

平成21年6月4日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770202

研究課題名（和文）

条鰭類系統初期に分岐したポリプテルスの両生類型発生における体軸／胚葉形成機構

研究課題名（英文）

Germ layer patterning and axis formation in the most basal ray-finned fish, *Polypterus senegalus*.

研究代表者

竹内 雅貴 (TAKEUCHI MASAKI)

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・研究員

研究者番号：00392019

研究成果の概要：ポリプテルスは原始的な硬骨魚であり、脊椎動物の進化を探るうえで非常に重要な系統的位置を占める。その初期発生の様子は全割卵で両生類と類似し、盤割卵の真骨魚（一般的な進化した硬骨魚）とは様々な点で異なる。しかしながら、ポリプテルスは全割発生であるにも拘らず、植物極側細胞集団が胚葉に貢献しない点で両生類とも異なる。この特徴は、最も原始的な現生脊椎動物であるヤツメウナギでも保存されており、ポリプテルス様の初期発生機構は脊椎動物の祖先型と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

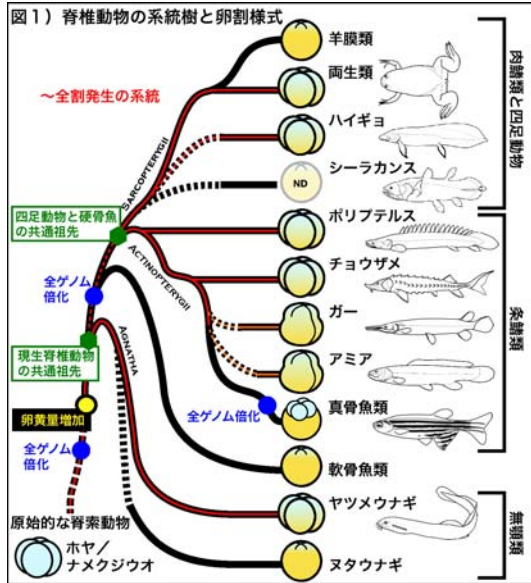
キーワード：進化発生、初期発生、卵割、胚葉形成、内胚葉、脊椎動物、ポリプテルス、ヤツメウナギ

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物初期発生の分子機構は、モデル生物：各分類群の代表としてマウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュなどを用いて解析が進んできた。このうち両生類は、全割卵で、すべての割球が三胚葉（外・中・内）のどれかへ分化し、胚体外組織を基本的に持たない。これらの点は原始的な脊索動物と共通であり、従って、両生類様の発生機構が脊椎動物において根源的であると考えられてきた。しかしながら、アフリカツメガエルの胚葉形成は、植物極側で母性に発現する T-box 転写因子 *VegT* に依存的な点で非

常に特徴的である。母性 *VegT* は、中・内胚葉を決定づける転写因子 *brachyury*・*sox17*、中内胚葉分化や体軸形成を司る *nodal* 関連因子などの領域特異的な発現に必要とされる。*VegT* の相同遺伝子は、これまで調べられたすべての両生類で母性発現が認められる。一方、ゼブラフィッシュ、ニワトリでは母性発現も同様の役割も無く、また、マウスではゲノム配列中に見つからない。また、両生類以外の分類群における全割発生の分子生物学的知見は非常に限定的である。従って、全割・盤割の現モデル生物間では系統的解析が困難であり、卵割様式・胚葉形成とその分子機構

の多様化を包括的に理解するためには、両生



類以外の全割発生を解析し、比較対象とする事が不可欠であると考えた。

ポリプテルスは、条鰭類系統で最も早期に分岐した硬骨魚である。その初期発生について、全割卵である事は知られていたが、その他の報告はほとんど無かった。

2. 研究の目的

ポリプテルスの初期発生を解析し、他のモデル生物と比較する事で、脊椎動物における初期発生の多様性を系統的に理解する。特に、胚葉形成については、中・内胚葉の分化領域を同定し、パターン形成の分子機構の変化との関連性を探る。

3. 研究の方法

(1) ポリプテルスの飼育と胚採集、胚操作技術の開発。

ポリプテルスは確立された実験動物ではないけれども、観賞魚として一般的であり、飼育/採卵についてはアマチュアからの情報を参考にした。使用したポリプテルス種は *Polypterus senegalus*, *P. endlicheri* の二種で、流通量が多く、採卵が容易であると予想した。胚操作については、卵膜処理、顕微注入、胚の解剖、などを開発した。

(2) ポリプテルスの遺伝子単離。

遺伝子断片の単離は、主に縮重プライマーを用いた RT-PCR 法 (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) で行った。また、受精卵から初期神経胚までの cDNA ライブラリーを作成し、その EST (Expression Sequence Tag) 解析からの情報を利用した。全長 cDNA の単離は、3' -もしくは 5' -RACE 法 (Rapid Amplification of cDNA Ends) で行った。

(3) ポリプテルス胚での遺伝子発現解析。

発生段階に従った遺伝子発現の量的変化は、各遺伝子の特異的プライマーを用いた RT-PCR によって解析した。

発現の領域的パターンの同定には *in situ* hybridization 法と、切り分けられた組織片から RT-PCR する事で行った。

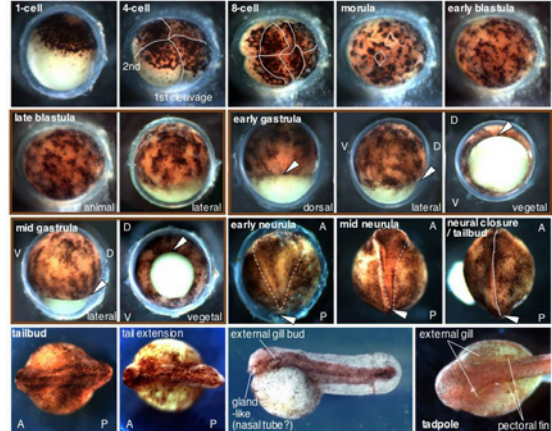
(4) ヤツメウナギの解析。

研究の進行に伴い、系統的な理解のためにヤツメウナギ胚の解析を必要とした。ヤツメウナギにおいても、ポリプテルス同様の方法を、一部変更して行った。

4. 研究成果

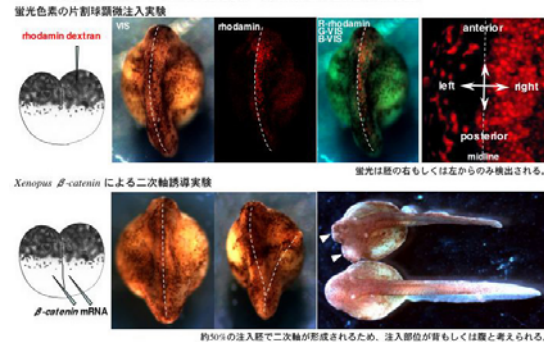
(1) ポリプテルスの初期発生は両生類と酷似する。

図2) *Polypterus senegalus* の発生

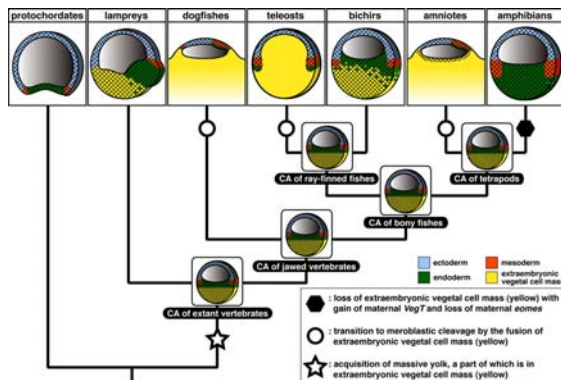


以下、ポリプテルス胚発生の特徴を羅列する；卵黄顆粒は植物極側に多いが、胚全体に分布し、従って、卵割様式は不等全割である。植物極側には比較的大きな割球が形成されるが、単核の細胞である (真骨魚で見られる yolk syncytial layer は形成されない)。初期胞胚には内部に明確な卵割腔が形成される。原腸形成時には背側で極端に組織陥入し、表層組織の胚内部への巻き込みが観察される (真骨魚で見られる enveloping layer / forerunner cell group は無い)。神経板が形成され、その両端が背側正中で接する神経管閉鎖が観察される。

図3) ポリプテルスにおける受精後第一卵割面と背腹軸の相関性



り動物極側細胞を中内胚葉へ誘導する活性を持っていた。類似の活性は、両生類では内胚葉に、他の脊椎動物では胚体外組織（真骨魚の卵黄多核層 YSL など）に由来する。



これらの結果から、脊椎動物初期発生の多様化過程について以下の仮説を提唱した；現生脊椎動物の共通祖先で、胚に含まれる卵黄量が劇的に増加し、それに伴って植物極側細胞集団は胚体外組織へ特化した（ポリプテルス/ヤツメウナギが保持）。胚盤と一つの大きな卵黄細胞を形成する盤割は、羊膜類/真骨魚類/軟骨魚類などの系統で、植物極側細胞集団が進化的に融合する事で獲得された。その際、羊膜類で植物極側細胞集団の一部は胚体外組織（羊膜、漿膜など）の起源となった。両生類においては母性 *VegT* の発現と機能を独自に獲得し、二次的に植物極側細胞集団を内胚葉へ分化させた。本仮説は教科書の見地を覆す画期的なものとして自負している。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Takeuchi, M. (7 名中 3 番目)、Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head.、*Developmental Biology*、325、282-295、(2009)、査読有
- ② Takeuchi, M., Okabe, M., Aizawa, S., The Genus *Polypterus* (Bichirs): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-Finned Fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harb. Protoc.*、5、pdb.emo117、(2009)、査読無
- ③ Takeuchi, M., Okabe, M., Aizawa, S., Microinjection of Bichir (*Polypterus*) Embryos. *Cold Spring Harb. Protoc.*、5、pdb.prot5157、(2009)、査読無
- ④ Takeuchi, M., Okabe, M., Aizawa, S., Whole-Mount In Situ Hybridization of

Bichir (*Polypterus*) Embryos. *Cold Spring Harb. Protoc.*、5、pdb.prot 5158、(2009)、査読無

- ⑤ Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., Aizawa, S. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Developmental Biology*、in press、(2009)、査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 竹内 雅貴(代表)、「祖先的条鰭類ポリプテルスの初期発生：両生類/真骨魚との比較と考察」、第 40 回日本発生物学会・第 59 回日本細胞生物学会大会 合同大会、2007 年 5 月 30 日、福岡国際会議場
- ② 竹内 雅貴(代表)、「原始的条鰭類ポリプテルスの胚葉パターンと原腸形成」、第 13 回小型魚類研究会、2007 年 9 月 16 日、東京大学
- ③ 竹内 雅貴(代表)、「原始的条鰭類ポリプテルスからみる脊椎動物初期発生の多様化とその分子機構」、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)、2007 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜
- ④ Masaki Takeuchi(代表)、「ポリプテルス、ヤツメウナギの全割発生にみる部分割発生の進化的起源」、第 14 回小型魚類研究会、2008 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター (基礎生物学研究所)

〔図書〕（計 1 件）

Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., Aizawa, S., Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Emerging Model Organisms Vol. 1*, In: Gann, A., Crotty, D. (Eds), (2008), Chapter 18; The Genus *Polypterus* (Bichir): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-finned Fishes (Actinopterygii). pp 447-467.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 雅貴 (TAKEUCHI MASAKI)

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・研究員

研究者番号：00392019