

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06844

研究課題名(和文)硬骨魚の側線鱗形成における神経堤細胞の関与

研究課題名(英文)The contribution of the neural crest cells in developing lateral line scale in the teleosts.

研究代表者

重谷 安代(Shigetani, Yasuyo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431773

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)：ポリプテルスの側線感丘および側線鱗の形成に寄与する神経堤細胞は背側経路を通ることを明らかにした。そこで背側経路を遮断する目的で神経堤の外側に絶縁フィルムを挿入する微細手術を行い、移動する神経堤細胞の動態について分子マーカーを用いて調べたところ、背側経路の神経堤細胞の移動を遮断することに成功した。

実験上の改良点として、背側経路を通る神経堤細胞に発現するMitf遺伝子の調節領域にEGFPを繋いだTo12遺伝子移動コンストラクトを作製し、これを予め胚に発現させておくことで、術後に実験をしなくても移動する神経堤細胞を可視化することができるようになり、より大きな個体になるまで育てても観察が容易になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリプテルスは、シーラカンスと同様に学術的に重要な位置を占める四足動物に近い魚であるにも関わらず、実験動物としては確立していない野生動物である。それでもゲノム配列が明らかになり、生きた胚を扱えることで、ヒトにつながるかたちの仕組みを進化発生学的に解明することに貢献できる。ポリプテルスにおいて神経堤細胞をゲノムレベルで可視化する分子生物学的手法と、特定の神経堤細胞の移動経路を遮断する実験発生学的手法を組み合わせることで、側線器官やエナメル含有鱗の形成に寄与する神経堤細胞の動態や機能の検証のみならず、これらの構造体が完成する幼生期に至るまでの検証も可能となり、より実情に即する改良となった。

研究成果の概要(英文)：The neural crest cells that are contributed to the formation of the lateral line neuromast and/or the lateral line scale in Polypterus was shown to use the dorsal migration pathways. I then investigated the dynamics of migrating neural crest cells using molecular markers following performed microsurgery to insert a fine insulating film into the vicinity of the neural crest, which resulted in successfully blocking the lateral migration pathway of the neural crest cells.

Experimental improvements include: a construct of a regulation region of Polypterus or mouse Mitf gene inserted in To12 vector together with the EGFP expression cassette. By expressing the construct in a fertilized egg in advance, it became possible to visualize neural crest cells passing through the dorsal migration pathways without postoperative experiments, and it became easier to observe even if they were raised until they became larger individuals.

研究分野：形態発生学

キーワード：ポリプテルス 神経堤細胞 側線感丘 側線鱗 Mitf

## 1. 研究開始当初の背景

条鱗類ポリプテルスは、肉鱗類シーラカンスと並んで分岐系統学上、最も根幹に位置する現存の魚であり、これら両者の鱗はエナメル質を含むことから原始的な形質と捉えられ、古代甲青魚の頃の名残と見なされている。一般的な魚の鱗(層板骨)はエナメル質を含まず、中胚葉由来であることが示されている (Shimada, et al., Nat Commun, 2013)。ポリプテルスの鱗は層板骨の上にエナメル質が覆う構造をしている。本研究では、エナメル質含有鱗の由来が神経堤細胞によるものか否かについて、ポリプテルス遺伝子組換え体を作製して検証する。

## 2. 研究の目的

ポリプテルスを用い、エナメル質の形成機構の解明を目的に、以下の検討を実施する。

- (1) エナメル質形成における神経堤細胞の関与を明らかにする  
ポリプテルス遺伝子組換え体作製技術と実験発生学的手法を組み合わせ、神経堤細胞のエナメル質形成への関与を証明する。
- (2) 鱗と感丘の形成過程における関係性を調べる  
ポリプテルスにおける側線鱗と感丘の発生・再生過程における関係性を、神経堤細胞分化の観点から調べる。側線鱗形成にはエナメル質形成が、感丘形成には色素細胞形成が関わることを示唆されることから、この分化の方向性がどのように決定するか、さらに孔の塞がった通常鱗に感丘が再生するかを調べる。

## 3. 研究の方法

- (1) 実験発生学的な鱗形成への神経堤細胞の関与に関する検討  
ポリプテルス神経胚において、背側経路を移動する神経堤細胞を阻止する目的で、絶縁フィルムを挿入する実験を行う。
- (2) 硬骨魚の鱗と感丘の再生過程における関係性の検討  
ポリプテルス成魚の側線鱗と普通鱗の挿げ替え実験を行う。鱗上に感丘のための小孔が二時的に形成されるか、感丘が再生されるか、エナメル質が変化するかなどを調べる。またポリプテルスと硬骨魚の鱗の比較解析を行い、原始的構造について考察をする。

## 4. 研究成果

- (1) 実験発生学的な鱗形成への神経堤細胞の関与に関する検討  
ポリプテルスの側線感丘と側線鱗は、水平中隔の延長線上の表皮と真皮から形成されるため、これら両者に寄与すると考えられる神経堤細胞は、*PsSox10* とその下流遺伝子の *PsMif* を用いて調べたところ、共に背側経路を通ることが明らかとなった。これはゼブラフィッシュではメラニン芽細胞が一過性に構成する外側ストライプと同じものとしても確認された (Kelsh et al., 2009)。次にこの背側経路を遮断する目的で、初期神経胚の神経堤外側に細切した絶縁フィルムを挿入する顕微手術を行なった。フィルム挿入 6 時間後の尾芽胚期にサンプリングを行い、*PsSlug* 遺伝子発現について whole-mount *in situ* hybridization 法を施したのち凍結切片の作製をして確認してみたところ、背側経路の神経堤細胞を遮断することが確認できた。しかしフィルム挿入後の胚は損傷しやすい上に時間と熱を掛けて分子マーカーの発現を調べることは気を遣い困難を伴うことから、*PsMif* 遺伝子の調節領域に *EGFP* をつないだコンストラクトを作製し、メダカ Tol2 発現システムをポリプテルスに応用することにした。ポリプテルスの *Mif* 遺伝子の調節領域については詳しく調べられていないためマウスやヒトとゼブラフィッシュの配列を参考にして、プロモーターの上流 790bp ほどの *Sox10*、*Pax3*、*CREB* 結合配列を含む領域を用いた。また同じ領域のマウス *Mif* 遺伝子調節領域を用いたコンストラクトも同時に作製した。これらのコンストラクトとトランスポザーゼ mRNA を予めポリプテルス受精卵に顕微注入し、その後の神経胚でフィルム挿入実験を施すことで、神経堤細胞が GFP タンパク質により可視化され、フィルムの阻害効果を調べることができるようになった。これならば胚を超えて幼生になってもゲノムに組み込まれた GFP は産生され続けるため容易に神経堤細胞由来の構造を観察できる。

- (2) 硬骨魚の鱗と感丘の再生過程における関係性の検討  
ポリプテルス成魚の側線鱗と通常鱗の異所性交換移植実験を行い、およそ 3 ヶ月後にこれら鱗を採取して連続切片を作製し HE 染色を施した上で形態学的解析を行った。通常鱗があった場所へ側線鱗を移植した場合、感丘と思しき細胞塊は未だ観察された。一方、側線鱗があった場所へ通常鱗を移植した場合には、明確な感丘構造は観察されず、また本来側線鱗の表層に存在する小孔も認められなかった。これは側線鱗および感丘の再生が不可能であるのか、あるいは 3 ヶ月という期間では足りないのかを判定するには実験数が圧倒的に足りないため、課題の残る結果

となった。

硬骨魚の鱗と感丘を観察するためインドネシア産シーラカンスの側線鱗の組織切片を作製し観察したところ、露出部のみにエナメル質および象牙質の硬組織と色素細胞が存在しており、そこを通るように側線管の孔が開くことが明らかとなった。感丘に繋がると思われる神経束が観察されたことから、トンネル型側線感丘であることはほぼ間違いない。これは線画のみの報告に留まった Millot and Anthony (1965) による知見よりも実態の伴った結果と言える。

一方、条鰭類ポリプテルスの側線感丘は側線鱗を覆う表皮内に存在するのだが、鱗について詳細を調べてみたところ、エナメル質の下に象牙質も島状に存在することが、偏光フィルターを用いた微分干渉顕微鏡観察により明らかとなった。これは既報の白亜紀のガー *Obaichtys* (Brito, et al., 2000) の鱗に酷似している。従って、ポリプテルスの鱗は、白亜紀のガーや現存のシーラカンスと同様にコズミン鱗を持つことになり、従来の形態学的解釈には変更が必要なのかも知れない (重谷、日本分子生物学会 2018 にて発表; Meunier F.J.私信)。そしてこの象牙質は現存のガーの鱗では見られない (重谷、日本分子生物学会 2018 にて発表)。ただし骨と歯の骨化調節に関わる SCPP 遺伝子群の最近の分子データ解析では、シーラカンスには AMEL 遺伝子が発現するところを、ガーの鱗にはその代わりに SCPP5 遺伝子が発現するために、層板骨しか持たないゼブラフィッシュの発現と似ている、つまりエナメル質の有無に関わらず条鰭類の中で機能する遺伝子は共通することを示し、また同じエナメル質でも硬骨魚と条鰭類では本質的に異なる可能性をも示唆しており (Kawasaki, et al., 2021)、形態と分子が相容れない状況となっている。

#### < 引用文献 >

Shimada, et al., Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nat Commun*, 2013;4:1639.

Kelsha et al., *Sem Cell & Dev Biol* 20 (2009) 90-104.

Millot and Anthony, *Anatomie de Latimeria chalumnae Tome II*, 1965.

Brito et al., *C.R.Acad. Sci.Paris, Sciences de la Terre et des planètes/Earth and Planetary Sciences* 331 (2000) 823–829.

Kawasaki, et al., *Coevolution of enamel, ganoin, enameloid, and their matrix SCPP genes in osteichthyans*. *iScience* 24, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒瀬成美、田中亮輔、小林汐織、重谷安代、岡部正隆、長澤竜樹、二階堂雅人.
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関する進化発生的起源の解明.
3. 学会等名 日本進化学会年大会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒瀬成美、田中亮輔、小林汐織、重谷安代、岡部正隆、長澤竜樹、二階堂雅人.
2. 発表標題 ハリネズミの針形成に関する進化発生的起源の解明.
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重谷安代、立花利公、岡部正隆.
2. 発表標題 ポリテリスの側線感丘後方移動時の基底膜の変化と感丘形成.
3. 学会等名 日本動物学会第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重谷安代、立花利公、岡部正隆.
2. 発表標題 古代魚の側線感丘後方移動時の基底膜の再編成と感丘形成.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重谷安代、立花利公、岡部正隆.
2. 発表標題 ポリテリスの側線感丘後方移動時の基底膜の変化.
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重谷安代、井上龍太郎、岡部正隆.
2. 発表標題 ポリテリスの側線感丘後方移動時の基底膜の変化.
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重谷安代、Hukom FD、Iwata M、岡部正隆.
2. 発表標題 硬骨魚の側線鱗とそれに付随する感丘の比較形態からみるプロトタイプ.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会パンフィコ横浜
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 重谷安代、ほか. 早稲田大学先進理工学部生命医科学科編集.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店.	5. 総ページ数 149
3. 書名 生命科学概論 第2版：環境・エネルギーから医療まで. 第6章 生物の進化.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

学校法人慈恵大学 教育研究年報  
<http://www.jikei.ac.jp/jikei/finance/kyouikukenyuunenpou.html>  
 東京慈恵会医科大学解剖学講座（組織・発生）  
[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/02\\_sokaibo.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/02_sokaibo.html)

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		
インドネシア	インドネシア海洋研究所LIP1-RCO		