考慮すると、さきがけ研究の当初のねらいであった「メカニズムが複雑/未知な系での植物形質の変化を高精度に予測するため、圃場生態系の生物群集情報と新規な時系列解析法を組み合わせた研究枠組みを確立すること」を十分に達成できたと考えている。また、当初は予定になかった「予測」の先である「野外生態系動態の制御」に関しても一定の成果を達成できた。

研究期間全体を通じた進め方としては、当初の計画を大幅に変更することなく着実に研究を実行できたと考えている。その上で追加のイネ成長動態の制御実験を行えたことは特筆に値する。また、研究費の執行に関しても無駄なく執行できたと考えている。

本研究の成果の重要性は大きく2つに分けられる。1つ目は基礎科学的な重要性であり、この点に関しては (i) 野外圃場における網羅的かつ定量的な生物群集モニタリング手法を確立したこと、(ii) 生物群集モニタリングデータから興味ある変数を制御するための枠組みを確立したこと、が挙げられる。これらの成果は今後、野外の系を対象に研究を進める農学・環境学・生態学などの領域の研究者にとって、系の理解・予測・制御を進める上で重要なマイルストーンとなり得ると自負している。実際に (i) の網羅的かつ定量的な生物群集モニタリングの手法はすでにさきがけ情報協働栽培の研究者を含めて複数人の研究者が採用しており共同研究に発展している。また、取得したデータそのものも貴重であり、これを利用した共同研究もすでに国内外の研究者と開始している。

2つ目は応用的重要性であり、この点に関しては (iii) イネの成長に圃場環境で影響しうる生物を網羅的にリスト化したこと、(iv) 「網羅的生態系モニタリング→時系列解析→操作実験」の枠組みを解析技術の特許出願を通じて社会への実装をはかったこと、が挙げられる。(iii) については今後、イネ栽培上有用な未知の生物の発見に繋がる可能性があり、(iv) については社会実装の試みを引き続き行っていく予定であり、先進的なセンシング技術と組み合わせて農生態系を含む野外の現象の高精度予測システムに繋げていければと考えている。

全体として、未経験であった農学分野・情報科学分野の領域の研究に、生態学の知識や技術を元に果敢に切り込み、一定の成果を挙げられたのではないかと考えている。また、さきがけ研究期間で得た人脈や知識が共同研究や社会実装に繋がりがつつあり、これらの点でも有意義な成果を挙げることができたと考えている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Chun-Wei Chang\*, **Masayuki Ushio\***, Chih-hao Hsieh\*. Empirical dynamic modeling for beginners. *Ecological Research* (2017) 32 pp.785–796
2. **Masayuki Ushio\***, Koichi Murata, Tetsuya Sado, Isao Nishimura, Masamichi Takeshita, Wataru Iwasaki, Masaki Miya\*. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* (2018) 8:4493
3. **Masayuki Ushio\***. Use of a filter cartridge combined with intra-cartridge bead-beating improves detection of microbial DNA from water samples. *Methods in Ecology and Evolution* (2019) 10 pp.1142–1156
4. **Masayuki Ushio\***. Idea paper: Predicting culturability of microbes from population dynamics under field conditions. *Ecological Research* (in press)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

### (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)

- ・ 2018年3月17日第22回日本生態学会 宮地賞 受賞
- ・ 2018年9月20日 IIBMP2018(生命医薬情報学連合大会)(鶴岡、山形)、招待講演、潮雅之“野外農生態系の理解・予測・制御に向けた生物群集の動態補足と時系列解析”
- ・ 2018年11月14日 The nonlinear dynamics and model-free prediction for fisheries workshop (Santa Cruz, California, USA)、招待講演、Ushio M “Analyzing multispecies ecological time series: Interaction network, dynamic stability and improving forecasting accuracy of system dynamics”
- ・ 2019年5月13日 11<sup>th</sup> Asian Society for Microbial Ecology (台中、台湾)、招待講演、Ushio M “Quantifying dynamic stability of microbial communities under field conditions using DNA time series and empirical dynamic modeling”
- ・ 2019年12月3日 第42回分子生物学会(博多、福岡)、招待講演、潮雅之“環境DNA時系列データに基づいた生物群集ネットワークの再構築: 生物多様性の決定機構に迫る”