

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「環境変動に対する植物の頑健性の解明
と応用に向けた基盤技術の創出」
研究課題「倍数体マルチオミクス技術開発による
環境頑健性付与モデルの構築」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：清水健太郎
(横浜市立大学木原生物学研究所、
客員教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

有用植物には、パンコムギ、セイヨウアブラナ、ワタ、アラビカ種コーヒー、サツマイモをはじめとして、倍数体種が多いことが知られている。倍数体種の長所と短所については、データの乏しいままに諸説が入り乱れていた。中でも、広い環境に応答できる性質である環境頑健性や、同祖遺伝子(重複遺伝子)の冗長性つまり突然変異頑健性が古くから指摘されていた。前者の環境頑健性は、気候変動の中で安定した収量を保つために欠かせない性質である。しかしながら、倍数体ゲノムの複雑さと、フィールド環境でのデータ不足から、倍数体の長所・短所の分子基盤についての知見は乏しく、頑健性付与のための道筋も見えていなかった。

本プロジェクトでは、次のように各グループが研究を分担した。横市グループが世界三大穀物であるパンコムギのフィールドデータ収集と高精度ゲノム解読を、スイスグループがモデル異質倍数体であるシロイヌナズナ属ミヤマハタザオのデータ収集を、筑波グループが実験セッティングと統計解析を統括した。倍数体解析のバイオインフォマティクスと、生物学的メカニズム解析のための機械学習モデリングの開発をヒューマノームグループが担当した。フィールドでの画像解析と形質抽出をエルピクセルグループが担当した。そして、京大グループが課題間連携を活用し、遺伝子型改変による検証のための NAM 系統の開発と、カートによる画像解析技術開発を推進してきた。これらを統合して、以下のように倍数体の頑健性などの分子基盤を解明し、それに基づきパンコムギの環境応答に関わる新規対立遺伝子単離を進めた。

まず、倍数体の長所・短所について、パンコムギとミヤマハタザオのゲノムに共通する進化のパターンを探索した。ゲノムワイド多型解析や RNA-seq, エピゲノム解析とあわせることで、次の共通パターンが見つかった。

- (1) 同祖遺伝子が定性的に冗長に見えたとしても、定量的に形質を考慮すれば、冗長性は高くない。つまり、倍数体であっても突然変異頑健性は弱い。このことを利用すれば、同祖遺伝子のうち一つを改変することにより、定量的に表現型を調整できる。
- (2) 倍数体化により、育種・進化のターゲットになる遺伝子数が倍増した。
- (3) 増加したうちで比較的少数の異なったシス制御を持つ同祖遺伝子によって、両親の環境応答を組み合わせた環境頑健性が得られた。
- (4) 「ゲノムショック」と呼ばれてきたゲノムワイドな大きな発現・エピゲノムの変化は、再検討が必要である。倍数体化という一つの変異で大きな現象を説明しようとする「有望な怪物」説ではなく、上記のような少数遺伝子を単離していく堅実なアプローチが有効である。

パンコムギはゲノムサイズが 17 GB とヒトゲノムよりも数倍大きく、さらに異質六倍体であるためにゲノム配列が非常に複雑で、プロジェクト開始時に高精度ゲノムアセンブリが報告されていなかった。そこで、コムギ 10+ゲノムプロジェクトの国際コンソーシアムと連携し、日本を代表するパンコムギ品種農林61号の染色体レベルのゲノム解読を行った。まず全品種の配列を、上記のような倍数体の長所・短所の解析に用いた。そして、日本品種農林 61 号はプロジェクトの唯一のアジアの近代品種であり、他の欧米品種と配列が大きく異なっていた。日本の風土に適応した結果として、緑の革命で用いられた半矮性変異をはじめ、出穂、品質や病原適応性などに関連した多数の既知変異が見いだされた。とくに、出穂は温暖化に対する頑健性付与の鍵となる形質であるが、出穂を司るフロリゲン *FT1/VRN3* 同祖遺伝子の解析により、機能欠損やコピー数変異の新規変異を見いだした。こうした新規のコピー数変異の発見は高精度ゲノム解読によって可能になったものであり、上記(1)のパターンの通り、異質倍数体の育種戦略として、コピー数増減によって形質を量的に制御できる可能性を示唆する。このうち *FT-D1/VRN-D3* 同祖遺伝子の変異は 1 塩基欠失であったが、既存手法と比べて安価・迅速に 1 塩基変異をジェノタイプングできる手法 PRIMA を開発した。特許を国際出願して、日本、米国、欧州においてライセンス契約を結び、育種用の大規模ジェノタイプングを可能にした。本プロジェクトは、企業と海外グループが当初から参画しており、国内外のアカデミア・企業とのネットワークによる学際的連携を生かして成果を発表し、戦略目標の海外展開を推進した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 倍数体高精度ゲノム多型・エピゲノム技術開発による突然変異頑健性とゲノムショックの再検討

概要:

これまで諸説入り乱れていた倍数体種の長所と短所について、我々は高精度の倍数体種用バイオインフォマティック手法を開発して再検証した。高精度ゲノム多型解析の結果、パンコムギとミヤマハタザオに共通して、突然変異頑健性が進化可能性、育種可能性に寄与したことが支持された。過去の低精度のゲノム・エピゲノム解析で論じられてきたゲノムショックと呼ばれてきたような大規模変化の再検証の必要性が示唆された。

2. 倍数体高精度 RNA-seq 技術開発による環境頑健性の分子基盤の解明

概要:

20 世紀半ばから倍数体種の長所として、広い環境適応性(環境頑健性)が指摘されていたが分子レベルでの解明はほとんど手つかずだった。その検証のため、倍数体高精度 RNA-seq 技術開発により、温度・水分・土壌など様々な環境応答に関わる遺伝子発現を解析した。その結果、倍数体種が親の種それぞれから比較的少数の環境応答遺伝子のシス発現を受け継ぎ、組み合わせることでより広い環境に適応して環境頑健性を得たという一般的なパターンを見出した。

3. パンコムギ汎ゲノム解析による品種特異的染色体ブロックの発見と倍数体ゲノム進化

概要:

異質六倍体であるパンコムギの 10+ゲノムプロジェクトのデータの汎ゲノム解析をおこなったところ、20 Mb を超えるような染色体の大きなブロックで遺伝子・反復配列ともに品種にユニークな部分が多く見いだされた。これらは病原抵抗性遺伝子を多数含んでおり、多数の系統のゲノム解析が有用であることを端的に示した。また、ゲノム多型・選択解析の結果、パンコムギでも野生種ミヤマハタザオと同様に、同祖遺伝子が別種として異なった適応進化を経たのちに倍数体として組み合わせることで環境頑健性が得られたことが支持された。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. コムギ日本品種農林 61 号の高精度ゲノム解析の育種への展開

概要:

パンコムギは世界三大穀物の一つであるが、育種の根幹であるゲノム多型解析が非常に遅れていた。パンコムギ 10+ゲノムプロジェクトの解析の結果、日本品種農林 61 号の配列は、他の欧米品種と大きく異なっており、日本の風土に適応した結果として出穂、品質や病原適応性などに関連した多数の既知・未知の機能変異が見いだされた。とくに、フロリゲン遺伝子 *FTI/VRN3* 同祖遺伝子に、機能欠損やコピー数変異の新規対立遺伝子を見いだした。これは異質倍数体の育種戦略として、コピー数増減によって形質を量的に制御できる可能性を示唆する。本国際プロジェクトでは、シンジェンタ・KWS といった世界的な種苗会社や世界のコムギ育種拠点である CIMMYT と共同研究しており、育種素材として提供する体制も整っている。

2. ゲノム編集での安価・迅速なジェノタイプング法(国際特許出願、日米欧のライセンス契約)

概要:

遺伝子型再構成の主な手法として、ゲノム編集を用いた 1 塩基置換・挿入による遺伝子機能欠失変異の作製が挙げられる。目的のデザイン通りの変異が入った系統を見つけるためには多数系統をジェノタイプングする必要がある。とくに、倍数体種で複数の重複遺伝子を編集するには、ジェノタイプングが律速段階になる。これまでの市販の電気泳動装置では、2-3 塩基

置換・挿入が検出限界であった。我々は、電気泳動度に干渉するプローブを設計することで、安価・迅速に 1 塩基置換・挿入を同定できる技術 PRIMA を開発した。これらの技術は今後頑健性付与モデルの検証をはじめ、あらゆる生物の研究に活用できる。特許の国際出願をして論文を発表し、日本、米国、欧州においてライセンス契約を結んで実用化した。

3. 機械学習による植物頑健性予測・付与モデル開発(特許出願)

概要:

気象条件の変動に対して、植物の生育・出穂・収量などの農業形質がどれほど頑健なのかを予測できることは本研究の根幹である。我々の構築した 2 段階頑健性予測モデルは次の 2 つの新規性をもつ。まず、気象条件から形質を予測する際に、生物学的実態のあるトランスクリプトームデータから設計した中間層を加えることで形質予測精度と設計性を既存の手法と比べて大きく改善した。さらに、標準的な回帰でなく、機械学習のスパースモデルを用いることで、形質予測に影響が大きい気象条件を明確に特定できるようにした。閣議決定「気候変動への適応計画」で危惧されている温暖化によるコムギの減収に関して、本モデルを適用して環境変動による表現型への影響を予測し、温暖化実験による検証を行った。本モデルは特許出願し、育種だけでなく、林業での開花予測、花粉アレルギー予報、果実の成熟時期予測による作業・流通の効率化など多方面への応用が考えられる。

<代表的な論文>

下線は本 CREST メンバー、点線は CREST・さががけ間共同研究

1. Walkowiak, S., Gao, L., Monat, C., Haberer, G., Kassa, M.T., Brinton, J., Ramirez-Gonzalez, R.H., Kolodziej, M.C., Delorean, E., Thambugala, D., Klymiuk, V., Byrns, B., Gundlach, H., Bandi, V., Nunez Siri, J., Nilsen, K., Aquino, C., Himmelbach, A., Copetti, D., Ban, T., Venturini, L., Bevan, M., Clavijo, B., Koo, D.-H., Ens, J., Wiebe, K., N'Diaye, A., Fritz, A.K., Gutwin, C., Fiebig, A., Fosker, C., Fu, B.X., Garcia Accinelli, G., Gardner, K.A., Fradgley, N., Gutierrez-Gonzalez, J., Halstead-Nussloch, G., Hatakeyama, M., Koh, C.S., Deek, J., Costamagna, A.C., Fobert, P., Heavens, D., Kanamori, H., Kawaura, K., Kobayashi, F., Krasileva, K., Kuo, T., McKenzie, N., Murata, K., Nabeka, Y., Paape, T., Padmarasu, S., Percival-Alwyn, L., Kagale, S., Scholz, U., Sese, J., Juliana, P., Singh, R., Shimizu-Inatsugi, R., Swarbreck, D., Cockram, J., Budak, H., Tameshige, T., Tanaka, T., Tsuji, H., Wright, J., Wu, J., Steuernagel, B., Small, I., Cloutier, S., Keeble-Gagnère, G., Muehlbauer, G., Tibbets, J., Nasuda, S., Melonek, J., Hucl, P.J., Sharpe, A.G., Clark, M., Legg, E., Bharti, A., Langridge, P., Hall, A., Uauy, C., Mascher, M., Krattinger, S.G., Handa, H., Shimizu, K.K., Distelfeld, A., Chalmers, K., Keller, B., Mayer, K. FX, Poland, J., Stein, N., McCartney, C.A., Spannagl, M., Wicker, T., Pozniak, C.J. *Nature* 588, 277-283, 2020.

(Author Contribution 欄:

清水健太郎:農林 61 号ゲノムと多様性・多型解析の責任者

那須田周平:細胞遺伝学解析の責任者

Thomas Wicker 責任著者の一人)

概要:

コムギ 10+ゲノムプロジェクトにより、世界を代表するパンコムギの汎ゲノム解析をおこなった。各品種にユニークな染色体ブロックに、品種特異的な病原抵抗性遺伝子などが見つかリ、1 品種のゲノムでは発見できない遺伝子が多いことが明らかになった。日本品種農林 61 号はその他の欧米品種と遺伝的に大きく離れていた。同祖遺伝子が別々の進化の歴史をたどっており、倍数化によって育種・選択のターゲット数が 3 倍に増加したことが支持された。

2. Paape, T., Briskine, R.V., Halstead-Nussloch, G., Lischer, H.E.L., Shimizu-Inatsugi, R., Hatakeyama, M., Tanaka, K., Nishiyama, T., Sabirov, R., Sese, J., Shimizu, K.K. *Nature*

Communications 9, 3909, 2018

概要:

倍数体化後の初期進化を調査するために、モデル倍数体ミヤマハタザオの25ゲノムの多型と選択の解析をおこなった。その結果、突然変異頑健性つまり同祖遺伝子間の冗長性は、二倍体種よりも弱いものの存在していた。一方、有利なアミノ酸変異の割合が高かった。この結果は、1970年に大野乾が提唱したように、片方の同祖遺伝子が本来の機能を保つ一方で、もう片方が新規の機能を獲得しやすくなり新規性が進化しやすいという説を支持する。

3. Song, Y.H., Kubota, A., Kwon, M.S., Covington, M.F., Lee, N., Taagen, E.R., Cintrón, D.L., Hwang, D.Y., Akiyama, R., Hodge, S.K., Huang, H., Nguyen, N.H., Nusinow, D.A., Millar, A.J., Shimizu, K.K., Imaizumi, T. *Nature Plants* 4: 824–835, 2018

概要:

これまで実験室での研究結果から、花成誘導を担うフロリゲン遺伝子 *FT* は夕方に発現ピークがあると考えられていたが、アメリカとスイスの野外でデータを取得したところ、予想外にどちらでも朝にピークが見られた。この結果に基づき、実験室環境をより野外に近い状態に調整すると、実験室でも朝にピークが見られた。花成誘導と出穂は重要な育種形質であり、実験室とフィールド研究のギャップの存在を示す重要な成果である。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 横浜市グループ

研究代表者: 清水 健太郎(横浜市立大学木原生物学研究所 客員教授)

研究項目

・圃場での倍数体オミクスデータ収集と実験的検証

② 産総研グループ (ヒューマノームグループに変更)

主たる共同研究者: 瀬々 潤((株)ヒューマノーム研究所 代表取締役)

研究項目

・機械学習を用いた倍数体オミクス解析とモデリング技術の開発

③ エルピクセルグループ

主たる共同研究者: 島原 佑基(エルピクセル(株) 代表取締役)

研究項目

・植物個体の自動観測システムの研究開発

④ スイスグループ

主たる共同研究者: Kentaro Shimizu (University of Zurich, Faculty of Science, Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies, Professor)

研究項目

・圃場での倍数体オミクスデータ収集の基盤技術開発

⑤ 筑波グループ

主たる共同研究者: 田中 健太(筑波大学山岳科学センター 准教授)

研究項目

・植物野外栽培と統計解析

⑥ 京都グループ

主たる共同研究者: 那須田 周平(京都大学大学院農学研究科 教授)

研究項目

・遺伝子型再構成系によるコムギ表現型解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本プロジェクトには、主たる共同研究者に産業界、国外グループが当初から参画しており、国内外と産業界との深い連携によるネットワークによって成果を挙げた。とくに、コムギ 10+ゲノムプロジェクトの国際コンソーシアムの国内外アカデミアと国外産業界の研究者と連携して、プロジェクト内の唯一のアジアの近代品種として、日本を代表するパンコムギ農林 61 号のゲノムの高精度解読を達成した。これにより、コムギの国際ネットワークでの日本のプレゼンスを確保し、さらに農林 61 号をアジアを代表する近代品種として国内外で基礎・育種研究を進める基盤を築くなど、戦略目標の海外展開を推進した。また、本 CREST 領域の工藤チーム、永野チーム、岩田チーム、平山チーム、関連する JST さきがけ「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」の佐藤博士、JST さきがけ「情報科学との協働による革新的な農産物栽培手法を実現するための技術基盤の創出」の戸田博士を始め、国内研究者との異分野間連携の共同研究を推進して論文を出版した。さらに、上記の通り産業界との連携として、自然変異やゲノム編集多型を簡便に検出する手法 PRIMA の特許を国際出願し、日本、米国、欧州においてライセンス契約を結んだ。