

研究終了報告書

「ゲノム・遺伝子倍化が駆動する植物分子の新機能の探索とデザイン」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:赤木 剛士

1. 研究のねらい

植物の進化は速く、非常に多彩である。植物は、わずかな期間での種分化において独自の形態構造や新規有用成分など幅広い形質を獲得し、一見して共通した形質であっても、系統ごとに独立した新しい分子機構を成立させてきた。つまり、植物の分子制御の理解においては、画一的な共通モデルだけではなく、各論(系統ごと)から見える全体の多様性に重要性が置かれるべきだろう。植物における多様性獲得の原動力の一因は「頻繁に起こるゲノム・遺伝子の倍化」と考えられている。倍化は生物に共通した現象であるが、植物は特異的にその頻度が高い。栽培種の多くが近年の倍数化によって生まれたことに加え、植物全体においても現存種の 8 割以上が系統特異的な古ゲノム倍化を経験して新規形質を獲得している。実際、各植物種を代表する独自の形質にはゲノム倍化もしくは遺伝子の大規模な倍化が関与していることが多い。トマトおよびツツジ目果樹作物の進化(Fig. 1)に示されるように、果実研究のモデルとされるトマトにおいて多くの果実成熟関連遺伝子の成立はナス科特異的な古ゲノム倍化に起因しており、カキ・キウイフルーツの性表現の変化はゲノム・遺伝子倍化を基点とした新機能獲得によって成立したものである。ゲノム倍化は、短期的には大きな塩基変異を伴わず、遺伝子量のバランス変化や(エピ)ゲノムの再編成を通して新規形質の発現を可能にし、長期的には、重複遺伝子(パラログ)群における機能分化や新機能獲得によって新規制御系が成立する。

しかし、植物における頻繁な倍化イベントによって生まれた潜在的な新機能因子の大部分は未開拓であるとともに、倍化による遺伝子新機能進化の原動力は未だ全く分かっていない。本研究では、ツツジ目果樹作物を中心としつつ、その外群にあたるナス目・ナデシコ目などのゲノム進化にも着目し、ゲノム学・進化学・AI 技術を含む先端情報科学を融合した学際的なアプローチにより、系統特異的なゲノム・遺伝子倍化に駆動され適応進化の中で種独自に形成された新規機能分子およびその要因の網羅的同定を行い、作物への実装の可能性を探索する。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では以下の 4 点について大きな成果を得ている。1. 古ゲノム・遺伝子倍化が駆動する「新規の遺伝子発現調節(*cis* 因子)」に関する AI 協働モデル化、2. 古ゲノム・遺伝子倍

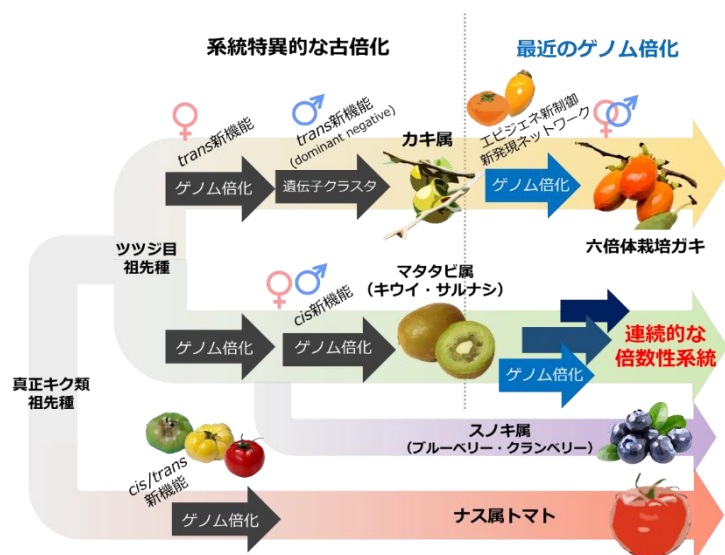


Fig. 1 トマト・ツツジ目植物のゲノム倍化と新形質獲得

化が駆動する「新規タンパク質機能分子 (*trans* 因子)」同定に向けた進化学的アプローチの開発と候補因子の同定、3. 近年のゲノム倍化がゲノム・エピゲノムの再編に及ぼす影響の理解と生殖形質変化の分子メカニズム、4. 重複因子を基点とした性染色体進化の新規概念の開拓、である。

1. トマト・キウイフルーツにおいて、古ゲノム倍化が駆動したと考えられる果実成熟システムについて、その発現制御ネットワークをプロモーター配列(*cis* 因子)からモデル化する AI プラットフォームを構築した。さらに、「説明可能な AI」技術の視点から、その発現パターンの鍵となる領域(残基)を特定し、ゲノム編集によって発現のファインチューニングを目的とした系統群の作成を行った。
2. マタタビ属進化を例として、約 2,000 万年に起こったとされる古ゲノム倍化によって新機能を獲得し、正の適応選択圧を受けたと考えられる系統特異的なタンパク質機能因子の探索を試みた。Episodic positive selection(一過的正の選抜)の検出を行うとともに、AI による予測構造と系統進化間の異質性を検出するスクリーニング法によって、マタタビ属特異的な適応タンパク質機能を有すると考えられる 10 因子の同定に至った。
3. カキの六倍体化における性表現の両全性への回帰、およびサルナシの連続的倍数化に従う単為結果性の獲得、という独立した生殖現象変化について、その鍵となる分子を同定するとともに、エピゲノム状態の連続的推移・サイトカニンシグナルへの受容性の向上、という二点において、これまで植物では未定義である「倍数化による直接的な定向進化要因」の候補を発見した。
4. マタタビ属・カキ属・マンテマ属の pangenome 解読により、極めて頻繁に起こるネオ性染色体の進化や巨大 Y 染色体の早急な進化がいずれも系統特異的なゲノム重複・転移因子に由来しており、形質獲得だけでなく、他殖性・染色体構造進化においても植物特異なゲノム倍化性が鍵となっている可能性を示した。

これらに加えて、特に情報学的なツール類の開拓を行っており、社会実装を目的とした画像から診断・予測および画像データとオミクス情報の融合解析に至るような深層学習系(AI)プラットフォームの構築を多数行った。

(2) 詳細

1. 古ゲノム・遺伝子倍化が駆動する「新規の遺伝子発現調節(*cis* 因子)」に関する AI 協働モデル化

果実作物の成熟に関して、多くの種は自己触媒的エチレン生合成を鍵として細胞壁を分解するという画一的な成熟様相(クライマクテリック型)を示しており、この生理反応には共有祖先をもつ共通分子による制御を前提と考えられてきた。しかし、トマトにおけるゲノム進化学的観点から、系統特異的な古倍化がこの果実成熟ネットワークにおいても新機能分子を成立させており、その発現制御パターンは種特異的である可能性が示唆されていた。一方、プロモーター配列から遺伝子発現の鍵となる *cis* 因子を同定する技術は未だ乏しく、種特異的と考えられる重要 *cis-trans* 相互作用をモデル化する方法論について待望されている状況もあ

った。本研究では、シロイヌナズナの転写因子全ファミリーの大部分をカバーする *cistrome* データへの深層学習により、トマトおよびキウイフルーツにおける全ゲノム遺伝子群プロモーター領域における各転写因子ファミリーが結合可能な *cis* モチーフの予測を行った。これを活用して、果実成熟期における発現変動パターンを応答変数、*cis* モチーフ群の配置推移行列データを説明変数とした一次元 CNN および *transformer* での分類問題解析を行い、発現変動予測モデルを構築した。さらに、説明可能な AI (X-AI) と呼ばれる CNN 逆伝播モデルによって、予測モデルの判断要因、すなわち発現変動の鍵となる *cis* モチーフを同定する技術を確認した (Figure 2; Akagi et al. 2022 *Plant Cell*, Kuwada et al *in submission*)。これらの技術から、トマトとキウイフルーツ果実成熟初期における重要転写因子および寄与率の高い *cis* モチーフを可視化した結果、両者の間に共通項は少なく、エチレンによって誘導される一見すると同じ果実成熟パターン(クライマクテリック型果実成熟)も、系統ごとに独自に形成された集約進化の様相を示している可能性が示唆された。

さらに、トマトにおける CNN 発現予測モデルから、トマトの果実成熟における鍵因子の一つである *NOR* 転写因子の発現パターンに着目し、果実成熟初期のみに寄与するプロモーター残基群・領域を標的としたゲノム編集個体群を作出した。つまり、果実成熟段階で *NOR* の発現は停止し、老化プロセスには発現しないと予測される。現在、T1 世代の多数系統において *NOR* 遺伝子プロモーター塩基変異パターンを検証中である。

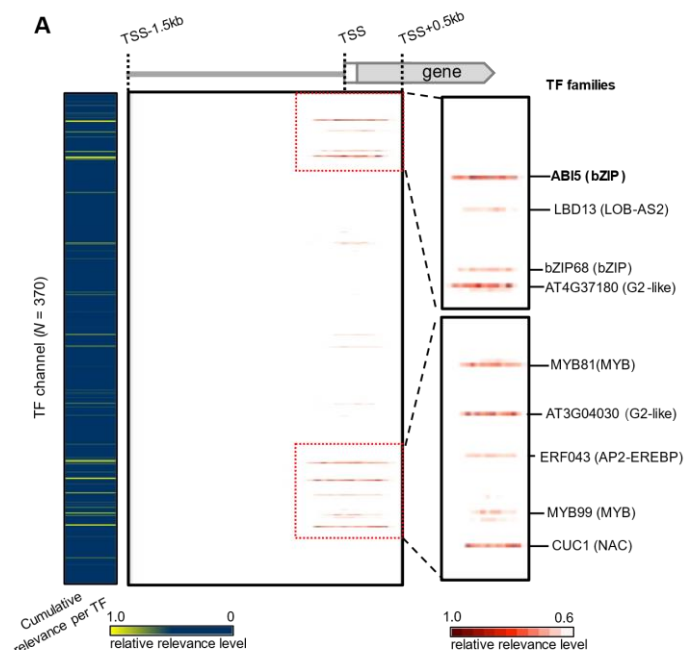


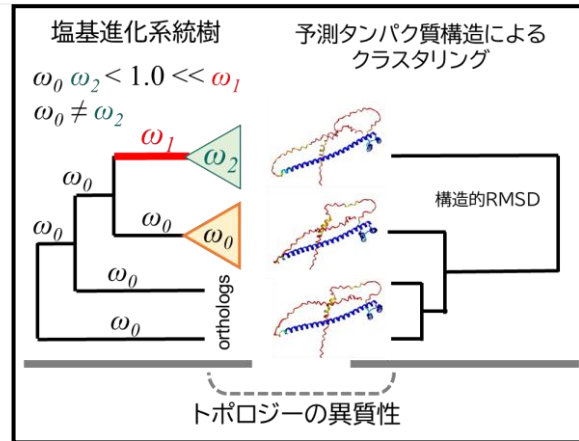
Figure 2: X-AI によるキウイフルーツ果実成熟初期応答における発現上昇によって鍵となった *cis-trans* 相互作用パターンの可視化

2. 古ゲノム・遺伝子倍化が駆動する「新規タンパク質機能分子 (*trans* 因子)」同定に向けた進化学的アプローチの開発と候補因子の同定

マタビ属に共通して起こったと考えられる約 2,000 万年前の全ゲノムワイド倍数化に起因するパラログペアの検出とその進化学的トポロジーに基づき、PAML および BUSTED による枝-サイト特異的モデル解析をゲノムワイド解析用に改編し、パラログの重複ペアにおいてどちらか一方でのみで正の選抜を経験したもの、すなわち、適応進化によって加速度的な機能変化を遂げた可能性のあるもの、を網羅的に同定した。さらに、深層学習によるタンパク質構造予測プログラム AlphaFold2 によって、倍化によって機能が分岐した(オリジナルと新機能)分子種について、その立体構造予測を行った。予測タンパク質構造におけるパラログ-オースログ間の空間的な誤差 (RMSD) を指標とした距離行列と、残基置換ベースの距離行列から

導かれる系統トポロジーの「異質性」を検出することで、新機能分子をフィルタリングできる可能性を見出した (Figure 3)。この結果に基づき、マタビ属進化において特異な適応進化下で成立したとされる機能変化可能性の高い 10 因子を同定し、現在、機能解析を進めている。

Figure 3: 配列距離とタンパク質構造距離の比較による新機能因子のスクリーニング



3. 近年のゲノム倍化がゲノム・エピゲノムの再編に及ぼす影響の理解と生殖形質変化の分子メカニズム

カキ属において、極めて最近の六倍体化によって我々が口にする栽培ガキが成立しているが、栽培ガキでは、本来二倍体野生種では画一的な雌雄性 (雌雄異株性) を有していたものに揺らぎが生じ、雄花・雌花が同一個体に着生し、また両性花の着生も見られるようになる。本研究では数百のトランスクリプトームデータを統合した多角的な遺伝子ネットワーク解析から、統御因子となる *DkRAD* 遺伝子を同定し、これは六倍体化によってカキがそれまでは有していなかった強いサイトカイニン応答性を獲得したことに起因する可能性を見出した (Masuda et al. 2022 *Nature Plants*)。興味深いことに、この作用機作には植物の科を超えた共通機作が見え隠れしており、以下に記すマタビ属サルナシにおける倍数性依存的な単為結果性発現の研究においても、高次倍数化とサイトカイニン応答性が連動した新しい発現動態の獲得が検出されている。

本研究では、2 倍体サルナシ (*Actinidia arguta* var. *hypoleuca*) ドラフトゲノム情報・全遺伝子情報を新規に構築し、日本列島に特異な異倍数系統 (2 倍体から 8 倍体) を用いたゲノムワイド集団構造解析および花器官・子房における網羅的なトランスクリプトーム解析・DNA メチローム解析・H3K9me2/H3K4me1 などを標的とした ChIP-Seq 解析を行った。ゲノムワイド遺伝子型解析からサルナシは連続的に推移する倍数性において、倍数性に依存した集団構造を維持しておらず、同次倍数体であっても独立した起源・由来を持つことが示された。つまり、倍数性依存的な単為結果性・両全性と言った生殖表現の変化は、ゲノム構造の連続的推移に従うものではなく、倍数性に直接的に依存したものであることが示された。トランスクリプトームデータに基づいて、高次倍数性系統にのみ見られる発現変動遺伝子およびそれと共発現する遺伝子ネットワークを検出した。ここでは、CYP78A などの候補分子も同定し、単為結果を直接的に誘導することを証明した。さらに、上述したカキと同様に、倍数性の上昇に応じてサイトカイニンシグナル受容性が上昇する可能性が示唆された。これと連動して、ゲノムの DNA メチル化程度は減少し、ヘテロクロマチンマーカーである H3K9me2 ピークの減少なども見られた。以上から、いわゆる「ゲノムショック」と呼ばれるような倍数化応答現象において、エピゲノム再編とサイトカイニン応答性を繋ぐ未定義の経路が、植物種を問わず存在している可能性を明らかにした。

4. 重複因子を基点とした性染色体進化の新規概念の開拓

本研究ではマタタビ属の広い範囲をカバーするプラチナゲノム解読 (pangenome 解読) を行い、染色体断片重複進化の観点から、その性の機能に関する維持性および適応機構を調査した。上述したサルナシに加えて、シマサルナシ (*A. rufa*) およびマタタビ (*A. polygama*) に関して PacBio HiFi および Bionano (Saphyr) シークエンス解析を組み合わせた染色体レベルのゲノム解読を完了し、性染色体の転移性が遺伝子重複と、高度に頻繁におこる転移因子の爆発的重複によるものである可能性を明らかにした。さらに、この事実から、従来の進化学において常識となっていた「性的二型性 (オスらしさ・メスらしさ)」に関わる性染色体進化の定説を覆し、新しい概念に基づく「ゲノムの特性そのものに基づいた性染色体進化過程」を提唱した (Figure 4, Akagi et al. 2023 *Nature Plants*)。

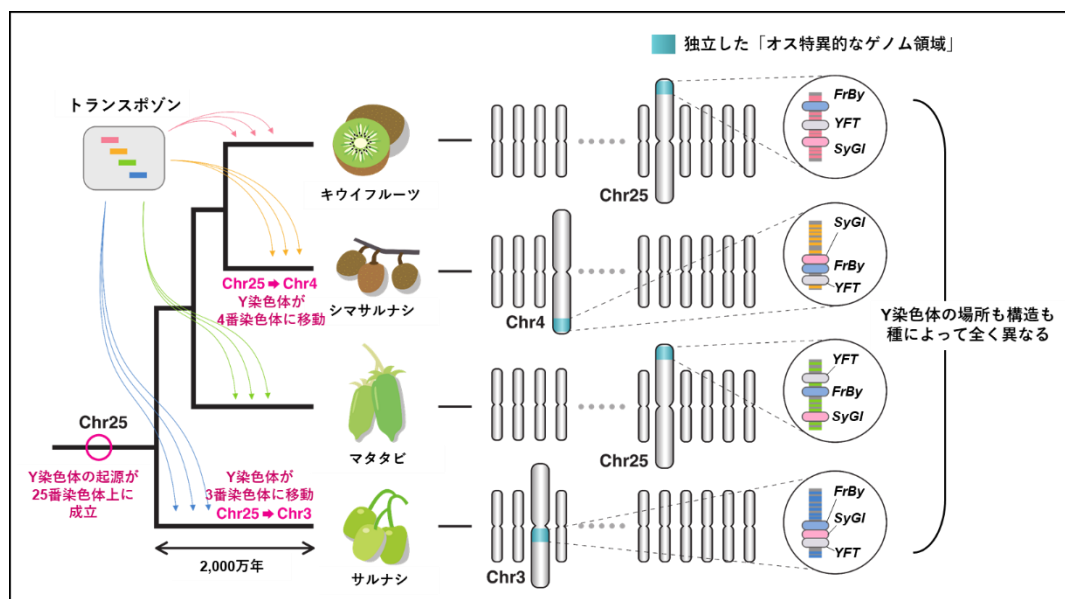


Figure 4: 系統特異的な重複・転移因子が駆動するマタタビ属のネオ性染色体の反復進化

カキ属においても六倍体の栽培ガキ高精度全ゲノムを解読し、そのゲノム倍化過程において性染色体の再編が起こるとともに、上述したマタタビ属と同様に「性的二型性」に非依存的なゲノム特性自体に基づいた性染色体進化の新説を提唱した (Horiuchi et al. 2023 *Mol Biol Evol*)。さらに、カキ属全体をカバーする 8 種の染色体レベルゲノム解読を完了し、マタタビ属と同様に、遺伝子・転移因子重複を原動力とする反復的なネオ性染色体進化の過程を明らかにした (Masuda et al. *in submission*)。また、100 年前に植物で初めて性染色体が発見され、以来、性染色体進化のモデルとなっているマンテマ属においても、同様の重複因子を基点とした巨大 Y 染色体進化の全容を明らかにした (Akagi et al. *in submission*)。

5. 画像・オミクスデータを融合する AI モデル群の開発

上述した研究内容とは直接的には関係しないが、技術開拓として深層学習系の適用開拓を本研究では続けており、画像データからの果実内部構造予測の高度診断モデル (Suzuki et al. 2022 *Hort J*, Masuda et al. 2023 *Postharv Biol Tech*) や、画像・オミクスデータの融合解析フレーム (Figure 5, Masuda et al. 2023 *Plant Cell Physiol*) などを構築した。さらに

small-RNA の蓄積性を予測する transformer モデルを開発し、その attention 解析から蓄積性に関する鍵配列を small-RNA の周辺ゲノム配列に見出した。これは基礎科学的にも重要な知見であり、現在まで small-RNA の配列には蓄積性に関する何らかの特徴量があることが示唆されているが、配列上の際立った法則性も見だせていない。今後の展開次第では AI 協働研究の概念で、新しい基礎知見に至る可能性を秘めている。

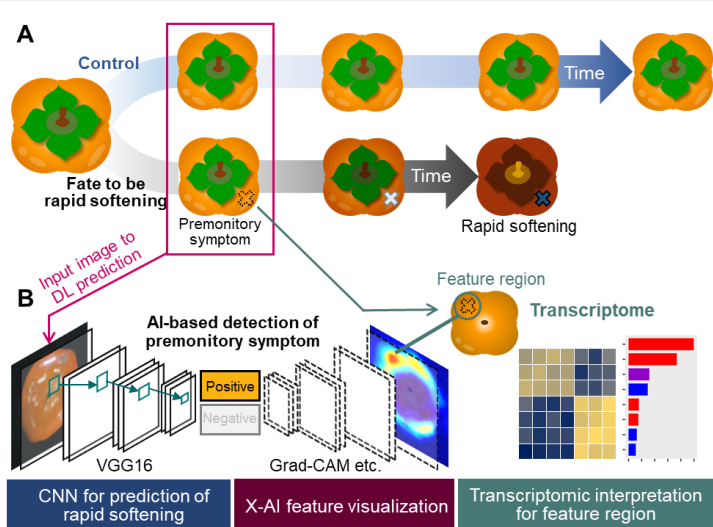


Figure 5: 画像データへの深層学習と X-AI に基づいたトランスクリプトーム解析による果実早期軟化の運命予測と生理的要因の同定

3. 今後の展開

本研究ではゲノム・進化・情報学的な融合観点から植物の潜在的な機能多様性(新機能因子群やその進化概念)が特異なゲノム動態である頻繁なゲノム重複に由来するメカニズムを捉え、実際にその分子(候補)や原因残基の同定にも至っている。一方、これらの詳細な新機能はまだ明確にはなっておらず、進化の中で得られた「新機能」が一体、どのような酵素活性・認識機能などを有しているか?と言った部分は今後の展開で解明すべきものであり、その機能に依存して実育種に活用していくべき重要課題であると認識している。

AI による発現のモデル化においても、本領域で開拓した技術は新しい遺伝子発現デザインを可能とするものであるが、今後の展望としては、これを「使いこなす」ことで、実際に「既存の遺伝資源には存在しない」形質をファインチューニングすることが可能であろう。既に本研究の成果の一部として、果実成熟関連転写因子の発現ファインチューニングを目指したゲノム編集をトマトで用意しており、今後の形質変化に期待している。

これらの新機能因子・制御は他科作物種にも実装可能なものであり、系統特異的に獲得された形質を「移入」させることで新しい概念の育種形態へと発展させていきたい。奇しくも、近年報告されつつある栽培進化の研究から、現在の栽培種の多くは、他植物種群からの遺伝子移入を介して、歴史的に何度も系統特異的に獲得された有用形質(の遺伝質)を他から取り込んでいることが明らかになっており、本研究の将来展望と一致する。言うなれば、現在のバイオテクノロジーを以て「進化再設計」とでもいうべき方向性を目指してみたいと考えている。

4. 自己評価

ゲノム情報への AI 技術群の開発や、ゲノム解読を起点としたゲノム進化的解釈に関して、計画当初からスムーズに進めることができ、ゲノム・遺伝子倍化に関しての寄与実態や、その駆動力と

なる基礎科学的知見を多く得られることができたと感じている。研究対象や方向性が多様化し、寄り道が多くなって、研究全体における概念の一貫性が多少損なわれたようにも感じられたが、性染色体ゲノム進化の解明や、多種多様なデータ型への AI 技術の転用など、思わぬ収穫が得られたことは結果として喜ばしいことだと判断した。領域内での共同研究を盛んに行うことができ、酵素触媒化学的な視点と系統進化学的視点の融合(棟方博士)や、ゲノム解釈への援助(平野博士)、RNA 配列パターンへの AI 解析(元村博士)に加えて、アドバイザーとの共同研究として、ホップ性決定進化(小埜博士・高林博士)なども展開することが出来た。

反省点として、同定した新規分子機能の詳細を明らかにする余裕が無かったこと、また、「実装・デザイン」を謳っておきながら(また、私自身が農学研究者でありながら)、得られた知見を社会実装が目に見えるラインまで昇華できなかったことが悔やまれる。これらは今後の展望(課題)として挙げられるものであり、既に実装用のゲノム編集ラインを用意し、また同時に領域のサポートを経て成立した国際共同研究の枠組みで展開を始めているものである。

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: 11件

1. **Takashi Akagi***, Kanae Masuda, Eriko Kuwada, Kouki Takeshita, Taiji Kawakatsu, Tohru Ariizumi, Yasutaka Kubo, Koichiro Ushijima, Seiichi Uchida (2022) Genome-wide cis-decoding for expression design in tomato using cistrome data and explainable deep learning. *Plant Cell*, 34: 2174-2187.

本論文は、ゲノム配列情報・遺伝子発現情報への CNN(深層学習)解析モデルを構築し、果実成熟における遺伝子発現予測可能にするとともに、X-AI の概念を適用してその発現予測の鍵となる *cis* 領域(配列)を明らかにしたものである。トマトを材料に用いているが、その系統特異的な遺伝子発現進化を検出可能であり、発現パターンをデザインする概念も示唆したものである。

2. Kanae Masuda, Yoko Ikeda, Takakazu Matsuura, Taiji Kawakatsu, Ryutaro Tao, Yasutaka Kubo, Koichiro Ushijima, Isabelle M. Henry, **Takashi Akagi*** (2022) Reinvention of hermaphroditism via activation of a *RADIALIS*-like gene in hexaploid persimmon. *Nature Plants*, 8: 217-224.

カキ属において、近年の倍数化(六倍体化)は性表現に可塑性を与え、二倍体種では一様に雌雄の分離を示すにもかかわらず、六倍体の栽培ガキでは雌雄異花同株性や両性花の着花性を示す。本論文は、六倍体カキにおける両性花への回帰がゲノム倍化によって新規に成立した *RADIALIS* 様遺伝子の ABA・サイトカイニン応答性に依存した「新機能獲得」であるものを証明したものである。

3. **Takashi Akagi***, Erika Varkonyi-Gasic, Kenta Shirasawa, Andrew Catanach, Isabelle M.

Henry, Daniel Mertten, Paul Datson, Kanae Masuda, Naoko Fujita, Eriko Kuwada, Koichiro Ushijima, Kenji Beppu, Andrew C. Allan, Deborah Charlesworth, Ikuo Kataoka (2023) Recurrent neo-sex chromosome evolution in kiwifruit. *Nature Plants*, 9: 393-402.

植物における性染色体の構造進化は、「性的二型性」と呼ばれる「オスらしさ・メスらしさ」の維持に依存した組み換え抑制が原動力であり、その進化形態は画一的かつ固定されたものであると考えられてきた。本論文は、この長年の定説を覆すものであり、植物特異的に起こる極めて頻繁なゲノム断片重複や転移因子の活性化を通じて、マタタビ属の性染色体が絶えず活発に染色体間を移動しており、その性的二型性も性染色体では無く、性決定遺伝子自身によって維持されるものである可能性を示したものである。

(2) 特許出願

(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. Takashi Akagi, Lineage-specific inventions of the sex in plants, triggered via independent gene/genome duplication events. 招待講演・Philosophical Transaction of Royal Society, Online meeting (2021 年 6 月 24 日)
2. Takashi Akagi, Genome-Wide Cis-Decoding for Expression Design in Tomato Using Cistrome Data and Explainable Deep Learning. 招待講演・Plant & Animal Genome XXX, San Diego (2023 年 1 月 15 日)
3. Takashi Akagi, Boy meets Girl, everywhere? Mysteries in neo-sex chromosome evolution in kiwifruit. 基調講演・XI International Symposium on Kiwifruit (2024 年 2 月 23 日)
4. 赤木剛士: 金光奨励賞 (2022 年 10 月 23 日)
5. 赤木剛士: 園芸学会奨励賞「深層学習による果実の内部形質・遺伝子発現パターンの予測と解釈」(2023 年 3 月 20 日)
6. 赤木剛士: 「ゲノム・遺伝子改変に向けた AI 協働研究」日本農薬学会誌 47:113-116.