

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18546

研究課題名(和文) 器官有対化の分子発生メカニズムを明らかにするコイ科魚類を用いた進化発生学研究

研究課題名(英文) Analysis of the evolutionary developmental mechanisms of the twin-tail morphology in cypriniformes species.

研究代表者

阿部 玄武 (ABE, Gembu)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20550073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の有対ヒレはより古い正中ヒレから進化したと考えられている。しかし、元々正中に一つであった構造が、どのように有対化したのかはわかっていない。そこで、金魚品種およびその近縁種ゼブラフィッシュの変異体で見られる「Twin-tail表現型」をモデルとし、どのような発生メカニズムの変更が重要を解析検討した。

Twin-tail表現型胚において、遺伝子発現や細胞追跡実験から、Twin-tail表現型は予定ヒレ領域が拡大する事で有対化した事が示唆された。さらに機能解析から、そこにfgfとbmpのシグナル経路が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によって明らかになった金魚尾ヒレ有対化の発生メカニズムは、脊椎動物の器官有対化に関与する発生現象とその分子実体の、初めての報告になる。脊椎動物の頭部感覚器や付属肢の正中器官有対化は、高次分類群を特徴づける形態進化と考えられる一方、どのような発生メカニズムが関与したかはこれまでよくわかっていなかった。金魚尾ヒレ有対化の発生メカニズムをそれら過程に一般化させることで、脊椎動物のボディプラン成立に関する発生メカニズムの進化過程を明らかにする事が期待される。

研究成果の概要(英文)：The paired fins of vertebrates are thought to have evolved from median fins, which are evolutionary ancestral appendage in vertebrate lineage. However, it is not known how the midline un-paired fins transit to paired fins with trunk bilateral state. Therefore, we analyzed the changes in developmental mechanisms, using as a model the "Twin-tail phenotype" observed in a variety of goldfish and mutant of its closely related species, zebrafish. To investigate the phenotype, we performed gene expression and cell tracking experiments in the twin-tail phenotype embryos in goldfish and zebrafish, and these results suggested that the twin-tail phenotype was due to the expansion of the presumptive median fin field. Furthermore, functional analysis of fgf and bmp signaling pathways suggested that the fgf signaling from the tail bud region was indispensable for the formation of the twin-tail phenotype.

研究分野：進化発生学

キーワード：正中ヒレ有対化 Twin-tail表現型 金魚 ゼブラフィッシュ

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

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の進化過程では、元々正中に一つの器官が左右に有対化する現象が度々見られており、新しい生態の獲得・適応への原動力になっている。例えば、頭部感覚器(目や鼻孔など)や体幹の付属肢(有対ヒレ)は、化石資料や現世動物の形態や発生の比較から、元々正中にあった構造が後に左右有対に進化したことが明らかである。それら有対器官の進化過程において、どのような発生メカニズムの変化が有対化を駆動したのかは、脊椎動物の基本体制の成り立ちを明らかにする重要なテーマである。

器官有対化過程を一般化して考察すると、器官形成メカニズムを維持しながら形成領域を変更させる現象が仮定される。この現象に対して発生学的観点から少なくとも二つの問題、どのように形成領域の変更がおこるのか(形成領域変更メカニズム)、領域変更後にどのように組織間相互作用が変化及び維持されるのか(組織間相互作用)が問われる。さらにこれらに付随し、大規模な発生メカニズムの変化に際しどのように生存率を維持するか(生存率維持)、という問いが想定される。しかしながら、系統進化的に遠く隔たった生物種の比較では詳細な因果関係の解析は困難であり、有対器官進化の具体的な発生メカニズムの変化がどのようなものかはこれまであまり解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、金魚の品種の中で独自に確立された「二叉にわかれた尾ヒレ(twin-tail)表現型」に注目した。その金魚 twin-tail 表現型は、変化しやすい鱗条部分だけでなく、体内の内骨格部分や付属する筋肉など、複雑な尾ヒレ構造がほぼ全て左右有対に2つ備わっている。したがって複雑な構造を有対化させる発生メカニズムを統合的に研究するのに非常に良いモデルになる。またこの Twin-tail 表現型は、近縁種であるモデル動物ゼブラフィッシュにおいても、胚発生時期に似た表現型を示す変異体が知られており、様々な遺伝・発生学的な解析がしやすいという利点がある。

これまでに申請者らは、twin-tail 表現型の遺伝的要因を解析し、金魚で2つある *chordin* 遺伝子の片方 *chdA* の変異が twin-tail 表現型の原因であることを発生遺伝学的実験により証明してきた。さらに、尾ヒレ有対化の領域変更過程と組織間相互作用に関して、*chdA* 変異による初期胚腹側領域の拡大が直接関与し、またその際にもう一つの *chdB* の正中に局限した発現が重要である可能性を予備実験により見出していた。

これらの事から、本研究計画では twin-tail 表現型を、金魚の *chdB* の発現と機能に注目し、尾ヒレ有対化の鍵となる発生メカニズムの変化を明らかにすることを目的とした。実験には金魚と共に、発生学的実験の容易なゼブラフィッシュとその変異体も用い、詳細な分子メカニズムの解析を行った。

3. 研究の方法

(1) twin-tail 金魚と *dino* 変異体の比較

twin-tail 金魚は *chdB* の存在によりゼブラフィッシュ *dino* と異なった尾ヒレ有対化の表現型を示す。よって、twin-tail 金魚と *dino* の発生過程の遺伝子発現の比較解析を行い、尾ヒレ有対化の鍵となる組織の分化状態や相互作用を推定した。

(2) 細胞系譜追跡による拡大した腹側領域と尾ヒレ領域形成位置の相関関係の解析

Twin-tail 表現型胚は初期胚の腹側領域の拡大が見られる。しかしその領域がどのように、

Twin-tail 表現型に關与するのは不明であった。それら腹側拡大領域が、どのように twin-tail 表現型に寄与するのかを、波長轉換する蛍光タンパクである kaede タンパク質を用いて細胞追跡実験を行い解析した。実験には、受精卵の準備が容易なゼブラフィッシュとその変異体を用いた。

(3) Twin-tail 表現型に關わる組織間相互作用の機能解析

Fgf や Bmp シグナルの尾ヒレ形成に必要な遺伝子発現に注目し、それらの組織間相互作用の機能欠損、機能獲得実験を行った。ただし、後期の胚発生過程の複雑な組織構造における相互作用が対象となるため、機能獲得実験には熱ショック誘導型プロモーターより、特定時期に局限させた強制発現系をゼブラフィッシュで構築し機能解析を行った。また機能欠損実験には、それぞれのレセプターを阻害する薬剤 (SU5402、K02288) を用いた。

4. 研究成果

(1) twin-tail 金魚と dino 変異体の比較

twin-tail 金魚は *chdB* の存在によりゼブラフィッシュ *dino* と異なった尾ヒレ有対化の表現型を示す。よって、どのような発生学的状況から twin-tail 表現型が導かれるのか、という観点から、twin-tail 金魚と *dino* の発生過程の比較を行い、尾ヒレ有対化の鍵となる組織の分化状態や相互作用を推定した。

遺伝子発現解析の結果、金魚とゼブラフィッシュ両者の Twin-tail 胚において、ヒレ関連遺伝子の中で、上皮マーカーである *dlx5a* の発現が、ヒレ発生過程のごく初期より有対化様の発現を示した。一方、間充織系の遺伝子発現は、ヒレ様構造が見られてからのみ、有対化する発現パターンを示した。このことから、もっとも早く発生過程で左右二つに表出する要素は、上皮組織に現れる事が示唆された。さらに、twin-tail 金魚胚と *dino* 胚の間で詳細に違いを観察したところ、*dlx5a* の発現領域において左右への広がり程度の違いが見られた。さらに、上皮組織に由来するヒレ様構造の立ち上がりにおいて、ヒレ構造マーカー遺伝子の発現が twin-tail 金魚胚では強く見られたものの、*dino* 胚では尾端部を除き非常に弱いか確認できなかった。以上の結果から、*chd* 抑制の程度の違いにおいて、上皮組織のヒレ様構造の形成に異常が出ていることが示唆された。

(2) 細胞系譜追跡による拡大した腹側領域と尾ヒレ領域形成位置の相関関係の解析

Twin-tail 表現型胚は初期胚の腹側領域拡大がみられるが、しかしそれがどのように Twin-tail 表現型に關与するのは不明であった。それら腹側拡大領域が、どのように twin-tail 表現型に寄与するのかを、波長轉換する蛍光タンパクである kaede タンパク質を用いて細胞追跡実験を行い解析した。

まず、正常胚において初期胚腹側領域の細胞追跡実験を行った。その結果、正中ヒレ原基さらに細胞運命追跡実験を kaede 蛍光タンパクを導入して行った。この結果、kaede 蛍光タンパクでラベルした細胞の大部分が、正中ヒレ上皮に参加せず、体幹部から尾部の間充織など体幹組織に存在することが明らかになった。この結果は、腹側領域が直接正中ヒレ上皮形成に参加しないことを示唆する。

次に正常胚において、正中ヒレ予定領域が明らかになる時期にラベルし、追跡実験を行った。その結果、正中ヒレに参加する細胞が、最初左右に広がる領域から、発生が進むにつれ正中に移動し、ヒレ構造に参加することが確認された。つまり、このことは正常胚において

も、正中ヒレ予定領域が左右軸性を最初持っていたことを示唆する。

さらに、ゼブラフィッシュの Twin-tail 胚で、同様の追跡実験を行った結果、正常胚同様、左右から正中方向への移動が見られる一方、より左右に広い領域から、ヒレ構造に細胞が入ることが分かった。つまり、正常胚でも見られた、左右に広がる予定ヒレ上皮領域が、Twin-tail 胚では、過剰に左右に広がり、それが正中に向かうものの、閉じ切らないことで Twin-tail 表現型になることが示唆される。またこの時、初期胚腹側領域の拡大は、おそらく予定ヒレ領域の誘導過程に関わりすることも示唆される。

(3) Twin-tail 表現型に関わる組織間相互作用

初期胚腹側拡大によって形成される拡大した尾部間充織が、Twin-tail 表現型の誘導に必要である可能性が示唆されたことから、正常胚においてそこに関わることが知られている fgf、bmp シグナルの機能解析を行った。

まず、bmp シグナルの機能解析を行った。機能欠損実験には阻害剤 (K02288) を用い、機能獲得実験は熱ショック誘導型の bmp 4 を用いた。機能欠損実験の結果、bmp シグナルを予定ヒレ領域決定時期に阻害しても、Twin-tail 表現型に影響が出なかった。そこから、さらにより前の時期に阻害実験を行った。機能獲得実験に関しても同様であり、この時期の bmp シグナルは、Twin-tail 表現型に重要でないことが示唆された。

次に、fgf シグナルの機能改正を行った。機能欠損実験には阻害剤 (SU5402) を用い、機能獲得実験は熱ショック誘導型の fgf8、fgf10 を用いた。阻害実験の結果、Twin-tail 表現型の形成が阻害された。一方、誘導では、前側に過剰なヒレ予定領域を作り出すことができた。この結果は、Twin-tail 表現型を導く拡大した予定領域の誘導に fgf シグナルが関わることを示唆する。

Chd 遺伝子は bmp シグナルを拮抗的に阻害する遺伝子であり、初期胚の拡大は、bmp シグナルの促進により起こっている。したがって、Twin-tail 表現型には bmp シグナルの初期胚での変更が重要であることになる。FGF シグナルは、その BMP シグナルの変更で起こった拡大した形成領域内で、ヒレ構造の形態形成に用いられていることが考えらる。現在、これまでの研究成果をまとめ論文投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Ing Jia Li, Shu Hua Lee, Gembu Abe, Kinya G. Ota, Embryonic and postembryonic development of the ornamental twin-tail goldfish. *Developmental Dynamics*. 2019, published online. doi: 10.1002/dvdy.15, 査読あり

Gembu Abe, Ing Jia Li, Shu Hua Lee, Kinya G. Ota, A novel allele of the goldfish chdB gene: Functional evaluation and evolutionary considerations. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2018, 330, 372-383. doi: 10.1002/jez.b.22831, 査読あり

Gembu Abe, Ing Jia Li, Shu Hua Lee, Kinya G. Ota, An alternative evolutionary pathway for the twin-tail goldfish via szl gene mutation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2018, 330, 234-241. doi: 10.1002/jez.b.22811,

査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

阿部玄武、「ゼブラフィッシュ Twin-tail 変異体を用いた左右対称な有対尾ヒレ形態を作るための発生学的機構の解析」, 日本動物学会第 89 回大会 (2018)

阿部玄武、「Evolutionary developmental relationship between paired and ventral median fins; Perspective from the twin-tail morphology」, 第 24 回小型魚類研究会 (2018)

阿部玄武、「Developmental mechanisms change for morphological transition from midline single to paired bilateral status in ventral fins.」, 第 70 回日本細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会 (2018)

阿部玄武、「Twin-tail 表現型胚の示す初期胚腹側拡大と二叉膜ヒレの発生学的関係」, 日本動物学会第 88 回富山大会 (2017)

阿部玄武、「Analysis of developmental mechanisms changes for bifurcated fin-fold development in twin-tail embryos」, 第 2 3 回小型魚類研究会 (2017)

阿部玄武、「Open and closed evolutionary paths for drastic morphological changes, involving serial gene duplication, sub-functionalization, and selection.」, 第 22 回国際動物学会・第 87 回日本動物学会合同大会 (2016)

阿部玄武、「金魚の二叉に分かれた尾ひれから考える大規模形態進化の条件」, CAT 異質界面プロジェクトワークショップ (2016)

阿部玄武、「Perspective from twin-tail morphology of goldfish for bilaterally paired appendages evolution」, 第 22 回小型魚類研究会 (2016)

阿部玄武、「なぜ鯉には金魚でみられる二叉にわかれる尾ひれが生じないのか?」, 日本動物学会・平成 28 年度東北支部大会 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名：阿部 玄武

ローマ字氏名：Gembu Abe

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 20550073

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。