

研究報告書

「病原ゲノミクスによる土壌診断法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 浅井 秀太

1. 研究のねらい

植物と微生物は、自然界で絶えず接し、必要な環境条件がそろった時に、ごく一部の微生物が特定の植物種にのみ感染して発病させることができる。近年の急速な気候変動下において、病害を回避し、安定した食料生産を実現できるのだろうか？本研究では、土壌病害に焦点を当て、情報科学と農学を融合することにより、この課題解決を目指した。具体的には、圃場調査を実施し、どの環境要因が病気の発生に影響を与えているかを明らかにすることで、病害発生を予測するモデル構築を目指した。また、上述したように、特定の微生物が特定の植物種に対してのみ病原となり得るため、作付けを行う土壌に生存する病原微生物を特定できれば、病害を回避することができる。そこで、土壌微生物の病原性を特定する手法の確立も本研究の達成目標とした。

近年のシーケンス技術の発展に伴い、土壌環境中に存在する微生物種の特特定までは可能となっているが、どの作物に対して病原となり得るのかについては評価できないのが現状である。例えば、世界中で重大な土壌病害を引き起こしている糸状菌フザリウム (*Fusarium oxysporum*) には、それぞれ異なる植物種に感染する 120 種類以上の分化型 (forma specialis; f.sp.) が存在することが知られている。フザリウムは、菌の生育には必須でなく、病原性など特定の形質を支配するゲノム領域を小型染色体上に保持しており、それにより宿主が決定していると考えられている (Nature 2010 464:367-373)。しかし、それらゲノム領域の機能や構造についてはほとんどわかっていないため、土壌中に生息する病原性フザリウム分化型の評価ができない。本研究では、土壌病原微生物フザリウムのゲノム情報 (比較ゲノム解析) を基に、現在の解析技術では調べることができない病原性の特定を可能にする手法を確立し、全国の圃場環境調査による、植物を取り巻く環境のビックデータに基づいた病害発生予測モデルを構築することで、作付け段階での病害の回避を可能にする技術基盤開発を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

土壌病原微生物フザリウムの異なる分化型間で比較ゲノム解析を行い、それぞれの分化型特異的ゲノム領域を明らかにすることで、「病原性の特定を可能にする手法の確立 (分化型解析マーカーの構築)」を試みた。PacBio シーケンスにより、計 28 のフザリウム菌株の全ゲノム配列を明らかにした。その内、先行的に解析を進めた計 11 菌株に、すでにゲノム情報が報告されていた 4 菌株を加えた計 15 菌株間で比較ゲノム解析を行い、分化型特異的ゲノム領域を明らかにした。分化型特異的ゲノム領域を基に、分化型解析マーカーを構築し検討した結果、いくつかのフザリウム分化型については、特異的な検出を可能にするマーカーを確立することができた。

分化型特異的ゲノム領域の有無により、宿主特異性(感染の成否)が決定すると考えられるため、持続的に利用可能な分化型解析マーカーを構築するには、宿主特異性決定機構を明らかにすることも重要である。そこで、キャベツ菌(*f.sp. conglutinans*)を、モデル菌株として、その「宿主特異性決定機構の解明」を試みた。薬剤処理により、宿主への病原性が低下した染色体喪失株を得て、その喪失株のゲノム解析により、欠損ゲノム領域を特定した。解析を進めた結果、宿主への感染に必要な2つの遺伝子を含むゲノム領域を明らかにした。

全国各地のフザリウムによる病害が発生した圃場より、継時的な土壌サンプルを採取すると共に、圃場環境調査を行った。その内、一年を通したフザリウムによる発病率のデータを取得することができた茨城県のミズナ栽培圃場の解析データを基に、フザリウムによる「病害発生予測モデルの構築」を試みた。具体的には、一週間の平均気温や土壌の化学性調査結果、および土壌の微生物叢(バクテリアおよび真菌)解析結果を使用した。これら環境要因と発病率との相関について調べたところ、気温と発病率においては、相関が見られたが、他の観測データとの間には相関が見られなかった。今回、対象とした土壌サンプルにおける微生物叢解析結果については、検出された微生物量が極端に少ないなどの問題もあった。気温と発病率との間に相関が見られたことから、隠れマルコフモデルを採用し、気温変化によるフザリウム菌体量および発病率の推移予測モデルの構築を試みたところ、19.9℃という気温を超えてくると、発病率が増加することが予測された。

(2) 詳細

研究テーマA「病原性の特定を可能にする手法の確立(分化型解析マーカーの構築)」

フザリウムの異なる分化型間で比較ゲノム解析を行い、それぞれの分化型特異的ゲノム領域を明らかにすることで、分化型解析マーカーの構築を試みた。ロングリードシーケンサー PacBio Sequel システムを用いて、計 28 のフザリウム菌株の全ゲノム配列を明らかにした。Busco 解析の結果、すべての菌株において >98.5%の推定ゲノムカバー率を示し、菌株間で推定ゲノムサイズの差異が見られた。これら菌株の内、先行的に解析を進めた、キャベツ菌(*f.sp. conglutinans*)、ダイコン菌(*f.sp. raphani*)、コマツナ菌(*f.sp. rapae*)、レタス菌(*f.sp. lactucae*) 2 株、タマネギ菌(*f.sp. cepae*)、ホウレンソウ菌(*f.sp. spinaciae*)、エンドウ菌(*f.sp. pisi*) 2 株、バナナ菌(*f.sp. cubense*)、非病原性株の計 11 菌株に、すでにゲノム情報が報告されていた 4 菌株を加えた計 15 菌株間で比較ゲノム解析を行い、分化型特異的ゲノム領域を明らかにした。フザリウム分化型の宿主範囲は、同じ科の植物においては、一部宿主の重複が見られることがある。そのため、分化型特異的ゲノム領域に加えて、同じ科の植物を宿主とする菌株において共通に保存されているゲノム領域についても明らかにした。例えば、キャベツ菌、ダイコン菌、コマツナ菌が共通に持っており、他の分化型には保存されていないゲノム領域をアブラナ科菌共通ゲノム領域とした。

以上の解析により明らかになった分化型特異的(および同科共通)ゲノム領域を基に、分化型解析マーカーを構築した。その内、アブラナ科菌、タマネギ菌、ホウレンソウ菌それぞれのマーカーについて、計 146 のフザリウム菌株のゲノム DNA を用いて特異性の確認を行った。その結果、アブラナ科菌マーカーが 97.3%、タマネギ菌マーカーが 92.5%、ホウレンソウ菌マーカーが 100%の特異的検出結果を示した。また、それぞれのフザリウム分化型を用いて人工的

に作製した汚染土より抽出した DNA においても、特異的に検出できることを確認した。

以上の結果から、本研究を通して、いくつかのフザリウム分化型については、特異的な検出を可能にするマーカーを確立することができた。

研究テーマ B 「宿主特異性決定機構の解明」

分化型特異的ゲノム領域に座乗する病原性因子は、宿主特異性(感染の成否)を決定する因子であると考えられる。そのため、持続的に利用可能な分化型解析マーカーを構築するには、宿主特異性決定機構を明らかにすることも重要である。そこで、キャベツおよびモデル植物であるシロイヌナズナに感染することができるキャベツ菌をモデル菌株として、その宿主特異性決定機構の解明を試みた。

PacBio シーケンスおよびオプティカルマッピングにより、22 本のスキャホールドで構成される、68.8 Mb のキャベツ菌の全ゲノムマップを得た。キャベツ菌において、薬剤処理により、キャベツ・シロイヌナズナ双方への病原性が低下、またはシロイヌナズナへの病原性のみが低下した小型染色体喪失株を得た。続いて、それら喪失株のゲノム解析により、欠損ゲノム領域を特定した。トランスクリプトーム解析を実施したところ、欠損ゲノム領域に隣接して座乗している2つのエフェクター候補遺伝子が宿主への感染時に高発現していることを明らかにした。これら2つのエフェクター候補遺伝子を含むゲノム領域を、シロイヌナズナへの病原性のみが低下した小型染色体喪失株に導入したところ、シロイヌナズナへの病原性が復帰した。

以上の結果より、シロイヌナズナへの感染に必要な2つのエフェクター候補遺伝子を含むゲノム領域を明らかにした。

研究テーマ C 「病害発生予測モデルの構築」

茨城県(ミズナ)、宮崎県(ダイコン)、長野県(レタス)、北海道(ホウレンソウおよびタマネギ)の上記品目においてフザリウムによる病害が発生した圃場より、経時的な(月に一度)土壌サンプルを採取すると共に、圃場環境調査を行った。併せて、転炉スラグという土に混ぜ込むことで、フザリウムによる病害が抑えられる資材を導入した管理圃場(ホウレンソウを作付け)からも経時的な土壌のサンプリング、および発病調査をはじめとした圃場環境調査を行った。これら品目の内、ミズナは年中作付けがされており、一年を通したフザリウムによる発病率のデータを取得することができた。そのため、2016 年より 2018 年の土壌および圃場環境の解析データを基に、フザリウムによる病害発生予測モデルの構築を試みた。具体的には、一週間の平均気温や土壌の pH、窒素・リン酸・加里含量などの化学性調査結果、および土壌の微生物叢(バクテリアおよび真菌)解析結果を使用した。気温と発病率との相関については、発病率の測定結果が得られている計 64 点でのデータを使用、その他については結果が得られている計 91 点のデータを使用した。発病率測定と観測日がずれている場合、発病率のデータを密度推定し、その他データの観測日に対応する予測値を取得し、使用した。微生物叢解析については、経時的かつ量的な変動を評価するため、一般的に用いられているメタバーコーディング法に標準 DNA を利用することにより、定量的な解析を行った。

はじめに、発病率とそれぞれの観測データについての相関関係について調べたところ、気温と発病率においては、相関が見られた(相関係数:0.627)が、他の観測データとの間には相

関が見られなかった(相関係数: < 0.1)。また、相関がみられなかった観測データを説明変数、発病率を目的変数として回帰モデルを構築し、lasso で推定してみても、変数として1つも選択されなかった。微生物叢(バクテリアおよび真菌)解析のデータについては、種レベル、属レベル、門レベルと細分を変えたデータについても、解析を行ったが、結果は変わらなかった。中には、フザリウム属菌の定量的なデータも含まれていたが、予想に反して、相関が見られなかった。データの詳細を確認したところ、対象とした茨城県の圃場サンプル由来の微生物叢解析結果は、検出された微生物量が極端に少なく、フザリウム属菌についても、サンプルによっては全く検出されていないものが含まれていた。この結果と一致するように、研究テーマ A で作製したアブラナ科植物を宿主とするフザリウム分化型を特異的に検出するプライマーを使用した定量 PCR によっても、検出がうまくいかなかった。他の圃場由来の土サンプルでは、十分に微生物叢解析結果が得られているため、今後、土質に合わせた効率的な DNA 抽出法を検討する必要があるだろう。

上記の解析を通して、気温と発病率との間に相関が見られることがわかった。今回のデータが時系列データであるため、隠れマルコフモデルを採用し、気温変化によるフザリウム菌体量および発病率の推移予測モデルの構築を試みた。気温がフザリウム菌体量に影響を与え、フザリウム菌体量が、最終的な発病率に影響を与えているという仮説の基、気温と発病率の測定結果を使用し、解析を行った。その結果、 19.9°C という気温を超えてくると、発病率が増加することが予測された。

3. 今後の展開

本研究を通して、土壤病原微生物フザリウムの病原性(宿主とする植物)を特定できる手法について一部確立することができた。この成果は、微生物種の特定までに留まっていた従来の微生物叢解析に病原微生物の特定という新たな要素を加えるコンセプトとなり得る。同様のアプローチにより、他の土壤生息病原微生物についても診断可能な技術開発に繋がることが期待される。また、キャベツ菌をモデルとして、その宿主特異性に関わる重要なゲノム領域を明らかにした。持続的に利用可能な分化型解析マーカーの構築のため、同様のアプローチにより、他のフザリウム菌株においても、病原性に関わる重要な遺伝子およびその機能について明らかにしていく。以上の様に、表現型(病原性)とマーカー(ゲノム領域)の紐付けを進めると共に、現場での迅速かつ簡易な診断を可能にするキット(デバイス)の開発を進めていく。

病害発生予測モデルについては、気温と発病率の相関について、一部予測を可能にする結果を得ることができた。しかし、今回対象とした土壤サンプルにおいて、検出された微生物量が極端に少ないなどの問題があり、当初予定していた分化型解析マーカー由来のデータを取得し、利用することができなかった。これについては、同サンプルでの再解析を検討すると共に、他の圃場由来の解析データを基に、病害発生予測モデルの構築を進めて行く。

4. 自己評価

「研究のねらい」で記載した通り、本研究では、情報科学と農学を融合することにより、作付け段階での病害回避を可能にする技術基盤開発として、土壤微生物の病原性を特定する手法の確立と病害発生予測モデルの構築を達成目標とした。病原性を特定する手法の確立については、一部ではあるが、精度の高い検出系を確立することができた。病害発生予測モデ

ルの構築については、サンプル調整における不運もあったが、本研究期間内に、上記の手法により得られる結果を反映させることができなかった。この点については、今後の課題とする。

これまでは、土壌病原微生物の生存や病原性について調べる手法がなかったため、現場では、経験則により、病害防除法(土壌消毒・還元消毒・農薬の散布など)の選定や病害の発生予察がなされてきた。本研究を通して確立した(今後、確立する予定の)土壌微生物の病原性を特定する手法や病害発生予測モデルを利用することで、病害防除効果を数値として評価することも可能となり、適切な時期・回数および防除法の選定が可能となる。また、近年の急速な気候変動下においても、病害の回避を可能にすることが期待される。つまり、将来的には、作付け段階での作物の選定や防除法について、農業関係者への的確な提案が可能となり、病害防除への貢献はもちろん、農薬過剰散布の回避など、生態系の保全や、費用・労力の低減といった環境的、経済的な利益への貢献も期待される。

本研究開始当初は、情報科学の知識は皆無であったが、本研究を通じて、知識を身に付けると共に、情報科学に長けた研究者の方々と交流を持てたことが、大きな財産となった。この経験を活かし、今後、情報科学と農学を繋ぐ役割を担っていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Asai S., Ayukawa Y., Gan P., Masuda S., Komatsu K., Shirasu K. and Arie T., “A high-quality draft genome sequence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strain 160527, a causal agent of Panama disease” *Microbiology Resource Announcements* 8:e00654–19, 2019

(2)特許出願

研究期間累積件数：0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)

主要な学会発表 ○:発表者

1. ○浅井秀太, 鮎川侑, Gan Pamela, 増田幸子, 有江力, 白須賢 “比較ゲノム解析を通じたフザリウム分化型解析マーカーの構築と応用” 令和2年度植物病理学会大会 [鹿児島] 2020年3月
2. ○浅井秀太, 鮎川侑, 増田幸子, 有江力, 白須賢 “比較ゲノム解析を通じたフザリウム分化型解析マーカーの構築” 令和元年度植物病理学会関東部会 [東京] 2019年9月
3. ○浅井秀太 “圃場病原ゲノミクス - 土壌診断法の開発にむけて -” 第12回フザリウム研究会 [秋田] 2019年9月 *基調講演
4. ○浅井秀太, 鮎川侑, 白須賢 “フザリウム分化型解析マーカー構築に向けた比較ゲノム解析” 平成30年度植物病理学会関東部会 [東京] 2018年9月
5. ○浅井秀太 “圃場病原ゲノミクス - 土壌診断法の開発にむけて -” 平成30年度(第28回)植物細菌病談話会, [高知] 2018年8月 *基調講演

受賞

1. 日本植物病理学会学術奨励賞 2020年3月

著作物

1. 浅井秀太 “圃場病原ゲノミクス - 土壌診断法の開発にむけて -” 植物細菌病談話会
論文集(第28号)ISSN 1346-5767, 日本植物病理学会, 高知 28:34-39, 2018.