

令和元年6月4日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18594

研究課題名(和文) 円口類ヌタウナギ、ヤツメウナギ半規管の進化発生学的解析

研究課題名(英文) Evolutionary Developmental Study of the Semicircular Canals in Cyclostomes

研究代表者

菅原 文昭 (SUGAHARA, Fumiaki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00611005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回われわれは、世界で初めてヌタウナギの内耳発生の詳細な観察に成功した。また、同時にヤツメウナギの内耳も観察し、形態、遺伝子レベルでヌタウナギと比較した。その結果、顎口類の前半規管と後半規管の位置を決める発生メカニズムが、これら2種に備わっていることを発見した。さらに、第3の半規管である外側半規管について、円口類はこれをもたないものの、その検出器(膨大部稜)と相同な感覚上皮と、その情報を中枢へ伝える神経枝の存在を同定した。以上から、脊椎動物はその共通祖先の段階で、思いのほか複雑な半規管をもっていたと推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人間が人間について知りたいというのは人類普遍の知的好奇心のひとつである。われわれヒトの複雑なからだは、どのような進化を経て成立したのだろうか？三半規管はわれわれの平衡器官として大変重要な構造物で、めまいなどを伴う疾病にも関連の深い器官である。複雑な形態を持つ半規管の進化の過程は、これまで謎に包まれていたが、一半規管から一つずつ数を増やしてきたと単純に理解されてきた。ところが今回の我々の研究で、実際の進化はそう単純なものではなく、共通祖先の段階で多くの三半規管の構成要素をすでに持っていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully observed the developing inner ears of the inshore hagfish *Eptatretus burgeri* as well as lamprey *Lethenteron camtschaticum*, and compared them at histological and molecular levels. We found that both hagfish and lampreys have developmental patterning for anterior and posterior canals similar to the early developmental pattern of the inner ear in gnathostomes. In addition, we found another sensory epithelium and axon bundles in both cyclostome species, which are thought to be homologous to the gnathostome lateral crista. We suggest that the latest common ancestors of the extant vertebrates already have had more complex inner ears than previously thought.

研究分野：進化発生学

キーワード：半規管 内耳 ヤツメウナギ ヌタウナギ 発生 進化

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

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の内耳は3つの半規管(前・後・外側半規管)、いわゆる三半規管を持ち、X軸、Y軸、Z軸方向の回転運動の受容にはたっている。脊椎動物の成立以前に分岐した頭索類ナメクジウオや尾索類ホヤには半規管が存在しないことから、半規管は脊椎動物の新規に獲得された形質であると考えられている。

現生の顎のない脊椎動物、ヤツメウナギ類とヌタウナギ類は、デボン紀末までに絶滅した化石無顎類の特徴をよく保持しており、脊椎動物の初期進化のモデル生物として用いられてきた。興味深いことに、ヤツメウナギの半規管は2つしかなく、外側半規管を持たない。さらにはヌタウナギの半規管は単一で、内耳全体がトラス状の非常に単純な構造をしている。このことから、半規管は脊椎動物の進化の過程で1つから2つ、そして3つと段階的に成立したと考えられてきた。

ところが、近年の分子系統解析によると、ヤツメウナギとヌタウナギは「円口類」とよばれる単系統群をなし、顎のある脊椎動物(以下顎口類)の祖先と分岐後にヤツメウナギとヌタウナギが分かれたらしい。つまり、ヌタウナギはヤツメウナギよりも「古い」系統ではないことになる。この系統関係が正しいとすれば、脊椎動物の半規管の進化は上記のシナリオでは説明できないことになり、半規管の進化過程は再び謎に包まれることとなった。

2. 研究の目的

ヌタウナギ、ヤツメウナギが単系統群であると判明したことから、半規管の進化について次のような仮説が考えられる。(1)円口類の分岐以前、すなわち現生の脊椎動物の共通祖先の段階で、2つの半規管(前・後)が成立した。(2)ヌタウナギの系統でそれらが融合、もしくはどちらか1つが二次的に退化し、一半規管となった。(3)円口類の分岐後、顎口類の系統で外側半規管が獲得された。

本研究は上記の仮説を検証することを目的とした。しかしながら、ヌタウナギの半規管の発生過程はこれまで不明であった。そこで本研究ではまず、これまで未記載であったヌタウナギの内耳の発生過程を詳細に観察し、ヤツメウナギと比較することで円口類の内耳発生における共通点および相違点を抽出することを試みた。さらに分子発生学的手法を用いて、遺伝子レベルでの発生プログラムにどのような変更が生じた結果、脊椎動物が3つの半規管を獲得するに至ったのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ヌタウナギ胚を入手し、パラフィン連続切片を作成し、ソフトウェアを用いて立体構築を行った。これと、ヤツメウナギの二半規管や顎口類の三半規管の発生と比較することで、共通発生段階の同定と、内耳プラコードから半規管に至る発生過程において、どの段階が本質的に異なるのかを探索した。

また、ヌタウナギ、ヤツメウナギ胚の内耳において遺伝子発現解析を行い、3つの半規管をもつマウスなどモデル生物との発生プログラムの共通点、相違点を抽出した。

4. 研究成果

本研究は複数の研究者との協力のもとで進めたが、特に理化学研究所 BDR 形態進化研究チームの樋口真之輔研修生と協調して遂行した。まずヌタウナギ内耳の発生過程を観察するため、複数の発生ステージの胚を用いて組織切片を作成した。作成した組織切片写真からコンピュータにより内耳の3D立体画像を構築した。その結果、ヌタウナギの内耳は咽頭胚期に袋状の耳胞の中央部から単一の陥入が生じ、反対側の上皮と融合・消失することで孔が開き、トラス状の半規管が形成されることが分かった。

次に、ヤツメウナギ胚の半規管形成について観察したところ、アンモーシーテス幼生の初期において耳胞の前後2ヶ所に内部への突出が生じ、それが反対側からの同様の突出と融合することにより内リンパ液が仕切られることが確認された。このように2か所で耳胞内部が仕切られて前後の半規管ができるという点において、ヤツメウナギと顎口類は類似していることが分かった。

続いて、ヌタウナギ、ヤツメウナギ内耳の遺伝子発現パターンを観察したところ、顎口類と同じように前後に沿ったいくつかの遺伝子発現が観察された。すなわち、ヤツメウナギの二半規管は、ヌタウナギの一半規管の前半、後半の部分とそれぞれ相同であると言え、さらにそれは顎口類の前後半規管と相同な関係にあると言える。また、これらの動物の系統関係を考慮に入れると、脊椎動物の共通祖先は2ヶ所で孔を作っていたと推定でき、ここから1つの孔をつくって単一半規管を生じるヌタウナギの発生過程は、系統独自に生じた進化である可能性が示唆された。

水平方向の回転を感知する外側半規管は、二半規管をもつ祖先的内耳からどのように獲得されたのだろうか。*Otx1* ノックアウトマウスは前後2つの半規管は正常な形態を保ちつつ、外側半規管を完全に欠くことが知られている。つまり、*Otx1* ノックアウトマウスはヤツメウナギの「先祖返り」状態ととらえることができるかもしれない。この説を検証するため、ヤツメウナギ、ヌタウナギにおいてすべての *Otx* 相同遺伝子を同定して、内耳での発現解析を試みた。この計画は現在も進行中であるが、少なくともそのうち一種 *OtxA* が円口類両種において内耳

で発現していることを確認した。ただし、この発現は内耳腹側に限局しており、顎口類の *Otx1* のように外側半規管が発生する耳胞の背側外側部には発現が見られなかった。*Otx* 遺伝子の発現と外側半規管獲得との関係については、今後検証していきたい。

また、半規管の回転刺激を受容する膨大部と、刺激を中枢へ伝える前庭神経について注目した。興味深いことに、円口類の両種において、外側半規管の膨大部と極めて類似した発生過程をもつ感覚毛をもつ検出器と、そこから中枢へ伝える神経枝の存在を同定した。また、ヌタウナギの前庭神経節は全脊椎動物で唯一前後2つ存在するが、その発生過程はどちらも他の脊椎動物と同じ耳胞の前方領域から形成されることが分かった。

並行して、平衡感覚の中枢として重要な延髄および小脳の解析も行った。ヌタウナギには小脳がほぼ認められないが、その発生場となるロンボメア1が、*Hox* 遺伝子が発現しない領域として顎口類と同様に存在することを確認した。また円口類両種において、顎口類の小脳に存在する興奮性、抑制性のニューロンと同じ発生メカニズムをもつ細胞集団を見出した。

上記の研究のうち、動物サンプリングと遺伝子発現解析は樋口と菅原が協調・分担して行い、形態学的観察は主に樋口、脳の解析は主に菅原が担当した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

1. ヌタウナギ, ヤツメウナギの内耳発生から見てきた脊椎動物の半規管の進化
菅原文昭 樋口真之輔
兵庫医科大学医学会雑誌 43 (1), 39-47 2019年3月
査読無
2. Inner ear development in cyclostomes and evolution of the vertebrate semicircular canals.
Higuchi S, [Sugahara F](#), Pascual-Anaya J, Takagi W, Oisi Y, Kuratani S
DOI: 10.1038/s41586-018-0782-y
Nature 565(7739) 347-350 2019年1月
査読有
3. Hagfish and lamprey Hox genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates.
Pascual-Anaya J, Sato I, [Sugahara F](#), Higuchi S, Paps J, Ren Y, Takagi W, Ruiz-Villalba A, Ota KG, Wang W, Kuratani S
DOI:10.1038/s41559-018-0526-2
Nature ecology & evolution 2(5) 859-866 2018年5月
査読有
4. 円口類から探る、脊椎動物の脳の共通発生プランと進化
菅原文昭
兵庫医科大学医学会雑誌 42(1) 33-38 2017年9月
査読無
5. Reconstructing the ancestral vertebrate brain
[Sugahara F](#), Murakami Y, Pascual-Anaya J, Kuratani S
DOI: 10.1111/dgd.12347
Development, Growth & Differentiation 59(4) 163-174 2017年4月
査読有

[学会発表](計 8件)

1. [Sugahara Fumiaki](#), Pascual-Anaya Juan, Kuratani Shigeru, Murakami Yasunori. 小脳の領域化と、小脳特異的なニューロンの発生プログラムの起源と進化.(一般) 日本動物学会第89回札幌大会 2018.9 札幌
2. Inner ear evolution in early vertebrates: insights from semicircular canal development in cyclostomes.
Higuchi S, [Sugahara F](#), Takagi W, Oisi Y, Kuratani S.
The 1st AsiaEvo Conference 2018.4. 深セン, 中国
3. [Sugahara Fumiaki](#), Pascual-Anaya Juan, Kuratani Shigeru, Murakami Yasunori. Molecular developmental plan of cyclostome hindbrain: towards acquisition of the gnathostome cerebellum. The 29th CDB Meeting "Mavericks, new models in developmental biology" 2017.10 Kobe

4. 菅原 文昭, Juan Pascual-Anaya, 村上 安則, 倉谷 滋. 円口類から探る、小脳神経細胞獲得のための分子機構の初期進化.(一般) 日本動物学会第 88 回富山大会 2017.9 富山
5. 樋口 真之輔, 菅原 文昭, 高木 互, 大石 康博, 倉谷 滋. 脊椎動物の内耳の進化:円口類の比較発生的解析から.(一般) 日本動物学会第 88 回富山大会 2017.9 富山
6. 菅原 文昭, 樋口 真之輔, 大石 康博, 高木 互, 佐藤 昇, 倉谷 滋. 円口類の比較発生的解析から探る三半規管の進化.(一般) 日本解剖学会年大会 2017.3 長崎
7. Higuchi Shinnosuke, Sugahara Fumiaki, Oisi Yasuhiro, Kuratani Shigeru. Development of the inner ear in cyclostomes and its implication to the evolutionary origin of the semicircular canals. the 22nd International Congress of Zoology 2016.11 Onna
8. 菅原 文昭, Pascual-Anaya Juan, 大石 康博, 工樂 樹洋, 青田 伸一, 足立 礼孝, 平井 珠美, 佐藤 昇, 村上 安則, 倉谷 滋. 円口類ヤツメウナギ、ヌタウナギ両系統の比較から見えてきた脊椎動物の脳の初期進化.(一般) 日本進化学会第 18 回大会 2016.8 東京

〔図書〕(計 1 件)

1. ブレインサイエンス・レビュー 2019
菅原 文昭 (共著 担当:円口類から探る、脊椎動物小脳の発生プランの進化)
クバプロ 2019 年 3 月 ISBN:978-4-87805-160-9

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：樋口 真之輔

ローマ字氏名：HIGUCHI, Shinnosuke

研究協力者氏名：倉谷 滋

ローマ字氏名：KURATANI, Shigeru

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。