

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17626

研究課題名(和文)メタトランスクリプトーム的手法による重要ウリ科作物の植物微生物相互作用の研究

研究課題名(英文)RNA-seq based study on plant-fungi interaction in melon plant

研究代表者

矢野 亮一 (Yano, Ryoichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度解析センター・主任研究員

研究者番号：00443044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、うどんこ等のウリ科植物病害に特に弱いマスクメロン品種を対象として、実際の農業生産現場と同等の温室環境にて採取されたRNA-seqデータをベースに植物付着菌類と植物トランスクリプトームを一斉解析するためのバイオインフォマティクス手法を検討した。リボソームRNAによる菌叢解析にて検出された真菌類についてパブリックデータベースから近縁のゲノム配列情報を網羅的に収集し、これをリファレンスとすることでRNA-seqから菌叢情報と植物体トランスクリプトームを一斉解析する解析パイプラインを考案した。また、本研究で取得したRNA-seq情報は新規に解読したメロンゲノムの遺伝子推定にも活用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウリ科植物には、メロンの他にカボチャ、キュウリなど農業生産上重要な園芸作物が存在する。いずれもうどんこ等の病原菌への抵抗性が望まれる作物であり、本研究で考案したRNA-seqに基づく一斉解析の手法はこれらのウリ科作物の研究においても応用が可能である。今後、より大規模なRNA-seqデータを圃場環境で収集した際には、菌類のプロファイルとトランスクリプトーム情報の統合解析が実施できると考えている。このような試みで得られた遺伝子解析情報は、将来の病害抵抗性品種の育成や重要遺伝子の発見のために役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although melon is an important source of vitamins and minerals for human, some cultivars (e.g. Japanese Earl's favorite series melons) are known to produce valuable fruits with rich flavor and sweet taste. However, some of the high-grade melon cultivars are sensitive to fungal diseases such as powdery mildew which sometimes causes severe economic loss in agriculture. In addition to powdery mildew, many fungi are likely to be present on the surface of the melon plants grown under field conditions. To promote breeding of disease resistant cultivar, it is important to investigate plant-fungi interaction under field conditions. In this study, RNA-seq data were collected from melon plants, and a bioinformatics method was considered to simultaneously analyze fungi composition and plant transcriptome based on a single RNA-seq data.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：ゲノム科学 トランスクリプトーム解析 菌叢解析 フィールドオミックス

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

1. 研究開始当初の背景

メロン、キュウリ、カボチャ等のウリ科園芸作物にはうどんこやべと病、つる割れ病などの病害があり、これらによって深刻な経済損失が生じることがある。ウリ科作物のモデルとして研究に用いられるメロンでは、特にアールスフェボリット系のマスクメロンが病害に弱いことで知られ、その栽培は非常に困難である。ビニールハウス温室であっても植物は絶えず様々な病害微生物に曝されており、採取された植物組織サンプルには付着微生物の情報が少なからず含まれると考えられる。そのような菌叢情報と植物体トランスクリプトームを一斉解析できれば、将来の耐性品種育成や病害防除、重要遺伝子の発見に役立つ知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究に先立ち、ハウス環境下で収集したメロンの組織別 RNA-seq データ (全遺伝子発現情報、トランスクリプトーム) を解析しており、その中で、付着微生物の情報を情報処理レベルでデータとして分離して解析できることが示唆されていた。そこで本研究では、特に病害に弱い純系マスクメロン品種「アールスフェボリット春系3号」を対象として、温室環境での RNA-seq データ収集を行い、植物付着菌叢情報を RNA-seq データから分離して解析するバイオインフォマティクス解析法を検討した。開発した手法を様々な RNA-seq データに適応し、また、植物体トランスクリプトームと合わせて一斉解析することで、新たな知見を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq ベースの菌叢解析法の検討

はじめにハウス栽培メロンに付着する菌叢について検討するために、リボソーム DNA ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域を対象としたシークエンス解析を実施した。実際の農業生産環境と同等の温室において春系3号メロンを異なる季節 (春季、秋季) に水耕栽培し、うどんこ罹病部位と非罹病部位 (コントロール) が同一の葉に混在するような完全展開葉をサンプリングに利用した。罹病部位、非罹病部位のリーフディスクをそれぞれ採取し、サンプル破砕後に DNase, RNase を選択的に用いることにより、DNA と Total RNA を同一サンプルから同時調整した (図 1A)。DNA を ITS 菌叢解析に供したところ、QIIME による解析では 42 種類の分類グループが検出された。うどんこ菌または近縁と考えられる *Golovinomyces* 属も検出されており、秋季栽培のうどんこ罹病部位サンプルにおいては、*Golovinomyces* 属が全体の菌叢の 97% を占めていた (図 1B)。このことは、罹病部位をサンプリングしたことと一致している。一方、春季栽培サンプルにおいては、うどんこの存在はサンプリング前に目視で認められていたものの、QIIME による解析では有為な *Golovinomyces* 属の存在が認められなかった。この理由としては、リーフディスクに由来する菌類の DNA が検出限界以下であった可能性も考えられる。*Golovinomyces* 属の他には、メロンつる枯れ病に関連する可能性がある *Mycosphaerella* 属が含まれていた。

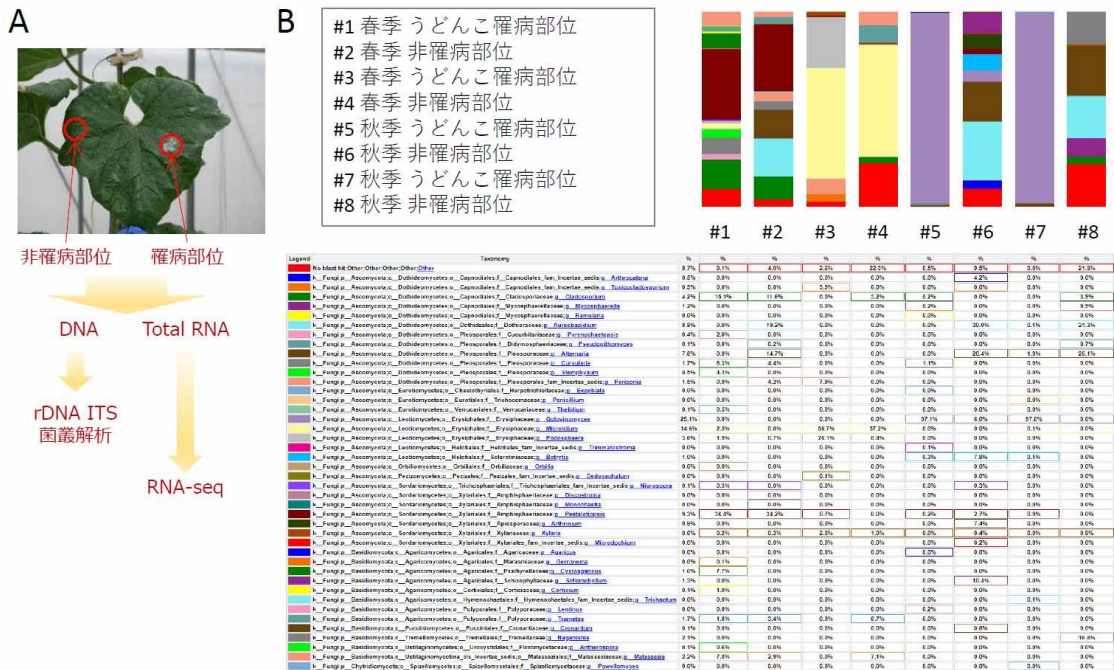


図1. リーフディスクサンプリングと菌叢解析
 (A) 同一の葉におけるうどんこ罹病部位と非罹病部位のサンプリング
 (B) rDNA ITS配列情報に基づく真菌類の菌叢情報結果

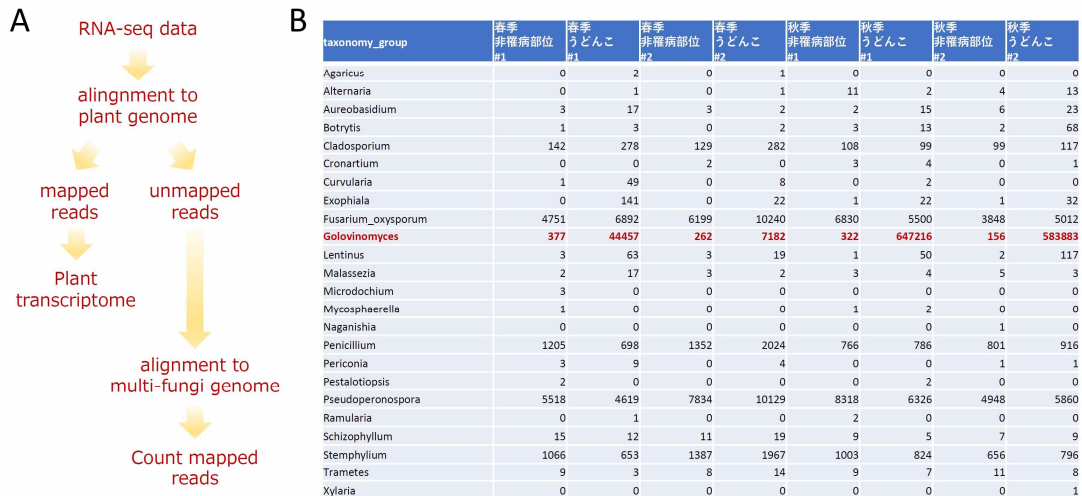


図2. 真菌類マルチゲノムリファレンスを用いたRNA-seqベースの菌叢解析
 (A) 情報解析簡略図
 (B) RNA-seqベースの菌叢解析結果. 春季うどんこ罹病部位ではGolovinomyces属のカウント数が非罹病部位に比べて著増大しており、サンプリングと一致している。

一方、DNA と同時抽出した Total RNA は Illumina シークエンサーによる RNA-seq 解析に用いた。RNA-seq では poly-A 配列が末端に付加された RNA 分子を対象としており、取得されるデータには、メロン植物体に由来する RNA 配列情報と菌類に由来するものが混在すると考えられる。これらを情報処理レベルで分別して RNA-seq データに基づく菌叢解析を行うために、取得したショートリードをまずメロンの参照ゲノム配列にアライメントし、非マップリードを分離した(図 2A)。次に、これらの非マップリードを解析するための菌類マルチゲノム参照配列情報を独自に用意した。上述の ITS 菌叢情報を基に、検出された菌類の参照ゲノム配列をパブリックデータベースにて検索し、近縁種を含めて情報が公開されているものを一斉ダウンロードして結合した。これらには、べと病、つる割れ病に関連する可能性がある *Pseudoperonospora* 属、*Fusarium oxysporum* の参照ゲノム配列(近縁種含む)も含まれる(合計 24 種、301 系統のゲノムアセンブリ)。前述の非マップリードを菌類マルチ参照ゲノム配列にアライメントし、リードカウントをベースとして各属の在・不在を解析した。その結果、ITS 菌叢解析では春季罹病サンプルにおけるうどんこ感染(*Golovinomyces* 属)が検出できなかったが、RNA-seq ベースの手法では明確に見出すことができた(図 2B)。したがって、実験的に DNA、RNA を別々に調整せずとも、RNA-seq データのみで真菌類の菌叢情報がある程度、得ることができると考えられる。*Golovinomyces* 属以外にカウント数が多いグループとしては、*Pseudoperonospora* 属と *Fusarium oxysporum*、*Cladosporium* 属、*Stemphylium* 属が挙げられた。特に前者 2 つはカウント数が多く、メロン栽培において問題となるべと病やつる割れ病との関連が示唆された。

(2)メロン本葉ならびに組織別データにおける RNA-seq ベースの菌叢解析

(1)で考案した RNA-seq ベースの真菌類菌叢解析法を、メロン本葉の RNA-seq データ、ならびに、組織別 RNA-seq データにそれぞれ適用した(図 3)。どちらにおいても、全体に占める *Fusarium_oxysporum*、*Pseudoperonospora* 属のリードカウント数が高い傾向にあり、植物体表層にて、べと病やつる割れ病菌が多く存在していた可能性が示唆された。これらに対して、*Golovinomyces* 属の割合が少なかったのは、ハウス栽培においてうどんこに対応した農薬散布が徹底されていたことによる可能性が考えられる(白い斑点が出現するため早期発見がしやすく、日常的に実験補助員による局所的農薬塗布が行なわれていた)。メロンは着果すると著しく病害抵抗性が弱まることがあり、実験では着果前後の生育ステージの違いも検討した。しかしながら、今回取得したデータに関しては、生育ステージによる菌叢の明確な差は認められなかった。組織別 RNA-seq データの解析では、特にポストハーベスト果実の果皮において *Cladosporium* 属の割合が高い傾向が認められた。*Cladosporium* 属は黒かび病の原因になることも考えられ、目視できない範囲で収穫果実の表面に付着していた可能性が考えられる。

4. 研究成果

前述のように、ITS 菌叢解析では春季うどんこ罹病サンプルにおける *Golovinomyces* 属の有為な増大を見出すことができなかったが、RNA-seq ベースの手法では見出すことができた。このことは、rDNA による解析法より RNA-seq ベースの手法の方が植物付着菌類の検出感度が高い可能性を示唆している。今回構築したスクリプト(プログラム)は情報処理を自動化しており、メロンのみならずキュウリ、カボチャなど他のウリ科作物の真菌類菌叢解析に用いることが可能である。遺伝子研究のみならず農薬散布の効果を評価する目的などにも、本研究で開発した手法が適用できると考えられる。本研究では、真菌類菌叢情報と共に植物体トランスクリプトーム情報も同時に取得しており、上記 3-(2)で解析したデータについては、菌叢情報とトラン

スク립トームを統合した共発現解析を試みている。現状のサンプル数では特定の遺伝子と菌類の相互作用を検出するには至っていないが、今後、解析対象の系統・品種を増やすなど、サンプル数を増やすことにより新たな発見につながる可能性がある。耐性品種と感受性品種における RNA-seq データを多数集積して解析することは、メロンだけでなく今後の課題の一つであると考えている。

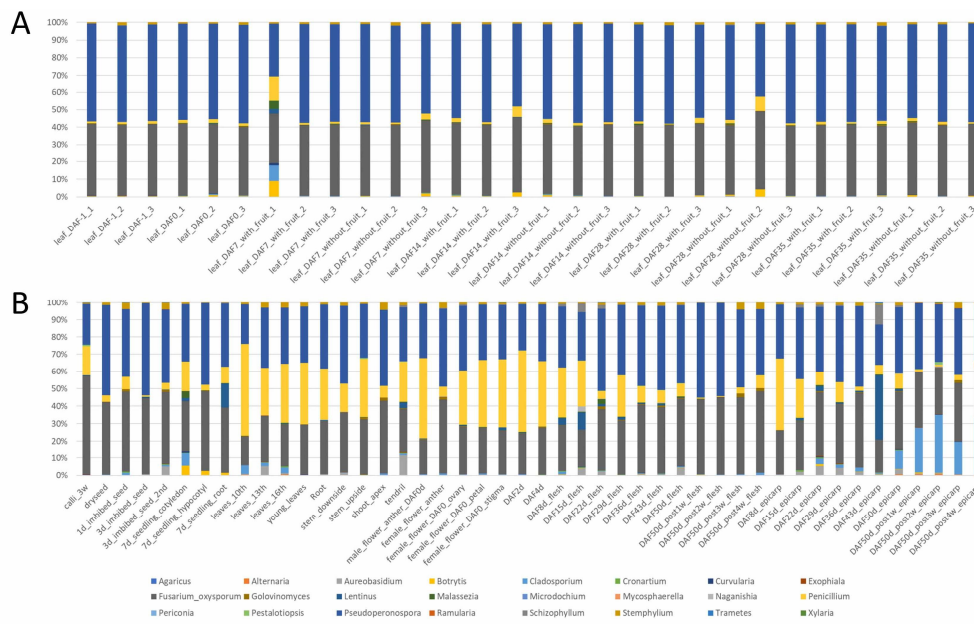


図3. ハウス環境で取得されたRNA-seqを用いた菌叢解析
 (A) 着果前後の葉のRNA-seqに基づく菌叢解析
 (B) メロン組織別RNA-seqに基づく菌叢解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Comparative genomics of muskmelon reveals a potential role for retrotransposons in the modification of gene expression. Ryoichi Yano, Tohru Ariizumi, Satoko Nonaka, Yoichi Kawazu, Silin Zhong, Lukas Mueller, James J. Giovannoni, Jocelyn K. C. Rose, Hiroshi Ezura. *Communications Biology* 3, Article number:432 2020

An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. Valentino Ruggieri, Konstantinos G. Alexiou, Jordi Morata, Jason Argyris, Marta Pujol, Ryoichi Yano, Satoko Nonaka, Hiroshi Ezura, David Latrasse, Adnane Boualem, Moussa Benhamed, Abdelhafid Bendahmane, Riccardo Aiese Cigliano, Walter Sanseverino, Pere Puigdomènech, Josep M. Casacuberta, Jordi Garcia-Mas. *Scientific Reports* 8 8088 2018
 Melonet-DB, A Grand RNA-seq Gene Expression Atlas in Melon (*Cucumis melo* L.). Ryoichi Yano, Satoko Nonaka, Hiroshi Ezura. *Plant and Cell Physiology* 59(1) e4 2017

〔学会発表〕(計5件)

メロンのゲノム解析およびデータベース構築. 矢野 亮一 園芸学会ウリ科小集会 2019年3月

Developing Genome and Transcriptome Information Database for Functional Genomics Research of Japanese Muskmelon. Yano, Ryoichi; Ariizumi, Tohru; Nonaka, Satoko; Ezura, Hiroshi. *Cucurbitaceae2018* 2018年11月

Pacbio を用いたマスクメロンの全ゲノム情報解説 矢野 亮一 第134回 日本育種学会 ランチョンセミナー 2018年9月

メロンのゲノム情報解析データベース「Melonet-DB」矢野 亮一; 野中 聡子; 江面 浩. 第59回 日本植物生理学会 データベース講習会 2018年3月

De novo assembly of Japanese muskmelon ‘Earl’s favorite Harukei-3’ Yano, Ryoichi; Ariizumi, Toru; Nonaka, Satoko; Ezura, Hiroshi. XIV Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference (SolCuc2017) 2017年9月

〔図書〕(計1件)

Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, R. Grumet et al. (eds.), Genetics and Genomics of Cucurbitaceae. Ryoichi Yano, Hiroshi Ezura. pp.345-375 2017

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

メロンゲノム情報データベース「Melonet-DB」 (<https://melonet-db.dna.affrc.go.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：江面 浩

ローマ字氏名：EZURA, Hiroshi

研究協力者氏名：野中 聡子

ローマ字氏名：NONAKA, Satoko

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。