

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82112
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2014
 課題番号：25850033
 研究課題名(和文)時系列Dual RNA-Seq法によるイネといもち病菌の感染時相互作用の解析

 研究課題名(英文)Time-series Dual RNA-Seq analysis of rice and blast fungus

 研究代表者
 川原 善浩(Kawahara, Yoshihiro)

 独立行政法人農業生物資源研究所・ゲノムインフォマティクスユニット・主任研究員

 研究者番号：30546370

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：いもち病菌に対して異なる病害抵抗性を示す3つのイネ品種(罹病性、真性抵抗性、圃場抵抗性)の感染後0、24、36、48時間のイネの葉を対象にし、イネといもち病菌の双方の感染時系列遺伝子発現プロファイル比較解析をDual RNA-Seq法を用いて行った。その結果、抵抗性反応の違いによって、イネの感染時応答遺伝子の発現誘導のタイミングが異なること、およびいもち病菌の感染時応答遺伝子の発現も抵抗性反応によって異なることを明らかにした。ゲノムや遺伝子アノテーションと共に感染時の遺伝子発現プロファイルが俯瞰可能なゲノムブラウザやゲノムや転写産物に対するBLAST検索機能をもったデータベースの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：To reveal differences in plant-pathogen interaction at a transcriptome level, we performed time-series Dual RNA-Seq analysis using a blast fungus strain and three rice cultivars (susceptible, true resistance and field resistance). We carried out sequencing of the fungal genome using MiSeq. By de novo assemble and gene prediction, we obtained a genome assembly (3,272 scaffolds, 41.7Mbp) and annotation of 12,250 loci. Dual RNA-Seq analysis was conducted for time-series samples (0, 24, 36, 48hr after inoculation) of three types of plant-pathogen interactions. We found that the expression profiles of infection responsive genes of rice and blast fungus were different among susceptible, true and field resistance interactions. We developed the database to provide genome annotation and Dual RNA-Seq data of rice and blast fungus.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：植物-病原菌相互作用 イネ いもち病菌 RNA-Seq de novoゲノムアセンブル 遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

いもち病は、糸状菌であるいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされる、イネ (*Oryza sativa*) の重要病害の1つである。イネのいもち病菌感染応答、特に遺伝子発現変化については、マイクロアレイにより様々な研究グループが解析を行っている。一方で、いもち病菌側の遺伝子発現解析は試験管内で誘導可能な付着器形成段階までにとどまっておられ、植物細胞内に侵入した後のいもち病菌側の遺伝子発現については感染後 36 時間の被感染イネ細胞を機械的にサンプリングしてマイクロアレイ解析した一例があるのみであった。近年、我々はイネといもち病菌の感染初期 (24 時間) における Dual RNA-Seq 法を確立し、双方の同時遺伝子発現解析を行っている。その研究によって明らかになった興味深い知見の一つとして、親和性比べて、非親和性相互作用において、イネといもち病菌の双方でより多くの遺伝子の発現変動が見られる、ということが挙げられる。これは、イネとの相互作用の違いに応じて、いもち病菌が感染戦略を変化させている可能性があることを示唆するものである。しかしながら、単一タイムポイント解析では、その変化が感染応答の有無によるものなのか、それとも発現のタイミングがずれた結果によるものなのかまでは結論づけられなかった。

2. 研究の目的

我々は単一タイムポイント Dual RNA-Seq 解析により、いもち病菌とイネの双方において親和性と非親和性相互作用間で遺伝子発現変動が大きく異なるという知見を得ている。いもち病菌に対するイネの抵抗力としては、単一の遺伝子に支配され、いもち病菌とイネの間で系統特異性が見られる「真性抵抗力」や、複数の微動遺伝子によって支配され、系統非特異的で抵抗力が打破されにくいと考えられている「圃場抵抗力」が存在する。上述したように、これらの抵抗力をもつイネの遺伝子発現についてはマイクロアレイなどを用いた詳細な解析が行われている。しかし、そのようなイネの感染組織中における、いもち病菌の遺伝子発現についてはほとんど明らかになっておらず、真の感染時相互作用の全容を理解する上で、様々な相互作用関係にあるいもち病菌とイネの遺伝子発現を、同時に、感染タイムコースに沿って解析する必要がある。

本研究では、いもち病菌 P91-15 株とそれに対して罹病性を示す「コシヒカリ」、真性抵抗力を示す「コシヒカリ BL3 号」、圃場抵抗力を示す「ともほなみ」の3品種対象とした時系列発現解析を行い、相互作用の違いによって発現している遺伝子のレパートリーや発現のタイミングがどう変化するのかを明

らかにし、データベースとして公開する。

3. 研究の方法

(1) 感染時系列サンプリングとシーケンシング

いもち病菌 P91-15 株とそれに対して罹病性を示す「コシヒカリ」、真性抵抗力を示す「コシヒカリ BL3 号」、圃場抵抗力を示す「ともほなみ」の3品種を、N6 培地にて2週間水耕栽培した。イネの幼苗の第4葉を広げるようにして紙を敷いた角型プレート内に静置し、第4葉を中心にいもち病懸濁液 (1.0×10^6 /ml) をプレート当たり 5ml 噴霧接種したものを感染サンプルとした。同様に滅菌水を 5ml 噴霧摂取したコントロールサンプルを準備した。噴霧接種後 24 時間は角型プレート内に入れたまま 25 度の恒暗条件のインキュベータに静置した。その後、水耕溶液に移して明暗条件の 25 度のインキュベータ内で栽培した。噴霧摂取後 24、36、48 時間において、各タイムポイント3個体 \times 2 反復、合計 6 個体の第4葉の葉身を採種した。葉身を切り出し、即座に液体窒素に浸けて凍結し、その後は -80 度で保存した。感染前のいもち病菌のコントロールサンプルについては、 1.0×10^5 /ml 孢子懸濁液に植物性 WAX (50 μ M) を添加し、ガラスの料理用バットに 20ml ずつ分注、25 度で 17 時間培養し、付着器を形成してガラス壁面に付いた菌をゴムヘラで回収し、遠心、洗浄したのち、-80 度で凍結保存したものをを用いた。

Qiagen の RNAeasy Plant Kit を用いて RNA 抽出を行い、Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit の試薬とプロトコルに従ってライブラリ調製を行った。HiSeq2000 によるシーケンシング (paired-end, 100bp) は外注した。

(2) いもち病菌 P91-15B 株のリファレンスゲノム構築

孢子懸濁液から DNA を抽出し、Illumina 社のプロトコルに従って DNA シーケンシングライブラリを調製した後、MiSeq によって 1 ラン分のシーケンシングを行った (250bp、ペアエンド)。FastQC (v0.10.1) による Trimmomatic (v0.32) を用いて、低クオリティ塩基とアダプター配列除去を行った。前処理後の配列データを入力として、MaSuRCA (v2.3.2) を用いて de novo ゲノムアセンブル解析を行った。その後、得られたスキャフォールド配列に対して、上述の RNA-Seq データを TopHat2 (v2.0.13) を用いてアラインメントし、スキャフォールドをまたいでマップされたリードの情報を元に SSPACE (v3.0) を用いて再スキャフォールディングを行った。さらに、公開されている 70-15 株のミトコンドリアゲノム配列と相同性の高い (blastn の結果で identity>95%、かつ Coverage \geq 30%) スキャフォールドを除き、P91-15B 株のリファレンスゲノムを構築した。70-15 株の遺伝

子アノテーションを元に作成した学習モデルと共に、TopHat2によるRNA-Seqデータのアラインメント結果やGMAPによる70-15株の遺伝子配列のアラインメント結果をエクソン領域のヒントとして活用し、AUGUSTUS(v3.0.3)を用いてab initio遺伝子予測を行った。得られた遺伝子構造についてはUniProtへの相同性検索、pfamへの機能ドメイン検索、SignalPによる細胞内局在予測を行い、アノテーション情報を付与した。

(3)Dual RNA-Seq法による遺伝子発現解析
RNA-SeqデータのFastQCによるクオリティチェック、Trimmomaticによるアダプター配列や低クオリティ塩基の除去を行った。前処理後の各サンプルのRNA-SeqリードをTopHat2を用いてイネといもち病菌双方のリファレンスゲノム配列(IRGSP-1.0と本研究によって構築したP91-15B株のゲノム配列)に対して同時にアラインメントした。リードのアラインメント結果と遺伝子アノテーション情報を元に、Cufflinks2(v2.2.1)を用いて、各遺伝子の遺伝子発現量を推定した。

4. 研究成果

(1)いもち病菌 P91-15B 株のゲノム配列と遺伝子アノテーションの整備
いもち病菌はリファレンス菌株(70-15)のゲノム配列が利用可能だが、本研究で用いたP91-15B株のゲノム配列は未解読である。そこで、解析精度の向上、およびP91-15B株に特異的な遺伝子も解析対象とするため、P91-15B株のゲノム配列決定と遺伝子アノテーションを行った。イルミナ社のMiSeqで解読したリード(250bpのペアエンド)を元に、MaSuRCAを用いてde novoゲノムアセンブル解析を行った。得られたスキファールド配列に対して、同菌株のRNA-SeqデータをTopHat2によってアラインメントし、SSPACEによって再スキファールドリングを行った。そして、得られたスキファールドのうち、公開されている70-15株のミトコンドリアゲノム配列と相同性の高い配列を除くことでP91-15B株のゲノム配列を構築した。完成したゲノム配列は総スキファールド数が3,272本、総塩基量が41.7Mbp、N50は54Kbpであった。総塩基量はいもち病菌70-15株のリファレンスゲノム(40.9Mbp)とほぼ同等で、これまでに論文が公開されている他の4株のゲノム配列(Y34:38.4Mbp, P131:37.7Mbp, HN19311:36.7Mbp, FJ81278:37.9Mbp)に比べて長く、リピート配列の量も多いことが分かり、より完全な形

に近いゲノム配列が得られたとかがえられる。

P91-15B株のゲノムに遺伝子アノテーションを付けるため、リピート配列情報、70-15株の遺伝子配列のP91-15B株ゲノムへのアラインメント情報、RNA-Seq配列のアラインメント情報をヒントとして活用しながら、AUGUSTUSを用いて、非タンパク質コード領域も含めた遺伝子予測を行った。その結果、70-15株の遺伝子配列のアラインメント結果を元にした遺伝子領域も合わせて、合計12,177遺伝子座が予測された。

(2)時系列 Dual RNA-Seq 解析

前処理後のリード数は各サンプル平均すると6千万ペアリード数であった。最も多いサンプルで2億ペア、最も少ないもので2千万ペアリードであった。これらのリードをイネといもち病菌のゲノム配列を合わせたものにアラインメントしたところ、各サンプル平均して95.7%のリードがアラインメントされた。これらをアラインメントされたゲノム配列の位置を元に、解読したリードのうちはいもち病菌由来、イネ由来のそれぞれの割合を計算したところ、感染組織中のいもち病菌由来のリードの割合は平均して0.4%で、最も少ないサンプルで0.04%(コシヒカリBL3号とともほなみへの感染48時間後)、最も多いもので1.8%(コシヒカリへの感染48時間後)であった。このことから、罹病性のコシヒカリへの感染によって、いもち病菌の転写活性が上がっていることが示唆された。

双方のゲノム配列にアラインメントされたリードを元に全遺伝子についての時系列発現プロファイル解析を行った。まず、イネの代表的な感染時応答遺伝子について、3種類の抵抗性反応と遺伝子発現プロファイルの関係を調べたところ、罹病性のコシヒカリは他の2品種と比べて明らかに遺伝子発現応答が弱いことが明らかになった(図1)。この結果は、これらの遺伝子の発現が病害抵抗性に関与していることを裏付けるものである。一方、真性抵抗性を示すコシヒカリBL3号や圃場抵抗性を示すともほなみの遺伝子群は比較的強い感染応答を示し、ともほなみでより強い発現誘導が見られた。しかしながら、感染後24時間ではコシヒカリBL3号の遺伝子発現誘導のピークを過ぎてしまっている可能性があるため、より早いステージでの解析が必要であると考えられる。

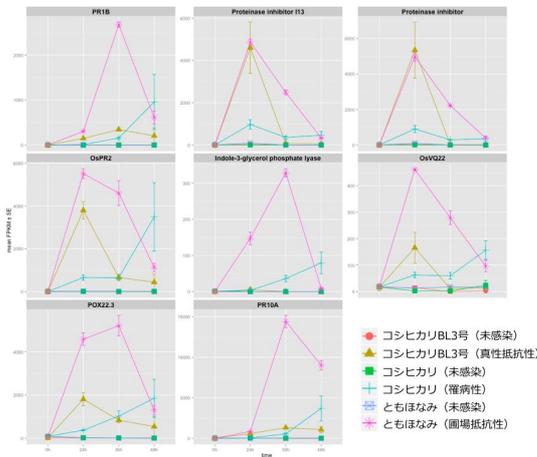


図 1 代表的なイネ遺伝子についての感染時系列遺伝子発現プロファイル

また、いもち病菌側の遺伝子発現解析については、イネと比べて総リード数が少ないため、サンプル間の遺伝子発現量のバラつきが大きくなってしまい、解釈が困難であった。しかしながら、Common1 や BAS1 のように付着器形成時では発現しておらず、感染 24~48 時間で誘導がかかる遺伝子の存在が明らかになった(図 2)。また、宿主植物の抵抗性反応の違いにより、それらの遺伝子発現プロファイルにも違いが見られることが明らかになった。

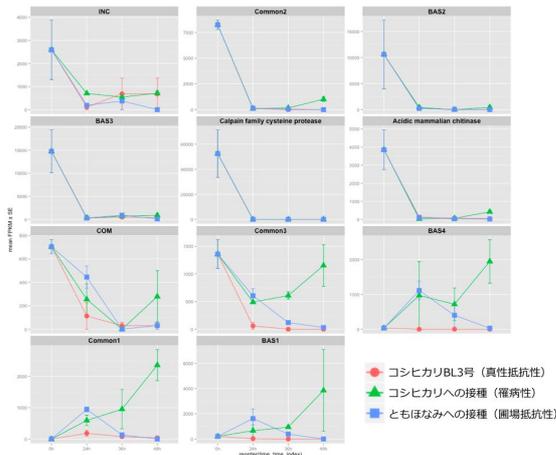
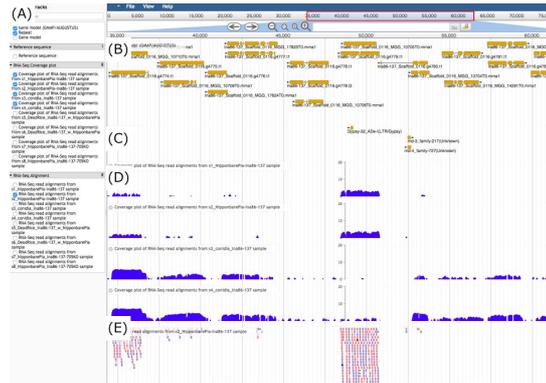


図 2 代表的ないもち病菌遺伝子についての感染時系列遺伝子発現プロファイル

以上の結果からイネといもち病菌の感染時相互作用の過程で、その相互作用の種類(罹病性、真性抵抗性、圃場抵抗性)によってイネといもち病菌双方の攻撃と防御に関わる遺伝子の発現プロファイル(発現誘導のタイミング)が異なっており、これらのプロファイルの違いを更に詳細に調べていくことによって、感染や防御のメカニズムに関する新たな知見が得られることが期待される。

これらの研究成果を広く閲覧し、さらなる研究へ有効に活用されることを目的としてデータベース構築を行った。このデータベースはウェブブラウザ経由で閲覧可能であり、本研究で構築した P91-15B 株のゲノム配列と遺伝子アノテーション情報、さらに感染時系列 RNA-Seq 情報を俯瞰可能とするものである(図 3)。



(図 3) ゲノム上の (A) 転写産物、(B) リピート領域、(C) RNA-Seq による転写活性情報や (D) 個々のリードのアラインメント状況が概観可能なゲノムブラウザー

また、P91-15B 株ゲノムや転写産物配列への BLAST 検索機能も備えている。本データベースについては本成果の論文と同時に公開する予定である。

<引用文献>

- Dean RA et al. (2005) Nature 434(7036):980-6
- Soanes DM et al. (2012) PLoS Pathog 8(2):e1002514
- Mosquera G et al. (2009) Plant Cell 21(4): 1273-90
- Kawahara Y et al. (2012) PLoS ONE 7(11): e49423

5. 主な発表論文等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 善浩 (KAWAHARA, Yoshihiro)

研究者番号: 30546370