

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06794

研究課題名(和文) 円口類を用いた「第3の半規管」水平半規管獲得の進化発生的な解明

研究課題名(英文) Analysis of the evolutionary origin of the horizontal semicircular canal using cyclosotomes

研究代表者

菅原 文昭 (Sugahara, Fumiaki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00611005

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)：水平半規管がどのような発生的メカニズムにより獲得されたのかを解明するため、本研究ではまず、水平半規管をもたないヤツメウナギ胚から内耳を取り出しRNAを抽出することに成功し、これを用いてトランスクリプトーム解析など発現解析を行った。その結果、以前から水平半規管の「マスター遺伝子」と考えられていたOtx1に相当する可能性のある4つのOtx遺伝子は、どれもヤツメウナギの内耳にも発現していることがわかった。また、水平半規管を欠くOtx1ノックアウトマウス胚からも内耳を取り出し、RNAseqにより発現プロファイルを取得した。今後はこのマウスとヤツメウナギの比較によって水平半規管獲得の経緯を探りたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人間が自身について知りたいという欲求は普遍的な知的好奇心のひとつである。われわれヒトはどのような進化の変遷を経て成立したのだろうか？3つの半規管は平衡感覚のうち、特に回転覚を知覚するための重要な器官である。前回の研究課題から引き続いて行ってきた研究から、複雑な形態をもつ3つの半規管は、脊椎動物の進化の過程でいきなり成立したのではなく、段階的に成立してきたことが明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：To investigate the developmental mechanism by which the horizontal semicircular canal is acquired, we successfully extracted RNA from lamprey embryonic inner ears that do not possess the horizontal canal. Expression analysis using the extracted RNA revealed the expression of four Otx genes, which are potential candidates corresponding to the "master control gene" of the horizontal canal, in the lamprey inner ears. We also extracted the inner ear and obtained RNA from Otx1 knockout mouse embryos lacking the horizontal canal, and their expression profiles were obtained through RNAseq. We plan to explore the acquisition process of the horizontal canal by comparing the data from both mice and lampreys.

研究分野：進化発生学

キーワード：円口類 半規管 ヤツメウナギ ヌタウナギ 進化 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれの内耳には3つの半規管(前・後・水平)いわゆる三半規管があり、X軸、Y軸、Z軸方向の回転運動を受容する。脊椎動物の成立以前に分岐した尾索類ホヤや頭索類ナメクジウオに半規管は存在しないので、この器官は脊椎動物の新奇形態(Evolutionary Novelty)だと考えられている。このような半規管の形態は、どのように獲得され、どのような発生過程の変更を経て現在に至ったのだろうか？

現生の顎のない脊椎動物、ヌタウナギ類とヤツメウナギ類は、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、脊椎動物の初期の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、ヌタウナギの半規管はドーナツ状で1つしかなく、ヤツメウナギは前後2つしかない。ごく近年まで、ヌタウナギはヤツメウナギより先に分岐したと考えられていたので、半規管は進化の過程で1→2→3と段階的に成立してきたと単純に考えられていた。ところが、研究代表者らのグループによる以前の研究により、一見、一半規管に見えるヌタウナギの環状の半規管の前半分と後半分は、ヤツメウナギや顎口類の前後2つの半規管とそれぞれ相同であることが判明した。以上からわれわれは、現生の脊椎動物の共通祖先は、すでに前後に分かれた2半規管をもっていたと推定した。残された謎は、顎口類に至る過程のいつ、どのようなしくみによって第3の半規管、すなわち水平半規管を獲得したのかである。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、円口類の分岐以前の祖先的脊椎動物からわれわれ顎口類に至る過程のいつ、どのようなしくみによって第3の半規管、すなわち水平半規管を獲得したのかを探るため、円口類の一種であるヤツメウナギの内耳発生を、マウスなど顎口類と遺伝子レベルで比較し、脊椎動物の水平半規管がどのような発生プログラムの変遷をたどって獲得されたのか推定できないか考えた。

また、上記計画段階の背景には入れていなかったが、半規管や前庭からの情報が入力される小脳は、平衡覚処理において非常に重要な脳の領域である。興味深いことに円口類の小脳は形態的に極めて未分化である。今回は上記半規管の解析に加え、中枢側の小脳の進化についても考察を行うため、円口類の小脳発生を分子発生学的に解析した。

3. 研究の方法

これまでに水平半規管を欠く変異マウスがいくつか知られている。中でも *Otx1* のノックアウトマウスは水平半規管のみを欠き、前後半規管は残る。このため、以前から *Otx1* 遺伝子が水平半規管の「マスター遺伝子」であり、この遺伝子が円口類の内耳では機能を獲得して「いない」のではと言われていた。上記の仮説を検証する手段のひとつとして、まずヤツメウナギの4種の *Otx* の内耳での時空間的発現を定量化する実験を計画した。また、水平半規管を有するマウスの内耳の mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、出てきたデータから各遺伝子の内耳における発現レベルを推定し、動物間で比較することを計画した。このとき、顎口類 - ヤツメウナギ間で顕著に発現レベルが異なる遺伝子群があれば水平半規管の発生に関与している可能性があるだろう。

小脳については、主要なニューロンである顆粒細胞とプルキンエ細胞が発生する分子的基盤が円口類の小脳相当域に存在するかについて調べた。

4. 研究成果

ヤツメウナギ胚の複数の発生ステージの胚および幼生から酵素処理と微小手術によって内耳の原基である耳胞を抽出することに成功した。ここからトータル RNA を抽出し、発現解析を行った。ヤツメウナギは4つの *Otx* 遺伝子が存在することが明らかになったため、それらをリアルタイム PCR によって発現を定量的に解析したところ、うち2種の遺伝子は発生期～幼生期にわたって発現しており、残りの2種は2半規管が形成される体長 10mm-13mm の幼生期においてのみ発現がみられた。つまり、水平半規管の「マスター遺伝子」と考えられていた *Otx1* 相同遺伝子は、少なくとも2半規管のヤツメウナギ胚に発現しており、何らかの機能を果たしていることが示唆された。また、後期胚および 10mm 幼生の mRNA を次世代シーケンサーにより配列決定し、それぞれ約 4900 万リード、6000 万リードを得た。これらを既存のヤツメウナギゲノムにマッピングし、それぞれ 96.6%、97.1%のマッピングに成功した。この過程でヤツメウナギ胚の RNA 抽出の手法について改良を行い、その内容を技術論文を発表した。

並行して、水平半規管を欠き2半規管となる表現型で知られる *Otx1* ノックアウトマウスの解析を行った。ノックアウトマウス胚から内耳を取り出し RNA を抽出し、こちらで次世代シーケンサーによって発現プロファイルが得られた。今後はこのデータと上記のヤツメウナギのデータとを比較し、円口類が保持する2半規管からどのような発生学的変化により水平半規管が獲得されたのかの経緯を探りたい。

小脳については、顆粒細胞の分化に必須な転写因子 *Atoh1* と *NeuroD1*、およびプルキンエ細胞

の分化に必要な *Ptf1a* のそれぞれの相同遺伝子を単離し、ヤツメウナギ、ヌタウナギの小脳相当領域での発現を観察したところ、これらの遺伝子が胚発生期に発現していることが分かった。すなわち、これら小脳の主要なニューロンを生み出す分子発生的メカニズムは、円口類と顎口類の分岐以前にある程度成立していることが示唆された。この小脳の内容について原著論文、日本語総説、および本の章を執筆し、発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugahara Fumiaki, Pascual-Anaya Juan	4. 巻 -
2. 論文標題 High-quality total RNA extraction from early-stage lamprey embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/btn-2023-0004	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
1. 著者名 Sukparangsi Woranop, Morganti Elena, Lowndes Molly, Mayeur Helene, Weisser Melanie, Hammachi Fella, Peradziryi Hanna, Roske Fabian, Holzenspies Jurriaan, Livigni Alessandra, Godard Benoit Gilbert, Sugahara Fumiaki, Kuratani Shigeru, Montoya Guillermo, Frankenberg Stephen R., Mazan Sylvie, Brickman Joshua M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Evolutionary origin of vertebrate OCT4/POU5 functions in supporting pluripotency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32481-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 該当する
1. 著者名 Takagi Wataru, Sugahara Fumiaki, Higuchi Shinnosuke, Kusakabe Rie, Pascual-Anaya Juan, Sato Iori, Oisi Yasuhiro, Ogawa Nobuhiro, Miyanishi Hiroshi, Adachi Noritaka, Hyodo Susumu, Kuratani Shigeru	4. 巻 20
2. 論文標題 Thyroid and endostyle development in cyclostomes provides new insights into the evolutionary history of vertebrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-022-01282-7	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
1. 著者名 Sugahara Fumiaki, Pascual-Anaya Juan, Kuraku Shigehiro, Kuratani Shigeru, Murakami Yasunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic Mechanism for the Cyclostome Cerebellar Neurons Reveals Early Evolution of the Vertebrate Cerebellum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 700860-700860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.700860	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

1. 著者名 Sugahara Fumiaki、Murakami Yasunori、Pascual-Anaya Juan、Kuratani Shigeru	4. 巻 96
2. 論文標題 Forebrain Architecture and Development in Cyclostomes, with Reference to the Early Morphology and Evolution of the Vertebrate Head	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain, Behavior and Evolution	6. 最初と最後の頁 305-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519026	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 該当する

1. 著者名 菅原 文昭, 村上 安則	4. 巻 46
2. 論文標題 小脳の起源と進化を円口類の比較発生から探る	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 兵庫医科大学医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 31-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Itoyama T, Fukui M, Kawaguchi M, Kaneko S, Sugahara F, Murakami Y	4. 巻 5
2. 論文標題 FGF- and SHH-based molecular signals regulate barbel and craniofacial development in catfish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological letters	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-019-0135-1	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 尾内 隆行, 菅原 文昭, 足立 礼孝
2. 発表標題 口ゼツタ中胚葉からわかった脊椎動物頭部の進化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Onai Takayuki, Sugahara Fumiaki, Adachi Noritaka
2. 発表標題 The problem of head segmentation: insights from the lamprey head mesoderm dynamics
3. 学会等名 The 43rd annual meeting of the molecular biology society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiaki Sugahara
2. 発表標題 Brain Molecular Structure in Cyclostomes
3. 学会等名 9th European Conference on Comparative Neurobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinnosuke Higuchi, Fumiaki Sugahara, Juan Pascual-Anaya, Wataru Takagi, Yasuhiro Oisi & Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Development of the inner ear in hagfishes and lampreys reveals evolution of the vertebrate semicircular canals
3. 学会等名 International Congress of Vertebrate Morphology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Fumiaki Sugahara	4. 発行年 2021年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 471
3. 書名 Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology (Chapter 22. Cyclostomes (Lamprey and Hagfish))	

1. 著者名 Murakami Yasunori, Sugahara Fumiaki	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 564
3. 書名 Cerebellum as a CNS Hub (Contemporary Clinical Neuroscience), (Evolutionary and Developmental Perspectives on the Origin and Diversification of the Vertebrate Cerebellum)	

1. 著者名 菅原文昭	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典(末光隆志編) 第2章 動物の進化 5.10 無顎類の出現(分担執筆)	

1. 著者名 菅原文昭(分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 クバプロ	5. 総ページ数 332
3. 書名 ブレインサイエンスレビュー2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	樋口 真之輔 (Higuchi Shinnosuke) (20847131)	神戸大学・付属学校部・付属中等教育学校教諭 (14501)	

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
---------	---------