



Evolutionary Theory for

CONSTRAINED & DIRECTIONAL DIVERSITIES

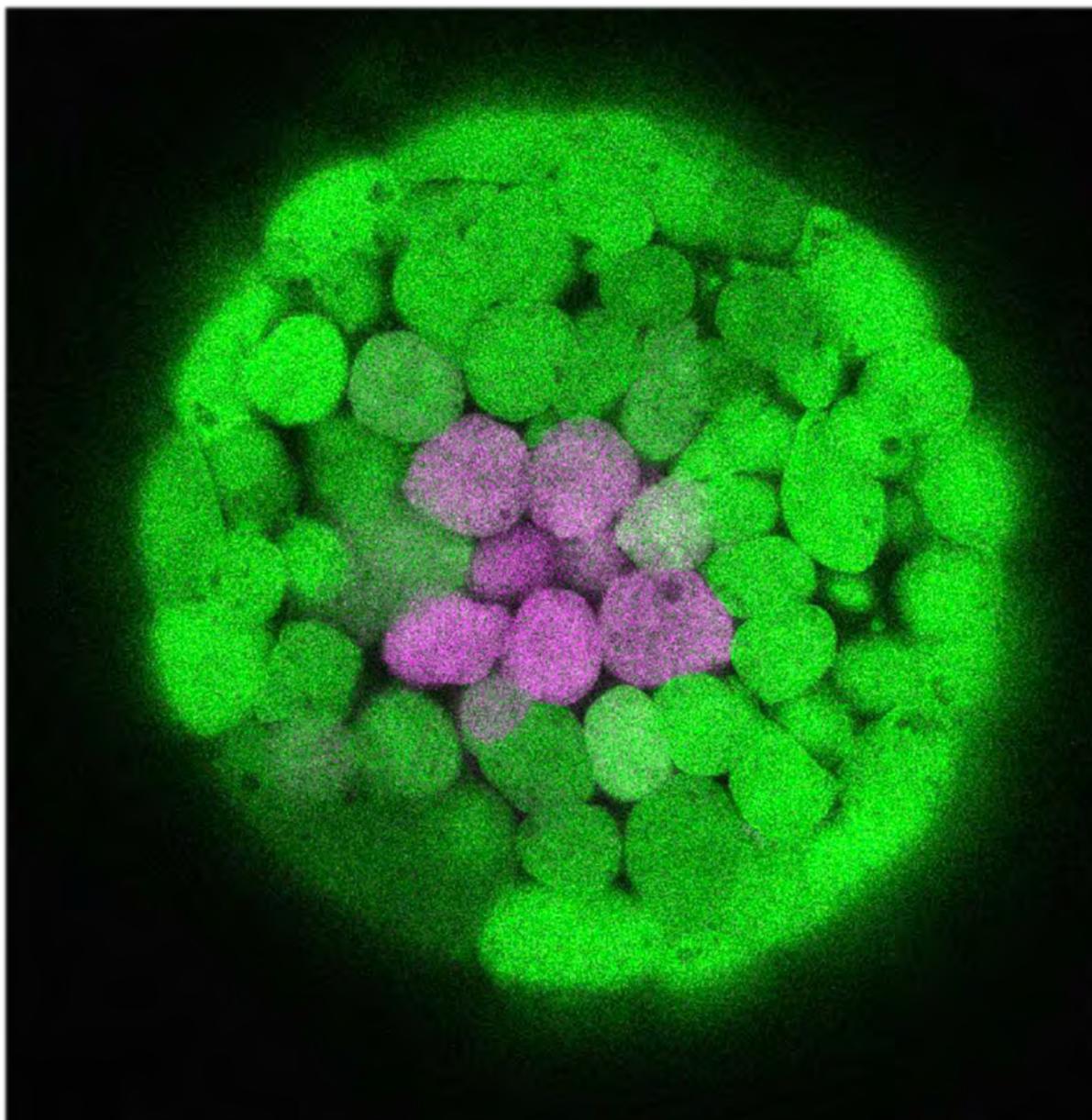
Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 5 No. 3 (2021)

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～



第9回理論情報交換会 第8回大規模解析情報交換会
第9回領域会議 第9回総括班会議 報告

表紙:ゼブラフィッシュ胚から作成した自己組織化細胞塊。kaedeレポータータンパク質にて可視化している(緑色)。マゼンタはphotoconversionによって標識した細胞群。

(写真:青山学院大学 守山裕大)

目次

領域代表挨拶	倉谷 滋	1
第9回領域会議・第9回総括班会議 (Zoom オンライン会議) 日程概要		3
第9回理論情報交換会報告	古澤 力	6
第8回大規模解析情報交換会報告	重信 秀治、小林裕樹	8
第5回若手企画ワークショップ(ポスターセッション)概要報告	入江 直樹	12
計画研究班		
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	13
進化の揺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	15
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	17
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	18
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	20
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	21
公募研究班		
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	阿部 玄武	23
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	25
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	27
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 佑磨	29
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	東山 大毅	31
RNAの構造揺らぎの大きさから進化しやすさを予想し制御する	市橋 伯一	32
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	33
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	35
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	36
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	37
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	39
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	40
発現量揺らぎ-適応系により探索する発現変動の適応-進化への影響	守屋 央朗	41
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	42
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	44

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	46
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	47
ネッタイツメガエル胚発生における遺伝子制御ネットワークの揺らぎと進化	安岡 有理	48
連載エッセイ(33) 和製動物形態学図譜とオオサンショウウオ	倉谷 滋	50

領域代表挨拶

みなさま御達者でしょうか。昨年の今頃でしたか、新型コロナウイルスの感染拡大を受け、緊急事態宣言が出されると前後して私の勤める研究所でも在宅勤務がベースとなりました。当初は、「在宅でできることは在宅で済ませた方がいい」というアップデートされた良識と、日本的勤勉性や自虐的美学としてのストイシズムが人々の中で闘ぎ合っていたように思います。あの頃この国の至る所で「出勤さえすれば仕事をしているような気分になる」という、日本の精神土壌が露わになったことも多かったのではなかったでしょうか。それはともかく……。

データを出して論文を書き、未来を作っていかなければならない若い研究者にとっては確かに大きな打撃でしょう。私はというと、「こういときこそ、古典を読んで、語学力を身につけろ」と良く人に言いますが、同じ理由でもって自らを叱咤激励し、この際自宅に籠もって激しい読書&執筆活動をできるだけやってみることにしました。私は一人暮らしですから、こういうことは結構大きなチャレンジです。最初の緊急事態宣言の頃は、へタすると二、三日誰も話さないことがありましたし、たまに知り合いと顔を合わせたなりなどと、自分でも驚くほどベラベラ喋りまくっている自分に気が付いたものです。案外、こういったことから拡大した感染もあったのではなかろうかと思えます、今にして思えば。というわけで、あらためて自分も所詮生身の人間でしかないのだと気付かされたものです。日頃から研究室のメンバーが家族のようになっていて、それで今までやってこられたのだということが身に滲みて理解できました。有り難い話です。で、いまだから書けることですが、私はこの状況をある意味、(部分的に)老後人生の予行演習だと思って凌いでみることにしたのであります。

「引退したら、思っきり趣味に邁進するのだ」とか、「好きなだけ読書に耽るのだ」などと息巻いている人をよくみかけますが、これを実践できる人は実は驚くほど少ないものです。目は悪くなるし、体力もなくなるし、そもそも我慢も効かなくなります。分厚い本を読んだりすると、「早く本題に入ってくれ」と心の中で叫びだし、挙げ句の果てに読了せずに投げ出してしまふ。あまつさえそれを著者のせいにして悪態をついたりもします(!)。さもないと、読書という行為自体が睡眠薬と同じ効果しかもたらさなくなる。若い人間の方がよっぽど根性があると私は断言します。それだけは間違いがありません。そもそも、本当に読書が好きで研究が好きな人間は、仕事や家族を犠牲にしてまでやってしまうものなのです。

これは、私が若い頃行きつけだったギター屋の店主から聞かされたことですが、「就職したからといって音楽止めるなら、本当は音楽なんか全然好きじゃなかった、ってことなんですよ。趣味を甘く見てはいけません。本当に趣味だというのなら、人生を危険にさらしても続けるぐらいの覚悟がなきゃ。あなたにはそれができると思いますよ」とのことでした。いわば一種の人生訓です。以来、やりたいことがあったら、たいいていのことは犠牲にできると思ってやってきましたし、読みたい本があったらたいいていのことはほったらかしにして読んでしまうことにしていました。

で、今回もまた緊急事態宣言です。また、在宅が奨励されます。みな慣れっこになってきたみたいですが、最初の時のことを忘れてはいけません。これについて思い出すのは、テアトル・フランセ広場を見下ろすホテルに長期滞在し、そこから定点観測するかのように窓から見える景色を描き続けた印象派の画家、ピサロ。彼には、誰も気が付いていなかった光の変化が見えていたのでしょうか。そしていつの間にか、私自身も同じことをやっているのに気が付いたのです。自分が読んだ本の内容をすべて記録する。思いついたアイデアをすべて記録する。自分の考えてきたことや勉強・研究してきたことをすべて想い出してみる。何が変わり、何が変わらないのか。そんな当たり前のことを実験的・意識的に行ってみる

のも、研究者としての訓練ではあります。実は大きな変化が起こっているのに、ただ漫然と過ごしていると、何も見つけられないかも知れません。アイデアは常に自分に訪れます。が、そこで見据えないとあっという間に去って行きます。そこで掴み取ることが重要です。

進化はつねに「発見」に似たプロセスを経て進行します。人間が経験する発見とあまり違いはありません。ただし、科学はそれをうまく記述することができていません。現象の中に主体がないにもかかわらず、何かの繋がりを発見し、それが鍵革新ともなれば、拘束の解除とも成りうる。科学者が何かを「発見」していることは認めても、現象が「発見」していることを認められないのが科学の弱点であると、メタ科学的な視点から言うことができます。それでも、発見を客観的に位置づけるには、定点観測に似た一種確固とした姿勢のようなものが必要だとは言えることができます。それでは皆さん、この一年を有意義に使いましょう。

倉谷 滋(理化学研究所)

新学術領域研究「進化の制約と方向性」
第9回領域会議・第9回総括班会議
Zoom オンライン会議 日程概要

5月26日～6月1日 オンライン若手企画ワークショップ (slack 上でのポスター掲示)

6月2日(水曜)

10:00～12:00 第9回理論情報交換会:揺らぎに関する総合討論/ケーススタディ

13:30～15:30 第8回大規模解析情報交換会:バイオインフォマティクスに関する話題提供及び被支援班からの報告

16:00～18:00 第5回若手企画ワークショップ(ポスターセッション)

18:30～ 若手懇親会

6月3日(木曜)

08:50～9:00 倉谷滋 領域代表挨拶

座長:長谷部光泰

09:00～09:20 倉谷滋「脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性」

09:20～09:40 長谷部光泰「摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明」

09:40～10:00 入江直樹「脊索動物胚発生の分子発生システムゆらぎ測定と進化的保存性」

10:00～10:20 深津武馬「昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明」

10:20～10:40 休憩

座長:金子邦彦

10:40～11:00 古澤力「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」

11:00～11:20 金子邦彦「進化の揺らぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開」

11:20～11:40 阿部玄武「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」

11:40～12:00 守野孔明「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」

12:00～13:00 昼休み

座長:入江直樹

- 13:00～13:20 土松隆志「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」
- 13:20～13:40 高橋佑磨「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」
- 13:40～14:00 東山大毅「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」

座長:深津武馬

- 14:00～14:20 市橋伯一「RNAの構造揺らぎの大きさから進化しやすさを予想し制御する」
- 14:20～14:40 大林龍胆「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」
- 14:40～15:00 鈴木郁夫「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」

15:00～15:20 休憩

座長:古澤力

- 15:20～15:40 寺島浩行「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」
- 15:40～16:00 石川由希「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」
- 16:00～16:20 鈴木孝幸「仙椎ー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」
- 16:20～16:40 細田一史「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」
- 16:40～17:00 守屋央朗「発現量揺らぎー適応系により探索する発現変動の適応ー進化への影響」
- 17:00～17:20 守山裕大「自己組織化過程における細胞の揺らぎと対称性の破れ」

18:30～ 懇親会

6月4日(金曜)

座長:重信秀治

- 09:00～09:20 石川麻乃「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」
- 09:20～09:40 森下喜弘「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」

- 09:40～10:00 田中幹子「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」
- 10:00～10:20 安岡有理「ネットアイツメガエル胚発生における遺伝子制御ネットワークの揺らぎと進化」
- 10:20～10:25 重信秀治 大規模解析支援について
- 10:25～10:30 古澤力 理論情報交換会について
- 10:30～10:35 入江直樹 若手ワークショップについて
- 10:35～10:40 倉谷滋 終わりの挨拶
- 11:00～12:00 総括班会議



参加者集合写真(一部)

第9回理論情報交換会報告

古澤力(理化学研究所/東京大学)

本新学術領域で目指すところは、統計物理学を背景とした理論生物学研究、特に表現型揺らぎと進化の関係性を取り込むことにより、これまで各論の域を超えることが困難であった進化的制約や方向性を統一的な視点から理解しようとする点にあります。この領域では、分子から生態系まで複数の階層における進化過程を研究対象としますが、一方でその様々な系においてどのように表現型揺らぎを定義し、実験的に計測をするのかは議論が続いていました。2020年12月に行われた第7回理論情報交換会では、「揺らぎに関する総合討論」と題して表現型揺らぎの定義やその計測に関して議論を行いました。それをさらに拡張し、明確な定義を与えることを目的として2021年2月に有志が集まり第8回理論情報交換会を行いました。そこでの議論は、公募班の細田一史さんにより、領域ニュースレター Vol.5, No. 2 にまとめられています。

領域会議前日の2021年6月2日に開催された第9回理論情報交換会では、冒頭に細田さんによってこれまでの議論のまとめについて発表があり、それに基づいて議論を行いました。ここでは、表現型揺らぎに関する現状での理解をまとめ、さらに実験データの分散から表現型揺らぎや環境応答を定量する手法を提案しました。特に、同一遺伝子型・同一環境条件における表現型揺らぎと、環境の微小な変化に起因する環境応答を実験的にどのようにして判別するかについて、集中して議論が行われました。

続いて、以下の3つの班から、表現型揺らぎなどの実験的な計測がどのような手法で行われているか、情報共有を目的としたケーススタディの発表がありました。

1:メダカ胚を用いた表現型揺らぎ・進化応答の定量(入江班・内田唯さん)

メダカ胚のトランスクリプトーム解析からの表現型揺らぎと進化応答の定量について、その手法の詳細が議論されました。特に、実験ノイズと表現型揺らぎを分離する手法と、表現型揺らぎの発現量依存性をどのように扱うかについて、その解析手法が必要になった経緯まで含めて説明があり、それに基づいた活発な議論が行われました。

2:ツメガエル胚を用いた制御ネットワーク進化過程の解析(安岡班・安岡有理さん)

ネットイツメガエルの1核 RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析を用い、表現型揺らぎと遺伝子制御ネットワークの進化の関係を明らかにする研究に関して、その進展が発表されました。実験ノイズと表現型揺らぎの分離や、表現型揺らぎの発現量依存性をどのように扱うかなど、参加者から様々な手法の提案が行われました。

3:大腸菌進化実験を用いた変異に起因する表現型変化の定量(古澤班・津留三良さん)

突然変異に起因する表現型の変化について、出来る限り選択圧をかけずにそれを定量する手法として、植え継ぎごとの有効集団サイズを1(あるいは少数)に保つ変異蓄積(Mutation Accumulation)実験が紹介されました。この実験を十分に多くの独立系列で行うことにより、ランダムにゲノムに導入された変異に起因する表現型変化を定量できます。大腸菌を用いた試験的結果として、遺伝子発現量の表現型揺らぎの大きさ(Vip)と変異に対する応答(Vg)に正の相関がある予想と矛盾しない結果が示されました。

本新学術領域も終盤戦となり、結果をまとめる議論がより必要となる時期になっています。それぞれの系において、表現型揺らぎをどのように定義するか、それをどのように実験的に定量するか、といった

相談がある場合には、古澤 (chikara.furusawa@riken.jp) まで連絡をお願いします。

最後になりますが、この理論情報交換会にて発表をした皆様、また議論に参加した皆様に感謝します。



理論情報交換会における議論(古澤力)



大規模解析情報交換会における議論(重信秀治)



大規模解析情報交換会における議論(小林裕樹)



第 8 回大規模解析情報交換会報告

【プログラム】

2021 年 6 月 2 日 (水) 13:30-15:30

Zoom によるオンライン開催

13:30 - 13:35 はじめに(重信)

各班からの話題提供

13:35 - 14:05 入江班・上坂 「脊椎動物胚を用いた single nucleus RNA-seq 法」

14:05 - 14:35 守野班・守野 「非モデル海産無脊椎動物クサイロアオガイのゲノム解読」

総括班支援チームからの話題提供

14:35 - 14:50 小林 「Nanopore London Calling 2021 レポート」

14:50 - 15:30 重信 「リモート&クラウドコンピューティングでラクラク大規模情報解析」

開催報告 I

重信 秀治(基礎生物学研究所)

第 8 回大規模解析情報交換会は、第 9 回領域会議の前日に、Zoom を用いたオンライン形式で行いました。今回は 2 部構成とし、前半は各班からの話題提供として、総括班からの大規模解析支援を受けている班に進捗報告を兼ねて話題提供をしていただきました。後半は、総括班支援班から次世代シーケンシングと情報解析のに関する最新情報を提供しました。

前半では、入江班の上坂さんと守野班の守野さんに発表いただきました。お二人には、大規模解析の現状と経験について、失敗談や未解決の問題も含めて、ラボミーティングのようなノリでぎっくばらんにお話ください、と事前をお願いしていました。

最近、drop-seq ベースの single cell RNA-seq (scRNA-seq)の技術が大変注目されています。この技術は数千から 1 万個ほどの細胞からいっぺんに一細胞毎のトランスクリプトームデータを取得できる画期的な技術で、10x Genomics 社の Chromium などの使いやすい商用プラットフォームの登場をきっかけに、急速に広まりつつあります。本領域でも scRNA-seq を実施中及び検討している班は多く、私たち支援班も比較的早期よりサポート体制を整えてきました。scRNA-seq は解析に要するコストが非常に高額であること、また、一般に出回っているプロトコルは本領域で扱っている多様な生物にはそのまま適用できないことが多いことなどから、支援班と各班で試行錯誤を重ねそれらの経験を共有しつつ研究を進めている状況です。今回の情報交換会では、入江班の上坂さんが、Chromium を使ったメダカ胚の single nuclei RNA-seq 法 (snRNA-seq) の確立について試行錯誤の過程も含めて詳しくお話しくださいました。入江班は「細胞」ではなく「核」を対象として遺伝子発現プロファイルを取得する戦略をとっています。細胞でなく核を使うメリットはいくつかありますが、一番大きいのは、凍結したサンプルからでもライブラリ調製ができることでしょう。ただ、snRNA-seq にはいくつかの技術的なハードルがあり、scRNA-seq ほどクリーンなデータが出にくいという話も多く聞きます。実際、上坂さんの 1 回目の scRNA-seq 実験は失敗に終わりました。データの検証の結果、ambient RNA が多いことがわかり、これは核から RNA が漏出していることが原因であると結論づけられました。そこで、2 回目の実験では核分離のプロトコルを変更し、巷で定評のある Frankenstein 法を採用したところ、良好な結果を得ることができました。Biological

replicates 間の遺伝子発現プロファイルは類似しており、再現性は高いものでした。クラスタリング解析により主要な細胞集団が明確にアノテーションできることも示されていました。上坂さんによると、マイナーな改善は必要とのことですが、snRNA-seq の一連の基礎的な過程の技術は確立できたと言って良いと思います。この snRNA-seq 技術は大変汎用性の高いものであるのでメダカ胚以外の系への適用も多いに期待できます。細胞壁を持つ植物はそもそも細胞の解離がほぼ不可能ですし、動物でも神経細胞のように細胞の解離が困難な細胞腫も多くあります。また、新鮮なサンプルを十分な量いっぺんに確保することが難しいケースも多いでしょう。これらの実験に scRNA-seq は適しています。今後データ解析を進めていきますとバイオインフォマティクスの課題も見えてくると思いますので、それらの課題についても上坂さんや領域のメンバーと共に検討していきたいと考えています。

全く余談ですが、上坂さんが、Frankenstein 法を提案するメールを私に送ってくれたのは今年の 10 月下旬でした。季節柄、私は、上坂さんが何かハロウィン企画のことで話しているのかと思いました。が、そうではなくて大真面目に scRNA-seq の計画を立てていたのです。ちなみに Frankenstein 法の名前の由来ですが、良くわかりませんが、どうやら複数の核抽出法の良いポイントを「寄せ集め」たことによるのではないかと思います。Frankenstein 法は開発者による詳細のプロトコルが protocols.io で公開されています(<https://www.protocols.io/view/frankenstein-protocol-for-nuclei-isolation-from-f-bqxymxpw>)。

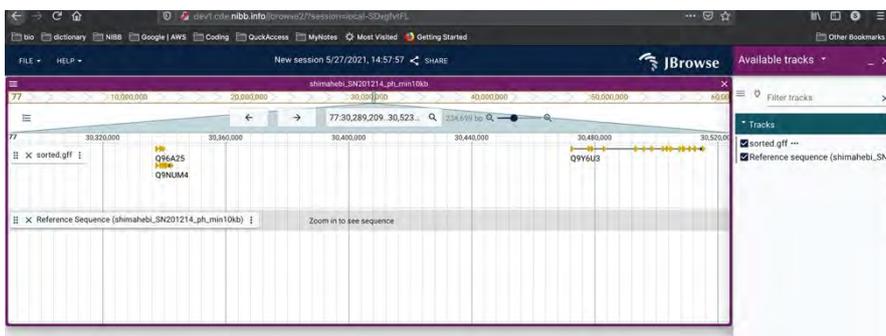
守野さんには、クサイロアオガイのゲノム解読の進捗状況について発表していただきました。支援班では複数の新規ゲノムシーケンスを支援していますが、中でもクサイロアオガイのゲノム解読は最も難易度の高いプロジェクトの1つで、正直苦勞しています。ロングリード、ショートリードの複数のシーケンステクノロジー、異なるアセンブルのパイプラインを色々試しているところです。その過程と現状を守野さんと支援班ポスドクの小林君より報告していただきました。詳細は、小林君のレポートをご覧ください。

後半は、まず小林君からナノポアシーケンサーの最新情報について情報提供してもらいました。ちょうど前月に Oxford Nanopore 社主催のミーティングがオンラインにて開催され、数々の新製品情報やユーザーからの先駆的な研究報告があったようです。時差にもめげず参加した小林君が、情報交換会では本領域に関連の深そうなトピックを選んで紹介してくれました。詳細は小林君のレポートをご覧ください。

最後に、私が「リモート&クラウドコンピューティングでラクラク大規模情報解析」と題した発表を行いました。最近、皆さんも「クラウド」というキーワードを耳にすることが多いと思います。私たちが日々利用する IT 関連ツールはほぼ全て何らかの形でクラウドコンピューティングに依存しています。クラウドコンピューティングとは、インターネット経由で様々な IT リソースを利用することができるサービスの総称ですが、現在、ビジネスの世界ではクラウドへの移行が急速に進んでいます。アカデミアの世界でもその流れが来てる！と私自身感じるため、今回情報交換会のトピックに取り上げました。米国はオバマ政権時代の 2011 年に Cloud First 政策をスタートしました。そのため当然 NIH や NCBI を含む米国の学術機関もクラウド対応を進めてきました。そして遂に昨年末に NCBI は、NCBI が扱うデータの中で最大規模である Short Read Archives (SRA) をクラウドの雄 Amazon AWS 上で提供することを発表しました。これは大変象徴的なニュースです。バイオインフォマティクス業界の中心的存在である NCBI が本気でクラウド中心の環境を整えることを意味しており、これを契機にクラウド中心のバイオインフォマティクスのエコシステムが一気にまわり始めることが予想されます。

このような状況を鑑み、支援班では数ヶ月前より Amazon AWS の各種サービスの試用を開始し、どのような場面でクラウドのどのサービスが私たちの研究に適しているのかを模索しているところです。今回の私の発表ではその一部を紹介しました。クラウドの使い所としては、web サーバや web ベースのアプリケーションは筆頭に挙げられます。例として、鈴木班のシマヘビゲノムプロジェクトのゲノムブラウザをクラウド環境で作成してみました。ゲノムブラウザのフレームワークには、昨年の情報交換会でも紹介した JBrowse を採用しました。Amazon AWS のサービスの1つである EC2 仮想サーバを1つ立ち上げ、Linux OS 上にウェブサーバ nginx を稼働させます。JBrowse のコンポーネントとシマヘビのゲノムデータを EC2 にコピーすることによって比較的簡単に、ゲノムブラウザ が完成しました。ユーザーは一般的なウェブブラウザを使ってアクセスすることができます。コストも安価で、今回の設定では常時稼働でも月 2000 円程度です。工夫をすれば、より安価に抑えることも可能です。今後は、ゲノムブラウザと連動した遺伝子データベースをクラウド上に開発することを計画しています。

アカデミアにおけるクラウドの



Amazon AWS 上に突貫工事で作成した、シマヘビのゲノムブラウザ

別の使い所として、HPC (High Performance Computing) があります。いわゆるスパコンをクラウドで実現するわけです。支援班ではクラウドでの HPC を数ヶ月前より試験的に利用して、ポジティブな手応えを得ているところです。今回の情報交換会では時間の関係で発表は省略しましたが、次回以降に是非情報共有したいと考えています。

このようにクラウドの利用が増えると、リモートサーバで作業する機会が増えてきます。また、まだクラウドを利用されていない皆さんも、近年のデータ規模の増大により自分のローカル PC で解析が完結することが難しくなり、他のサーバにログインしてリモート解析をすることが増えてきているのではないのでしょうか。またコロナ禍においてリモートワークが広まり、リモートサーバへのアクセスの機会はますます増えていると思われます。そんなリモート中心の環境で作業効率を抜群に向上させるためのちょっとした Tips を3つ、情報交換会でお伝えしようと用意していました。時間不足で説明できませんでしたが、Slack にプレゼン資料をアップロードしましたので興味ある方は是非ご覧ください。メニューは以下の3つです。

- 1) ssh コマンドを使いこなす。公開鍵認証のおすすめ、踏み台サーバの利用、ポートフォワーディング機能。
- 2) Python ユーザー必見！ Jupyter をリモートから使う。
- 3) 人気 No.1 プログラミングエディタ Visual Studio Code をリモートで使う。

開催報告 II

小林裕樹(基礎生物学研究所)

今回の情報交換会では、恒例となる支援を受けたメンバーからの報告が2件と、重信さんからのクラウド解析の紹介がありました。それに加え、会のおよそ2週間前となる5月19日から21日にかけて

Oxford Nanopore 社のカンファレンス“London Calling”がオンラインで開催されていたため、それに参加していた私からも、そこで見聞きした Nanopore シーケンサー関連の動向について、いくつか報告させていただきます。

今年の Nanopore のトレンドは、新発売のライブラリ作成キット 2 種類によるシーケンスリードの向上、が中心となっています。新しいキットの一方は Ultra-Long DNA Sequencing Kit といひ、超長鎖 DNA のライブラリ作成によってリードの長さを向上させるものです。このキットは、長い DNA を分解せずかつ選択的にライブラリ作成できることが特長で、塩基数換算でリードデータの約半数が 100kb 以上となるシーケンスリードが得られるという説明でした。もう一方のキットは、新しい試薬である Q20+ chemistry を使用してリードの正確性を向上させるものです。このキットは正確性の高い R10.3Flow Cell や basecaller と組み合わせることで塩基あたりの信頼性が 99%を超える正確なリードが得られ、複数リードでコンセンサスを取ることで Illumina などのデータを使わずに正確配列情報を得ることができる、ということでした。これらは異なるライブラリ作成キットのため超長鎖リードと 99%正確性の両立は現状では達成されていませんが、超長鎖リードは非モデル生物ゲノムの de novo アセンブリにおいて非常に強力であり、一方で正確性の高い Nanopore リードは塩基変異と構造変異を含めたバリエーション解析への応用が可能になるなど、用途に応じて使い分けることで効果的な解析ができそうです。超長鎖キットの必要 DNA 量の多さや Q20+キットのスループットなどを考慮すると必ずしも現行キットの上位互換とはならないようですが、有用なツールであることは違いなく、支援班でも機を見て導入していければと思っています。

被支援班からの話としては、入江班の上坂さんと、守野班の守野さんからの報告がありました。その内、守野さんの実施している海産貝類クサイロアオガイのゲノム構築に関しては、私も支援班として解析のお手伝いをしており、報告の一部を担当しました。この貝はヘテロ接合性が高いため、ゲノムアセンブリの際に対立アレルが別個のコンティグとして出力されてしまう傾向が高く、一揃えのハプロタイプ相当のゲノム情報構築が難しいという内容になりました。これまでに 10x Chromium 社の linked-read 法でのシーケンスや、Nanopore ロングリードからのアセンブリなどを実施していますが、linked-read からのアセンブリではシングルコピー遺伝子の重複が多い上にアセンブリの連続性が非常に低く、Nanopore リードからのアセンブリにおいても、連続性・網羅性とハプロイド性が十分に両立できるパイプラインが現状のところ見つかっていません。リードの状態から、ヘテロ性の高さだけでなくゲノム抽出も難しい生物であるようにも思われ、総合的な de novo ゲノム解読の難易度がかかなり高い印象ですが、これからさらに解析を進めていく計画ですので、今後さらに改善されていくことを期待したいところです。

今回の会におけるその他の発表としては、上坂さんから single nucleus-RNA-seq の実施報告が、重信さんからクラウド解析のサービスや解析法のチュートリアルなどがありました。どちらも近年の流行に乗っているトピックで、まだ触れたことのないメンバーにとっても、勉強になる内容だったのではないかと思います。

第5回若手企画ワークショップ(ポスターセッション)概要報告

入江 直樹

新学術会議日程に合わせ、今回も若手ワークショップを事前に開催しました。オンラインでの開催が続き、なかなか近い距離での自由闊達な議論が難しい中、若手ワーキンググループのみなさん(特に守野孔明さん、内田唯さん、上坂将弘さん、香曾我部隆裕さん、田中祥貴さん)が中心になって工夫を凝らした若手企画が開催されました。

これまで同様、引き続き若手の一人一人にスポットライトを当てることはもちろん、今回では「自分の研究の新たな展開を考え、成果発表だけではなく、「これからやりたいこと」「まだ具体的に定まってないけどやってみたいこと・興味があること」に焦点を当てた議論の場となりました。

互いにブラッシュアップしていくことも目指した内容で、主にはオンラインポスター、そしてZoom上でのグループディスカッションを中心としたクローズド形式で行われました。

- 日時 5/26(水)–6/1(水) Slack 上での資料掲示、議論(形式は完全に自由)
- 6/2(水) 16:00~18:00 zoom 上でのグループ議論
(持ち時間 25min/人程度、グループ替えをして2ラウンドの予定)
5人程度のグループに分かれ、研究紹介、議論、ブレインストーミングなど行う。

内容には十分自由度が認められており、ある研究成果を核にした今後の展開や新しい問題への興味があるけど、どうアプローチしたら良いだろうか?のような自由な議論が行われました。

なお、詳しい内容は Vol.5 No.4 にまとめて報告されますので、みなさまお楽しみに。

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(理化学研究所)、平沢達矢(東京大学)

【研究目的・背景】 脊椎動物の筋-骨格要素間の結合には進化的保守性が見られ、大きなつなぎ変えを生じずに形態を多様化してきた。が、まれにそこから逸脱した例もある。本研究では、筋-骨格結合が大きく変化したケースに注目し、胚発生における筋-骨格結合の成立機構に内在する揺らぎの解明を通じて、発生上の揺らぎと進化的傾向の関連を明らかにする。特に対象とするのは移動性体節筋(MMP筋と略:舌筋、四肢筋など)である。この筋は、*Lbx* 遺伝子を特異的に発現する体節由来前駆細胞が長距離を移動後、発生後期に非体節由来の骨格要素と相互作用し二次的に結合を樹立することでパターンを得る。この発生過程には多分に揺らぎが含まれていると予想され、進化において筋-骨格要素に見る結合の保守性の基盤が失われる傾向へ連なると考えられる。

【2020年度研究進捗状況】 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、*Dil* 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。

【2021年度研究計画】 前年度までに、四肢動物の胚発生における筋-骨格結合樹立の精密観察により、進化上この結合関係が変化するときの発生基盤の一端が真皮下部に分化する結合組織細胞による筋前駆細胞や筋芽細胞の移動誘導にあることが解明されつつある。今年度は、既に展開しているニワトリ胚を用いた発生擾乱実験を通して、筋-骨格結合に変異をもたらすこの発生機構の異所的再現実験を展開し、予想通りに結合関係が変異するか、また、どの程度の可塑性をもって変異が生じるのかを検証する。その際、MMP筋として発生する筋の中にも、発生上で分化するタイミング、あるいは進化上で獲得された順序に幅があることに着目し、発生擾乱実験におけるそれぞれの筋の変異率の差異も解析する。さらに、その結果を、化石記録を含めた筋-骨格結合の進化的変化の歴史と比較、現生動物(ニワトリ)で実験的に観察される発生の可塑性と進化的傾向(どの筋が配置パターンを変更しやすいかや、どの系統的位置で変更されたかといった進化史における観測事実)の対応関係を探る。以上の結果を論文としてまとめるとともに、領域内の他の班との議論も重ね、動物における発生過程の揺らぎと進化過程における制約と方向性の関係性についての理論的理解を進める。同時に、並行して進めてきた胚発生における比較トランスクリプトーム解析から、脊椎動物胚での細胞型分化過程におけ

る揺らぎの要因となる分子機構を絞り込む。うち、1つの研究の軸は、四肢動物を含む顎口類と MMP 筋を持たない円口類(ヌタウナギ、ヤツメウナギ)との比較であり、筋前駆細胞の移動をともなう発生過程が脊椎動物系統の中でどのように獲得されたのかの理解を進める。この過程で、羊膜類における筋の発生で同定されてきた特定の遺伝子発現の比較による限界から離れ、非モデル生物においてバイアスのかからない遺伝子探索も行う。もう1つの軸は、カメと他の四肢動物との比較であり、カメ胸筋と骨格の結合関係が進化上変化した問題に対し、筋前駆細胞や筋芽細胞の移動を誘導する真皮下部結合組織細胞の分化を生じさせる胚環境について、進化上どのような遺伝子発現制御変化によって成立したのかの解明とその可塑性の理解を目指す。最後に、研究計画全体で得られた知見を統合し、脊椎動物進化における筋骨格系の発生過程の揺らぎの起源と形態進化過程との関連についての理論的枠組の構築を進める。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】 入江班研究分担者である上坂将弘博士、および金子班研究分担者、藤本仰一博士の研究グループメンバーである Safiye E. Sarper 博士、金子班研究協力者、香曾我部隆裕博士が、倉谷班の実験設備を使って研究を進めており、彼らと日常的に議論を行い、各班の専門を統合する理論的枠組の深化を目指している。特に若手研究者や学生どうしの議論が活発であり、そのような研究環境は新たな学術領域の創成に結びつくと期待される。

揺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(東京大学)、藤本仰一(大阪大学)

【研究目的・背景】 これまでノイズや環境変動による表現型揺らぎが大きいほど進化もしやすいという、揺らぎ応答理論を定式化してきた。この結果を踏まえ、表現型進化の制約、進化しやすさという漠然としていた概念を定量的に表す理論を完成する。そのため、生物の状態を少数マクロ変数で記述し、それが遺伝的变化、環境変化とともにどう変化するかを地形で表した理論を構築する。次に、複数種の集団が安定して共存しつつ進化できるかを理解するべく、相互作用をとり入れた階層進化理論を展開する。これにより、表現型可塑性と共生過程の関係を結びつけ共生しやすさを定量的に表現する。第三に、表現型を形作る発生過程が進化を通しどのように変化していくかを調べ、進化と発生の対応、発生過程の進化拘束を定量的に表現する。これにより、形態進化の方向性への理解を与える定量的進化発生学の道を開く。成果は一般向け講演、成書でも公表、表現型進化の新描像を広く世に問う。

【2020 年度研究進捗状況】 (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の、まずこの条件をあらゆる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、それが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、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、それにより生成される社会、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。

【2021 年度研究計画】 (i) 表現型進化の方向性と拘束の理論: まず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、進化とダイナミクスの相関の起源を理論的に解明する。ついで多環境多入力での応答における進化の方向性を遺伝子制御ネットワークそして統計力学のスピング

ラスモデルで明らかにする。それをもとにしたマクロなポテンシャル地形理論を定式化する。次に種間相互作用で揺らぎと可塑性が増加することを示す。理論を多倍体、有性生殖の場合に拡張、減数分裂に対するロバストネスによりメンデル法則が進化することを示す。(ii) 階層進化理論:階層進化理論を細胞、多細胞生物、細胞集団へと拡張する。細胞内共生体が進化により遺伝子を失うことを示す。ついで細胞と細胞集団の階層では細胞間の成分やり取り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、その特徴づけを行う。さらに個体-社会の階層に対しては社会で親族、家族構造の進化を理論モデルで明らかにしたことをふまえてそれと現実データとの照合を行う。一般に協同的社会構造出現条件の定式化により実験班への示唆を与える。(iii) 発生過程の進化:発生の砂時計構造進化の条件を明らかにし、実験データとの比較も行って、論文発表を行う。

【藤本グループ】 これまで動植物の器官の空間的配置において、種内で制約された揺らぎを見出してきた。その発生の仕組みを同定するために、刺胞動物の内臓および植物の花器官の発生過程それぞれについて、計算機実験を並行して進める。さらに、植物器官の発生における各細胞の分裂方向や成長の揺らぎとその制約について、実験データと計算機実験を統合することで定量的評価を進める。これら細胞分裂/成長、および、器官配置の2つの階層における解析を複数種で進めることで、種内揺らぎと進化の相関関係の抽出を目指す。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】 (i) 表現型進化の方向性と拘束の理論:古澤班の大腸菌進化実験ならびに細胞進化シミュレーションとタイトに連携して進めている。(ii) 階層進化理論:市橋班の構成的進化実験、特に RNA とプロト細胞の階層進化への理論からの視点、大林班でのゲノム数と進化の関係、深津班の共生進化の拘束、細田班の生態系進化の低次元拘束に関しては理論的な方向から議論を進めている。(iii) 進化発生対応:入江班、倉谷班と砂時計仮説、揺らぎと進化の関係の実験結果と理論をつなぐべく研究を進めている。長谷部班のコケ植物3次元体制の多様性、新美班のテントムシ斑紋形成の揺らぎと多様性に関して、発生モデリングを進めている。さらに、動物の対称性の揺らぎと多様性に関して、倉谷班と共同して実験と数理モデリングの両方を進めている。

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(東大)、上坂将弘(理研)、内田唯(理研・東大)

【研究目的・背景】

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。

【2020 年度研究進捗状況】

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)形成期が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(Hu *et al.* Nature Eco Evo 2017)がみえてきている他、胚致死による強い負の選択圧では十分に説明できないこともわかってきた(Uchida *et al.* EvoDevo 2018)。本課題では器官形成期の表現型揺らぎの小ささが多様性の乏しさと相関することで、ボディプランが保存されてきた可能性を検討している。これまでの研究によりメダカの近交系及び同種異集団を用いた実験系により、揺らぎと進化的保存性との関連、そして遺伝子の使いまわしによる多様性の拘束(多面拘束)との関連がみえてきている。また、今年度は発生過程における分子シグナルの依存性が原因となり多様性が拘束されているとする説(発生負荷)を間接的に検証することを試みた。具体的には、カメ、ニワトリの脊索、そして脊索周囲にある神経管と体節を、Laser Micro Dissectionにより切り出した上でRNAseqを行い、発生負荷が存在しているとする場合に期待される遺伝子の保存性を検討した。

【2021 年度研究計画】

メダカを用いた数世代程度の進化実験による揺らぎ応答理論の検証を引き続き行う。また、各動物門におけるボディプランと保存された器官形成期の細胞集団レベルでの関連を single cell seq で解析し、遺伝子発現情報レベルでの保存性とボディプランとの理解のギャップを埋めるための研究を推し進める。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

古澤班、そして大規模情報解析支援班、倉谷班との共同研究を進めている。

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)

【研究目的・背景】

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、近年の申請者らの研究により、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自由生活性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。

【2020 年度研究進捗状況】

- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。

【2021 年度研究計画】

最終年度ということで、成果を順次取りまとめ、論文発表を目指す。具体的には

- ・チャバネアオカメムシその他のカメムシ類で同定された培養可能共生細菌について、比較ゲノム、野外宿主集団における分布と多様性、自然環境中における分布、存在様式、多様性、宿主との共進化、

共生細菌間の相互作用、宿主への適応度効果、機能解析、共生、感染、伝達の生理機構、分子機構、自然環境中における進化生態ダイナミクスなどについて解明した研究成果を取りまとめる。

- ・チャバネアオカメムシその他のカメムシ類において同定された環境中の潜在的共生細菌群について、比較ゲノム、多種宿主集団における分布と多様性、自然環境中における分布、存在様式、多様性、共存細菌間の相互作用、多種昆虫への適応度効果、機能解析、共生、感染、伝達の生理機構、分子機構、自然環境中における進化生態ダイナミクスなどについて解明した研究成果を取りまとめる。

- ・これら様々な進化段階にある難培養共生細菌、培養可能共生細菌、潜在的共生細菌を感染させた宿主昆虫について、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、それら定量値の平均、分散、揺らぎについて統計的に検討し、共生能力との相関解析を行った研究成果をとりまとめる。

- ・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 の間における宿主—共生細菌間の特異性に関わる共生細菌側の遺伝子、宿主昆虫側の遺伝子をそれぞれ同定した研究成果を取りまとめる。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

- ・古澤班の若本祐一との共同研究により、チャバネアオカメムシの培養可能共生細菌 C, D, E, F の微細流路培養システムを用いた宿主体外培養系の構築、共生器官構造を模した培養系の開発、少数細胞レベルの増殖モニタリング、競争実験を継続するとともに、微細空間での難培養性共生細菌の人工培養の検討などを行なった。

- ・総括班支援により、潜在的共生細菌を人工接種したカメムシの共生部位における網羅的遺伝子発現解析のための RNAseq 解析ならびに共生特異性に関わる宿主側遺伝子の探索を目的とした RADseq 解析を実施した。加えて、超ロングリードシーケンサを用いた高度反復配列を持つ共生細菌ゲノムの高精度アセンブル法の検討も行なった。

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(理研)、若本祐一(東京大)、津留三良(東京大)

【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。

【2020 年度研究進捗状況】

(1) 複数薬剤に対する耐性能の定量に基づく適応度地形の推定

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:

蛍光タンパク質遺伝子をそれぞれの遺伝子に結合させた大腸菌ライブラリを用い、発現揺らぎの大きさと、さまざまな環境変動に対する応答を系統的に解析した。結果として、発現揺らぎと環境応答、そして進化過程における発現変化の度合いには正の相関があることが示された。

【2021 年度研究計画】

(1) 環境条件を動的に制御する進化実験による進化能地形の推定

環境にフィードバック制御を与えて進化過程をコントロールする技術を用い、様々な初期条件から複数のターゲット表現型へ向けた進化実験を実施し、その進化軌跡が持つ性質を解析する。特に、それらのデータから、進化可能性を記述するポテンシャルランドスケープの定量を試み、それに基づいて進化過程の予測と制御を行う手法を開発する。

(2) フローサイトメリーを用いた大腸菌遺伝子発現揺らぎと環境応答の定量:

蛍光タンパク質遺伝子をそれぞれの遺伝子のC末端に結合させた大腸菌ライブラリーを用い、発現揺らぎの大きさと、環境変動に対する応答、そして進化的応答を系統的に解析する。これまでに得られた結果として、一部の遺伝子はタンパク質の局在などにより、他よりも大きい発現揺らぎの大きさを示す場合があること、そして発現揺らぎと環境変動に対する応答の大きさには正の相関があることが見出されている。今年度は、植え継ぎ培養による進化実験によって発現量がどのように変化するかを定量し、揺らぎ-応答関係を検証するとともに、進化可能性がどのように予測できるかを検討する。

(3) 1細胞計測系を用いた遺伝子発現揺らぎと遺伝型摂動への応答の定量:

顕微鏡下での1細胞計測を行いながら、光遺伝学的手法を用いて遺伝子操作を行う系を用いることにより、揺らぎの計測を行いながら、同時にゲノム配列への摂動とその応答を解析する。さらに、この系を用いるなどして、ゲノム変異に依存しない抗生物質耐性の獲得ダイナミクスを解析し、そこでの表現型揺らぎと環境摂動への応答がどのように関係するかを明らかにする。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

金子班、深津班、入江班、市橋班、大林班、細田班、新美班との共同研究が進行中である。

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、上田真道、Peng Chen、
棚瀬邦明、真野弘明、瀬上紹嗣(基礎生物学研究所)

【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。

【2020 年度研究進捗状況】

[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。

【2021 年度研究計画】

[課題1. 食虫性関連遺伝子の特定]Palfalvi を中心に、フクロユキノシタを用いて、昨年度に残ったシングルセルトランスクリプトーム解析を完了し、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に、代表的な遺伝子の in situ ハイブリダイゼーション実験を完了する。フクロユキノシタのゲノムリアノテーション結果、課題2の大量 RNA-seq 解析と合わせて、論文投稿を行う。

鳴川を中心に、CRISPR/Cas9 法によって、サイトカイニン分解酵素の遺伝子破壊体、過剰発現体を CRISPR/Cas9 法で作出する。オーキシンセンサーライン、サイトカイニンセンサーラインを確立し、オーキシン分布とサイトカイニン分布を推定する。これらの結果を統合して論文を投稿する。

Cheng、瀬上を中心に、ムジナモのカルスを用いて形質転換系を確立する。昨年度開発した手法により、培養液のホルモン濃度、光条件などを調整することで、高効率で形質転換体を得る条件を確定する。シングルセルトランスクリプトームを完了し、解析結果を、ハエトリソウのトランスクリプトーム結果と比較して、両者における食虫性関連遺伝子の相違点を探る。

棚瀬、瀬上を中心に、昨年度に成功した方法を用いて、培地ホルモン濃度や栄養塩濃度を調整することで、最適形質転換条件を決定する。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を完了し、ハエトリソウやムジナモとの比較から、食虫性関連遺伝子の相違点を探る。

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出版する。

[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おいて、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の RNA-seq を完了し、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、論文として投稿する。

[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 解析を完了し、大量 RNA-seq のデータとともに論文投稿する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

Single cell RNAseq、single cell ATAC-seq、大量 RNAseq 解析を総括班支援班、発現揺らぎについての理論解析を古澤班と共同で進めている。

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・院生命)

【研究目的・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。

【2020 年度研究進捗状況】

2020 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。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。

【2021 年度研究計画】

① 鰭条形成における *shh* シグナル経路の解析

胸ヒレ骨格(軟骨、硬骨)、*shh* 経路応答および *shh* 発現細胞をトレースするトランスジェニック系統(TG)を用いて、*shh* 経路や環境要因の摂動実験を行い、ゆらぎのもととなる発生現象を特定するとともに、環境要因と *shh* 経路の関係を明らかにする。

② 鰭条-DR 接続様式の進化傾向の解析

条鰭類全体での胸ヒレ骨格のサンプリング・骨格パターン解析から明らかになった鰭条/DR 接続の条鰭類における進化傾向と *Hox* 遺伝子や *shh* 遺伝子との関係を、ゼブラフィッシュとメダカでゲノム編集技術を用いた遺伝子とその制御領域の欠損・導入の解析を行い、機能的な因果関係を証明する。

③ カナガシラの胸ヒレ骨格の区画化の解析

カナガシラの卵を取得し、胸ヒレ形成過程と *shh* 経路、区画化遺伝子の発現を記載する(図 2)。また、*shh* 経路の摂動実験を行い、鰭条ゆらぎに関わる発生機構と遊離軟条進化の関係を議論する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

総括班支援により、カナガシラのヒレ形成における RNA-seq 解析の計画を進めている。現在、様々な臓器から抽出した mRNA の解析による RNA カタログの作成と、カナガシラゲノムの解析を行っている。

軟体動物割球特異化機構を題材とした発生システム浮動の制約と方向性の解明

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。

【2020 年度研究成果】

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揺らぎの検証

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。

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。

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。

【2021 年度研究計画】

2021年度にはまずこれまでの遺伝子進化史解析、発現解析および過剰発現実験のなどの成果を取りまとめ、論文化することを第一に行なっていく。また、前年度までに得られている1個体ずつのトランスクリプトームデータをもとに発現のばらつきに着目し、各転写因子の発現のばらつきの程度、およびそこにどのような傾向があるかについて明らかにしていく。併せて、他の腹足類での解析も進めていく。また、割球特異化システムの冗長性の検証については、さらに、1q1 および 1q2 系列で発現する転写因子群について機能阻害を進めていくと共に、前年度に取り組んだ遺伝子のうち、表現型の出なかった遺伝子に関しては、二重 KD などにより冗長性の存在を検証していく。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

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。

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）

【研究目的・背景】

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しうると予想される。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。

【2020年度研究進捗状況】

(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た。

【2021年度研究計画】

(1) 実験による特異性のゆらぎの定量と進化の再現

昨年度に引き続き、特異性のゆらぎの定量実験を進める。実際の野生集団で発見されたS対立遺伝子内のアミノ酸置換が、タンパク質相互作用の程度や自家不和合性の活性(花粉管伸長等)に与える影響を定量する。野生集団解析は継続して進め、さらに候補となるアミノ酸置換を探索する。以上の解析は孢子体型自家不和合性をもつ植物(ハクサンハタザオ)を中心に進めるが、配偶体型自家不和合性植物(ペチュニア)でも並行して行う。

(2) 数理モデル解析へのフィードバック

新しい*S*対立遺伝子の進化と特異性のゆらぎとの関係を探るための数理モデルを昨年度までにすでに構築し、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。本年度は、実験で得られたデータを数理モデルへとフィードバックさせ、現実のパラメータで新しい*S*対立遺伝子が進化しうるかどうかなどの検討を行う。また、数理モデルについても、孢子体型、配偶体型自家不和合性双方について解析を進める。

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

高橋佑磨、斉藤京太(千葉大学)、坪井助仁(ルンド大学)

【研究目的・背景】

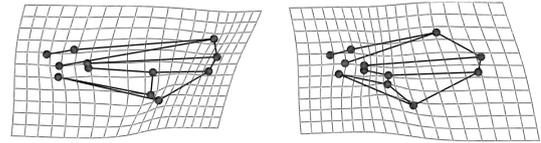
われわれは、生命現象のさまざまな階層で表現型のばらつき(不均一性)を認識することができる。比較的大きなスケールであれば、ある科内の属間での形態的変異や、ある属内での種間の形態的変異がある(=大進化的差異)。少しスケールを落とすと、ある種内の集団間での形態的変異(=小進化的差異)や、ある集団内での個体間の遺伝的な変異(=standing variation/遺伝的多型)を認識することができる。さらに、エピ遺伝的な変異にも目をやると、同じ遺伝子型内での環境による表現型変異(=表現型可塑性)や、遺伝でも環境でも説明のできない発生上のランダムな表現型変異(=発生ゆらぎ)がある。一方で、ふつう、各形質の表現型は別の形質の表現型と相互作用しながら適応度に影響を与えるため、「適応的な表現型の組み合わせ」を達成するような遺伝的なシステム(たとえば、遺伝子ネットワークや多面発現効果)が進化の過程で獲得されることが知られている。このような選択圧は、相関選択と呼ばれる。また、ひとたび表現型相関が達成されると、取りうる表現型の組み合わせが制限され、結果として、突然変異の方向性や大進化の方向性などのさまざまな表現型変化の方向性を制約する可能性が、近年指摘されるようになってきた。多次元の形質空間上では、standing variation のベクトル(方向性)と突然変異のベクトル、大進化のベクトルとが類似した方向を向くことも実証的に示されつつある。一方で、あらゆる階層の表現型のばらつきを統合するという観点からいえば、上述のベクトルと、発生ゆらぎのベクトル、表現型可塑性のベクトル、小進化のベクトルなどがどのような関係にあるのかが検証されなければならない。そこで本研究では、ショウジョウバエ類を対象に、各階層において、多次元形質空間に表現型のばらつきのベクトル、すなわち、発生ゆらぎ(f_{\max})と表現型可塑性変異(e_{\max})、standing genetic variation(g_{\max})、集団間の小進化的多様性(p_{\max})、大進化的多様性(d_{\max})を推定するとともに、各階層の変異のベクトルの整列性を検証することを目的とする。

【2020 年度研究進捗状況】

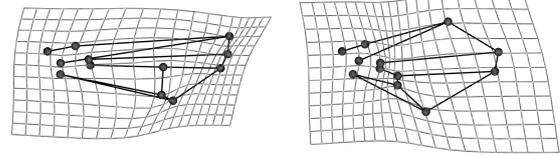
本年度は、ショウジョウバエ類の翅の 12 点の相同なランドマークを形質、また各ランドマークの x 座標と y 座標を表現型値として解析を行なった。上述のベクトルを定量・比較したところ、 d_{\max} と g_{\max} 、 e_{\max} は互いによく似たベクトルであった(互いの変異最大ベクトルがなす角が 10° 未満)。一方で、 f_{\max} はこれらとは異なるベクトルであることがわかった。これらの結果は、 d_{\max} 、 g_{\max} 、 e_{\max} は共通の遺伝的制約によって進化的あるいは発生上拘束されていることを示唆している。また、 f_{\max} は、そ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。



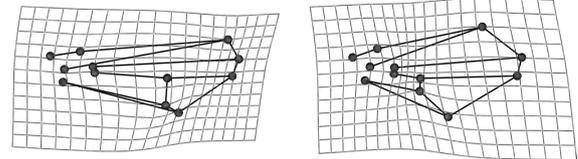
d_{max}
種間バラツキ



g_{max}
種内バラツキ



e_{max}
可塑的バラツキ



【2021 年度研究計画】

今後は、全国の複数の地点でサンプリングを行なうことで、小進化のベクトル(p_{max})をするとともに、複数種あるいは複数系統を用いて解析することで各ベクトルを高い精度で推定する。これらのデータを用いて、下位階層から上位階層のベクトルの予測性を検証する。また、理論的に可能なさまざまな翅形態と実在する翅形態を用いた流体力学的解析を通じて各ベクトルの相関性の背景にある相関選択を生み出す適応度地形を推定するとともに、実際に起きた進化の過程やその結果としての生じる階層間でのベクトルの相関の成立機構を議論する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

現在行なっているランドマークベースの解析は、同一の(=相同な)ランドマークをもつ生物にしか拡張することはできない。実践的には、属間の比較を超えるような高次の表現型変異の比較において、ランドマークベースの解析は無力である。そこで、領域内の支援を受け、トランスクリプトームベースの解析を計画している。すなわち、各相同遺伝子を形質、各遺伝子の発現量を表現型として、多階層・超多次元で表現型分散のベクトルを推定し、各ベクトルの方向性を比較するための方法論の確率を目指している。その第一歩として、遺伝子発現プロファイルに関する e_{max} と g_{max} を行ない、その整列性を検証する。

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)

【研究目的・背景】

脊椎動物は、同一セットの顔面原基の量的な曲げ伸ばしと組合せで顔面形態を作っている。これまでに、哺乳類でない羊膜類に比較し、現生哺乳類では顔面原基の組合せが大きくシフトしていることを示した。では、この哺乳類特徴的なパターンを作った発生上の機構は何だろうか。また哺乳類に至る系統でだけ同パターンが成立した理由は何だろう。あるいは、他の羊膜類でも実は類似したシフトが起こっている可能性はないだろうか。本研究では、顔面形成期の哺乳類胚では、眼胞のサイズが他系統では顔面形成が破綻してしまうほど明らかに縮小していることにも着目し、「眼胞や脳も含め、羊膜類各系統での特有な顔面原基の形態が、発生上どこが最もダイナミックに変化することで生じるのか」「同一種内で揺らぎうる原基のサイズはどの範囲か」「例えばニワトリの眼胞を縮小するなど人為的な摂動を与えたとき、周囲の顔面原基と連動した変化によって哺乳類型に近づくかどうか」を定量的に検証し、羊膜類顔面のプロポーションを作る法則性や進化可能性についての考察を試みる。

【2020 年度研究進捗状況】

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的骨格(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的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。

【2021 年度研究計画】

前年度ではうまく進められなかった、マイクロ CT スキャンを用いた胚頭部の定量化をおこなう。咽頭胚から顔面原基どうしが結合し顔面形態が作られるまでの発生段階を通じてマイクロ CT スキャンで胚顔面を撮影。各顔面原基や眼胞や脳胞を三次元で定量し、「発生のどの段階でどの部位がどのくらい増大するか」を示し、互いの顔面形態の差を生む時期と部位を定量的に明示する。8 月頃にはスッポンの産卵シーズンとなるので、ここでスッポン胚を購入し、マウス、ニワトリ、スッポン胚で比較をおこなう。哺乳類と"爬虫類顔"の間でもっとも変更の大きい部位と時期に着目して摂動を加え、その結果として顔面の形態がもう一方の系統に近づくかどうかを検証する(例えば、眼胞のサイズ変化が両者の間で最も大きく異なる場合、ニワトリの眼を縮小して哺乳類顔に近づくかどうかを検証する)。

RNA の構造揺らぎの大きさから進化しやすさを予想し制御する

市橋伯一(東大総合文化)、前田祐太郎(東大総合文化)、上浦六十(東大総合文化)

【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。近年我々は、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)を構築した。RNA の場合、遺伝型(RNA 配列)から表現型(RNA 構造)とその揺らぎまでを計算することができる。したがって、進化による配列変化が表現型とその揺らぎをどう変えたかを曖昧さなく理解することができる。さらに配列をデザインすることで、揺らぎの大きさを自由に変えることもできる。したがって、この系は揺らぎ応答理論の検証のために理想的な実験モデルとなっている。今回の研究提案では解析対象を進化実験中に現れたすべての RNA (64 種類)へと拡大する。そしてさらに 1 歩踏み込んで、揺らぎ応答理論に基づいて進化のしやすさを予想し制御できるかを検証する。これができれば、進化はこれまでのようにただ観察するのではなく、予想と制御が可能なものとなるだろう。

【研究進捗状況】

揺らぎ応答理論に基づくと、進化が進むほど RNA の構造揺らぎが小さくなることが予想される。2020 年度では、進化途中のすべての RNA (64 種類)について構造解析を行いこの予測が正しいかを検証した。その結果、確かに進化が進むにつれて揺らぎが減少する傾向があることを見出した。この結果から、揺らぎが大きい方が進化可能性が高い(=適応的な変異が多い)のではないかと、という仮説を立てた。つまり、揺らぎが大きいほど改良可能な部分構造が多く、ゆえにそこを良くするための適応的な変異が見つかりやすいということである。この仮説は、揺らぎの大きな RNA と揺らぎの小さな RNA について適応的な変異の頻度を比較することで実験的に検証が可能である。実際に我々は、進化途中に現れたいくつかの RNA について、揺らぎの大きさと適応的な変異の頻度(進化可能性の大きさ)に相関があることを見出した。さらに現在、進化途中に現れた RNA ではなく、人為的に揺らぎの大きさを変えた約 10 種類の RNA を構築し、それらが持つ適応変異の頻度についての測定(大規模解析班の支援による)を行った結果、揺らぎが大きいものほど適応変異が多い傾向にあることを見出した。この結果は、揺らぎを変えることで適応変異の頻度を制御できる可能性を示している。また、これまで構造揺らぎの大きさは計算で予想していたが、近年開発された SHAPE-MaP という RNA の構造依存的ラベルと次世代シーケンスを組み合わせた方法を用いると、揺らぎの大きさを実験的に測定できる可能性が出てきた。この方法についても現在検討しており、その現状についても報告したい。

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(東工大)、畠山哲央(東大)

【研究目的・背景】

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。ゲノム倍数化と進化との関係について、有名な仮説として大野乾によって提唱されたゲノム重複説がある。これは、ゲノム重複により冗長性が生じ、正常な遺伝子を保持したまま、コピー遺伝子を改変でき、新規形質の進化が促進されるという仮説である。他方、Fisherの基本定理によれば、進化における適応度の増加率は、適応度の分散に比例する。しかし1細胞あたりのゲノムコピー数が多い状態では、1つのゲノムに変異が入っても、その他の正常コピーによってその効果が弱められるため、変異の効果が表現型として現れにくい。したがってゲノム倍数化により進化速度は遅くなる。本研究では、この二つの概念を統合して、ゲノム倍数体の進化を実験生物学により定量的に捉え、ゲノム倍数化と進化に関する普遍的な原理の解明を目指す。

【2020年度研究進捗状況】

(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。

【2021 年度研究計画】

これまでの結果より我々は、同時に複製されるゲノムの数が揺らぎ、複数のゲノムが同時に複製されると不均一性が保たれ、ゲノム重複による新規形質の獲得が起こるのではないかという仮説を立てた。すなわち複製システム自身の揺らぎにより、選択的にゲノムを遺伝し進化速度を速くする状態と、ゲノムの不均一性を高め新規形質の獲得を促す状態がシフトする。本年度はこの複製システムの揺らぎを人為的に変動させ進化可能性に与える影響を解析する。また、人工進化実験と理論を併用することによりゲノム遺伝の選択性とゲノム間の不均一性、そして進化速度の関係を明らかにする。

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)

【研究目的・背景】

本研究は、ヒトに固有な重複遺伝子である NOTCH2NL (N2NL) のレパートリーに見られる個人間の「揺らぎ」が、短期的時間スケールにおいては人類集団に脳発達の「揺らぎ」を生み出し、より長期的時間スケールにおいてはヒトの認知機能の進化を方向づけた可能性を検証する事を目的とする。脳発生において個々の神経幹細胞は、同一ゲノムを持ちながら、増殖やニューロン分化について一定の幅で「揺らぎ」を持ったふるまいをし、結果として脳全体のニューロン数は種ごとに決まった数になる。申請者はヒト固有遺伝子 N2NL を発見し、N2NL が神経幹細胞の「揺らぎ」をシフトさせることで大脳皮質ニューロンを増やし、脳容積の拡大進化を駆動した事を明らかにした (Suzuki *et al Cell* (2018))。N2NL 遺伝子はヒト進化過程において NOTCH2 遺伝子の一部が重複することで誕生し、さらなる重複により4つのパラログが生じた。パラログの一次配列やコピー数に個人差がある事から、進化的に新しい N2NL 遺伝子は今なお進化の途上にあり、脳発達を制御する事により「認知機能における個人差」という表現型の揺らぎを生み出している可能性がある。本研究では、人類集団中の N2NL 遺伝子レパートリーの全体像を把握し、個々のパラログ・バリエーションが神経幹細胞の「揺らぎ」に与える影響を統合的に明らかにする事を目的とし、N2NL 遺伝子レパートリーがヒト脳進化をどのように方向づけているのかを評価する。

【2020 年度研究進捗状況】

ヒト神経幹細胞由来サンプルを用いたロングリードシーケンサーによるトランスクリプトーム解析を終え、発達期大脳皮質において発現する N2NL 遺伝子レパートリーを明らかにした。具体的にはオルタナティブスプライシングによる C 末端領域の多型と、糖鎖修飾パターンに差異のあるアミノ酸残基の多型を見つけている。糖鎖修飾部位の多形については機能解析を進めており、たった1アミノ酸置換により細胞内局在パターンが変化することや、Notch シグナルのリガンド分子との相互作用の様式に違いがあることを見出している。さらに、マウス胚大脳皮質における強制発現実験から、当該アミノ酸残基の多型が神経幹細胞の維持活性制御に重要な関わりを持つことを見出している。

【2021 年度研究計画】

すでに発見している N2NL 遺伝子レパートリーの大脳皮質発生における機能解析を進めるとともに、さらなるロングリードシーケンサーを用いた解析により新たな N2NL 遺伝子の探索を行い、脳発達過程とヒトの多様な疾患状態の脳組織における発現パターンを明らかにする。加えて、個々の N2NL 遺伝子の人類集団中におけるアレル頻度やコピー数の「ゆらぎ」や疾患との関連性、そして進化解析を進める。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

本研究はヒト固有 N2NL 遺伝子について、ゲノムレベルから個体レベルの多様なアプローチを用いて解析を行う。本領域の多様なバックグラウンドを持つ皆さんからのインプットにより研究を発展させていきたいと考えている。

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）

【研究目的・背景】

多くの細菌は、運動器官として細菌べん毛を持つ。また、病原性大腸菌 O-157 やサルモネラ属菌などの腸管病原性細菌は、病原性タンパク質注射装置「III型分泌装置」を持つ。両者は、自分自身の細胞外構造を構築するために構成タンパク質を細胞外へと分泌する。構造構築後、細菌べん毛はスクリーンのように回転し、水中を泳いだり、粘液表面を這うために使われる。一方で III 型分泌装置は、宿主細胞表面に穴をあけ、細菌側から宿主細胞内へと注射器のように病原性タンパク質を撃ち込む。両者は、起源を同一とする細胞小器官であると考えられている。細菌べん毛の起源は非常に古いと考えられている一方で、III 型分泌装置は、哺乳類などの宿主生物の出現以降に比較的新しくべん毛から進化し、病原性分泌装置としての新規形質を獲得したものと考えられている。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。

【2020 年度研究進捗状況】

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。

【2021 年度研究計画】

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。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

本年度は特になし。

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)

【研究目的・背景】

配偶者選好性の分化は種分化の重要な一步である。一方、配偶者選好性は種内でもばらつく。この種内レベルの揺らぎから、どのように種間で分化した配偶者選好性が生じるかは、生物の進化を理解する上で重要な命題である。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。この揺らぎからどのように種間の分化が生じるのだろうか？本研究では、ごく近縁でありながら単一フェロモンへの選好性を逆転させた姉妹群であるキイロショウジョウバエ(キイロ)とオナジショウジョウバエ(オナジ)、また両者の F1 雑種を用いてこの問いに答える。

【2020 年度研究進捗状況】

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 2020 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システムに関しては、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。

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。

【2021 年度研究計画】

神経接続の比較に関しては、2020 年度に得られた attP 系統を系統化し、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。全ての系統が確立できたら、雑種における喪失が示唆されている神経接続についての種間比較を行う。

味覚ニューロンによる求愛抑制については、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。具体的には

光遺伝学ツールによる神経活動操作や、カルシウムイメージングによる神経応答特性の解析を行う。神経活動抑制を行うツールはまだ確立されていないため、必要に応じて作成する。カルシウムイメージングのツールはすでに入手している。

これまでの研究成果から、「神経ネットワークにおいて揺らぎにくい経路は進化的に保存されやすく、揺らぎやすい経路の進化によって配偶者選好性の進化が実現されるのではないか」という可能性が浮上した。もしこれが正しいければ、神経ネットワークの揺らぎは進化の方向性を規定しうることになる。そこで、神経接続の進化的保存性と揺らぎやすさが相関するかを検証するため、外的摂動を与えたハエの神経接続の強度を定量し、各経路でそのばらつきを比較する。摂動にはハエの配偶者選好性を変化させることが知られる交尾経験を用いる。摂動を与えたハエを解剖し、GRASP法により神経接続の強度を推定、比較する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

オンラインミーティングにおいて、総括班による助言を頂いた。

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)

【研究目的・背景】

私たちの体は前後軸に沿って正しい位置に器官が配置されることで機能的な体として成り立っている。脊椎動物において、体の前後軸パターンは発生中に将来の脊椎骨となる体節に発現する Hox 遺伝子群によって領域分けされ、それぞれの体節レベルに特定の器官が形成されることで、秩序だった体の構造(椎式など)が完成する。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。

【2020 年度研究進捗状況】

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。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。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。

【2021 年度研究計画】

現在、*Gdf11* の発現が個体間でどれだけゆらぎが大きいかを調べるために、当研究室で数十年近交系として交配を続けている GSP 系統のニワトリの単一のオスとメスを、人工授精により交配し、有精卵を採取している。この有精卵から胚を採取し、*Gdf11* の発現が開始される 10 体節期のステージにおける *Gdf11* の発現量のゆらぎを RT-qPCR を用いて明らかにする。この時に *Gdf11* とともに、発現量の個体間のゆらぎの程度を比較するために Hox 遺伝子や、ハウスキーピング遺伝子など複数の遺伝子の発現量と比較する。これらの遺伝子を既存の RNA-seq のデータから複数抽出し、ゆらぎを比較するための検討対象とする。

これまでの研究で、Hox11 遺伝子群の中で *Hoxa11* 遺伝子の発現が最も前側の体節で見られることが明らかになっている。現在 *Hoxa11* 遺伝子を前体節中胚葉の前側まで発現領域を拡大させる実験を行っている。この胚において仙椎の領域が前側にシフトするのかを骨染色により調べる。

現在計画班とともに、シマヘビの全ゲノム解読を行っている、2020 年度にシマヘビ胚を用いた ATAC-seq を行っているので、2021 年度の前半にシマヘビのゲノム解読を追えて、ATAC-seq のデータをマッピングし、仙椎の位置のゆらぎが大きいシマヘビの *Gdf11* と *Hoxa11* 遺伝子のエンハンサー候補領域を探索する。得られたエンハンサー配列をニワトリやマウスと比較し、遺伝子発現がゆらぎやすい分子メカニズムを解明する。昨年度までに種を越えて保存された *Gdf11* のエンハンサー領域を2つ発見したので、種間でのエンハンサー活性のゆらぎやすさを調べる。

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 (理化学研究所)

【研究目的・背景】

生物は内部にも外部にも複雑なネットワークを有する階層構造の中に存在し、生物の進化はこの内部構造による制約と、外部生態系での選択圧の両面に制限される。よって進化の理解には階層をまたぐ必要があり、異なる階層を同じ理論で記述できれば大きく前進する。生物の階層において内部構造制約を表現する「揺らぎ応答理論」があるが、原理的には生態系においても、短期的な揺らぎと長期的な変化には同様の関係がありえる。この理論が生態系レベルにも適用可能なら、生物の上下の階層をまたぐ進化の理解が飛躍的に進歩するだろう。また人類の緊急課題である生態系変化の理解と予測も躍進する。本研究では、揺らぎ応答理論が生態系レベルにも適用可能かを実験的に明らかにする。これまで、実験生態系の自発的な変化について揺らぎ応答関係を調べたが、明示的な関係は観察されなかった。そこで本研究では、摂動実験と進化実験により、揺らぎ応答関係を解明する。

【2020年度研究進捗状況】

(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°C上昇の3通り)を与えた。結果、どの生態系も5°C以下では有意な変化は見られなかったが、10°C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。

【2021年度研究計画】

(4) 揺らぎ応答関係の解析: 初年度の実験結果から、摂動実験でも進化実験でも、揺らぎによって観察された制約と同じ方向に変化した生態系と、そうでない生態系があることがわかっている。これらがなぜなのかを解明することで、理解を得る。なお、生態系の群集動態を記述する数理モデルにより、この制約の有無は再現できている。すなわち、理論的にその特徴を得ることができると考えている。

(5) 生態系内の生物の進化の解析: 初年度の実験結果から、進化によって有意に表現型が変化すると示唆される生物種を単離し、凍結保存することができている。よって、これを祖先株と比較する。またゲノム配列の変化を解析する。これら各生物種の進化による変化が、(4)においてみられるような生態系全体の変化とどのように結び付けられるか、その解析にも挑戦する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

古澤班と進化および揺らぎ応答関係の議論を行った。金子班と多階層の議論を行った。守屋班と人工生態系の改良について議論し、いただいた酵母の株をもちいて新規系の構築を行っている。

発現量揺らぎ—適応系により探索する発現変動の適応—進化への影響

佐伯望、山本智絵、榎本玲菜、守屋央朗 (岡山大学)

【研究目的・背景】

細胞内のタンパク質には、発現量の変動が強い制約を受けているものと、制約をあまり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—ADPOT 系により、

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。

【2021 年度研究進捗状況】

これまでに高温や高塩 (NaCl) などの条件で ADPOT 実験のデータを取得してきた。今回はこれに加え、乾燥、凍結融解、活性酸素存在下、熱ショックストレス、低グルコース、定常期などの新たな条件での ADOPT 実験を行った。これまでに、高温・高塩における ADOPT 実験により取得された適応的遺伝子が、シビアな環境下で酵母が増殖するために自然界では与えられているが実験室酵母では不足している遺伝的／環境的要因を明らかにすることが見えてきている (実験室酵母補完計画)。本年度 ADOPT 実験により得られた、活性酸素条件、熱ショックストレスに適応的な遺伝子はこの可能性をさらに強めるものであった。「補完計画」に与する遺伝子は、実験室環境で与えられていない酵母が必要としている要因を指示する、機能既知の遺伝子群であった。一方で、これまで機能があるか不明だった複数の「新興遺伝子」が ADOPT 実験により取得されている。これらの新興遺伝子は既存のシステムに外挿する形で酵母の環境適応に進化可能性を与えるのかもしれない。

【今後の研究計画】

2021 年度は、特に ADOPT 実験の結果を論文としてまとめることに注力し、研究の質を向上させるような仮説検証実験に注力する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

大規模解析支援班により ADOPT 実験のナノポアシーケンス解析、適応的遺伝子を過剰発現している細胞の RNAseq 解析の支援を受けている。

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)

【研究目的・背景】

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。特に胚発生においては、はじめはひとつの細胞(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ることで種特有の体制を作り上げていく。これまでの研究から、胚発生においてはモルフォゲンの濃度勾配による位置情報の供与によって胚の極性が確立することなどが示されてきた。では、このような細胞集団の秩序立っ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においてどの程度変化しうるものなのだろうか?本研究課題ではゼブラフィッシュ胚から作成される細胞塊を用いて、自己組織化過程における細胞の振る舞いと極性の確立について、特に細胞のゆらぎや細胞/細胞集団における物性的性質に着目してその関係性を明らかにする。

【2020 年度研究進捗状況】

ゼブラフィッシュを用いた自己組織化細胞塊の作出については、近年2つの研究グループから報告された(Fulton *et al.*, *Curr Biol.* 2020, Schauer *et al.*, *eLife* 2020)。前年度ではまず、これら先行研究において用いられている方法を追試し、実験系の確立を試みた。その結果、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。自己組織化するかの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。

【2021 年度研究計画】

前年度では自己組織化過程における一細胞レベルの挙動を追跡できる実験系を確立することができたが、使用するレポーター (**kaede** を用いた **photoconversion**) の性質から、イメージングを2時間程度までしかおこなうことができなかった。本年度ではより長時間、特に自己組織化が形態変化により確認できる5時間超のイメージングをおこなえるよう条件を検討する。現在までにいくつかの条件を検討し、良い条件を見つけつつある。これにより自己組織化が観察される際の個々の細胞の挙動を追跡し、前年度では捉えることができなかった形態変化(腔の形成、後端部の伸長)におけるその特徴を定量的に解析する。

また、自己組織化の結果、後端部において中内胚葉が分化することが先行研究において報告されている(Fulton *et al.*, *Curr Biol.* 2020, Schauer *et al.*, *eLife* 2020)。これらは *in situ* hybridization 法などによる固定胚における解析であることから、自己組織化過程においてどのように中内胚葉が分化するかについては不明な点が多く残されている。そこでトランスジェニック系統の利用やプラスミドの導入により中内胚葉を可視化することで、自己組織化過程における中内胚葉の分化の様子を観察する。

in vitro における自己組織化という現象は多くの生物種において観察されているが、その進化的な意義は不明な点が多く残されている。この点に取り組むために、初期発生の特定の段階で細胞が解離し、発生が進んだのちに細胞が集合、自己組織化し体軸が形成されるという特殊な発生様式をもつ真骨魚類のノブランキウス属に着目する。この種の正常発生における遊離細胞の挙動、自己組織化過程、中内胚葉の分化過程をゼブラフィッシュ自己組織化細胞塊と比較する。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

とくになし

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)

【研究目的・背景】

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 年度研究進捗状況】

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。

【2021 年度研究計画】

(1) 稚魚～幼魚期におけるトランスクリプトームのゆらぎの定量的解析

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を定量的に計測するため、同一卵塊から得られた孵化直後の稚魚から孵化後3ヶ月の幼魚まで、異なる餌条件、温度に曝露し、RNA シークエンスを行う。稚魚は全身サンプル、幼魚は脳、鰓、肝臓サンプルを用いる。トランスクリプトームのゆらぎに、イトヨとニホンイトヨで違いがあったステージ／環境条件／組織について、淡水進出年代の異なる2つの淡水型を用いて同様にトランスクリプトームのゆらぎを定量する。

(2) 繁殖形質に関連する遺伝子発現のゆらぎの違いを生む遺伝基盤解析のためのシングルセルマルチオーム ATACseq + RNAseq 解析、eQTL + cQTL 解析

これまでの私たちの研究から、淡水型で見られる日長応答性(ゆらぎ)の喪失に甲状腺刺激ホルモン

TSHB2 の発現量変化が中心的な役割を果たすことが明らかになってきた (Ishikawa et al. in prep)。祖先的な海型集団では、TSHB2 が日長条件に依存して繁殖のオンオフを切り替えるスイッチとして機能し、多数の繁殖形質に日長応答性をもたらす一方、淡水集団では、複数の集団で短日条件での TSHB2 の高発現が失われ、早春や初冬にも繁殖できるようになっていた。では、繁殖の日長応答性に関わる多くの遺伝子の中で、なぜ、TSHB2 が何度もその日長応答性(ゆらぎ)の喪失に中心的な役割を果たしてきたのか？これを明らかにするためには、TSHB2 だけでなく、繁殖の日長応答性(ゆらぎ)を担う他の遺伝子群を明らかにし、それらの遺伝子と TSHB2 の機能や遺伝子制御ネットワークにおける制御関係、遺伝機構を比較する必要がある。そこで、繁殖の日長応答性に関わる TSHB2 を含めた遺伝子制御ネットワークを同定するために、2-a) 海型集団の日長応答前後での下垂体のシングルセルマルチオーム ATACseq + RNAseq、2-b) 海型集団と淡水型集団の F2交雑個体の eQTL + cQTL 解析を行う。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

シングルセルマルチオーム RNA-seq + ATAC-seq と eQTL のための RNA-seq 解析について、大規模解析支援に申請し、支援を得ている。

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)

【研究目的・背景】

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(τ - ξ 系と呼ぶ)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 τ - ξ 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、研究を進める。

【2020 年度研究実績】

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組上に載せる状態までの一連の前処理系を確立した(Normalization 方法は模索中)。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。アフリカツメガエルに関して、シーケンスデータからゲノムにマッピングする際に、3'UTR 側の配列が登録されていない遺伝子群が存在することに気が付き、RNA 自体は抽出されているにもかかわらず、解析結果としてそのカウント数が検出できていないものが存在するという問題を抱えていた。遺伝子数としては多くないと考えられ、メジャーなものは手動補正で対応した。

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。

【2021 年度研究進捗・計画】

比較対象であるニワトリ胚四肢発生過程に対する空間トランスクリプトームデータを取得する計画である(現在 10x genomics 社の Visium キットを利用するための新鮮凍結切片作製中)。得られた結果をツメガエルデータ同様 τ - ξ 系で計測し、二種間で時空間発現パターンが保存されている遺伝子群と保存されていない遺伝子群へと分類する。また、時間座標 τ に関しては、両種の組織変形動態から「発生時刻の種間時計合わせ」によって定義されたものだが、遺伝子発現パターンの類似性に基づいた時計合わせ(τ')をすることも可能である。 τ と τ' の一致性についても解析を行う。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

大規模支援解析にて scRNAseq 解析を行うことが採択された。重信先生と進めていきたい。また、空間トランスクリプトーム解析について興味を持っている他の班員に対して、解析時の困難な点や工夫した点などの情報をシェアすることで領域に貢献したい。

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)

【研究目的・背景】

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う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変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うこととした。

【2020 年度研究進捗状況】

本研究では、ストレスに応答した個体発生の「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うこととした。

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、ニワトリ胚の枝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枝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、可塑的に発現量が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。

【2021 年度研究計画】

2021 年度は、昨年度までに遂行予定であった研究のうち、出校制限のために一部実行できなかった研究とあわせて、次の研究を遂行することとする。

(1) ニワトリ胚の指間で酸化ストレスに応答する経路の解明

ニワトリ胚を題材に、酸化ストレス酸化ストレス応答に関与する因子の阻害剤の有無による細胞死の変化や、遺伝子発現レベルの変化を解析する。

(2) ニワトリ胚の指間で ROS シグナルと Bmp シグナルが細胞死を制御する経路の解明

ニワトリ胚を題材に、ROS シグナル経路と Bmp シグナル経路が指間細胞死を促す過程で、それぞれの経路がどこで合流するのかを明らかにすることを目標とした検証を行う。

(3) (1) と (2) の経路のうち、両生類の枝芽に存在している経路を明らかにする。

ネッタイツメガエル胚発生における遺伝子制御ネットワークの揺らぎと進化

安岡有理(理化学研究所)

【研究目的・背景】

動物の胚発生期における遺伝子発現パターンの進化は、遺伝子発現を制御するシス制御配列が進化し、その配列に結合する転写因子の種類や活性が変化してもたらされると考えられてきた。しかし、遺伝子発現制御機構の進化過程を、遺伝子制御ネットワーク(GRN)の揺らぎとして、個体内あるいは種内といった短い時間スケールで定量的に捉えるような研究はなされていない。そこで本研究では GRN の揺らぎを実験的に測定し、進化との関連性を探る。

実験にはネッタイツメガエルを用い、シス制御配列、転写因子結合、標的遺伝子発現の揺らぎをゲノムワイドに測定して GRN の揺らぎを定量化する。近交系統内での GRN の揺らぎが系統間での揺らぎに反映されているのか、さらには近縁種間での GRN の進化につながっているのかを検討する。進化的保存性の異なる転写因子間での比較や、異なる発生ステージ間での比較、さらには 1 細胞レベルでの遺伝子発現の揺らぎの検出やシス制御配列の網羅的機能解析を通じて、「進化しやすさ」を支える分子基盤を明らかにする。

【2020 年度研究進捗状況】

ネッタイツメガエル初期原腸胚の 1 胚 RNA-seq 解析を行い、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* 機能阻害胚を用いて行ったところ、*otx2/5* の機能阻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。機能阻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* の機能阻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* の機能阻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* 機能阻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ぎ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。

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ケン斯拉イブラリの作成を依頼した。

【2021 年度研究計画】

Nigerian BH 系統と Ivory Coast 系統の各ステージの 1 胚 RNA-seq 解析データをさらに解析し、遺伝子発現揺らぎの系統間の違いを明らかにする。さらに WGS の結果と合わせ、ゲノム配列(特にシス制御配列)の変化と遺伝子発現揺らぎとの間の相関関係を導き出す。アフリカツメガエルのゲノム配列と

比較し、ネットアイツメガエル系統間での遺伝子制御ネットワークの揺らぎがゲノム進化と相関しているのかを検討する。揺らぎを司るエンハンサーが推定されたら、機能解析を行って実際のエンハンサー活性を調べる。

さらに細胞ごとの遺伝子発現の揺らぎを定量化するため、コントロール胚と機能障害胚をそれぞれ5つずつ別々に回収し、核を抽出して1核 RNA-seq 解析を行う。1核 RNA-seq 解析結果をもとに各細胞をクラスタリングし、機能障害によって増減する細胞集団、同一条件で発生する兄弟胚間で変動する細胞集団、細胞集団内で発現レベルが大きく変動する遺伝子などに注目する。これまでの1胚 RNA-seq 解析の結果と統合し、遺伝子発現の揺らぎを生み出す仕組みを1細胞レベルで解明する。ChIP-seq 解析の結果と照らし合わせ、どのシス制御配列が機能障害胚における細胞集団や遺伝子発現の変動に関わっているのかを検討する。細胞集団を制御するシス制御配列が見つかれば、特異的な DNA モチーフ配列、標的遺伝子との位置関係、標的遺伝子あたりのシス制御領域の数との関係、機能障害胚での標的遺伝子発現変動の大きさ(=転写因子の発現制御に対する貢献度)、標的遺伝子の胚発生中の発現パターンなどに注目して、その特徴を明らかにする。

【領域内他班との共同研究、総括班支援】

総括班の大規模解析支援を受け、大規模 RNA-seq 解析を継続して実施中である。

和製動物形態学図譜とオオサンショウウオ

倉谷 滋

今回は日本の生物学徒なら誰でも一度はお世話になったに違いない、日本の比較解剖学書を、年代を追いながらいくつか見てみよう。

まず、戸澤富壽著『動物系統解剖学』(1928年)。医学部における動物解剖実習に向け、実習書と参考書両方の機能を兼ね備えたものとして執筆されたとみえるが、(いくつか豪華なカラー図版があるものの)全編通じて図が少ないのが残念だ。医学部向けというだけあって、無脊椎動物としてサナダムシや肝臓ジストマなどの寄生虫、ヒトに付いて吸血する蚊、蚤、虱などが多く選ばれている。その一方で「だいめうばつた(トノサマバツタ)」も扱われており、この昆虫が当初から無脊椎動物解剖学の定番となっていたことが伺える(後述)。この時代ではやはりまだ文語調で書かれていて、いまの我々には読みにくい。解剖学用語には英語、独語、ラテン語が付されている。昭和になったばかりの頃の大学医学部の雰囲気が見られる。



福井玉夫&阿部余四夫著『生物学実験法講座:動物解剖学実験法』(1939年)も戦前の国産比較解剖学書である。これは大学理学部のための解剖実習書という体裁で、無脊椎動物と脊椎動物の二部構成になっているが、比較形態学の基礎事項をもつばら文章で教える教科書という方が当たっている。脊椎動物を担当した阿部余四夫博士(1891-1960)は、日本にウシガエルを移入した他、生物地理学でも知られる渡瀬庄三郎博士の弟子だった人。内容は観察記述が主体で、標本作製の方法までは述べられていない。したがって、「生物実験法」の

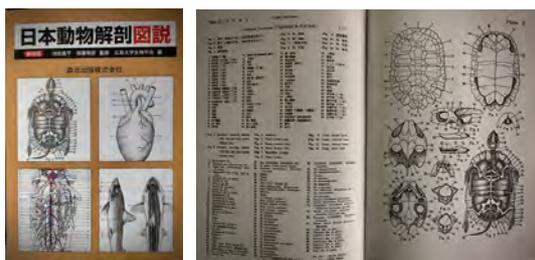
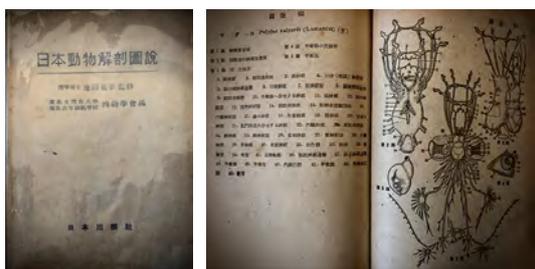
一環のように見えないが、「.....屁理屈はやめにして實見即ち實物を見るという意味に解して置く」とされている。



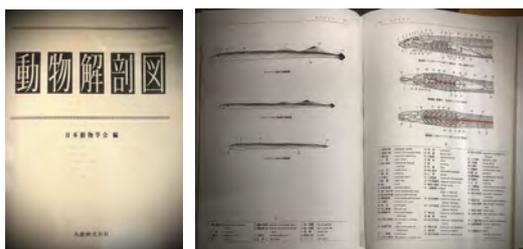
脊椎動物については、圓口綱、魚綱、兩棲綱、爬蟲綱、鳥綱、哺乳綱の順に系統解剖学的記述がなされているが、残念ながらやはり図は多くはない。とはいえ、円口類にはヤツメウナギとヌタウナギが扱われ、両者の内耳構造が比較されているので、ポイントは押さえられている。魚綱では軟骨魚類と真骨類がまとめて扱われている。昆虫の代表としては再び「ダイミヤウバツタ(トノサマバツタ)」が扱われている。そういえば、1960年代の図鑑で「ダイミョウバツタ(大名飛蝗)」の名を見たことがあったようななかったような.....。

戦後の教科書として、博物學會編、池田嘉平監修『日本動物解剖圖説』(1947年)。広島文理科大学の池田嘉平博士は当時の博物学会会長である。やはり終戦直後は物資不足だったのだろう、紙質は悪い。実際、森銚三十柴田宵曲共著のエッセイ集『書物』にも、その頃の状況が述べられている。しかも、広島に投下された原爆のため、この図説の編纂に携わっていた幾人かの命とともに多くの図版原稿が失われたという。しかし関係者の苦労のおかげで、解剖学図説としては図版が充実し、これ以前の類書よりもはるかに使いやすく分かりやすいものとなった。とくに、本書の最初に扱われている「ラット」と「ハト」については、そのまゝいまでも十分学生実習に使える。無脊椎動物についても同様であろう。ちなみに、「ダイメウバツタ」はここでも健在(かな綴り

の変遷が気になる)。本書冒頭にあるように、手引書と図譜を折衷したようなつくりで、両者の短所を補うべく工夫されている。すでに見たように、日本では満足のいく動物解剖図譜が少なく、それを打開する志をもって出版されたと覚しく、それは確実に報われている。この方針のものはこれ以降いくつか出版され、後に述べてゆくようにそこには日本動物学会も関わっている。欧米のものと同様、実習の便宜を指向したもので、多くの教官や学生が確実に恩恵を被った。ありがたい話だ。



今でも入手可能な版は、池田嘉平&稲葉明彦監修・広島大学生物学会編『日本動物解剖図説』(1971年版)である。本来このような形で出版されるはずだったと考えるべきなのだろう。巻頭カラー図版付き。比べてみると分かるが、驚くべきことに1940年代の版とまったく同一の図版がすべて使われ、加えられた新しい図版はわずかなのである。上にも書いたように終戦当時は紙質が悪く、せつかくの美しい描画も満足に印刷できなかつたようだ。最初からここまで見事な図が用意されていたことにまず感激する。



丸善から出版された図譜、日本動物学会編『動

物解剖図』(1990年)は、驚くほど多くの動物を扱っている。マウス、クサガメ、キンギョ、アメリカザリガニあたりは定番かも知れないが、シロボヤ、オカダンゴムシ、チョウセンウスヒラムシなどは珍しいかも知れない。本書の執筆には多くの会員が関わり、編集委員は小林英司、川島誠一郎、小黒千足、笹山雄一(敬称略)。こういった書籍はいつでも入手可能であって欲しい。解剖図譜はあまり内容的に改訂される必要はなく、むしろ溢れ出んばかりの情報がいつでもアクセス可能になっていることが重要。それが形態認識を目指すからには、やはり線画で見たい。写真がリアルであることは、この際あまり意味を持たない。

上に紹介したのは、すべて実習での参照を目指した入門編。解剖図譜とはそもそもそういったものである。これ以上のレベルで個別的研究に役立てようと思ったら、特定の動物種に焦点を当てたモノグラフを入手するしかない。例えば、大沢岳太郎 Gakutaro Osawa の著になるオオサンショウウオの解剖学論文はその一例にあたるといえる。それもまた日本の形態学の快挙というべきだろう。



ちなみに、大沢博士の論文 (Beiträge zur

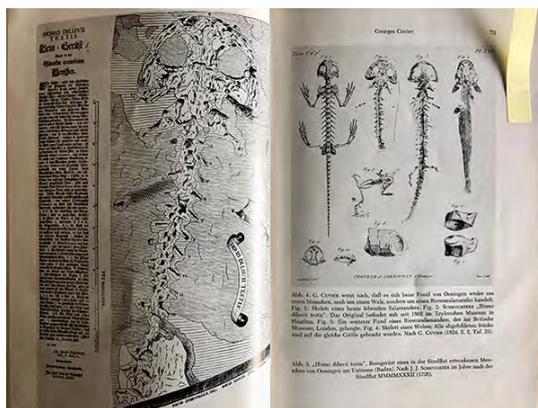
Anatomie des japanischen Riesensalamanders、東京帝國大學医学部紀要、明治 35 年) にアクセスするには、それを収録した生駒義博 Yoshihiro Ikoma 編『日本ハンザキ集覧 : Giant Salamander』(1973 年)を見るのがいい。むろんハンザキとはオオサンショウウオ *Andrias japonicus* の別名。学名は十数回変わった。そしてオオサンショウウオと言えば岡山県だが、津山市には「津山科学教育博物館」があり、そこに特大サイズの標本が陳列してある。むろん日本ではハンザキ研究の伝統があり、日本動物学の基礎を築いた石川千代松博士もハンザキ学者として有名である。いま私が所有するこの本は知り合いの先生から譲り受けたもの。じつは私には思い出深い論文だ。かれこれ 30 年以上も前になるか、この論文のコピーを後輩に頼んだことがある。琉球大学に赴任した当初オオサンショウウオの解剖を始めようとしていて、その基礎資料として必要となったのだ。ありがたいことに彼女はコピーの図版に色鉛筆で着色までしてくれたのだが、結局この動物について論文を書くことにはならなかった。岡山大学に赴任したときにも別のチャンスはあったのだろうが、それを活かすことはなかった。

思えば、オオサンショウウオとはことあるごとにニアミスを繰り返し、そのかわりに縁深い動物となったのがカメ類と円口類だったということになる。だから場合によっては、オオサンショウウオの進化と発生に関して何か面白い研究ができたのかも知れない。それは、過形成 *hypermorphosis* とか、あるいはヘテロクロニー *heterochrony* の問題だろうか。本書にはこの他、シーボルト Philipp Franz von Siebold の『日本動物誌: Fauna Japonica』(天保 9 年, 1833) や、『和漢三才図会』、『本草和名』などにおける記載も収録されており、見ているだけで滅法楽しい。カレル・チャペックやジョイヒツァー、キュヴィエとの関わりを思うと一層感慨深い(注)。

注：かつてリポポート社から出版された荒俣宏の「Fantastic Dozen」シリーズは、単なる博物趣味を超え、著者が「目玉の大冒険」と呼ぶ図像を介した英知の歴史を概観しようと目論まれた一種の図像学集大成の趣をなすが、なかでも第 2 巻「神聖自然学」はかなり貴重な出版物だったのではないかと密かに思っている。18 世紀の学者、ヨハン・ヤーコプ・ジョイヒツァー (Johann Jakob Scheuchzer 1672-1733) は、聖書の記述を科学的に説明

しようと、この『神聖自然学 (Physica Sacra : 聖なる自然)』を著した。そのなかの一部、「創世記」においては、当時信じられていた前成説に従い、徐々に大きくなる骨格だけの男が最後に内臓を取り込み、皮を被って完成するさまが描かれる。神による創造と生物学的現実としての発現現象が整合的に(?) 比べられていると私は勝手に解釈しているが、本当のところはよく分からない。

旧約聖書の「出エジプト記」では「埃からブヨが生まれた」と記述されたが、たしかにこれを遡るアリストテレスの頃から無脊椎動物は自然発生すると信じられていた。交配によって繁殖するのは、脊椎動物だけだとされていたのである。一方でウィリアム・ハーヴェイ William Harvey やヤン・スワンメルダム Jan Swammerdam の研究も当時はあったが、それは取り入れられていないらしい。つまり、これは当時の科学的解釈のうち、聖書の記述と合致する部分を体験する道標ともなりうる。荒俣氏によれば、「神聖自然学」執筆の切掛けになったのは、ジョイヒツァー本人が報告したオオサンショウウオの化石だという。ジョイヒツァーはそれを洪水で死んだ古代人のものと論じたが(「ノアの洪水の証人」)、1811 年に動物学者キュヴィエ (Georges Cuvier) が正しくオオサンショウウオと同定、ジョイヒツァーに敬意を表し「アンドリアス・ジョイヒツェリ・テュディ」の学名を与え、後に日本にそれが生き残っていることが発見された。これに触発されたチェコのカレル・チャペック (Karel Čapek) が、のちに名著『山椒魚戦争』を執筆したのである。



当時の先端科学から膨大な資料を引用して聖書を実証しようとしたジョイヒツァーの精神には、世界全体の記述を目指したアタナシウス・キルヒャーのそれにも通ずるものがある。が、知識の殿堂はしばしばそれを支えるに足る強大な支柱を持たないことが多い。それでも、巨大な伽藍を創ろうとする情熱だけは消えることがない。比較形態学などその典型ではないかと思うことがある。Emil Kuhn-Schnyder による 1969 年の論文『Georges Cuvier 1769-1832』(上図) には、ジョイヒツァーによるオオサンショウウオの記述(左: *Homo diluvii testis*, 1726 年)と、キュヴィエによる動物学的記載(右: 1824 年)がある。後者においては、ジョイヒツァーの記載した際の図版が現生のサンショウウオの骨格とともに並べられている。

初出: 「Facebook 衝動的に書籍紹介」(2020-21 年)

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 5 No. 3

発行：2021年7月1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/>