



Evolutionary Theory for

CONSTRAINED & DIRECTIONAL DIVERSITIES

Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 4 No. 10 (2020)

新学術領域研究

進化の制約と方向性

～微生物から多細胞生物までを貫く表現型進化原理の解明～



令和2年度 研究成果報告

表紙: ジンガサハムシ *Aspidomorpha indica*。ペクチン分解酵素産生に特化し、ゲノムが高度に縮小 (< 0.3 Mb) した共生細菌 *Stammera* を保有する (Salem *et al.* 2020 *Curr Biol* 30, 2875)。
(写真: 産業技術総合研究所 森山実)

目次

領域代表挨拶	倉谷 滋	1
総括班活動報告	倉谷 滋、長谷部 光泰	3
大規模解析支援報告	重信 秀治	5
理論解析支援報告	古澤 力	7
国際活動支援報告	入江 直樹	8
研究計画成果報告(6課題)		
倉谷班「脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性」		10
金子班「進化のゆらぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開」		11
入江班「脊索動物胚発生の分子発生システム揺らぎ測定と進化的保存性」		13
深津班「昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明」		15
古澤班「多様な選択圧下での大腸菌進化実験による揺らぎ—応答関係の定量解析」		17
長谷部班「摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明」		19
公募研究成果報告(18 課題)		
阿部班「胸ヒレ鰭条の種内ゆらぎを生み出す発生メカニズムと種間形態多様性」		21
守野班「軟体動物割球特異化機構を題材にした発生システム浮動の方向性と制約の解明」		22
土松班「特異的相互作用の進化:植物自家不和合性を用いた理論と再現実験によるアプローチ」		24
高橋班「多次元形質空間におけるマルチレベルな表現型のゆらぎの統合と進化の方向性の予		

測」	26
東山班 「顔面原基のプロポーシオンが哺乳類系統でだけ激変した背景にある、発生上の制約」	27
市橋班 「人工 RNA 進化システムを用いた RNA の構造揺らぎと進化の関係の解析」	28
大林班 「倍数ゲノム複製機構がもたらす新規機能獲得と進化速度の両立」	29
田中班 「酸素で生じた「ゆらぎ」が「パターン形成プログラム」へと進化した分子基盤の解明」	30
寺島班 「腸内感染と運動性の揺らぎが導く細菌病原性分泌装置への進化の実験的解明」	31
石川(由)班 「神経ネットワークにおける揺らぎと進化的保存性の関係」	32
鈴木(郁)班 「ヒト固有 NOTCH2NL 遺伝子による脳発達の揺らぎと脳進化方向性の研究」	34
鈴木(孝)班 「仙椎－後肢ユニットの形態の制約と個体間の位置のゆらぎを生み出す分子機構の解明」	35
細田班 「実験生態系の摂動と継代による生態系の揺らぎ応答関係の解明」	36
守屋班 「発現量揺らぎ－適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応－進化への影響」	37
守山班 「自己組織化過程における細胞の揺らぎと対称性の破れ」	38
石川(麻)班 「トランスクリプトームのゆらぎがもたらす新規ニッチへの進出能力」	39
安岡班 「ネッタイツメガエル胚発生における転写因子－標的遺伝子関係の揺らぎ測定」	40
森下班 「相同器官固有の形態形成ダイナミクスの標準形と発生組織内の位置価を適切に測る座標系」	41

領域代表挨拶

緒言：皆さん御達者ですか。報告書の季節になりました。文章を書くのも研究者の仕事です。そしてそれは間違いなく文化の一部です。

それに関し、私が紀田順一郎氏の著書『日本語大博物館：悪魔の文字と闘った人々』を読んだのはもうだいぶ前になります。もっぱら明治以来、いかにして日本語がいま我々の使う日本語になったのか、日本語とどう付き合ってきたのかがそこには解説されており、非常に興味深かったことを覚えています。明治政府はややもすると、ひらがな漢字を廃してアルファベットにしかねなかったのです。一方で、日本語のタイプライターは非常に煩雑で使い勝手が悪いので有名でした。あの「グリコ森永事件」で犯人一味中井英夫の「虚無への供物」に登場する氷沼家邸もそうではなかったかと思います。私が遊び回っていた60年代の豊中市郊外にも同様の屋敷がいくつかあり、そのなかのひとつに黒マントの怪が使用したのもタイプライターだったことを思い出します。80年代、そこへ颯爽と登場したのがワープロ。それですべてが変わりました。ようやく、日本人も欧米並みの速度で書類を作成できるようになりました。先人達が日本語というこの厄介な言語といかに闘ってきたのか、苦労が偲べれます。

今野真二著『百年前の日本語 - 書きことばが揺れた時代』もたいへん面白い本です。「書きことば」という著者こだわりの綴りから伺い知れるように、本来和語には仮名を当てていたのが日本語の習い。しかし、和語に二次的に意味に応じた漢字が当てられ、それが嵩じて「訓読み」というものが成立したのでした。そんな、本来いい加減なものであった「音訓」が言文一致のいきおいを得て標準化し、教育に取り入れられ今に至っているわけですが、本来言葉は揺らぐもの。今でも揺らいでいます。仮名の字体もそうです。先日、私がある出版物に寄せた文章の校正で、「聴く」がすべて「聞く」に換えられてしまい、「聴覚の話題に＜聞く＞はないだろう」と直させましたが、言葉は生き生きと意味を伝えてこそその言葉なのです。大河ドラマの『西郷どん』など見ていますと、当時の江戸、上方、薩摩、長州、土佐の方言のみならず、奄美大島、沖永良部島の言葉まで字幕画面で登場するうえ、筆で書かれた書きことばも画面一杯に出てきます。もっぱら武士が使っていた楷書の漢文体だけでなく、草書体の仮名綴りも含みます。ひょっとすると、岩倉具視は本当に鶴瓶のようにしゃべっていたのかも知れません。本書には夏目漱石の「それから」が多く引用されています。戦前・戦後の日本語を扱った続篇、できれば谷崎潤一郎と江戸川乱歩を引用したものはないかななど思っていたら、同著者の近刊に『乱歩の日本語』があることに気がつきました。

これはちょっと凄い本でした。乱歩が使った数々の「言葉」のなかに、小説の舞台となった時空間が鮮やかに蘇ってきます。昭和30年代初頭の新東宝映画『一寸法師』や東映ならびに松竹の『少年探偵団シリーズ』を見れば分かりますが、戦後からわずか10年の東京住宅地を撮れば、それはほぼそのまま乱歩世界に繋がっていたものでした。当たり前のように共有されていた読者と著者の言語世界が機能していたのです。乱歩の言う「洋館」はどういったものだったのか。神戸北野異人館街を思えば良いのか。おそらくそれは違うでしょう。乱歩のいう洋館の多くは当時の金持ちが建てたハイブリッド建築で、日本家屋と西洋風の建物が繋がった複合体の一部を指していました。ですから、その屋敷には応接用の日本間もあれば洋風の書斎もあり、「洋館」とはしばしばそんな屋敷の一部を意味していたのです。「陰獣」の小山田邸も「一寸法師」の山野邸もそんな建物です。たしか人が住んでいると勝手に思い込んでいたものです。そんな、二昔前の白黒映画やドラマによくあった邸宅は、今ではもうほとんど見かけることはなくなりました。

一方で、文字通りの「洋館」も作品中に登場します。北野の「うろこの家」など「塔」を持つ本来的な洋館です。というわけで、乱歩のストーリーをそのまま移し替えようとしても、舞台が違えば話も変わってきます。そういった齟齬がそろそろ明らかになりはじめたのが1970年代以降。あらためて思い出すと、万博が乱歩世界を異界に吹き飛ばしてしまったという印象が強いようです。1977年の松竹映画『陰獣』など、かなり苦労して昔の浅草を復元していた。いまならCGでかなりのことがや

れるでしょう。しかし、それも原作の解説あつてのこと。他に乱歩独得のオノマトペ、「ムクムク」の話が非常に面白いと思いました。

ここでひとつ飛びに、日本語彙の原点として、大槻文彦著『言海』を見てみましょう。原著は明治 37 (1904) 年の発行。こんなすばらしい辞書が文庫版で手に入るとは。あまりに素晴らしくて頬摺りしたくなるぐらいです。字が小さくて困りますが、これは昭和 6 年に出版された小型版そのままのサイズで復刻したものだそうです。1300 頁を超える分厚さ。当時は他に大版も売られていましたが、いまなら文庫版がお手頃でしょう。つくづくちくま文庫は興味深い出版をしていると思います。

まず当惑したのは頁番号の付け方です。例えば、算用数字では「789」と書くところが、当時右から左へと書いていた漢数字では「九八七」となります。内容的にも面白い。たとえば我々の使う「いま」という言葉には、文字通りの「現在」と「ついさっき」という意味がありますが、後者は本来「いまがた」と言われたもので、現在でも使う「今しがた」という言い方にその変化した形が残っています。一方で、当時の「いま」には「今ひとつ」というように、「更に」もしくは「このうえに加えて」という意味が付随していました。現在誰もが使う「イマイチ」なんてのも同じ方針のものです。また、動物名の解説が詳細。昔、「蝙蝠(コウモリ)」は「かはほり」とも呼ばれ、「かわほり」と発音されていました。この名は「皮翻り(皮あふり=皮がひるがえること)」もしくは「蚊屠り(蚊ほふり)」、さらには水を好むので「川欲り」に由来した、という三説が解説されています。当時は「欲す(ほっす)」だけでなく、「欲る(ほる)」という用法もあり、それは「惚る」と同音同義で、「惚れる」はもともと後者の訛った形だったのです。まるで、遺伝子重複に続く分化を見るようです。これが本来の日本語です。これを見ると、現代国語辞典などつまらなくて見ていられなくなります。

あるいは、小池和夫著『異体字の世界 - 旧字・俗字・略字の漢字百科』も重要。良く知られるように漢字にはさまざまなバリエーションがあり、同じ意味を持つ異なった複数の漢字が存在します。一方で、常用漢字、当用漢字、さらにはワープロやパソコンの発達に伴って制定された「情報交換用漢字符号系」もあります。いわゆる「JIS 第 1 水準」とか「JIS 第 2 水準」と言われるものがそれです。時代とともに異体字がさまざまな意味を分化させてゆき、いつしか別の漢字として通用してしまったり、同じ小説の中でもニュアンスに応じて異体字を使い分けたりするのがいわゆる「文化」である一方、それを統一し分けしようというのはシステムや制度の発想。それらは相反する思想にして境界はあやふやなのです。いずれにせよ、異体字の背景を知るのは進化生物学研究のようで面白いと思います。例えば、「櫻井翔」の「櫻」(これを「二階(貝)の女が気(木)にかかる」と覚える)はもちろん「桜」の旧字体で、人名用漢字としていまでも使用が認められていますが、30 年ほど前まではこのような用法はあまりなく、比較的最近になって「かっこよさ」が旧字に付随しはじめたのだということです。また、紙幣などに用いられる「貳」は改竄を防ぐために用いられるもので、「壺」とともに「大字」と呼ばれる二次的なもの(一方で「萬」はちゃんとした旧字)。従って、「貳」を略して「弍」と書くことに本来的な意味はないということだそうです。

最後に読むべきは齋藤孝著『日本語力で切り開く未来』。タイトル通りの素晴らしい内容です。集英社インターナショナル新書のなかで、これは間違いなくトップクラスの一冊、文章を書く前には、落ちついて目を通したいもののひとつです。さて、我々の使う学術日本語はどうでしょうか。私が和文総説など書くと、「神経繊維」の「繊」を「線」に変えろといわれることが非常に多く、参ってしまいます。本当はどちらでもいいのですが、それも決まって医学系の研究者が言うてくる。しかし、理学系も黙ってはいません。「神経堤」を「神経冠」と書きたがるのはたいてい動物学系生物学者です。どんなに混乱してもどこ吹く風といった風情。こうなるとはや縄張り争いにしか見えません。いわばジャーゴンもテリトリーを広げるように振る舞う限りは、進化の機構に従っているのでしょう。が、それを自覚できないようでは、進化研究も覚束ないのでは？

倉谷 滋

総括班活動報告

倉谷滋、長谷部 光泰

生物は決してランダムに多様化しているのではない。発生プログラムの変更や形態進化の変更には不均一さや、変わりにくい部分があり、それが進化の性質を示すように見えながら、正確に記述されたことはまだない。本新学術領域では、この制約と揺らぎをさまざまなレベルで検出し、個体間差や環境変化による表現型変化など短期的な時間スケールで観察される表現型揺らぎと、長期的なスケールで起こる表現型進化の制約や方向性がどのように相関しているかを実験的に解明し、制約進化理論の適用範囲の検証と修正を行うことで、何が表現型進化に制約と方向性をもたらすのかを明らかにすることを目的とする。そして、従来の自然淘汰理論、中立進化理論を包含し、生物進化をより包括的に説明できる理論の構築を目指す。

これらの目的の達成のために、総括班は計画研究及び公募研究の支援を行うとともに、理論と実験の融合を促進し、もって各研究結果から一般性を導き出すべく、以下の活動を実施した。

(1) **総括班会議・国際活動支援班会議の開催**: 第 7 回総括班会議を 2020 年 6 月 19 日に、Zoom によるオンライン会議として開催し、昨年度の領域活動の総括と今年度の領域活動計画を策定した。また、大規模解析支援の支援対象の決定を行った。第 8 回総括班会議を 2020 年 12 月 15 日に、Zoom によるオンライン会議として開催し、今年度の領域活動の総括と、来年度以降の領域活動計画を策定した。

(2) **領域会議の開催**: 2020 年 6 月 18 日、19 日に、Zoom によるオンライン会議として第 7 回領域会議を開催し各班の研究計画、2020 年 12 月 14 日、15 日に、Zoom によるオンライン会議として第 8 回領域会議を開催し、各班の研究成果について討議した。

(3) **大規模解析支援**: 第 6 回と第 7 回大規模解析情報交換会をオンラインにて開催した。第 6 回では、ゲノム情報の可視化をテーマにハンズオンレクチャーを行った。第 7 回では計画班及び公募班で大規模解析を実際に担当している研究者が、失敗談や未解決の問題を含む具体的な経験を披露し、それをもとに参加者全員で議論を行った。2020 年度は新たに 14 件の支援課題(計画班 3 件、公募班 11 件)を所定の審査を経て採択した。上記支援課題に対し、総括班大規模解析支援チーム(長谷部・重信に加えて、博士研究員 1 名、研究支援員 2 名)が研究支援にあたった。打ち合わせや実験における人的交流を含む各班員と支援チームの緊密な連携が図られた。支援内容は多岐にわたるが、今年度はシングルセル RNA-Seq に挑戦する班が多いことが特徴的であった。バイオインフォマティクスの支援も実施した。大規模解析支援チームでは領域内ニーズに合わせた技術開発を進めた。コロナ禍において活動制限や試薬・サンプルの調達等の問題が生じたものの、オンラインツールを積極的に導入するなどの工夫によって、領域の研究を推進することができた。

(4) **理論情報支援**: 2020 年 6 月と 2021 年 2 月の領域会議時に、第 6 回と第 7 回の理論情報交換会を開催した。第 6 回では、ボディプランの起源と多様性に関する総合討論が行われた。、ボディプランの生成を理解するための方向性が提示され、活発な議論が行われた。また、第 7 回の理論情報交換会では、揺らぎに関する総合討論が行われた。、表現型揺らぎを観察したときのバラツキが、何に依存するものであって、理論的にはどのような関係があるとされ、実験においてどのように扱うことができるのか、といった内容が議論された。これらの議論は領域ニュースレターとし

て発行されている。さらに、理論情報支援班が中心となって、計画班・公募班に対して理論解析支援を行った。

(5) 国内・国際シンポジウムの開催: 国際シンポジウムを3件(日本分子生物学会、発生生物学会)企画・開催した。また、国内学会にて、26 件(うち招待講演 21 件。6 件は若手による企画)のシンポジウム・ワークショップを企画・開催した。企画が開催された国内学会は、進化学会、生物物理学会、個体群生態学会大会、動物学会、植物学会、解剖学会、遺伝学会、分子生物学会、生態研セミナー、発生生物学会など、広く関連した分野でのイベントとなり、領域活動を広く発信するとともに分野を超えた学術交流を行った。また、オンラインを活用した国際セミナーも開始し、すでに3件を開催した。

(6) 若手育成: 領域内の若手研究者(大学院生を含む)で構成される若手ワーキング・グループが中心となり、様々な学術活動を行った。領域内では、理論情報交換会にて未解決あるいはコンセンサスが得られていない概念的な議論を行い、大規模情報解析情報交換会では、ゲノムブラウザを作成するハンズオンなど、若手研究者が実際に用いる概念操作、情報技術の習得・交換を行うなどした。また、若手中心に企画された「新・研究計画? ~新たな謎に取り組み~」をはじめ、関連学会や学術集会にて、学術集会を企画・開催(国内2件)した。さらに、学術雑誌の特集号の編集に若手1名が関わった。

(7) ウェブサイト・ニュースレター作成: 2020 年度のニュースレター第4巻は本編9号、号外7号の計16号を発行し、領域ウェブサイトから一般に公開した。なお、ニュースレター第10号「令和2年度研究成果報告」を現在編纂中であり、計17号となる予定である。また、学会やワークショップの案内、領域内の公募や研究支援などの情報を適宜領域ウェブサイトで公開し、領域活動を強化した。

(8) 国際活動支援: オンラインでの学術交流に限られたものの、これまででは難しかった短期間(数時間)などでの交流方法を活用するなどし、積極的に国際交流を行った。具体的には、(5)で述べた国際オンラインセミナーシリーズ(3件)に加え、2021 年度に開催する AsiaEvo の企画・運営を通じた国際交流を行った。また、国際活動支援班の予算とは別に、計画班・公募班にて招待講演10件(うち基調講演1件、領域メンバーによる企画3件)、国際会議での講演・情報発信(招待講演以外)3件、招聘・受け入れ2件の国際連携が行われた。国際共同研究に関しては、3班5件の国際共同研究が行われ、領域が目指す新しい学術的潮流を生み出すための活動となった。

大規模解析支援報告

重信 秀治

本領域で扱う表現型揺らぎと進化的制約を定量的に理解するためには、超多試料トランスクリプトーム解析や非モデル生物のゲノム解析など、従来の進化研究のスケールを大きく上回る大規模なオミクス解析が重要な役割を持つ。大規模解析支援チームは、新学術領域ならではの研究プラットフォームを構築し、班員の解析をサポートすることを目指す。さらに、それらの新しい技術を班員が有効に活用できるよう、情報共有と領域メンバーの技術向上を促す役割も担う。今年度は以下の活動を行った。

これまでに採択済みの支援課題に加えて、令和2年度は新たに14件の支援課題(計画班3件、公募班11件)を所定の審査を経て採択した。採択課題は以下の通り。

- **石川班**: イトヨ eQTL 解析のための超多サンプル RNA-Seq、シングルセル ATAC/RNA-Seq x(2件)
- **深津班**: カメムシ共生器官の超多サンプル RNA-Seq、RAD-Seq
- **市橋班**: 人工進化させた RNA の RNA-Seq 解析
- **鈴木班**: マウス ATAC-Seq、シマヘビの新規ゲノム解読
- **長谷部班**: 食虫植物の新規ゲノム解読、トランスクリプトーム解析。シングル核 RNA-Seq 解析。
- **阿部班**: カナガシラのゲノム解読及び多サンプル RNA-Seq 解析
- **新美班**: テントウムシ RNA-Seq 解析、シングルセル RNA-Seq 解析、CATCH 法
- **高橋班**: ショウジョウバエの多サンプル RNA-Seq
- **守屋班**: 網羅的プラスミド集団シーケンシング(ナノポア)、RNA-Seq
- **守野班**: クサイロアオガイのゲノム解読
- **入江班**: メダカ胚のシングルセル RNA-Seq 解析
- **安岡班**: カエルの超多サンプル RNA-Seq 解析
- **森下班**: Spatial transcriptome と統合するためのシングルセル RNA-Seq 解析

上記支援課題に対し、総括班大規模解析支援チーム(長谷部・重信に加えて、博士研究員1名、研究支援員2名)が研究支援を行った。支援を強化するために、今年度より技術支援員を1名増員した。打ち合わせや実験における人的交流を含む各班員と支援チームの緊密な連携が図られた。支援内容は多岐にわたるが、超多サンプル RNA-seq、ロングリードによる細菌ゲノム解読、非モデル生物の新規ゲノム解読、細菌叢解析、ナノポアによるプラスミド解析などである。今年度は特に、革新的なトランスクリプトーム解析として脚光を浴びているシングルセル RNA-Seq に挑戦する班が多く、領域内で情報を共有しながら研究を進めた。コンピュータ解析の個別トレーニングも実施した。

大規模解析支援チームでは領域内ニーズに合わせた技術開発を進めた。ナノポアシーケンシング、de novo ゲノムアセンブリ、微量サンプルからの超多サンプル RNA-seq、ATAC-seq、シングルセル解析など。新しい解析技術の情報収集や導入も積極的に行なった。バイオインフォマティクスについては、ストレージを強化するとともに、クラウドでのハイパフォーマンスコンピューティングの環境の開発を進めた。

大規模解析情報交換会を2回開催した。第6回大規模解析情報交換会は、2020年6月17日にオンラインにて開催した。重信が講師を務め、ゲノム情報の可視化をテーマにハンズオンレクチャーを行った。第7回大規模解析情報交換会は2021年2月18日にオンラインにて開催した。計画班及び公募班で大規模解析を実際に担当している研究者が、失敗談や未解決の問題を含む具体的な経験を披露し、それをもとに参加者全員で議論を行った。

コロナ禍において、活動制限や試薬等の調達の問題が発生し、サンプル調達や班員の移動をともなう実験などに遅延が生じるなどの影響があった。しかし、オンラインツールを積極的に導入するなどの工夫によって、総じて支援活動のアクティビティを下げることなく領域の研究を推進することができた。

理論解析支援報告

古澤 力

本領域の大きな特徴は、統計物理を背景とした理論生物学研究を取り入れ、表現型の制約や方向性に関する進化について、統一的な視点から理解しようとする点にある。この目的のためには、これまでの理論研究に関する情報共有と、さらなる理論の発展へ向けた密な議論を領域内で行う必要がある。さらに、得られた実験データからの特徴量抽出や数理モデル構築など、理論研究との融合研究を推進することが重要となる。そうした連携活動をサポートすることを目的として、理論解析支援班が構成されている。2020 年度は以下の活動を行った。

1: 理論情報交換会の開催

領域が目指す制約進合理論の構築へ向けて、情報共有とメンバーの理論解析技術の向上を目的として、理論情報交換会を開催した。第 6 回理論情報交換会は 2020 年 6 月の領域会議の前日に開催され、計画班の金子・藤本を中心として、ボディプランの起源と多様性に関する総合討論が行われた。まず金子により、ボディプランの生成を理解するための方向性が提示された。親族構造が個人と集団の階層進化モデルで出現したように、多細胞生物においても、個々の細胞とその集団という階層進化モデルを考え、それに物理的な拘束や、機能的な拘束(例:消化管の形成)の条件を課すことにより、ボディプランの出現を議論できるのではないか、というアイデアである。次に藤本により、これまでに議論されたボディプランの分類に関するレビューの後に、多細胞生物の対称性や基本的な構造に着目することにより、可能なボディプランの出現と変遷を理論的に解析するというアイデアが提示された。この金子・藤本両氏によるプレゼンを起点として、非常に活発な質問・コメントの応酬が引き起こされた。

第7回理論情報交換会は 2021 年 2 月に行われた。この会では、総括班の古澤が中心となり、揺らぎに関する総合討論が行われた。具体的には、表現型揺らぎを観察したときのバラツキが、何に依存するものであって、理論的にはどのような関係があるとされ、実験においてどのように扱うことができるのか、そして複数のメカニズムをどのように分類して切り分けられるか、ということが解説および議論された。大腸菌、ハエ、蛇、魚、花、食虫植物、RNA 分子といった、領域において具体的に実験で扱われる様々な例を元に説明および議論が行われ、様々な生物種や階層を扱う実験研究者や理論研究者からの疑問やコメントを起点として、活発な議論が引き起こされた。時間内に議論が収束しなかったため、slack において議論が継続され、さらに 2021 年 3 月に 10 名程度の参加者によって、続・理論情報交換会が開催された。これらの議論をまとめた文章が、公募班代表の細田を中心として執筆され、ニュースレターとして公開されている。興味のある方は一読をお願いしたい(<https://constrained-evo.org/news.html> の Vol.5 No.2)。

2: 領域内での実験・理論融合研究の支援

理論解析支援班の活動の一つとして、必要とする班と共同研究を行い、理論解析の支援を行った。各班の研究内容と進展に依存して、さまざまな理論解析が進んでいる。例えば、入江班が取得したメダカの遺伝子発現揺らぎと進化応答のデータに関して、その関係を抽出するための適切な解析手法が支援の一環として開発された。また、長谷部班との共同研究では、植物細胞の分裂面を予測する数理モデル構築が進んでおり、この解析から植物形態形成の揺らぎがどのように制御されるかの仕組みが理解されつつある。また、古澤・入江が中心となり、複数の公募班と個別に研究を議論する場を設け、それぞれの研究における揺らぎの計測について議論を行った。今後も、領域会議や個別の議論を通じ、領域内での理論解析支援を積極的に推進する。

国際活動支援報告

入江 直樹

本領域が研究の対象とする進化の制約や方向性は「進化可能性」に直結する問題であり、これに取り組むグループ研究は世界を見渡しても珍しい。本領域の研究はこうした中で世界的な学術潮流を生み出すべく活動が続けている他、進化学分野の発展が著しい東アジア諸国の進化学研究者が相互に交流できる国際コミュニティ(AsiaEvo)の立ち上げに成功するなど、進化生物学分野全般の活性化にも貢献してきた。

国際会議等での活動

2020 年度は、新型コロナウイルス感染症拡大の影響を受け国際交流がほぼ閉ざされ、予定していた国際会議も数多くがキャンセル・延期となってしまうものの、オンラインでの定期セミナーシリーズをスタートさせるなど、新しい形での国際交流を行った。国際公開オンラインセミナーでは、領域内の班代表のみならずのみならず大学院生や一般にも公開とすることで、積極的に本領域が目指す学術的潮流の構築を行った。第一回目は、Gunter Wagner 博士を招聘するなど、2020 年度内にすでに3件の著名な進化生物学者を招待し、講演・議論を行った。

CDE Online Open meeting

- ・ 第一回 2021 年 3 月 12 日: Dr. Gunter Wanger (Yale University, U.S.A.)
- ・ 第二回 2021 年 3 月 19 日: Dr. Akane Kawaguchi (Vienna BioCenter, Austria)
- ・ 第三回 2021 年 3 月 26 日: Dr. Mikhail Tikhonov (Cambridge University, U.K.)

上記公開国際オンラインセミナーの情報は、進化分野のメーリングリストへの周知のみならず、領域ウェブサイトでも積極的に情報公開している (<http://constrained-evo.org/docs/CDEonline1b.pdf> など)。

この他にも、国際活動支援班の予算とは別に、計画班・公募班にて招待講演 10 件(うち基調講演1件、領域メンバーによる企画3件)、国際会議での講演・情報発信(招待講演以外)3件の国際連携を行い、オンラインという制限がありつつも、領域で得られた知見の積極的な情報発信と国際交流を進めた。

AsiaEvo

また 2018 年度に発足させることに成功した AsiaEvo (アジア圏の国際進化生物学コミュニティ)も、2021 年度に第二回を東京(オンライン)にて開催予定であり、班員が運営に関与しつつ今後のさらなる交流や展開を見据えた準備を進めている。領域からは、「Phenotypic Evolvability(表現型の進化可能性)」というシンポジウム企画を 2nd AsiaEvo にて開催する。本領域以外ではほぼ唯一といっていい進化可能性にかんする研究プロジェクト、Norwegian Academy of Science, Center for Advanced Study「Evolvability project (2020 年に終了)」の中心メンバーとの交流も続いており、当該シンポジウムにて講演いただく予定となっている。

国際連携・共同研究

領域では 3 班 4 件の国際共同研究(台湾 Academia Sinica, オークランド大学、ニールス・ボーア研究所、コペンハーゲン大学)が行われ、領域が目指す新しい学術的潮流を生み出すための活動となった。また、Norwegian Academy of Science, Center for Advanced Study「Evolvability project (2020 年終了)」メンバーとの交流も続いており、AsiaEvo での招聘や、オスロ大学の研究者

との定期的なオンライン会議など、進化生物学分野の新たな展開に向けて順調に交流が進んでいる。

脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性

倉谷滋、平沢達矢、Juan Pascual-Anaya（理化学研究所）

発生における筋-骨格結合樹立過程とその進化上の変異性について、いくつか進展があった。まず、トラザメ胚とマウス胚において細胞系譜解析を展開し、形態的多様化が極端に小さく進化上「制約」の存在を予想させる外眼筋の発生過程の理解を進めた。特にトラザメ胚に対しては細胞標識が技術的に困難であったが、DiI インジェクションを駆使してこれを可能とすることに成功した。結果、外眼筋の筋-骨格結合樹立の際に、一部の腱は従来考えられてきた神経堤細胞由来ではなく、筋と同じく頭部中胚葉由来であることが突き止められた。形態変異性が比較的大きい四肢筋の腱も中胚葉由来であることから、外眼筋形態進化の制約要因として神経堤細胞の特性が関与している可能性は排除されることとなった。

次に、脊椎動物前肢に関して、進化における変化の方向性、制約と発生擾乱の結果としての変異がとりうるパターンについて、それぞれ化石記録、発生学実験および先天異常のデータを集めて比較を行った。その中で、進化(化石記録)上は観察される変化パターンの多くは発生擾乱の結果としても認められるが、一部は進化系列にしか見られない変化方向性であることが分かってきた。これは、発生上の揺らぎと進化的傾向の関連を解明するためには、進化過程で発生のロバストネスが変化した可能性を考慮に入れるべきであることを示唆する。

一方、発生機構的探索として、ニワトリ胚で組織移植による筋-骨格結合の発生擾乱実験を進めたが、研究室立ち入り制限が続いたため、本格的なデータ取得は次年度に持ち越された。

また、細胞型分化過程にある遺伝子発現プロファイル変化を明らかにするための比較トランスクリプトーム解析に関して、順調に円口類からのデータ取得、解析を進めた。

- Kuroda, S., Adachi, N., Kusakabe, R., and Kuratani, S. (2021). Developmental fates of shark head cavities reveal mesodermal contributions to the tendon progenitor cells for extraocular muscles. *Zool. Lett.* 7: 3
- Uesaka, M., Kuratani, S., and Irie, N. (2021). The developmental hourglass model and recapitulation: An attempt to integrate the two models. *J. Exp. Zool. Part B*, <https://doi.org/10.1002/jez.b.23027>.
- Kuratani, S., Uesaka, M., and Irie, N. (2021). How can recapitulation be reconciled with modern concepts of evolution? *J. Exp. Zool. Part B*, Dec 31. doi: 10.1002/jez.b.23020. Epub ahead of print.
- Kusakabe, R., Higuchi, S., Tanaka, M., Kadota, M., Nishimura, O., and Kuratani, S. (2020). Novel developmental bases for the evolution of hypobranchial muscles in vertebrates. *BMC Biol.* 18: 120.
- Kuratani, S. (2021). Evo-Devo studies of cyclostomes and origin and evolution of jawed vertebrates. In: S. F. Gilbert (ed) *Evolutionary Developmental Biology*. Elsevier/Acad. Press; pp. 207-240.
- Kusakabe, R., and Kuratani, S. (2021). Development and evolution of the neck muscles. In: Nuno de la Rosa L., Müller G. (eds.) *Evolutionary Developmental Biology: A Reference Guide*. Springer, Cham. pp. 849-862.
- Hirasawa, T., and Kuratani, S. (2021) Evolution of Skeletal Tissues. In: Nuno de la Rosa L., Müller G. (eds) *Evolutionary Developmental Biology: A Reference Guide*. Springer, Cham. pp. 863-875.
- Kuratani, S. (2020). Neural crest and craniofacial evolution of vertebrates. In: D.M. Medeiros & B. Eames eds. *Evolving Neural Crest Cells (Evolutionary Cell Biology)*. Taylor and Francis, pp. 219-241.

進化のゆらぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開

金子邦彦(東大総合文化) 藤本仰一(阪大理)

(i) **表現型進化の方向性と拘束の理論**: これまでにロバストネス進化により表現型変化が低次元空間に拘束されることを示してきた。今年度は統計力学のスピングラスモデル、またタンパクのデータを用いて、この進化的次元縮減が普遍的であることを示した。タンパクのモデルにおいてはロバストネスと可塑性を両立させると緩和スペクトルがべき的な振る舞いをし、臨界状態が実現していることを示した。以上は3篇の論文として出版されている。また遺伝子制御ネットワークの適応ダイナミクスが進化により低次元に束縛され、これを利用して新規入力への適応性を有することを示した。

(ii) **階層進化理論**: 情報—機能分化の対称性破れの理論を昨年度発表したもので、まずこの条件をあらわす分子数と変異率に関するスケーリング関係をシミュレーションにより求め、理論的に説明した。次に細胞レベルでは細胞内共生体と細胞の進化を通して、遺伝子がホスト側に移動する条件を求めた。多細胞生物に関しては遺伝子発現とエピジェネティクスの相互フィードバックで発現状態の振動を通して安定した分化が生じること、またそれがリプログラミングできることを明らかにした。生態系の階層では細胞が有用成分をもらうことで多種共生が生じ、それにより安定した生態系が形づくられることを明らかにした。またホストとパラサイトの相互作用によって表現型の揺らぎを増す進化が生じ、可塑性の進化が生まれることを示した。さらに個体—社会の階層に対しては社会での家族構造の四類型がどのような条件で生じるかを示し、それによって生成される社会、経済構造を求めた。

(iii) **進化発生対応の理論**: 発生の砂時計仮説が発生過程のロバストネスと遅い遺伝子発現制御過程の進化により生じることを明らかにした。

[藤本グループ]: 刺胞動物の器官配置の対称性に関する形態解析から発見した種内多型に対して、その発生要因を数理モデルで調べた。その結果、左右対称および放射対称な個体を発生させる無性生殖初期の揺らぎを予測し、倉谷班との共著論文を投稿した。また、コケ植物の器官配置について、幹細胞の成長と分裂に関する幾何学モデリングを進めた。その結果、分裂面の回転角度に応じてらせん的な器官配置の多様性が生まれることを見出し、論文を出版した。さらに、器官形状に種を超えた普遍性とその発生拘束を見出し、論文を出版した。被子植物の根端の輪郭をスケーリングすると、複数種で共通してカタナリー曲線に一致することを発見した。カタナリー曲線を生み出す力学作用に基づき、根端がカタナリー形状となる発生拘束を予測し、この拘束を数理モデルと変異体実験の双方で乱すことで、その必要性を証明した。

Kohsokabe, T., & Kaneko, K. (2020). Dynamical Systems Approach to Evolution–Development Congruence: Revisiting Haeckel’s Recapitulation Theory. *J Exp. Zoology B*, 2021;1-14.

Tang, Q. Y., Hatakeyama, T. S., & Kaneko, K. (2020). Functional sensitivity and mutational robustness of proteins. *Physical Review Research*, 2(3), 033452.

Sakata, A., & Kaneko, K. (2020). Dimensional reduction in evolving spin-glass model: correlation of phenotypic responses to environmental and mutational changes. *Physical Review Letters*, 124(21), 218101.

Itao, K., & Kaneko, K. (2020). Reply to Read and Parkin: Our model correctly expresses the ethnographic nature of the cultural incest taboo and kinship structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9167–9168.

Matsushita, Y., & Kaneko, K. (2020). Homeorhesis in Waddington's landscape by epigenetic feedback regulation. *Physical Review Research*, 2(2), 023083.

Fujiwara, M., Goh, T., Tsugawa, S., Nakajima, K., Fukaki, H., and Fujimoto, K. (2021) Tissue growth constrains root organ outlines into an isometrically scalable shape. *Development* 148: dev196253. doi:10.1242/dev.196253

Kamamoto, N., Tano, T., Fujimoto, K., and Shimamura, M. (2021) Rotation angle of stem cell division plane controls spiral phyllotaxis in mosses. *J. Plant Res.* <https://doi.org/10.1007/s10265-021-01298-0>

Matsushita, K., Yabunaka, S., and Fujimoto, K. (2021) Polarity fluctuation inhibition by memory in collective cell motion. *J. Phys. Soc. Jpn.* 90, 054801

Okuda, S., and Fujimoto, K. (2020) A mechanical instability in planar epithelial monolayers leads to cell extrusion. *Biophys. J.* 10(19): 2549–2560.

坪井有寿, 奥田覚, 藤本仰一. (2020) 細胞競合の力学的理解. *医学のあゆみ* 274(5): 537–543.

脊索動物胚発生の分子発生システム揺らぎ測定と進化的保存性

入江直樹、上坂将弘、内田唯(東京大学)

動物の基本的な解剖学的特徴(ボディプラン)は5億年以上に渡って強固に保存されており、系統慣性(phylogenetic inertia)の好例とされる。ボディプランが保存される理由は、発生過程におけるボディプラン形成期間(動物門ごとの典型的な形を決めるという意味からファイロティピック段階と呼ばれる)の保存性によるのではないかと考えられており、近年の比較分子発生学的研究もこれを支持してきた(発生砂時計モデル)。しかし、結局のところなぜ器官形成期が進化的に保存されるのか、その進化メカニズムはよくわかっていない。動物胚の器官形成期が進化を通して保存されるのはなぜなのか。これまでの研究から、器官(ボディプラン)形成期は脊椎動物の進化を通してずっと保存のターゲットとなっていること(Persistent conservation, Hu *et al.* Nature Eco Evo 2017)がみえてきており、環境要因よりも(発生などの)内的要因が数億年スケールの多様化にバイアスをかけている可能性が考えられた。こうした内的要因の1つとして、従来仮説では器官形成期が容易に胚致死に至ることで強い負の選択圧に晒されているという脆弱説が指摘されてきた。しかし、本課題の研究ではこれを否定する結果(Uchida *et al.* EvoDevo 2018)を得ている。つまり、器官形成期は従来考えられていたほど脆弱ではなく、むしろ頑健である可能性が示唆された。器官形成期の保存に遺伝子の使い回しによる拘束(pleiotropic constraint)が寄与している可能性も浮上している(Hu *et al.* Nature Eco Evo 2017)。

2019年度は、保存性が生じた器官形成期のみならず、器官形成期後に多様化する発生段階にもフォーカスし、発生が進むほど種間の多様性が大きくなるという傾向を説明する何らかの発生学的特徴・傾向があるかどうかについて調べた。1つの可能性として、古くは Ernst Haeckel が提唱した反復説のように、発生の後期ほど進化的に新しい分子メカニズムが働いているのではないかと考えた。全胚由来遺伝子発現情報では、すでにこうした反復的な傾向が認められないことがわかっているが(Wang *et al.* Nature Eco Evo 2013, Hu *et al.* Nature Eco Evo 2017)、タンパク質コーディング遺伝子は異なる発生段階で頻繁に使い回し(多面的発現)が行われており、反復的な傾向を検出するには解像度が十分でないかもしれない。そこで、分担者の上坂は、遺伝子発現制御機構に着目し、発生過程後期における傾向を探った。具体的には、マウス・ニワトリ・メダカの発生過程を対象とした全胚 ATACseq データ解析を行ったところ、器官形成期以降の発生段階でのみ、配列上進化的に新しい制御領域がより後の発生段階で出現すること傾向が認められた(Uesaka *et al.* Zoological Letters 5:33, 2019)。これは、器官形成期より後の多様性が大きくなる発生段階においては、進化を繰り返すかのような反復的傾向を示すことを示している。一方で、こうした反復的傾向は発生初期から器官形成期までの時期には検出されなかった。ヘッケルの反復説をはじめとする反復的な傾向は、特定の形態的特徴について一部支持する報告はあったが、包括的な制御領域を対象とした実験から支持されるのは今回が初めてのことである。しかしながら、こうした反復的な傾向をもたらす進化メカニズムは不明のままである。また、遺伝子制御レベルでは反復的傾向がみられておらず、遺伝子制御レベルでのみこうした反復的傾向がみられることも十分な説明がなく、今後の研究を待つ必要がある。

Recapitulation-like developmental transitions of chromatin accessibility in vertebrates

Masahiro Uesaka*, Shigeru Kuratani, Hiroyuki Takeda, Naoki Irie

Zoological Letters 5, Article number: 33 (2019)

The developmental transcriptome for *Lytechinus variegatus* exhibits temporally punctuated gene expression changes

John D. Hogan, Jessica L. Keenan, Lingqi Luo, Dakota Y. Hawkins, Jonas Ibn-Salem, Arjun Lamba, Daphne Schatzberg, Michael L. Piacentino, Daniel T. Zuch, Amanda B. Core, Carolyn Blumberg, Bernd Timmermann, José Horacio Grau, Emily Speranza, Miguel A. Andrade-Narravo, Naoki Irie, Albert J. Poustka, Cynthia A. Bradham

Developmental Biology <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.12.002> (2019)

昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明

深津武馬、古賀隆一、森山実(産業技術総合研究所)、重信秀治(基礎生物学研究所)、二河成男(放送大学)、細川貴弘(九州大学)、西出雄大(農研機構)、松浦優(琉球大学)

従来の共生研究はすでに高度に確立した共生関係を対象としてきたが、我々の研究により、環境中には特定の宿主生物、例えば半翅目昆虫のチャバネアオカメムシなどに潜在的な共生能力を有する細菌が普遍的に存在することがわかってきた。このような環境中の「潜在的共生細菌」「共生可能細菌」の全貌を把握するとともに、既知の「必須共生細菌」や「任意共生細菌」と比較解析し、さらにはそれらを宿主昆虫に継続的に感染させて実験共生進化させることにより、共生進化の条件や可能性、さらにはその促進要因や制約機構を探る。またそれら実験データを理論生物学や統計物理学の観点から解析、統合することにより、共生進化と揺らぎ応答の関係について明らかにする。

本年度の主要な成果は以下の通りである。

- (1) 主要モデル系のチャバネアオカメムシに加え、他にも共生可能性進化実験モデルとして有用な可能性のあるカメムシ類およびその他の昆虫類について、野外採集による試料収集、実験室飼育維持手法の確立、共生細菌の単離、培養、機能解析などを推進した。
- (2) チャバネアオカメムシの共生細菌除去幼虫を日本各地から採取した土壌試料に曝露して、細菌感染により成長できた個体をスクリーニングすることで、環境中に存在する共生可能細菌群の網羅的な探索、分離、同定を進めた。
- (3) 得られた共生可能細菌系統について順次ゲノム配列決定、感染宿主カメムシの中腸共生器官の RNA-seq を行い、細菌側と宿主側のそれぞれについて、高発現している遺伝子群や共生能力に関わる可能性のある遺伝子群を同定し、特段に高発現しているものや興味深い機能を有することが予想されるものについて機能解析を進めた。
- (4) チャバネアオカメムシ地域個体群と難培養共生細菌、培養可能共生細菌、潜在的共生細菌の共進化、感染適合性、感染能比較などの実験生理学的な解析を推進した。
- (5) チャバネアオカメムシその他のカメムシ類について、難培養共生細菌、培養可能共生細菌、潜在的共生細菌を同定して、培養性、資化能力、細胞形態、運動性などの比較解析を推進し、共生進化レベルとの相関関係について検討した。
- (6) 異なるレベルの共生能力を示す難培養共生細菌、培養可能共生細菌、潜在的共生細菌を共生細菌除去幼虫に感染させることにより、感染密度、局在、垂直感染率、宿主共生器官の形態や大きさなどの表現型効果を定量的に評価して、解析を行った。
- (7) チャバネアオカメムシ本土集団の難培養共生細菌 A と、チャバネアオカメムシ沖縄集団の難培養共生細菌 B の間で、共生細菌除去、移植、交換等の実験生物学的なアプローチから、宿主—共生細菌間の共進化および特異性について検討を行なった。
- (8) チャバネアオカメムシ本土系統と沖縄系統の交配実験、共生細菌 A および B の定着率を指標にした RAD-seq QTL 解析により、共生特異性に関わる宿主側遺伝子の探索を推進した。

† Reis F., Kirsch R., Pauchet Y., Bauer E., Bilz L. C., Fukumori K., Fukatsu T., Kolsch G., Kaltenpoth

- M. (2020) Bacterial symbionts provide life stage-specific benefits that support larval sap feeding and adult folivory in aquatic reed beetles. *Nature Commun* 11: 2964.
- † Mondal S. I., Akter A., Koga R., Hosokawa T., Dayi M., Murase K., Tanaka R., Shigenobu S., Fukatsu T., Kikuchi T. (2020) Reduced genome of the gut symbiotic bacterium "*Candidatus Benitsuchiphilus tojo*" provides insight into its possible roles in ecology and adaptation of the host insect. *Front Microbiol* 11: 840.
- † Noda T., Okude G., Meng X. Y., Koga R., Moriyama M., Fukatsu T. (2020) Bacteriocytes and *Blattabacterium* endosymbionts of the German cockroach *Blattella germanica*, the forest cockroach *B. nipponica*, and other cockroach species. *Zool Sci* 37(5): 399–410.
- † Kubota K., Watanabe K., Zhu X. J., Kawakami K., Tanahashi M., Fukatsu T. (2020) Evolutionary relationship between *Platycerus* stag beetles and their mycangium-associated yeast symbionts. *Front Microbiol* 11: 1436.
- † Egan S., Fukatsu T., Francino M. P. (2020) Opportunities and challenges to microbial symbiosis research in the microbiome era. *Front Microbiol* 11: 1150.
- † Hosokawa T., Fukatsu T. (2020) Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Curr Opin Insect Sci* 39: 91–100.

多様な選択圧下での大腸菌進化実験による揺らぎ-応答関係の定量解析

古澤力(理化学研究所)、若本祐一、津留三良(東京大学)

【研究目的・背景】

生物システムは環境変動に応じて、柔軟にその内部状態を変化させ、新たな環境に対して適応・進化する能力を持つ。一方で、表現型変化は任意の方向に起こるのではなく、そこには明確な制約と方向性が存在する。本研究課題では、大腸菌進化実験を用いることにより、その表現型変化の制約と方向性の存在を定量的に明らかにする。それらのデータから、揺らぎ-応答関係がどのように成り立ち、そこから進化過程の抑制と方向性をどのように予測できるかを検証する。

【研究実績】

(1) 多様なストレス環境下での大腸菌進化実験:

これまでに、申請者が開発したラボオートメーションを用いた全自動の進化実験システムを用いて得られた大規模表現型・遺伝子型データを解析することにより、様々に異なる選択圧の下で得られた大腸菌進化株であるにもかかわらず、遺伝子発現プロファイルや耐性プロファイルといった表現型は少数のパターンに拘束されていることが見出された。また、ある一つの薬剤を添加した環境での大腸菌進化実験の過程において、同時に他の複数の薬剤に対する耐性能を定量することにより、高次元の耐性能空間における軌跡として進化ダイナミクスを記述することが出来る。そこで、8次元の耐性能空間において、異なる初期条件から始めた進化実験の軌跡を定量し、それに基づき適応度地形の推定を行った。結果として、複数のピークを持つ適応度地形が存在することが明らかとなり、そうした複数ピークを持つ地形の遺伝的背景を同定することに成功した。

(2) 顕微鏡観察による大腸菌遺伝子発現揺らぎと環境応答の定量:

昨年度までに立ち上げた、蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーを用いた遺伝子発現量の揺らぎの解析系を用い、遺伝子発現の揺らぎの大きさと環境変化に対する応答を定量したところ、理論から予測されるように両者の間に正の相関があることを見出した。さらに、大腸菌のプロモーター領域にランダムな変異を導入したライブラリを構築し、変異に対する発現量の頑強性を調べたところ、非必須遺伝子のプロモーター領域に比べて、人工のそれは発現量が増加しやすく、必須遺伝子のそれは発現量が低下しやすいことが分かった。この実験結果から、プロモーター領域の違いが、下流の遺伝子の発現量の進化の方向にバイアスを作り出していることが示唆された。

(3) 1細胞計測系を用いた遺伝子発現揺らぎと環境摂動への応答の定量:

大腸菌などの微生物について、発現プロファイルなどの高次元の表現型を非破壊的に定量することを目的として、ラマン分光を用いた表現型解析の手法を構築した。適切な機械学習を用いることにより、ラマン分光のスペクトルに基づいて、オミクス解析によって得られた発現プロファイルを定量的に予測可能であることが示された。またこの結果は、発現プロファイルの変化が比較的低次元に拘束されていることを示唆している。

【今後の展望】

これまで議論されてきた揺らぎ-応答進化理論を踏まえ、大腸菌の表現型進化がどのように拘束

されているか、また進化可能性をどのように理解できるかを実験データから明らかにする。それに基づき、理論解析を援用しつつ進化の予測と制御を可能とする手法を構築する。

“High-throughput laboratory evolution and evolutionary constraints in *Escherichia coli*”, T. Maeda, J. Iwasawa, H. Kotani, N. Sakata, M. Kawada, T. Horinouchi, A. Sakai, K. Tanabe, C. Furusawa, *Nature Communications* 11(1):5970 (2020)

“Toward understanding of evolutionary constraints: experimental and theoretical approaches”, C. Furusawa and N. Irie, *Biophys. Rev.* 12(5):1155–1161 (2020)

“Understanding metabolic adaptation by using bacterial laboratory evolution and trans-omics analysis”, T. Horinouchi, C. Furusawa, *Biophys. Rev.* 12(3):677–682 (2020)

“Suppression of antibiotic resistance evolution by single-gene deletion”, T. Horinouchi, T. Maeda, H. Kotani, C. Furusawa, *Sci. Rep.* 10(1):4178 (2020)

“Intrinsic growth heterogeneity of mouse leukemia cells underlies differential susceptibility to a growth-inhibiting anticancer drug”, A. Seita, H. Nakaoka, R. Okura, Y. Wakamoto, *PLoS ONE* 16(2): e0236534 (2021)

“Elevated Sporulation Efficiency in Fission Yeast *Schizosaccharomyces japonicus* Strains Isolated from *Drosophila*”, T. Seike, N. Sakata, F. Matsuda, C. Furusawa, *Jour. Fungi* (5):350 (2021)

摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明

長谷部光泰、鳴川秀樹、Gergo Palfalvi、須田啓、真野弘明（基礎生物学研究所）

【研究目的・背景】

本研究では、食虫植物の食虫性(誘引、捕獲、消化、吸収)を担う遺伝子を特定し、それらが、協調して進化しえた機構を「揺らぎ応答進化理論」で説明できるかを検証する。さらに、環境依存的な捕虫葉形成に着目し、植物の環境感知に関わるクロマチン状態と協調的な表現型進化の関連を調べることを目的とする。

【研究実績】

【課題1. 食虫性関連遺伝子の特定】 Palfalvi を中心に、昨年度に追加してシングルセルトランスクリプトーム解析を行うとともに、位置情報を付加し、食虫性に関わる遺伝子を抽出するため、代表的な遺伝子の in situ ハイブリダイゼーション実験を行う条件検討を行った。鳴川を中心に、推定した遺伝子の詳細な解析を行い、サイトカイニン分解酵素が捕虫葉形成に重要な役割を果たしている可能性が高いことを発見した。さらに、平面葉の異なった発生をする組織で同遺伝子が発現していることを in situ ハイブリダイゼーション法によって確認した。ウイルス誘導遺伝子サイレンシング法を用いたノックダウン法を検討したが、安定的にサイレンシング個体を得ることが難しいことがわかった。そこで、アグロバクテリアを用いた形質転換実験を開始し、CRISPR/Cas9 法によりサイトカイニン分解酵素を破壊するようなコンストラクト、葉形態形成に関わるオーキシンを検出できるセンサーのコンストラクトを作成し、形質転換を行い、現在、スクリーニング中である。ラノリンペーストによる局所投与法は、組織への吸収がおこらないためか、うまく表現型の変化が検出できなかった。

Cheng、瀬上を中心に、ムジナモのカルスを用いて形質転換系の確立を行っている。葉と葉柄の接合部から効率的にカルスが形成されることを発見し、表皮細胞への感染を確認した。切片観察の結果、組織内部から幹細胞が形成されることがわかり、カルスを切断して内部細胞に直接感染させる実験を開始した。シングルセルトランスクリプトーム解析を開始し、純粋な核の単離に成功した。

棚瀬、瀬上を中心に、モウセンゴケのカルス、苗状原基の誘導を行い、形質転換系の確立を目指したが、表皮細胞に感染するのみで幹細胞への感染が見られなかった。そこで、葉に穴を開け、アグロバクテリアを葉の内部組織に直接感染させることで、幹細胞にアグロバクテリアを感染させることに成功、形質転換モウセンゴケが得られて。運動受容位置を特定し、運動受容と伝達機構に関わる遺伝子を特定するためのシングルセルトランスクリプトーム解析のために、核単離条件の検討を行った。

Palfalvi を中心に、ハエトリソウ、コモウセンゴケ、ムジナモのゲノム比較の論文を出版した(Palfalvi et al. 2020 Curr. Biol.)。Palfalvi を中心に、ハエトリソウとコモウセンゴケの初期発生段階におけるトランスクリプトーム比較解析結果を論文を執筆開始した。

須田を中心に、ハエトリソウの食虫性の特徴である記憶機構について論文を出版した(Suda et al. 2020 Nature Plants)。食虫植物の運動に関わる遺伝子候補探索のため、同じように速い運動を行うオジギソウにおける運動機構に関わる LOB 遺伝子の遺伝子破壊体と野生型での運動器官の細

胞変化について観察を行った。

[課題2. 環境摂動による遺伝子発現応答の解析]昨年度に引き続き、Palfalvi、鳴川を中心としてフクロユキノシタに環境摂動を与え、食虫性関連遺伝子の発現応答を測定することで「揺らぎ応答進化仮説」が食虫植物進化に適用可能かを調べた。異なる光条件(24 時間連続明、16 時間明 8 時間暗、8 時間明 16 時間暗)、培養温度(15°C、25°C)、栄養分である窒素濃度を変えた条件、サイトカイニン投与、エチレン前駆体投与など、前年度から解析途中の約 300 サンプルの RNA 抽出を完了し、RNA-seq が進行中である。自然界で無いような環境条件でできることがわかった異常形態葉について、論文を発表した(Fukushima et al. 2021 Proc. R. Soc. B)。

[課題3. 温度感受に関わるクロマチン動態の解析]Palfalvi を中心に食虫性関連遺伝子が共通のエピジェネティック制御を獲得して進化した可能性を検証するため、ATAC-seq 解析を開始し、食虫性遺伝子発現とクロマチン状態に関連があるかを調べている。

Palfalvi, G., Hackl, T., Terhoeven, N., Shibata, T.F., Nishiyama, T., Ankenbrand, M., Becker, D., Forster, F., Freund, M., Iosip, A., Kreuzer, I., Saul, F., Kamida, C., Fukushima, K., Shigenobu, S., Tamada, Y., Adamec, L., Hoshi, Y., Ueda, K., Winkelmann, T., Fuchs, J., Schubert, I., Schwacke, R., Al-Rasheid, K., Schultz*, J., Hasebe*, M., and Hedrich*, R. (*: co-corresponding authors) 2020. Genomes of the Venus flytrap and close relatives unveil the roots of plant carnivory. *Current Biology* 30, 1-9.

Suda, H., Mano, H., Toyota, M., Fukushima, K., Mimura, T., Tsutsui, I., Hedrich, R., Tamada, Y., and Hasebe, M. (2020). Calcium dynamics during trap closure visualized in transgenic Venus flytrap. *Nat. Plants* 6, 1219-1224.

Fukushima, K., Narukawa, H., Palfalvi, G., and Hasebe, M. (2021). A discordance of seasonally covarying cues uncovers misregulated phenotypes in the heterophyllous pitcher plant *Cephalotus follicularis*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 288.

胸ヒレ鰭条の種内ゆらぎを生み出す発生メカニズムと種間形態多様性

阿部玄武(東北大)

研究の目的・背景

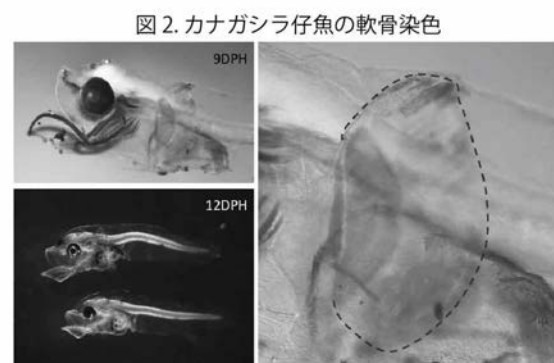
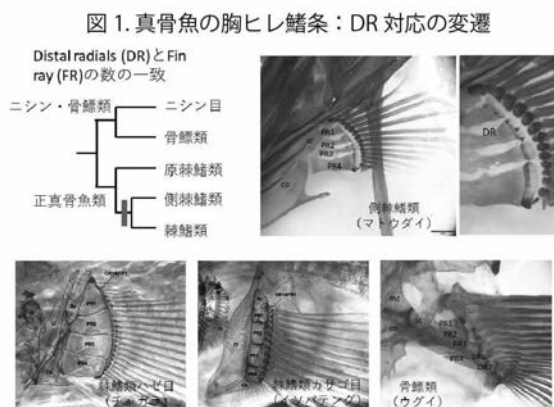
本研究は、種内ゆらぎの元となる発生メカニズムを特定し、そのメカニズムがある動物種を特徴づける特殊な形態の進化に必須である可能性を検証することを目的とする。種内ゆらぎのモデルとして魚類胸ビレの鰭条を取り扱い、環境に応答し胸ヒレ鰭条の本数ゆらぎと区画ゆらぎを生じる発生メカニズムを特定する。この発生メカニズムとして shh 経路と hox 発現制御に注目する。さらに、種を特徴づける特殊な形態として遊離軟条を扱う。Shh 経路や hox 遺伝子による発生メカニズムが、ホウボウ科魚種の遊離軟条の形態進化に関わるのかを明らかにする。

研究実績

本年度は、まず shh 経路がゼブラフィッシュ鰭条形成に関わることを明らかにする目的で、shh 経路に関わるトランスジェニックフィッシュ(TG)を作成した。shh 応答 TG を海外のバイオリソースから取得する共に、CRISPR/Cas9 システムによる Knock-in を行い shh レポーターTG を作製した。ゼブラフィッシュは真骨魚特異的ゲノム重複による二つの shh (shha, b) を持っている。それら二つのレポーターTG を作成し、発現を比較したところ、shhb-TG が一意的に鰭条形成時にヒレ後方で発現が見られることが分かった。

さらに、真骨魚全体のヒレ骨格パターンの進化傾向を調べるため、浅虫水族館のご協力のもと、真骨魚全体にわたるさまざまな系統の魚種を取得し、その胸ヒレ骨格の形態パターンを解析した。その結果、様々な形態特徴が正真骨魚グループのある時期を境に現れ(図1)、それが shh や hox 遺伝子のゲノム構造の変遷と同期している可能性が得られた。現在、データをとりまとめ、論文投稿の準備中である。

また、ホウボウ科魚種の胸ヒレ／遊離軟条発生を解析するため、カナガシラ胚の取得を目指した。青森県浅虫水族館および北大水産の高津哲也先生・中屋光裕先生の協力のもと、人工授精により胚が得られた。孵化した仔魚は、仔魚期の初期の約 2 週間ほど飼育・生育することができた。現在、それまでのサンプルを、骨染色による形態の観察を行っている(図2)。また、大規模支援班の協力により、現在各組織の RNA やゲノムのサンプリングを行い、遺伝カナガシラの遺伝情報の解析基盤を作成中である。



軟体動物割球特異化機構を題材にした発生システム浮動の方向性と制約の解明

守野孔明（筑波大学）

研究目的・背景

近年、発生システム浮動（DSD）と呼ばれる、相同な形質が生物によって異なった分子経路によって形成される事例が認識されてきた。DSD は表現型の変更を起こさないため、種々の選択のもとで進化の源泉となる変異が発生経路に蓄積されることを説明できる現象である。従って、DSD が起きる仕組みや、DSD に見られる方向性と制約の解明は、発生進化の方向性と制約の理解へとつながると考えられる。本課題では、特に保存的な発生を示す腹足類の 3 種、クサイロアオガイ（カサガイ類）、ヨメガカサ（カサガイ類）及びクロアワビの割球特異化機構に着目し、(1) 種内に見られる発現のばらつきの傾向とより長期的な進化の結果である DSD の傾向に相関があるのかを検証する。合わせて、(2) 各割球系列群における運命特異化機構の冗長性の程度を実験的に検証し、冗長性の程度と発現のばらつきおよび DSD の傾向に関連性が見られるかを明らかにする。これにより、発生システムの冗長性が発現揺らぎおよび DSD を許容し、方向性や制約を作り出すことに関与しているのかを解明することを目指す。

研究実績

(1) 1 個体ずつのトランスクリプトームを軸とした、転写因子発現レベルのばらつきの検証

カサガイ類クサイロアオガイを用いて 16・32 細胞期を用いて安定したフローを作ることを目指し、これまでに発生を同調させた上で RNA を安定して抽出する方法を確立した。1 ペアの父母から 16・32 細胞期それぞれ 5 個体より RNA 抽出、ライブラリー作成およびシーケンスを行なった。現在発現のばらつきを解析中である。

(2) 割球特異化システムシステムの機能解析と冗長性の検証

まず、卵割期に各割球系列で発現する転写因子群のうち orphan 転写因子について、mRNA 注入による過剰発現実験を行った。その結果、転写因子の発現領域に対応するマーカー遺伝子群の発現拡大が起こることから、orphan 転写因子群の多くが実際に割球運命特異化の機能があるであろうことを明らかにした。ここまでの成果についてを取りまとめ、投稿準備中である。

並行して、16 細胞期に 2q もしくは Mac の系列で発現する転写因子群を中心に、モルフォリノオリゴの注入による KD 実験を行なった。これまで、発現する転写因子数が少ない 2q 系列で発現する転写因子の KD 胚では、2q 系列マーカーの発現が消失するといった表現型が観察できている。一方で、大割球系列で発現する転写因子の KD では、特異的な表現型が観察できていないが、これが冗長性によるものなのか、KD の不完全性によるものなのかは慎重に検討していく。

(3) クサイロアオガイゲノム解析

本研究で着目する系統特異的転写因子は進化の過程で数を増減させやすい。冗長性や、進化の方向性の理解には、使用する種での遺伝子数の把握が必要である。そこで、本領域の大規模解析支援、並びに基礎生物学研究所の生物機能情報分析室との共同研究のもとに、クサイロアオガイのゲノムシーケンスを行なっている。2020 年度では、状態の良い長鎖 DNA を抽出し、Chromium システムおよび Nanopore を用いたシーケンスを行い、特に nanopore ベースのアセンブルでは N50 が約 300kb になるまで繋がった。今後、より良いアセンブルを構築できるよう条件検

討するとともに、遺伝子モデル構築および転写因子レパートリーの把握およびその進化史の解明へと進んでいきたい。

(4) SPILE 遺伝子群の多様化と発生様式の進化

orphan 転写因子群の中でも、特に SPILE 遺伝子群に着目し、軟体動物を中心にレパートリーと機能の変遷について解析した。その結果、軟体動物の SPILE 遺伝子群には大別して 4 つのグループがあり、祖先ではこの 4 つの遺伝子群を持っていたであろうこと、そのうち 1 つの遺伝子群が二枚貝類では重複し、重複した SPILE の一部が二枚貝の系統で獲得された割球特異化の早期化に関わっている可能性が見出された。このことは、初期発生期に発現する転写因子群の重複が進化の原動力となることを示唆する。これらの成果については、2 報の論文に取りまとめ、一報は 2020 年度中に投稿、もう一報も 2021 年夏に投稿予定である。

特異的相互作用の進化:

植物自家不和合性を用いた理論と再現実験によるアプローチ

土松隆志, 藤井壮太 (東京大学)

共進化する生物同士にはしばしば、特定の相手としか相互作用しないというパートナー選択の特異性がみられる。このような特異性を担う分子の実体は受容体とリガンドであることが多いが、新しい特異性、すなわち「新しい受容体とリガンドのセット」はどのように進化するのかという問題が以前から指摘されていた。受容体とリガンドのいずれかが変化すれば互いに認識されず、特異性は崩れてしまう。このような中間状態を乗り越え新しい特異性はどう進化するのか。本研究では、自家受精を防ぐ自己認識機構である植物の自家不和合性を対象にこの問題に取り組む。今回特に着目するのが、自家不和合性の受容体とリガンドのセット(「*S* 対立遺伝子」と呼ぶ)の特異性が不安定化し部分的に自家和合化するような、特異性の「ゆらぎ」現象である。このようなゆらいだ *S* 対立遺伝子は、自家受精による近交弱勢を被るリスクはあるものの、条件によっては集団中から淘汰されずに維持され、新しい *S* 対立遺伝子へと進化すると予想される。本研究は、数理モデルと実験により *S* 対立遺伝子の進化過程を予測・再現することを通して、特異性のゆらぎと新規受容体-リガンドのセットの進化可能性との関係を、理論と実験の両面から探ることを目的とする。これまでの数理モデル解析から、認識特異性がゆらいだ中間状態があることで新規 *S* 対立遺伝子が長期に渡って祖先型アリルとともに集団内に維持されること、*S* 対立遺伝子間の優劣性と新規 *S* 対立遺伝子の進化のしやすさに関連があるという予測が得られている。これを踏まえ 2020 年度は以下の解析を進めた。

(1)野生集団における自家不和合性遺伝子座の網羅的多型解析:

シロイヌナズナに近縁の自家不和合性種ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri*) を用いて、野生集団における *S* 遺伝子座の塩基配列解析を進めた。2019 年度、リシークエンスデータを用いて S1 (最劣性)、S4 (やや優性)、S12 (優性) という3種類の *S* 対立遺伝子について、同一の特異性をもつとされる *S* 対立遺伝子内にも非同義置換が見られることを見出していた。2020 年度は、野生集団からさらに個体のサンプリングを行ない、*S* 対立遺伝子内の多型解析を進め、*S* 対立遺伝子内の置換を探索した。加えて、ハクサンハタザオとは異なる配偶体型自家不和合性システムをもつナス科ペチュニア属植物 (*Petunia axillaris*) についても、Nanopore を用いたトランスクリプトーム解析等により野生集団内で分離する変異の探索を進め、多数の *S* 対立遺伝子及びその候補を同定した。

(2)形質転換実験による特異性の進化の再現

実際の野生植物集団で発見された *S* 対立遺伝子内のアミノ酸置換を人工的に作成、遺伝子導入し、タンパク質相互作用の程度や自家不和合性の活性の観点から特異性のゆらぎを定量する実験を進めた。また、花粉管伸長などの自家不和合性の表現型を確認と並行して、タンパク質相互作用を効率的に定量する系の開発を進めている。

1. Bamba, M., Aoki, S., Kajita, T., Setoguchi H., Watano, Y., Sato, S., and **Tsuchimatsu, T.** (2020) Massive rhizobial genomic variation associated with partner quality in *Lotus-Mesorhizobium* symbiosis. *FEMS Microbiology Ecology* **96**: fiaa202.
2. Suwabe, K., Nagasaka, K., Windari, E.A., Hoshiai, C., Ota, T., Takada, M., Kitazumi, A., Masuko-Suzuki, H., Kagaya, Y., Yano, K., **Tsuchimatsu, T.**, Shimizu, K.K., Takayama, S., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2020) Double-locking mechanism of self-compatibility in *Arabidopsis thaliana*: the synergistic effect of

transcriptional depression and disruption of coding region in the male specificity gene. *Frontiers in Plant Science* **11**:576140.

3. Tsuchimatsu, T., Kakui, H., Yamazaki, M., Marona, C., Tsutsui, H., Hedhly, A., Meng, D., Sato, Y., Städler, T., Grossniklaus, U., Kanaoka, M.M., Lenhard, M., Nordborg, M., Shimizu, K.K. (2020) Adaptive reduction of male gamete number in the selfing plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature Communications* **11**: 2885.

4. Gutiérrez-Ortega, J.S., Salinas-Rodríguez, M.M., Ito, T., Pérez-Farrera, M.A. Vovides, A.P., Martínez, J.F., Molina-Freaner, F., Hernández-López, A., Kawaguchi, L., Nagano, A.J., Kajita, T., Watano, Y., Tsuchimatsu, T., Takahashi, Y., Murakami, M. (2020) Niche conservatism promotes speciation in cycads: the case of *Dioon merolae* (Zamiaceae) in Mexico. *New Phytologist* **227**: 1872–1884.

多次元形質空間におけるマルチレベルな表現型の ゆらぎの統合と進化の方向性の予測

高橋佐磨(千葉大学)

表現型変異は、生命現象のさまざまな階層で観測される。比較的大きなスケールであれば、種間変異といった系統進化や大進化スケールでの表現型変異を認識できる。少しスケールを下げると集団内における遺伝的な差異に由来する表現型変異 (Standing variation) を認識することができる。また、同じ遺伝的な背景をもっていたとしても、環境に誘導されて出現する表現型変異 (表現型可塑性) や発生過程で生じるランダムな表現型変異 (発生ノイズ) も存在する。一方で、いずれの階層で生じる変異においても無数の形質に変異が見られる。このとき、多次元形質空間上で各形質の表現型をプロットすると、表現型のばらつきが大きくなる形質 (群) とばらつきが小さい形質 (群) が存在する。そのようなばらつき方の方向性 (ベクトル) は、当該空間上の第一主成分として評価することができる。これまでに、各階層で観察されるベクトルを網羅的に比較した研究はなく、階層間の表現型変異の関係はほとんどわかっていない。

そこで本研究では、ショウジョウバエ属昆虫の翅の形態に着目し、各階層における表現型変異のパターンを共通の方法で評価・比較することを目的とした。系統進化や大進化スケールにおける表現型のばらつきが最大になるベクトル (変異最大ベクトル) を $d_{\max}$ 、Standing variation における変異最大ベクトルを $g_{\max}$ 、環境に誘導されて生じる変異における変異最大ベクトルを $e_{\max}$ 、発生ノイズによって生じる変異における変異最大ベクトルを $f_{\max}$ と定義し、それぞれのベクトルを定量・比較したところ、 $d_{\max}$ と $g_{\max}$ 、 $e_{\max}$ は互いによく似たベクトルであった (互いの変異最大ベクトルがなす角が 10° 未満)。一方で、 $f_{\max}$ はこれらとは異なるベクトルであることがわかった。これらの結果は、 $d_{\max}$ 、 $g_{\max}$ 、 $e_{\max}$ は共通の遺伝的制約によって進化的あるいは発生上拘束されていることを示唆している。また、 $f_{\max}$ は、その制約の影響を受けずランダムな方向に生じるものであると考えられた。

顔面原基のプロポーションが哺乳類系統でだけ激変した背景にある、発生上の制約

東山大毅(東京大学)

本課題では、脊椎動物の顔面を構成する顔面突起を題材に、その組合せが羊膜類において哺乳類で激変した背景にある機構を探るものである。当該年度は変異マウス (*Dlx1-CreERT2;R26R-YFP* マウス)を用い、顔面突起のひとつ(上顎突起)が、他の羊膜類とは異なりたしかに哺乳類では上あご前端の骨格(切歯骨)まで形成することを組織学的に示した。さらに、羊膜類であるワニ類の胚の観察を行った。というのも、多くの羊膜類では両鼻孔の正中に上あご前端の骨格があるのに対して哺乳類やワニ成体では中心化した鼻の両側方に上あごの前端を構成する骨格があり、口先の末梢神経もあたかもこれに対応するよう哺乳類様の分布パターンをもつからである。しかし、発生過程の観察によりワニは一過的にトカゲやニワトリのような典型的な羊膜類のパターンを経たのちに、二次的な変更で哺乳類様の顔面を構成することが分かった。顔面突起の組合せそのものの変更はあくまで哺乳類の特徴であることが強調されたのである。本来予定していた発生過程における顔面突起の定量化はうまく進められなかったが、2021 年度は研究協力者との作業で μ CT スキャンによる定量化を進めてゆく。

また本来は予定していなかったが、同じ遺伝型のマウスにおいてすら明らかな形態的ゆらぎが見られる肝外胆道系について鳥を用いた記載的な研究を行い、現在その進化について総説をまとめている。

Nojiri T, Wilson AB L, López-Aguirre C, Tu VT, Kuratani S, Ito K, [Higashiyama H](#), Son NT, Fukui D, Sadier A, Sears KE, Endo H, Kamihori S, Koyabu D. Embryonic evidence uncovers convergent origins of laryngeal echolocation in bats. *Current Biology* 31: 1353-1365.e3 (2021).

[Higashiyama H](#), Kanai Y. Comparative anatomy of the hepatobiliary systems in quail and pigeon, with a perspective for the gallbladder-loss. *Journal of Veterinary Medical Science*, 20-0669 (2021).

Tri H Vu, Takechi M, Shimizu M, Kitazawa T, [Higashiyama H](#), Iwase A, Kurihara H, Iseki S. *Dlx5*-augmentation in neural crest cells reveals early development and differentiation potential of mouse apical head mesenchyme. *Scientific Reports* 11: 1-15. (2021).

Yokoyama H, Yoshimura M, Suzuki DG, [Higashiyama H](#), Wada H. Development of the lamprey velum and implications for the evolution of the vertebrate jaw. *Developmental Dynamics* 250: 88-98 (2021).

Pattarapanawan M, Uemura M, Miyazaki N, Takami S, Tomiyasu H, Tsunekawa N, Hirate Y, Fujishiro J, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, [Higashiyama H](#), and Kanai Y. Anatomical and histological characteristics of the hepatobiliary system in adult *Sox17* heterozygote mice. *The Anatomical Record* 303: 3096-3107. (2020).

人工 RNA 進化システムを用いた RNA の構造揺らぎと進化の関係の解析

市橋伯一(東京大学)

【研究目的・背景】

生物進化に対する制約のひとつとして、揺らぎの大きな表現型が進化しやすいという傾向(揺らぎ応答理論)が提唱されている。しかしながら、未だ実験的な検証は十分ではなく、またこの理論を用いて進化しやすさや方向性を予測することはできていない。そこで我々は、これまでに開発した生物と同じように変異と自然選択により自律的に進化する分子システム(RNA の自己複製システム)を用い揺らぎ応答理論の検証を行う。本プロジェクトでは、【項目1. 進化が進むにつれて揺らぎが小さくなるか】、および【項目2. 揺らぎの大きさから進化しやすさ(有益変異の多さ)が予想できるか】を実施する。

【研究成果】

2020 年度には項目1について、進化途中のすべての RNA(64種類)について構造解析を行った。その結果、あとの方で出現した RNA ほど構造揺らぎが小さくなっている傾向を見出した。ただしそれだけではなく、2 かいほど構造揺らぎが急に大きくなる現象を起こしていることも見出した。さらに項目2については、構造揺らぎの大きさが異なる複数の RNA について、構造揺らぎが大きい RNA ほど進化しやすいか(=有益変異が多く存在するのか)を検証した。進化途中で現れた 4 種類の RNA について、点変異ライブラリー構築し、そこから短期間の進化実験を行い、次世代シーケンスで各変異の頻度を計測することにより有益変異の頻度を求めた。その結果、揺らぎが大きいほど、有益変異の存在頻度が高いことを示す証拠を得ることができた。

倍数ゲノム複製機構がもたらす新規機能獲得と進化速度の両立

大林龍胆(東京工業大学)、畠山哲央(東京大学)

ゲノム倍数化は、現存する様々な生物種において観測される形質である。古くから倍数体生物は環境変動などへの適応能力が高いことが示唆されているが、その基本原理の解明には至っていない。大野乾のゲノム重複説によれば、ゲノムの倍数化により冗長性がもたらされ、元々の遺伝子の機能を保持したまま重複した遺伝子の機能が改変され、新規形質の進化が促進されうる。他方、進化速度を考えた場合、1細胞あたりのゲノムのコピー数が多い場合、1つのゲノムに変異が入ってもその効果が弱められる、つまり表現型の揺らぎが小さくなるため、進化速度は遅くなりうる。本研究では、この一見矛盾するゲノム倍数性の進化に対する影響を、実験と理論の両面から定量的に捉え、ゲノム倍数化と進化の関に存在する普遍原理の解明を目指す。

昨年度は主に進化のダイナミクスを考える準備段階として倍数性バクテリアの進化速度とゲノム遺伝様式(進化速度)を解析するための構成的手法を構築した。

(1)複数コピーゲノムの複製、遺伝様式の解析

複製されるゲノムや、娘細胞へと受け継がれるゲノムがどのように選択されるのかを明らかにするため、倍数性ゲノムの遺伝様式を解析する構成的手法を確立した。

1-1) 1細胞イメージングによる染色体トラッキング

まず各染色体を蛍光標識し、その動態をリアルタイムに計測することに成功した。その結果、ゲノム複製の選択性はなく、ほぼランダムに複製されるゲノムが選択されることがわ示唆された。さらに、このランダムな複製においても、わずか数世代でどれかひとつのゲノムに固定されることも明らかになった。以上の結果は、進化可能性を予測する上で基盤となる観察結果であり、シミュレーションにもこの複製、遺伝様式を取り入れ解析中である。

1-2) 細胞集団における倍数ゲノムの遺伝様式

集団レベル(コロニー形成段階)において、二つのヘテロなゲノムを持つ細胞から一つのゲノムに固定されるまでの世代数と、どの程度(世代数)ヘテロな状態を維持できるのかを定量する構成的手法を確立した。その結果、上記のライブイメージングによる観察と同様、約15世代後にはヘテロなゲノムを持つ細胞は1%程度であり、その他ほとんどの細胞はどちらか一方のゲノムに固定されていることがわかった。さらに、複製、分裂の変異体を用いてこの遺伝率がどう変化するのも解析中である。倍数性が進化に与える影響の条件としてヘテロな状態を保てることが重要であるが、通常の生育条件ではヘテロな状態を長く維持できないことが実験的に示された。しかし、変異体を用いた解析より、成長が速い条件ではヘテロ状態を長く保てることも示唆されており、条件依存的に進化可能性が異なることが示唆された。

(2)倍数性バクテリアの進化速度

これまでのシミュレーションの結果より、通常の培養では進化速度は倍数性の違いによらずほぼ変わらないことが示唆された。そこで、いくつか倍数性の異なるシアノバクテリアを用いて実際の進化速度を定量した。その結果、この実験的検証ではシミュレーションの結果とは異なり、倍数性が高い(ゲノムコピー数が多い)ほど進化速度が速いことが明らかとなった。現在はこの現象を理論的に説明するための実験を継続中である。

酸素で生じた「ゆらぎ」が

「パターン形成プログラム」へと進化した分子基盤の解明

田中幹子(東京工業大学)

指と指間の分離は、両生類では細胞の増殖速度の違いによって行われるが、羊膜類になると「指間細胞死」によって行われるようになる。我々は、四肢動物が「大気中の酸素」に曝されると、指間細胞死が促されるという成果を得た。さらに両生類であっても、高い酸化ストレスに曝されると指間に細胞死が誘発されることが明らかとなったが、両生類の指間細胞死は一部の細胞にとどまり、パターン形成にはほとんど影響を与えていなかった。これらの結果は、指間には元々細胞死が生じる分子的な背景は揃っており、両生類では酸化ストレスに応答した可塑的变化として生じた指間細胞死が、羊膜類では四肢のパターン形成に不可欠な発生プログラムへと進化したことを示唆していた。そこで、本研究では、個体発生の「ゆらぎ」として生じた細胞死が、「パターン形成に不可欠な発生プログラム」へと進化した分子的背景に迫ることを目標に研究を行っている。

昨年度は、まず、ニワトリ胚の指間で酸化ストレスに応答する経路について検証するために、ニワトリ胚の肢芽を通常酸素濃度条件で培養し、各種ストレス応答経路で働く主要キナーゼの働きを阻害剤で用いて検証した。さらに、指間で酸化ストレスにより活性化される経路を明らかにすることを目的に、通常酸素濃度条件、および、高濃度酸素条件で培養したニワトリ胚の肢芽の指間組織のトランスクリプトーム解析を、大規模解析支援班の重信氏らの協力により遂行し、その結果から、酸化ストレスにより、可塑的に発現量に変化する因子を明らかとした。また、ニワトリ胚の指間における、ROS の産生源については検証を継続中である。

一方、両生類の指間での酸化ストレスに応答した細胞死については、幼生期に指間での細胞死が観察されたエゾアカガエルを題材にした研究を遂行中である。

2020 年度の研究成果

Ingrid Rosenberg Cordeiro, Reiko Yu and Mikiko Tanaka (2020). Regulation of the limb shape in the Chinese softshell turtle: insights into the evolution of interdigital cell death. *Evol. Dev.* e12352 (Invited)

Ingrid Rosenberg Cordeiro and Mikiko Tanaka (2020). Environmental oxygen is a key modulator of the development across species: from molecules to ecology. *BioEssays* 42, 202000025. DOI: 10.1002/bies.202000025. (Invited)(表紙)

腸内感染と運動性の揺らぎが導く 細菌病原性分泌装置への進化の実験的解明

寺島浩行（長崎大学）

細菌は、運動器官である細菌べん毛と病原性タンパク質注射装置である III 型分泌装置を持っている。両者は同じ起源から機能分化・進化した細胞小器官であると考えられている。しかしながら、どのような遺伝的な変化、表現型の変化を経て、べん毛と III 型分泌装置へと進化したのかよくわかっていない。本研究では、まず、III 型分泌装置を欠損し病原性が減弱したネズミチフス菌（サルモネラ属菌）をマウスへ継続的に摂取・感染させる。しかしながら、III 型分泌装置欠損株は、腸内で定着できず体外へと排出される。その中で腸内に定着する変異株や病原性の回復する変異体を取得する。そして、病原性が生まれる仕組みと、べん毛から III 型分泌装置への進化を駆動する遺伝的な変化を明らかにする。

昨年度の研究実績

令和 2 年度の研究においては、継続的な感染実験に必要なネズミチフス菌の変異体を作成した。具体的には、2 種類ある III 型分泌装置 (SPI-1、SPI-2) を構成する遺伝子群を欠損させた変異株の作成をした。欠損領域には、テトラサイクリン耐性遺伝子を組み込んであることから、感染実験の時に糞便からネズミチフス菌を回収し、再度培養した後、マウスへと再感染実験をすることができるようにした。また、Lon プロテアーゼの欠損によって、マウスを殺さず持続的な感染状態を作ることが知られていた。そこで、Lon プロテアーゼ欠損株の作成も行った。本来であれば、すでにマウスへの継続的な感染実験を開始する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の蔓延による実験スケジュールの遅れから、まだ感染実験が開始できていない。現在、異動した長崎大学熱帯医学研究所にて、動物感染実験の設備のセットアップを行っているところである。

本年度の研究計画

まずは、作成したネズミチフス菌をマウスへと投与し、糞便中に排出される菌がいつまで観察されるか計測する。これまでの様々な研究から、1 週間待たずに腸内細菌叢との競合によって排除されてしまうと思われる。日ごとの菌数をコロニー形成数として計測し、それを基準としてマウス腸内への定着が上昇した変異体の評価を行う。また、糞便中の炎症マーカーリポカリン 2 などを指標にして、病原性の回復した変異体の評価を行う。週に一回、糞便から回収したネズミチフス菌を、再度培養・マウスへ摂取させ、長期間（1 年以上、可能であれば数年単位で行う）ネズミチフス菌を腸内に投与し続ける。上記のような腸内定着能が上昇した変異体や病原性が回復したような変異体を取得し、全ゲノムシーケンス解析によってどのような領域に変異が生じているのか明らかにする。また、EMS による変異原処理したネズミチフス菌も用意してあるため、それも同様に継続的感染実験を行い、定着能が上昇するあるいは病原性が回復するような変異体を取得する。

神経ネットワークにおける揺らぎと進化的保存性の関係

石川由希(名古屋大学)

動物の配偶者選好性は神経ネットワークに規定されている。神経ネットワークは経験やゲノム変異によってゆらぎ、選好性のばらつきを生む。この揺らぎが分化に果たす役割はあるのだろうか？神経科学や遺伝学のモデル生物であるキイロショウジョウバエ(キイロ)は、メス特有のフェロモン 7,11-HD により求愛を促進させる。一方、姉妹種オナジショウジョウバエ(オナジ)は 7,11-HD により求愛活性を劇的に低下させる。このことは、フェロモン選好性を規定する神経回路(フェロモン選好ネットワーク)がこの近縁2種において分化していることを示唆している。そこで私はこのフェロモン選好ネットワークに着目し、その揺らぎやすさとフェロモン選好性の進化の関係を明らかにしようとした。

これまでは、キイロとオナジの F1 雑種が 7,11-HD によって求愛抑制をされるオナジ型のフェロモン選好ネットワークを持つことを利用し、キイロと雑種のフェロモン選好ネットワークのすべての神経接続の有無を再構成 GFP 法を用いて行った。その結果、雑種に置いて、特定の神経接続のみが失われており、それ以外の経路の神経接続はすべて保存されていることが示唆された。これまで知られているフェロモン選好ネットワークの回路構造や各ニューロンの機能を併せて考慮すると、今回特定された神経接続の喪失がフェロモン選好ネットワークの機能を逆転させる可能性が示唆された。また、これまで知られていたフェロモン選好ネットワークの最上流に位置するフェロモン受容ニューロンを神経毒を用いて機能抑制した場合にも、キイロへの求愛抑制は維持されることから、上記フェロモン受容ニューロン以外に求愛を抑制する回路が存在することが示唆された。スクリーニングの結果、特定の味覚ニューロンを機能抑制した場合に、雑種のキイロへの求愛が上昇することが明らかとなり、この味覚ニューロンもまたフェロモン選好性の分化に寄与していることが示唆された。

そこで昨年度は、雑種を用いて明らかになった「特定の神経接続の喪失」がオナジの純系統においても存在することを検証するために、CRISPR/Cas9 と phiC31 法を用いてオナジに再構成 GFP 法ツールを導入することを目指した。その結果、今回着目する神経接続のシナプス前細胞を標識するノックイン系統に関しては、ターゲットサイトに attP 配列を導入した個体を確立することに成功した。今後、これを系統化し、phiC31 法を用いて GAL4 や LexA 配列の導入を行う予定である。シナプス後細胞を標識する系統についてはすでに入手済みである。シナプス前／後細胞に GFP 断片を発現させる系統に関しては、すでに導入ベクターの作成を終えつつあり、完了次第 phiC31 法を用いての導入を目指す。

昨年度はさらに、雑種を用いて明らかになった「特定の味覚ニューロンによる求愛抑制」がオナジの純系統においても存在することを検証した。当該味覚ニューロンに、赤色光によって神経活動を誘導する光遺伝学的ツールを発現させ、味覚ニューロンの活動操作をした際の求愛活性への影響を観察した。その結果、当該味覚ニューロンの活性化によりオナジの求愛活性が抑制されることがわかった。このことは、雑種で見られた求愛抑制機構がオナジにも存在することを示しており、キイロとオナジのフェロモン選好性の逆転にはこの味覚ニューロンによる求愛抑制が寄与していることを示唆している。今後、この味覚ニューロンのキイロにおける機能や性質を調べ、味覚

ニューロンのどのような種間差がフェロモン選好性を逆転させたのかを明らかにする。

#Hyunsoo Kim, #Mihoko Horigome, Yuki Ishikawa, Feng Li, J. Scott Lauritzen, Gwyneth Card, Davi D. Bock, Azusa Kamikouchi (2020). # Equal contribution Wiring patterns from auditory sensory neurons to the escape and song-relay pathways in fruit flies. J Comp. Neurol., Article DOI: 10.1002/cne.24877

Yuki Ishikawa, Mao Fujiwara, Junlin Wong, Akari Ura, Azusa Kamikouchi (2020). Stereotyped Combination of Hearing and Wind/Gravity-sensing Neurons in the Johnston's Organ of Drosophila. Front. Physiol., 10:1552 doi: 10.3389/fphys.2019.01552

Shuhei J. Yamazaki, Kazuya Ohara, Kentaro Ito, Nobuo Kokubun, Takuma Kitanishi, Daisuke Takaichi, Yasufumi Yamada, Yosuke Ikejiri, Fumie Hiramatsu, Kosuke Fujita, Yuki Tanimoto, Akiko Yamazoe-Umemoto, Koichi Hashimoto, Ken Yoda, Katsufumi Sato, Akinori Takahashi, Yuki Ishikawa, Azusa Kamikouchi, Shizuko Hiryu, Takuya Maekawa, Koutarou D. Kimura (2019). A hybrid versatile method for state estimation and feature extraction from the trajectory of animal behavior. Frontiers in Neuroscience 13: 626.s. doi: 10.3389/fnins.2019.00626

ヒト固有 NOTCH2NL 遺伝子による脳発達の揺らぎと 脳進化方向性の研究

鈴木郁夫(東京大学)

ヒトは類人猿の中でも特別に大きな脳を獲得し、その神経基盤により生み出される高度な認知機能を活用することで繁栄した。ヒトがチンパンジーと分岐して以降、脳発達過程の神経幹細胞ダイナミクスが変更され、より多くのニューロンが生み出されるようになった。ヒト固有遺伝子 NOTCH2NL は、ヒトだけが獲得したニューロンの数を増やす効果を持つ遺伝子であるが、現代人ゲノム中では平均して4コピーに重複していて、コピー数や配列に個人差がある。本研究ではヒト固有 NOTCH2NL 遺伝子の個人間でのゆらぎが、脳発達や生後の神経機能に影響を与える可能性とそのメカニズムを検証する。

昨年度は以下の研究に取り組んだ。

(1) NOTCH2NL 遺伝子のパラログの多様性と、個々のパラログ遺伝子座におけるアレル多様性やスプライシング多型の全容がわかってきた。従来、重複遺伝子はパラログ間の配列類似度が高すぎるために、ショートリードシーケンサーを用いた解析では、完全にパラログを識別することが難しかったが、今回、ロングリードシーケンサーPacBioを用いたトランスクリプトーム解析により、ヒト神経幹細胞中で転写されている全ての NOTCH2NL トランスクリプトを同定することができた。

(2) 特に発現量が多い主要なものについて、cDNA クローニングを行い、分子機能についての検証を進めた。少数の主要なアレル多型については、メジャー型とマイナー型の間に明確な生化学的な機能の差異があることを見出しており、その脳発達に与える影響を検証する。

(3) これまでの研究により NOTCH2NL の神経幹細胞における機能はわかってきたが、分化後のニューロンにおける機能は未解明だったため、マウス大脳皮質ニューロンへの強制発現実験を行い、ニューロンの成熟についての表現形解析を行なった。NOTCH2NL のアレルにより表現形の違いを検出できており、今後のさらなる詳細な解析を行うことにより、その分子機構を解明する。

1. De Franco et al. The Journal of Clinical Investigation. 130, 12 6338-6353 (2020)
2. Bergoglio, **Suzuki*** et al. Neuroscience Research. in press (2021) (* correspondence)
3. Sønderby et al. Translational Psychiatry. 11, 1 1-16 (2021)

仙椎－後肢ユニットの形態の制約と個体間の位置のゆらぎを生み出す分子機構の解明

鈴木孝幸(名古屋大学)

本研究で我々は、個体間での仙椎の位置のゆらぎが生まれるメカニズムを、Hox 遺伝子群の発現を誘導する GDF11 と、仙椎の位置を決定する Hox11 遺伝子群の発現ゆらぎの視点から解明を試みた。

これまで仙椎領域がゆらぐメカニズムの解明では、培養細胞系を用いて GDF11 の濃度と時間のどの働きが Hox11 遺伝子群の発現に重要であるのかを調べた。マウスの ES 細胞を脊椎骨の前駆組織である前体節中胚葉の細胞に分化誘導し、その細胞に様々な濃度の GDF11 タンパク質、及びに作用時間を変化させて Hoxa11, Hoxc11, Hoxd11 の発現量を RT-qPCR を用いて調べた。その結果、Hox11 遺伝子群の発現は濃度と時間依存的に発現が上昇することが分かった。

同一の転写因子などの細胞内タンパク質の量があるときに、遺伝子発現にゆらぎを生じやすい機構は何かを明らかにするために、ニワトリの精子をウズラのメスに人工授精させることによって生まれるニワトリウズラの F1 雑種胚における遺伝子発現量を次世代シーケンスの手法を用いて解析し報告した(Ishishita et al., 2020, Plos one)。この結果から、同一の細胞内環境においてもニワトリとウズラの遺伝子の発現量が大きく異なるものが存在し、それらの遺伝子発現はゲノムの中でもとりわけ遺伝子の発現量を調節する因子によって決まっている可能性が強く示唆された。本研究成果は、新学術領域の目標である遺伝子発現のゆらぎやすさのメカニズムを解明するための大きな成果と言える。

また、実験に用いるニワトリの系統の評価を行うために名古屋大学が所持しているニワトリと世界のニワトリの系統的關係を調べ、発表した(Hata et al., Sci. Rep, 2021)。

1. The dynamic spatial and temporal relationships between the phalanx-forming region and the interdigits determine digit identity in the chick limb autopod. Suzuki T., Fallon J. F. Dev Dyn. in press (2021)
2. Thalidomide and its metabolite 5-hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neosubstrate PLZF. Yamanaka S., Murai H., Saito D., Abe G., Tokunaga E., Iwasaki T., Takahashi H., Takeda H., Suzuki T., Shibata N., Tamura K., Sawasaki T. EMBO J. 40, e105375(2021)
3. Origin and evolutionary history of domestic chickens inferred from a large population study of Thai red junglefowl and indigenous chickens. Hata A., Nunome M., Suwanasopee T., Duengkae P., Chaiwatana S., Chamchumroon W., Suzuki T., Koonawootrittriron S., Matsuda Y., Srikulnath K. Sci Rep., 11, 2035(2021)
4. Transcriptome analysis revealed misregulated gene expression in blastoderms of interspecific chicken and Japanese quail F1 hybrids. Ishishita S., Tatsumoto S., Kinoshita K., Nunome M., Suzuki T., Go Y., Matsuda Y. Plos one, 12, e0240183 (2020)
5. Geographic Origin and Genetic Characteristics of Japanese Indigenous Chickens Inferred from Mitochondrial D-Loop Region and Microsatellite DNA Markers. Hata, A., Takenouchi, A., Kinoshita, K., Hirokawa, M., Igawa, T., Nunome, M., Suzuki, T. and Tsudzuki, M., 2020. Animals, 10, 2074 (2020)
6. How do signaling and transcription factors regulate both axis elongation and Hox gene expression along the anteroposterior axis? Saito S, Suzuki T. Dev Growth Differ. 62, 363–375 (2020)

実験生態系の摂動と継代による生態系の揺らぎ応答関係の解明

細田一史 (理研)

本研究では 12 種の微生物による実験生態系を用いて生態系の揺らぎ応答関係を解明する。具体的には本研究全体として下記 5 項目および総合解析を行う。(1)安定な実験生態系の構築:12 種から開始して半年間で 5 種以上が共存し続ける 10 通りを準備。(2)温度変化を加える(摂動実験):10 通り各々を 32 複製して温度上昇による系の変化を計測。(3)長期変化の計測(進化実験):同じく 32 複製を半年間継代する。温度変化の有無は両方行う。(4)揺らぎ応答関係の解析:32 複製の揺らぎと摂動実験や進化実験の変化の方向の関係を解析。(5)生態系内の生物の進化の解析:代表生物として大腸菌を単離し、ゲノムと表現型の変化を解析。

2020 年度には(1)~(3)について、以下のような結果を得た。

(1) **安定(疑似安定)な実験生態系の構築**:12 種の生物種から開始して、生産者・分解者・消費者を含む 3~5 種生物が半年間安定に共存する生態系を 10 通り選択した。これに加えて、2 種しか生存しなかった系も比較のために用意した。

(2) **温度変化による生態系の変化を計測(摂動実験)**:上記 10 通りの生態系それぞれについて、32 個に複製し、系への外力として温度変化(2、5、10℃上昇の3通り)を与えた。結果、どの生態系も 5℃以下では有意な変化は見られなかったが、10℃では 2 種生物しかいない生態系以外では揺らぎ応答関係を解析可能な変化が見られた。

(3) **長期変化の計測(進化実験)**:上記 10 通りの生態系それぞれについて、同じく 32 複製に関して半年程度の継代培養を行った。摂動実験同様に、2 種生物しかいない生態系以外では、揺らぎ応答関係を解析可能な変化が見られた。

1. Kazufumi Hosoda, Shigeto Seno, Naomi Murakami, Hideo Matsuda, Yutaka Osada, Michio Kondoh, "A model ecosystem of twelve cryopreservable microbial species allowing for a non-invasive approach", bioRxiv, 10.1101/2020.10.23.351742
2. 細田一史, "人工生態系の生物物理", 生体の科学「特集:生物物理学の進歩—生命現象の定量的理解へ向けて」, Vol. 72, No. 3 (2021 年 6 月発刊予定)
3. 細田一史, 瀬尾茂人, "生命システムにおける複雑ネットワークとその制御", システム/制御/情報、「複雑ネットワーク研究の最前線特集号」、生命システムにおける複雑ネットワークとその制御, Vol. 65, No. 5 (2021 年 5 月 15 日発刊予定)
4. 招待講演:細田 一史, "無数の実験生態系から生命の法則を探る", 脳情報通信融合研究センター BFI セミナー, オンライン, 2021 年 2 月 4 日
5. 招待講演:細田 一史, "無数の小世界をつくって生命の法則にたどり着きたい", 京都大学 MACS セミナー
6. オンライン, 2020 年 11 月 25 日
7. 招待講演:細田 一史, "1 万を超える人工生態系により生態系と生命の謎に迫る", 生態研セミナー
8. オンライン, 2020 年 11 月 20 日
9. 招待講演:細田 一史, 村上 なおみ, 瀬尾 茂人, 長田 穰, 松田 秀雄, 近藤 倫生, 古澤 力, "生物進化と生態系変化の制約にモデル人工生態系で迫る", 日本進化学会第 22 回オンライン大会企画シンポジウム「システム頑健性と進化可能性」, オンライン, 2020 年 9 月 7 日
10. 招待講演:細田 一史, "今や簡単に家管理、ラボ管理、実験機器連携が低コストかつ思いつきで自動化できる", Laboratory Automation 勉強会, オンライン, 2020 年 6 月 27 日

発現量揺らぎ-適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応-進化への影響

守屋央朗（岡山大学大学院環境生命科学研究科）

背景と目的:細胞内のタンパク質には、発現量の変動が適応度に強い影響を与える(強い制約を受けている)ものと、発現量を多少変動させても適応度に影響を与えない(制約を受けていない)ものがある。私たちは、出芽酵母 (*S.cerevisiae*) のほとんどの種類のタンパク質について、それぞれの発現量がどれくらい制約を受けているのかを、独自の発現量揺らぎ-適応系 (gTOW 法) により調べてきた。その結果、大半のタンパク質の発現量は制約を受けていない一方、2%程度のタンパク質の発現量のみが強い制約を受けている事を明らかにした。本研究では、発現量揺らぎ-適応をハイスループット化させた実験系(ADOPT 法)により、課題 1:発現量の制約は環境により変わるのか、課題 2:発現量揺らぎは適応-進化に寄与するのか、課題 3:発現変動による適応はどのようなメカニズムにより達成されるのかを追求する。

研究実績:本年度は ADOPT 法により高塩ストレスで適応的な遺伝子群について調査した。その結果、高塩ストレスに関してカルシウム応答性遺伝子群の過剰が適応的になること、それ以外に新興遺伝子の過剰が適応的になることが見いだされた。これらの結果から、(過剰による)適応は、環境要因の補完、および新規メカニズムの外挿により達成できることが示唆された。

Kintaka R, Makanae K, Namba S, Kato H, Kito K, Ohnuki S, Ohya Y, Andrews BJ, Boone C, Moriya H., Genetic profiling of protein burden and nuclear export overload., *Elife*. 2020 Nov 04;9:e54080

Ishikawa K, Ishihara A, Moriya H., Exploring the Complexity of Protein-Level Dosage Compensation that Fine-Tunes Stoichiometry of Multiprotein Complexes., *PLoS Genet*. 2020 Oct;16(10):e1009091.

Moriya H., The expression level and cytotoxicity of green fluorescent protein are modulated by an additional N-terminal sequence., *AIMS Biophysics* 2020, 7(2): 121-132

自己組織化過程における細胞の揺らぎと対称性の破れ

守山裕大(青山学院大学)

生物の特徴の一つは、胚発生から生体の形態・生理機能の維持まで、エントロピー(乱雑さ)が増加しないことである。特に胚発生過程においては、はじめは単一細胞(受精卵)であったものが細胞分裂を繰り返し、個々の細胞の運命が決定されていくことで生物種特有の体制を作り上げていく。このような胚の秩序立つた組織化の背景にはどのようなメカニズムが存在しているのだろうか?また、そのようなメカニズムは進化の過程でどれくらい変化しうるのだろうか?本研究課題ではゼブラフィッシュ胚から抽出した細胞塊を用いて、自己組織化過程における細胞の挙動と極性の確立について迫ることを目的としている。本年度においてはまず先行研究において報告のある、ゼブラフィッシュ胚から抽出した細胞塊を自己組織化させる作成法を再現し、その作成法を確立することを目指した。

近年、二つの研究グループからゼブラフィッシュ胚を用いた自己組織化細胞塊の作出法が報告された(Fulton *et al.*, *Curr Biol.* 2020, Schauer *et al.*, *eLife* 2020)。これら2つのプロトコルを追試した結果、後者の先行研究の作成法がより高確率で自己組織化細胞塊を作成できることを見出し、以降この作成法を用いた。

次にkaedeレポーターを導入した胚から自己組織化細胞塊を作成し、photoconversionにより自己組織化細胞塊内の特定の細胞を標識し、それら細胞の挙動を共焦点顕微鏡により追跡した。自己組織化するかを見極めが卵黄から切り出した1時間後に容易になること、またkaedeレポーターのシグナルが観察開始後2時間程で退色することから、卵黄から切除し自己組織化細胞塊を作成した1時間後からイメージングを開始し、2時間の様子を観察した。標識した細胞について平均二乗変位(Mean-Square Displacement: MSD)の解析をおこなったところ、個々の細胞はブラウン運動的な挙動と方向性の持った挙動の両方を併せ持つこと、また移動範囲としては多くが細胞一つ程度に留まることが明らかとなった。さらに、隣接した細胞が同調して細胞分裂をすること(細胞間の時空間的協調性)、ブレブと呼ばれる細胞膜の膨出を示すものなど、特徴的な形質も自己組織化過程において観察された。今後の課題としては、より長時間のイメージングをおこなうこと、平均二乗変位をはじめとする各解析をより詳細におこなうことが挙げられる。

Arai S, Lloyd K, Takahashi T, Mammoto K, Miyazawa T, Tamura K, Kaneko T, Ishida K, Moriyama Y and Mitsui T*. **Dynamic properties of heart fragments from different regions and their synchronization.** *Bioengineering*. 2020, 7(3), 81. doi: 10.3390/bioengineering7030081

トランスクリプトームのゆらぎがもたらす新規ニッチへの進出能力

石川麻乃(東京大学)

本研究では、生物の新規ニッチ進出の制約と方向性を生む機構として、表現型のゆらぎや方向性の違いに着目し、その分子の実態と新規ニッチ進出に果たす具体的な役割を解明する。モデルとするのは、淡水ニッチへの進出能力が異なるトゲウオ科イトヨ2種である。イトヨ *Gasterosteus aculeatus* は世界各地で海から淡水への進出に成功し、多様化を遂げている。一方、近縁種であるニホンイトヨ *G. nipponicus* は淡水域に一切進出していない。これまでの私たちの研究から、ニッチ進出能力の高いイトヨは、進出能力の低いニホンイトヨに比べて、淡水域への適応に関わる遺伝子発現のゆらぎが大きいことが示唆された (Ishikawa et al. *Science* 2019; Ishikawa et al. *Evol Ecol Res* 2016)。また、淡水ニッチに進出した集団では、更に日長条件や浸透圧変化に対するトランスクリプトームの環境応答性が祖先集団に比べて変化していた (Ishikawa et al. *Evolution* 2017; Ishikawa et al. in prep)。これは、トランスクリプトームのゆらぎの進化が、淡水ニッチへの進出と適応に寄与していることを示唆している。そこで、本研究では、『トランスクリプトームのゆらぎの差が新規ニッチへの進出・適応能力を規定している』という仮説を立て、このゆらぎの違いを生むゲノム領域／候補変異を同定し、それらが新規ニッチ進出に果たす具体的な役割を実験的、定量的に解析することで、これを検証する。

2020 年度は、新型コロナ感染拡大の影響により、イトヨとニホンイトヨのトランスクリプトームのゆらぎの定量的解析を行うための大量のニホンイトヨ稚魚を作成するための親魚の採集を行うことができなかった。そこで、淡水適応後にトランスクリプトームのゆらぎの差を生み出したゲノム領域を同定するために行う予定であった、イトヨ内での海型と淡水型の eQTL 解析を前倒しして開始した。本解析では、複数の異なる組織で eQTL 解析を行うことで、ゆらぎの差を生むゲノム領域が持つ多機能性やそれによる組織間での遺伝子発現の進化の制約などを明らかにする。また、これらのゲノム領域が淡水進出過程でどのような選択圧を受けたのかや、人工淡水池で実際に選択されるのか、また、どのような機能を持つのかを明らかにすることで、トランスクリプトームのゆらぎが新規ニッチへの進出を規定するか検証し、その分子機構を明らかにする。海型集団と淡水型集団の F₂交雑個体を淡水条件下と 100%海水条件下に置き、エラ、生殖腺の2組織について RNA 抽出を行った。解析予定の 224 サンプルの内、現在、16 サンプルの予備実験用の解析が終了し、残りのサンプルについても外注の HiSeq でのシーケンスが進んでいる。また、これに関連して、海型集団での日長応答前後での下垂体の1細胞 RNAseq を行った。

ネットイツメガエル胚発生における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎ測定

安岡 有理(理化学研究所)

多細胞生物ボディプランの進化をもたらす大きな原動力の一つは、胚発生期における遺伝子発現パターンの変動、すなわち遺伝子制御ネットワーク(GRN)の改変である。本研究では、GRNの進化過程を個体内あるいは種内といったより短い時間スケールで動的に捉えるため、近交系統が複数整備され、一度に大量の同胞胚を得られるネットイツメガエルを実験に用いる。発生学実験とゲノムワイドな情報解析によって、GRN 進化の制約と方向性を定量的・理論的に導き出すことを目的とする。

2020 年度は、ネットイツメガエル初期原腸胚の 1 胚 RNA-seq のデータ解析を進め、5 つの兄弟胚間で発現量のばらつきが大きい「揺らぎ遺伝子」を 500 個程度同定した。同様の解析を独立に 5 回行ったところ、各実験群(Clutch)で共通の揺らぎ遺伝子 65 個を見出した。このうち 26 個は、Clutch ごとの平均発現量の揺らぎも大きく、特に揺らぎやすい遺伝子だった。実験には近交系統(Nigerian 系統)を用いていたので、この結果は比較的均質な遺伝的背景でも一部の遺伝子は発現が大きく揺らぐことを示している。

さらに同様の RNA-seq 解析を *otx2/5* 機能障害胚を用いて行ったところ、*otx2/5* の機能障害によって兄弟胚間での遺伝子発現レベルの揺らぎが増大していることが判明した。この傾向は発現量の多い遺伝子でより顕著であった。機能障害効果が一定である(実験ノイズが少ない)とするならば、この結果は *otx2/5* の機能障害に対する各遺伝子の応答が兄弟胚間で揺らぐこと、さらには *otx2/5* の機能障害によって胚発生の頑健性が損なわれていることを示唆している。また、*otx2/5* 機能障害胚とコントロール胚との間での各遺伝子の発現変動を実験群ごとに算出し、5 つの実験群間で「発現変動の揺らぎ」が大きい遺伝子を抽出したところ、転写因子が多く含まれていた。この結果は、*otx2/5* の下流で働く転写因子セットが大きく揺らぎながら、ネットワークのつながりかえが種内でも頻繁に起こっていることを示唆している。

次に系統間での遺伝子制御ネットワークの揺らぎを検出するため、Ivory Coast 系統を用いた同様の 1 胚 RNA-seq 解析を行い、Nigerian BH 系統の結果と比較した結果、発現の揺らぎが大きい遺伝子には系統間でそれぞれ違いがあることが判明した。さらに *otx2/5* の下流遺伝子の揺らぎにも系統間で違いがあることが分かった。今後親個体の WGS のデータを解析し、系統間の遺伝子発現の揺らぎを引き起こすゲノム領域を推定する。

さらに、異なる発生ステージ(初期原腸胚、後期原腸胚、神経胚、咽頭胚、オタマジャクシ幼生)における遺伝子発現の揺らぎを比較するため、Nigerian BH 系統および Ivory Coast 系統で 1 胚 RNA-seq 用のサンプルを用意し、大規模解析支援班にシークエンスライブラリの作成を依頼した。

相同器官固有の形態形成ダイナミクスの標準形と発生組織内の位置価を適切に測る座標系

森下喜弘（理化学研究所 生命機能科学研究センター）

本研究では、脊椎動物四肢を題材に、特にその形態形成過程の種間比較を軸に相同器官の表現型(形態)の多様性の研究に取り組む。種間形態の差(多様性)は発生プロセスの違いにより生じるため、種間でそのプロセスを測って比較したい。組織変形写像は、プロセスを測る一つの基準となるだろう。我々は、これまでニワトリとツメガエル四肢発生過程において、細胞のリネージトレースデータから写像を復元し、適切な時空座標系下で観測すると、両者が一致することを明らかにした。これより、種に依らない四肢固有の形態形成ダイナミクスが存在することを仮説として提案する。他方で、発生生物学・進化学では組織内の各場所には遺伝子発現パターンにより決まる「位置価」が与えられ、細胞はそれにより分化等の運命決定を行うとされる。遺伝子発現の時空間パターンを上記の時空座標系で観測することで、相同器官間で発現ダイナミクスが保存された遺伝子群と、種固有のダイナミクスを示す遺伝子群とに客観的に分類できるのではないかという着想のもと、研究を進めている。

研究実績: 2020 年度はツメガエルに関して空間トランスクリプトーム解析を行い、生データから解析の俎上に載せる状態までの一連の前処理系を確立した。また、典型的な四肢発生マーカー遺伝子に対して、既知の発現パターンと概ね一致することを確認し、空間トランスクリプトーム解析が適切に行われていることを確認した。また、大規模支援解析にて scRNAseq 解析を行う事を採択されたので、そのための準備として、発生中のツメガエル四肢を単一細胞に分解する方法の確立(先行研究に準拠)と生存率の確認まで行った。

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 4 No. 10

発 行 : 2021 年 5 月 31 日

発行者 : 新学術領域研究「進化の制約と方向性～微生物から多細胞生物までを貫く表現型
進化原理の解明～」(領域代表者 倉谷 滋)

編 集 : Constrained & Directional Evolution Newsletter 編集委員会(編集責任者 深津 武馬)

領域 URL : <http://constrained-evo.org/>