

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0074

研究課題名(和文) 転写制御ネットワークの頑健性と柔軟性、相転移の実験的検証

研究課題名(英文) Robustness, flexibility and phase transitions of the gene regulatory network.

研究代表者

和田 洋 (Wada, Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60303806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物の形態進化は遺伝子の変化によりもたらされた。形態形成を司る遺伝子は転写制御というネットワークの形で機能している。このネットワークの特徴が、突然変異や環境変動に対するロバスト性に関する要求によって、どのように形作られてきたかを明らかにした。また、軟体動物と棘皮動物の初期発生過程の研究から、この転写制御ネットワークが従来考えられてきたよりも、非常に多様であることも明らかになった。発生過程に大きな変更をもたらさないネットワークの多様性が、生物の多様な形態の創出に結びついていた可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の進化は人が人生よりもはるかに長いスケールで進行する現象なので、一般社会に理解が浸透しにくい。自然選択の概念は比較的受け入れやすいが、選択の素材となる形態の多様性が遺伝子の書き換えからどのようにもたらされるかについて、わかりやすく説明することが求められている。本研究は、そのような形態の多様性の創造プロセスに、遺伝子制御機構のネットワークとしての性質が深くかかわることを示したものであり、社会の進化という現象の理解の増進に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Morphological evolution of animals was brought about by genetic changes. The genes responsible for morphogenesis function in the form of a gene regulatory network. We clarified how the characteristics of this network have been shaped by the need for robustness against mutations and environmental changes. The study of the early developmental processes of molluscs and echinoderms also revealed that this transcriptional regulatory network is much more diverse than previously thought. Network diversity that does not bring about many changes in developmental processes may have been linked to the creation of diverse forms of animals.

研究分野：進化生物学

キーワード：遺伝子制御ネットワーク 形態進化 棘皮動物 軟体動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は、様々な環境の変動にさらされている中でも、受精卵という1細胞からの発生過程を正確に遂行していく頑健性ロバストネスという特性をもつ。その一方で、変動する環境に対応していく際に(結果として)利用される遺伝的な多様性も内包している。このようなスタンディングバリエーションは、遺伝的な変異の影響を受けずに発生過程を遂行するため、適応度に大きな影響を与えないまま集団内に維持されているという意味で、遺伝的な変異に対する頑健性とも捉えられる。その一方で、環境変動に対する適応とも深く関わることから、環境変動に対するネットワークの柔軟性フレキシビリティと捉えることもできる。

このような頑健性や柔軟性という生物の特性は、発生プロセスなどに関与する転写制御ネットワークの特性として理解されるであろうと、多くの研究者は考えている。しかし、我々はまだ転写制御ネットワークの実像をつかみあぐねている。ネットワークの構築をウェットな実験をベースにして構築するには、膨大な実験が必要であり、転写因子とシス制御エレメントの対応をゲノム配列から推定していく方法も十分な精度があるとは言いがたい。そこで、我々は、遺伝子発現データだけから、動力学モデルに基づいて、転写制御ネットワークを推定する方法の開発に取り組んできた。まず、多細胞動物の発生過程で現在最も精度が高く遺伝子制御ネットワークが推定されている棘皮動物ウニの遺伝子発現データを元に、ネットワークの推定を行った。約50の転写因子が4つの細胞タイプに分化していく過程での遺伝子発現をもとにネットワーク推定を行った。様々な試行錯誤を経て推定したネットワークについて、遺伝子の機能阻害などの実験データを正確に再現できるかどうかに基づくクロスバリデーションによって、推定ネットワークの評価を行ったところ、50%以上の実験結果を再現できるまでに予測精度が高まった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、1) 転写制御ネットワークの性質を理論的な側面から明らかにしていくことを目標の1つとした。遺伝子ネットワークの推定において、同一の遺伝子発現パターンに対して複数のネットワークが推定可能であることを確認していた。これは、生物では実現されていないかもしれないが、理論的には同じ機能を有する多数のネットワークが潜在し、多様性を有していることを示唆している。そこで多様性を取得可能なネットワーク推定技術を開発することによって、どの程度の多様性を生物が選択しているか、生物の特性としての頑健性および柔軟性はネットワーク多様性にどのように関連するかを理論的に明らかにすることを目指した。さらに、2) 自然界における遺伝子転写制御ネットワークの頑健性、柔軟性の検証を行うことを目的として、近縁種の日本産バフンウニで遺伝子発現データを整えて、中内胚葉細胞の分化におけるネットワーク推定を行い、既に用いているアメリカムラサキウニのものと比較し、転写制御ネットワークに遺伝的な多様性が内包されているかを検証することを目指した。

3. 研究の方法

目的1)に関しては、アメリカムラサキウニの遺伝子発現データを元に、転写制御ネットワークの推定を行い、また、ENCODEやDroidなどの遺伝子発現制御データベースを用いて、解析を行った。

目的2)3)に関しては、バフンウニとノコギリウニを用いたトランスクリプトーム解析に加えて、*in situ hybridization*、モルフオリノオリゴヌクレオチドによる遺伝子機能阻害、mRNAの顕微注入による遺伝子の強制発現などの実験を行い、検討した。また、研究を進める過程で、軟体動物の転写制御機構の初期段階に興味深い多様性が内包されていることを発見したので、

その現象についても、トランスクリプトーム解析に加えて、in situ hybridization、モルフォリノオリゴヌクレオチドによる遺伝子機能阻害、mRNA の顕微注入による遺伝子の強制発現などの実験を行い、検討した。

4 . 研究成果

1) 転写制御ネットワークの性質の理論的な解析

アメリカムラサキウニの内中胚葉における転写因子の発現プロファイルから、動力学モデルにより遺伝子ネットワークの推定を行った。遺伝子ネットワークは転写因子間の結合密度に応じて、複数のモデルが推定され、遺伝子発現パターンを再現することができた。

そこで、アメリカムラサキウニは自然選択の過程で、どのような結合密度のネットワークを持つようになったかを調べるために、自然選択の要因として、転写因子の発現の変動と転写因子の結合配列に入る突然変異の影響を想定して、解析を行った。その結果、前者の発現変動をシミュレーションした結果、結合密度が低いほど影響が小さく、後者の突然変異に関しては結合密度が高いほど影響が小さいことが分かった。そのトレードオフの関係の中で、結合密度係数が 0.25 周辺に、最適値があることが想定された。

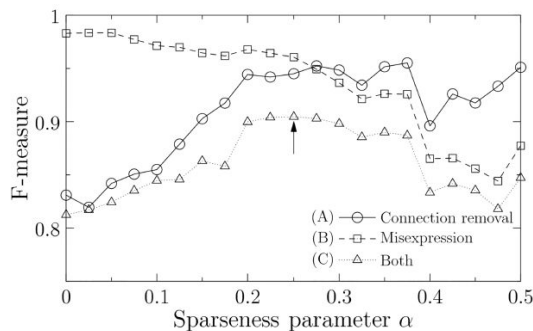


Fig 7. Robustness of perturbed networks as a function of sparseness parameter α . As the robustness, we show the average F-measure in 1,000 optimal solutions. The types of perturbations are (A) connection-removal perturbation ($n_c = 10$), (B) misexpression perturbation ($A = 10$, $\mu = 0.01$), and (C) the addition of both perturbations. Optimal robustness in (C) is observed at $\alpha = 0.25$ (indicated by an arrow). The other parameters are fixed at $C = 0.1$, $\sigma = 2$ [n], $d_{\text{max}} = 0$ [n], $d_{\text{min}} = 2$ [n], $\epsilon = 0.5$, and $\theta = 1$.

実際にアメリカムラサキウニでこの値のネットワークが実現されているかを、転写因子の機能阻害実験の結果を最もよく予測できるネットワークで検証したところ、確かにその結合密度係数でもっとも結果を忠実に再現できていることが明らかになった。

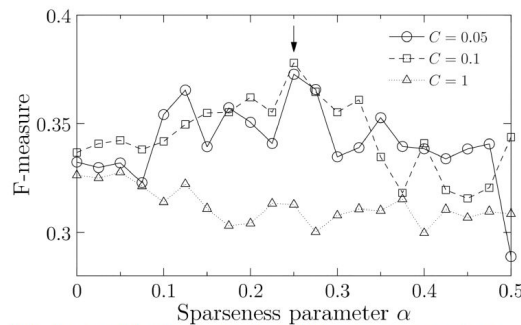


Fig 8. Accuracy for gene perturbation data as a function of sparseness parameter α . We show the average F-measure for each soft-margin parameter C in 1,000 optimal solutions. The optimal F-measure is observed at $(\alpha, C) = (0.25, 0.1)$ (indicated by an arrow). The other parameters are fixed at $d = 2$ [n], $d_{\text{min}} = 0$ [n], $d_{\text{max}} = 2$ [n], $\epsilon = 0.5$, and $\theta = 1$.

以上のことから、アメリカムラサキウニの転写制御ネットワークは、転写因子の発現の変動と転写因子の結合配列に入る突然変異の影響のトレードオフの関係の中で、形作られていることを示唆する結果を得た。

さらに、転写制御ネットワークの性質について、理論的な解析に踏み込み、興味深い成果を得た。リアルワールドネットワークの多くがその構造的な特徴としてスケールフリー性を有している。スケールフリー性とはノード毎の結合数が高分散である冪乗則分布に従うことであり、一部のノードは非常に多数の結合を持ち、他の大多数のノードは少数の結合を持つという特徴を有する。転写制御ネットワークはスケールフリー性を有しつつも、一般のリアルワールドネ

ネットワークとは異なる性質を持つ。すなわち、ノードの出力数はスケールフリー性を有するが、入力数はより低分散のポアソン様の分布となる。ここでノードの出力数はある転写因子が制御する遺伝子の数、入力数はある遺伝子を制御する転写因子の数に対応する。

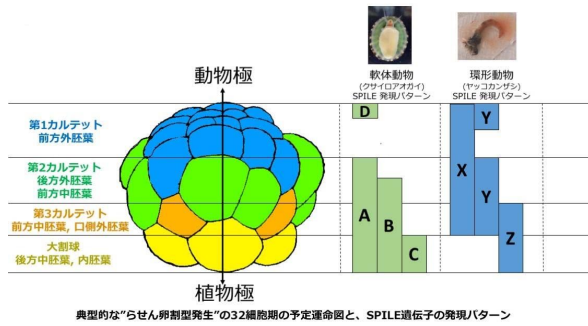
そこで、我々は遺伝子ネットワークが有するこの「半スケールフリー性」は遺伝子発現のロバスト性を実現するために獲得されたものであるという仮説を立て、数理的な検証を行った。遺伝子発現のロバスト性とは、結合の切断(プロモータの変異)やノードの除去(転写因子の機能不全)があっても同様の遺伝子発現を維持する能力である。遺伝子ネットワークモデルの解析によって、入力数の分散は低く、逆に出力数の分散は高いほどネットワークはロバストであることが示された。

この結果の意義は遺伝子ネットワークの詳細なパラメータ、たとえばある転写因子の作用が促進的か抑制的かなどを知らなくても、結合数の分散のようなネットワークの構造的特徴のみによってロバスト性が評価できることである。逆に言えば、遺伝子ネットワークにおいてロバスト性が必須な能力であれば、転写因子の詳細な制御関係とは独立に半スケールフリー性の構造的特徴が遺伝子ネットワークに獲得されるはずである。実際に我々は大腸菌、ショウジョウバエからヒトに至る様々な生物種の遺伝子ネットワークを同定し、それらの出力数分散は高くかつ入力数分散は低いという結果を示した。従って、ロバスト性に起因する半スケールフリー性は幅広い生物種の遺伝子ネットワークにおいて普遍的な特徴であると推察される。

2) 自然界に内包されている転写制御ネットワークの多様性

当初の計画には含めていなかった、軟体動物の転写制御ネットワークに関しても大きな成果を得ることができた。この成果は、軟体動物のゲノム解析の共同研究で、軟体動物を含む冠輪動物に特有のホメオボックス遺伝子を発見したことに端を発する。軟体動物は、「らせん卵割動物」と呼ばれることもある冠輪動物に属し、初期の受精卵の卵割(細胞分裂)がらせん状に進む。すなわち、卵の動物-植物極軸に沿って、特定の位置に特定の組織になる定め(発生運命)を持った割球群が生み出されるパターンが保存された特徴である。軟体動物のゲノム解析の中で、この冠輪動物にしかない TALE 遺伝子群(SPIralian-taLE, SPiLE 遺伝子)を発見した。この SPiLE のクサイロアオガイ(軟体動物である巻貝の一種)およびヤッコカンザシ(環形動物ゴカイの一種)における遺伝子発現を解析したところ、発生運命の分配が起きる初期卵割期というタイミングで、動物-植物極軸に沿って入れ子状に発現していることが明らかになった。さらに、クサイロアオガイにおいて SPiLE 遺伝子群の機能を調べたところ、割球運命の規定に実際に関わっていることが示された。以上のことから、らせん卵割型発生に見られる動物-植物極軸に沿った割球群の運命の割り当てを制御しているのは、SPiLE 遺伝子群であることが明らかになった。このことは、冠輪動物に特有のらせん卵割型発生システムは、モデル動物ではうまく当てはまる「共通する遺伝子の使い回し、使い方の変更」ではなく、新規な遺伝子群を獲得したことによってもたらされた可能性を示している。

さらに興味深いことは、SPiLE 遺伝子が冠輪動物の中で、非常に頻繁に遺伝子重複と遺伝子欠失を繰り返しており、遺伝子の系譜と機能に対応していないことである。図で、クサイロアオガイとヤッコカンザシで遺伝子の名前が異なっているのはそのためである。初期の割球運命の分配という非常に重要な機能が、相同な遺伝子で受け継がれてきていないことが明らかである。



また、棘皮動物の初期転写制御ネットワークの多様性に関しても明らかにした。アメリカムラサキウニでは、母性因子として卵の極性をつくるカテニンの下流で最初に接合子のゲノムから発現する遺伝子として Pmar が知られている。Pmar は内中胚葉分化の抑制因子である HesC の発現を抑制することで、内中胚葉分化を促進することが知られていた。しかし、Pmar はウニにしか存在せず、祖先的な棘皮動物のもつ内中胚葉分化の制御機構の最上流にこのような遺伝子が挿入されるという現象が、どのような進化的な歴史を経れば可能であるか、調べた。我々はヒトデや原始的な発生過程を経るウニ、ノコギリウニで Pmar の祖先となった phb 遺伝子が存在し、やはり抑制遺伝子として別の抑制遺伝子を介して内中胚葉の分化を促進していることを明らかにした。

しかし興味深いことに、この Phb が抑制する因子は HesC ではなく、別の抑制因子であることが明らかになった。したがって、ウニにおいて Pmar/HesC の二重抑制機構が成立するには、別の抑制因子が担っていた内中胚葉の抑制機構を HesC が乗っ取ることで、さらにその HesC を抑制する機能を Pmar が獲得することの2段階が必要であることが明らかになった。今後は、ヒトデのもつ未知の抑制因子の同定などを通して、どのような中間段階を経ることで、発生プロセスを崩壊させることなく、Pmar/HesC の二重抑制機構が獲得されたかについて、明らかにしていく。

以上の軟体動物と棘皮動物の研究で、動物の初期発生過程は、その後の発生の進行に影響を与えることなく、初期過程に改変を加えていることが明らかである。このような成果から、以下の二つの問題が提示された。一つは、どのようにして発生プロセスを崩壊させることなく初期の発生過程、あるいは上流の発生過程を改変するのかという問題である。もう一つは、なぜこのような大規模の改変が、発生の最初期に起こっているのか、という問題である。この二つの問題は、進化の歴史の中でどのようにしてボディープランの変更につながるような発生過程の改変が起こるのか、また発生プロセスの多様性が最初期に見られる発生進化の砂時計モデルとも関わっている。今後、実験的な操作の行える軟体動物と棘皮動物の系を使って、さらに研究を進めていく。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

- Natsuhiro Ichinose, Tetsushi Yada, and Hiroshi Wada. Asymmetry in indegree and outdegree distributions of gene regulatory networks arising from dynamical robustness. *Phys. Rev. E* 97, 062315 (2018) 査読有 DOI: 10.1103/PhysRevE.97.062315
- Yoshiaki Morino, Naoki Hashimoto, and Hiroshi Wada. Expansion of TALE homeobox genes and the evolution of spiralian development. *Nature Ecology and Evolution*. 1, 1942-1949 (2017) 査読有

DOI: 10.1038/s41559-017-0351-z

- Natsuhiro Ichinose, Tetsushi Yada and Hiroshi Wada. Estimating Optimal Sparseness of Developmental Gene Networks Using a Semi-quantitative Model. Plos One.12, e0176492 (2017) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0176492

〔学会発表〕(計 24 件)

- Atsuko Yamazaki, Yoshiaki Morino, Mao Nitobe, Hiroshi Wada. Characterization of gene regulatory network for adult skeletogenesis in a starfish *Patiria pectinifera*: Implications for innovation of larval skeletons in echinoderm. The European Society for Evolutionary Developmental Biology (国際学会) 2016年07月27日Uppsala, Sweden.
- Yoshiaki Morino, Hiroshi Wada. Increased number of spiralian TALE homeobox genes in bivalve lineage and evolution of cell fate segregation program in the early development. 7th Meeting of the European Society for European Developmental Biology (国際学会) 2018年6月28日Galway, Ireland.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~hwada/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：市瀬 夏洋

ローマ字氏名：Natsuhiro Ichinose

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院情報学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：70302750

研究分担者氏名：矢田 哲士

ローマ字氏名：Tetsushi Yada

所属研究機関名：九州工業大学

部局名：大学院情報工学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10322728

(2)研究協力者 なし