

# 研究終了報告書

## 「多検体オミクスによる混植系の構築と虫害制御」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：佐藤 安弘

### 1. 研究のねらい

フィールドでは、異なる作物を混植すると虫害が減少することが知られている。しかし、どのような植物を混植すれば虫害を軽減できるかは経験則に基づいており、体系だった方法論は未だない。近年、我々は、シロイヌナズナ属の野生種において、毛状突起を持つ個体と持たない個体が狭い空間に混在していることによって、毛状突起による虫害抵抗性が高まることを見出した。この近傍効果の現象にオミクス解析を適用すれば、植物個体間の相互作用を担う遺伝子や形質が網羅的に評価でき、それらの知見を混植による害虫防除に応用できるのではないかと考え、本さがけ課題を提案するに至った。

本課題では、特定の形質を狙って混植系を構築する方法を確立することで、他の形質に影響を与えずに虫害を抑制することを狙いとしました。シロイヌナズナ野生系統とアブラナ科作物を対象に、集団レベルでの防御応答の分子機構を解明し、近縁な作物でも混植して虫害を制御することを目標に掲げ、以下の3つのテーマを提案した。

研究テーマA「ゲノム情報から混植すべき系統を予測する」

シロイヌナズナの野生型200系統1000個体以上を野外に移植して個体ごとに虫害を評価する。周囲の植物個体の遺伝子型を考慮したゲノムワイド関連解析(GWAS)の手法を新たに確立することで、数百系統の無作為な配置から混植の候補となる組合せを予測する。さらに、予測を基に混植区を作成して実際に虫害が減少するかを検証する。

研究テーマB「遺伝子発現から混植による虫害制御の分子機構に迫る」

GWASでは、遺伝相関が検出できても偽陽性である可能性が排除できない問題がある。本研究では、多検体RNA-Seq法を組み合わせて、現象の鍵となる植物の形質多型とその原因となる遺伝子を絞り込む。これにより、混植による虫害抑制の分子機構を理解するとともに、同様の形質をもつアブラナ科作物に対しても混植による虫害の制御を展開する。

研究テーマC「動画像認識により虫害の計測を容易にする」

虫害の計測には微細な昆虫を野外で同定し数える必要があるため、表現型の取得に経験を要する。本研究では、複数名の調査者による大規模調査を可能にするために、動画像から食害昆虫を認識してその場で調査員に知らせる技術を開発する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

2017-2019年までの間に、シロイヌナズナ野生系統述べ8600個体を野外圃場に移植し、付着した昆虫を全て同定して数え上げる調査を、一個体あたり7回行った(8600株×7回調査=述べ調査数60,200個体)。うち2400個体について、Lasy-Seq法(Kamitani et al. 2019 *Scientific Reports*)に基づく多検体RNA-Seqを行い、葉の遺伝子発現の情報を得た。野外実験に合わせて虫の動画や写真を集め、深層学習による動画像解析に利用した。

表. シロイヌナズナ野生系統を栽培して得た野外データの一覧

地点/年	2017	2018	2019
日本	虫害: 200系統8反復 1600個体 RNA: 200系統3反復 600個体	虫害: 200系統8反復 1600個体 RNA: 200系統3反復 600個体	虫害: 200系統3反復 600個体
スイス	虫害: 200系統8反復 1600個体 RNA: 200系統3反復 600個体	虫害: 200系統8反復 1600個体 RNA: 200系統3反復 600個体	虫害: 200系統3反復 600個体 混植実験: 3ペア6系 統1000個体

一連の野外調査において、スイス(チューリッヒ)では2種類のノミハムシが、日本(滋賀県)ではシロチョウやコナガなどの鱗翅目幼虫が多く発生した。スイスでの野外調査では期間中一貫してキスジノミハムシ(*Phyllotreta striolata*、以下キスジ)とムモンキスジノミハムシ(*Phyllotreta atra*、以下ムモン)が多く発生したのに対して、日本では年によって優占する植食性昆虫の種や密度が大きく異なった。このため、3年時以降はスイスの調査地で発生したノミハムシ2種に注力して、混植実験や動画像解析を実施した。なお、2016年には同地点で19系統を用いた予備実験を行っており(Sato et al. 2019 BMC Plant Biol)、実験の季節や手順はそれらに準じた。スイスでの野外実験は清水健太郎教授(植物頑健性 CREST、チューリッヒ大学・横浜市立大学)と、多検体 RNA-Seq は永野惇准教授(植物頑健性 CREST、龍谷大学)と共同で行った。

本課題では、近傍個体を考慮した GWAS や畳み込みニューラルネット(CNN)を2段階にわけける解析手法を新たに考案し、シロイヌナズナの表現型やノミハムシの動画像にそれぞれ適用した。GWAS からは、近傍個体間の相互作用を組み込んだモデルが、従来の GWAS モデルよりもノミハムシによる虫害をより良く説明できることが明らかになった。動画像解析では、CNN を検出と識別の2段階に分けることで、野外で撮影した動画からキスジとムモンを8割近くの精度で判別できるようになった。

しかし、GWAS と RNA-Seq を組み合わせて絞り込んだ候補遺伝子群には機能未知のものが多く含まれ、原因遺伝子の特定や近縁な作物への応用までは至らなかった。これらの目標に向けた前段階として、原因遺伝子の特定に向けてはノミハムシの飼育法の確立を、他の植物への応用に向けては GWAS 手法の拡張と R パッケージ化をそれぞれ行い、一定の成果を得た。以下に各テーマの詳細を記す。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ゲノム情報から混植すべき系統を予測する」

GWAS に近傍個体間の相互作用を組み込むために、磁場の統計物理モデル(イジング模型)を線形混合モデルに拡張した。個人研究者が提案したモデルを元に、同領域の山本英司研究員と共同でシミュレーションを行って正答率を評価した。その結果、近傍個体の参照範囲を広げながら説明可能な表現型分散の割合を推定することで、近傍効果の真の空間範囲を逆推定できることが明らかになった。GWAS で頻繁に問題となる集団構造についても、従来の遺伝的類似度に加えて近傍効果の類似度も変量効果に考慮することで、p 値の

過大評価を抑えることができた。一連の解析手法を”Neighbor GWAS”と名付け、R 言語のパッケージとして Comprehensive R Archive Network (CRAN)に登録した(論文 1., その他の成果 3.)。

食害率、優占植食者の密度、昆虫の種数を表現型として、新規に開発した Neighbor GWAS を 2017 年から 2018 年にかけて日本とスイスで取得したデータに適用した。その結果、通常の GWAS モデルよりも Neighbor GWAS の方が、食害率や昆虫の種数の分散を有意に良く説明できることが明らかになった(図 1a)。加えて、2019 年のデータを検証用データとして、LASSO によるスパース回帰を適用したところ、近傍個体を説明変数に考慮した方が食害率の予測能力(未知のデータセットに対する観察値と予測値の相関係数)が僅かに改善することも明らかになった。虫害を例とした解析から、従来の GWAS では説明不可能な複雑形質の空間異質性が Neighbor GWAS で説明できる可能性が示唆された。

さらに、2017-2018 年のデータに対して LASSO 回帰を行って主要な SNP マーカーを選び、それらを基にした形質予測値から混植すると互いに虫害が抑制される系統を推定した。2019 年には推定上位 3 ペア計 1008 個体をスイスの野外圃場に移植した。その結果、全体として混植区では単植区よりもノミハムシによる虫害が約 10%軽減された。3 ペアのうち、1 ペアでは 2 系統両方で、別の 1 ペアでは片方の系統で、混植条件で虫害が減少することが確認された。複数年の結果を得るために、2020 年も同様の実験を行う予定であったが、新型コロナウイルス拡大に伴う渡航自粛要請に従い、やむなくスイスでの野外調査を中止した。

2019 年の混植実験では、混植による虫害抑制につながる野生系統ペアを見出すことができた。今後これらの交配後代を解析するために、実証試験に先立って Neighbor GWAS を QTL マッピング用にも拡張した。Neighbor GWAS と同じくシミュレーションで有効性を確認するとともに、シロイヌナズナ Col x Kas 近交組換え系統をキスジノミハムシに摂食させた予備試験も行った。一連の手法を Neighbor QTL と名付け、R パッケージを CRAN に登録して手法論文を公開した(論文 2., その他の成果 4.)。

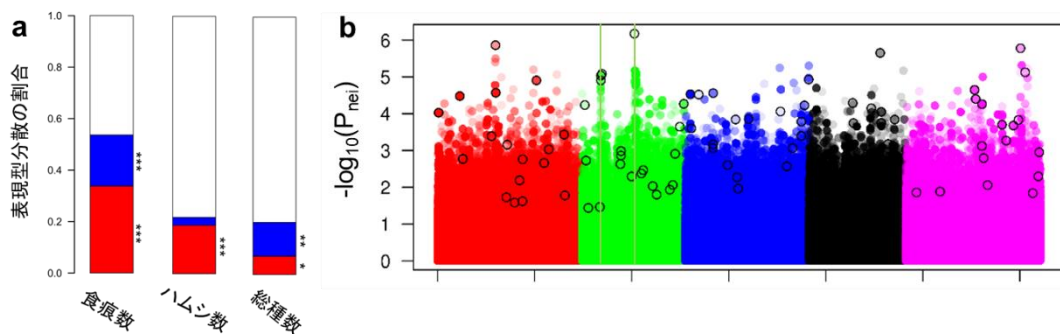


図 1. (a) スイスの調査地において、自身の遺伝子型(赤)と近傍個体の効果(青)で説明できた表現型分散の割合。アスタリスクは尤度比検定による有意差を示す(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。 (b) ノミハムシの食痕数に対する近傍個体の効果の GWAS。○は LASSO 回帰で選ばれた SNP を示す。

研究テーマ B 「遺伝子発現から混植による虫害制御の分子機構に迫る」

テーマ A で行った食害率・優占植食者の密度・昆虫の種数に対する GWAS から、近傍個体間の相互作用に関連するゲノム領域を絞り込んだ(多重比較補正前の p 値が 0.0001 以下)。スイスで観察したノミハムシの食痕数に対しては、p 値が期待値よりも高い領域が 2 番染色体上に 2 箇所見られた(図 1b の緑縦線 2 本)。さらに、RNA-Seq のデータから、発現レベルが低く( $\log_2(\text{rpm}+1)$ )の平均が 1 以下)かつ遺伝率が低い(多重比較補正前の p 値が 0.05 以上)遺伝子を除外したところ、180 遺伝子まで絞り込まれた。

シロイヌナズナではグルコシノレート関連遺伝子の発現量に野生系統間で極めて大きな変異があることが分かっていた(Sato et al. 2019 Frontiers in Genetics)。しかし、近傍個体に関わる候補遺伝子群にはこれらの遺伝子のごく一部しか含まれず、さらなる検証が必要となった。まず、ピーク周辺に位置する遺伝子群に注目して、発現量を表現型とした GWAS を行った。その結果、いずれの遺伝子の発現量でも近傍個体の効果には有意な GWAS ピークが見られなかったことから、発現量自体は自身の遺伝子型に依存するものと考えられた。これらのうち数個の候補遺伝子について、T-DNA 挿入変異体を取り寄せ、予備的なバイオアッセイを行った。同時に、ノミハムシ類の飼育も試み、幼虫には根菜を、成虫には葉物のアブラナ科野菜を与えることで継代飼育に成功した。

アブラナ科作物での応用に向けては、滋賀県湖南市のタキイ種苗(株)研究農場を訪問して、本課題について意見交換を行った(受入:田中和幸アドバイザー)。残念ながらシロイヌナズナで絞り込まれた候補遺伝子群は既知の育種対象形質と異なったため、近縁作物での混植に至らなかったが、応用の方向性について有益なコメントを受けることができた。

#### 研究テーマ C 「動画像認識により虫害の計測を容易にする」

現場でリアルタイムに利用することを想定して、動画を対象に深層学習による画像認識を応用した害虫同定システムの開発を進めた。昆虫の動画像の収集を個人研究者が行い、深層学習による動画像解析を滝本裕則准教授(岡山県立大学情報工学部、永野 CREST 参加者)と共同で進めた。当初は撮像にスマートグラスを用いる計画であったが、体長数 2-3 mm ミリのノミハムシ(図 2)を撮影するには接写が不十分であった。そのため、市販のウェブカメラ Logicool C920r(1920×1080 画素)を軽量化したデバイスで微小昆虫を撮影した。ウェブ検索で収集した画像と 2017-2018 年の野外実験時に撮影した画像を合わせて学習に用い、2019 年の野外実験時に撮影した動画を用いて検証した。

野外で撮影したキスジノミハムシ(キスジ)とムモンキスジノミハムシ(ムモン)の動画に YOLOv2 適用した結果、(i)背景を虫と誤認する、(ii)ムモン(黒色)をキスジ(黄色ストライプあり)と誤認するという問題点が浮き彫りになった。そこで、YOLO で高速に検出した虫候補領域を、別の CNN(Xception)で精査して再識別する 2 段階の解析を試した。その結果、キスジ-ムモンを 8 割近くの精度で判



図 2. 野外栽培したシロイヌナズナ上のキスジ(青枠)とムモン(赤枠)の検出例。虫の体長は 2-3mm である。

別することができた。適合率は 0.77、再現率が 0.36、両者を統合した F 値は 0.50 となり、YOLO のみの解析の F 値と比較して 29%改善した(その他の成果 2.)。解析の過程で、野外背景からノミハムシ類を検出するには最低でも 40 x 40 画素が必要であること、胴体だけの学習画像で十分に検出できることなども明らかになった。今後、別の撮像や害虫種に拡張する上では、これらの詳細にも注意する必要がある。

### 3. 今後の展開

テーマ A では、新規に開発した Neighbor GWAS を独自に収集した野外データに適用して、近傍個体間の相互作用を担うゲノム基盤の一端を明らかにした。ゲノム情報に基づく推論を外装することで、混植による虫害抑制についても方法論を提示した。野生系統を用いた概念実証については、単年度の野外実験で手がかりを掴んだ段階にあり、今後さらに追試する。技術開発の側面からも、Neighbor GWAS を R パッケージとして利用しやすい形で配布することができた。また、今回提案した GWAS の新手法は、よく研究された磁場の統計物理モデルを基にしている。その最適化問題について興味深い性質があるようなので、理論的な側面は科研費若手研究に引き継いで地道に掘り下げていく。

テーマ B では、RNA-Seq と GWAS を組み合わせることで、変異体解析が現実的となる数まで候補遺伝子を絞り込んだ。結果的に候補遺伝子群が既知遺伝子と異なり、責任遺伝子の同定には至らなかったものの、今後の実験に向けて昆虫の飼育系を確立した。今後は、発現データの再精査と変異体を用いたバイオアッセイと交互に進めることで、責任遺伝子の同定を目指す。変異体解析が難航する場合は、テーマ A で開発した Neighbor QTL 法(論文 2.)を野生系統ペアの交配集団に適用することで、候補遺伝子をさらに絞り込む。

テーマ C では、微小物体の検出と識別の観点から、野外背景下の害虫検出に特化した改善策を提示することができた。現時点で実用化できる形にはなっていないが、CNN のアルゴリズムや専用ハードウェアは日々進歩しているため、要素技術のアップデートによって処理速度やデバイスの改善が期待できる。

以上を踏まえ、今後まずはシロイヌナズナで混植実験の追試とバイオアッセイを進めて方法論を完成させ、その後は作物や他の植物にも応用範囲を拡大していく。その際に、本課題で開発した量的遺伝学や動画像処理の手法を活かして、より効果的な運用を図る。

### 4. 自己評価

#### 【達成状況】

日本と欧州を往来しての大規模野外実験は肉体的に辛かったが、領域最年少として全力でフィールドワークを押し進めた。結果的に、個人研究としては限界に近いデータを得ることができたと感じている。潤沢な予算のおかげで数千株も RNA-Seq を行うことができ、野外実験に投じた労力を最大限に活かすことができた。本課題の中心的アイデアであった Neighbor GWAS についても、領域内の共同研究を通じて予定以上に検証が進み、課題期間内に手法論文を発表することができた(論文 1.)。ノミハムシの動画像解析については、ハードウェアに実装する段階までは至らなかったものの、野外背景下でも複数種を識別できた点で一定の成果が得られた。

一方で、当初期待していたほど GWAS の結果は単純ではなく、その後の原因遺伝子の特定

から作物への応用までは達成できなかった。実証研究から得られた知見はモデル植物に求められる水準に遠く及ばないことは重々承知しており、実験に投じるエフォートが不十分であったことも反省している。加えて、最終年度はコロナウイルスの問題で野外調査やバイオアッセイが進まず、残念な結果となった。今後はやり遂げられなかった野外実験と変異体解析に集中して成果を論文にまとめたい。

#### 【研究の進め方】

さがかけ専任研究者として、ほぼ 100%のエフォートを本課題のみに投じた。個人研究者が主体となって計画を進め、スイスでの野外実験では清水健太郎教授(植物頑健性 CREST、チューリッヒ大学・横浜市立大学)と、多検体 RNA-Seq では永野惇准教授(植物頑健性 CREST、龍谷大学)と共同研究を行い、関連する CREST 領域とも連携できた。特に、永野 CREST 参加者でもある滝本裕則准教授と行った昆虫の動画像解析は、工学系研究者との初の共同研究ともなった。その他にも、JST 植物関連領域との関わりを通じて、農学・植物生理学・情報学系の研究者とのネットワークが格段に広がった。在任中は、自身の学位取得分野(生態学)の外側に出ることを常に意識し、農学・植物生理学・情報学系の学会や集会にも参加・発表した。逆に、JST 植物関連領域を通じて知り合った研究者をシンポジウムに招いて、当該分野の意義を植物生態学分野に対して発信することもできた(その他の成果 1.)。バーチャル研究機関としてのさがかけに大きく感化された数年であったと思う。

専任研究者として課題に専念できた反面、予算の運用は不慣れであり不十分であった。日常的な実験や動植物の世話で研究補助員の支援を得ることができたものの、人員交代や短時間・単年度の雇用が多く、場当たりの運用になってしまった感は否めない。維持管理の面から大型機器の購入に躊躇してしまった点も良くなかった。いずれも自身が任期付きの立場であるが故に長期的な計画を立てることが難しかったというのが主な理由である。最終的に、常勤職への就職も成らず、専任のまま課題期間を全うしたこともマイナスポイントであると自覚している。

#### 【成果の波及効果】

概念実証を中心とした課題であったため、モノに依拠した特許にはつながらなかった。作物への応用にも至らなかったため、農業へのインパクトも欠ける。しかし、それらの反面、特定の対象を想定しない形で解析手法を汎化することはできた。本課題で開発した GWAS と QTL の R パッケージは植物の量的遺伝学全般に無償で利用することができる。本課題の延長として、作物を対象に混植による総合的害虫防除を進めることが短中期的な目標に据えられる。長期的には、任意の植物と形質に対象を広げ、フィールドオミクスに基づく生態系管理を通じて、持続可能な開発目標に貢献できればと考えている。そのための種を蒔く期間として本課題があったのだと振り返ることができるよう、まずは目の前の課題から着実に進めていきたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Sato Y, Yamamoto E, Shimizu KK, Nagano AJ. Neighbor GWAS: incorporating neighbor genotypic identity into genome-wide association studies of field herbivory. *Heredity*, 2021, 126, 597-614.

近傍個体間の相互作用を考慮したゲノムワイド関連解析を新たに提案した。シミュレーションで生成した形質と野外栽培したシロイヌナズナの虫害を解析し、提案手法の有効性を示した。さらに、一連の手法を R パッケージ化して R 言語の公式サイトに登録した。GWAS のシミュレーションを同領域 2 期生の山本英司講師と共同で行った。

2. Sato Y, Takeda K, Nagano AJ. Neighbor QTL: an interval mapping method for quantitative trait loci underlying plant neighborhood effects. *G3: Genes Genomes Genetics*, 2021, 11, jkab017.

近傍個体間の相互作用を考慮した回帰モデルを区間マッピング法に拡張した。シミュレーションで生成した形質とシロイヌナズナ近交組換え系統の虫害を解析し、提案手法の有効性を示した。一連の手法を R パッケージ化して R 言語の公式サイトに登録した。

3. Shimizu-Inatsugi R, Milosavljevic S, Shimizu KK, Schaepman-Strub G, Tanoi K, Sato Y. Metal accumulation and its effect on leaf herbivory in an allopolyploid species *Arabidopsis kamchatica* inherited from a diploid hyperaccumulator *A. halleri*. *Plant Species Biology*, 2021, 36, 208-217.

シロイヌナズナ属野生種 3 種の重金属蓄積と虫害の関係を野外で調べ、異質倍数体種が親種の中程度の重金属蓄積と虫害防御を持つことを明らかにした。スイス滞在中にインターンシップの学生(第 2 著者)を指導し、実験計画・野外調査・統計解析に貢献した。ICP-MS による重金属の定量は、本領域 1 期生の田野井慶太郎教授と共同で行った。

## (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

## (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)

1. 佐藤安弘・村中智明. 「使ってみよう先端技術! -オミクス解析と形質測定で迫る植物の生き様-」 第 51 回種生物学シンポジウム. 宮崎. 2019 年 12 月 (シンポジウム企画)
2. Kuzuhara H, Takimoto H, Sato Y, Kanagawa A. Insect pest detection and identification method based on deep learning for realizing a pest control system. The SICE 2020 Annual Conference, Sept. 23-26, 2020. Chiang Mai, Thailand (査読あり・国際会議)
3. rNeighborGWAS: Testing Neighbor Effects in Marker-Based Regressions  
開発者: Sato Y, Yamamoto E, Shimizu KK, Nagano AJ  
公開先: The Comprehensive R Archive Network (CRAN)  
URL: <https://cran.r-project.org/package=rNeighborGWAS>
4. rNeighborQTL: Interval Mapping for Quantitative Trait Loci Underlying Neighbor Effects  
開発者: Sato Y, Takeda K, Nagano AJ  
公開先: The Comprehensive R Archive Network (CRAN)  
URL: <https://cran.r-project.org/package=rNeighborQTL>