

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870042

研究課題名（和文） 円口類ヤツメウナギ、ヌタウナギにおける鼻下垂体プラコードの分子発生学的研究

研究課題名（英文） Developmental study of the naso-hypophyseal placode in cyclostomes (Lamprey and Hagfish)

研究代表者

菅原 文昭 (SUGAHARA FUMIAKI)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・研究員

研究者番号：00611005

研究成果の概要（和文）：

本研究により、円口類ヤツメウナギの鼻下垂体プラコード(以下NHP)は、形態学的、組織学的には単一の肥厚として発生するにもかかわらず、鼻および下垂体プラコードに相当する遺伝子発現が、肥厚前よりそれぞれ前後に分かれて観察されることが分かった。また、ヤツメウナギ初期神経胚に蛍光色素DiIを注入し、どの領域の細胞が鼻下垂体プラコードを形成するのか解析した。同時に蛍光タンパク注入によるライブイメージング技術の導入も試み、この動物に対する発生学的解析の土台を構築できた。ヌタウナギは胚を得ることに成功し、今後解析予定である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we found that although lamprey naso-hypophyseal placode develops as a single median thickening, nasal- and hypophyseal placode specific genes were already expressed separately before placode thickening. In order to track the cell lineage of the nasal placodal area, we succeeded to inject DiI focally at the pre-placodal area. Also, to trace cell movements, we injected a fluorescence protein at 1 cell stage and succeeded to observe fluorescein signals in this animal. Regarding hagfishes, we obtained a few fertilized eggs. We are preparing to analyze their gene expression patterns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ヤツメウナギ ヌタウナギ 鼻下垂体プラコード 顔面形成 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

われわれ顎のある脊椎動物(顎口類)の頭部には外鼻孔が1対存在する。つまり鼻の穴が2つ開いている。これは発生初期の頭部パタ

ーニングにおいて、鼻プラコードと呼ばれる肥厚した外胚葉の原基が2つあることに由来する。ところが、化石記録によると、脊椎動物の進化の初期には鼻の穴は1つであったら

しい。デボン紀に栄えた顎のない脊椎動物セファラスピスなどいくつかの動物群は、鼻孔が1つしかなく、正中に開いていたことが分かっている。つまり脊椎動物の初期進化において、「対鼻性」の獲得と「顎」の獲得が、脊椎動物の頭部形態に大きな変化をもたらしたのは間違いない。現生の円口類ヌタウナギ類、ヤツメウナギ類も外鼻孔は1つであり、顎を持たない。このことから円口類は、初期の脊椎動物の形態を残している可能性があり、脊椎動物の初期進化のモデル生物となりうる。

2. 研究の目的

対鼻性の獲得についての分子発生的考察は、これまでのところ知見に乏しい。ヤツメウナギの鼻プラコードは、下垂体プラコードと極めて隣接しており、「**鼻下垂体プラコード(nasohypophyseal placode ; 以下 NHP)**」と呼ばれる。先行研究によると、ヤツメウナギの NHP は、まず頭部先端部から肥厚していき、その肥厚が後方へ伸びるように成長し、プラコード後端が2次的に間脳視床下部に接し、下垂体を形成する。もしこの観察が本当ならば、NHP は、少なくとも発生初期は間脳に非依存的に発生することとなり、顎口類の下垂体プラコードの発生機構と大きく異なることになる。ところが、研究代表者の予備的な観察によると、下垂体分化マーカー遺伝子 *Lhx3* のヤツメウナギ相同遺伝子は、プラコードが肥厚する以前から間脳視床下部に接した外胚葉に発現する。つまり形態学的観察による考察と遺伝子発現の事実に相違がありそうだ。

そこで本研究では、これまでの形態学的知見に分子発生的解析を加えることにより、NHP の発生とその分子機構について詳細に解析し、顎口類のそれと比較することで、こ

の NHP が進化の過程でどのように、下垂体プラコードと、2 つに分離した鼻プラコードへと変遷していったのかを理解することを目的とする。具体的には以下を達成目標とした。

(1) ヤツメウナギの鼻下垂体プラコード(NHP)の細胞はどこから来るのか？

NHP は前方から後方に成長し、間脳視床下部に2次的に接するという報告がある(Uchida et al., 2003)。これを検証するため、前方に発生した初期 NHP の細胞を脂溶性蛍光色素 DiI 注入により標識し、その細胞運命を追うことにより、NHP がどのような細胞移動を伴って発生するのかを明らかにしたい。

(2) 鼻下垂体プラコード(NHP)の比較分子発生的解析

これまでヤツメウナギの NHP における遺伝子発現の解析は非常に知見に乏しい。そこで本研究ではすでに単離に成功し解析中の *Lhx3* 相同遺伝子をはじめとする、顎口類で知られる鼻プラコードおよび下垂体プラコードの領域形成、分化に必要な遺伝子群を網羅的に単離し、まず発現解析を行う。次にその誘導機構についても、すでに申請者が確立した(Sugahara et al., 2011)遺伝子経路の阻害系を使用し、顎口類との類似点、相違点を明らかにしたい。

(3) ヌタウナギの鼻下垂体プラコード(NHP)の観察

ヌタウナギ胚は、数を得るのが非常に困難なので、まず得られた胚で NHP の組織学的観察を行い、ヤツメウナギとの類似性を確認する。可能であれば、いくつかの遺伝子発現(*Lhx3*, *Eom* など)を観察することにより、ヤ

ツメウナギで得られた知見が円口類一般に保存されたものなのかを確認したい。

3. 研究の方法

スタウナギ胚は数に限りがあるので、研究は主にヤツメウナギを使用する。平成 23 年度はまず円口類カワヤツメ (*Lethenteron japonicum*) を 5, 6 月に北海道、および新潟県から入手し、人工授精を行い受精卵を得る。その胚を使用して、顎口類において知られる鼻、下垂体プラコードに発現する遺伝子群 (下垂体: *Lhx3*, *Pitx2*, 鼻: *Eom*, *Emx*, *Dlx*) の単離を試みる。得られた遺伝子を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションにより発現部位、発現ステージを特定する。これにより鼻下垂体プラコードが発生上いつ、どこで領域化され、さらにいつ鼻プラコード、下垂体プラコードへの分化が起こるのかを解明する。

スタウナギについては、今年度中に成体を確保し、維持、産卵させることを目標とする。スタウナギの発生は極めて遅いため、得られた胚の固定、観察は次年度に行わなければならない。

平成 24 年度は、ヤツメウナギにおいて前年度で得られた情報から、鼻下垂体プラコードが、発生の中の位置で、どの段階で特異化されるかが分かるはずである。顎口類の下垂体プラコードの誘導には、間脳視床下部から分泌されるヘッジホッグシグナル、および FGF シグナルが必須であることが分かっている (Scully et al., 2002)。よって、前年度の観察により推定した発生ステージにこれらのシグナリングカスケードを遮断することにより、下垂体プラコード誘導が阻害されるかどうかを確認する。研究代表者は既にヤツメウナギにおいてヘッジホッグシグナル、および FGF シグナルを阻害する実験系を確立している (Sugahara et al., 2011)。もし分化が阻害されたなら、円口類の鼻下垂体プラ

コードの下垂体側は、顎口類と類似した誘導機構を備えていることになり、もし阻害されないなら円口類の下垂体プラコードは顎口類と極めて異なる機構により発生していることが示唆されるだろう。

また、予定プラコード領域のどの領域から下垂体原基、鼻原基が形成されるかを追跡するため、蛍光色素 DiI インジェクションを行い、細胞の系譜解析を行う。さらに、鼻下垂体プラコードの後方、つまり将来腺性下垂体となる部分が 2 次的に後方に伸びて視床下部と接するのか (形態学的観察は Uchida et al., 2003)、それとも、顎口類と同様に、もともと視床下部に接していた外胚葉が腺性下垂体となるのか調べるために、細胞の系譜解析を行う。

鼻プラコードの誘導機構については顎口類においても非常に知見が乏しい。しかし、下垂体が最終的に間脳視床下部と一体となって発生するのと同様、嗅覚器官は終脳との関係性が非常に高い (ローマー, 1986)。申請者は以前に、ヤツメウナギの終脳腹側の発生機構が顎口類と大きく異なることを報告している (Sugahara et al., 2011)。よって本研究で終脳と鼻プラコードの発生機構、および位置関係を詳細に解析することにより、対鼻化に必要な発生メカニズムの変化を特定することを目標とする。

スタウナギについては、まず得られた胚で NHP の組織学的観察を行い、ヤツメウナギのそれとの発生を比較する。可能であれば、いくつかの遺伝子発現 (*Lhx3*, *Eom* など) を観察することにより、ヤツメウナギで得られた知見が円口類一般に保存されたものなのかを確認したい。

4. 研究成果

NHP は、形態学的、組織学的には単一の肥厚として発生するにもかかわらず、顎口類の

鼻プラコード、下垂体プラコードに相当する遺伝子発現が、プラコード肥厚前よりそれぞれ前後に分かれて観察されることが分かった。このことから、NHP は組織学的には単一のプラコードであるものの、分子発生的には異なる性質を発生初期から持つ可能性が示唆される。遺伝子機能阻害実験については、FGF シグナル阻害剤およびモルフォリノを使用した。現在表現型を解析中であるが、下垂体プラコードマーカーの発現が抑制されたことから、少なくとも下垂体プラコード誘導機構については、顎口類とヤツメウナギは共通のシステムを使用する可能性が高い。

また、鼻プラコードの予定運命について、ヤツメウナギ初期神経胚に蛍光色素 DiI をインジェクションし、どの領域の細胞が鼻下垂体プラコードを形成するのか解析した。また、ライブイメージングに向けて、蛍光タンパク質を受精卵に注入し、蛍光が胚で観察できることを確認し、今後の解析への土台ができた。ヌタウナギについては、8月に成体の入手に成功し、多数の産卵も観察された。現在胚発生中であり、今後はこの胚を用いて鼻下垂体プラコードの分子発生を解析する予定である。

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 1 件)

1. Sugahara, F., Murakami, Y., Adachi, N., Kuratani, S. Evolution of the regionalization and patterning of the vertebrate telencephalon: what can we learn from cyclostomes? *Curr. Opin. Genet. Dev.* in press (2013)

[学会発表] (計 2 件)

1. Fumiaki Sugahara, Shin-ichi Aota and

Shigeru Kuratani

Development of the Naso-Hypophyseal Placode (NHP) in Lamprey with special reference to the evolution of the vertebrate head structure. 2012/7/13 EuroEvoDevo meeting ポルトガル(リスボン)

2. 菅原文昭, 青田伸一, 倉谷滋

Development of the Naso-Hypophyseal Placode (NHP) in Lamprey with special reference to the evolution of the vertebrate head structure. 2012/5/31 日本発生学会年会 兵庫県神戸市

[その他]
ホームページ等; 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 文昭 (SUGAHARA FUMIAKI)

独立行政法人理化学研究所・形態進化研究グループ・研究員

研究者番号: 00611005

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし