

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06239

研究課題名(和文) Twin-tail形態と有対ヒレの進化発生学的関係の解明

研究課題名(英文) Evolutionary developmental relationship between paired fins and twin-tail morphology

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胸ヒレや四肢などの有対ヒレは、正中ヒレの発生メカニズムを体側に流用することで進化するとされる。しかし、具体的にどのように起こったのかはよくわかっていなかった。そこで本研究では、正中ヒレが有対化する変異体をモデルとしてその過程を推定した。その結果、正中ヒレ形成過程に左右性がすでに内包されていること、有対化はその左右性を表出する形で起こることが分かった。さらに、正中ヒレと有対ヒレは、共通する予定ヒレ領域を使って発生してくることも明らかになった。したがって実際の進化過程においても、有対化変異体で起こった遺伝学・発生学的変化に似た現象によっての有対ヒレ獲得が起こった可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎口類の鍵革新である有対ヒレが進化上どのように獲得されたのかは、150年前から注目される脊椎動物の形態進化における重要なテーマである。本研究により、その進化過程で起こったであろう、遺伝学・発生学的過程がどのようなものであったのかが示唆された。これにより、我々のもつ手足がどのように進化したのか、またこれからどのように進化し得るのかがより理解されたといえる。また、今回明らかになった有対化メカニズムは、ある種のヒト遺伝病と発生機構を同じくする。つまり、そのような遺伝病は、発生機構の中に内在する特性ゆえに表出することが示唆されるだろう。

研究成果の概要(英文)：Paired fins are believed to have evolved by using median fins' developmental mechanisms, but it was unclear how it occurred. In this research we have studied it by using the twin-tail mutant as a model system. We found that the median fin development includes the bilaterality and twin-tail phenotype appeared along the bilaterality. We also found that the paired and median fins shared the same developmental field. Therefore, we suggest that the paired fin acquisition occurred by events similar to the genetic and developmental changes that occurred in twin-tail mutants.

研究分野：進化発生学

キーワード：正中ヒレ Twin-tail ogon 脊椎動物付属肢進化 有対ヒレ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は地球上でもっとも繁栄している動物群の一つであり、その理由に発達した付属肢（ヒレや四肢）を持つ事があげられる。体幹から独立する付属肢は容易にその形を進化させ、脊椎動物が様々な環境に進出する原動力となってきた。このような付属肢の進化、特に顎口類の鍵革新の一つである有対ヒレ（胸ヒレと腹ヒレ）の獲得は、150年前から多くの研究者が注目する大きなテーマである。

脊椎動物の付属肢は、体側の有対ヒレと正中線上の非有対ヒレ（尾・背・尻ヒレの正中ヒレ）が存在する。これらは形態的に全く別の位置にあるが、基本的に同じ骨格パターンを持ち、同様の発生メカニズムで形成される。例えば、ヒレの形成位置はそれぞれ正中と体側（胸ヒレと腹ヒレ野間）に長い線状の領域（ヒレ誘導可能域）に限局され、またヒレ形成はFGFシグナルによって膜ヒレが誘導される事で始まる（Abe et al., 2007; Yonei-Tamura and Abe et al., 2008）。そして正中ヒレは脊索動物門に広く保存された進化的に古い形質であり、有対ヒレは正中で進化したヒレ発生メカニズムを体側にリクルートする形で獲得されたと考えられている（Freitas et al., 2006, Nature）。しかしながら、どのように正中に一つのものを有対の状態にしたのか、という正中ヒレと有対ヒレの具体的な進化発生学的関係に対する問いは、依然答えが得られていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、金魚の特定品種で独自に獲得された「尾ヒレと尻ヒレ（腹側正中ヒレ）が有対化するTwin-tail形態」に注目した。Twin-tail形態は、支持骨格やそれに付属する筋肉など複雑なヒレ構造がほぼ全て左右有対に2つ備わっている、器官構造の有対化メカニズムを研究するのに極めて良いモデルである。

これまで応募者は、Twin-tail金魚の遺伝的要因を解析し、その結果*chd*遺伝子の変異に主要な要因があることを特定してきた（Abe et al., 2014, Nature Commun.; Abe et al., 2016, Sci. Rep.）。さらに最近応募者は、これまで全く不明であったTwin-tail形態形成の発生学的要因を解析し「正中と体側のヒレが直接進化発生学的に関連する可能性」を見出した。

本研究計画では、Twin-tail形態の発生メカニズムを有対ヒレ発生の機能因子に注目して明らかにし、さらにその系統進化的保存性を検討することで、有対ヒレ獲得における正中ヒレ発生との進化発生学的な関係性を考察することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 有対ヒレ発生の機能因子に注目するTwin-tail形態の形成領域決定機構の機能解析

Twin-tail形態の予定膜ヒレ領域は幅広い領域として尾芽上に伸展し、その左右両側に膜ヒレが形成される。ただしなぜ左右両側に形成されるのかは不明である。そこで有対ヒレの領域形成に必須のシグナル(BMP・FGF)を中心に両側に膜ヒレが形成される過程を解析した。特にBMPとFGFは、詳細は不明だが正中ヒレ発生に働くことが示唆されている。これらを解析しTwin-tail形態と有対ヒレの発生メカニズムの関係を考察した。機能解析には、機能獲得実験として、熱ショックプロモーターによって任意の遺伝子を発現させる系を用いた。また機能欠損実験には、BMPシグナル阻害剤K02288、FGFシグナル阻害剤SU5402を用いた。

## (2) 体側と正中の誘導可能域の発生学的関係性とそれの Twin-tail 形態における変化の解析

体側と正中のヒレは同じ誘導可能域から出来てくる可能性がある。そこで正常胚で誘導可能域の範囲を解析し、正中と体側のヒレの発生学的関係を考察した。誘導可能域は、*fgf10* の強制発現により膜ヒレマーカー *sp9* を異所的に発現させることで可視化した (Yonei-Tamura and Abe et al., 2008)。

## (3) Twin-tail 表現型要因の有対ヒレ発生への影響の解析

もし、体側の有対ヒレ形成領域と正中ヒレが同じ誘導可能域から出来てくるならば、Twin-tail 表現型要因が有対ヒレ形成にも影響している可能性がある。そこで、特に位置的に近い腹ヒレの形成位置を、Twin-tail 金魚および腹ヒレを可視化するトランスジェニックのゼブラフィッシュを用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Twin-tail 表現型発生における BMP シグナルの時期特異性の特定

まず、Twin-tail 表現型の遺伝的原因が、BMP シグナルの阻害因子 (金魚: *chd*、ゼブラフィッシュ: *szl*) の変異にあることに注目し、BMP シグナルの機能解析を行った。*bmp* 遺伝子や、*chd*、*szl* 遺伝子は、初期からヒレ形成過程まで尾芽で発現しつづけ、後に正中ヒレ上皮で発現する。仮説として、BMP シグナルが後期発生において直接的に正中ヒレ誘導に関わる可能性と、初期胚 (bud stage (11hpf) まで) における腹側拡大が間接的に Twin-tail 表現型に関与する可能性が考えられた。そこでまず、熱ショックプロモーターを用いた BMP シグナルの強制発現を Early (4hpf) と Late (12hpf) にわけて異時的に行った。その結果、初期発生時の BMP シグナルの熱誘導によって Twin-tail 形態を誘導することができたが、後期発生での BMP 誘導では Twin-tail 表現型を誘導できなかった。また、BMP シグナルを K02288 (BMP 阻害剤) によって機能抑制を行った。機能獲得実験と同様に初期と後期に分けて維持的に BMP シグナルを阻害したところ、初期過程阻害で Twin-tail 表現型が形成されなくなるが、後期発生過程の阻害では Twin-tail 表現型に影響がなかった。以上の結果から、BMP シグナルの機能は、直接後期胚で Twin-tail 表現型を誘導するのではなく、初期胚腹側拡大の影響で、ヒレ発生領域を拡大するなど、何かしらのシグナルを介して Twin-tail 表現型形成に関わることが示唆された。

### (2) Twin-tail 表現型発生における FGF シグナルの役割

そこで、次に FGF シグナルに注目し機能解析を行った。FGF シグナルは、背側の正中ヒレや有対ヒレの誘導に機能することが知られている。まず、FGF や体幹後部の遺伝子発現を Twin-tail 胚で確認したところ、初期胚腹側化の影響で、尾芽が拡大し、それに従って尾芽に発現する遺伝子の発現領域が拡大していた。また、Twin-tail 胚では wt 胚と異なり、ヒレ形成時 (18hpf) から *fgf10* が体幹後方腹側で有対になるように発現していた。興味深いことに、未分節体節 (沿軸中胚葉) に発現する *tbx6* が、有対になった *fgf10* の内側に異所的に発現するようになっていた。体節が有対ヒレ形成を阻害する可能性が知られており (Tulenko et al., 2013) この異所的 *tbx6* の発現が、正中に集約するはずだった *fgf10* の発現を左右有対にし、それが Twin-tail 形成を促す可能性が考えられた。実際に、Twin-tail 胚の正中ヒレ形成過程において FGF シグナルを SU5402 によって阻害したところ、Twin-tail 表現型が形成されなくなった。遺伝子発現の解析によっても、ヒレ発生マーカー遺伝子の発現が阻害されていた。したがって、*fgf10* などによる FGF シグナルが Twin-tail 表現型の誘導を行うことが示唆される。一方、FGF シグナルの機

能獲得実験を、熱ショック誘導による *fgf10* の過剰発現によりおこなったところ、wt 胚において頭側方向への異所的ヒレ形成領域拡大が見られたが、体幹後方・尾部での左右方向への拡大は見られなかった。したがって、FGF シグナルは、Twin-tail 表現型を導く横方向へのヒレ形成領域拡大は起こせないことが示唆された。つまり、Twin-tail 表現型は、*chd* や *szl* の欠損により BMP シグナルが増大し、初期胚腹側拡大がおこり、そこに有対化した *fgf10* によって、左右有対にヒレ構造を誘導することで作られることが示唆される。

#### (3) 体側と正中の誘導可能域の発生学的関係性とそれの Twin-tail 形態における変化の解析

FGF シグナルは、有対ヒレ発生において、ヒレ形成可能領域にヒレ構造を誘導可能なことが知られている。また今回、FGF シグナルの過剰発現により、腹側正中ヒレ領域が頭側に拡大した。さらに以前の私たちの研究によって、腹側正中ヒレの形成予定領域が卵黄嚢後方から尾部に伸展する事、つまり体幹部と同一の領域になることを明らかにしている。このことから、腹側ヒレ形成可能領域が、正中ヒレと有対ヒレで同一の発生学的起源を有している可能性が考えられた。その可能性を検証するために、FGF シグナルの強制発現時における、正中と体側のヒレ形成領域の状態を遺伝子発現で確認した。その結果、FGF シグナル強制発現胚では、ヒレ領域マーカーである *dlx5a*、ヒレ形成マーカーである *sp9* が、腹側正中ヒレ領域から卵黄嚢を大きく覆うように発現していた。さらにその発現は胸ヒレ芽での *dlx5a*、*sp9* の発現と連続した。したがって、予想通り、腹側のヒレ形成可能領域は、有対ヒレと正中ヒレで連続した同じ起源を有していることが示唆された。

#### (4) Twin-tail 表現型要因の有対ヒレ発生への影響の解析

有対ヒレと正中ヒレの予定形成領域が同じ発生学的起源を有することから、有対ヒレ獲得進化において Twin-tail 表現型発生で見られる初期胚腹側拡大に関わった可能性が考えられる。もしそうなら、Twin-tail 表現型胚において、有対ヒレになにかしらかの形成位置変化が起こっていることが考えられる。実際に、腹ヒレの形成位置を Twin-tail 金魚およびゼブラフィッシュの幼魚で確認したところ、wt 個体よりも側方側に寄った位置取りをしていた。さらに、ゼブラフィッシュの Twin-tail 表現型個体において、トランスジェニック系統により腹ヒレを可視化しながら計時的な変化を観察したところ、どの時期においても、wt 個体よりも腹ヒレの位置が側方に変化することが確認できた。以上の観察により、Twin-tail 表現型個体では、有対化する尾・尻ヒレだけでなく、有対ヒレも位置取りが側方に変化することが示唆された。

#### (5) 議論と今後の展望

以上の結果より、Twin-tail 表現型は、初期胚での BMP シグナル増強による腹側領域拡大がおこり、後期胚においてその拡大した領域内で FGF シグナルにより有対にヒレ構造が誘導されることで形成されると考えられる。この初期胚における腹側領域拡大は、有対ヒレと腹側正中ヒレが同じ形成可能領域から出来てくることから、有対ヒレ獲得進化においても重要なステップである可能性がある。これまでは、正中ヒレと有対ヒレは進化発生学的に独立な構造であると考えられてきた。しかし、本研究課題によって発生学的に連続的な関係性があることが明らかになり、有対ヒレ獲得は正中ヒレ発生の変形で起こった可能性が考えられる。今後は、この可能性の検証のため、より祖先的な脊椎動物などで、同様の実験を行うなどの検証をしていきたい。

また、今回明らかになった有対化メカニズムは、形成領域の正中集約不全という理解もできる。これは、二分脊椎などのヒト遺伝病と発生機構を同じくする。つまり、そのような遺伝病は、発生機構の中に内在する特性ゆえに表出することが示唆されるだろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uemoto Toshiaki, Abe Gembu, Tamura Koji	4. 巻 10
2. 論文標題 Regrowth of zebrafish caudal fin regeneration is determined by the amputated length	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57533-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Gembu, Hayashi Toshinori, Yoshida Keigo, Yoshida Takafumi, Kudoh Hidehiro, Sakamoto Joe, Konishi Ayumi, Kamei Yasuhiro, Takeuchi Takashi, Tamura Koji, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2019.11.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Hiroki, Uemoto Toshiaki, Tanaka Yoshitaka, Honda Yuki, Kitajima Keiichi, Umeda Tetsuya, Kawakami Atsushi, Shinya Minori, Kawakami Koichi, Tamura Koji, Abe Gembu	4. 巻 5
2. 論文標題 Pattern of fin rays along the antero-posterior axis based on their connection to distal radials	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-019-0145-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gembu Abe, Ing Jia Li, Shu Hua Lee, Kinya G. Ota	4. 巻 330(6-7)
2. 論文標題 A novel allele of the goldfish chdB gene: Functional evaluation and evolutionary considerations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology -B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 372-383.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22831.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浜田裕貴、植本俊明、田中祥貴、本田祐基、北嶋慶一、梅田哲也、川上厚志、新屋みのり、川上浩一、田村宏治、阿部玄武
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの鰭条における前後軸パターンとその形成機構
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植本俊明、田中祥貴、梅田哲也、田村宏治、阿部玄武
2. 発表標題 胸ヒレ鰭条の前後軸パターンとその形成過程
3. 学会等名 日本動物学会・令和元年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中祥貴、浜田裕貴、植本俊明、本田祐基、梅田哲也、北嶋慶一、新屋みのり、川上厚志、川上浩一、田村宏治、阿部玄武
2. 発表標題 Development of antero-posterior pattern in fin ray-distal radial connection of zebrafish pectoral fin
3. 学会等名 the 52nd annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部玄武、太田欣也、田村宏治
2. 発表標題 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的機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部玄武、梅田哲也、田村宏治
2. 発表標題 Evolutionary developmental relationship between paired and ventral median fins; Perspective from the twin-tail morphology
3. 学会等名 第24回小型魚類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部玄武、太田欽也、田村宏治
2. 発表標題 Developmental mechanisms change for morphological transition from midline single to paired bilateral status in ventral fins
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>魚は切られたヒレの長さを分かっている 魚の尾ヒレ再生時に元の形を復元するしくみを新たに提案  <a href="https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/date/detail---id-49182.html">https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/date/detail---id-49182.html</a>  魚は切られたヒレの長さを分かっている 魚の尾ヒレ再生時に元の形を復元するしくみを新たに提案  <a href="https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/01/press20200120-03-hire.html">https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/01/press20200120-03-hire.html</a>  魚の胸ヒレの鰭条に前後軸パターンがあることの発見  <a href="https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/date/detail---id-48978.html">https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/date/detail---id-48978.html</a>  最近の論文から  <a href="http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/research/recent_pub.html#oa2020-1">http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/research/recent_pub.html#oa2020-1</a></p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------