

研究終了報告書

「多細胞生物の進化に倣った染色体操作及び器官再構成法の開発」

研究期間：2020年11月～2024年3月

研究者：安藤 俊哉

1. 研究のねらい

本研究では、多細胞生物が進化の末に獲得した機能的な器官の特徴付けを行う鍵遺伝子座に着目した。鍵遺伝子座を別種生物の染色体上に大規模に移植することで、人為的に器官の特徴を再構成することを目指した。その実現に必要な、鍵遺伝子の転写制御機構の解明と染色体操作技術の開発を進めた。具体的には、テントウムシの翅の斑紋の色素細胞分化パターンを進化を担ってきた鍵遺伝子座 *pannier* (GATA 転写因子遺伝子)に着目して計画を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、以下の3つの研究計画を進めた。

計画1 ナミテントウの斑紋進化の鍵遺伝子 *pannier* の転写制御機構の解明

計画2 ナミテントウの斑紋進化の鍵遺伝子 *pannier* の 100 kb スケールの染色体断片を他種・他系統の昆虫への移植技術の開発

計画3 数百万年前に生じた *pannier* 遺伝子座での逆位の復元による生命進化を模倣した斑紋パターンの操作

計画1 に関しては、非モデル昆虫であるナミテントウの斑紋進化の鍵位遺伝子 *pannier* の転写制御機構の理解を目的として、single nucleus RNA-seq 法による上流制御因子の探索を進め、転写制御因子候補を見出した。さらに、候補因子が *pannier* 遺伝子座周辺の制御配列への直接の結合性を検証する方法として、さきがけ 2 期・原田哲仁博士と協力して実験系を確立した。

計画2 に関しては、100kb スケールの染色体断片を他種の染色体上に移植する上で重要な基盤技術として、広範な昆虫で、高効率にノックインを誘導する方法を見出した。また、モデル生物のキイロショウジョウバエに対して ϕ C31 インテグラーゼを利用して DNA を挿入するランディングシステムを作出した。

計画3 に関しては、CREST 北野グループの研究に触発されて、人工的に種分化のきっかけとなるゲノム構造に関連する染色体操作実験を検討した。さらに、個体内の組織において、表現型の変化に関連する転写制御機構の転換を分子レベルで解明するためのエピジェネティック修飾状態を解析するプロトコルを確立した。

(2) 詳細

計画 1: ナミテントウの斑紋進化の鍵遺伝子 *pannier* の転写制御機構の解明

多様な斑紋を示すテントウムシは表現型進化の研究モデルであるが、分子遺伝学分野における所謂非モデル生物である。従って、進化の鍵遺伝子座 *pannier* が獲得した 100 kb サイズのイントロン内の転写制御配列を含めた、あらゆる遺伝子の転写制御機構が未解明であった。本計画では、single nucleus-RNAseq・ChIL-seq・ゲノム編集といった技術を活用して、染色体断片の移植によって他種生体内で機能させる *pannier* 遺伝子の転写制御複合体の内在での機能実態を解明することを目指し、関連するシグナル伝達経路と転写因子を同定した。さらに、これらのシグナル伝達に関わる転写制御因子が *pannier* 遺伝子座へ直接結合することを検証するアッセイ系を構築した。

計画 2: ナミテントウの斑紋進化の鍵遺伝子 *pannier* の 100 kb スケールの染色体断片を他種・他系統の昆虫への移植技術の開発

進化の過程で獲得された 100 kb スケールの転写制御配列を他種生物に移植して、斑紋形成に関わる遺伝子制御ネットワークを起動するために必要な染色体移植技術の開発を進めた。

計画 3: 数百万年前に生じた *pannier* 遺伝子座での逆位の復元による生命進化を模倣した斑紋パターンへの操作

CREST 北野グループが着目しているように、近年の集団ゲノミクスの発展により、種分化に関連した表現型進化において、染色体逆位などの染色体の構造変換が重要な役割を果たす可能性が示唆されてきた。関連するゲノム領域で見られる遺伝情報をもとにゲノムを書き換える技術を確認した。一方で、分化途中の組織における細胞核内でのエピジェネティックな修飾状態を解析するプロトコルの確立が必要であることが判明し、テントウムシに最適化したプロトコルを確認した。

3. 今後の展開

計画 1・計画 2・計画 3 の推進に必要な解析技術の開発を進めてきたが、それぞれの計画の最終目標の達成には至っていないので、計画に関連する研究費を獲得して、計画の達成を目指す。

社会実装に展開する可能性のある技術として、ゲノム編集を利用した表現型操作技術が挙げられる。応用先としては、多細胞生物を対象とする為、農産物の育種への応用が見込まれる。いずれも、カルタヘナ法における第一種使用に該当する場合社会実装するには、上記の技術のさらなる開発と、環境への影響の評価が必要となると見込まれる。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

本研究計画は、非モデル生物の個体を対象に、多細胞生物の生命進化プロセスの一部を他種個体内で復元操作技術の開発を通して、生命進化の分子基盤の解明を目指す挑戦的な研究課題であった。特に、非モデルの多細胞生物では、確立された前例がほとんどないゲノム編集を利用した DNA 挿入技術・エピジェネティック修飾の解析技術の確立を目指して、領域内の各分野の専門家と議論・研究アイデアの共有・共同研究を進め、最先端の分子遺伝学における遺伝子操作技術・エピジェネティクス解析技術を確認できた点は高く評価できる点だと考えている。一方で、

さきがけ計画には、目標を高く・多く設定しすぎた為に、最終的な達成目標まで、期間内に到達できなかった点が反省点である。一方で、汎用性の高い新たな実験系構築のシーズを見出したため、今後注力して開発を進めていきたいと考えている。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

代替の実験系や、実験プロトコルの最適化を進める上で、研究補助員の雇用は効果的であった。ポスдок経験者・博士の学位取得直後の研究者・分子生物学の経験を持つ技術員の3名を雇用したが、DNA インジェクション技術・次世代シーケンス解析技術・分子生物学実験技術といった、必要技術に精通しており、指示に従って効率的に実験系の確立ができた。一方で、さきがけ研究期間内に独立したことで、教育業務・書類業務・実験系の立ち上げに時間を割く必要が生じたため、独立後1年間、実験の効率(特に実験の指示を出す効率)が低下した点は反省点である。スタートアップ支援によって、さきがけ研究を進める上で必要な機材や新たな実験系の立ち上げがスムーズに行えたのに対して、研究以外のマネジメント体制の構築に即座に投資すべきだったことを特に反省している。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究計画の目標である、生命進化の過程で獲得されてきた器官の進化に関連するゲノム情報を参考にして表現型操作する技術は、地球上で40億年かけて獲得してきた染色体上の機能構造を実験生物の体内で復元して理解する実証実験に基づいた新たな進化生物学分野の開拓に重要な技術である。さらに、「今後の展望」で述べた社会実際に向けた技術に昇華する上でも重要な技術である。本研究内では、目標達成に必要な要素技術の確立にとどまっているが、今後の更なる開発によって技術確立が達成されることが見込まれる。また、表現型進化に関連する分子基盤を解明することで、新たな表現型進化の様式の解明や、表現型進化の予測・表現型操作に役立つことが期待される。

研究成果の発表について

本研究は、多細胞生物の表現型進化の分子基盤の解明を目標として、既存の技術を非モデル生物に適用する検討を進めるのが主な計画であった。確立した技術が論文出版に至っていないのが反省点である。早急に基本技術の出版を進める必要がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

(1) Phenotypic diversification through repeated chromosomal inversions at the key locus of color

- pattern formation in the harlequin ladybug Toshiya Ando, Taro Nakamura, Teruyuki Niimi 第 43 回日本分子生物学会年会 2020/12/04
- (2) 大規模な自然変異を再現して検証する『構成的進化生物学』に必要な遺伝学的ツール ～ テントウムシにおける取り組みを例に～ 安藤俊哉 日本進化学会第 23 回東京大会 2021/08/19
- (3) ナミテントウの斑紋多型と関連した染色体逆位の人為的再構成に向けて 安藤俊哉、中村太郎、松岡佑児、新美輝幸 令和 4 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 92 回大会 2022/03/14
- (4) Genetic tool development for understanding the molecular basis of intraspecific color pattern diversification in the ladybug Toshiya Ando the 55th Annual Meeting of Japan Society of Developmental Biology 2022/05/31
- (5) ナミテントウの種内に見られる多様な斑紋パターンの形成に関わる分子基盤の解明に向けた技術開発 Yuji Matsuoka, Toshiya Ando , Teruyuki Niimi the 55th Annual Meeting of Japan Society of Developmental Biology 2022/06/03
- (6) 多細胞生物の表現型の進化方向性にエピジェネティック情報が与える影響の理解に向けて 安藤俊哉 第 15 回日本エピジェネティクス研究会年会 2022/06/09
- (7) 非モデル昆虫における CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子挿入技術の開発 松岡佑児、中村太郎、安藤俊哉、新美輝幸 日本動物学会第 93 回早稲田大会 2022/09/09
- (8) Goldschmidt の Systemic mutation model 再考:ナミテントウの逆位が引き起こす表現型進化の復元実験に基づく考察 安藤俊哉、松岡佑児 日本進化学会第 25 回沖縄大会 2023/08/31
- (9) ナミテントウ斑紋の性的二型の遺伝的基盤 家木壮一、安藤俊哉 日本進化学会第 25 回大会 2023/09/02
- (10) 生命が示す幾何学的機能形態の「形成」と「進化」の分子基盤を昆虫を使って理解する 安藤俊哉 第 33 回 ERATO 共生進化機構先端セミナー 2024/03/16

受賞

- (11) 日本動物学会 奨励賞 「マクロスケールからミクロスケールまでの昆虫の機能的形態の形成機構の研究」 安藤俊哉 2021/09/03

シンポジウム企画

- (12) 日本動物学会第 93 回早稲田大会 Recent advances in targeted gene knock-in techniques in Emerging model animals 安藤 俊哉・安齋 賢 2022/09/09