

## 植物の確率論的なふるまいに基づいた戦略

オーガナイザー

川出 健介<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>生命創成探究センター 植物発生生理研究グループ

<sup>2</sup>基礎生物学研究所 植物発生生理研究室

<sup>3</sup>総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

Kensuke Kawade<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Plant Development and Physiology Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS)

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Development and Physiology, National Institute for Basic Biology

<sup>3</sup>Department of Basic Biology, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, 444-8787 Aichi, Japan

北沢美帆<sup>4,5</sup>

<sup>4</sup>大阪大学全学教育推進機構

<sup>5</sup>大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

Miho S. Kitazawa<sup>4,5</sup>

<sup>4</sup>Center for Education in Liberal Arts and Sciences, Osaka University

<sup>5</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University

DOI: 10.24480/bsj-review.10a1.00148

確率論的なふるまいは、分子、細胞、器官、さらには生態系レベルまでの幅広い階層で見られ、量、形、種類など様々なばらつきをうみ出す。近年の実験および理論的な研究から、このばらつきこそ、集団の構造を安定化させる要因であることが明らかにされ始めている。私たちは、この分野の現時点での理解を共有し、生物が示すばらつきについて定量的に真正面から議論するため、日本植物学会第82回大会（2018年9月、広島）において、シンポジウム「植物の確率論的なふるまいに基づいた戦略」を企画した。本総説集はその内容を改めてまとめたものである。

生物現象は、基本的にばらつきを含むものである。これまでの多くの場合、実験による観測結果を平均化したものが、研究対象の代表的な振る舞いとして解釈に用いられてきた。しかし、次世代シーケンシングやイメージングなどの技術が革新的に向上することで、迅速かつ高精度に生物現象を定量できるようになってきた。さらに、観測結果を統計数理的に解析する研究も相まって進展したことにより、平均値のみならず、ばらつきも生物学的・物理学的な意味と紐付けられるようになってきた。このような背景から、生物の各階層でみられるばらつきがどのように起こり、

さらに、そのばらつきを生物がどのように活用しているのか明らかにする重要性は次第に認識され始めている。そこで本総説集では、遺伝子発現レベルでのばらつき（栗津&永野）、細胞レベルでのばらつき（川出、津川）、器官レベルでのばらつき（北沢）、個体から生態レベルでのばらつき（柿嶋）を取りあげて、その特徴を定量的に記述し、ばらつきが生じる仕組みや生体機能との関係について考察している。これらが、この新しい研究の潮流を植物科学の立場から大いに盛り上げる一助になることを期待している。

最後に、本総説を執筆する機会を下さった日本植物学会・電子出版物編集委員の方々に深く感謝します。ご期待に応えられる仕上がりになっていることを、心より願っております。

## 遺伝子発現の確率性：ばらつきの特徴・背景・機能との関係

栗津 暁紀<sup>1</sup>, 永野 惇<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 広島大学大学院理学研究科

〒739-8526 広島県東広島市鏡山 1-3-1

<sup>2</sup> 龍谷大学農学部

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

Akinori Awazu<sup>1</sup>, Atsushi J. Nagano<sup>2</sup>

**Stochastic behaviors of gene expressions:**

**Features, backgrounds, and relationships to functions of fluctuations**

Keywords: Feedback, function, regulation, stochasticity, transcriptome

<sup>1</sup>Dept. of Math. and Life Sciences, Hiroshima Univ., Higashi-hiroshima, 739-8526 Japan

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Ryukoku University, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a2.00149

### 1. 目的

本小論では、遺伝子発現に現れる確率性（個体間でのばらつき、または個体間での揺らぎ）が示す特徴、その特徴が現れる背景、及びその生命機能との関連について、少し前に出版された論文（Awazu et al. 2018。\*以降「論文 X」と呼びます。）の内容に触れつつ紹介する。この論文 X では、20 個体以上の同一生育時期にあるシロイヌナズナの RNA シークエンスを行うという、従来ほぼ行われてこなかったサンプリングに基づいて考察が進められており、そのデータと得られた知見を是非多くの方に有効利用して頂きたいと思っている。しかしこの論文は数理的な色合いがやや強く、実験を主たる研究手段としている方々にはやや読み難いものになっている感がある。そこで詳細は論文 X をご参照頂くとして、本小論ではその内容のエッセンス、このような研究を行った背景、及び得られた結果の幅広い有用性を、少しでも伝えられたらと思っている。

### 2. 遺伝子発現量の「ばらつき」に注目する意義

同一の遺伝型を持つ個体間で遺伝子発現量（表現型）が大きくばらつく事は、よく見られる事である。そしてこれまでに、その「ばらつき方」の統計性やその背景について、様々な細胞・生物を用いた考察が進められている（Chang et al. 2008, Elowitz et al. 2002, Furusawa et al. 2005, Newman et al. 2006）。特に大腸菌では、1000 種類以上の遺伝子に対する網羅的な解析から、各遺伝子の個体（細胞）毎の発現量がガンマ分布に従ってばらつく事が明らかにされ、その確率性が、遺伝子の転写・翻訳に必然的に紛れ込む生化学反応過程の揺らぎに起因していると示唆されている（Taniguchi et al. 2010）。但し、この知見がそのままあらゆる生物、例えば多様な代謝産物を産出するために大腸菌よりも遥かに複雑な遺伝子制御系を内包する植

物，に対しても適用出来るのかには疑問の余地がある。また近年盛んに行われているトランスクリプトーム解析では，多くの場合，生化学的過程というより経験に基づいて，mRNA 量が負の二項分布等に従ってばらつくとして考察がなされている (Gierliński et al. 2015, Karthik et al. 2016, Marioni et al. 2008, Robinson et al. 2008, Schurch et al. 2016, Smith et al. 2016)。

一方，大腸菌，酵母，植物（イネ・シロイヌナズナ）を用いた研究より，発現量のばらつき方がその遺伝子のプロモーター配列，機能，環境変化（ストレス）に対する応答性（発現量変動），及び変異による機能（活性）の向上性，等と相関する事が報告されている (Hirao et al. 2015, Lehner 2010, Lehner et al. 2011, Nagano et al. 2012, Sato et al. 2003, Singh 2013, Tirosh et al. 2008)。この事は，発現制御から機能や進化可能性まで，各遺伝子の持つ様々な側面がその発現量のばらつきと密接に関連している事を示唆している。しかしこのような事実を包括的に議論する試みは，殆どなされていない（\*現在，以下に述べる我々の考察（論文 X）や，その後に発表された研究（Cortijo et al. 2019）等が出てきている。）。

論文 X ではこのような背景を踏まえ，シロイヌナズナの遺伝子発現のばらつきに着目した考察を進めている。以下にその内容を端的に述べておく。この研究は，同一ゲノムを持つ同一条件で生育した 20 個体以上のシロイヌナズナに対し，RNA シークエンシングを行い，データを解析したものである。そして 8 種の生育時期でのデータを解析し，

I) 遺伝子の発現量のばらつき方には大まかに，発現量の分布（ヒストグラム）がガウス分布（正規分布）に（近似的に）従うもの，ベキ分布に（近似的に）従うもの，その中間の分布型に従うものの 3 種類が存在する。ここで「近似的に」と付けたのは，実際にはガウス・ベキ混合分布と名付けられた分布に従うと考えられるからである。またこのばらつき方は，遺伝子毎，生育時期毎で変化する。

II) 発現量の分布がベキ分布に従っている遺伝子の発現制御は，確率的な（強いノイズにまみれた）フィードバックの影響を強く受けており，逆に発現量の分布がガウス分布に従う遺伝子では，そのようなフィードバックの影響を殆ど受けていないと考えられる。

III) 遺伝子の機能とその発現量の分布に相関がある（表 1）。例えば *Essential genes* と呼ばれる生存に必須な遺伝子群や代謝・エネルギー変換に関わる遺伝子群の多くで，その発現量がガウス分布に従う。一方，転写因子等をコードする遺伝子群の多くで，その発現量がベキ分布に従っている。また機能未知遺伝子の多くも，発現量がベキ分布に従っている。

といった事が見出されている。

これらの知見は多くの示唆に富んでいる。例えば II) と III) から，転写因子等は互いに活性・抑制をフィードバックし合う相互制御的なネットワークを形成しているのに対し，生存に必須な遺伝子群は上流遺伝子から *Passive* に制御されているといった，遺伝子ネットワークの全体像が容易に想像できる。また I) と II) から，各遺伝子が時期特異的にどのような制御（上流からか？フィードバックか？）をより強く受けているのかが推測出来る。更に I) と III) は，発現量の分布から機能未知の遺伝子の機能推定の手がかりが得られる事を示唆する。つまり，これが重要な事なのであるが，各遺伝子のその時々様々な側面，情報が，遺伝子発現量のばらつきとして滲み出ているのである。

このように，系の様々な性質がデータのばらつきとして滲み出ているケースは，遺伝子発

現量だけに留まらないと思われる。よって実験で複数の Replicate を取った時に、その値のばらつき方にも注目する事は、一つの実験からより多くの情報を得る上で有用と思われる。しかし次節で述べるように、この「データばらつき」の取り扱いには少々厄介な問題がついてまわるので、注意が必要である。

Ratio of	ベキ分布	中間の分布	ガウス分布
All genes	0.435357671	0.260434582	0.304207747
Function known genes (GO annotation)	0.322610702	0.276288934	0.401100364
Essential genes (GO slim)	0.208732694	0.248136315	0.54313099
mitochondria	0.464503043	0.249492901	0.286004057
extracellular	0.45	0.246206897	0.303793103
plastid	0.149706795	0.245946878	0.604346326
cytosol	0.205555556	0.283597884	0.510846561
ribosome	0.216624685	0.258186398	0.525188917
transcription factor activity	0.484303056	0.239849309	0.275847635
nucleic acid binding	0.458526875	0.262773723	0.278699403
other molecular functions	0.448415374	0.224544842	0.327039784
structural molecule activity	0.204889406	0.263096624	0.53201397
electron transport or energy pathways	0.154351396	0.238095238	0.607553366

表 1. 日齢 7 日のシロイヌナズナの遺伝子の機能と発現量が従う分布型との関係。各機能グループにアノテーションされた遺伝子群に対し、各分布の型を示す遺伝子の割合を示している。遺伝子のアノテーションは Gene Ontology Slim (<http://www.arabidopsis.org>), Essential genes は SeedGenes Project (<http://www.seedgenes.org/GeneList>) (Meinke et al. 2008) に基づく。

### 3. 「外れ値」か? 「ばらつき」か?

例えば同一なゲノムを持つ生物個体を同一条件下で飼育し、各個体から 2 つの遺伝子 (仮に A と B と呼ぶ) の発現量を計測し、個体順にプロットする (図 1)。多くの人が経験する通り、計測値には「ばらつき」が現れる。

しかしここで注目する遺伝子 A と B の発現量のばらつき方の中には、何か違いがあるように思える。A の発現量はばらついているものの、全体として平均値の周りに対称に分布しており、この平均値はこの発現量をおよそ代表出来る値であるように思える。その一方で、B の発現量は多くの個体で低い値を取るものの、目立って高い値も 2 つ (人によっては 1 つと思うかもしれない) 現れている。実験の個体数の違いはあれ、このようなばらつき方をする結果に出会った経験を、多くの人が持っているのではと思われる。そしてこのような量をどのように特徴付けすべきか、悩んだのではないと思われる。

これはあくまで筆者の見聞き・経験したことからの想像であるのだから、この B の発現量のような結果に対し多くの場合行われている処方方は、「目立って高い (低い) 値を『外れ値』として無視した上で、各種統計量を評価する。」であろう。各種統計量の評価は、様々なモ

デル分布関数へのフィッティングを介して行われる事も多いが、その際にもこのような処理がまずなされているようである。(例えば Gierliński et al. 2015 等)。

上記のような対処は多くの場合、結果的に正しいものになっていると考えられる。実験・計測のプロセスで完全にエラーを排除するのは困難であり、他から大きく逸脱して見えるデータはエラーの結果と考えられる事が良くあるからである。しかし残念ながら、大抵の場合、その対処が正しいとする根拠を与える事は出来ない。更に少なくない場合で、この対処が正しくない可能性も疑われる。一般に計測された値が「外れ値」なのかどうかの判定は、あまり極端ではない常識的な値をパラメータとして与えた、経験的に適当と思われるモデル分布関数に基づいて行われる。しかしこの「常識的」「経験的に適当」という言葉は決して根拠を与えるものではない。つまり「外れ値」は我々の先入観の産物である可能性が否定出来ないのである。

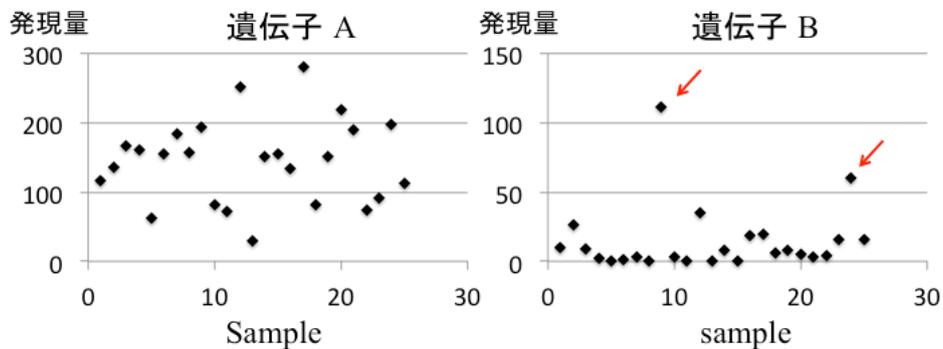


図 1. 同一条件で生育した同一のゲノムをもつシロイヌナズナ 25 サンプルから得られた、ある 2 つの遺伝子 (A, B) の発現量。赤矢印の示す点が、従来「外れ値」とされてしまう可能性が高いと考えられるサンプルの発現量。

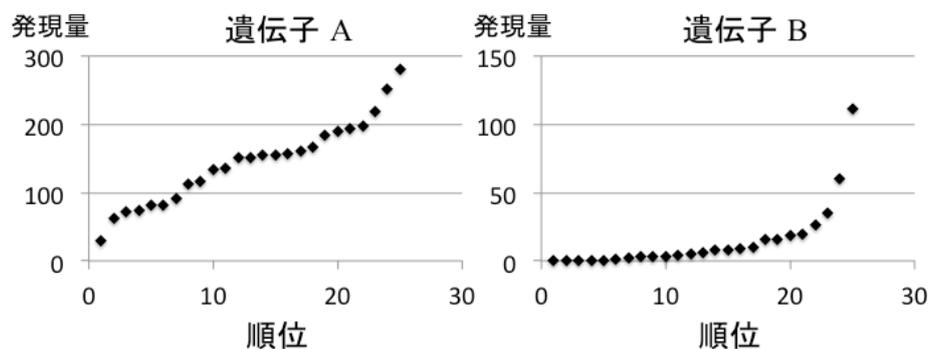


図 2. 2 つの遺伝子 (A, B) の発現量を小さい順に並べ直した「順位-発現量関係」。

ここで例えば、先ほどと少し視点を変えて、上記の各遺伝子発現量のデータに小さい順に順位をつけて、その順に並べてプロットした「順位-発現量関係」に着目する(図 2)。この場合、遺伝子 A では全体的に、順位が増加に対し発現量は最初の頃はやや急に増加しつつ途中緩やかになり、終盤やや急に増加するようなグラフが現れる。一方遺伝子 B では、全体と

して順位の増加に伴い発現量の増加の仕方が急になるグラフが現れる。更に重要な事は、後者では、順位の前半から最後の2つの大きな値までが、滑らかな曲線で繋がっているように見える事である。つまり殆ど発現していない状態から桁外れに発現量が上昇している状態のどれかが、「ある一つの規則に従って起きている」のではないかと疑いたくなるようなグラフの形状をしているのである。

もし上記の疑いが本当であれば、高い発現量値を「外れ値」として除外するのは言語同断である。ここで注意すべき事は、論文 X で扱われているシロイヌナズナ遺伝子発現量データには、遺伝子 A に似た様相のものも遺伝子 B に似た様相のものもそれぞれ数千種類ずつ存在しており、これらは決して例外的なものではないという事である。では実際どのような対処をしたら良いのだろうか？

ご存知の通りデータが理想的に十分多く取られていれば、これまで提案されてきているモデル分布関数に頼らずに、原理的にデータだけから発現量の分布関数型を推定できる。しかし多くの人を経験している通り、多くの場合（特に生物を対象とした実験の場合）そのような理想的な状況は期待出来ない。それに対し論文 X では、I) 各生育時期の遺伝子発現データに 20 以上の Replicate が存在する事、II) 順位-発現量関係の形状の類似性から遺伝子が（数十から数千の遺伝子からなる）グループに分けられる事、の2点を利用して、データの非理想性を部分的にもクリアできる試みを行っている。そして次節で述べるような遺伝子発現量の分布関数（ヒストグラム）型を、定性的にはあるが推定している（推定手法や導出の詳細は論文 X を参照のこと）。

#### 4. 「ばらつき」の分布関数（ヒストグラム）の型の推定とその特徴

論文 X でなされた発現量データのみからの分布の推定の結果、シロイヌナズナの各遺伝子の発現量の分布が、順位-発現量関係の形状の類似性で分けられた時に属するグループに依存して、i) ガウス分布（正規分布）、ii) ベキ分布、iii) 中間の分布、の何れかに近い分布になるが示唆されている（図 3）。例えば上記の遺伝子 A と同じグループに属する遺伝子の発現量はガウス分布、遺伝子 B と同じグループに属する遺伝子の発現量はベキ分布に従うと推定される。

ところでガウス分布は多くの人に馴染みがあるかと思われるが、ベキ分布に関してはそうでないかも知れない。そこでガウス分布とベキ分布の違いをここで大まかに述べておく。発現量を  $x$  とすると、ガウス分布は  $G(x) \propto \exp(-a(x - x_0)^2)$  という関数型で表され、平均発現量  $x_0$  を中心に対称な釣り鐘型の形をしている（図 4）。それに対しベキ分布は  $P(x) \propto x^{-b}$  ( $b > 0$ ) という関数型で表され、 $x = 0$  から単調に（急激に）減少する関数である（図 4）。どちらの分布も十分大きな  $x$ （ガウス分布の場合は  $x_0$  より十分大きな  $x$ ）が起こる頻度は非常に低い事が分かる。しかし実は、この部分での両者の振る舞いは全く異なり、またこの事が発現量のばらつきの特徴、もしくは「ばらつき」そのものに対する見方、を考える上で重要になる。

ガウス分布とベキ分布の違いは、発現量 ( $x$ ) とその頻度 ( $G(x)$ ,  $P(x)$ ) の対数 ( $\log x$ ,  $\log G(x)$ ,  $\log P(x)$ ) を軸とした両対数プロットを見ると、顕著になる（図 4）。ガウス分布を

両対数プロットで見ると、 $x_0$  よりある程度 ( $\sim\sqrt{1/a}$  程度) 大きい値まで  $x$  が増大すると、頻度  $G(x)$  が急激に ( $-\infty$  に向けて加速度的に「ストン」という感じで) 減少しているのが分かる。つまり  $x$  の分布がガウス分布に従うという事は、 $x$  が  $x_0$  と比べ  $\sqrt{1/a}$  程度より大きな桁の値を取る頻度がほぼ無視できる事を意味している。このような場合、発現量  $x$  は、例えばらつきがあったとしても、大体  $x_0$  程度の値を取ると考えて差し支えない。

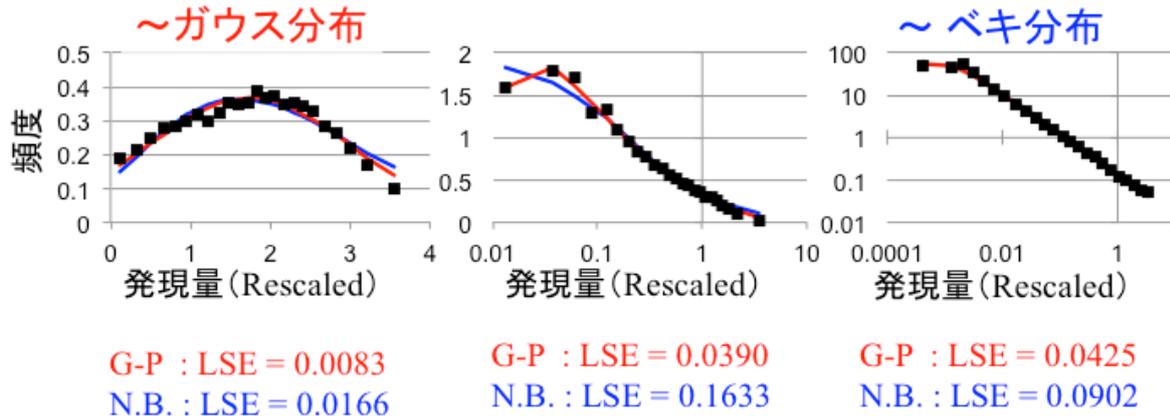


図 3. 遺伝子発現量の典型的な分布関数型。左からガウス分布，中間の分布，ベキ分布。中間の分布は横軸を，ベキ分布では横軸縦軸双方を対数軸としてプロットしている。グラフ中の赤と青の曲線はそれぞれ G-P 分布と（一般化した）負の二項分布（N.B.）でのフィッティング曲線。各グラフ下の数値は，G-P 分布と負の二項分布でのフィッティングした際の最小自乗誤差を表す。

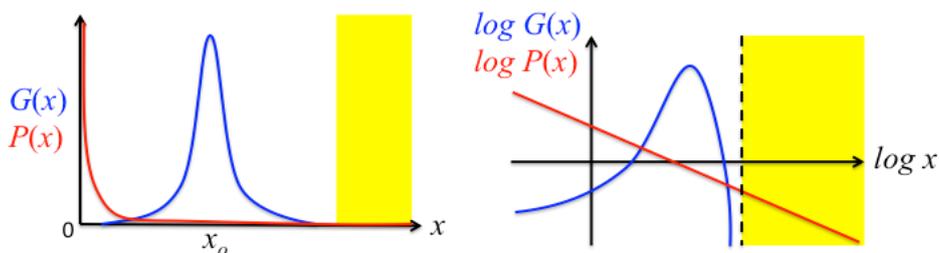


図 4. ガウス分布 ( $G(x) \propto \exp(-a(x - x_0)^2)$ ) : 青) とベキ分布は ( $P(x) \propto x^{-b}$  ( $b > 0$ )) : 赤) の概形。左図が通常スケールのプロット，右図が両対数プロットでの各分布の概形。黄色の領域は  $x = x_0$  よりも十分大きな  $x$  の領域を表す。

それに対しベキ分布を両対数プロットで見ると、 $x$  の増大に対し頻度  $P(x)$  は減少するが、その割合は一定で（「だらだら」と線形で減少），ガウス分布のような急激な減少をすることがない。これはガウス分布での経験を踏まえると、「この程度以上は無視してよい」という値が存在しない事を意味しており、発現量  $x$  はどんなに大きな桁の値でも（稀ではあるが）有限の頻度でとりうる事を意味している。これはまた、例えばある時点で得られている発現量  $x$  の値からその平均値や分散値等の特徴量を求めたとしても、それよりも何桁も大

きな  $x$  の値が後から有限の頻度で出てきて、これらの特徴量を大幅に変更してしまう可能性がある事を意味している。つまり平均値等が安易に発現量  $x$  の特徴量となり得ない事を意味しているのである。（実は地震のエネルギーとそのような地震が起こる頻度の関係もベキ分布になっている（グーテンベルグ・リヒター則（Gutenberg et al. 1941）。この事は近年我々も体験している通り、地震は小さなものから桁違いに大きなエネルギーのものまで、有限の頻度で起こりうる事を示している。）

勿論、遺伝子発現量は無限大になる事はなく何らかの上限があるため、発現量の分布が理想的なベキ分布になる事は無く、近似的にある発現量の大きさの範囲でだけベキ分布になっている、というのが現実である。しかし発現量の分布の中にそのようなベキ分布になっている部分がある程度含まれていると、上記で述べたように、平均値等を発現量の特徴量としてみる事が的外れになる。そして論文 X で発現量の分布がベキ分布と推定されたものは正に、発現量が「何桁にもわたってばらつく」「平均値等が特徴量にならない」ものとなっている。

## 5. 「ばらつき」の背景と機能との関係

前節までの話で、シロイヌナズナの RNA シークエンスデータから、遺伝子毎に発現量の「ばらつき方」が異なる事、少なくない遺伝子で発現量の分布が近似的に「ベキ分布」に従うという、「たちの悪いばらつき方」をする事などが推定されている事を紹介した。すると、実際にはどのような分布の型に従っていると考えられるのであろうか？またどうしてこのような「ばらつき方」の多様性が現れるのであろうか？等という疑問が自然に出てくるのではと思われる。

詳細は論文 X に譲るとして、その問いに対する一つの考察を紹介する。まず結果を述べると、ある遺伝子の発現量  $x$  の従う分布  $Q(x)$  は、次のような式に従うと考えられる。

$$Q(x) = A \frac{K+x}{fx} x^{\frac{2gK-K^2}{f^2}} e^{-\frac{1}{f^2} \left[ \frac{gK^2}{x} + (2K-g)x + \frac{x^2}{2} \right]}$$

ここで  $f, g, K$ , は、後で説明するこの遺伝子の発現制御に関わるパラメータから決まる定数で、 $A$  は規格化（ヒストグラムの度数の和を 1 にスケールする）定数である。この  $Q(x)$  を眺めてみると  $x^c$  ( $c$  は定数) と表されるベキ分布部分と  $\exp(-d(x-x_0)^2)$  と表されるガウス分布部分の積を含んでいる事が分かる。つまり  $Q(x)$  はガウス分布とベキ分布を掛け合わせて混合させたような分布となっているのである。そこで論文 X ではこの分布を「ガウス-ベキ混合分布 (G-P 分布)」と名付けている。

ではこの G-P 分布は、シロイヌナズナの遺伝子発現量の分布をどれほど表現できるのか？そこで、RNA シークエンスのデータ解析でしばしば仮定される負の二項分布（例えば Gierliński et al. 2015, Marioni et al. 2008, Robinson et al. 2008, 等）と G-P 分布で、前節で得られたデータのみから推定された各遺伝子の発現量分布のフィッティングを行い、双方の分布の妥当性を比較する（図 3）。ここで負の二項分布については、パラメータを一つ加え、整数値に限らない拡張されたものを用いる。その結果、パラメータ数はどちらも 3 つと同じであるが、多くの場合で負の 2 項分布より G-P 分布  $Q(x)$  の方がより良いフィッティングが可能である事が分かる。

また従来よく使用されていた負の二項分布と異なり、G-P 分布  $Q(x)$  に含まれる各パラメータは、以下のような遺伝子の発現制御に関わるパラメータと関連している (図 5。  $Q(x)$  の導出は論文 X を参照の事)。まずある遺伝子に対するその上流遺伝子からの寄与 (転写活性化) の強さを  $G$ 、その転写・翻訳の産物の分解速度を  $C$ 、この遺伝子から下流の遺伝子 (群) への活性化を特徴付ける (平均的な、ミカエリス定数のような) 量を  $K$ 、そしてその下流遺伝子 (群) からのフィードバックに伴うノイズの強さを  $F$  とする。このとき  $f, g$  はそれぞれ  $f = F/C, g = G/C$  と与えられる。

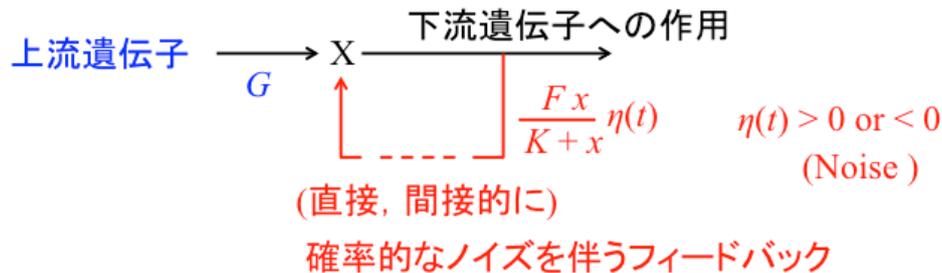


図 5. ある遺伝子 X の発現制御ネットワークのモデル図。一般に遺伝子発現量は、上流遺伝子からの作用による発現活性 ( $G$ ) と下流遺伝子への作用からの確率性を伴うフィードバック ( $Fx\eta(t)/(K+x)$  に比例) を受ける。ここで  $\eta(t)$  は時刻  $t$  に依存してランダムに変化する平均 0 のノイズを表す。

このことから次の事が考えられる。ある遺伝子が下流遺伝子を活性化するがそのフィードバックの影響が無視出来る場合、つまり  $f$  や  $K$  が小さいとき、この遺伝子の発現量分布  $Q(x)$  はガウス分布に漸近し、逆にこれらが  $g$  に比べ大きいとき、 $Q(x)$  のベキ分布部分が顕著になってくる。逆に言えば、発現量の分布がベキ分布に従っている遺伝子は確率的なフィードバック制御の影響を強く受けており、逆に発現量の分布がガウス分布に従う遺伝子では、フィードバック制御の影響を殆ど受けていない事が示唆される。つまり、発現量のばらつきの分布が分かれば、その遺伝子があるとき実際に受けている制御の様相を推測出来るのである。

このように発現量の多様なばらつき方の背景には、その遺伝子がある時点で受けている実効的な制御の違いが存在している。更に各遺伝子の発現量のばらつき方の傾向は、その遺伝子が持つ機能とも関連している (表 1)。先の節でも述べたが、例えば生存に必須な遺伝子群や代謝・エネルギー変換に関わる遺伝子群の多くは、発現量がガウス分布に従う。このことから、これらの遺伝子の制御にはフィードバックが殆ど影響せず、その結果として平均値で特徴付けられる安定的な発現量を維持する傾向にあると考えられる。一方、転写因子等をコードする遺伝子群の多くは、発現量がベキ分布に従っている。このことから、これらの遺伝子は (相互) フィードバックの影響により、状況に応じて数桁に渡る大きな発現量変化を実現出来るようになっている、と推測される。更に別の研究から、同一条件下において発現量のばらつきが大きい遺伝子は、環境の変動に対し大きな発現量の変動を示す傾向にある事が知られている (Hirao et al. 2015)。この知見に加え、一般的に発現量がベキ分布を示す遺伝子の方

がガウス分布を示すものより発現量のばらつきが大きい事を踏まえると、ベキ分布を示す転写因子等をコードする遺伝子群の多くは、フィードバックの影響により環境変動に対し敏感な発現量変化を可能にしているとも推測される。つまり発現量のばらつき方は、各遺伝子の機能とその遺伝子が受けている制御の双方と密接に関係し、またそれによって、各遺伝子が受ける発現制御と機能を結びつけているのである。

## 6. まとめと願望：本考察の知見と得られたデータを有効活用して頂けたら

ここまで、遺伝子発現量に現れるばらつき（確率性）の特徴、その特徴が現れる背景、及びその生命機能との関連について、論文 X の内容を参照しつつ紹介した。ここまで詳しくは述べなかったが、上記の考察では、よく実験で用いられる生育条件下（明暗が変化は 12 時間毎）でシロイヌナズナを育て、7 日目及び 22 日目の、明るくなってから 1 時間後、7 時間後、13 時間後（暗くなってから 1 時間後）、19 時間後、の計 8 生育時期に、各時期につき 20 以上の Replicate から RNA が採取され、解析に利用されている。このようなサンプリングは従来ほぼ行われてこなかったであろう。同時にそれらのデータの解析も、従来踏襲されてきたものから大きく逸脱した方法で試みられている。そういった事を踏まえ、ここまで読んで下さった方々に向けた願望を、最後に幾つか述べさせて頂きたいと思う。

論文 X では、時期依存的に各遺伝子の揺らぎ方を分類し、表にまとめている。勿論全ての遺伝子について解析出来ている訳ではないが、各条件につき 1 万遺伝子種程度の情報は得られている。そこで、ある遺伝子に着目して実験をする状況になったとき、一度まずこの表をご参照頂ければと思う。そうする事でこの遺伝子の制御の背景やその変化を推測出来るだけでなく、実際に発現量の計測の際どの程度結果がばらつくものなのかも予測出来るので、「外れ値」なのか「考慮すべき結果」なのかの判定にも役立つのではと考えられる。

また、ストレス等の何らかの処理を加える場合に、注目する遺伝子の処理前（無し） - 処理後（有り）での発現量に対し、その平均だけでなく「ばらつき方の変化」にも注目して頂ければと思う。発現量のばらつき方の変化は、背景にある発現制御の変化（例えばフィードバックの ON-OFF）を意味すると予測されるため、未知の制御関係を探せる可能性があるからである。これら 2 つの事は、これまでの実験研究の道筋から少し寄り道をして頂くだけで、オプションに有益な情報を提供してくれるのではと思われる。

最後に、これは見方に依っては一部敗北宣言になるのかもしれないが、このようなデータの更なる有効な活用法をお考え頂けたらと考えている。発現量データは論文 X の Supplement のファイルとして誰でも自由に取得・利用出来るようになっているので、ここで紹介した知見を遥かに凌駕する考察が現れる事を期待したい。

## 謝辞

本小論の執筆に当たり、その基となる論文の共著者である神谷麻梨氏、手塚あゆみ氏、田邊章洋氏に感謝致します。また本小論の執筆の機会を頂きました川出健介氏、北沢美帆氏に感謝致します。

## 引用文献

- Awazu, A., Tanabe, T., Kamitani, M., Tezuka, A., Nagano, J. A., 2018. Broad distribution spectrum from Gaussian to power law appears in stochastic variations in RNA-seq data. *Sci. Rep.* **8**, 8339.
- Chang, H.H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D.E. & Huang, S. 2008. Transcriptome-Wide Noise Controls Lineage Choice in Mammalian Progenitor Cells. *Nature* **453**, 544–547.
- Cortijo, S., Aydin, Z., Ahnert, S., & Locke, J. C. (2019). Widespread inter-individual gene expression variability in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular systems biology*, **15**, e8591.
- Elowitz, M.B., Levine, A.D., Siggia, E.D. & Swain, P.S. 2002. Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science* **297**, 1183–1186.
- Furusawa, C., Suzuki, S., Kashiwagi, A., Yomo, T. & Kaneko, K. 2005. Ubiquity of Log-Normal Distributions in Intra-Cellular Reaction Dynamics. *BIOPHYSICS* **1**, 25–31.
- Gierliński, M., Cole, C., Schofield, P., Schurch, N.J., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G., Owen-Hughes, T., et al. 2015. Statistical Models for RNA-Seq Data Derived from a Two-Condition 48-Replicate Experiment. *Bioinformatics* **31**, 3625-3630.
- Gutenberg, B. & Richter, C.F. 1941. Seismicity of the earth. *Geol. Soc. Am. Sp. Pap.* **34**, 131
- Hirao, K., Nagano, A.J. & Awazu, A. 2015. Noise–Plasticity Correlations of Gene Expression in the Multicellular Organism *Arabidopsis Thaliana*. *J. Theo. Biol.* **387**, 13–22.
- Karthik, D., Stelzer, G., Gershanov, S., Baranes, D. & Salmon-Divon, M. 2016. Elucidating Tissue Specific Genes Using the Benford Distribution. *BMC Genomics* **17**, 595.
- Lehner, B. 2010. Conflict Between Noise and Plasticity in Yeast. *PLoS Genet.* **6**, e1001185.
- Lehner, B. & Kaneko, 2011. K. Fluctuation and Response in Biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1005–1010.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M. & Gilad, Y. 2008. RNA-Seq: an Assessment of Technical Reproducibility and Comparison with Gene Expression Arrays. *Genome Res.* **18**, 1509–1517.
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C. & Dickerman, A. 2008. Identifying Essential Genes in *Arabidopsis Thaliana*. *Trends Plant Sci.* **13**, 483–491.
- Nagano, A.J., Sato, Y., Mihara M., Antonio, B.A., Motoyama, R., Itoh, H., Nagamura, Y. & Izawa T. 2012. Deciphering and Prediction of Transcriptome Dynamics Under Fluctuating Field Conditions. *Cell* **151**, 1358–1369.
- Newman, J.R., Ghaemmaghami, S., Ihmels, J., Breslow, D.K., Noble, M., DeRisi, J.L. & Weissman, J.S. 2006. Single-Cell Proteomic Analysis of *S. cerevisiae* Reveals the Architecture of Biological Noise. *Nature* **441**, 840–846.
- Robinson, M.D. & Smyth, G.K. 2008. Small-Sample Estimation of Negative Binomial Dispersion, with Applications to SAGE Data. *Biostatistics* **9**, 321–332.
- Sato, K., Ito, Y., Yomo, T. & Kaneko, K. 2003. On the Relation Between Fluctuation and Response in Biological Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14086–14090.
- Singh, G.P. 2013. Coupling Between Noise and Plasticity in *E. Coli*. *G3 (Bethesda)* **3**, 2115.
- Schurch, N.J., Schofield, P., Gierliński, M, Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G., Owen-Hughes, T., et al. 2016. How Many Biological Replicates Are Needed in an RNA-Seq Experiment and Which Differential Expression Tool Should You Use? *RNA* **22**, 839-851.

- Smith, G.R. & Birtwistle, M.R. 2016. A Mechanistic Beta-Binomial Probability Model for mRNA Sequencing Data. *PLoS One* **11**. e0157828.
- Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A. & Xie, X.S. 2010. Quantifying E. Coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. *Science* **329**. 533–538.
- Tirosh, I. & Barkai, N. 2008. Two Strategies for Gene Regulation by Promoter Nucleosomes. *Genome Res.* **18**. 1084–109.

## 表皮細胞の大きさと核内倍加のサイコロゲーム

川出 健介<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>生命創成探究センター 植物発生生理研究グループ

<sup>2</sup>基礎生物学研究所 植物発生生理研究室

<sup>3</sup>総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

Kensuke Kawade<sup>1,2,3</sup>

### Rolling dice of endoreduplication during cell size specification

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, cell size, endoreduplication, leaf development, ploidy

<sup>1</sup>Plant Development and Physiology Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS)

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Development and Physiology, National Institute for Basic Biology

<sup>3</sup>Department of Basic Biology, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, 444-8787 Aichi, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a3.00150

#### 1. はじめに：細胞サイズの多様性と均一性

細胞の大きさはでたらめに決まるのではない。求められる機能を十分に発揮できるよう、成熟したときの大きさが組織ごとに決められている。その一方で、ひとつ、もしくはごく少数の細胞に由来するクローン的な集団であっても、細胞の大きさが実に多様な場合もある。興味深いことに、この場合の細胞の大きさを測定して集団レベルで捉えると、大きさの分布を示すヒストグラムはいつも同じ形になる。つまり、細胞の大きさを決めるプロセスには、集団に均一性をもたらす頑健な仕組みの他に、多様性を再現性良くみ出す仕組みが存在すると考えられる。これまで、個々の細胞の大きさの制御機構については盛んに研究されているが、このような集団における細胞のサイズ分布については十分に調べられていない。本総説では著者らの近年の成果 (Kawade and Tsukaya, 2017) を中心に据え、植物細胞の大きさと関連性がよく取り上げられる核内倍加の起こる仕組みや、それに応じて細胞が大きくなる仕組みをまとめる。特に、それらの理論的・定量的な側面に焦点を当てることで、細胞が確率論的なふるまいを組み込んで最終的な大きさへ到達する姿を紹介したい。

#### 2. 植物細胞の大きさと核内倍加

細胞は分裂と成長を繰り返して増殖し、その後、増殖活性を失って分化肥大を起こす。増殖細胞の大きさが一定に保たれる仕組みは分化肥大を起こしている細胞のサイズ制御を考えるうえで重要だが (Tsukaya, *in press*)、本総説では考察する対象を明確にするため、分化肥大を終えて成熟した細胞の大きさについて着目する。

シロイヌナズナの葉の表皮組織と、隣接して内部にある柵状組織は、茎頂分裂組織の異なる細

胞群に由来する別々のクローン的な集団である (Poethig, 1989; Szymkowiak and Sussex, 1996)。完全に展開した葉において、気孔やトライコーム以外の表皮細胞 (pavement cell) は投影面積で  $1,000 \mu\text{m}^2$  から  $10,000 \mu\text{m}^2$  と様々な大きさになる。全体としては、 $3,000 \mu\text{m}^2$  を中央値として大きい方へ長く伸びる裾の重いサイズ分布を示す。ところが、柵状組織の細胞では  $1,500 \mu\text{m}^2$  ほどを平均値とし、標準偏差が  $300 \mu\text{m}^2$  ほどの正規分布に近いサイズ分布となる (図 1)。これまでの研究から、表皮組織における細胞では、核内倍加による核相の増加と分化肥大の促進に正の相関があると報告されている (Elsner et al. 2012; Melaragno et al. 1993)。核内倍加とは染色体の複製により核内 DNA 量が倍加したにも関わらず、その後に細胞分裂が起こらないため核相が増加するという、細胞周期を改変して起こる現象である。核内倍加が繰り返されることで、シロイヌナズナの場合は核相が従来の 2C から 4C, 8C, 16C … と増加する。核内倍加と細胞の大きさの関係は葉だけでなく、暗所栽培で伸びる芽生え胚軸 (もやし) の表皮でも報告されている (Gendreau et al. 1998)。これらのような目を引く例があったことも背景となり、細胞サイズ制御の視点から核内倍加についての分子機構が精力的に調べられてきた (Breuer et al. 2010; Kalve et al. 2014)。そして、蓄積してきた知見をもとに、細胞周期と細胞成長を組み合わせる細胞サイズを考察するシンプルな機能モデルから、細胞周期に関わる分子の相互作用を網羅的に微分方程式で記述した数理モデルなどが報告されている (Apri et al. 2014; Beemster et al. 2006; Dissmeyer et al. 2009; Roodbarkelari et al. 2010)。現時点で、細胞分裂が停止した後に核内倍加が繰り返し起こるまでの動態を再現することができているので、核内倍加が起こる基本的な分子機構については一定の理解を得ていると言える。

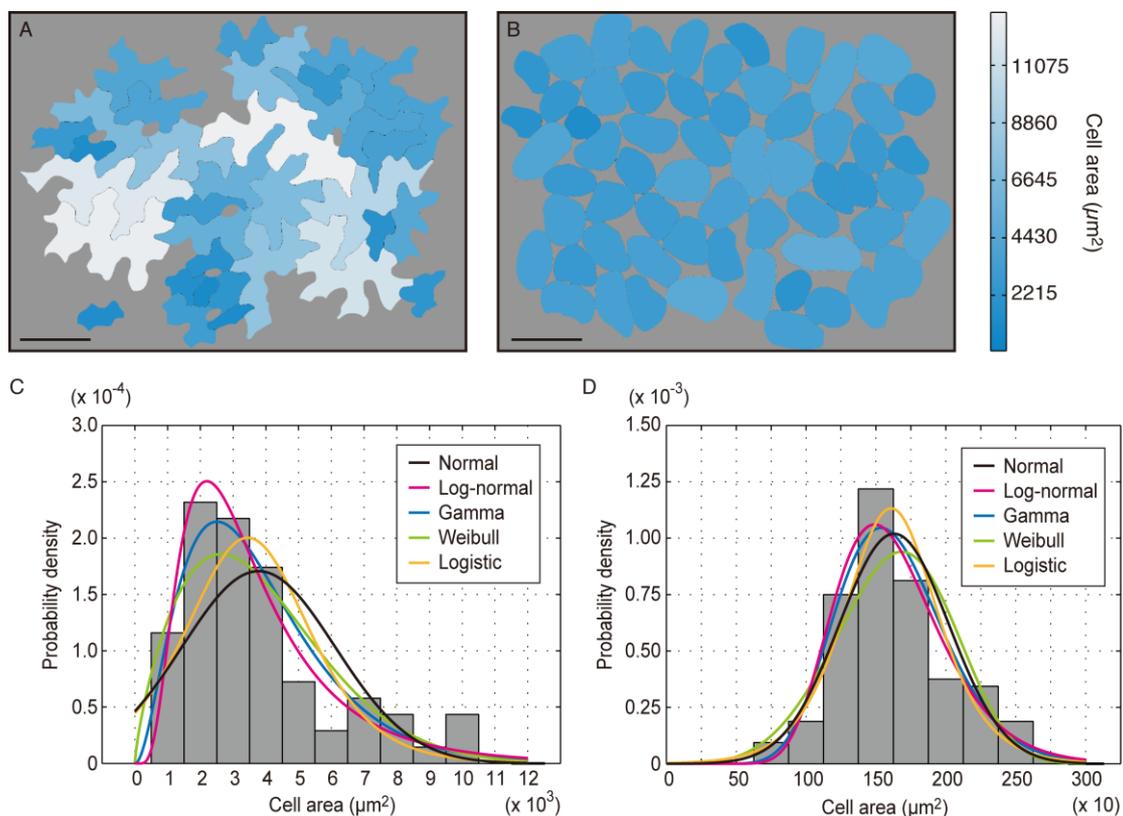


図 1. シロイヌナズナの成熟した第 1 葉における細胞のサイズ分布。(A, B) 表皮組織 (A) および柵状組織 (B) の細胞を大きさによって色分けした図。(C, D) 表皮組織 (C) および柵状組織 (D) における、細胞サイズの相対的な分布 (ヒストグラム) と、それをもとに推定した様々な確率密度分布 (実線)。表皮細胞のサイズ分布は裾が重く、対数正規分布 (Log-normal) などで比較的良く表現できる。スケールバー =  $100 \mu\text{m}$ 。

### 3. 核内倍加の発生ダイナミクス

前章において、表皮細胞の大きさと核相に関連性があると述べたことから分かるように、表皮組織では個々の細胞において核内倍加が起きる頻度が同じではない。完全に展開した第一葉では核内倍加を1回も起こしていない2Cの細胞から、核内倍加を4回起こした32Cの細胞まで観察される。核内倍加が繰り返し起こることは、細胞周期の分子機構をもとにした考え方だけで再現できるが、集団内にばらつきが生じることは説明できない。そこで考慮すべき要素として提唱されているのが、核内倍加の発生動態における確率論的なふるまいである。その先駆けとして、細胞が一定時間あたりに核内倍加を起こす確率 $r$ を核相ごとに設定し、集団における核相プロファイルの時間発展を微分方程式で表現した研究が知られている (Schweitzer et al. 1995)。この数理モデルは、例えば2Cの細胞が核内倍加を起こして4Cになる確率を $r_{2C-4C}$ とし、同様に4Cの細胞が核内倍加を起こす確率を $r_{4C-8C}$ といったふうに、核相の数だけパラメータを設定するものである。こうして構築された数理モデルを用いて、トウモロコシの胚乳で測定される核相プロファイルの時間発展を再現するようパラメータを調整したところ、 $r$ は時間とともに線形的に減少する性質があると推定された。この数理モデルは、トウモロコシの胚乳のように活発に核内倍加が起こる組織(10日間で最大5回)では核内倍加の動態をよく表現できたのだが、ユリの花器官のように緩やかに核内倍加が起こる組織(40日で最大3回)には適用できなかった。そこで、核内倍加を起こす確率 $r$ を、シグモイド関数に従って一定時間後に急激に低下させる改変モデルが発表された (Lee et al. 2004)。この改変モデルの妥当性は、 $r$ を線形的に減少させる場合よりはるかに実測値に合った動態を示すことや (Lee et al. 2004)、低温によるユリ花器官の成長抑制を摂動として核内倍加を調べた実験でも確認されている (Lee et al. 2007)。その後も数理モデルの検討がなされ、現在では細胞周期の長さや、時間の進行に伴う分裂能の低下など増殖に関連するパラメータも組み込むことで、細胞増殖から核内倍加の動態までを集団レベルで十分につなぐ数理モデルが提案されている (Bertin et al. 2007)。また近年、シロイヌナズナのがく片に見られる巨大細胞に着目し、増殖している細胞が確率論的に核内倍加を起こすと、その後は成熟するまで核内倍加を起こし続けるという仮定を設けることで、集団内における特殊な細胞の形成にも対応するモデルが発表されてもいる (Roeder et al. 2010)。

このように、確率論的なふるまいで細胞集団に核相プロファイルの多様性をもたらす重要なパラメータとして、一定時間あたりに核内倍加を起こす確率 $r$ が挙げられる。しかし現在、現実的な状況をなるべく反映させるため、数理モデルに組み込まれるパラメータの数は増える傾向にある。これでは、核相プロファイルの実測値を再現できたとしても、得られる結果の解釈が難しくなるのは避けられない。そこで著者らは、シロイヌナズナの葉の表皮組織における核相プロファイルを解析し、数理モデルの改良を目指した。そして、核内倍加は核相を問わずランダムに起こるポアソン過程だと仮定できることを見つけた。これにより、葉の表皮組織では、一定時間あたりに核内倍加を起こす確率を

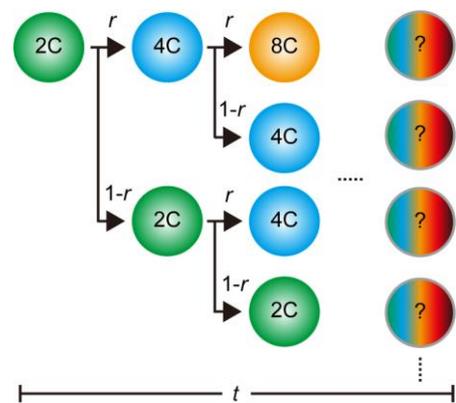


図 2. 核内倍加の動態モデル. 限られた時間  $t$  において、確率  $r$  で起こる核内倍加が何回起こるかで、各細胞の核相が決まる。

全ての時間において単一の  $r$  とすることができ、成熟までの時間  $t$  との 2 つのパラメータのみで核相プロファイルを再現することに成功した (図 2)。この数理モデルは解析的に解くことができ、また、従来のモデルを単純化して整理できる点から、葉の表皮組織を題材として核内倍加の発生動態を理解する重要な一歩になると考えている。

#### 4. 核内倍加と細胞サイズの定量的な関連付け

ここまで紹介してきたように、核内倍加の動態については実験および理論的なアプローチでよく研究されている。しかし、核相プロファイルから細胞の大きさの多様性を定量的に調べている研究は意外にも限られている。その原因のひとつとして、核相プロファイルは組織から単離した細胞をフローサイトメーターでひとまとめに分析している場合が多く、個々の細胞の核相と大きさを対応付けられていなかった点が挙げられる。ところが近年、組織の透明化技術の発展や、定量イメージング解析の精度が向上し、顕微鏡を用いて核の大きさから個々の細胞の核相を見積りつつ、対応する細胞の大きさを測定することが可能となっている (Katagiri et al. 2016)。著者らはシロイヌナズナの葉において対応が付いている細胞の核相と大きさを解析し、核内倍加が 1 回起きると表皮細胞は投影面積でおよそ 1.5 倍、2 回起きるとさらに 1.5 倍、と指数関数的に大きくなることを見いだした (ploidy effect, PE)。これは、細胞を球として単純化して考えた場合、体積が 2 倍になると投影面積は 1.5874 倍になることから、妥当な値だと考えられる (図 3)。そこで、前章で述べた核内倍加の動態を確率論的なふるまいで表現する数理モデルで核相プロファイルを推定し、それに PE を反映させて細胞集団のサイズ分布を計算した。そうすると、表皮組織で見られる特徴的な裾の重い分布を十分に再現することに成功した。さらに、核内倍加の発生に異常を

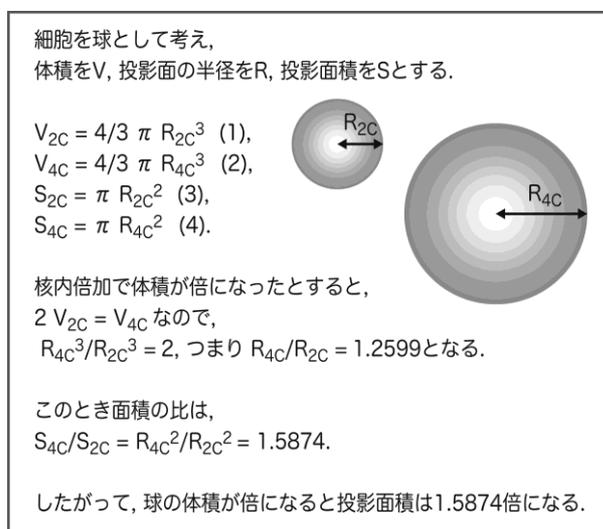


図 3. 体積と投影面積の関係.

興味深いことに、この細胞サイズ決定モデルは、核内倍加による PE の効果を外すだけで、柵状組織の細胞サイズ分布を再現することもできる。したがって、表皮組織における多様な細胞の大きさは、柵状組織における細胞サイズの基本制御プログラムに PE を組み込むのみで達成される、という実に分かりやすい関係性も考察することができる。これは、柵状組織の細胞に表皮のアイデンティティーを分子遺伝学的手法で付与すると、柵状組織であっても PE が顕在化し始めるという実験結果とも矛盾しない (Katagiri et al. 2016)。

## 5. さいごに：確率論的なふるまいがうみ出す多様性

著者らの研究から、葉の表皮組織で細胞の大きさの多様性を再現性良くうみ出す仕組みは、確率論的な核内倍加の動態と、それに応じた指数関数的な分化肥大の促進だということが分かってきた。ここから、確率論的なふるまいが指数関数的なプロセスを経て多様性をうみ出すという、生命システムのひとつの戦略が伺える。同じような例として、タンパク質の発現レベルが知られている。大腸菌におけるタンパク質のコピー数を1分子計測と統計的な解析により調べた研究から、mRNAの転写は確率論的に起こること、そして、タンパク質への翻訳は指数関数的な分布にそった頻度で群発すること、が示されている (Cai et al. 2006; Taniguchi et al. 2010; Yu et al. 2006)。大雑把ではあるが、このような比較から生命システムの基本原理が見いだされる可能性もあるはずである。

そこで、シロイヌナズナの葉の表皮組織において、核内倍加がどのように確率論的に起こっているのか、また、核相に応じてどのように指数関数的に細胞が大きくなるのか、というのは解くべき重要な課題である。前者については、表皮のアイデンティティを發揮させる転写因子をコードする *AtML1* という遺伝子の発現揺らぎが、がく片組織の巨大細胞で核内倍加が確率論的に起こる鍵だと報告されている (Meyer et al. 2017)。また、別のアプローチとして、確率論的な要素を組み込んで核内倍加の発生动態を再現する理論モデルと、核内倍加の周期に関わる分子や核内倍加を起こす細胞のライブイメージング解析を組み合わせることで、どの制御機構に揺らぎが潜んでいるのか調べられるはずである。また、後者については、まずは細胞の大きさと核相の関係をより適切に理解することから始める必要があると考えられる。シロイヌナズナ表皮組織では、核内倍加により指数関数的に細胞が大きくなっていると考えると実測値とよく合うが、その関係性は柵状組織では見られないことがこれまでの研究で明らかにされている (Tsukaya, 2013)。また、エンドウの子葉やトマトの果皮では、核相と細胞の大きさには線形的な関係があると報告されている (Cheniclet et al. 2005; Lemontey et al. 2000)。さらに、核内 DNA 量と核の大きさには線形的な関係が見られる一方で、核の大きさと細胞の大きさには必ずしも相関関係がある訳では無い点にも注意が必要である (Robinson et al. 2018)。したがって、細胞のサイズ制御と核内倍加については、両者の関係を定量的に関連づけて様々な情報を整理することが、これからの重要な第一歩になると考えられる。それを踏まえ、なぜ核相からシロイヌナズナ表皮細胞の大きさが推定できるのか、その詳細な仕組みを明らかにしたいところである。

このように立ち戻って考える際、細胞の生理的な側面を考察に組み込むことも興味深い点である。例えば、核内倍加の発生动態に関する理論モデルにおいて、各パラメータと生理的意義を対応付けることで、育種戦略を提案しようとする試みが存在する (Apri et al. 2014)。核内倍加についての分子機構がよく理解されている現在だからこそ、このような再考察に取り組むことで、独自の研究へとつながるネタを見つけられるかもしれない。

本総説の最初に、「細胞の大きさはでたらめに決まるのではない」と表現した。これは自明ではなく、でたらめの語源を考えるとサイコロゲームにつながる。確率論的なふるまいを直感的に認識するのは難しいが、定量的に解析することで浮かび上がってくる面白い性質である。

## 6. 謝辞

まずは、本総説を執筆する機会を下さった日本植物学会・電子出版物編集委員の方々に深く感謝します。

また、東京大学の塚谷 裕一 博士からは、本総説の中心となる研究を遂行するにあたり、数多くのご助言を頂きました。東京理科大学の松永 幸大 博士からは、本総説の中心となる研究を遂行するために必要な公刊済みの実験データを、快く迅速に共有して頂きました。基礎生物学研究所の藤田 浩徳 博士には、核内倍加の発生動態に関する数理モデルについて大変参考になるご意見を頂きました。主として取りあげた筆者らに近年の研究成果 (Kawade and Tsukaya, 2017) は、住友財団 基礎科学研究助成 (150238) や日本学術振興会 科学研究費 若手研究 (B) (17K15147) の援助で進められました。この場を借りてお礼を申し上げます。

最後になってしまいますが、自然科学研究機構 生命創成探究センター (Exploratory Research Center on Life and Living Systems, ExCELLS) の BIO-NEXT プロジェクトからは、研究活動の全てにおいてご支援頂いております。本当に有り難うございます。

## 7. 引用文献

- Apri, M., Kromdijk, J., de Visser, P.H.B., de Gee, M., & Molenaar, J. 2014. Modelling cell division and endoreduplication in tomato fruit pericarp. *J. Theor. Biol.* 349: 32-43.
- Beemster, G.T.S., Vercruyse, S., De Veylder, L., Kuiper, M., & Inzé, D. 2006. The *Arabidopsis* leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *J. Plant Res.* 119: 43-50.
- Bertin, N., Lecomte, A., Brunel, B., Fishman, S., & Génard, M. 2007. A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *J. Exp. Bot.* 58(7): 1903-1913.
- Breuer, C., Ishida, T., & Sugimoto, K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 654-660.
- Cai, L., Friedman, N., & Xie, X.S. 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature.* 440: 358-362.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.P., & Renaudin, J.P. 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 139: 1984-1994.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Pusch, S., De Schutter, K., Alvim Kamei, C.L., Nowack, M.K., Novak, B., Duan, G.L., Zhu, Y.G., De Veylder, L., & Schnittger, A. 2009. Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA1. *Plant Cell.* 21: 3641-3654.
- Elsner, J., Michalski, M., & Kwiatkowska, D. 2012. Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth: a quantitative analysis of *Arabidopsis thaliana* wild-type and triple *cyclinD3* mutant plants. *Ann. Bot.* 109: 897-910.
- Gendreau, E., Höfte, H., Grandjean, O., Brown, S., & Traas, J. 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant J.* 13(2): 221-230.

- Kalve, S., De Vos, D., & Beemster, G.T.S. 2014. Leaf development: a cellular perspective. *Front. Plant Sci.* 5: 362.
- Katagiri, Y., Hasegawa, J., Fujikura, U., Hoshino, R., Matsunaga, S., & Tsukaya, H. 2016. The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development.* 143: 1120-1125.
- Kawade, K., & Tsukaya, H. 2017. Probing the stochastic property of endoreduplication in cell size determination of *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal tissue. *PLoS ONE.* 12(9): e0185050.
- Lee, H.C., Chiou, D.W., Chen, W.H., Markhart, A.H., Chen, Y.H., & Lin, T.Y. 2004. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Sci.* 166: 659-667.
- Lee, H.C., Chen, Y.J., Markhart, A.H., & Lin, T.Y. 2007. Temperature effects on systemic endoreduplication in orchid during floral development. *Plant Sci.* 172: 588-595.
- Lemontey, C., Mousset-Déclas, C., Munier-Jolain, N., & Boutin, J.P. 2000. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J. Exp. Bot.* 51: 167-175.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B., & Coleman, A.W. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 5: 1661-1668.
- Meyer, H.M., Teles, J., Formosa-Jordan, P., Refahi, Y., San-Bento, R., Ingram, G., Jönsson, H., Locke, J.C., & Roeder, A.H.K. 2017. Fluctuations of the transcription factor ATML1 generate the pattern of giant cells in the *Arabidopsis* sepal. *eLife.* 6: e19131.
- Poethig, S. 1989. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet.* 5: 273-277.
- Robinson, D.O., Coate, J.E., Singh, A., Hong, L., Bush, M., Doyle, J.J., Roeder, A.H.K. 2018. Ploidy and size at multiple scales in the *Arabidopsis* sepal. *Plant Cell.* doi: 10.1105/tpc.18.00344.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., & Meyerowitz, E.M. 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 8(5): e1000367.
- Roodbarkelari, F., Bramsiepe, J., Weindl, C., Marquardt, S., Novák, B., Jakoby, M.J., Lechner, E., Genschik, P., & Schnittger, A. 2010. Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreduplication cycles in *Arabidopsis* trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 15275-15280.
- Schweizer, L., Yerk-Davis, G.L., Phillips, R.L., Srien, F., & Jones, R.J. 1995. Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7070-7074.
- Szymkowiak, E.J., & Sussex, I.M. 1996. What chimeras can tell us about plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 351-376.
- Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., & Xie, X.S. 2010. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science.* 329: 533-538.
- Tsukaya, H. 2013. Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from *Arabidopsis* genetics. *PLoS One.* 8(12): e83729.
- Tsukaya, H. in press. Has the impact of endoreduplication on cell size been overestimated? *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.15781.

Yu, J., Xiao, J., Ren, X., Lao, K., & Xie, X.S. 2006. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*. 311: 1600-1603.

# がく片器官の形の頑健性：細胞成長揺らぎの時空間平均化の仕組み

津川 暁

理化学研究所 理論生物学研究室  
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Satoru Tsugawa

## Shape Robustness in Sepal: Mechanism of Spatio-temporal Averaging of Cell Growth Variability

Keywords: cell growth variability, organ shape robustness, spatio-temporal averaging

Theoretical Biology Laboratory, Riken, Wako, Saitama 351-0198 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a4.00151

### 1. はじめに

植物器官は個体の違いに依らず正確な形状を獲得する頑健性を持つが、ミクロな細胞成長はしばしば確率的に振る舞う。このマクロな器官の頑健性とミクロな細胞の多様性という一見相反した性質が矛盾なく説明されるような原理はどのようなものであろうか？我々はミクロとマクロをつなぐ生物物理学的な仕組みが存在すると期待して、植物がく片の成長過程を理論・データの両輪で分析し、植物器官の成長原理を解明することを目指している。本稿では、器官が頑健な形状を獲得する仕組みのひとつの可能性として「細胞成長揺らぎの時空間平均化」の概念を紹介したい (Hong et al., 2016)。

本稿は以下のように構成されている。まず正確な形状に至る野生型と比較するために、形状がばらつく“形状頑健性欠損”変異体について紹介する。次に野生型と変異体それぞれのがく片の細胞情報（表面積や成長など）の抽出方法をソフトウェア MorphoGraphX の簡単な使い方を紹介しながら説明する。MorphoGraphX により得られる細胞情報から細胞成長揺らぎを解析した結果、驚くべきことに頑健な形状に至る野生型の方が空間的な細胞成長揺らぎが高いことが明らかになった。これはミクロな細胞成長揺らぎがマクロな器官形状の安定性につながり得ることを意味している。最後にこの性質を表現する数理モデルを構築し、細胞成長揺らぎが時空間的に緩和される場合にマクロな器官形状の頑健性が決定されることを示す。

### 2. 器官レベルの頑健性と細胞レベルの多様性

植物は茎、根、葉、花弁など様々な器官で構成されているが、特に花弁やがく片は種が同じであれば個体に依らずほぼ同じサイズや形状に至ることが知られている (図 1A, Hong et al., 2016; Hong et al., 2018)。この性質は器官が内外の擾乱に拮抗して形を健全に保つ、という意味で形の頑健性と言うこともあれば、器官が個体の違いに依らず再現性高く同じ形に至る、

S. Tsugawa – 1

という意味で形の再現性とも言う。この器官レベルの頑健性・再現性について分子生物学の中心原理（セントラルドグマ）を基準に考えれば、器官の発生段階において細胞レベルで遺伝子発現による転写・翻訳・タンパク質合成が完全に制御され、適切な細胞成長の位置、大きさ、タイミングが決定論的に制御されていることに依る、と考えることができるかもしれない。しかしながら、近年の顕微鏡観察による細胞レベルの振る舞いはむしろ確率論的に振る舞うことが明らかになってきた。例えば、シロイヌナズナのがく片の細胞ではサイズが縦方向に異常に長くなる巨大細胞が空間的にランダムに点在することが明らかになっており（図 1B, Roeder et al., 2010, Meyer et al., 2017）、葉の細胞では形が楕円型やジグソーパズル型など多様なかたちに分化する（図 1C, Sampathkumar et al., 2014, Sapala et al., 2018）。細胞の種類も様々で、器官は孔辺細胞や毛状突起など異なる機能を持つ細胞種によって構成されている（図 1C-D, Nedeau et al., 2002, Hervieux et al., 2017）。すなわち、器官レベルの頑健性・再現性の仕組みを理解するには遺伝学的・決定論的な制御のみを考えるだけでは不十分で、細胞レベルの確率論的な制御（成長・サイズ・かたち・種類）を考慮する必要性が浮かび上がってきた(Meyer et al., 2014, Hong et al., 2018)。

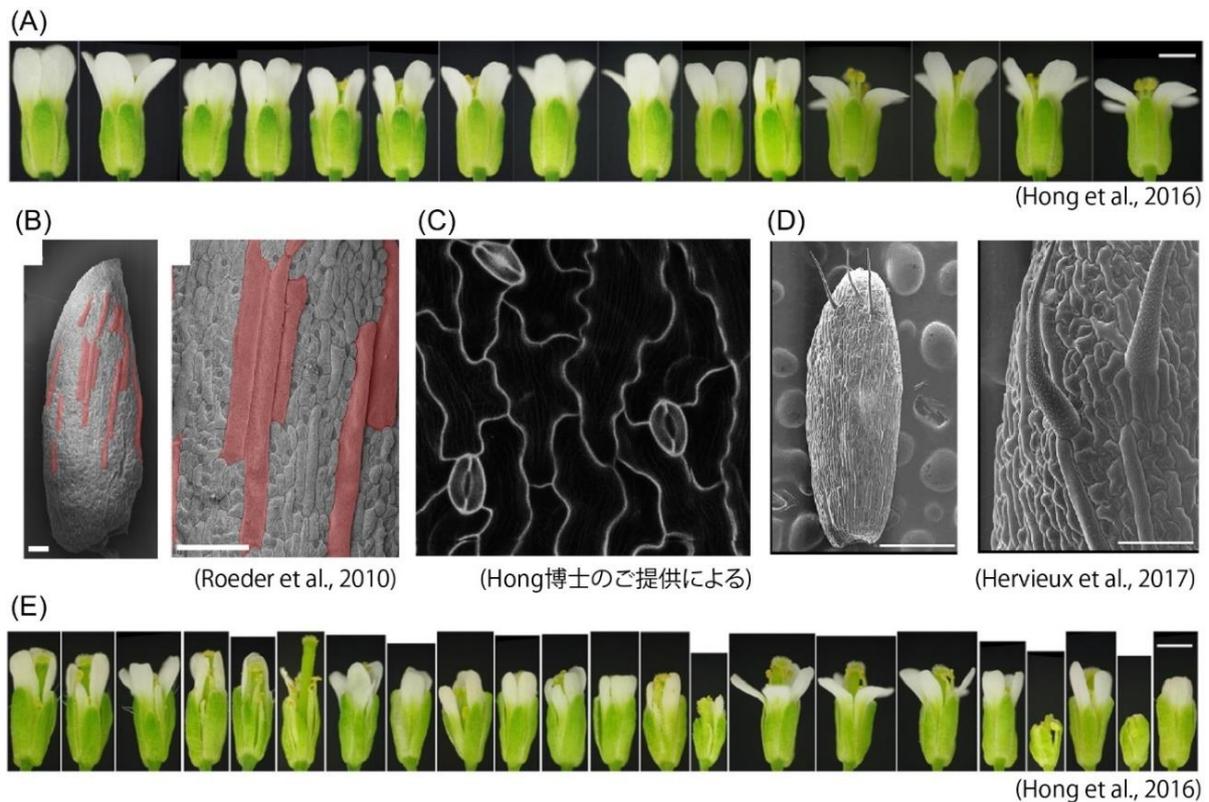


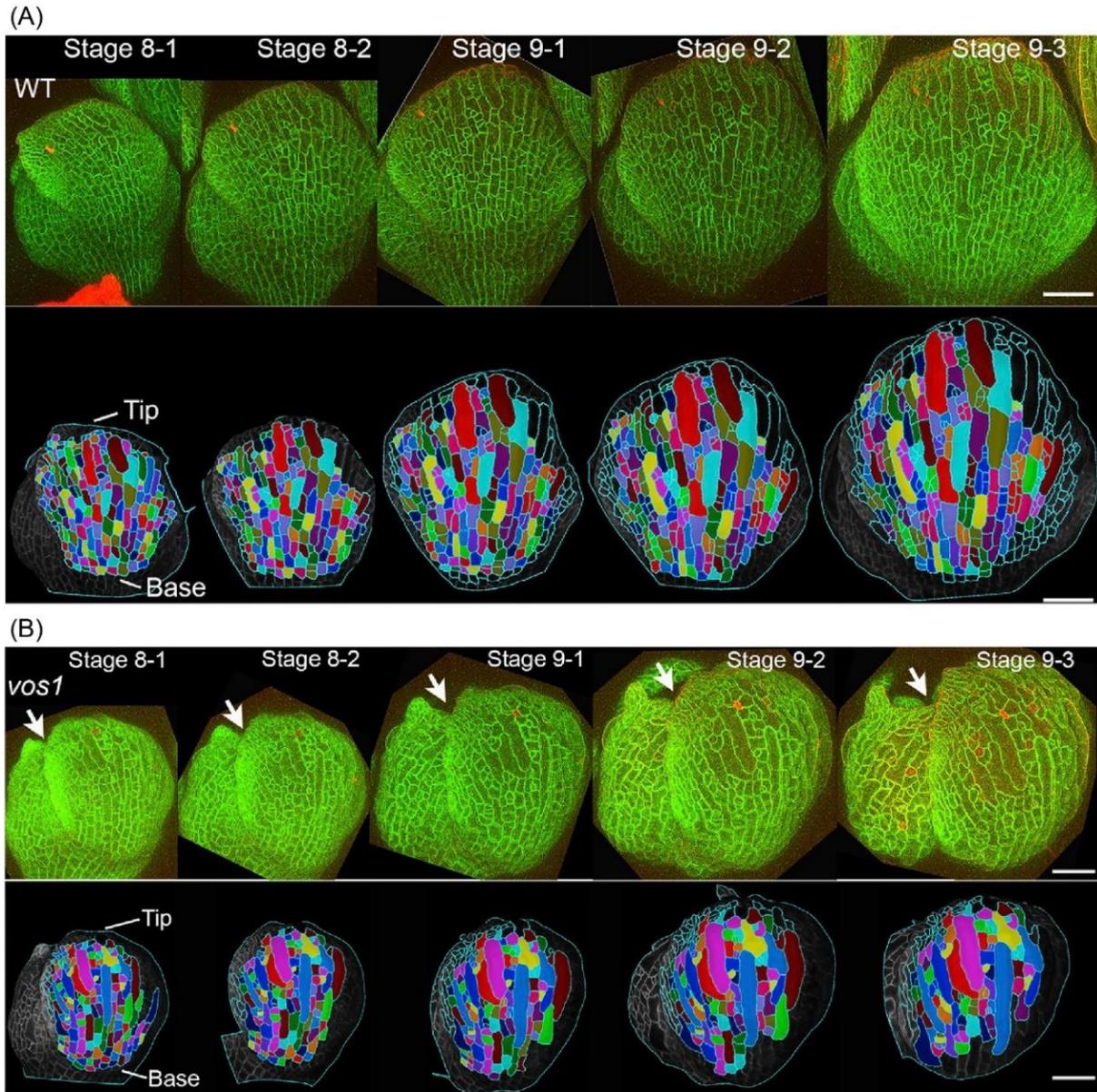
図 1. (A) 器官形状の頑健性。シロイヌナズナの野生型がく片は個体の違いに依らずほとんど同じ形状に成長する。(B) 細胞サイズの確率的なばらつき。縦方向に異常に長く伸長する巨大細胞（赤）がランダムな位置に点在する。(C) 細胞形状の確率的なばらつき。細胞はジグソーパズル型や楕円型などのさまざまなかたちに分化する。(D) がく片中の毛細胞。(E) 形状頑健性欠損変異体。がく片形状の頑健性が失われ、大小さまざまな形状に成長する。

### 3. “形状頑健性欠損”変異体の単離

植物生理学の強力な遺伝学的アプローチとして、特徴的な表現型（本研究の場合、形状の頑健性）に欠損を持つ変異体を単離するという遺伝学的スクリーニング手法がある。共同研究者であるコーネル大学 Adrienne Roeder 教授と研究員の Lilan Hong 博士は、数年に及ぶスクリーニング過程によって、がく片形状の頑健性に欠陥を持つ変異体（“形状頑健性欠損”変異体）、つまり最終形状が大小さまざまに変化する変異体を単離した（図 1E, Hong et al., 2016）。この変異体では AAA-ATPase 活性及びメタロプロテアーゼ活性を持つ FtsH4 遺伝子が欠損しているため、がく片形状がばらつき、形の頑健性に欠陥を引き起こすと考えられている（Hong et al., 2016）。またこの変異体では器官形状がばらつくことに加え、器官サイズもばらつくため、厳密には“形状・サイズ頑健性欠損”変異体（variable organ size/shape1; vos1 変異体）と呼ばれている。コーネル大学のグループは野生型と変異体で異なる発現をしている分子を探索したところ、成長停止を促す活性酸素（Reactive Oxygen Species）の分泌タイミングが変異体の方が野生型に比べて早期であることがわかった（Hong et al., 2016）。しかしながら、なぜ大小さまざまに変化していくのかについての分子生物学的な詳細な仕組みは未だ明らかでない。我々は形状が頑健である野生型と形状が変化する変異体の細胞レベルの動態を詳細に比較することにより、がく片器官の形の頑健性の仕組みを理解できると考えた。そこで細胞レベルの振舞いとして各時刻のがく片細胞の相対的成長率に着目し、細胞情報の抽出ソフトウェアである MorphoGraphX によって細胞成長を定量化することを試みた。

### 4. 細胞情報の抽出ソフトウェア MorphoGraphX

共焦点レーザー顕微鏡で得られる 3 次元蛍光データから細胞情報を抽出・定量化することができるオープンソースのソフトウェア MorphoGraphX は共同研究者であるマックスプランク植物育種学研究所の Richard Smith 教授のグループによって開発・改良が進められている（<https://www.mpipz.mpg.de/MorphoGraphX>）。MorphoGraphX によって、例えば細胞膜を標識した GFP 蛍光データから 3 次元的な物体形状（表面積、体積、曲率など）を定量化することが可能である。蛍光データのライブイメージング（時系列タイムラプス）があれば細胞の成長率や成長方向を計算することができる（deReuille et al., 2015）。つまり、本研究で定量化したいミクロな細胞の成長揺らぎとマクロな器官形状の両方のスケールの情報を同時に計測できる。細胞情報の抽出方法は(1) メッシュ構成過程、(2) 細胞セグメンテーション過程、(3) 細胞系譜追跡過程を通して行われ（付録をご参照）、図 2 に示すように上段の蛍光画像から下段の細胞の異なる色によるラベル付け（A：野生型、B：変異体）が可能になる。筆者の私見では MorphoGraphX は既存の画像処理ソフトでは扱いにくいメッシュ（小三角形の集合体）を自在に操作できるという特徴があり、植物の 3 次元的な形状を分析するうえで、非常に有用なデータ解析方法である。入門として MorphoGraphX による細胞の表面積成長の計算方法についてマニュアルとの対応付けを付録にまとめた（deReuille et al., 2015 supplement）。



(Hong et al., 2016)

図2. ライブイメージングによる3次元蛍光データとMorphoGraphXによる細胞情報の抽出。上段は共焦点顕微鏡による蛍光画像。下段はMorphoGraphXによる細胞抽出結果。異なる色は異なる細胞のラベルを表し、時間経過とともに同じ細胞系譜に同じラベルを割り当てることができる。(A) 野生型。(B) 変異体。

## 5. 細胞成長揺らぎのデータ解析

我々は当初、マクロな頑健性を獲得する野生型の方が変異体に比べてミクロな細胞レベルの成長の変動量（成長揺らぎ）が低いことを予想していた（以下、「揺らぎ」という言葉を単に変動量という意味で用いる）。つまり、マクロな頑健性を失う変異体の方がミクロな細胞レベルの成長揺らぎが高いと考えていた。この予想を検証するために、ミクロな細胞レベルでの細胞成長が時間的に（空間的に）どのように変動しているかを定量化することを試みた。

S. Tsugawa-4

まず細胞成長の時間的な揺らぎは、注目する細胞の表面積成長率の時間変化（時間方向の成長率の差）で定義される。図 3A に、各時刻の時間的な成長揺らぎを全細胞で平均した結果を示す。細胞成長の時間的な揺らぎは野生型が若干高い値であるものの、値が振動する時間領域などもあり、変異体と明確な違いがあるとはいえない。一方、細胞成長の空間的な揺らぎは、注目する細胞の表面積成長率の空間変化（隣接細胞との成長率の差の平均値）で定義され、図 3B に各時刻の成長の空間的な揺らぎを全細胞で平均した結果を示す。時間的な成長揺らぎとは異なり、空間的な成長揺らぎについては、野生型の方が変異体に比べて明確に高い値になることが明らかになった。つまり、当初の予想に反しマクロでは頑健な形状に至る野生型の方がミクロな細胞の空間的な成長揺らぎが高いことがわかった。そこで、次節で紹介するような作業仮説で器官形状の頑健性を説明できるのではないかと考えた。

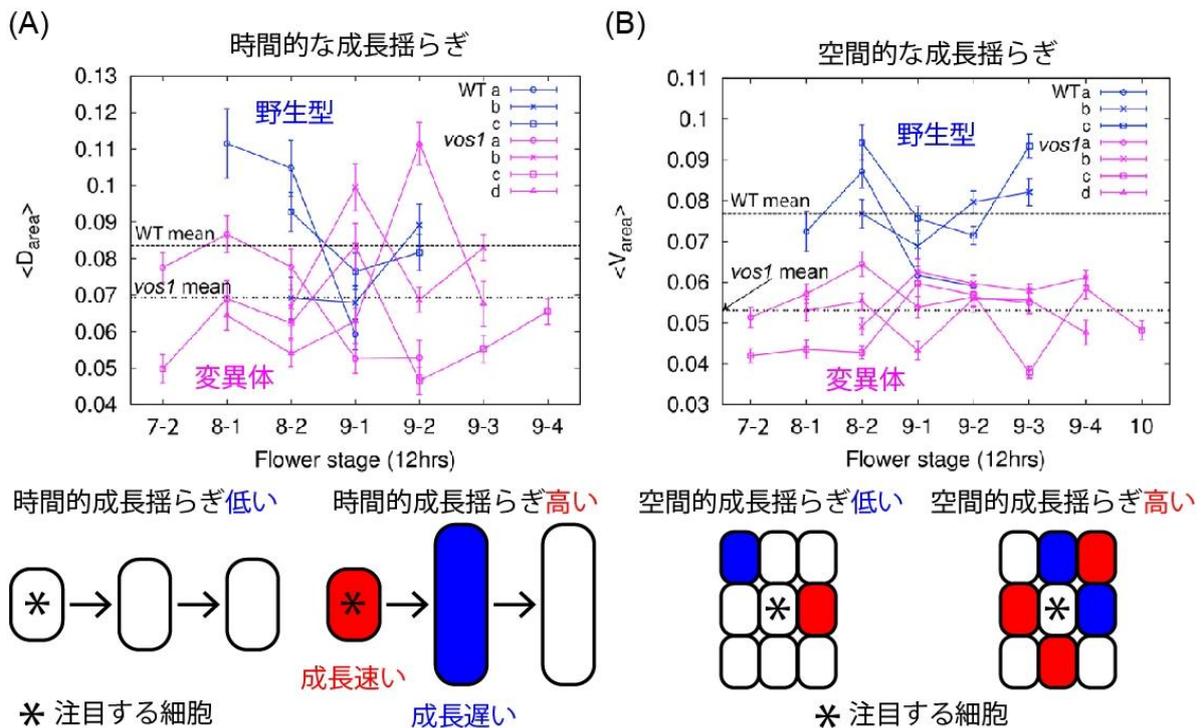


図 3. (A) 細胞の時間的な成長揺らぎの野生型と変異体の比較データ。(B) 細胞の空間的な成長揺らぎの野生型と変異体の比較データ。a-d は同じ遺伝型の異なるがく片を表す。

### 6. 作業仮説：細胞成長揺らぎが器官の“均一性”を導く

ミクロな細胞の成長揺らぎのデータ解析結果を基礎に、細胞の空間的な成長揺らぎと時間的な成長揺らぎを考慮に入れることを考えた。つまり、図 4 上段のように、成長が速い細胞や遅い細胞が空間的にランダムに分布している場合に、時間的にも細胞成長がランダムになり、それぞれの細胞の異常な変形が緩和されて最終的には形状が均一になる、という状況が野生型で起こっている、と考えた。一方の変異体では図 4 下段のように、成長が速い細胞や遅い細胞が空間的に局所的な部分にしか存在しないものの、時間的に細胞成長がランダムにはならないために、同じ局所部分ばかりが異常に変形し、マクロな最終形状がばらつく、と

考えられる。そこで、がく片の形の頑健性を次の作業仮説で説明することを考えた。

作業仮説「細胞の空間的成長揺らぎを時間とともに平均化することで頑健な形状を獲得する」

我々はこのような仕組みを「細胞成長揺らぎの時空間平均化」と名付け、器官の最終形状の頑健性を説明する中心的な概念である、と考えている。

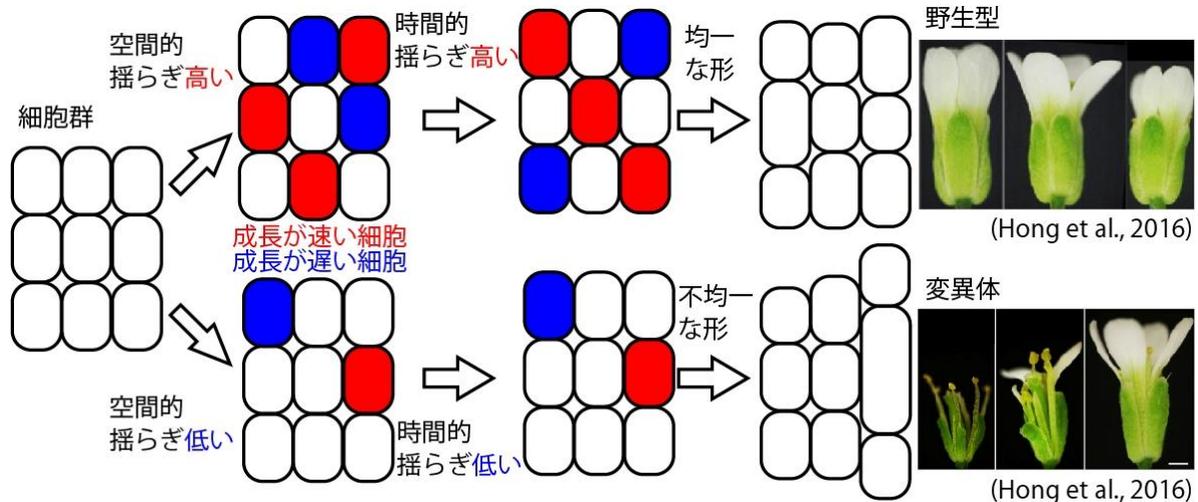


図4. 作業仮説の概念図。上段は、空間的成長揺らぎが高い場合に時間的にもランダムに成長して異常変形を緩和することで、最終的には均一な形を形成する野生型の場合を示している。下段は、空間的成長揺らぎが低く時間的成長揺らぎも低いと、局所的な異常変形が増幅されて、最終的には不均一形を形成する変異体の場合を示している。

## 7. 数理モデルによる作業仮説の検証

では実際に作業仮説によってほんとうに器官形状の頑健性を説明できるのだろうか？共同研究者である ENS リヨンの Arezki Boudaoud 教授と研究員の Mathilde Dumond 博士は有限要素法を用いた弾性体モデルで時空間的な成長揺らぎを考慮した数理モデルを考案した (Hong et al., 2016)。数理モデルはがく片器官を弾性ばねで構成される小三角形の集合体とみなし、茎から吸い上げる水分による膨圧によって“水風船”のように膨らみ成長する弾性体モデルを考えている (図 5A)。ただし、実際の植物はセルロースを主成分とする細胞壁を作り上げるため、完全な弾性体ではなく弾性変形と塑性変形の両方を示すような弾塑性体の成長を仮定する。つまり、成長後には弾性ばねによる残留応力が存在するが、細胞壁の補強により残留応力が一部緩和されることを仮定している。このがく片を模倣した弾性体の各ステップの形は局所的な弾性 (ヤング率) により決まり、硬い領域では成長が遅く、柔らかい領域では成長が速い (図 5B)。

この設定の下、“空間揺らぎパラメータ”は局所的な弾性の空間的なばらつきとして与え、パラメータが大きい場合にはヤング率の空間分布のばらつきを大きくし、パラメータが小さい場合にはヤング率の空間分布のばらつきを小さくする (図 5B)。一方、“時間揺らぎパラメータ”は局所的な弾性を時間的な変化として導入し、パラメータが大きい場合にはヤング率を刻一刻シャッフルし、パラメータが小さい場合にはヤング率をシャッフルせず前時刻のヤ

ング率と一致させる (図 5C)。このとき、形の頑健性は異なる初期状態 (異なるランダムネスの種によるヤング率の空間分布) から始めてあるステップまで計算し、最終形状がばらつくかによって考察することができる。図 5D は異なる 7 つの初期状態から弾性体を成長させて、100 ステップ後のそれぞれの最終形状を 7 色の線で示している。

結果を極端な 3 つの例に分類して示す。まず図 5D のパラメータ (i) では、初期分布の空間的成長揺らぎが高くこのまま成長していくと異常に変形していくが、時間的な成長揺らぎが高く弾性が刻一刻シャッフルされるため、異常変形を起こす力学的な弱点が緩和されて、最終的にはほとんど同じ形に成長する (図 5E 上段)。これは野生型の変形状況に相当する。図 5D のパラメータ (ii) では、初期分布の空間的成長揺らぎが高い場合に時間的な成長揺らぎが低く同じ局所部分ばかり異常変形が起き、最終的な器官形状がばらつく (図 5E 中段)。これは変異体の変形状況に相当する。図 5D のパラメータ (iii) では、初期分布の空間的成長

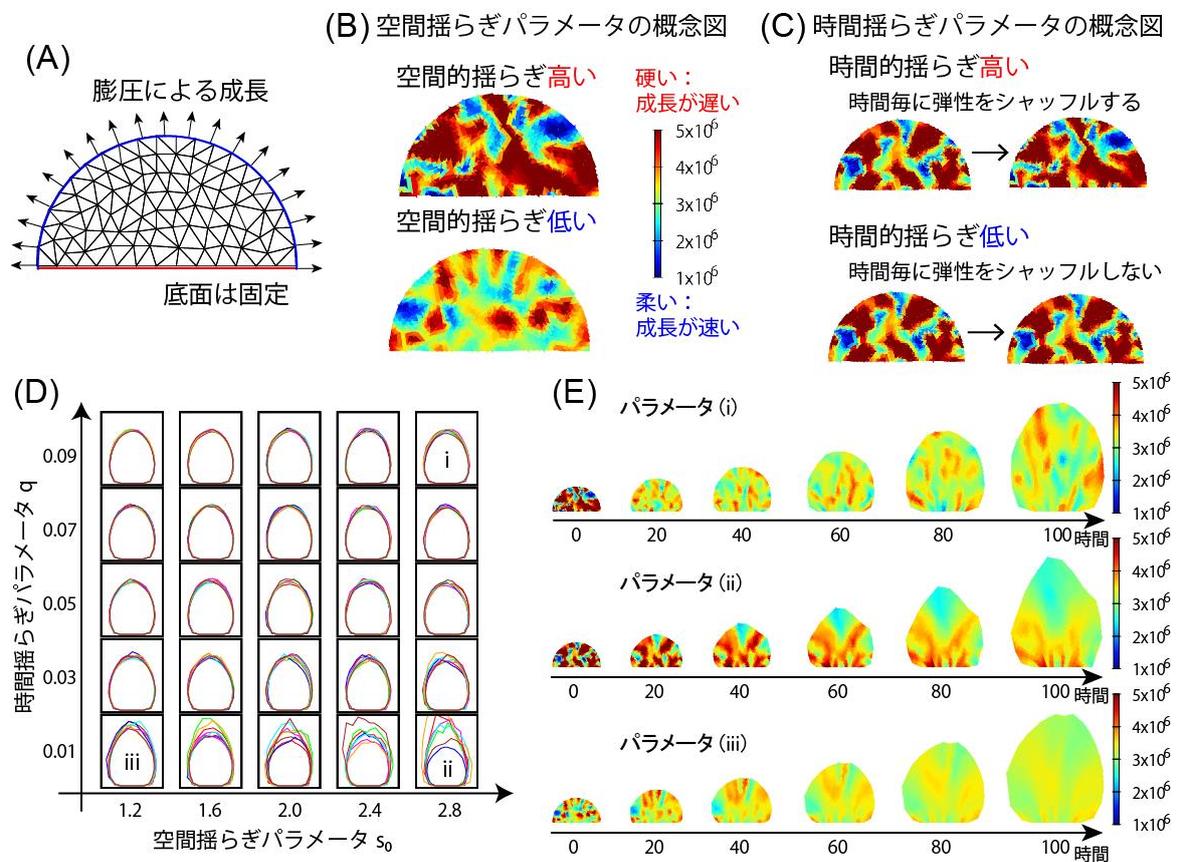


図 5. (A) 有限要素法を用いた弾性体モデル。茎から吸い上げる水分による膨圧によって“水風船”のように膨らむ状況をモデル化している (底面は固定)。(B) 空間揺らぎパラメータの概念図。色は局所的弾性 (ヤング率) を表し、赤い部分では硬い性質により成長が遅く、青い部分では柔らかいため成長が速い。(C) 時間揺らぎパラメータの概念図。(D) 器官形状の空間揺らぎパラメータ及び時間揺らぎパラメータによる依存性。(E) パラメータ (i), (ii), (iii) における各時刻の器官形状と弾性 (ヤング率) のカラープロット。

揺らぎが低い場合には時間的な成長揺らぎが低くても異常変形を増幅する効果が弱く、最終的には同じような形状を保つことができる (図 5E 下段)。これはパラメータ(i)とはまた別の理由で形の頑健性を示す変形状況を表している。つまり、数理モデルにより、局所的成長の時間的な揺らぎが強い場合にかく片形状は頑健性を獲得する、という作業仮説に整合する結果が得られた (パラメータ (i))。また、その仕組みと独立して、局所的成長の空間的な揺らぎが弱い場合にも頑健性を獲得し得る、という数理モデルにおける新しい側面も明らかになってきた (パラメータ (iii))。

## 8. まとめと展望

本稿では、植物がかく片器官が頑健な形状を獲得する仕組みの可能性のひとつとして、「細胞成長揺らぎの時空間平均化」という概念を概観した。研究を始めた当初、マクロな頑健性を保つ野生型の方が、頑健性を失う変異体に比べてミクロな細胞レベルの成長多様性が低いことを予想していたが、細胞レベルの成長の時空間揺らぎを解析した結果、マクロに頑健な形状をもつ野生型の方が変異体に比べて細胞レベルの揺らぎが大きい、というデータ結果を得た。そこで、作業仮説として「細胞の空間的な成長揺らぎが器官の“均一性”を導く」という仮説を考え、器官にとって細胞レベルの確率性・揺らぎは“必要なもの”と捉えて器官形状の頑健性が説明されるのではないかと考えた。この作業仮説を、有限要素法による弾性体モデルによって理論解析をした結果、「器官形状の頑健性は局所的成長の時空間的な揺らぎの絶妙なバランスにより局所的な力学的弱点が緩和されることで達成される」という器官の形の頑健性を説明する新しい器官成長の仕組みを提案している。

展望としては、これらの数理モデルによる定性的な説明を、実際のにかく片細胞の成長データと照らし合わせて定量的に検証していく必要があると考えている。実験から理論へ展開するアプローチとしては、細胞成長揺らぎパラメータに対応する遺伝子変異体を単離できれば野生型に対する本研究の成長モデルの実験的検証が可能かもしれない。一方で、理論から実験へ展開するアプローチとしては、例えば実際のデータと数理モデルを同じ座標をもつ図 5D のような形の空間（「形態空間」と呼んでいる）で比較することで、理論側が具体的に新しい実験検証方法を提案できるような研究体制を確立していくことが望ましい。これらの展望を実現していくためには、上記で紹介したような生理学・コンピュータ科学・データ科学・数理物理学などの異なる研究分野を横断するような新しい科学のスタイルで、共通言語（形態空間）や共通の議論の場を作っていく必要がある。

### 付録. “MorphoGraphX”による細胞の表面積成長の計算方法

MorphoGraphX のマニュアル (deReiulle et al., 2015 supplement) に沿いながら、細胞の表面積成長の計算方法を概説する。計算方法は、(1) メッシュ構成過程、(2) 細胞セグメンテーション過程、(3) 細胞系譜追跡過程を通して行われる。

#### (1) メッシュ構成過程

まず 3 次元のボクセル (2 次元ではピクセル) に蛍光強度が付与されている画像をソフト

ウェア上に取り込み (マニュアルの項目 3. Loading samples), 蛍光群の中心から見て最も外側にある蛍光点 (器官表面に相当) を特定する。この特定された蛍光点群 (器官表面) を覆うようにメッシュと呼ばれる小さな三角形の集合体を構成する (マニュアルの項目 4. Extract the biological object shape)。

### (2) 細胞セグメンテーション過程

得られた三角形の集合体と元の細胞膜蛍光情報を同画面に表示・照合することにより, 基本的には人間の目で細胞境界を判断しながら三角形に細胞・細胞境界のラベルづけを行っていく (7. Segment the cells)。最近の改良手法では, 細胞境界の高強度の蛍光情報を利用してセグメンテーション過程を自動的に適用するツールも導入されつつあるが (watershed algorithm), 計算誤差を含む場合があるためやはり最終的には人間の目で細胞境界を判断する必要がある。このようにして得られた三角形とラベル情報により, それぞれの細胞の表面積が計算できる (マニュアルの項目 9. Quantify Cell Area)。3次元蛍光として2層目3層目まで詳細に得られている場合は細胞体積の計算などが可能である (Bassel et al., 2014, マニュアルの項目 14.3D segmentation)。

### (3) 細胞系譜追跡過程

次に, 細胞の成長率を計算するためには, 異なる時刻の同じがく片の細胞の系譜, つまり異なる時刻の細胞ラベルの対応付けを行う必要がある。細胞ラベルの対応付けをするには, ある時刻のがく片細胞境界と次の時刻のがく片細胞境界を同画面に表示し (Mesh1 と Mesh2 にそれぞれ別のメッシュデータを取り込む), 一方のがく片をソフトウェア上で仮想的に拡大・縮小することで, 同形状の細胞を (人間の目で) 判断して親細胞と子細胞の対応付けを行う (マニュアルの項目 11. Parent labeling)。細胞がイメージング間隔の間に2つ3つに分裂している場合には, 分裂した子細胞一つ一つに親細胞との対応付けを行う。この細胞系譜データと(2)で得られた細胞面積データを利用して, 細胞表面積の相対的成長率が計算される。

## 謝辞

本研究はヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラムの研究課題「細胞の確率的振る舞いから再現的な形状へ：形態形成に潜む協調原理」(2014年度～2017年度)の支援により進められました。コーネル大学 Adrienne H. K. Roeder 教授, Lilan Hong 博士, Mingyuan Zhu 研究員には植物生理学の基礎知識や蛍光データの解析方法などを教えて頂きました。マックスプランク植物育種学研究所の Richard S. Smith 教授, Anne-Lise Routier-Kierzkowska 博士, Aleksandra Sapala 研究員には, MorphoGraphX を用いた解析方法や細胞表面上の力学について学ばせて頂きました。ENS リヨン高等師範学校の Arezki Boudaoud 教授, Olivier Hamant 教授, Nathan Hervieux 研究員, Mathilde Dumond 研究員には有限要素法による理論解析を教えてくださいました。北海道大学電子科学研究所の小松崎民樹教授, ストックホルム大学の Chun-Biu Li 准教授には, 活発で有益な研究の議論をさせて頂きました。理化学研究所の新海創也博士, 基礎生物学研究所の藤田浩徳助教, 大阪大学の藤本仰一教授にはご多忙の中, 本稿をお読み頂き適切なコメントを頂戴いたしました。これらの支援に心から感謝申し上げます。

S. Tsugawa-9

## 引用文献

- Bassel, G.W., Stamm, P., Mosca, G., de Reuille, P.B., Gibbs, D.J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M.J., and Smith, R.S. 2014. Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the *Arabidopsis* embryo. *PNAS*, 111: 8685-8690.
- de Reuille P.B., Routier-Kierzkowska, A.-L., Kierzkowski, D., Bassel, G.W., Schüpbach, T., Tauriello, G., Bajpai, N., Strauss, S., Weber, A., Kiss, A., Burian, A., Hofhuis, H., Sapala, A., Lipowczan, M., Heimlicher, M.B., Robinson, S., Bayer, E.M., Basler, K., Koumoutsakos, P., Roeder, A.H.K., Aegerter-Wilmsen, T., Nakayama, N., Tsiantis, M., Hay, A., Kwiatkowska, D., Xenarios, I., Kuhlemeier, C., & Smith, R.S. 2015. MorphoGraphX: a platform for quantifying morphogenesis in 4D. *elife* 4: e05864.
- Hervieux, N., Tsugawa, S., Fruleux, A., Dumond, M., Routier-Kierzkowska, A.-L., Komatsuzaki, T., Boudaoud, A., Larkin, J.C., Smith, R.S., Li, C.-B., Hamant, O. 2017. Mechanical Shielding of Rapidly Growing Cells Buffers Growth Heterogeneity and Contributes to Organ Shape Reproducibility. *Curr. Biol.*, 27: 3468-3479.
- Hong, L., Dumond, M., Tsugawa, S., Sapala, A., Routier-Kierzkowska, A.-L., Zhou, Y., Chen, C., Kiss, A., Zhu, M., Hamant, O., Smith, R.S., Komatsuzaki, T., Li, C.-B., Boudaoud, A., Roeder, A.H.K. 2016. Variable Cell Growth Yields Reproducible Organ Development through Spatiotemporal Averaging. *Dev. Cell*, 38: 15-32.
- Hong, L., Dumond, M., Zhu, M., Tsugawa, S., Li, C.-B., Boudaoud, A., Hamant, O., Roeder, A.H.K. 2018. Heterogeneity and Robustness in Plant Morphogenesis: From Cells to Organs, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 69: 469-495.
- Meyer, H.M., Roeder, A.H.K. 2014. Stochasticity in plant cellular growth and patterning. *Front. Plant Sci.* 5: 420.
- Meyer, H.M., Teles, J., Formosa-Jordan, P., Refahi, Y., San-Bento, R., Ingram, G., Jönsson, H., Locke, J.C.W., Roeder, A.H.K. 2017. Fluctuations of the transcription factor ATML1 generate the pattern of giant cells in the *Arabidopsis* sepal. *eLife*, 6: e19131.
- Nedea, J.A., Sack, F.D. 2002. Control of Stomatal Distribution on the *Arabidopsis* Leaf Surface. *Science*, 296: 1697-1700.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., Meyerowitz, E.M. 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Biol.* 8: e1000367.
- Sampathkumar, A., Krupinski, P., Wightman, R., Milani, P., Berquand, A., Boudaoud, A., Hamant, O., Jönsson, H., Meyerowitz, E.M. 2014. Subcellular and supracellular mechanical stress prescribes cytoskeleton behavior in *Arabidopsis* cotyledon pavement cells. *eLife* 3: e01967.
- Sapala, A., Runions, A., Routier-Kierzkowska, A.-L., Gupta, M.D., Hong, L., Hofhuis, H., Verger, S., Mosca, G., Li, C.-B., Hay, A., Hamant, O., Roeder, A.H.K., Tsiantis, M., Prusinkiewicz P., Smith R.S. 2018. Why plants make puzzle cells, and how their shape emerges. *eLife* 7: e32794.

## ばらつきから見えること：キンポウゲ科の花被片数を例に

北沢美帆

大阪大学全学教育推進機構

〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-16

Miho S. Kitazawa

### **Findings from the variation: Ranunculaceae tepal numbers as an example**

Keywords: *Anemone*, Development, Floral organ number, Ranunculaceae, Variation

Center for Education in Liberal Arts and Sciences, Osaka University

1-16 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a5.00152

### 1. 背景

#### 1-1. 生物形態のばらつき

生物の形態には、様々なばらつきが存在する。ばらつきが生まれる要因を小さいスケールから順に考えると、まず遺伝子発現のゆらぎが考えられる。遺伝子発現のゆらぎは細胞の分裂パターンや成長に影響し、最終的には私たちの目に見えるスケール、例えば器官の形やパターンのばらつきに反映される。ばらつきは要因の内外に分けて考えることもできる。生命活動の様々なシステムの内側から生まれるばらつきもあれば、環境によって外的に与えられるノイズも存在する。個体内のばらつきだけでなく、個体差や地域ごとの特性など、より大きなスケールでのばらつきも存在する。このスケールのばらつきにも、遺伝に依拠するものもあれば、環境によるものもある。

こうしたばらつきは、観察や実験の結果の理解を妨げるものとして認識されることがある。ある変異体が呈する表現型が一定であれば議論は簡単だが、ばらつきが大きければ途端に難しくなる。実験室環境ならまだしも、野外集団では遺伝的に不均一であるうえに、様々な微細環境の変動がノイズとなり、ばらつきの原因の解明は簡単ではない。しかしそれが生物のリアルであり、生物学者である以上無視はできない。それでは逆に、ばらつきの存在をポジティブに捉えることはできないだろうか。ばらつきが何らかの生物学的過程を経て生まれている以上、ばらつきから生物に関する情報を引き出すこともできるのではないか。

#### 1-2. ばらつきの形

ばらつきを目に見える形で表す方法の一つが、ヒストグラム（度数分布）である。直感的な例として、ヒトの身長を考えてみよう。横軸に身長を（例えば1cm刻みで）取り、縦軸にその身長を持つヒトの数を並べたものを想像してほしい。20歳の日本人女性の平均身長は160cmだ、というとき、日本人女性がすべて160cmであると考える人はいないであろう。平均的な身長の人数が最も多いが、大きい方にも小さい方にもだいたい均等にばらつく、と考えるのがふつうだ。こうした左右対称な分布として、もっとも著名な分布は正規分布であ

M. S. Kitazawa-1

る。生物の特徴を数値化して議論するときには、正規分布を想定しているケースが多い。

自然界にはその他にも様々なばらつきがある。生物の形態のばらつきについては、19世紀の終わりごろから様々な検討がなされてきた。その中で、メンデルの法則の再発見者として有名な Hugo De Vries という学者は、植物の器官数のばらつきに三つのタイプを見いだした (De Vries 1894, 1895, 1899)。対称な分布、非対称な分布、そして複数のピークを持つ分布である。このような分布はどのように生まれるのだろうか？

植物の器官数の分布を理論的に説明しようとする試みは、De Vries と同時代に始まっている。例えば Karl Pearson という著名な統計学者は、*Ranunculus bulbosus* の花弁数分布に対して確率分布の当てはめを試みた (Pearson 1895)。ただ、Pearson はとある確率分布の例として花弁数のばらつきを挙げたに過ぎない。

ばらつきの起源についてより生物学的な説明を与えた例として、Bachmann と Chambers (1978) による研究が挙げられる。彼らはキク科 *Microseris* 属の植物の綿毛の本数に注目した。この属の植物では、綿毛の本数がだいたい5から10の間に分布する。まれに5未満と10より大きいものがあるが、これを排除して度数分布を描いてみると、ポアソン分布によく似ている。彼らはこの事例について、ポアソン分布を生み出すような発生過程まで考えた。綿毛は萼片の変形した器官だと考えられており、一つの花につき通常5個つくられる綿毛原基から発生する。各綿毛原基は通常1個の綿毛に分化するが、低確率で分裂すると仮定する。すると生じる分布はポアソン分布と予想され、実測値にもよく合う。

*Microseris* の綿毛の例のように、特定の発生過程によるばらつきが分布の形に反映されるなら、分布の形から発生過程を推定することもできるのではないか。そうすれば、ばらつきから生物の発生過程に関する情報を引き出すことができるのではないか？

## 2. 花器官数のばらつきの特性

私たちが注目しているのは、キンポウゲ科の花器官数のばらつきである (Kitazawa & Fujimoto 2014)。花器官、特に花被片 (花弁・萼片) の数は、多くの植物においては種ごとに一定である。単子葉植物においては3、真正双子葉植物では5または4というように、系統群ごとにだまかに決まっていることも知られている。しかしキンポウゲ科においては、花被片の数が大きくばらつく (図1)。

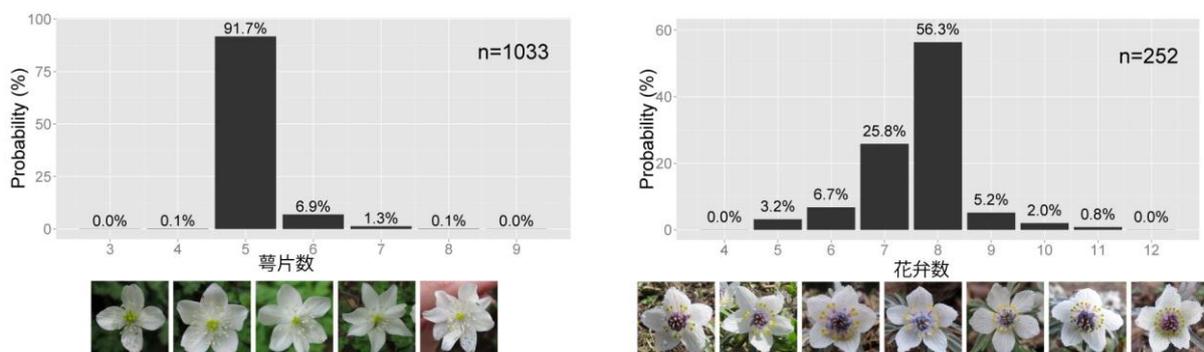


図1. ニリンソウの萼片数 (左; 白い花弁状器官) とセツブンソウの花弁数 (右; 黄色い蜜腺が目立つ器官) の分布 (Kitazawa & Fujimoto 2014 より)。

キンポウゲ科の花器官数のばらつきの程度は、同種であっても個体群ごとに異なる。場合によっては、最頻値となる花器官数が、個体群によって異なることもあった。キンポウゲ科においては、花器官数は種ごとに決まっているのではなく、完全にばらばらなのだろうか。それとも基準になる数があるのだろうか？

これに答えるヒントは、分布の形をじっくり見ることで見つかった。最頻値の値とばらつきの大きさに関係があったのだ。例えばウマノアシガタの花弁数の場合、5弁花が最も多い個体群での5弁花の頻度は8割を超えるが、6弁花が最も多い個体群での6弁花の頻度は4割程度であった。ばらつきの大きさを標準偏差で見ると、前者の方が圧倒的に小さい。標準偏差を平均の関数として見てみると、平均が3, 5, 8といった特定の値にあるときのみ、ばらつきが小さくなることがわかった(図2)。図に示しているのは標準偏差のみだが、分布の鋭さを表す尖度 *kurtosis* も、同様に平均が特定の値にあるときのみ高い値をとる(鋭いピークと広い裾野を持つ)ことがわかった。

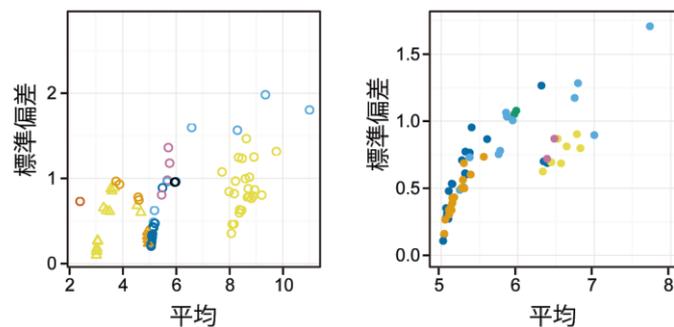


図2. キンポウゲ属(左)とイチリンソウ属(右)のばらつきの統計量(Kitazawa & Fujimoto 2016より; De Vries 1894, 大野 1991のデータを含む)。色は種を表す。キンポウゲ属は○が花弁数, △が萼片数。イチリンソウ属はすべて花被片数。

この結果は何を表すのだろうか？もし、種ごとの「典型」が決まっておらず、どんな数でも取り得るのであれば、例えば最頻値が6の時に標準偏差が0に近いことがあっても良い。しかし、図2を見ると最頻値が6でばらつきが小さい(平均も6付近となる)状況は、観察されていないことがわかる。ここから、器官数は好き勝手にばらつけるのではなく、種ごとに何らかの形で決まる「典型的な数」があると考えられる(図3)。

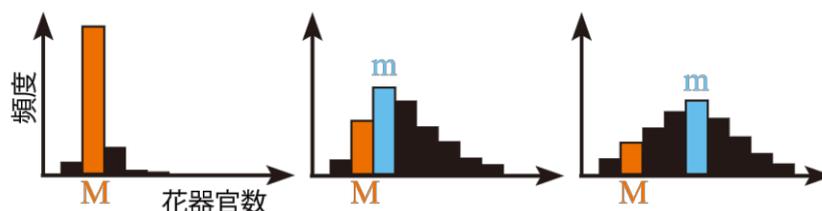


図3. 種ごとの「典型的な数」Mがある。見かけ上の最頻値  $m$  が  $M$  と異なるときは、その個体群における器官数のばらつきが大きい(Kitazawa & Fujimoto 2016より)。

では、この「典型」とは何なのだろうか。形態を決めるのは発生過程だから、発生過程にその要因を探すべきだろう。一つのアイディアは、BachmannとChambers(1978)による説明である。彼らは綿毛原基が5個あり、そこから1個乃至2個の綿毛が形成されると考えた。この場合、綿毛原基の数が「典型」だと考えられる。

一方、キンポウゲ科の花を見ていると、複数の花器官の中間形態をもつような花器官が頻繁にみられる。このような花器官の存在は、ABCモデルと呼ばれる分子モデル(図4AB; Coen & Meyerowitz 1991)で説明可能である。ABCモデルは、花器官のアイデンティティが花の発生過程においてどのように決まるかを説明するモデルである。植物の花は、中心から心皮、雄蕊、花被片(あるいは花弁と萼片)という3乃至4種類の花器官が同心円状に並んだ構造をとる。ここで複数の原基が一つの同心円に並んだ構造をwhorlと呼び、一つのwhorlの中の花器官は、通常同じアイデンティティを持つ。すべての花器官は相同器官と考えられ、花芽分裂組織の縁にできるドーム状の花器官原基から分化する。花器官原基の発生運命は発生当初決まっていなかったが、ABC三つのクラスの遺伝子(現在ではより多くの遺伝子が発見され、3よりも多くのクラスが提案されているが、ここでは簡単のため最初に発見された3クラスに留める)により花の領域が四つに分けられ、花器官原基は領域ごとに異なるアイデンティティを付与される(図4AB)。

このモデルはキンギョソウとシロイヌナズナの変異体の研究に基づいて提案されたが、今日では、いくらか調整すれば被子植物全体に適用可能だと考えられている。一部の植物では、遺伝子発現領域、すなわち花器官アイデンティティの境界があいまいだと指摘されており(Soltis et al. 2007)、キンポウゲ科でも境界の揺らぎ(図4C)が花器官数のばらつきの主因と考えられている(Wang et al. 2016)。

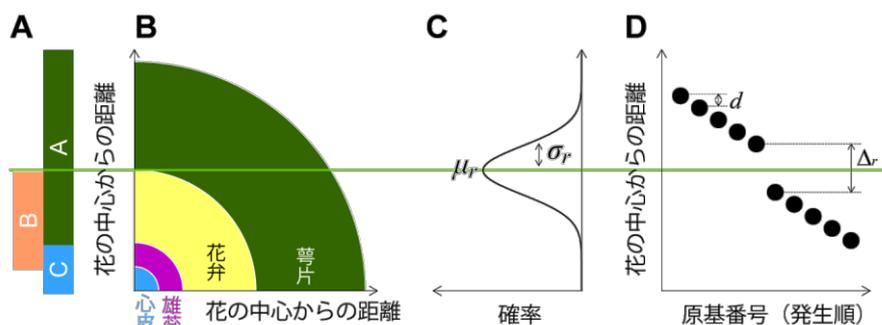


図4. 花器官数のばらつきの発生モデル(Kitazawa & Fujimoto 2014より)。A, B. ABCモデル。ABCクラス遺伝子の同心円状の発現(A)が花芽を四領域に分割する(B; 花芽の1/4のみを示す)。C. 遺伝子発現境界の揺らぎに関する仮定。ある遺伝子(ここではBクラス遺伝子)の発現境界が平均 $\mu_r$ 、標準偏差 $\sigma_r$ の正規分布でゆらぐと仮定する。D. 花器官原基の位置に関する仮定。早く発生した花器官原基ほど花の中心から遠くにあり、一定数の原基(この図では5個)が発生すると、 $\Delta_r$ の距離的ギャップを置いて次の原基が発生する。

図2, 3で示したばらつきの特性を表すには、境界の揺らぎだけでは不十分である。「典型

的な数」を与える要素がないからだ。ABC クラス遺伝子の境界の揺らぎの他にキンポウゲ科の花発生で知られていることとして、求心的な発生、すなわち外側の花被片ほど早く発生すること、さらに発生初期では原基が一つずつ発生することが挙げられる (Ren et al. 2010)。原基が一つずつ発生し、外側に押し出されることで、それぞれの原基と花の中心との距離がばらつくことになる。これは花器官数のばらつきを増加させるが (Wang et al. 2016)、やはり「典型的な数」を与えることにはつながらない。

一方、様々な文献で花発生の電顕写真を眺めていると、原基が一つずつ発生するキンポウゲ科でも、曖昧ながら whorl (中心から等距離にある花器官群または花器官原基群) 状の構造がみられる。厳密な whorl を持つ輪生 (whorled) の配置の場合、一つの whorl を構成する複数の原基は一斉に発生する。しかし、花発生においては、連続的な原基発生から整った whorl 状の器官配置に遷移することがある。キンポウゲ科の花発生では多くの場合、何となく whorl 状の配置は見えるものの、発生が進んでも完全な whorl にはならず、発生の順番が花被片の重なりという形で維持される。この中途半端な whorl 状の原基配置が「典型的な数」とばらつきを共存させているのではないか。

私たちは、この中途半端な whorl に基づいて、キンポウゲ科の花器官数のばらつきを説明するモデルを作成した (図 4D)。whorl の定義は「中心から等距離にある花器官原基群」だが、ここで想定するのは中途半端な whorl なので完全に等距離ではなく、古く発生した原基ほど中心から若干遠い位置にあると考えた。同時に whorl としての区切りを与えるため、一定数個の原基 (図では 5 個) の内側に  $\Delta_r$  の距離的ギャップがあると仮定した。この配置を仮定したうえで、ABC モデルに従って遺伝子発現境界の揺らぎ (正規分布と仮定) を加味し、どのような分布が得られるか計算した (図 5)。

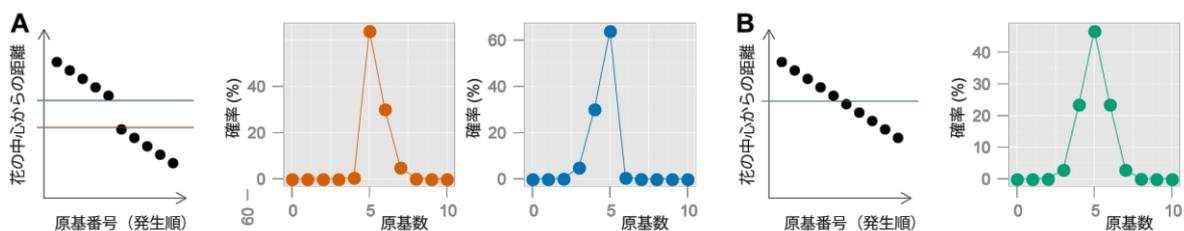


図 5. 花器官数のばらつきの発生モデルの結果 (Kitazawa & Fujimoto 2014 より)。

計算の結果、中途半端な whorl を仮定すると、花器官数のばらつきに見られる左右非対称な分布が得られる (図 5A) 一方で、whorl 状の配置を仮定しないと対称な分布しか得られないことがわかった (図 5B)。分布の鋭さ (尖度) は、 $\mu_r$  が whorl 間のギャップにある限り  $\Delta_r$  により制御される。 $\mu_r$  が whorl 間のギャップにない場合、分布は正規分布に近づく。このモデルを用いることで、図 3 に示した分布の形の変化を説明することができる。

ではそもそもこの中途半端な whorl はどうやってできるのか、という疑問が起こるのだが、それについてのアイディアは Kitazawa & Fujimoto (2015) を参照されたい。

### 3. ばらつきと進化のシナリオ

本稿では、花器官のばらつきの発生的起源として Bachmann と Chambers によって提案された原基の分裂、私たちの提案する ABC モデルと中途半端な whorl, 以上 2 点の仮説を紹介した。花発生の知見からすると、おそらくどちらも起こり得ることだろう。見る対象によっていずれが主因であるか異なる可能性もあるが、どちらのモデルが実測値をよりよく説明するかによって、主たる発生源を推測することも可能だろう。もちろん、考えられる原因がこれで尽きたわけではないが、実際に観察されている現象から無理なく導き出せ、ばらつきの発生源を説明できるモデルとして、これらのモデルには価値があると考えられる。

ばらつきの特性は、進化ともかかわり得る。ここまで見てきたばらつきと、進化に直接結びつく遺伝的なばらつきとの関係は明らかではない。しかし全くの無関係ではないだろう。ばらつきが何らかの発生過程に依拠する以上、ばらつきは発生過程の特性によって縛られる。発生過程に縛りがあれば、生物のかたちは無制限に揺らぐわけにはいかず、進化の方向性をも縛るものとなる。発生過程で揺らぎ得る方向は、進化の方向とも何らかの関わりをもつのではないだろうか。

花器官の数について言えば、被子植物の二大系統群、真正双子葉植物と単子葉植物の間で基本数が異なるという謎がある。ナデシコやサクラなど真正双子葉植物では 5 が基本で 4 がそれに次いで多いが、ユリやアヤメなど単子葉植物では 3 がほとんどだ (Smyth 2018)。両者の姉妹群であるマグノリア類に三数性がみられることや、花の祖先形態を再構成する試み (Sauquet 2017) から、三数性が祖先形態だという考えも提示されている。三数性が祖先的だとして、真正双子葉植物の 4 や 5 はどのように現れたのか? 他の数がほとんど見られないのはなぜか? ばらつきを通して発生過程の縛りを探ることが、そういった疑問に答える鍵となるかもしれない。

## 謝辞

本総説を執筆する機会をくださった日本植物学会・電子出版物編集委員の方々、ならびに執筆のきっかけとなるシンポジウムを主として企画してくださった川出健介博士に感謝いたします。本総説の中心となる研究は、JSPS 科研費 (JP12J01243) の助成のもと、大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻の藤本仰一博士との共同研究により行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

## 引用文献

- Bachmann, K., & Chambers, K. 1978. Pappus part number in annual species of *Microseris* (Compositae, Cichoriaceae). *Plant Syst. Evol.* 129(1-2): 119–134.
- Coen, E., & Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37.
- De Vries, H. 1894. Ueber halbe Galton-Curven als Zeichen discontinuirlicher Variation. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 12: 197–207.
- De Vries, H. 1895. Eine zweigipige Variationskurve. *Devel. Genes Evol.* 2(1): 52–64.
- De Vries, H. 1899. Ueber Curvenselection bei *Chrysanthemum segetum*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 17: 84–98.

- Kitazawa, M.S. & Fujimoto, K. 2014. A developmental basis for stochasticity in floral organ numbers. *Front. Plant Sci.* 85(4): 3530.
- Kitazawa, M.S. & Fujimoto, K. 2015. A dynamical phyllotaxis model to determine floral organ number. *PLoS Comp. Biol.* 11(5): e1004145.
- Kitazawa, M.S. & Fujimoto, K. 2016. Relationship between the species-representative phenotype and intraspecific variation in Ranunculaceae floral organ and Asteraceae flower numbers. *Ann. Bot.* 117(5): 925–935.
- 大野正男. 1991. ニリンソウ. 河野昭一・田中肇 (編) フィールドウォッチング3. 早春の季節を歩く. pp. 60–63. 北隆館. 東京.
- Pearson, K. 1895. Contributions to the Mathematical Theory of Evolution. II. Skew Variation in Homogeneous Material. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. A.* 186: 343-414
- Ren, Y., Chang, H-L., & Endress, P.K. 2010. Floral development in Anemoneae (Ranunculaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 162(1): 77–100.
- Sauquet, H. et al. 2017. The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nat. Commun.* 8, 16047 doi: 10.1038/ncomms16047.
- Smyth, D.R. 2018. Evolution and genetic control of the floral ground plan. *New Phytol.* 220(1): 70–86 doi:10.1111/nph.15282
- Soltis, D.E., Chanderbali, A.S., Kim, S., Buzgo, M., Soltis, P.S. 2007. The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms, *Ann. Bot.* 100(2): 155–163
- Wang, P., Liao, H., Zhang, W., Yu, X., Zhang, R., Shan, H., ... & Kong, H. (2016). Flexibility in the structure of spiral flowers and its underlying mechanisms. *Nat. Plants*, 2(1), 15188.

## 熱帯雨林の多種共存と動物による確率的な種子散布

柿嶋聡<sup>1</sup>, 石田厚<sup>2</sup>, 吉村仁<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup>国立科学博物館分子生物多様性研究資料センター

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 4-1-1

<sup>2</sup>京都大学生態学研究センター

〒520-2113 滋賀県大津市平野 2-509-3

<sup>3</sup>静岡大学工学部数理システム工学科

〒432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1

<sup>4</sup>ニューヨーク州立大学環境科学林学大学環境・森林生物学教室

〒13210 アメリカ合衆国ニューヨーク州シラキュース市

<sup>5</sup>千葉大学海洋バイオシステム研究センター

〒299-5502 千葉県鴨川市内浦 1

Satoshi Kakishima<sup>1</sup>, Atsushi Ishida<sup>2</sup>, Jin Yoshimura<sup>3,4,5</sup>

### **Extreme tree species diversity in tropical rainforests enabled by stochastic animal seed dispersals**

Keywords: animal seed dispersers, coexistence, glacial period, multi-layer lattice model, tropical rainforests

<sup>1</sup>Center for Molecular Biodiversity Research, National Museum of Nature and Science

4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

<sup>2</sup>Center for Ecological Research, Kyoto University

2-509-3 Hirano, Otsu, Shiga 520-2113, Japan

<sup>3</sup>Department of Mathematical and Systems Engineering, Shizuoka University

3-5-1 Johoku, Naka, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561, Japan

<sup>4</sup>Department of Environmental and Forest Biology, State University of New York College of

Environmental Science and Forestry, Syracuse, NY 13210, USA

<sup>5</sup>Marine Biosystems Research Center, Chiba University, 1 Uchiura, Kamogawa, Chiba 299-5502,  
Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a6.00153

### 1. はじめに

樹木の多様性は、緯度が低くなるほど高いほか (Currie 1991), 蒸発散量が高い地域ほど高くなることが知られる (Latham & Ricklefs 1993)。中でも、熱帯雨林は樹木の多様性がきわめて高く、狭い単位面積にも多くの樹種が共存している (Richards 1996, Morley 2002)。古くから、共存機構がなければ、多種の共存は不可能であることが、理論研究により指摘されており (Hutchinson 1961), 熱帯雨林の多種共存機構に関しては、数多くの仮説が提唱されてきた

(Wright 2002)。その代表的なものに、ニッチ分化仮説 (Terborgh 1973), Janzen-Connell 仮説 (Janzen 1970, Connell 1971), 統合中立説 (Hubbell 2001) がある。これらについては、多くの日本語の優れた解説があるため (例えば, 今埜 & 清和 2011, 門脇 2016 など), ここでは簡単な説明に留める。ニッチ分化仮説では、生物は種ごとに異なる環境・資源を利用するため、それぞれの種が異なるニッチ (生態的地位) を持つ (Terborgh 1973)。熱帯雨林では利用できる環境・資源が多く、より多くのニッチが存在するため、樹木の多様性が高くなると説明される。Janzen-Connell 仮説は、親木の近くでは食害や病害虫が多くなるために、実生が育ちにくくなる (Janzen 1970, Connell 1971)。その結果、負の頻度依存選択が働き、単位面積あたりの種数が増えたと考えられる。統合中立説では、種間でのニッチや適応度の違いを仮定せず、種分化、絶滅、移入のみを考慮したモデルでも、実際の熱帯雨林の多様性を再現することができる (Hubbell 2001)。しかし、これらの仮説はいずれも決定的ではなく、そもそも排他的ではないため、熱帯雨林の多種共存機構については、今なお活発な議論が続いている。また、近年は、送粉者、種子散布者、土壌の菌叢といった生物との相互作用が、植物の多様化や多様性の維持に貢献している可能性が指摘されている (Tiffney 2004, Bascompte & Jordano 2007, Mangan et al. 2010, Pauw 2013, Kadowaki et al. 2018)。そこで、本稿では、生物間相互作用の中でも、樹木と種子散布動物との相互作用に注目し、確率的に生じる動物の種子散布が、樹木の多種共存機構や多様化に与える影響について、数理モデルによる研究 (Kakishima et al. 2015) を紹介する。

## 2. 動物による種子散布

植物の種子散布様式には、風や水の流れを利用した風散布や水散布といった環境を利用した散布様式、果実が弾けるなどして植物自身の力で種子を散布する自動散布、鳥や哺乳類、昆虫などに果実が付着したり、食べてもらったりすることで種子を運んでもらう動物散布などがある (Howe & Smallwood 1982)。動物散布植物の果実は、特定の動物に食べてもらいやすいような色や大きさに進化しており、例えば鳥、コウモリ、その他の哺乳類に種子を運ばれる植物の果実には、それぞれ異なる特徴があることがよく知られており、同じ動物に運ばれる植物の果実は共通の特徴を持つ (Schaefer et al. 2004, Lomáscolo et al. 2010)。このような植物と散布動物の共生関係は種子散布シンドローム *seed dispersal syndrome* と呼ばれている (van der Pijl 1969, Howe & Smallwood 1982)。植物の中には、特定の種類の動物が食べやすいような (あるいは特定の種しか食べられないような) 形態の種子や果実に進化している種類も知られている。植物と散布動物が種特異的な関係を持つ場合、散布動物が減少、あるいは絶滅すると、種子散布が困難となり、植物の個体数が減少する可能性が指摘されている (Bond 1994, Markl et al. 2012)。散布動物の絶滅が植物の個体数に大きな影響を与える場合は、植物にとって強い選択圧になると考えられ、実際に果実食の大型鳥類が絶滅した地域では、ヤシの1種の種子サイズが急速に小型化したとされる例も知られている (Galetti et al. 2013)。このように、植物と散布動物はしばしば密接な共生関係を持つ。

鳥や哺乳類などの散布動物は、果実を食べたその場で種子を吐き戻すこともあるが、多くの場合、果実を食べてから数十分~1日程度で種子を排泄する (Barnea et al. 1992, Fukui 1996,

Stevenson 2000)。また、ネズミ類や鳥類などでは、種子や果実を運んで貯蓄することが知られている (Smith & Reichman 1984)。そのため、多くの場合、散布動物が果実を食べた親木から移動した先に、種子が散布されるが、この種子分散には、それぞれの動物の行動様式が直接的に反映されることが考えられる。一般に、動物には特定の移動経路があり、その周辺で糞をすることが知られる (Yumoto et al. 1999)。そのため、川に沿って移動するような動物であれば、種子が散布されるのも川沿いであるだろうし、藪の中を移動する動物であれば、藪の中で、立ち枯れで休息する鳥であれば、立ち枯れがある場所に種子が散布されることが予想される。その結果、種子散布する動物が異なる植物種間では、種子が散布される場所も異なることが考えられる。このような種子散布場所の不均一性は、植物の生育場所の違いを生み出し、結果として、樹木種の共存を促進している可能性がある。特に熱帯雨林では、他の植物群系と比較して、動物散布植物が多いことが知られ、その割合は樹木全体の9割を超えることもある (Howe & Smallwood 1982)。そこで次項では、この確率的な種子散布が樹木の多種共存を促進するという仮説を数理モデルにより検証する。

### 3. 確率的な動物散布を再現した多種共存モデル

個体ベースモデルの1種である格子モデルは、空間を格子状に分割し、それぞれのセルに個体を配置し、相互作用させるモデルであり、空間構造を考慮したシミュレーションが可能である。熱帯雨林における樹木種子の動物散布を再現するモデルには、格子モデルを応用した多層格子モデルを採用した。多層格子モデルでは、格子を多層に重ねることで、異なる階層の個体とは空間的な相互作用が生じない一方、同じ位置に存在する個体同士を相互作用させることが可能である (図1)。この動物散布モデルでは、 $n$ 種の植物 ( $P_i, i=1, \dots, n$ )、それぞれの植物種の種子を散布する  $n$ 種の動物 ( $A_i, i=1, \dots, n$ ) を想定する場合、 $n+1$ 層の格子を作成する。1層目は植物層で  $L_0$ 、各セルは植物種  $P_i$  もしくは植物が生育しない空き地  $O_0$  のいずれかとする。残りは動物層で ( $L_i, i=1, \dots, n$ )、 $L_i$ 層には動物種  $A_i$ のみが配置され、格子上を移動する。植物種  $P_i$ の種子は動物種  $A_i$ のみが散布する。動物層には、動物が配置されているセル  $A_i$ 、空き地  $O_i$ に加え、動物が移動できないセル  $U_i$ が非移動セル率  $u$ の確率で存在する。この動物が移動できない格子を設定することで、動物が動くことのできる格子が制限され、動物の行動パターンを再現する。このモデルでは、植物の共存機構に焦点を当てているため、動物の繁殖や死亡は考慮していない。また、植物は必ず受粉・結実に成功し、種子は即座に親個体まで成長する。シミュレーションでは、まず動物層の1つのセルをランダムに選択し、そのセルに動物  $A_i$ がいた場合、同じ層  $L_i$ の空き地  $O_i$ に移動する。最初に動物がいた格子の直下の植物層  $L_0$ に、動物種に対応した植物  $P_i$ が生育していた場合、植物  $P_i$ の種子を動物が移動した先に運ぶ。移動した先の植物層  $L_0$ が空き地  $O_0$ であった場合、種子が発芽、成長し、植物  $P_i$ の親個体となる。また、植物  $P_i$ は死亡率  $m_i$ で死亡し、空き地  $O_0$ となる。このような条件でシミュレーションを行い、セルの総数と同じ回数 ( $200 \times 200 = 40,000$ 回)の動物の移動とそれに伴う種子散布を1ステップとした。なお、シミュレーションが早く定常状態に達するようにするため、植物種により死亡率が異なるとした ( $m_i = M - 0.01i, M$ : 基本死亡率)。

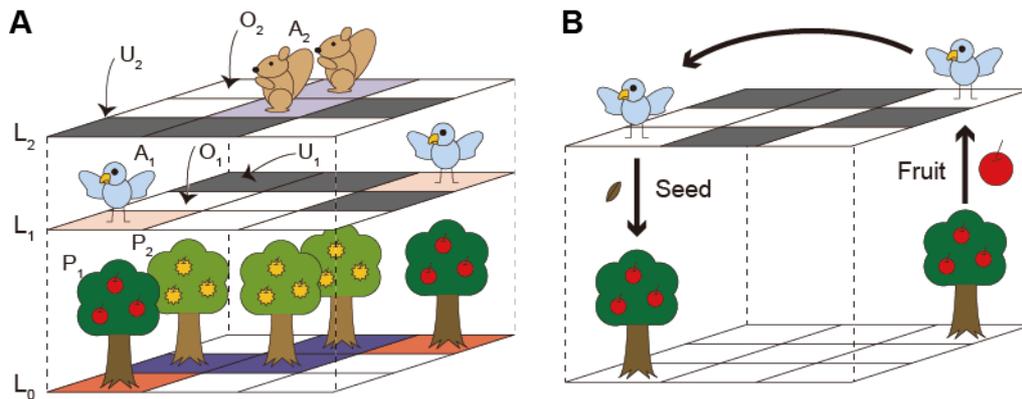


図 1. 確率的な動物種子散布を再現した多層格子モデルの概念図。

A. 2種の植物 ( $P_1$ ,  $P_2$ ), それぞれの植物種の種子を散布する2種の動物 ( $A_1$ ,  $A_2$ ) を想定する場合,  $P_1$ ,  $P_2$ が生育する植物層  $L_0$ ,  $A_1$ が移動する動物層  $L_1$ ,  $A_2$ が移動する動物層  $L_2$ の合計3層の格子を作成する。動物層  $L_i$ には, 動物  $A_i$ が移動できないセル ( $U_i$ ) を  $u$ の確率で設定する ( $i = 1, 2$ )。植物や動物が存在しない空き地は  $O_i$  ( $i = 0, 1, 2$ ) とする。B. 動物層  $L_1$ の1つのセルをランダムに選択し, そのセルに動物  $A_i$ がいた場合, ランダムに空き地  $O_i$ を選び, 移動する。その際, 最初に動物  $A_i$ がいた格子の直下の植物層  $L_0$ に, 植物  $P_i$ が生育していた場合, 種子が運ばれる。移動後のセルの植物層  $L_0$ が空き地  $O_0$ であった場合, 種子が発芽, 成長し, 植物  $P_i$ の親個体となる。Kakishima et al. (2015) を改変。

まず, 全ての種類の散布動物が全ての場所に自由に動けるとした場合 ( $u = 0$ ), 最も死亡率の低い植物種のみが生き残り, 他の種類は全滅した (図 2A)。一方, 全てのセルのうち, 移動できないセル  $U_i$ の割合が 80%で, 動物  $A_i$ が残りの 20%のセルにしか動けないように, 行動を制限した場合 ( $u = 0.8$ ), 全ての植物種が生き残った (図 2B)。 $u$ が大きくなるにつれ, 共存種数は増えていくが, それぞれの植物種の個体数は少なくなる (図 2C)。これは, 各セルに生育できる植物種数が減少し, 植物の生育場所に種間で分化が生じることで, 共存できる種数が増加したことを意味している。散布動物の行動パターンというニッチの違いにより, 植物の生育場所というニッチの違いが生じることで共存が可能になったとも言え, 一種のニッチ分化仮説でもある。

ここまでのシミュレーションでは, 植物  $P_i$ の種子を動物  $A_i$ のみが散布する, 動物種子散布の完全な種特異性を仮定していたが, 実際の熱帯雨林ではこのようなケースはまれであり, 通常は, それぞれの植物種に対して, 複数の動物種が種子を散布している (Bascompte & Jordano 2007)。そこで, 種子散布の種特異性が低い場合についてシミュレーションを行った。植物  $P_i$ の種子を 100%の確率で種子散布を行う動物  $A_i$ が, 他の植物  $P_j$ の種子を 0%, 20%, 50%の確率で散布する場合について比較すると, 種子散布の種特異性が低いと植物種の共存種数は減った (図 2D)。これは, 同じ動物種に複数の植物種の種子が運ばれることで, 植物種間での生育場所の分化が小さくなり, 競争が生じてしまい, 共存種数が減少したと考えられる。一方で, 種子散布の種特異性が低くても,  $u_i$ が大きい場合は多種の共存が可能であったことから, 実際の熱帯雨林でも確率的な動物種子散布による多種共存メカニズムが働いている可能性が高い。

さらに, 植物の死亡率が高い場合と低い場合を比較してみると, 基本死亡率  $M < 0.1$  の場合は

8種全てが共存するのにに対し、死亡率が上がっていくと共存種数は減っていき、 $M > 0.3$  では、1種のみが生存する (図 2E, F)。死亡率が高いと、全体の個体数密度が減少していき、死亡率の最も低い種のみが残ることがわかる。これは、寒冷地や乾燥地など生物の生育に不適な環境では共存種数が減ることを再現していると考えられる。

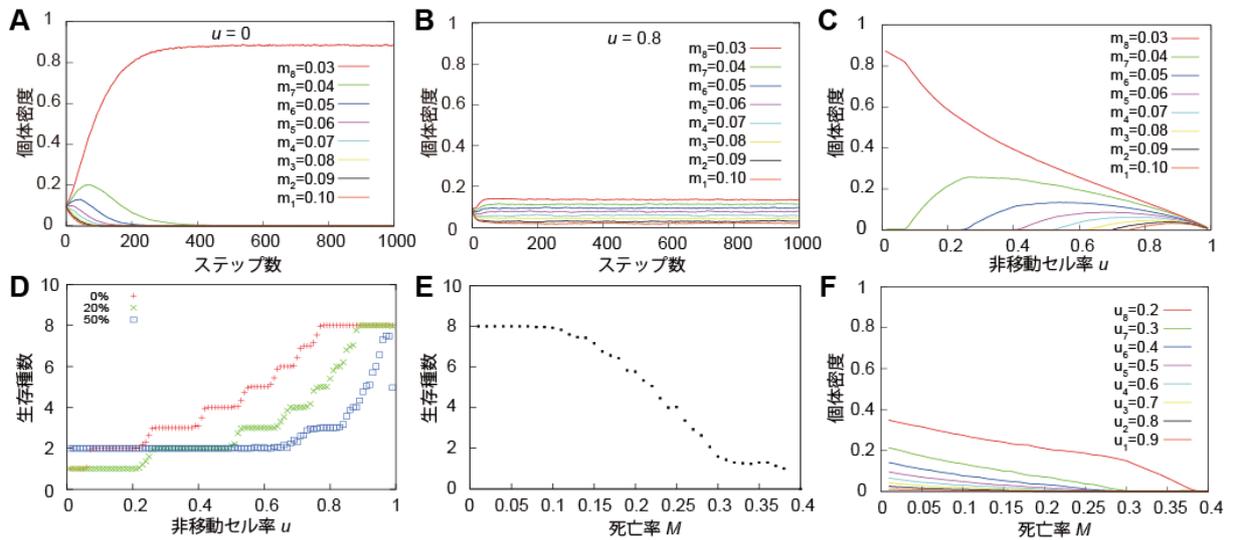


図 2. 動物種子散布の多層格子モデルを用いたシミュレーションの結果。

A.  $u=0$  の場合の植物 8 種の個体密度の変化。B.  $u=0.8$  の場合の植物 8 種の個体密度の変化。C.  $u$  を変化させたときの植物 8 種の個体密度。D. 植物  $P_i$  の種子を 100% の確率で種子散布を行う動物  $A_i$  が、他の植物  $P_j$  の種子を 0%, 20%, 50% の確率で散布する場合の共存種数。E. 植物の死亡率を変化させたときの共存種数。F. 植物の死亡率を変化させたときの個体数密度。

Kakishima et al. 2015 を改変。

#### 4. 異所的種分化と確率的な動物散布を再現した多様化モデル

熱帯雨林は、過去の気候変動に伴う寒冷化や乾燥化により、何度も分断化と再結合を繰り返してきたと考えられている (Benn & Evans 2010)。それにより、多くの動植物もその生育地の分断と再結合を経験してきた。一般に、地理的な隔離が生じた集団間では、それぞれの生育地への適応や遺伝的浮動により、徐々に変異が蓄積することで生殖隔離が成立し、集団が再度接触しても交配ができなくなるため、種分化が生じる (Coyne & Orr 2004)。種分化の中でも、この地理的隔離による異所的種分化が最も一般的であると考えられている。そのため、熱帯雨林の高い生物多様性を生み出す原動力の一つが、この分断化と再結合の繰り返しであると考えられている

(Richardson et al. 2001, Hewitt 2004)。そこで、熱帯雨林の分断化と再結合の繰り返しによって多様化した植物の共存において、植物と種子散布動物の関係がどのような影響を与えるのか、検証した。

熱帯雨林の分断化と再結合を再現するため、4つのステージを想定した (図 3A)。ステージ 1 では、分断化する前の熱帯雨林を再現し、ステージ 2 で熱帯雨林が分断化される。ステージ 3 では、分断化した熱帯雨林では、植物と動物が種特異性を維持したまま新たな種に種分化する。ス

ページ4では、再び熱帯雨林が再結合し、元の種と新たな種が同じ熱帯雨林を共有する。ここま  
 までを1つのサイクルとし、ステージ1に戻る。理想的には、1つのサイクルで種数は倍増してい  
 くことになるため、3サイクルあれば種数は $2^3=8$ 倍となる。実際には、多種の共存は難しいた  
 め、これより共存種数は少なくなると考えられる。シミュレーションでは、3000ステップの  
 ステージ1の後、ステージ2になるときに200x200のセルからなる格子を200x100のセルからな  
 る2つの格子に分ける。ステージ3では、種特異性を持つ植物種 $P_i$ と動物種 $A_i$ のペア $P_i - A_i$ が  
 $P_{i1} - A_{i1}$ と $P_{i2} - A_{i2}$  ( $i=1, 2, \dots, n$ )の2つのペアに種分化する。一般に近縁種は類似のニッチを  
 持つことから(系統的ニッチ保守性 phylogenetic niche conservatism, Wiens & Graham 2005, Losos  
 2008),

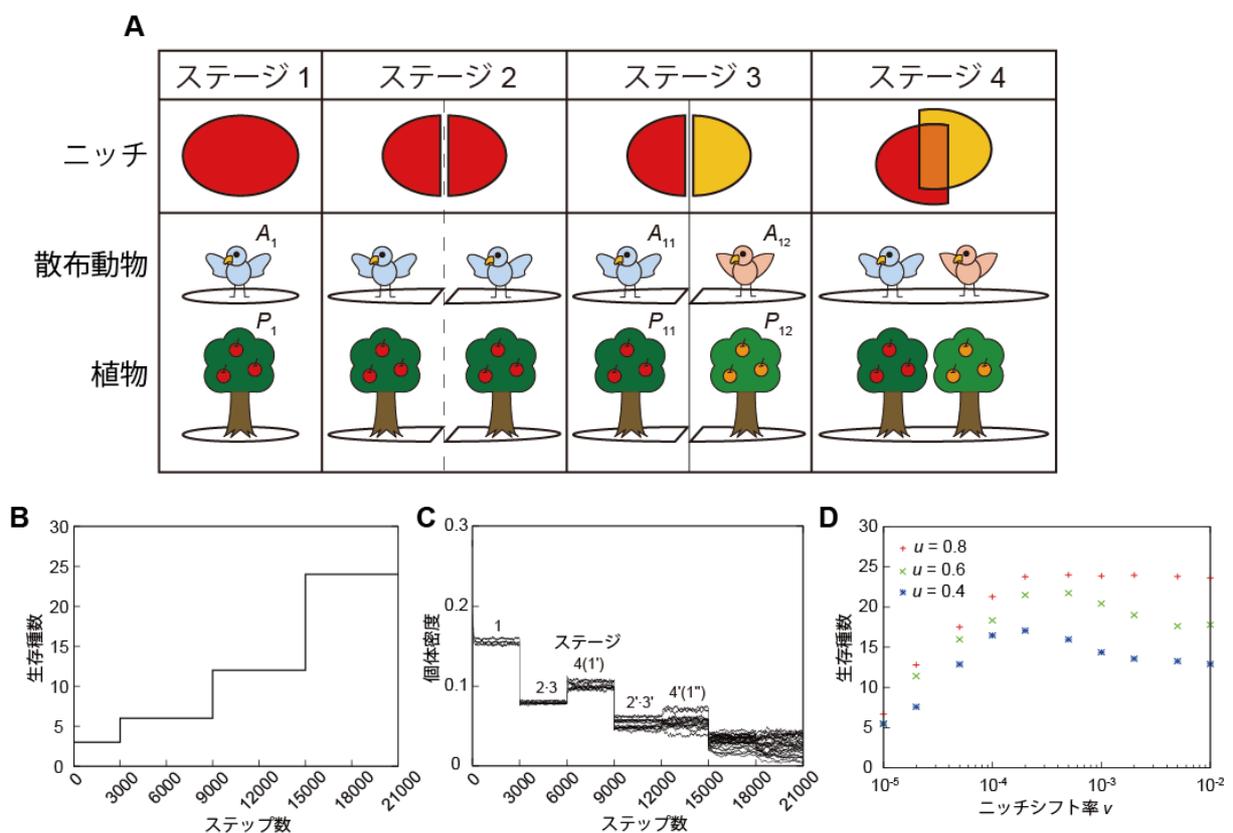


図3. 地理的隔離による異所的種分化と動物散布による多種共存を再現したモデルの概念図とシ  
 ミュレーション結果.

A. ステージ1では、分断化する前の熱帯雨林を再現し、ステージ2で熱帯雨林が分断化され  
 る。ステージ3では、植物 $P_1$ と動物 $A_1$ が種特異性を維持したまま新たな種 $P_{11}$ と $A_{11}$ 、 $P_{12}$ と $A_{12}$   
 に種分化する。その際、ニッチシフトが生じ、動物の行動パターンが変わる。ステージ4では、  
 再び熱帯雨林が再結合する。ここままでを1つのサイクルとし、ステージ1に戻る。B. 3種の植物  
 が3回の異所的種分化の繰り返しにより、24種まで増加する。非移動セル率 $u=0.8$ 、ニッチシ  
 フト確率 $\nu=10^{-2}$ 、死亡率 $m_i=0.032-0.002i$  ( $i=1, 2, 3$ )。C. Bと同じシミュレーションでの植物  
 各種の個体密度の変化。D.  $u=0.4, 0.6, 0.8$ において、 $\nu$ を $10^{-5}$ から $10^{-2}$ まで変化させたときの、  
 生存種数。Kakishima et al. 2015を改変。

種分化の際に、片方の散布動物の移動できないセル  $U_i$  がニッチシフト確率  $\nu$  で隣のセルに変化する

るとした。この状態で 3000 ステップのシミュレーションを行い、その後ステージ 4 として 2 つの格子を再結合させ、ステージ 1 に戻ってシミュレーションを継続した。実際のシミュレーションでは、3 種の植物と散布動物からスタートして、格子の分断化、種分化、格子の再結合からなるサイクルを 3 回繰り返す、最大で  $3 \times 2^3 = 24$  種へと多様化する過程での多種共存を検証した。

植物や動物の各種の初期密度をそれぞれ 0.2、非移動セル率  $u = 0.8$ 、ニッチシフト確率  $\nu = 10^{-2}$ 、死亡率  $m_i = 0.032 - 0.002i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) としたとき、3 回の異所的種分化の繰り返しにより、24 種まで多様化した (図 3B)。24 種へと多様化する際には、種分化前の種に比べ、個体密度は減少していったが、絶滅した種はなかった (図 3C)。 $u = 0.8$  のとき、 $\nu = 10^{-5}$  では、6 種までしか増えなかったが、 $\nu$  を大きくしていくと種数は増えていき、 $\nu = 10^{-3}$  や  $\nu = 10^{-2}$  では、24 種全てが生じた (図 3D)。一方、 $u = 0.4$  や  $u = 0.6$  のときは 24 種全てが生ずることはなく、 $u$  が大きいと生存種数が多くなることがわかった。これは、前項の共存モデルと同様に、動物の行動パターンに制限がある場合ほど、多様化した植物の共存が可能になることを示している。さらに、 $u = 0.4$  や  $u = 0.6$  のとき、 $\nu = 10^{-4}$  と  $\nu = 10^{-3}$  の間に、共存種数のピークが存在していた。これは、種分化の際に散布動物の行動パターンのニッチシフト率が低すぎると、種分化後の 2 種の行動パターンがほとんど同じになってしまい、植物の生育場所のニッチもほとんど同じになり、植物の共存が不可能になる (Terborgh 1973)。一方、ニッチシフト率が高い場合は、近縁の 2 種間でのニッチの違いが大きくなり、行動パターンの違いがランダムに近づくと、共存種数がわずかに減っている。この要因に関しては、より詳細な検証が必要である。

## 5. 今後の展開

実際の熱帯雨林では、きわめて多くの動植物が生育するため、ほとんどの植物の種子散布者が分かっていないものの、植物と散布動物の種特異性は必ずしも高くないと考えられている

(Bascompte & Jordano 2007)。今回のシミュレーションでは、植物と散布動物の種特異性が低くても、確率的な種子散布により植物の共存種数は向上することが示唆された。そこで、実際のフィールドデータをモデルに組み込むことで、より現実に近いモデルに改良することが期待される。今回のモデルでは動物散布種のみを想定していたが、実際には重力散布や風散布が主要な種子散布様式であるような植物 (例えば、東南アジアのフタバガキ科) においても多様化が知られている (Dayanandan et al. 1999)。異なる散布様式の植物が混ざって生育する場合をモデルで再現することで、より現実に近い条件で多種共存がどのような条件で成立するか検証することが可能である。また、植物とポリネーターの相互作用が、植物と動物の双方の多様化を引き起こすことはすでによく知られている (Pauw 2013)。例えば、絶対送粉共生系として知られる、クワ科のイヌビワ属とイチジクコバチや、コミカンソウ科のカンコノキ属とハナホソガでは、熱帯雨林においてきわめて高い多様性が知られる (Cook & Rasplus 2003, Kato et al. 2003)。このように、熱帯雨林の高い多様性は、複数の要因が複合的に影響している可能性が高いため、最終的には様々な要因について統合したモデルを作成していくことが必要である。

## 6. まとめ

確率的な動物散布を再現した多層格子モデルを用いたシミュレーションから、植物と散布動物に種特異性があり、散布動物の行動にパターンが存在すると、散布される植物の生育場所が分化し、植物の共存種数が増えることが明らかとなった。さらに、このモデルでは、植物と散布動物の共生関係による多種共存と、熱帯雨林の分断による異所的種分化の繰り返しが、熱帯雨林の植物の多様化の要因である可能性を示唆している。このことは、今起きている現象、生物、群集などの成立要因を解明する際には、それが生じた歴史的な背景を考慮に入れる必要があることを示している。今起きていること自体は直接的な検証が可能な一方で、歴史的な背景を調べるためには分子系統解析や化石情報などに基づいた推定が必要であるが、必ずしも十分な情報がない場合も多い。その際に、本論文で紹介したような数理モデルを実証的なデータと組み合わせることが今後は重要になっていくだろう。

## 謝辞

本稿で紹介した研究を行うにあたり、静岡大学の守田智教授、国立環境研究所の吉田勝彦博士、長崎大学の伊東啓博士を始め、多くの方にお世話になりました。また、紹介した研究の一部および本論文の執筆は、科研費（13J03600, 26840126）、旭硝子財団、基礎生物学研究所、琉球大学熱帯生物圏研究センターの助成を受け行いました。

## 引用文献

- Barnea, A., Yom-Tov, Y. & Friedman, J. 1992. Effect of frugivorous birds on seed dispersal and germination. *Acta Oecol.* 13: 209-219.
- Bascompte, J. & Jordano, P. 2007. Plant-animal mutualistic networks: the architecture of biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*: 38: 567-593.
- Benn, D., & Evans, D.J.A. 2010. *Glaciers and glaciation*, 2nd edn. Routledge, New York.
- Bond, W.J. 1994. Do mutualisms matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 344: 83-90.
- Connell, J.H. 1971. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. In: Den Boer, P.J. & Gradwell, G. (eds.) *Dynamics of populations*. pp. 298-312. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
- Cook, J.M. & Rasplus, J.Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends Ecol. & Evol.* 18: 241-248.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. 2004. *Speciation*. Sinauer, Sunderland.
- Currie, D. J. 1991. Energy and large-scale patterns of animal-and plant-species richness. *Am. Nat.* 137: 27-49.
- Dayanandan, S., Ashton, P.S., Williams, S.M. & Primack, R.B. 1999. Phylogeny of the tropical tree family Dipterocarpaceae based on nucleotide sequences of the chloroplast *rbcl* gene. *Am. J. Bot.* 86: 1182-1190.

- Fukui, A. 1996. Retention time of seeds in bird guts: costs and benefits for fruiting plants and frugivorous birds. *Plant Species Biol.* 11: 141-147.
- Galetti, M., Guevara, R., Côrtes, M.C., Fadini, R., Von Matter, S., Leite, A.B., Labecca, F., Ribeiro, T., Carvalho, C.S., Collevatti, R.G., Pires, M.M., Guimarães, P.R. Jr., Brancalion, P.H., Ribeiro, M.C., Jordano, P. & Pires, M.M. 2013. Functional extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size. *Science* 340: 1086-1090.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359: 183-195.
- Howe, H.F. & Smallwood, J. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13: 201-228.
- Hubbell, S.P. 2001. The unified neutral theory of biodiversity and biogeography. Princeton University Press, Princeton.
- Hutchinson, G.E. 1961. The paradox of the plankton. *Am. Nat.* 95: 137-145.
- Janzen, D.H. 1970 Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Nat.* 104: 501-529.
- 門脇浩明. 2016. パッチ状環境における生物多様性の維持機構. *日本生態学会誌* 66: 1-23.
- Kadowaki, K., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A.S., Hidaka, A., & Toju, H. 2018. Mycorrhizal fungi mediate the direction and strength of plant–soil feedbacks differently between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal communities. *Commun. Biol.* 1: 196.
- Kakishima, S., Morita, S., Yoshida, K., Ishida, A., Hayashi, S., Asami, T., Ito, H., Miller III, D.G., Uehara, T., Mori, S., Hasegawa E., Matsuura, K., Kasuya, E. & Yoshimura J. 2015. The contribution of seed dispersers to tree species diversity in tropical rainforests. *R. Soc. open sci.* 2: 150330.
- Kato, M., Takimura, A. & Kawakita, A. 2003. An obligate pollination mutualism and reciprocal diversification in the tree genus *Glochidion* (Euphorbiaceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 5264-5267.
- 今埜実希 & 清和研二. 2011. Janzen-Connell モデルの成立要因の検討. *日本生態学会誌* 61: 319-328.
- Latham, R.E. & Ricklefs R.E. 1993. Global patterns of tree species richness in moist forests: energy-diversity theory does not account for variation in species richness. *Oikos* 67: 325-333.
- Lomáscolo, S.B., Levey, D.J., Kimball, R.T., Bolker, B.M. & Alborn, H.T. 2010. Dispersers shape fruit diversity in *Ficus* (Moraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 14668-14672.
- Losos, J.B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecol. Lett.* 11: 995-1003.
- Mangan, S.A., Schnitzer, S.A., Herre, E.A., Mack, K.M., Valencia, M.C., Sanchez, E.I., & Bever, J.D. 2010. Negative plant–soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. *Nature* 466: 752-755.
- Markl, J.S., Schleuning, M., Forget, P.M., Jordano, P., Lambert, J.E., Traveset, A., Wright, S.J. & Böhning-Gaese, K. 2012. Meta-analysis of the effects of human disturbance on seed dispersal by animals. *Conserv Biol* 26: 1072-1081.

- Morley, R.J. 2002. Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley and Sons, Chichester.
- Pauw, A. 2013. Can pollination niches facilitate plant coexistence? *Trends. Ecol. Evol.* 28: 30-37.
- Richards, P.W. 1996. The tropical rain forest, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Richardson, J.E., Pennington, R.T., Pennington, T.D. & Hollingsworth, P.M. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science* 293: 2242-2245.
- Schaefer, H.M., Schaefer, V. & Levey, D.J. 2004. How plant–animal interactions signal new insights in communication. *Trends. Ecol. Evol.* 19: 577-584.
- Smith, C.C. & Reichman, O.J. 1984. The evolution of food caching by birds and mammals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 329-351.
- Stevenson, P.R. 2000. Seed dispersal by woolly monkeys (*Lagothrix lagothricha*) at Tinigua National Park, Colombia: dispersal distance, germination rates, and dispersal quantity. *Am. J. Primatol.* 50: 275-289.
- Terborgh, J. 1973. On the notion of favorableness in plant ecology. *Am. Nat.* 107: 481-501.
- Tiffney, B.H. 2004. Vertebrate dispersal of seed plants through time. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 1-29.
- van der Pijl, L. 1969. Principles of dispersal in higher plants. Springer, Berlin.
- Wiens, J.J. & Graham CH. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 519-539.
- Wright, S.J. 2002. Plant diversity in tropical forests: a review of mechanisms of species coexistence. *Oecologia* 130: 1-14.
- Yumoto, T., Kimura, K. & Nishimura, A. 1999. Estimation of the retention times and distances of seed dispersed by two monkey species, *Alouatta seniculus* and *Lagothrix lagothricha*, in a Colombian forest. *Ecol. Res.* 14: 179-191.