

平成 31 年 5 月 1 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06171

研究課題名（和文）栄養状態を反映する発現バイオマーカーの体系的作出と利用

研究課題名（英文）Development of expression biomarkers to estimate nutrient conditions

研究代表者

永野 惇（Nagano, Atsushi）

龍谷大学・農学部・講師

研究者番号：00619877

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,600,000円

研究成果の概要（和文）：植物体内の窒素やリンなどの栄養成分量を知ることは様々な局面で重要である。本研究では、遺伝子発現量からこれらの成分量を推定するマーカーの開発を行った。まず、多数のトランスクリプトームデータを効率的に取得するために、低コスト多検体RNA-Seqのシステムを改良した。さらに、さまざまな栄養状態、温度、光、体内時計時刻の条件で取得したサンプルのトランスクリプトームデータとリン量などの形質データを取得し、それらのデータを用いた統計モデリング・機械学習によって、対象形質に対する発現マーカーを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した植物の栄養状態を推定する発現マーカーは、作物の栄養状態の診断や適切な施肥タイミングや施肥方法の検討に役立つと考えられる。また、野生植物への応用が可能になった場合には、熱帯林の一斉開花や、ブナの豊凶、地域の植生などを予測するモデルと組み合わせて用いることで、これらの予測の精度を高められる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is important to measure quantity of nutrients in plants for plant science and agriculture. In this study, we develop gene-expression markers to estimate the quantity of nutrients. Low-cost and high-throughput RNA-Seq library preparation system was updated for collecting massive transcriptome data to train the markers. We developed the markers using transcriptome data and trait data of samples in various nutrient conditions, temperature conditions, light conditions and circadian timings.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：トランスクリプトーム 栄養 リン 発現マーカー 統計モデリング 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素やリンなどの主要な栄養成分やホウ素などその他の必須元素の欠乏・過剰は植物の生育に重大な影響を及ぼす。そのため植物体中のこれらの成分量を知ることは様々な局面で重要となる。従来から行われてきた CN コーダーなどによる測定に加えて、近年、遺伝子発現量をもとにしたマーカー（以下、発現マーカー）の開発がおこなわれつつある。ここでいう発現マーカーは複数遺伝子の発現をもとに計算される指標のことである。例えば、トウモロコシの葉の窒素量を反映する 8 遺伝子の発現量からなる発現マーカーが開発されており、発現マーカーの値と実測の窒素量は良く一致していた (Yang et al, 2011, Plant Phys.)。

さらにその 8 遺伝子に対応するイネオーソログの発現量 (Nagano et al, 2012, Cell のマイクロアレイデータ) から、独自に栽培期を通じた窒素量の変化を推定したところ、実際の窒素量を反映していると思われるパターンが得られた (Nagano, unpublished)。このようなマーカーは、育種・栽培管理の指標として実用上重要であるのはもちろんのこと、植物科学の研究上、栄養欠乏耐性や調節の分子機構の解析において有用であると考えられる。また、生態学において熱帯林の一斉開花や、ブナの豊凶、地域の植生の決定要因など様々な現象を説明するために植物内部の栄養状態の変化を仮定したモデルが用いられている。発現マーカーを用いて野生植物の栄養状態を知ることが可能になれば、様々な現象のモデルを直接検証することが可能となる。

2. 研究の目的

このように発現マーカーは有用であるが、これまで比較的小規模で場当たりの研究のみが行われてきた。その原因は、1. 頑健な発現マーカーを作出するためにはターゲットとする条件以外の発現に影響する様々な要因をなるべくばらつかせてサンプリングする必要があること、2. 多数のサンプルのトランスクリプトームデータを取得する必要があること、3. 高度なデータ解析技術が要求されること、である。一方、我々のグループではこれらの要因を解決する技術 (スマートインキュベータ、低コスト多検体 RNA-Seq、統計モデリング・機械学習) を有している。そこで本研究では、これらの技術を駆使して気象条件、体内時計時刻、日齢、植物種などによらず頑健に栄養状態を表す発現マーカーを体系的に作出する手法を確立することを目標とした。

3. 研究の方法

1. 多数のトランスクリプトームデータを効率的に取得するために、我々のグループで確立してきた低コスト多検体 RNA-Seq のシステムをさらに改良する。
2. スマートインキュベータによって作りだした様々な環境条件下において、リンなどの栄養条件や気温、サンプリング時刻を複合的に変化させたサンプルを、イネ、ネギ、タバコなどに関して収集する。
3. 2 で取得したサンプルのトランスクリプトームデータとリン量などの形質データを取得し、それらのデータをもとに統計モデリング・機械学習によって、それぞれの形質に対する発現マーカーを得る。
4. 3 で得られた発現マーカーの精度・有効性を、実際の野外圃場サンプルを用いて検証する。

4. 研究成果

発現マーカーの作出のためには、対象形質が様々な値になっている多数のサンプルについて、形質値とトランスクリプトームの測定が必要である。そこで、多検体から効率的にトランスクリプトームデータを得るために、RNA-Seq ライブラリの自動調整系を確立した。これによって、同時に 384 多検体の RNA-Seq ライブラリの自動調整を行うことが可能となった。さらに、より低コストに RNA-Seq ライブラリの調整を行うために、プレプール型のプロトコルを導入した (図 1)。

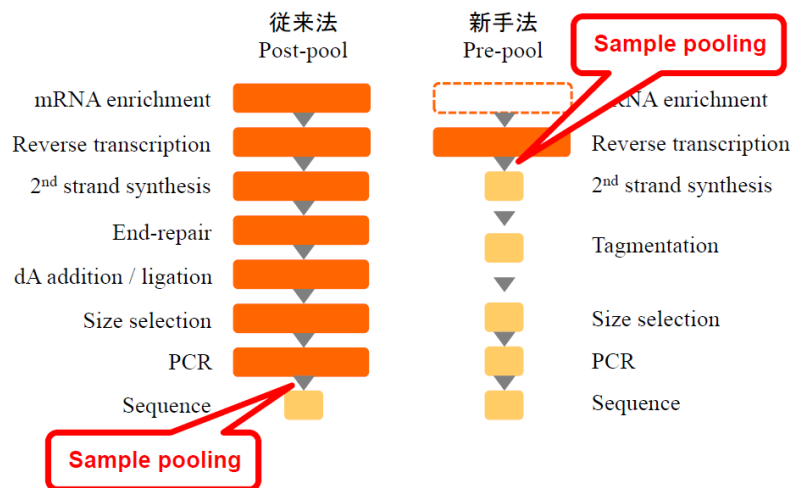


図 1 Pre-pool 型プロトコルを導入することで大幅な低コスト化、高スループット化、安定化を実現した

また、少ないリード数から高精度に発現量を推定するために、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。

イネ、ネギ、タバコなどを材料として、様々な体内時計時刻、気温、光、栄養条件下で、合計で約 2000 サンプルのトランスクリプトームデータを学習用データとして取得した。また、他のプロジェクトによって収集してきたイネ、ハクサンハタザオのトランスクリプトームデータ（約 1500 サンプル分、Nagano et al, 2012, Cell, Nagano et al, 2019, Nature Plants）についても、発現マーカーの作成手法検討用のデータとして用いることとした。例えば、ネギ、タバコに関しては、北大・江澤グループと共同で、リン施用条件を様々に変えたサンプルからトランスクリプトームデータと、地上部リン量・地下部リン量の形質値データを取得した。これらのデータを用いた解析から、例えば 8 遺伝子の発現量の組み合わせからなる十分な精度の発現マーカーを作出することが可能であることを示した。さらに、単純に施用量を変えるのではなく、根からの直接吸収量と菌根菌を経由した吸収量のそれぞれを制御して栽培を行ったサンプルを得た。これらのサンプルのトランスクリプトームデータを用いた解析から、吸収経路特異的にリンの吸収量を推定する発現マーカーを得ることが出来た。さらに、人工気象室内の植物サンプルと野外圃場の植物サンプルを用いて検証用データを取得し、吸収経路別のリン量マーカーの精度の評価を行った。その結果、学習用データと近い環境である人工気象室内の植物サンプルに関しては精度よくリン量を推定できたのに対して、野外圃場の植物サンプルに関しては、それより低い精度にとどまっていた。これは、野外圃場のデータは、学習用データからみて外挿に当たる環境のデータであるためと考えられる。今後は、野外圃場のデータを取り込んで予測モデルのアップデートを行ったり、人工気象室でより広い環境のふり幅のデータを蓄積したりすることで、より頑健な予測を行う発現マーカーを開発することが可能となると考えられる。一方で、独自に開発したデータ解析手法により、遺伝子ごとに発現マーカーに寄与する確率を推定し、その確率の高い遺伝子のリストに既知のリン吸収関連遺伝子が含まれていることを確認した。このことから、リストの他の遺伝子に未知のリン吸収機構にかかわる遺伝子が含まれていることが示唆された。また、糖の転流速度を推定するマーカーや、気温など周辺物理環境を推定するマーカーの開発に着手し、プロトタイプを得た。

また、これらの研究の過程で開発した多検体 NGS 解析技術、データ解析技術を用いて、多数の共同研究を行い、様々な研究の支援を行った。

< 引用文献 >

Yang XS, Wu J Ziegler TE, Yang X, Zayed A, Rajani MS, Zhou D, Basra AS, Schachtman DP, Peng M, Armstrong CL, Caldo RA, Morrell JA, Lacy M, Staub JM. (2011) Gene expression biomarkers provide sensitive indicators of in planta nitrogen status in maize., *Plant Physiol.* 157(4):1841-52.

Nagano AJ, Sato Y, Mihara M, Antonio BA, Motoyama R, Itoh H, Nagamura Y and Izawa T, (2012) Deciphering and Prediction of Transcriptome Dynamics under Fluctuating Field Conditions., *Cell*, 51(6):1358-69.

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

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. 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 査読有
2. Yasugi M, Tezuka A, *Nagano AJ (2018) Stacksbinder: online tool for visualizing and summarizing Stacks output to aid filtering of SNPs identified using RAD sequencing, *Conservation Genetics Resources*, in press. 査読有
3. Chen YY, Nishii K, Barber S, Hackett C, Kidner CA, Gharbi K, Nagano AJ, Iwamoto A, *Moller M (2018) A first genetic map in the genus *Streptocarpus* generated with RAD sequencing based SNP markers, *South African Journal of Botany*, 117: 158-168. 査読有
4. *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. 査読有

5. *Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, *Kudoh H (2018) A Survey on Plant Viruses in Natural Brassicaceae Communities Using RNA-Seq, **Microbial Ecology**, doi: 10.1007/s00248-018-1271-4. 査読有
6. Kagiya S, Yasugi M, Kudoh H, Nagano AJ, *Utsumi S (2018) Does genomic variation in a foundation species predict arthropod community structure in a riparian forest?, **Molecular Ecology**, 27(5):1284-1295 査読有
7. *Nagano Y, Mimura T, Kotoda N, Matsumoto R, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H, Yamamoto M (2018) Phylogenetic relationships of Aurantioideae (Rutaceae) based on RAD-Seq, **Tree Genetics & Genomes**, 14: 6. 査読有
8. *Sakaguchi S, Kimura T, Kyan R, Maki M, Nishino T, Ishikawa N, Nagano AJ, Honjo M, Yasugi M, Kudoh H, Li P, Choi H-J, Chernyagina O, Ito M (2018) Phylogeographic analysis of the East Asian goldenrod (*Solidago virgaurea* complex, Asteraceae) reveals hidden ecological diversification with recurrent formation of ecotypes, **Annals of Botany**, 121(3): 489-500. 査読有
9. Ishikawa T, Kashima M, Nagano AJ, Ishikawa-Fujiwara T, Kamei Y, Todo T, *Mori K (2017) Unfolded Protein Response Transducer IRE1-mediated Signaling Independent of XBP1 mRNA Splicing Is Not Required for Growth and Development of Medaka Fish. **eLife**, 6: e26845 査読有
10. *Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, *Kudoh H (2017) First report of Pelargonium zonate spot virus from wild Brassicaceae plants in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 83(5): 329-332 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Atsushi J. Nagano, Plant responses to complex natural environments captured by field transcriptomics, 1st ITbM Frontier Seminar, 2019
2. 永野惇, 野外環境における植物システムの 包括的設計・制御に向けた基盤技術, 植物-農業ワークショップ高温・高CO₂でも環境負荷の少ない農業を実現する基盤研究, 2018
3. Atsushi J. Nagano, Genomic dissection and prediction of transcriptome dynamics in field conditions, T-PIRC Symposium, 2018
4. 永野惇, 野外におけるトランスクリプトーム変動を予測する, 第7回生命医薬情報学連合大会, 2018
5. 永野惇, 境界を越え、異分野に学ぼう~野外トランスクリプトーム研究などを通じて~, 日本植物学会, 2018
6. Atsushi J. Nagano, Genomic dissection and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions, In natura workshop, 2018
7. Atsushi J. Nagano, Genomic dissection and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions, Plant and Animal Genome Conference XXVI, 2018
8. 永野惇, トランスクリプトームによる植物内部状態の推定と栄養研究への応用の可能性, 第三回植物の栄養研究会, 2017
9. Atsushi J. Nagano, Field transcriptomics: Integration of transcriptomics and meteorology, The 33rd annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 2017
10. 永野惇, How transcriptome reflects fluctuations in biotic and abiotic environments in the field, 分子微生物科学セミナー, 2017
11. 永野惇, 野外トランスクリプトミクスでつなく、ゲノム、気象、表現型, 日本作物学会・第243講演会, 2017
12. 永野惇, 野外トランスクリプトミクスから分子生物学と農業気象の接点を探る, 日本農業気象学会 2017年全国大会, 2017
13. 永野惇, 気象とトランスクリプトームの解析からみる野外での植物の温度応答, Biothermology Workshop - 生命システムの熱科学 -, 2016
14. 永野惇, 野外トランスクリプトミクスでつなく、ゲノム、気象、表現型, 2016年植物科学

シンポジウム「植物科学とイノベーション」, 2016

〔図書〕(計1件)

永野 惇「野外トランスクリプトームの定量生物学」In 小林 徹也(編),「定量生物学」, (2018), 化学同人

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: トピックモデルを用いた遺伝子情報推定装置

発明者: 岩山幸治, 永野惇

権利者: 龍谷大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-033381

出願年: 2017

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。