

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03301

研究課題名（和文）エミューの前肢を積極的に退縮させる発生基盤の解明

研究課題名（英文）Developmental basis for the regression of emu wings

研究代表者

田中 幹子（Tanaka, Mikiko）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：40376950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エミューの前肢の退縮機構の解明を目的に研究を行った。その結果、エミューの前肢は、骨の短縮、滑膜関節の消失、左右非対称な骨格という特徴を示すこと、これらは前肢の先端に筋肉が存在しないため発生中に肢を動かさないことに起因することを示した。さらに、前肢の筋前駆細胞に二種類の細胞の特徴を備える細胞が存在していること、これらが先端へ遊走せず、基部で大規模な細胞死を起こすために、先端に筋肉がなく、力学的ストレスが欠如することで、エミュー特有の骨格が形成されることを見出した。本成果は、遺伝的要因と後天的要因の組み合わせによって起こる新たな器官退縮の提唱に繋がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物に不要となった器官の退縮は、その器官の発生を担う遺伝子の発現量や発現領域の変化に起因して、細胞数が減少することによって起こると考えられていた。本研究の成果は、器官の退縮が単にその器官の発生に必要な因子の欠如にはならず、新しい細胞種が存在するという遺伝的要因と筋形成不全に伴う力学的ストレスの低下という後天的要因の組み合わせによって起こりうるという、これまでの常識を覆す全く新しい器官退縮の発生機構の提唱に繋がった。本研究では、形態変化の要因を考える上で、ほとんど考慮されてこなかった視点の重要性を提案しており、今後の発生学分野研究と進化学分野研究の展開に新たな方向性を提案する重要な成果となった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanisms underlying wing reduction in emus. Our analyses showed that the immobilization resulting from the absence of distal muscles contributes to the shortening, the loss of synovial joints, and the left-right asymmetric phenotypic variation observed. Further analyses identified a population of muscle progenitors displaying a dual transcriptional cell signature. These muscle progenitors aggregated at the proximal region of the wing buds and are responsible for the morphological features seen in the wings of emus. These findings demonstrate that differential mobility during embryonic development may underlie the evolution of vestigial structures.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：進化発生

1. 研究開始当初の背景

地球上に棲息する動物は、その生息域や行動様式に応じて、不要な器官が退縮することがある。不要となった器官の発生過程では、その器官の形成に必要なシグナルが減少することで、器官が退縮するようになる例が多数報告されている。たとえば、腹棘(変形した腹鰭)が退化したトゲウオでは、腹鰭原基の形成を促す遺伝子の発現量が減少しており(Cole, Tanaka et al., 2003 *Curr Biol* 13, R952)、イルカやヘビでは後肢芽の形成が誘導されるものの、その伸長を維持する遺伝子が発現しないために、後肢の退縮がおこる(Thewissen et al., 2005 *PNAS*, 103, 8414-8418; Kvon et al., 2016 *Cell* 167, 633-642)。また、その器官の形成を担う遺伝子の発現パターンが変化することで、器官が退縮する例もあり、たとえばラクダやウマの肢芽では、指間細胞死を担う遺伝子の発現領域が拡大することで、指の数が減少する(Cooper et al., 2014 *Nature* 511, 41-45)。

化石記録から、鳥類を含む主竜類では、前肢の指の減少が何度も起こっていることが知られている(Xu and Mackem, 2013 *Curr Biol* 23, R538-544)。さらに、ニワトリ、ゼブラフィンチ、エミュー、及び、ワニの胚においては、成体の前肢の指の数にかかわらず、初期胚の肢芽には5本の指原基が存在する。これらのことから、主竜類の前肢の退縮がどうやって起こってきたのかという問題は、発生生物学者や古生物学者にとって大きな課題の一つとされている(Tamura et al., 2011 *Science* 331, 753-757; Towers et al., 2011 *Nature Commun* 2, 426; Xu et al., 2014 *Science* 346, 1253293)。特に、エミューの前肢の退縮は著しいことから、主竜類でみられる前肢の退縮機構を理解するためのモデルとして、しばしば用いられてきた(de Bakker et al., 2013 *Nature* 500, 445-448; Sackton et al., 2019 *Science* 364, 74-78)。近年、エミューの前肢の退縮の原因が、四肢形成とは無関係な遺伝子が前肢芽の間充細胞に発現していることによるものであることが示された(図1; Farlie et al., 2017 *Nat Commun* 8, 132)。この事実は、エミューの前肢の退縮は、これまで知られていたような肢の形成を担う遺伝子の発現パターンの変化にはよるものではない新しいメカニズムによって促されていることを示唆していた。



図1. エミューの前肢の発生. *Nkx2.5* が発現したことで、肢芽が小さくなるとされたが(Farlie et al., 2017),その機構は不明である.胚の前肢には、手根骨(手首の骨)や3本の指骨の軟骨が認められるが、発生中に融合する.また、前肢の骨格(特に先端部)は、他の部位と比べて相対的に短い。

一方、我々は、エミューの成体では、観察したすべての個体において前肢骨格のパターンが異なることを示した(Kawahata et al., 2019 *Sci Rep* 9, 8560)。また、エミューの成体では、前肢の骨格要素の短縮だけでなく、骨格要素の融合に伴う関節形成不全も観察されていた。さらに、エミューの成体の前肢の先端には、筋要素がほとんど欠損していることを確認していた。

四肢動物の四肢の骨格要素の伸長と関節形成には、筋弛緩薬を投与したニワトリ胚や筋形成不全を誘発させた遺伝子改変マウス胚などを使った研究から、遺伝的要因に加えて、胚が四肢を動かすことによる力学的ストレスという後天的要因も必要であることが知られている(Pollard et al., 2014 *J Anat* 224, 615-623; Kahn et al., 2009 *Dev Cell* 16, 734-43)。ニワトリ胚の動きを抑制すると、四肢骨格の融合に伴う関節形成不全と骨格要素の短縮が生じるのである。これらの特徴は、エミューの前肢骨格で見られる特徴と一致していたことから、我々は、エミューの前肢骨格は、発生中に前肢の動きが抑制されたことに起因する形質をもっている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで知られていた器官退縮機構とは異なる器官退縮のための戦略をもつと思われるエミューを題材に、エミューの前肢が発生の過程で退縮する分子基盤を明らかにすることを目標に研究を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究課題では、エミューの前肢の筋形成不全の実態と骨格パターン、および、四肢の動きを詳

細に観察した上で、筋弛緩薬で処理したニワトリの前肢の骨格パターンと比較することで、エミューの骨格要素が力学的ストレスの低下に起因する特徴を備えた形態をしているかを検証した。さらに、エミューの前肢の筋肉を形成する筋前駆細胞については、その特徴を理解するために、各種分子マーカーを使った組織学的解析、および、single cell RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析等の手法を用いた解析を行なった。

4. 研究成果

エミュー成体の骨格パターンについて解析したところ、これまで報告されてきた骨格要素の短縮、滑膜関節の消失、さらに我々が以前報告した個体間での骨格パターンのバリエーション(図2; Kawahata et al., 2019)に加え、同一個体の前肢の左右の骨格パターンも異なっていることがわかった。

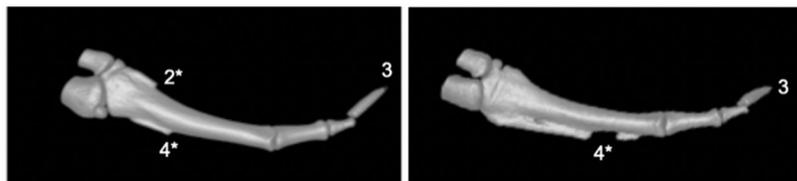


図2. エミュー成体の前肢の骨格パターン. エミューの前肢では、骨格要素の短縮や滑膜関節の消失に加え、個体間での骨格パターンのバリエーションが確認された (Kawahata et al., 2019).

四肢の骨格要素の短縮と滑膜関節の消失は、発生中に四肢の動きを抑制されたマウス胚やニワトリ胚の四肢骨格で報告されている特徴であることから (Pollard et al., 2014; Kahn et al., 2009)、エミューの前肢骨格で骨格要素の短縮と滑膜関節の消失に加えて見られた骨格パターンの個体間、および、個体内(左右)でのバリエーションも、発生中の四肢の動きの抑制によるものであるかを検証することとした。この目的で、発生中のニワトリ胚の動きを筋弛緩薬で抑制したところ、前肢の骨格要素の短縮と滑膜関節の消失だけでなく、個体間、および、個体内(左右)で、骨格パターンにバリエーションが生じることが確認された。これらのことから、エミューの前肢の骨格は、発生中に四肢の動きを抑制されたニワトリの前肢と同じ特徴を示すことが明らかとなった。

そこで、エミュー胚の発生中に前肢が動いているかを調べたところ、ニワトリ胚の前肢は手首の先まで動いていたにも関わらず、同じ発生段階のエミュー胚の前肢の先端がほとんど動いていないことが確認された。このことから、エミュー胚では前肢の筋肉の発生プロセスに異常が生じている可能性を考えた。まず、ニワトリとエミューの前肢の骨格筋組織について、組織学的に比較したところ、大きな違いは認められなかった。次に、ニワトリ胚とエミュー胚の前肢芽について、その発生プロセスを比較したところ、ニワトリ胚の前肢芽で手首より先に筋肉が形成される発生段階になっても、エミュー胚の前肢芽では手首より先に筋肉がほとんど形成されなかった。これらのことから、エミューでは、発生中に前肢の先端に筋肉が形成されないために、前肢の先端の動きが抑制されていることが明らかとなった。

次に、エミューの前肢芽の先端で筋肉が形成されない原因を明らかとすることを目的に、エミュー胚の前肢芽を題材に各種マーカー遺伝子を用いた遺伝子発現解析、および、scRNA-seq 解析を行なった。その結果、エミュー胚の前肢芽には、二種類の細胞の特徴を有する筋前駆細胞が存在していること、この筋前駆細胞群が前肢芽の基部で大規模な細胞死を起こすために、前肢の先端に筋肉が形成されないことが示唆された。

本研究の結果から、エミュー胚の前肢芽では、発生中に二種類の細胞の特徴を有する筋前駆細胞が基部で細胞死を起こすことで、先端の筋肉が形成されず、発生中に前肢の先端を動かせなくなることで、このため、四肢骨格の伸長や滑膜関節の形成に必要な力学的ストレスが欠如し、エミュー特有の骨格が形成されることを見出した。本研究の遂行により、器官の退縮が、遺伝的要因と筋形成不全に伴う力学的ストレスの低下という後天的要因の組み合わせによって起こりうるという、新しい器官退縮の発生メカニズムの存在の提唱に繋がった。本研究では、形態変化の要因を考える上で、ほとんど考慮されてこなかった視点の重要性を提案しており、今後の発生学分野研究と進化学分野研究の展開に新たな方向性を提案する重要な成果にとなった。これらの成果をまとめた論文については、1報の改訂版が査読中であり (Tsuboi et al., under revision)、1報は招待論文として投稿予定である (Cordeiro et al., in preparation as an invited article for *Dev Biol*).

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Cordeiro Ingrid R., Yu Reiko, Tanaka Mikiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Regulation of the limb shape during the development of the Chinese softshell turtles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolution and Development	6. 最初と最後の頁 e12352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ede.12352	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 Cordeiro Ingrid Rosenburg, Tanaka Mikiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Environmental Oxygen is a Key Modulator of Development and Evolution: From Molecules to Ecology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 202000025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202000025	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 Ono Satomi F., Cordeiro Ingrid Rosenburg, Kishida Osamu, Ochi Haruki, Tanaka Mikiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Air breathing behavior underlies the cell death in limbs of Rana pirica tadpoles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-022-00199-x	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 Pratiwi Hilda Mardiana, Hirasawa Masahiro, Kato Kohki, Munakata Keijiro, Ueda Shogo, Moriyama Yuuta, Yu Reiko, Kawanishi Toru, Tanaka Mikiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Heterochronic development of pelvic fins in zebrafish: possible involvement of temporal regulation of pitx1 expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1170691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1170691	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16件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Eriko Tsuboi, Satomi F Ono, Ingrid Rosenberg Cordeiro, Reiko Yu, Toru Kawanishi, Makoto Koizumi, Shuji Shigenobu, Guojun Sheng, Masataka Okabe, Mikiko Tanaka1
2. 発表標題 Immobilization secondary to cell death of dual-signature muscle precursors shapes wing skeletal pattern
3. 学会等名 Limb development: Fundamental mechanisms, evolution, disease and regeneration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Satomi F Ono, Eriko Tsuboi, Ingrid Rosenberg Cordeiro, Reiko Yu, Toru Kawanishi, Makoto Koizumi, Shuji Shigenobu, Guojun Sheng, Masataka Okabe, Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Deciphering the emu wing's distinct morphology: Insights from single-cell RNA sequencing of muscle progenitors
3. 学会等名 Limb development: Fundamental mechanisms, evolution, disease and regeneration (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Intrinsic and Extrinsic Factors underlie the Morphological Evolutions of Fins and Limbs
3. 学会等名 OIST-CNRS Joint Symposium on West Pacific Marine Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩重日奈子、川原大和、湯玲子、河西通、田中幹子
2. 発表標題 滑膜形成における力学的ストレスの関与の可能性の検証
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第76回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉岡優美、高木互、兵藤晋、田中幹子
2. 発表標題 鰭や四肢の動きを制御する運動神経の進化
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第76回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平沢将大、上原克也、湯玲子、河西通、田中幹子
2. 発表標題 付属肢の滑膜関節の進化プロセスの解明に迫る
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第76回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川原大和、岩重日奈子、平沢将大、湯玲子、河西通、田中幹子
2. 発表標題 力学的ストレスによる滑膜関節の発生の制御
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第76回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Mechanoadaptive Evolution of Emu Wings
3. 学会等名 The 29th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 動物のからだの形づくりの進化
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 遺伝的要因と外的要因に起因する発生プログラムの進化
3. 学会等名 第31回日本Cell Death 学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 遺伝的要因と外的要因に起因する形態の発生と進化
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eriko Tsuboi, Ingrid Rosenburg Cordeiro, Satomi F Ono, Reiko Yu, Makoto Koizumi, Guojun Sheng, Masataka Okabe, Mikiko Tanaka
2. 発表標題 Reduction of Muscle Activities Underlies the Forelimb Morphology of Emu
3. 学会等名 16th International Conference on Limb Development, Regeneration, and Evolution (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原克也、平沢将大、川原大和、湯玲子、河西通、田中幹子
2. 発表標題 滑膜関節の進化のプロセスの解明に向けたアプローチ
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坪井絵里子、Ingrid Rosenburg Cordeiro、小泉誠、岡部正隆、田中幹子
2. 発表標題 四肢の骨格パターン形成における力学的ストレスの役割
3. 学会等名 日本進化学会第22回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 外的要因による四肢の発生プログラムの可塑的变化
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中幹子
2. 発表標題 外的要因による四肢の発生プログラムの可塑的变化
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中幹子 (末光 隆志(総編集))	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 2-5-12 脊椎動物の上陸、2-5 動物の進化の歴史、第2章 動物の進化「動物の事典」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

田中幹子研究室 http://www.evodevo.bio.titech.ac.jp 田中幹子研究室 (TANAKA Lab) http://www.evodevo.bio.titech.ac.jp

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			
スウェーデン	Karolinska Institutet			
中国	Zhejiang University			