



表紙 (上)ゼブラフィッシュ成魚胸鰭骨格(Arizalin Red染色)。(下)発生中の胸鰭鰭条。左からprx:EGFP;  
Arizalin Red staining; Blood vessels (fli1) + osterix:DsRed (一部に疑似的色転換処理した)。  
(東北大学 田村宏治)

# 目次

領域代表より	倉谷 滋	1
第4回領域会議、第2回大規模解析情報交換会、第2回理論情報交換会 開催プログラム 於 理化学研究所・生命機能科学研究センター C棟1F オーディトリウム(兵庫県神戸市) 2018年7月19日(木) 1日目		
10:30~12:00 第2回大規模解析情報交換会	重信秀治	2
13:20~13:30 領域代表始めの挨拶:倉谷滋		
座長:古澤 力		
13:30~13:50 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	4
13:50~14:10 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	入江直樹	6
14:10~14:30 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	7
座長:金子邦彦		
14:30~14:50 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	8
14:50~15:10 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	9
15:10~15:30 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	11
15:30~16:00 休憩		
座長:入江直樹		
16:00~16:20 胸鰭の鰭条本数の個体間ゆらぎ要因と種間形態多様性	田村宏治	12
16:20~16:40 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	14
16:40~17:00 「鍵と鍵穴」の進化を解く: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	15
座長:長谷部光泰		
17:00~17:20 深層ネットワークを援用した表現型制約と表現型進化原理の探索と普遍構造の探求	小林徹也	16
17:20~17:40 武器と性形質進化における発生の拘束と可塑性	岡田泰和	17
17:40~18:00 骨化順序ヘテロクロニーの揺らぎと制約	小薮大輔	18
18:00~20:00 情報交換会(理化学研究所・生命機能科学研究センター C棟 1F ラウンジ)		

2018年7月20日(金) 2日目

座長:深津武馬

- 9:00~9:20 酵素1分子の活性揺らぎと進化能の関係 上野博史 19
- 9:20~9:40 脊椎動物の陸上進出による新奇形質の誕生—環境変化により揺らぐ形態形成経路に迫る— 田中幹子 20
- 9:40~10:00 神経ネットワークの揺らぎは配偶者選好性の進化を規定しうるか 石川由希 21
- 10:00~10:20 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 22

10:20~10:50 休憩

座長:重信秀治

- 10:50~11:10 生態系の揺らぎ応答関係と内部進化の実験的解明 細田一史 24
- 11:10~11:30 植物感染糸状菌の共生性と病原性を規定する分子の進化論的考察 晝間 敬 26
- 11:30~11:50 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 28
- 11:50~12:10 ネット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 安岡有理 30

12:15~13:30 第4回総括班会議 C棟4FS401 セミナー室

総括班代表:倉谷

総括班分担者:入江、金子、長谷部、深津、古澤、重信

総括班研究協力者:郷通子、佐藤矩行、津田一郎、伏見譲、藤山秋佐夫

座長:倉谷滋

- 13:30~13:50 ゲノム倍数性がもたらす進化可能性~揺らぎと安定性の両立~ 大林龍胆 31
- 13:50~14:10 テントウムシ斑紋の揺らぎから探る表現型進化の制約と方向性」 新美輝幸 32
- 14:10~14:20 領域代表終わりの挨拶:倉谷滋
- 14:30~16:00 第2回理論情報交換会 古澤 力 33
- 16:00~16:30 国際活動支援について 入江直樹 34

連載エッセイ (7) 「テンペスト」に世界を見る - テクスト性の成立とボディプラン進化

倉谷 滋 35

## 領域代表挨拶

先月末には記録的な豪雨がありました。みなさま大丈夫でしたでしょうか。私は、交通渋滞に巻き込まれ、帰宅に5時間近くかかったこともあり。そしていよいよ暑い夏が始まりました。神戸理研BDRの中庭ではすでにクマゼミが啼きまくり、それを時折ヒヨドリが美味そうに啄んでいます。

異常気象は日本に限ったことではありません。先日、アイルランドはゴールウェイ(Galway)に赴き、National University of Irelandにて開催された第7回ユーロエヴォデヴォ(EED)ミーティング2018に参加しました。折しも、何時になく気温が上がり、連日30度を超す真夏日でありました。これもまた、観測史上初めてのことであったと聞き及びます。が、会場が熱気に包まれていたのは、気温のせいではなかったと思います。どのセッションも活気を帯び、常に新しい考えと手法で進化の謎に挑もうとする研究者の熱意が伝わってきました。この会議の様相については、いずれニュースレターで詳細にお伝えしたいと思います。わたしたちもこれに負けず、果敢に新しい研究に挑戦してゆきましょう。

夏は、挑戦に適した季節です。目を開き、新しい世界に飛び込むチャンスでもあります。それではみなさん、この機会を逃さず、領域会議を意義あるものにして頂きたいと思います。

倉谷 滋(理化学研究所)



## 第2回大規模解析情報交換会報告

重信秀治(理化学研究所)

第2回大規模解析情報交換会は、領域会議に先立って、2018年7月19日に開催しました。

### 【プログラム】

- 10:30-11:00 重信 秀治 (基礎生物学研究所)  
「倉谷新学術領域の大規模解析支援について」  
「次世代シーケンシング技術の最新動向(ダイジェスト)」  
11:00 - 12:00 真野 弘明(基礎生物学研究所)  
「Introduction to Nanopore Sequencing」

今回、公募班が加わって初めての大規模解析情報交換会であったため、会の前半では、前回の情報交換会と内容がオーバーラップするものの、大規模解析活動支援の概要の説明と、次世代シーケンシング技術の最新動向の紹介を、重信が行いました。

本領域は総括班に大規模解析活動支援班を設置しています。本領域が目指している進化の制約と方向性の解明のために、従来の進化研究のスケールを大きく上回る大規模なゲノム解析が想定されます、大規模解析支援班はそれらを実現するための支援を行います。第一に、次世代シーケンサーやライブラリ作製機器、計算機などの機器を整備、運用します。第二に、それらを活用した大規模解析の研究をウェットからドライまで技術支援します。第三に、書類審査を経てそれらに要する研究経費を総括班予算から支援します。班員の皆さんにおかれましては、気軽に支援班にご相談いただきたく思います。

現在の次世代シーケンシング技術は大まかには2つに分けられます。イルミナ社に代表されるショートリード型と、パシフィックバイオサイエンス(PacBio)社やオックスフォードナノポア社に代表されるロングリード型です。ショートリード型は読める DNA 断片の長さは約 100 bp と短いですが、1回のランで得られるシーケンスリード数は数億以上あり、また塩基の読み取り精度もサンガーシーケンサー並に高い特徴があります。一方、ロングリード型は、塩基の読み取り精度は低いものの(エラー率 10-15%)、得られるリード長は平均でも 10kb 以上であり、50kb 以上のリードも少なくありません。ショートリード型とロングリード型それぞれの強みと弱みを理解して使い分けることが重要です。場合によっては両方を組み合わせたハイブリッドアプローチも検討に値します。本新学術領域では、ショートリード型とロングリード型の両方のプラットフォームを整備しています。

情報交換会の後半は、支援班メンバーの真野研究員(基生研)によるナノポアシーケンシング技術の紹介でした。ロングリード型に分類されるナノポアシーケンシングはまだ荒削りながら、最近著しい性能の向上を見せており注目を浴びています。真野研究員には、ナノポアシーケンシングの原理から、実際のシーケンスとデータ解析まで、支援班が運用する機器で得た実データを披露しつつ詳しく解説してもらいました。ナノポアとはナノスケールの微細な穴で、ナノポアが組み込まれたデバイスでは、イオン電流がナノポアの中を流れ、ナノポアの中を DNA や RNA が通過する際に発生する電流の変化から DNA や RNA の配列を読み取ります。ナノポアシーケンサーは、超高分子のゲノム DNA を読み取る事ができ、かつ RNA も逆転写する事なくそのまま読み取る事ができます。従来のシーケンサーと異なり、コストがかさむ原因となる蛍光試薬やそれを検出するための光学系が不要であり、シーケンサーのデバイスを低価格化かつ小型化できることが大きな利点ですが、ある程度安定した手法としてオックスフォードナノポア社によって商品化されたのは比較的最近のことになります。本新学術領域では、MinION と GridION を導入して、ゲノム解読および

トランスクリプトーム解析を試験的に開始しています。真野研究員は、植物2種と昆虫1種のゲノムシーケンスの結果を報告してくれました。期待通り 100 kb を超えるようなロングリードが得られた一方で、そのクオリティや産出データ量は生物種やライブラリの作製法によって大きく異なることがわかりました。それぞれの生物種ごとに最適なゲノム抽出法を確立するとともに、ライブラリ作製においても細かいノウハウが必要のようでした。また、得られる塩基配列の精度はベースコール(電流変化の生データから ATGC の塩基配列に変換するプロセス)を行うソフトウェアによっても大きく変わります。今後ディープラーニングなど最先端のインフォマティクスを取り入れることによってベースコール精度の向上が期待できます。(それ故、巨大な生データを捨てられなくてサーバのストレージを圧迫するという問題もあるのですが)。真野研究員がナノポアで得られたデータのみを使って、マメ科植物のゲノムを de novo アセンブルしたところ、これまでイルミナと PacBio でアセンブルしたアセンブルと同等もしくは部分的に凌駕する品質のアセンブリをたった1日の計算時間で得ることに成功したことも報告され、今後がますます期待されます。今回は時間の関係で、トランスクリプトーム解析のテストについては発表を割愛しました。次回以降の情報交換会で情報共有したいと考えています。

情報交換会后、「次世代シーケンシング技術は進歩が早すぎてついていけないが、講演で最新動向が把握できて良かった。進歩の速さに驚いた」、「自分の研究課題に次世代シーケンシング技術を、想像していたよりスムーズに取り入れられそうだ、威力を発揮しそうだ」、「是非支援制度を利用したい」などの声をいただきました。大規模解析支援に関する相談は、気軽に重信 <[shige@nibb.ac.jp](mailto:shige@nibb.ac.jp)>までご連絡ください。

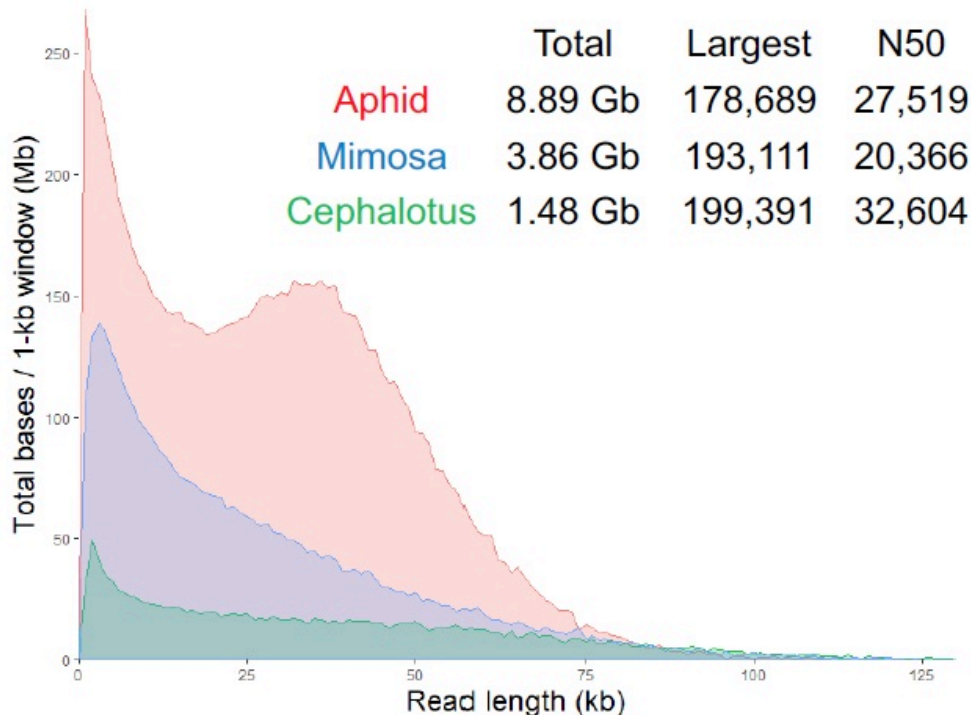


図 Nanopore シーケンシングの結果の例。Aphid (アブラムシ)、Mimosa (オジギソウ)、Cephalotus (フロキノシタ)のゲノムについて、それぞれ 1D ligation kit でライブラリを作製し、GridION でそれぞれ1フローセルずつシーケンスした。いずれも N50 が 20 kb 以上、最長リード約 200 kb と長いリードが得られていることがわかる。一方、スループット(1回のランの出力塩基総数)は実験ごとに大きなばらつきが見られる。

# 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)

## 【研究目的・背景】

脊椎動物進化では、その 5.2 億年の歴史の大部分において、筋と骨格の結合関係が保たれたまま形態的多様化が生じてきた。一方、ごく稀に筋-骨格結合関係が変化した例もある。例えば、4-3.75 億年前にヒレから手足の進化が起こり、このときに新しい筋-骨格結合関係が成立した。また、四肢動物では新たに筋が舌内部に結合し舌を動かすことが可能になった。しかし、それ以降、四肢動物系統では、カメの胸筋や哺乳類の横隔膜といった少数の例外を除き、筋-骨格結合は進化的によく保存されてきたと言える。

四肢筋や舌筋群の発生では、筋前駆細胞は間葉の中を移動したのち、自身とは別の細胞系譜から分化した腱前駆細胞との間に結合を樹立する。この発生過程には細胞の移動や細胞どうしの相互作用、分化までのエピジェネティック状態変化などに関して揺らぎが含まれているはずで、その特性は進化上の安定性とそこから逸脱に大きく関与してきたと予想される。

本研究では、未解明な部分が多い筋-骨格結合の発生過程を、上記のような揺らぎを含むものという観点から記述し、発生機構のどこが動かし難く、どこが揺らぎやすいかを突き止めることを目指している。さらに、古生物学的に観測される進化上の筋-骨格結合の変遷パターンを調べ、発生機構に内在する揺らぎ特性と進化可能性の関係性を探っていく計画である。

## 【研究計画】

(1) 四肢筋や舌筋群に分類される筋を個別に見ると、筋前駆細胞が移動する環境や分化するタイミングに差異がある。それらの差異は発生過程に含まれる揺らぎの大きさに影響していると予想され、実際、筋-骨格結合関係にさまざまな変異が報告されているヒトでは、変異しやすい筋とそうでない筋が存在する傾向が見られる。そこでまず、同一種内のさまざまな四肢筋と舌筋群の発生について、骨格系や舌粘膜と結合を樹立して個々の筋に分かれるまでの過程を比較解析することで、発生の揺らぎの大きさを左右する要因を突き止める。具体的には、ニワトリ、マウス、スポン、アホロートル、ニホンヒキガエル、トラザメ、ヤツメウナギの胚や幼生について、特に非体節由来間葉(側板中胚葉と神経堤細胞)の変化に注目しながら、Lbx 遺伝子を発現し分化が抑制されている筋前駆細胞の分布、筋-骨格結合を介在する腱の発生過程、分化が始まった筋芽細胞集団の中で筋膜となる結合組織が配置されて個々の筋に分かれる過程を観察する。特にニワトリに関しては、移植実験により体節由来の細胞を可視化し、詳細な観察を展開する。

(2) 四肢筋の発生機構がどのような可塑性を潜在的に持ちうるかを把握する上で、胸骨から腹甲骨格へ結合位置が変わっているカメの胸筋は重要な研究対象である。昨年度までに我々は、カメの胸筋はこれまで考えられていたように腹甲骨格と直接結合を樹立するのではなく、まず腹側の真皮と結合を樹立したのち、真皮中で生じて発生とともに成長していく腹甲骨格へ二次的に付着するようになることを発見した。真皮と結合する骨格筋としては他に哺乳類で胸筋から進化した皮幹筋の研究例があるが、我々はそれをもとに、カメ胚で胸筋と真皮が結合を形成する領域でも、マウス皮幹筋原基が広がって真皮と結合を形成する領域に見られるのと同様の遺伝子発現(*Fat1*)を示す細胞が分布していることを確認した。さらに研究を進める中で、マウスの舌筋が舌粘膜(真皮相当)と結合を樹立する過程においても、マウス皮幹筋やカメ胸筋と共通する発生機構が使われていることを示唆する観察結果を得た。これらの状況証拠より、筋-骨格結合を解除して筋-真皮結合を樹立する進化では共通の発生機構の導入があり、その際、進化的に最初に獲得されたはずの舌筋-舌粘膜結合で成立した機構がコオプションとして他の筋の発生過程に組み込まれたという可能性が考えられる。そこで、この推論を検証するために、羊膜類の外群における舌筋-舌粘膜結合の発生過程を解析する。

## 【研究結果】

(1) 現在、研究対象とする上記生物種胚の前肢芽および環咽頭弓領域について、*Lbx1* および *Lbx2* 遺伝子を発現する細胞の分布の解析を展開している。また、筋-骨格結合を介在する腱の



前駆細胞が非体節由来間葉から分化し予定腱領域に局在するまでの過程について、腱と靭帯の前駆細胞に特異的に発現する *Scleraxis* (*Scx*) をマーカー遺伝子として観察を進めている。予察的な観察結果によると、前肢芽では、最初に現れる *Scx* 発現細胞集団の分布パターンは種間で異なるが、その後、四肢動物にほぼ共通する腱の配置に収束するらしいことが分かってきた。

(2) 先行研究により、胸骨は、前肢要素と体幹要素の接合点として、前肢芽間葉から連続する *Tbx5* 発現領域で発生することが知られていた。これに注目し、カメ胚における *Tbx5* 発現パターンを調べてみたところ、胸筋原基が伸びていく領域には *Tbx5* 発現が見られず、カメで胸筋原基が伸びていく外側体壁は他の羊膜類とは異なる部分に相当するという予察的結果を得た。カメ胸筋の進化過程で生じた筋-骨格結合の解除は、外側体壁における *Tbx5* 発現領域の進化的変化とも関連していることが示唆される。

同時に、ニワトリ胚で実験的に胸骨が発生しないようにした場合に、ニワトリ胸筋がどのような結合関係を樹立するかを調べている。これまでに、ニワトリ胚において第 21~26 体節レベルの側板中胚葉(胸骨が発生する組織)を第 27 体節レベルの側板中胚葉(胸骨も後肢芽も発生しない組織)と交換移植すると胸骨が発生しなくなることを確認しており、胸筋と真皮の関係、胸筋に隣接する組織の遺伝子発現 (*Scx*, *Fat1*) の解析を進めている。予察的には、ニワトリ胚において胸骨が発生しない場合は腹側の真皮に接するように胸筋が発生している様子が組織学的観察から得られており、カメの胸筋と同様に筋-真皮結合が樹立されている可能性が示唆される。

#### 【今後の展望】

(1) 各生物種の胚の前肢芽および環咽頭弓領域において、腱の配置と筋膜の分化がどのように決まっているのか、個別の筋ごとの差異に注目しながら解析を進める。その結果をもとに、筋-骨格結合の揺らぎの大きさを左右する要因の候補を推定する。

(2) カメ胸筋の進化過程について、*Tbx5* 発現の比較解析およびニワトリ胚における移植実験を進める。また、両生類のモデルとしてニホンヒキガエルを導入し、舌筋-舌粘膜結合の発生過程を明らかにし、筋-真皮結合に共通する発生機構が認められるかどうか検証する。

## 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

入江直樹(東京大)、内田唯(東京大)、上坂将弘(理化学研究所)

### 【研究目的・背景】

動物の発生過程の進化的多様性には、ある種の法則性が存在することが近年明らかになった。長年の予想に反して、発生段階のうち最も保存されているのは最初期ではなく、発生の途中段階(特に器官形成期)であるという法則性(=発生砂時計モデル)が遺伝子発現情報の比較解析研究から判明した。この保存された器官形成期こそが、動物門ごとのボディプランを数億年スケールで強固に保存させてきた原因になったのではないかと考えられており、門ごとの型(タイプ)を指定するという意味からファイロティピック段階と呼ばれている。しかし、発生砂時計モデルが複数の動物門において成立することが示唆されているにも関わらず、なぜ器官形成期が保存されるのかについてその進化メカニズムは明らかになっていない。ボディプランは、長い進化スケールにおいて非常に変わりにくい「限られた多様性」の好例と考えており、本課題ではこの進化メカニズムを明らかにしたい。

### 【研究計画】

本課題では、脊索動物の進化において観察された発生途中段階の限られた多様性が生じた進化メカニズムを、発生システムの揺らぎや柔軟性・頑健性、そして複雑性といった観点から探索する。特に、複数の脊索動物種における動物胚から、ゲノムワイドな遺伝子発現情報・エピジェネティック状態などを測定・解析しつつ、進化的保存との関連を探っていく。

### 【研究結果】

砂時計型の多様性を動物胚が示すことを説明する有力候補としては、ファイロティピック段階は攪乱に対して脆弱であるため、致命的表現型となりやすく、結果的に純化選択を経て保存されるという脆弱説があった。しかし、我々の実験ではそれは支持されなかった(Uchida *et al.* *EvoDevo* 2018)。一方で、包括的な遺伝子発現情報解析を脊索動物8種で行ったところ、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が浮上した(Hu *et al.* *Nature Eco Evo* 2017)。他にも我々のグループで行った解析からみえてきた、ある種の発生進化の法則性についても議論したい。

### 【今後の展望】

多面的な発現をする遺伝子群が進化的な保存をもたらすという多面拘束が、器官形成期の保存に寄与している可能性が示唆されたが、実はその具体的なメカニズムについてのコンセンサスは得られていない。今後は、個体間差や攪乱への摂動を含む揺らぎの視点を加えた実験も行うことで、器官形成期を保存させてきたメカニズム及び、その理論的理解へと進めたい。

## 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(東京大)、藤本仰一(大阪大)、竹内信人(東京大)

### 【研究目的・背景】

揺らぎを含む細胞内の多成分のダイナミクスから、可塑性やロバストネスといった性質を記述するマクロ状態量を抽出し、この量の揺らぎと応答の関係から表現型の可塑性と進化しやすさの定式化を完成させ、ワディントン流のポテンシャル地形と対応づける。次に、複数種の集団が相互作用をとり入れた階層進化理論への展開を行う。第三に、表現型を形作る発生過程が進化を通してどのように変化していくかを理論とシミュレーションで調べることにより、古来から議論されてきた発生過程の進化拘束を定量的に表現する。

### 【研究計画・研究結果】

(1) 表現型進化のポテンシャル理論: 古澤力との共同研究で、表現型が変動できる領域が状態空間内で低次元に落ちていることをシミュレーションで確認し、さらに、これを少数の遅く緩和するモードが生成されることで説明し、また表現型進化の方向性を確認した。さらに複数環境下で細胞を進化させるシミュレーションを進めて、環境揺動により、この低次元への拘束がどうなるかを調べている。

(2) 階層進化理論: 分子—細胞—個体—個体集団の階層をまたがる進化シミュレーションと理論を進めた。特に、竹内信人との共同研究で分子/細胞レベルでの進化の相克により、情報を担う分子と機能を担う分子への対称性の破れが生じ、これが遺伝子の起源につながることを示した。

(3) 進化発生対応の理論: 発生過程を単純化したパターン形成モデルの進化シミュレーションを行い、進化—発生対応を調べ、この際(1)でもみたような遅いモードの生成が進化発生対応をうむこと、また、遅いモードにより進化しやすさが増すかを調べた。

藤本グループでは、細胞から多細胞組織さらには器官にいたる階層の形態や配置に注目し、力学的あるいは幾何学的な性質の揺らぎや発生拘束を調べている。実験データの定量解析と数理モデルを連携することで、細胞の分裂面(長谷部班と共同研究)、多細胞組織中の細胞の形態や配置、器官の形態、および、器官の配置や数などにおいて、揺らぎを制御する仕組みを見いだしつつある。

### 【今後の展望】

(1) ポテンシャル地形理論を完成させて進化の方向性の理論を構築するとともに、2倍体有性生殖の場合で表現型の安定性とメンデル遺伝の関係を調べる

(2) 階層性進化について統計力学と階層的 Price 方程式に基づいて、情報機能分化の理論を進め、多細胞生物での生殖—体細胞分化、個体集団での分化への理論への基盤をつくる。一方で多種相互作用による表現型可塑性と共生進化の起こりやすさを調べる。

(3) 発生の砂時計仮説とロバストネスの関連を明らかにする。また藤本グループでは各階層の形態の揺らぎと進化の方向性の間の対応関係を動物と植物で明らかにする。

## 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、玉田 洋介、石川 雅樹、鳴川 秀樹、須田 啓、Gergo Palfalvi (基生研)

### 【研究目的・背景】

ダーウィン以来の進化研究が、未だに解明しきれていない問題として、一つ一つの形質は適応的ではないが、いくつかの形質があわさることで始めて適応的になる複合適応形質がどのように進化するかがある。複合適応形質はいろいろな生物に見られるが、複数の形質が確率的な突然変異の蓄積のみによって一斉に進化するのには困難であろうと考えられてきたものの、これまで妥当な代替仮説が存在しなかった。食虫植物の持つ食虫性は、小動物を誘引、捕獲、消化、吸収することではじめて適応的になるので、複合適応形質の典型例である。本研究では、フクロユキノシタの誘引、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、フクロユキノシタの温度依存的な捕虫葉形成に着目し、植物の温度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。

### 【研究計画・研究結果】

博士研究員の鳴川秀樹、大学院生の Gergo Palfalvi、須田啓、研究協力者の玉田洋介、石川雅樹と共同して研究を行う。

[課題1. 食虫性関連遺伝子の特定] 鳴川を中心として、フクロユキノシタの捕虫葉形態形成機構を明らかにするため、葉形態形成関連遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、3遺伝子の解析が進行中である。また、アグロバクテリウム法による形質転換系の確立を目指し、実験条件の検討を行っている。Palfalvi を中心にフクロユキノシタゲノムのリシーケンス、HiC 解析を行い、課題2と3のゲノム関連解析に資する。昨年度、培養個体が十分に得られなかったが、大量培養に成功し、RNA の大量抽出、ライブラリー構築が進行中である。また、ハエトリソウ、コモウセンゴケの発生段階による比較トランスクリプトーム解析を完了し、食虫性関連候補遺伝子の発現変動を検出した。さらにハエトリソウ、ムジナモ、コモウセンゴケのゲノム比較から、食虫性関連遺伝子がどのように進化したかの解析を進めている。

[課題2. 環境摂動による遺伝子発現応答の解析] 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検証する。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)、栄養分濃度を変えた条件で食虫性に関わる遺伝子の方が、関わらない遺伝子よりも発現ゆらぎが大きいかどうかを調べる。RNA の大量抽出、ライブラリー構築を進めている。

[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。植物の温度感受に関わるヒストンバリエント H2A.Z の ChIP-seq を行い、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る。現在 Nanopore を用いた実験のための予備実験を行っている。

### 【今後の展望】

これまでの *in situ* ハイブリダイゼーションの結果からフクロユキノシタ捕虫葉はサラセニア (Fukushima et al. 2015 Nat. Commun.) とは異なった発生様式で変化されることがわかってきたので、従来の仮説と対比し論文としてまとめる。

中間葉形成が自生地の環境とは異なった環境で高頻度で引き起こされることがわかったので、通常環境下では現出しない隠された reaction norm があることが示唆されたので論文としてとりまとめる。

## 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(産総研)、細川貴弘(九州大)、二河成男(放送大)、西出雄大(農研機構)、松浦優(琉球大)、重信秀治(基生研)

### 【研究目的・背景】

生物界において微生物との共生関係は普遍的に見られ、重要な生物機能を有する。このような共生関係がどのように始まり、不安定な初期段階からさまざまな中間段階を経てより安定な関係を構築し、今あるような共生システムが確立したのかは、進化生物学における未解明の問題である。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カメムシなどに潜在的な共生能力を有する自由生活性の微生物が存在することがわかってきた。こういった環境中の「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。

### 【研究計画】

- (1) 共生可能性進化実験モデルの探索および確立：我々が先行研究で確立したチャバネアオカメムシを主たるモデル系として、共生可能性の機構および進化に関する実験を遂行するとともに、他種の昆虫類なども含め、より有望な実験系の探索をおこなう。
- (2) 共生可能細菌群の探索、分離、解析：共生細菌除去幼虫を日本各地の土壌試料に曝露、スクリーニングすることで、環境中の共生可能細菌群を網羅的に探索、分離、同定する。
- (3) 共生能力に関わる分子機構の解析：比較ゲノム解析やRNAseq解析を駆使して、共生能力に関わる可能性のある遺伝子群を探索する。細菌側の遺伝子は遺伝子破壊や形質転換により、宿主側の遺伝子はRNAiやゲノム編集により、それぞれ機能解析をおこなう。
- (4) 共生能力と共生関連表現型の相関進化解析：異なる細菌間で競争感染実験を実施して、相対共生能力を定量化する。これら異なるレベルの共生能力を示す細菌類について、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相関、分散、揺らぎを測定し、共生能力と揺らぎ応答の関係について種間レベルで明らかにする。
- (5) 共生可能細菌の実験進化的解析：共生可能細菌に感染させた昆虫システムを飼育維持し適応度の高い個体を選抜して体内細菌を次世代に感染させることを継続的に繰り返して進化実験をおこなう。

### 【研究結果】

- ・共生可能性進化実験モデルの探索および確立：我々が先行研究で確立したチャバネアオカメムシを主たるモデル系として、共生可能性の機構および進化に関する実験を遂行するとともに、他種カメムシ類やその他の昆虫類も含め、より有望な昆虫—微生物共生系の探索を広範におこなった。
- ・共生可能細菌群の探索、分離、解析：共生細菌除去幼虫を日本各地の土壌試料に曝露、スクリーニングすることで、環境中の共生可能細菌群を網羅的に探索、分離、同定した。中でも南西諸島の宮古島は共生細菌Cのみが優占する特異な共生細菌叢を呈することが判明した。
- ・共生能力と共生関連表現型の相関進化解析：異なる細菌間で競争感染実験を実施して、相対共生能力を定量化した。
- ・共生可能細菌の実験進化的解析：共生可能細菌に感染させた昆虫システムを飼育維持し、適応度の高い個体を選抜して体内細菌を次世代に感染させることを継続的に繰り返して進化実験をおこなうための予備実験を実施した。

### 【今後の展望】

- ・共生可能性進化実験モデルの探索および確立については、他種カメムシ類やその他の昆虫類も含め、より有望な昆虫—微生物共生系の探索を継続して実施する。

- 共生可能細菌群の探索、分離、解析については、継続して実施するとともに、特に共生細菌 C のみが優占する特異な共生細菌叢を呈することが判明した宮古島について、今後より詳細な解析を行っていく。
- 共生能力と共生関連表現型の相関進化解析については、異なるレベルの共生能力を示す細菌類について、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相関、分散、揺らぎを測定し、共生能力と揺らぎ応答の関係について種間レベルで検討の予定である。
- 共生可能細菌の実験進化学的解析については、条件設定を完了し、本格的な実施をめざす。

# 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、その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。その制約と方向性が出現するメカニズムを明らかにすることは、無方向でランダムな多様化過程を前提とした従来の進化理論では説明することが難しいさまざまな現象を、統一的に理解する新たな進化理論の構築に繋がる。

そこで本研究課題では、大腸菌進化実験を用いることにより、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。表現型揺らぎの計測、そして細胞モデルの計算機シミュレーションと融合することにより、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。

## 【研究計画】

表現型進化がどのように拘束されているかを明らかにするために、自動培養システムを用いた複数環境・複数系列での大腸菌の進化実験を行った。95種類のストレス環境を添加した環境下で大腸菌を30日間培養し、その過程におけるトランスクリプトームとゲノム配列の変化などを定量した。この進化の過程において、表現型の変化が拘束されている方向と、発現揺らぎの大きさがどのような関係にあるかを明らかにする。また、大腸菌を用いた1細胞レベルでの表現型揺らぎ計測を行い、環境ストレス応答との対応を定量することにより、揺らぎと環境応答との対応を解析する。

## 【研究結果】

上記の進化実験で得られた耐性株について、様々なストレスに対する耐性能を定量し、トランスクリプトーム解析による発現量変化との対応を解析した。PLS回帰を用いたところ、9次元程度の自由度によって様々なストレスへの耐性能を定量的に予測可能であることが示され、大腸菌の発現プロファイルの変化が比較的low自由度に拘束されていることが示唆された。さらに、この発現プロファイルの変化がどのような遺伝子機能と関係しているかを、統計的手法により解析したところ、ストレス耐性に関与した自由度や、増殖活性に関与した自由度など、表現型変化を特徴づける主要軸の抽出に成功した。

また、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の構築に成功した。この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ことが可能であることが示唆された。

## 【今後の展望】

耐性株において同定された変異がどのような表現型変化をもたらしているか、実験的に定量する。また、そうした変異の要素を取り入れた表現型予測モデルを構築し、金子班との協力により理論解析を援用しつつ、発現揺らぎの大きさと進化的拘束の対応を解析する。

# 胸鰭の鰭条本数の個体間ゆらぎ要因と種間形態多様性

田村宏治、阿部玄武（東北大学・大学院生命科学研究所）

## 【研究目的・背景】

魚類の胸鰭は、四肢動物の前肢の相同器官である。ただし胸鰭内骨格（軟骨内骨）のさらに先端には「鰭条」とよばれる膜性骨が存在し、鰭条に相当する構造は前肢には無い。しかし、胸鰭の鰭条骨格が前肢骨格と同じ側板中胚葉に由来することが示され、胸鰭において鰭条も四肢と同様にパターン形成を行っている可能性も示唆されている。

鰭条のパターン形成を考えるにあたって、そもそも胸鰭の鰭条に明確なパターン（定形）が存在するのか、の記載が無かった。そこでゼブラフィッシュを用いて、鰭条の本数を指標に、胸鰭鰭条のパターンの存在の有無を調べた（未発表、図1）。その結果、前方では鰭条の本数が一定であること、一方で後方の鰭条は2～5本と個体によってゆらぎがあり、全体の数は10～13本と個体差が存在することを見出した。鰭条数のゆらぎは同一系統の同腹個体でも見られる。さらに、このゆらぎの度合いが系統によって異なることも判明した。過去の知見と併せて考えると、このゆらぎを見せる後方の鰭条は、四肢のパターン形成因子として有名な *shh* 遺伝子の発現領域に由来する可能性がある。鰭条数がゆらぐのは後方部位のみであり、ゆらぎを生じる部位に制約がある。本研究は、胸鰭鰭条の本数に部位的制約をもって種内ゆらぎを生じる外的要因とその標的カスケードを特定すること、さらに鰭条本数のゆらぎと魚類の特殊な鰭条（遊離軟条）形成や四足動物の指本数多様性形成との関係を示すこと、を目的とする。

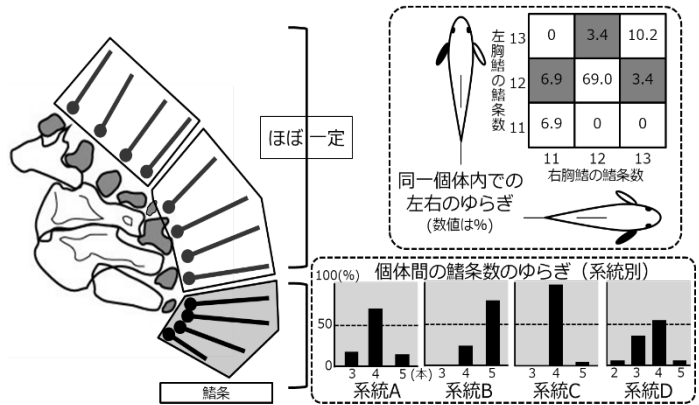


図1. ゼブラフィッシュの個体内、個体間および系統間における、胸鰭の鰭条数のゆらぎ

## 【研究計画】

鰭条数の種内ゆらぎを起こす外的要因とその標的カスケード（経路）の特定を行い、種内における形態の多様性を引き起こしている仕組みを明らかにする。また、その仕組みが四肢形態（指形態）の種間差を生み出すメカニズムに関係し得るかを調べる。これにより、種内でゆらぎ易い領域制約的な仕組みと種間多様性や形態特殊性を生み出すメカニズムとの関係を考察する。以下の3つを、研究期間内に明らかにする具体的な研究課題と研究計画とする。

（課題1）種内ゆらぎを生じる外的要因の特定

計画：鰭条数ゆらぎが起こる時期・領域・過程の特定とゆらぎ外的要因候補の摂動実験

（課題2）種内ゆらぎの外的要因が標的とするカスケードの特定

計画：第一候補 (*shh* シグナル経路) の解析と網羅的他候補因子 (経路) の探索

（課題3）種内ゆらぎと種間多様性の関係の理解

計画：遊離軟条および四足動物の指本数に対する、課題1,2の要因および標的の摂動

## 【研究結果】

- ・ゼブラフィッシュ近交系の入手（慶応大・新屋先生との共同研究）。
- ・ゆらぎ時期や部位特定のためのTG系統の取得・作製 (*sox10*, *col2*, *osterix*, *shh* など)。
- ・外的要因としての餌条件を検討するための、摂動実験用ビタミンA欠乏餌の委託作製検討。

## 【今後の展望】

ツバメコノシロ（遊離軟条をもつ魚種）胚の入手とモデル動物化を試みる、比較ゲノム解析と鰭発生過程 RNAseq による魚類特異的遺伝子とその機能の解析、ショウジョウバエにおける Fluctuating Asymmetry（同一個体で左右の器官サイズに揺らぎが生じること）の解析法を参照す



るなど、さまざまな計画をさらに加えて、「種内で多様性をもつ形質とそれを生み出すメカニズムが進化の方向性を規定している」可能性について議論できるよう、研究の幅を広げたい。

# 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)

## 【研究目的・背景】

発生システム浮動は発生進化の源泉となる変異を生み出す。従って、発生システム浮動の方向性の理解は発生進化の方向性の理解へとつながる。近年、らせん卵割動物（軟体・環形動物など）にのみ存在する新規 homeobox 遺伝子群 SPILE が、動-植軸に沿って入れ子状に発現し、らせん卵割型発生の保存された特徴である動植軸に沿った割球運命分配に働くことを発見した。一方で、軟体動物腹足類の中でも遺伝子数や発現パターンに変動があり、他の転写因子に比べ変異に富むことも分かっている。本課題では、腹足類3種を用いて初期発生期の転写因子発現プロファイルの相違点と、それに SPILE 遺伝子がどう寄与しているかを、*in situ* hybridization とトランスクリプトーム、機能解析を組み合わせ検証する。これにより、数億年レベルで保存されている発生様式の背後にどの程度の浮動が許容されどのような傾向があるかを理解する。

## 【研究計画】

保存された発生パターンを示す軟体動物カサガイ類 2 種クサイロアオガイ (*Nipponacmea fuscoviridis*) とヨメガカサ (*Cellana toreuma*)、クロアワビ (*Haliotis discus discus*)を用いて、SPILE 遺伝子を中心とした初期発生における転写因子の発現プロファイルおよび SPILE のはたらきの比較を行う。今年度の実験項目は以下の通りである。

(1) 1 細胞トランスクリプトーム: クサイロアオガイ、ヨメガカサおよびクロアワビの 16 及び 32 細胞期の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行う。まずは、実験的に扱いやすいクサイロアオガイで手法を確立することを目指し、その方法を他の種に応用していきたい。各細胞の遺伝子発現量を取得し、それらをクラスター解析し、細胞タイプごとのクラスターに分ける。加えて、ドメインサーチにより、転写因子を網羅的に同定し、3 種間での遺伝子対応表を作成する。これにより、どの生物種でどの転写因子が発現している/いないのかについての網羅的情報を構築する。

(2) SPILE 遺伝子群を中心とした転写因子群の発現パターンの解析: クサイロアオガイ、ヨメガカサ及びクロアワビの 32 細胞期において、SPILE を含む複数の転写因子群の *in situ* hybridization を行う。これにより、(1) SPILE 遺伝子群の発現パターンを網羅的に解明する、および (2) 1 細胞トランスクリプトームで得られた クラスターがそれぞれどの細胞に相当するのかを判断する、という 2 点を達成する。SPILE 遺伝子群だけでは全ての細胞タイプを分類するのに十分な情報でない可能性がある。そこで、軟体動物もしくは環形動物で幼生期に胚葉特異的に発現する転写因子群で、32 細胞期に発現している遺伝子を選択し、追加で解析を行う。以上の行程により、1 細胞トランスクリプトーム解析と *in situ* hybridization による情報を合わせ、どの割球細胞にどのような転写因子が発現しているのかを網羅的に理解する。

## 【研究結果・今後の展望】

(1) クサイロアオガイを用いて卵割期の 1 細胞トランスクリプトームに適した手法を検討している。また、(2) クサイロアオガイ 32 細胞期の割球タイプマーカーの探索を進めている。いずれも、クサイロアオガイで確立・発見したものを順次他の 2 種に適用していく。

## 「鍵と鍵穴」の進化を解く:

### 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(千葉大・理)、藤井壮太(東大・農)

#### 【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の多くは受容体とリガンドのような「鍵と鍵穴」のシステムであるが、新しい特異性、すなわち「新しい鍵と鍵穴のセット」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。鍵と鍵穴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、自家不和合性の鍵と鍵穴のセット(「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、シミュレーションモデル・数理モデルとアミノ酸置換実験により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しい鍵と鍵穴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。

#### 【研究計画】

##### (1) シミュレーションモデル・数理モデルによるS対立遺伝子の進化過程の予測

まず、進化過程を再現するモデルを構築する。S対立遺伝子に生じる突然変異、自然淘汰、遺伝的浮動を組み込んだ確率的な進化モデルのもとで、突然変異が特異性のゆらぎに与える影響をパラメーターとして変化させながら、S対立遺伝子の進化しやすさを定量的に検討する。

##### (2) アミノ酸置換実験による特異性のゆらぎの定量と進化の再現

特定の2種類のS対立遺伝子に着目したアミノ酸置換実験を行う。タンパク質相互作用部位のアミノ酸数カ所に変異を人工的に導入し、2種類のS対立遺伝子の中間的な配列を人工的に作製する。この配列をシロイヌナズナに遺伝子導入し、自家不和合性の活性を定量することで、不安定かつ中間的な特異性の実態を定量し、2種類のS対立遺伝子間の進化的移行の過程を実験的に再現する。

#### 【研究結果】

シミュレーションモデル上でS対立遺伝子の花粉側(鍵側)に変異を生じさせ、中間的な不和合状態をつくりだした。変異前のS対立遺伝子とどの程度長期に渡り共存するかを調べたところ、共存時間はいくつかの生理的パラメーターに大きく依存することが明らかになった。実験については現在、*Arabidopsis lyrata*の2種類の対立遺伝子とその中間型の対立遺伝子(花粉側遺伝子・柱頭側遺伝子)を自家和合性のシロイヌナズナに導入中である。

#### 【今後の展望】

モデルについては、シミュレーションだけでなく数理モデルによる実装も現在行っている。また、実験については、*A.lyrata*だけでなくハクサンハタザオ(*A.halleri*)についても現在野生集団のS対立遺伝子を探索中であり、よりよいS対立遺伝子のペアが見つければ、それを実験に供する予定である。

# 深層ネットワークを援用した表現型制約と表現型進化原理の探索と普遍構造の探求

小林徹也(東京大)

## 【研究目的・背景】

進化とは、多様化と安定化(選択)の競合的ダイナミクスの中で生まれる非定常な過程である。その描像が、統計物理学における熱ゆらぎとポテンシャル力の関係を想起することから、進化過程を物理的視点で定量・統計的に捉える試みが続いてきている。我々は、細胞の増殖の履歴を経路積分を用いて表現し、細胞の履歴全体を選択の単位と捉えることで、表現型ゆらぎを有する集団の自然選択過程に、熱力学と同等の変分構造が内在していることを明らかにした。この変分関係から、集団適応度の応答理論や変動環境下における適応度のゆらぎ定理が導かれた。しかしこれらの理論は実際の生物が直面する表現型や増殖特性に関する発生的・物理化学的・エネルギー的制約を考慮していない。また現時点で理論は、いかにして与えられた性質に集団が進化しうるか、というその進化過程までは含んでいないという課題を有する。

## 【研究計画】

本研究では、この進化の変分構造と適応度ゆらぎ定理を基盤として、その結果に深層ネットワークに基づくモデル化と強化学習の知見を融合させることで、表現型制約と表現型進化の理論を発展させることを目的とする。深層ネットワークを用いて抽象的かつ柔軟に表現型制約を表現し、深層強化学習の学習則から表現型進化過程のヒントと知見を得ることを狙う。またネットワークの構造を工夫して、免疫系の表現型進化や1細胞複製過程の表現型制約・進化の問題にモデルを具体化する。シミュレーションを主体に探索的に得られる表現型進化の法則は、免疫受容体 NGS データや1細胞定量データなどを用いて実験との整合性を確かめる。また、進化と深層強化学習の両者に共通して現れる変分構造を介して、統一的な理論の構築を目指す。その成果は生命進化の理解を深め、深層ネットワークの学習法などにも寄与すると期待される。

## 【研究結果】

適応免疫系を具体的な対象として、環境に対する表現型適応の過程を強化学習(マルコフ決定過程)の枠組みで定式化することを行っている。適応過程を免疫系が実装する細胞間相互作用を制約付の深層ネットワークによってモデル化する。具体的には環境とのインターフェイスである抗原の分布、それを受け取る T 細胞群、そして T 細胞群によって制御されるエフェクター細胞群の3層のレイヤーをまず考え、免疫学的な知見と矛盾しないように免疫ネットワークを構成することを行っている。深層強化学習などで援用されている Q 学習やエントロピー制約 Q 学習などの知見を用いて、免疫ネットワークの学習則を導き、その学習性能をシミュレーションで検討しつつ、免疫学的な知見と比較することで、より生物学的に妥当な学習則の探索などを行っている。

## 【今後の展望】

深層ネットワークを元に得られた適応ダイナミクスを主に数値的に解析し、学習過程および学習収束後にどのような分布に例えば T 細胞群が収束するかを調べる。その分布を T 細胞受容体の NGS シーケンスデータなどと比較することによって、得られたモデルの生物学的な妥当性を検証する。また可能であれば解析的な方法により、学習の結果からどのような分布が得られるのかなどに関する一般的な結果の導出も試みる。また上記の表現型適応過程のモデルを元に、モデルの表面的な詳細によらない普遍構造を取り出すため、深層強化学習の変分構造に着目して情報や熱力学構造の観点から得られた結果を捉える理論的枠組みを構築する。

## 武器と性形質進化における発生の拘束と可塑性

岡田泰和(首都大)

### 【研究目的・背景】

カブトムシの角やクジャクの羽といった性選択形質は、ひときわ目を引く巨大で美しい“誇張された表現型”であり、こうした武器や装飾はすさまじい種内・種間の多様性を持ち、進化的・発生的に“変わりやすい形質”であることが知られている。一方、節足動物の交尾器や哺乳類の脳など、他の体モジュールは生育時の環境によらず、ほぼ一定のサイズに発生し、発生プロセスも環境や遺伝的摂動に対して頑健な作りになっていると考えられている。表現型の“ゆらぎ”と安定性を考える上で、1) 環境依存的に形態形成が起こる表現型可塑性 および、2) 武器や可塑性が部位特異的に生じるモジュール性、が重要なしくみであるがそのメカニズムはよくわかっていない。私は、武器をもつ昆虫をモデルとして、様々な体モジュールが、全体として機能的なパフォーマンスを持つよう統合的に発生する仕組みに興味を持っている。本研究では、オオツノコクヌストモドキという武器甲虫を主なモデルとして、武器をもたらす遺伝子、そして武器サイズに大きな“ゆらぎ”を許容する分子基盤の解明を目指す。

### 【研究計画】

武器と他の体モジュールのあいだに発生的リンクをもたらすメカニズム解明にむけて、生態発生的解析(RNAiなどの実験的手法とトランスクリプトームによる、発生関連遺伝子の網羅的発現解析、形態計測学による変異性の評価)を行う。具体的には、栄養条件やオス・メス間、モジュール間で異なる形態発生をもたらす遺伝子を明らかにするため、飼育環境や性別の異なる個体間で、発生過程で発現する遺伝子を網羅的に比較する解析(RNAseq)を行う。具体的に絞込みができてきた因子、とくに栄養依存的な発生・発達を制御するインスリン経路遺伝子については、部位や発生ステージを広く対象とした精緻な発生・生理学解析を RNAi, リアルタイム定量PCRなどを用いてすすめる。

### 【研究結果】

インスリン経路は種間で保存された経路でありながら、要素となる個々の遺伝子は非常に多様化していることがわかってきた。リガンド分子であるインスリンの5つのサブタイプおよび、3つの受容体遺伝子について、発現解析および前蛹期でのノックダウン解析をすすめており、複数ある遺伝子コピーのうち特定のコピーのみが、武器である大アゴの可塑的発達を制御していることがわかってきた。遺伝子重複の後、特定のコピーを武器の発達に特化させることで、モジュール的な発生を可能にしていることが示唆される。

### 【今後の展望】

オオツノコクヌストモドキのゲノム配列解析に着手し、リシーケンスなどにより、武器の大小・有無による系統間・種間比較を行い、大アゴの誇張化をもたらした遺伝子やゲノムの特徴を解明したい。さらには、連携研究者(新見輝幸氏、後藤寛貴氏、香月雅子氏、岡田賢祐氏)との協力により、他の昆虫種にも知見を拡張し、環境応答の仕組みや進化的変化を担う遺伝基盤の共通性・多様性の解明を目指す。

## 骨化順序ヘテロクロニーの揺らぎと制約

小薮大輔(武蔵野美術大学造形学部 教養文化・学芸員研究室)

### 【研究目的・背景】

脊椎動物の身体は数百の骨によって構成されているが、どの骨を先に、或いは後に形成するかという骨化順序は種によってほぼ決まっている。これまで代表者は独自に収集してきた100種以上の羊膜類(鳥類, 爬虫類, 哺乳類)の胚標本を用いて、頭部構成骨の骨化順序にみられる種間変異と制約的パターンを明らかにしてきた。骨化順序の種間変異は種内レベルにおける変異が成因となっていると想定される。加えて、当該新領域が掲げる「進化の揺らぎ応答理論」に従えば、種内レベルで骨化順序の変動幅が大きい骨は種間レベルでも骨化順序の進化的変動幅が大きいと予想される。しかし、骨化順序の種内変異についての知見は大きく不足しているため、種内変異動態と種間変異動態に相関性はあるのか現状では明らかでない。そこで本課題では、脊椎動物の全身骨格の形成タイミングに見られる種内変異と種間変異を題材として「進化の揺らぎ応答理論」の検証を構想する。これまで代表者は羊膜類における頭部形態の発生プログラムの種間差を明らかにし、発生プログラム改変の系統進化パターンとモジュール的制約性を明らかにしてきた(e.g., Koyabu et al. 2011, *EvoDevo*; Koyabu et al. 2012, *PNAS*; Koyabu et al. 2014, *Nat. Commun.*; Ramírez-Chaves et al. 2016, *Proc. Roy. Soc. B*; Koyabu 2017, *J. Vet. Med. Sci.*). 本申請課題をこれら網羅的探索型研究に続く理論検証型研究として位置づけ、当該新領域の各計画班の成果を相互参照しながら、「進化の揺らぎ応答理論」の検証を目指す。

### 【研究計画】

2014年以降新たに入手した4種の哺乳類を加え、合計139種の胎子の全身マイクロCT画像を材料とした分析を行う。なお、本研究で使用するマイクロCTは今年度9月までに発表者の研究室に設置される予定である。これまで代表者は羊膜類脊椎動物の頭部における骨化順序の系統的な進化史と制約を明らかにしてきたが、これまでの研究では、骨化順序における①各骨の種間変異のパターンはどういったものか、②各骨の種内変異のパターンはどういったものか、③各骨の種内変異パターンと種間変異パターンは相関するのかわかるとは明らかになっていない。代表者のこれまでの研究活動により134種の羊膜類における頭部の骨化順序の記載は完了しているが、この生データから種間レベルでの骨化順序における各骨の変動幅を定量化すれば①を達成することができる。種内レベルでの骨化順序における変動幅の定量化は爬虫類と鳥類で行われているが、本課題では理化学研究所で飼育されているC57BL/6マウスを哺乳類における種内変異動態のモデルとして骨化の変異動態の定量化を行い、②を達成する。そして①と②の結果を踏まえ③の検証を行う。これまでの代表者の研究により頭部の骨化順序の進化史と制約性は明らかになっているが、全身骨格のパターンは未だ不明である。そこで、本課題は羊膜類において全身骨格の骨化順序を記載するとともに、頭部と同様に③の検証を行う。カミツキガメについての先行研究からは膜性骨群が種内変異が高いという指摘があるが、本課題によってカメ類の種間レベルでも同様のパターンがあるのかを検証する。また、鳥類では後期発生の骨群ほど種内変異が高いという指摘があるが、本課題によって鳥類の種間レベルでも同様のパターンがあるのかを検証する。

## 酵素1分子の活性揺らぎと進化能の関係

上野博史(東京大)

### 【研究目的・背景】

「同一の遺伝情報」を持つ細胞集団においても、個々の細胞の表現型には揺らぎが存在することが知られている。我々の最近の研究から、このような「表現型の揺らぎ」は、酵素1分子レベルでも生じることが分かってきた。つまり同一のDNAから合成した酵素1分子においてもその活性には揺らぎが存在するのである。このような「表現型の揺らぎの大きさ」と「進化」には相関があり、大きな揺らぎを示す表現型ほど進化速度が速くなるという理論が最近報告されている。しかしこの理論がどういった表現型や進化に適用できるかどうかは未だ自明ではない。そこで本研究ではマイクロチャンバーデバイスを用いた酵素の定量進化実験系を確立し、酵素1分子の活性揺らぎと進化能との関係を明らかにする。

### 【研究計画】

Alkaline phosphatase (ALP) をモデル酵素に用い、マイクロチャンバーデバイスを用いた進化実験で高活性型へと進化させる。得られた各世代の変異ALPの1分子酵素活性分布を計測し、揺らぎ幅と進化速度との関係を明らかにする。さらに進化の起点における活性揺らぎ幅が進化能に与える影響や、定方向進化や非定方向進化における活性揺らぎ幅と進化能の関係を明らかにする。本年度はまずマイクロチャンバーデバイスを用いたALPの定量進化実験系を確立する。進化実験では変異ALPをコードする変異DNAライブラリ・蛍光基質・無細胞タンパク質合成系の混合溶液からなる微小ドロップレットアレイを作製する。このドロップレット内の1DNAから合成されたALPの活性を蛍光強度から定量し、活性の高いドロップレットからDNAを回収する。その後、PCR増幅・シーケンス解析を行うことで、活性の高い進化したALPのDNAおよびその配列情報を得る。

### 【研究結果】

微小ドロップレットアレイ内の変異ライブラリDNA1分子からのALP合成・活性評価を行い、高活性ALPを選定した。その後1DNAからのPCR増幅・シーケンスによって高活性ALPの配列決定を行った。その結果、野生型ALPに比べて10倍以上活性の上昇したALP変異体を複数取得することに成功している。これらの変異体の活性揺らぎの大きさは分子種によって様々な値を持つことが分かった。

### 【今後の展望】

デバイスへのDNAの吸着防止処理や、PCR酵素・プライマー配列の検討を行いスクリーニング条件の最適化を行う。さらに蛍光性ALPの開発を行い、その発現量を見積もることで活性計測の定量性のさらなる向上を目指す。最終的に確立した進化実験系を用いて進化実験を繰り返し、得られた高活性ALP変異体の1分子酵素活性分布から酵素1分子の活性揺らぎと進化能との関係を明らかにする。

# 脊椎動物の陸上進出による新奇形質の誕生—環境変化により揺らぐ形態形成経路に迫る—

田中幹子（東京工業大学）

## 【研究目的・背景】

脊椎動物は陸上への進出に伴い、高濃度の酸素環境に曝されることとなった。本研究では、上陸に伴う酸化ストレスによって、新奇形質を生み出した形態形成プロセスの揺らぎの解明を目指す。

羊膜類の四肢の形成過程では、指間領域の細胞がプログラム細胞死（以降、指間細胞死とよぶ）によって取り除かれ、指が分離する。一方、両生類アフリカツメガエル幼生の肢芽では、指間細胞死のシステムが確立しておらず、それぞれの指が伸長することによって分離する。このことから、指間細胞死は、脊椎動物が進化の過程で新しく獲得した形質であると考えられている。我々は、ニワトリ胚の肢芽の細胞死領域において、高レベルの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が検出されること、この領域での ROS の作用を阻害すると細胞死が抑制されることを確認している。

これらの背景から、我々は、指間細胞死が環境変化によって獲得された形質である可能性を考えた。本研究では各種脊椎動物をモデルに、酸化ストレスによってのみ指間細胞死という新奇形質が出現する系を用いて、四肢の形態形成プロセスの揺らぎを検出し、その分子機構に迫ることで、脊椎動物の上陸に伴う環境変化が新奇形質を生み出す原理を明らかにすることを目的とする。

## 【研究計画】

本研究では、環境酸素濃度によって大きく揺らぎ、生体内に ROS を大量に産生させうる経路と考えられる (1) グルコース代謝経路との関連性、及び (2) 血管形成との関連性—の側面から検証を行うこととした。

## 【研究結果】

これまでに (1) グルコース代謝経路との関連性を明らかにするために、ニワトリ胚の増殖期と指間細胞死期の肢芽の指間領域のメタボローム解析を行ったところである。また、(2) 血管形成との関連性を検証するために、ニワトリ胚を用いて、指間領域における血管形成段階と ROS の産生レベルを経時的に検証しているところである。

## 【今後の展望】

今後は、(1)と(2)の2つの側面の検証を続け、さらに領域内との共同研究も視野に入れ、新しい方向に研究を展開できる可能性についても議論したい。



# 神経ネットワークの揺らぎは配偶者選好性の進化を規定しうるか

石川由希(名古屋大学)

## 【研究目的・背景】

動物の配偶者選好性は神経ネットワークによって規定されている。神経ネットワークはゲノム変異や経験などによりゆらぎ、配偶者選好性のばらつきを生む。一方、種分化の過程では、このゆらぎが固定され、選好性が分化する。本研究は、ショウジョウバエのフェロモン選好性を題材に、神経ネットワークのゆらぎやすさがどのように配偶者選好性の進化を規定しうるのかを明らかにする。

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が全く異なるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) とオナジショウジョウバエ (*D. simulans*) を材料として用いる。キイロショウジョウバエのオスは、メスの持つフェロモン 7,11-ヘプタコサジエン (7,11-heptacosadiene, 7,11-HD) によって求愛を上昇させる (Billeter et al. 2009)。一方、オナジショウジョウバエのオスは、7,11-HD によって求愛を低下させる。このことから、7,11-HD の情報処理を担う神経ネットワークはこれら近縁種間において急速な分化を遂げたと考えられる。そこで本研究では、この選好性の進化をもたらした神経ネットワークの変化を特定し、さらに神経ネットワークのゆらぎがどのように選好性の進化に貢献したのかを解明する。

## 【研究計画】

私たちはこれまでに、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの F1 雑種がオナジショウジョウバエと同様の負の 7,11-HD 選好性を示すことを示してきた (石川, 未発表)。このことは、F1 雑種の持つ 7,11-HD の情報処理を担う神経ネットワークがオナジショウジョウバエと類似していることを示唆している。さらに、この F1 雑種では、交雑を介してキイロショウジョウバエ由来の遺伝学的ツールを導入することで、特定のニューロンの機能や性質を詳しく調べることが可能である (石川, 未発表)。そこで本研究では、この F1 雑種をオナジショウジョウバエ型の神経ネットワークのモデルとして用い、キイロショウジョウバエと比較する。また、これと並行して、オナジショウジョウバエにおける遺伝学的ツールの作成し、最終的には各種の純系統を用いた神経ネットワークの比較を目指す。

本年度はまず、キイロショウジョウバエにおいて 7,11-HD 選好性に関与することが知られているニューロン群の機能を、キイロショウジョウバエと F1 雑種で比較する。各ニューロン群に光遺伝学ツールを発現させ、これらの人為的な活性化が求愛行動にどのような影響をもたらすかを定量する。これにより、ニューロンの機能という観点から、神経ネットワークがどのように種間で保存されているのかを明らかにする。次に、再構成 GFP (reconstructed GFP) によってシナプス接続を可視化する GRASP 法を用いて、神経ネットワークを構成する各ニューロン群間の神経接続を比較する。これにより、神経ネットワークの神経接続がどのように保存され/分化しているのかを明らかにする。

## 【研究結果】

光遺伝学を用いた強制活性化により、キイロショウジョウバエの 7,11-HD 選好性に寄与する神経ネットワークは求愛を促進させる一方、雑種の相同な神経ネットワークは求愛を抑制させることがわかった。さらに、この神経ネットワークを構成するニューロン群の神経接続を観察すると、雑種において特定の神経接続が失われていることが示唆された。このことは、特定の神経接続の変化が神経ネットワークの機能を分化させ、7,11-HD 選好性の進化を実現したことを示唆している。

## 【今後の展望】

以上の結果より、神経ネットワークにおける特定の神経接続の喪失が、7,11-HD 選好性の進化をもたらした可能性が示唆された。今後は Syb-GRASP や Ca<sup>2+</sup> イメージング、two-tag EM 法など他の方法を用いて、今回明らかになった神経接続の違いを丁寧に確認していく。また、神経ネットワークのゆらぎやすさがこのフェロモン選好性の進化に与える影響を検証するため、ゲノム変異や経験によってこの神経接続が揺らぐのか、またその揺らぎやすさと種間の保存性が相関するのかを調べる。これにより、神経ネットワークの揺らぎが配偶者選好性を規定しうるかを検証する。

# 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(大阪大)

## 【研究目的・背景】

生物進化の方向性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、またその制約をもたらすメカニズムも明らかでない。

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、配列情報から表現型である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(構造)及び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。したがって、この系は揺らぎ応答理論の検証とその分子メカニズムの理解のために理想的な実験モデルとなっている。

本研究では、これまでに行った進化実験における各段階の RNA9 種類について、構造特異的 RNA ラベリング実験により構造とその揺らぎを正確に予測し、構造揺らぎと進化により変化した構造に関連があるかを直接検証する。さらに得られた結果から、揺らぎ応答をもたらす分子メカニズムを理解することを目指す。本研究の特徴は、試験管内で進化した RNA を用いることで、進化制約をもたらす分子メカニズムにまで迫ることである。進化制約のメカニズムを理解できれば、進化の予想や制御も可能になる。これは生命の進化過程における偶然性と必然性の理解につながるのみならず、進化工学の飛躍的な効率化にも貢献する。

## 【研究計画】

本研究では、これまで得た進化の各段階の RNA9 種類を用いて、RNA の進化の方向性が揺らぎ応答理論と一致するか、すなわち揺らいでいる部分構造(表現型)が進化によって変化するか、を検証する。そして一致するならばその分子メカニズムを明らかにすることを目指す。そのために2年間で以下の4項目を実施する。

### 1. 9 種類の RNA の全長について構造特異的 RNA ラベリングにより各塩基の対合率を測定する

RNA の表現型(構造)ゆらぎを測定するために、構造特異的 RNA ラベリングを RNA 全長にわたって実施する。結果を RNA 配列に対応付け、RNA の各塩基が対合を形成する割合を求める。できるだけ精度を高めるために、同一 RNA について複数回の実験を行う。

### 2. RNA ラベリングのデータを用いて RNA の構造分布を求める

RNA ラベリングデータを制約条件に用いて、各 RNA のとりうる構造とその安定性を計算する。通常 RNA は安定性の異なる複数の構造を遷移している。したがってこの解析により、多くの取りうる構造とその存在割合(すなわち構造分布)を求める。

### 3. RNA 進化が揺らぎ応答理論と一致しているかを検証する

揺らぎ応答理論では、進化により変化しやすい構造はもともと揺らいでいた構造であることを予想する。これを確かめるために、進化の各段階で進化によって変化した構造が、進化前の RNA 構造分布で揺らいでいた場所かどうか、すなわち構造分布が広がっているかどうかを検証する。逆に、進化前の構造で揺らいでいない場所は進化により変化しないかどうかを検証する。これらの検証により RNA の構造進化が揺らぎ応答理論と一致しているかを検証する。

### 4. 揺らぎ応答理論のメカニズムを考察する

RNA の構造進化において揺らぎ応答理論を支持する結果が得られた場合、そのメカニズムを追求する。必要に応じて RNA の変異体作成やさらなるラベリング実験を行い、メカニズムの信頼性を検証する。

## 【研究結果】

現状では、ある全 9 種類の RNA について 1-2 回の構造特異的ラベリングを行った段階である。まだ測定は途中であるが、現段階で構造分布を描いてみると、構造的に揺らいでいる部分構造が進化によって固定される様子が観察されている。これは揺らぎ応答理論と一致しているように思われる。

**【今後の展望】**

全9種類のRNAについてラベリング実験を繰り返し、より信頼性のあるデータを得る。

# 生態系の揺らぎ応答関係と内部進化の実験的説明

細田一史(大阪大)

## 【研究目的・背景】

生物は様々な分子や細胞によって構成されており、また様々な生物は生態系を構成している。すなわち生物は階層構造の中に存在し、生物の進化は上の階層である外部生態系での選択圧だけでなく、下の階層である内部分子等のネットワーク構造による制約の両面に制限される。よって進化の包括的理解には階層をまたぐ必要があり、本研究では生物の上下にある異なる階層を同じ理論で記述することでその理解に迫る。

外部適応の原理である自然選択は分子・個体・生態群集と異なる階層で働くことが明らかだが、内部制約の原理は明らかでない。生物の下の階層において、内部構造制約を表現する「揺らぎ応答理論(短期的な揺らぎと長期的な変化の関係)」があるが、異なる階層への適用は明らかでない。もしこの理論が生態系にも適用可能なら、分子から生態系をまたぐ理論へと発展し、自然選択などを含む統合理論の構築が飛躍的に進歩する。また人類の緊急課題である生態系変化の理解も躍進する。

本研究では、実験生態系における揺らぎ応答理論と、その生態系内部の生物進化を解析することで階層をまたぐ進化の包括的理解を目指す。

## 【研究計画】

約 20 種の微生物を混合した実験生態系を用いて短期的な揺らぎと長期的な変化の関係を解析する。具体的には本研究全体として下記 6 項目を行う。

- (1) 多様性などをある程度保ち継代培養できる条件を約 400 通りの中から 4 条件に絞る。
- (2) その 4 条件それぞれについて、約 100 の反復実験を行い、分散  $V_i$  (短期的な揺らぎ。i は一つの測定次元)を測定する。
- (3) その  $4 \times 100$  個の実験生態系を約 30 回(100 世代相当)継代して変化  $\Delta x_i$  (x は測定値)を測定する(進化実験)。
- (4)  $4 \times 100$  個の実験生態系の様々なパラメタの変化から  $V_i$  と  $\Delta x_i$  の関係性を解析する。
- (5) 進化実験の前後において大腸菌を単離し、ゲノムとトランスクリプトームの変化を測定する。
- (6) 以上を説明する数理モデルの構築を試みる。

平成 30 年度には以下のように(1)~(3)を行う。

- (1) 培養条件の選択: 実験生態系が比較的多様性を保ち安定となる条件を選ぶ。様々な条件(振盪と静置、光および温度の強度、炭素源濃度、その他栄養濃度など約 400 通り)での培養を、1 週間に一度、10 分の 1 に希釈して継代培養し、これを 8 回続ける。この中から 4 条件を選ぶ。
- (2) 生態系の短期的な揺らぎを計測: 上記 4 条件のそれぞれについて、約 100 反復の培養を 1 週間行い、約 40 次元のそれぞれの測定量  $x_i$  に対して分散  $V_i$  を求める。 $V_i$  は測定で得られた分散から、培養を行わずに同じサンプルを測定したときの分散を引いたものである。定量 PCR は生物種の数だけプライマーセットがあり多量になるため、凍結したサンプルを用いて(3)以降を行いながら測定していく。 $V_i$  は元の 4 条件の生態系それぞれについて、測定系の数だけ求まる。
- (3) 継代培養: 4 条件  $\times$  100 反復の実験生態系を約 30 回(およそ 100 世代相当)継代する。継代中は簡易に顕微鏡観察、プレートリーダ、FCM による測定のみ行い、最後は全ての測定系を用いて、各測定量での継代前後の変化  $\Delta x_i$  を測定する。それぞれの生物は 100 世代以上継代される(死亡があるためこれ以上になる。例えば大腸菌であれば 200~300 世代と予想される)。大腸菌や酵母の進化実験ではおよそ 100 世代あればゲノムに変異が入るため、進化が期待される(実験進化において最初の変異は有意義であることが知られている)。

## 【研究結果】

以下のように培養条件の選択と、測定系の確立を行った。

- ・ 培養条件の選択では、様々な栄養条件、空気の交換、温度や光強度などを試した。全種が安定に共存する条件は無かったが、生態系における生産者・分解者・捕食者がそれぞれ複数種存

在するような、比較的多様性を保ち安定となる条件が見つかった。また条件を少し変えることで、異なる種の存在比をもつ生態系をつくることができた。

・ 測定系は、基本的には計画通りであるが、顕微鏡についてのみ、計画以上の状況となった。計画当初では、技術的困難さから高倍率の顕微鏡データは用いない予定であったが、幸いにも高倍率データを容易に取得できる方法が確立したため、計画以上に有意義なデータをとれることとなった。なおこのため、計画当初では各生物種の個体数を直接は測定しない予定であったが、混合種数がある程度減らして特徴に重複が無い種の組み合わせにすることで、おおよそながら各生物種の個体数を測定することができるようになった。よって計画通りの 20 種程度を混合する生態系と並行して、7 種程度を混合する生態系も加えることにした。

#### **【今後の展望】**

以上のように順調に進んでおり、次の(2)と(3)に進む予定である。

# 植物感染糸状菌の共生性と病原性を規定する分子の進化論的考察

晝間敬、西條雄介(奈良先端大)

## 【研究目的・背景】

植物に感染する微生物は、宿主植物から受ける様々な進化圧(例:防御応答)によってその進化は通常よりも急速に進むことが考えられる。本研究では、植物根に感染する糸状菌が同種でありながら、同一宿主に対して片や共生型、片や病原型と対照的な感染戦略を示す、その好対照な進化の方向性を決定づけた因子の同定を目的とする。植物感染糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*)は世界中の様々な植物種からこれまで単離されている。例えば、スペインで自生するモデル植物シロイヌナズナから単離された *Ct* は貧栄養条件下でリンなどの必須栄養素を供給することで非菌根性植物の植物生長を促すことが明らかになっている(Hiruma et al., Cell 2016; Hiruma et al., Curr Opin Plant Biol 2018)。一方で、日本から単離された *Ct* の1株に関しては、*Ct* スペイン株とは異なり植物の生長を阻害する菌であることを新たに見出した。*Ct* の感染戦略は異なる地域・植物への適応の結果、同種内にもかかわらず共生型から病原型まで幅広く変化することが推察された。

## 【研究計画】

1. シロイヌナズナに対して多彩な感染戦略を示す *Ct* 株およびその近縁菌株を同定する。
2. 対照的な感染戦略を示す菌株のゲノム情報をそれぞれ取得し、比較ゲノム解析により菌株間での多様性及び相同性を示すゲノム領域(遺伝子)を同定する。
3. 菌株が宿主植物の根に感染中のトランスクリプトーム解析を行い、菌株間で遺伝子応答パターンが異なる遺伝子群を同定するとともに、同一菌株の中で遺伝子発現が大きく揺らぐ遺伝子群を同定し、*Ct* 菌株間での保存性を上記のゲノム情報も元に明らかにする。
4. 2. , 3. で絞り込んだ進化速度の速い遺伝子群が対照的な感染戦略を示す要因であるかを検証するため、植物・菌の候補遺伝子の欠損変異体を作成し、変異体における感染行動を記述する。
5. 共生型 *Ct* 株が病原菌化する変異体、及び、その共生能がさらに強まる変異体などに *Ct* を感染させ、感染根から *Ct* を再分離する。その後、各変異体に再接種する一連の流れを継続する。宿主植物を介して特定の進化圧を人工的に与えることで、各 *Ct* 株の共生能に与える影響を調査する。

## 【研究結果】

本発表では、計画1と5について得られた結果を主に紹介する。

異なる地域・植物種から単離された4 *Ct* 菌株については、スペイン株と比較すると若干その効果は弱い場合やバリエーションはあったものの植物生長を促すことが判明した。一方で、*Ct* の近縁種 (*C. liriopes*, *C. spaethanum*, *C. incanum*, *C. higginsianum*) は同一条件で植物生長を効率よく促せないか、もしくは、植物生長をむしろ阻害した。これらのことから、少なくともシロイヌナズナに対する植物生長促進効果は *Ct* 種が有するユニークな機能であること、および、植物生長促進効果の有無は菌保存領域のシーケンスデータを基にした系統関係からある程度推察できることが考えられた。一方で、重要なことに、日本から単離された *Ct* の1株に関しては、シロイヌナズナの生長を阻害する菌であることを見出している。以上の結果から、*Ct* の感染戦略は異なる地域・植物への適応の結果、同種内においても共生型から病原型まで幅広く変化することが推察された。現在は、計画2および3を進めて行くため、対照的な感染様式をとる菌株のゲノム情報を取得中である。

同時に、共生菌 *Ct* が病原菌化する植物変異体や逆に共生能が一層高まる植物変異体に *Ct* を感染させることで、宿主内で特定の進化圧を *Ct* に与える実験を行なっている。現在、各変異体に *Ct* を接種し、根の内部から *Ct* を再分離して再接種する流れを10回繰り返している。本発表では、再接種した *Ct* 株が野生型植物に与える影響について調査した結果についてもご紹介したい。

## 【今後の展望】

今後は、同種でありながら多彩な感染戦略を示す *Ct* 株および近縁種間での比較ゲノム解析とそれら株の植物感染時のトランスクリプトーム解析を行い、植物感染糸状菌の感染戦略の可塑性のメカニズムや、その進化の方向性を決めた因子の絞り込みを目指したい。また、進化実験によって得た菌株も合わせて同様に解析していくことで、共生菌の進化の方向性(共生か病原か)を遺伝子発現や表現型の揺らぎから予測するモデルを見出したい。

# 発現量揺らぎ一適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応一進化への影響

守屋央朗(岡山大)

## 【研究目的・背景】

細胞内のタンパク質には、その発現量の変動が適応度に強い影響を与える一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一制約を受けていないものがある。私たちは、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のほぼすべての種類のタンパク質を対象として、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、独自に開発した発現量揺らぎ一適応系(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、先行研究で構築されたこの発現量揺らぎ一適応系をハイスループット化することで、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一進化に寄与するのかを追求する。

私たちの発現量揺らぎ一適応系は、一つの生物が持つすべての種類のタンパク質の発現量の制約を体系的に調査できる唯一の実験系である。この実験系は、標的タンパク質の発現量揺らぎを過剰方向に数十倍拡張することができ、与えられた環境でどのタンパク質の発現変化が最も適応的かをプロファイリングできる。さらに、短期的に起きる適応と長期的に起きる進化の間に存在する、適応から進化に至る中期的なイベントを短時間で観察できる。これらの特徴から、本実験系は、進化制約方向性領域で検証・確立を目指す「制約進化理論」や「揺らぎ応答理論」が、真核細胞の適応一進化に適用可能かを実証するのに最適な実験系であると私たちは考えている。

## 【研究計画】

研究目的の2つの課題を追求するために、従来の発現量揺らぎ一適応系をハイスループット化し、様々な環境における発現量の制約と発現上昇による適応を並列に評価する実験系の構築を行う。実験系は、以下の3つのステップから成る。1) *S. cerevisiae* の 5,800 種類の各遺伝子を 2 $\mu$  プラスミドに連結し、それぞれを酵母に導入する(すべての遺伝子を発現量揺らぎ一適応系に乗せる)、2)この 5,800 種類の株を混合し様々な環境下で培養する(コピー数適応を一斉に行わせる)、3)混合培養後の細胞集団からプラスミドを回収し、各プラスミドのコピー数を次世代シーケンサーによるインサートの出現頻度により解析する(コピー数の制約と適応的コピー数を測る)。

平成30年度は、上記の実験系を完成させることを第一の目標とする。本研究で最もコストのかかる1の株の構築については、すでに先行研究で終了している。本研究では、特に2と3に注力する。系が完成できた時点で、高温・貧栄養・薬剤存在下などの様々な環境におけるプロファイリングへと移行し、年度中に5程度の環境をプロファイリングする。平成31年度は、酵母が通常増殖できないような過酷な環境での実験へと移行する。さらに、特定の環境下で制約が弱まったり適応的に働いたりするタンパク質が見つかった場合には、これらを個別培養してハイスループット解析の結果を再確認するとともに、より詳細なメカニズムの解析も行う。ある。私たちは、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のほぼすべての種類のタンパク質を対象として、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、独自に開発した発現量揺らぎ一適応系(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、先行研究で構築されたこの発現量揺らぎ一適応系をハイスループット化することで、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一進化に寄与するのかを追求する。

私たちの発現量揺らぎ一適応系は、一つの生物が持つすべての種類のタンパク質の発現量の制約を体系的に調査できる唯一の実験系である。この実験系は、標的タンパク質の発現量揺らぎを過剰方向に数十倍拡張することができ、与えられた環境でどのタンパク質の発現変化が最も適応的かをプロファイリングできる。さらに、短期的に起きる適応と長期的に起きる進化の間に存在



する、適応から進化に至る中期的なイベントを短時間で観察できる。これらの特徴から、本実験系は、進化制約方向性領域で検証・確立を目指す「制約進化理論」や「揺らぎ応答理論」が、真核細胞の適応-進化に適用可能かを実証するのに最適な実験系であると私たちは考えている。

#### 【研究計画】

研究目的の 2 つの課題を追求するために、従来の発現量揺らぎ-適応系をハイスループット化し、様々な環境における発現量の制約と発現上昇による適応を並列に評価する実験系の構築を行う。実験系は、以下の3つのステップから成る。1) *S. cerevisiae* の 5,800 種類の各遺伝子を 2 $\mu$  プラスミドに連結し、それぞれを酵母に導入する(すべての遺伝子を発現量揺らぎ-適応系に乗せる)、2) この 5,800 種類の株を混合し様々な環境下で培養する(コピー数適応を一斉に行わせる)、3) 混合培養後の細胞集団からプラスミドを回収し、各プラスミドのコピー数を次世代シーケンサーによるインサートの出現頻度により解析する(コピー数の制約と適応的コピー数を測る)。

平成 30 年度は、上記の実験系を完成させることを第一の目標とする。本研究で最もコストのかかる1の株の構築については、すでに先行研究で終了している。本研究では、特に2と3に注力する。系が完成できた時点で、高温・貧栄養・薬剤存在下などの様々な環境におけるプロファイリングへと移行し、年度中に5程度の環境をプロファイリングする。平成 31 年度は、酵母が通常増殖できないような過酷な環境での実験へと移行する。さらに、特定の環境下で制約が弱まったり適応的に働いたりするタンパク質が見つかった場合には、これらを個別培養してハイスループット解析の結果を再確認するとともに、より詳細なメカニズムの解析も行う。

# ネッタ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)

## 【研究目的・背景】

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。GRNの進化は一般的に次のような過程で起こると想定されている。(1)ゲノム中のシス制御配列の変化、(2)シス制御配列に結合する転写制御因子の種類や活性の変化、(3)標的遺伝子の発現時期・領域・量の変化、である。このシス制御配列を介した転写因子一標的遺伝子関係の進化は、進化発生学分野の大きなテーマの一つであり、特定の遺伝子の発現を制御するシス制御配列の系統間比較解析がこれまで数多くなされてきた。しかしながら、遺伝子発現制御機構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ような研究は未だなされておらず、GRN進化の制約と方向性を定量的・理論的に導き出すには至っていない。そこで、本研究ではこのGRNの進化が転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎとそれに対する応答によってもたらされているという仮説を立て、それを実験的に検証することを目指す。

## 【研究計画】

本研究ではネッタイツメガエル近交系を実験材料として用い、胚発生期における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎを測定する。具体的には、転写因子の結合の揺らぎをクロマチン共免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析で、標的遺伝子の発現の揺らぎを摂動実験(転写因子機能阻害)胚のRNA-seq解析で、シス制御配列の揺らぎをゲノムリシーケンスで、それぞれ定量的に測定する(図1)。その結果を基に、以下の三つの揺らぎ応答関係を実験的に検討する。

[研究1] シス制御配列非依存的な転写因子結合の揺らぎが標的遺伝子の発現制御に影響するのかを、明らかにする。近交系統内でシス制御配列にSNPがほとんどないことを確認した上で、転写因子結合が揺らぎやすいシス制御配列や標的遺伝子の特徴を明らかにする。

[研究2] シス制御配列のSNP頻度と、転写因子結合および標的遺伝子発現制御の揺らぎが相関するのかを、近交系統間の比較を行って明らかにする。シス制御配列を近縁種のアフリカツメガエルのゲノム配列とも比較し、種内の揺らぎが種間の揺らぎにまで反映されているのかを検討する。

[研究3] 転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎの大きさが、転写因子や発生段階の保存性と相関するのかを明らかにする。進化的な保存性が高く発生過程を通じて幅広く利用されている転写因子と、保存性が低く発生過程で一過的に発現する転写因子の揺らぎの大きさを比較する。さらに、同じ転写因子でも発生段階に応じて標的遺伝子の揺らぎが変化するのかを検討し、咽頭胚期の遺伝子発現の保守性を担保する制御メカニズムの一端を解明する。

## 【研究結果】

2018年5月に現所属に移動したため、残念ながらまだ実験を始められていない。

## 【今後の展望】

研究支援パートタイマーを1名雇用し、本研究課題を推進する。

## ゲノム倍数性をもたらす進化可能性～揺らぎと安定性の両立～

大林龍胆(遺伝研)、畠山哲央(東京大)

### 【研究目的・背景】

本研究では染色体(ゲノム)倍数化が生物進化に及ぼす影響とその過程を実験と理論の両面から解き明かすことを目的とする。ゲノムの倍数性は、現存する様々な生物種(真核、原核生物)に偏在する形質である。古くから倍数体生物は環境変動など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。ゲノム倍数性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が提唱されてきた。しかし、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、つまり、表現型の「揺らぎ」をより大きくした方が、進化速度が速いという一般的な原理から考えると、ゲノム倍数性は不利な形質にみえる。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打ち消されるまたは弱められるため、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ことになる。そこで、本研究では、これまでの理論のみに基づくと一見矛盾する、ゲノム倍数性による進化理論を実験生物学により定量的に捕えることで、ゲノム倍数化と進化の関係に存在する普遍原理の解明を目指す。

### 【研究計画】

ゲノムの倍数化が進化に与える影響の実験的な検証にあたり、本研究ではシアノバクテリアをモデル生物として用いて、人工進化実験を行う。シアノバクテリアは1細胞内に複数コピーゲノムを保持している原核生物である(大腸菌などの一般的な原核生物は1細胞あたり1つのゲノムを保持する1倍体)。そこで本研究では、人工ヘテロゲノム系による構成的手法を構築し、複数ゲノムのうち一部のゲノムが生存に有利な(変異を獲得した)場合、そのゲノムが集団内でどのように広がり、また淘汰されていくか、つまりヘテロな遺伝情報が表現型として固定されるまでの進化速度を検証していく。

### 【研究結果】

これまでに、複数ゲノムは細胞の成長に伴い、全てが同時に複製されるわけではなく、一つずつ複製されていることを明らかにした(論文投稿中)。さらに、各ゲノムを標識し(人工ヘテロゲノム系による構成的手法)、複数ゲノムがどのように遺伝されているのかをモニタリングする系を確立した。本発表では、これまでの結果を含めて紹介する。

### 【今後の展望】

人工ヘテロゲノム系による構成的手法により、複数コピーゲノムの動体解析が可能になった。今後はこの評価系を用いて、様々な環境下であるゲノムに変異が入った際に、表現型と遺伝子型がどのように固定されて行くのかを検証することで、ゲノム倍数体での進化過程を解明する。

# テントウムシ斑紋の揺らぎから探る表現型進化の制約と方向性

新美輝幸、安藤俊哉(基礎生物学研究所)

## 【研究目的・背景】

ナミテントウは、極めて多様性に富む斑紋多型を有する昆虫である。この多様な斑紋パターンは、単一遺伝子座に座位する複対立遺伝子により支配されており、それらの組み合わせによって決定されることが古くから明らかにされてきた。また興味深いことに、ナミテントウの紅型では温度や性に依存して黒点のサイズが揺らぐことが知られている。

本研究は、温度という環境変化に対して斑紋の黒点サイズが揺らぐ明瞭な現象を有するテントウムシに着目する。研究材料には、種・属・科のレベルで斑紋に多型性および単型性を示す各種テントウムシを用いる。我々がナミテントウにおいて同定した翅の黒色領域のパターンを決定する斑紋プレパターン遺伝子に焦点を絞り、これまでに確立した遺伝子機能解析法を活かし、斑紋プレパターン遺伝子 *pannier* の温度応答エンハンサーを通して、黒点サイズという表現型の揺らぎと斑紋多型という進化の可変性について「揺らぎ応答理論」が適用可能かを検証する。

## 【研究計画】

### 1. ナミテントウにおける温度摂動による黒点サイズ応答及び斑紋プレパターン遺伝子の発現応答の解析

表現型の安定性とそれを担う遺伝子の時空間的発現パターンの安定性の関係性を調べるには、生体内での遺伝子発現の動態と表現型の双方を可能な限り定量的に調査し、分子レベルで応答機構を解明することが重要となる。温度摂動による斑紋プレパターン遺伝子の発現の揺らぎを定量的 RT-PCR 法により測定するとともに、斑紋プレパターンを制御する *pannier* 遺伝子座を標的としたゲノム編集によって、温度応答性を担う分子機構の同定を試みる。

### 2. 各種テントウムシにおける温度摂動による黒点サイズの応答及び斑紋プレパターン遺伝子の発現応答の解析

実験材料には、ナミテントウと同じ *Harmonia* 属において、斑紋多型をもつクリサキテントウと斑紋多型が存在しないヤホシテントウ、さらにナミテントウと同じ亜科に属するテントウムシの中で斑紋多型をもつダングラテントウおよびヒメカメノコテントウ、斑紋多型をもたないナナホシテントウなどのテントウムシを用いる。これらのテントウムシを材料に、温度摂動による黒点サイズへの影響を調査する。温度応答性を示すテントウムシについては、前述の研究計画 1 の実験を行う。

## 【研究結果】

まず、翅の斑紋の黒色領域と赤色領域の面積を計測する方法を確立した。現在、各種テントウムシを用いて温度摂動による黒点サイズへの影響を調査している。

## 【今後の展望】

今後、我々が解読したナミテントウのゲノム情報を利用し、形質転換体を用いた遺伝子機能解析を行い、斑紋プレパターン遺伝子の温度変化に応答するエンハンサーを同定する。さらに、各種テントウムシを用い、斑紋プレパターン遺伝子の温度応答エンハンサーの共通性・多様性について検討し、環境変動による表現型の変わりやすさと遺伝子型の変化による表現型の変わりやすさとの相関を検証する。以上の結果を理論支援班と共有することにより、テントウムシの斑紋の制約や方向性を予測する制約進化理論を構築することを目指す。

## 第2回理論情報交換会報告

古澤力(理化学研究所/東京大学)

第2回理論情報交換会を、領域会議後に引き続き2018年7月20日に開催いたしました。

公募班メンバーが領域に参加して初めての理論情報交換会ということで、本領域の基礎となった理論研究とその展開について、東京大学の金子邦彦さんに講演をしてもらいました。本領域の目的の一つは、進化の過程における表現型の変わりやすさと、遺伝的要素に依存しない表現型揺らぎの間にある関係を明らかにすることです。その背景にあるのは、物理学における線形応答理論で、そこではいくつかの仮定の下で、系の揺らぎの大きさと、外力を加えたときの応答の大きさに比例関係があることが示されています。ここから、大きく揺らいでいる表現型の方が、選択圧という外力を加えたときに進化しやすいのではないかとという可能性が提示され、細胞モデルのシミュレーションや大腸菌を用いた進化実験によって、部分的ではありますが検証もなされています。今回の講演では、その理論的な解析がどのように行われてきたか、そしてWaddington的な地形を考えたときに、その揺らぎと進化の関係がどのように理解できるかが論じられました。また、最近の結果として、一つの選択圧で進化を経てきたネットワークでは、ランダムネットワークと比較して、より広い範囲で揺らぎ-応答関係が見いだせる可能性が提示されました。

「自分はこう考えるのだけど・・・」「発表がわかりにくい」「これは自明な関係なのでは?」「そもそもcanalizationとは・・・」といった様々な質問やコメントが飛び交い、当初は30分程度を予定していたセッションは、1時間を超えても終息する気配がありませんでした。最終的には座長が打ち切りを宣言し、次回以降に議論を持ち越すことになりました。領域の背景にある理論には不完全な部分も残されており、その理論を金科玉条のようにして研究を進めれば良いわけではないことが、明確に示されたと思います。一方で、こうした活発な議論を通じて、領域内から新たな「何か」が出現するのではないかと、という期待を抱かせる会になりました。

最後に、理論解析支援班の活動について説明がありました。理論的な視点からの研究デザインに関する議論や、数理モデルによる解析、そして多変量解析や予測モデルなどの数理解析について、領域内の理論研究者が支援を行うことを計画しています。支援の内容はそれぞれの班によって大きく異なると予想されるため、特定のフォーマットに沿った支援申請の仕組みは考えていません。「こんなことが出来ると良いのだけど?」といった質問でも良いので、支援班代表の古澤(chikara.furusawa@riken.jp)まで連絡を頂ければ幸いです。

## 国際活動支援について

入江直樹(東京大学)

領域メンバーの皆さん、特に今回初めて領域会議に参加された公募班の方々には、何を支援してくれる班なのだろう・・・と思われた方も少なくないかもしれません。簡単に言ってしまうと、「本領域の学術的目標達成のための国際活動を支援する」のが国際活動支援班の役割です。海外の学会・研究会・研究施設に班員を派遣したい場合や、海外から研究者を招聘するために必要な費用などを支援します。学会等での成果発表に限らず、共同研究のための議論や、研究遂行のための情報収集・技術習得や、本領域の構想を海外の研究者に情報発信する場合なども支援対象になります。ちなみに支援対象は各班の代表に限りません。多くの科学的発見は、若い世代が新しい時代・世界観を切り拓くことでもたらされてきました。例えば大学院生であっても、妥当かつ十分な理由を説明いただければ支援対象になります。理論・情報解析・実験を自在に活用できる新世代を育てるチャンスとして、本支援を活用いただければと思います。ただし国際活動といっても、国際共同研究で用いる物品費や消耗品費などは支援できませんので、ご注意ください。

支援申請は、申請用紙(以下 URL よりダウンロードできます)に記入のうえ、  
intl\_support@constrained-evo.org までお送りください。様式、送付先などの詳しい情報は以下を参照ください。

[http://constrained-evo.org/international\\_activity.html](http://constrained-evo.org/international_activity.html)

各支援申請については、申請頂いた書類内容に基づき、支援班員(計画班の代表6名全員)が審査し、支援対象を決定します。効果的な予算執行と支援のため、申請書を完成させるだけの情報がない段階であっても、支援申請を検討されている方は早めに国際活動支援班までご連絡いただければ幸いです。

なお、支援申請の審査にあたっては、本領域の学術的目標に沿った内容かどうかを重視します。本領域のメンバーから、進化の制約と方向性を研究する国際的潮流を生み出していただければと思います。

## **Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 2 No. 3**

発行：2018年7月24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/>