

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570228

研究課題名(和文) 有袋類における頭部神経堤/顎原基のヘテロクロニ的発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Heterochronic development of cranial neural crest and jaw primordium in marsupials

研究代表者

若松 義雄 (WAKAMATSU, YOSHIO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60311560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類の中で有袋類は、有胎盤類と比べて未熟な状態で生まれ、保育嚢まで移動し、母乳で成長するために、前肢や顎等の器官が早く発生する。この発生様式の時間的変更メカニズムを明らかにするため、有袋類のオポッサムを用い、顎原基を形成する頭部神経堤細胞の発生について解析した。その結果、マウスやニワトリと比較して、Sox9遺伝子の頭部神経堤領域での発現が早くから始まり、かつ顎原基で継続することがわかった(Wakamatsu et al., 2014)。また、Sox9の神経堤エンハンサーに発見された有袋類特異的変異が、頭部神経堤でのSox9の早期の発現に重要であることが示めされた。

研究成果の概要(英文)：Because marsupial neonates are immature at birth, compared to those of placental mammals, they must travel into pouch and suckle on mother's milk to complete the rest of development. Thus, forelimbs and jaw elements develop early in marsupials. To understand this temporal shift of the developmental program in marsupials, we analyzed cranial neural crest development in opossum embryos. We found that the Sox9 expression in opossum cranial neural crest starts earlier and persists longer in the neural crest-derived mesenchyme of jaw primordium, compared to those in mouse or chicken (see Wakamatsu et al., 2014). We also found that a marsupial-specific mutation in the neural crest enhancer of Sox9 gene, is responsible for the early expression of Sox9 in the cranial neural crest of opossum embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：哺乳類 進化 有袋類 神経堤 顎 エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスやニワトリなどのモデル実験動物を用いた研究により、発生過程の遺伝的制御機構に関する研究が飛躍的に進んだ。一方で、種間の多様性がどのような遺伝子の変化によって実現されるのかは、ほとんど理解されていない。近年、様々な生物種のゲノム配列が決定されるようになり、生物種の多様性に遺伝子レベルでアプローチする環境が整いつつある。

発生プログラムの時間的な変更が形態の変化につながるという“ヘテロクロニー”という概念がある。例えば、カンガルーなどの有袋類においては、胎盤を持たないために胎児期に母体からの長期の栄養供給がおこなわれず、ヒトやマウスなどの有胎盤類と比較して相対的に未熟な状態で生まれる。しかし、母親の育児嚢に前肢を用いて這っていき、母乳を栄養として発育するために、有袋類の新生仔には、後肢が未発達でありながら前肢には筋肉や骨格、爪が発達するという発生段階の差異が生じ、また顎が発達して乳首をくわえることができる。このように、有袋類では一部の組織、器官が前倒しで発生するが、顎については、顎原基の元となる頭部神経堤細胞が非常に早く形成されることが知られていた。しかし、この頭部神経堤細胞が“早く”形成されることの背景にある遺伝的制御機構については、全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、有袋類の頭部神経堤細胞の発生制御機構が、有胎盤類を含む他の羊膜類とどのように違っているのかを明らかにし、ヘテロクロニックな発生プログラムの変更が脊椎動物の進化に与える影響を理解することを目的として、以下のような実験計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) これまでに神経堤細胞の発生に関与することが知られている遺伝子を、有袋類の一種であるハイロジネズミオポッサム（以下オポッサム）よりクローニングし、神経堤発生期のオポッサム胚での発現パターンを調べる。また、同様の発生段階のマウス、ニワトリ、ヤモリ胚についても調べ、比較をおこなう。

(2) (1)でオポッサム胚と他の羊膜類で頭部神経堤領域において顕著に発現パターンの異なる遺伝子が見つかった場合、動物間でゲノム配列を比較することによって、その遺伝子の発現を制御するゲノム領域を推定し、オポッサム胚の頭部神経堤での発現を制御す

る可能性のある DNA 配列を探索する。

(3) オポッサム胚で遺伝子機能を解析する技術は全く無い。そこで、取り出した胚を培養し、そこに電気穿孔法によって遺伝子導入する実験系の確立を目指す。

(4) (2)で同定された配列の活性を調べるために、緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現によって活性を可視化できるレポーター遺伝子を作成し、その活性を解析する。もし(3)でオポッサム胚を用いて活性を解析できる実験系ができた場合にはそれを利用し、もし出来ていない場合には、ニワトリ胚を用いた実験系で解析をおこなう。

4. 研究成果

(1) オポッサム胚において、神経堤形成に重要な働きをしていることが知られている Sox9 遺伝子が、マウス胚、ニワトリ胚よりも早い発生ステージで予定頭部神経堤領域に発現していることがわかった。また、オポッサム胚においては頭部神経堤細胞が顎原基を作る段階になっても Sox9 の発現が維持されており、神経堤形成とともに Sox9 の発現が消失するマウス、ニワトリ、ヤモリとは異なっていた。したがって、オポッサムにおける頭部神経堤のヘテロクロニックな発生様式の進化には、Sox9 遺伝子の発現時期の変更が関わっている可能性が示唆された（図1、引用文献）。

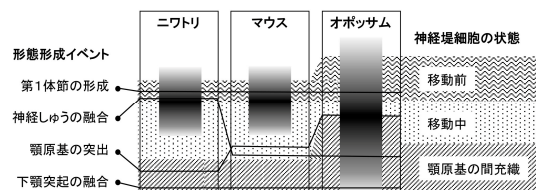


図1：生物種間における形態形成、神経堤細胞の発生状態と Sox9 遺伝子の頭部神経堤細胞での発現時期の比較。

(2) マウスにおいては、Sox9 遺伝子を頭部神経堤細胞で発現させるために働くエンハンサー配列が知られていた（引用文献）。そこで、マウスを含む有胎盤類、ワラビーやタスマニアデビル、オポッサムといった有袋類、そして単孔類のカモノハシについて、このエンハンサー領域の塩基配列を比較したところ、有袋類でのみ高度に保存された配列が見つかった（図2）。そこで、マウス Sox9 遺伝子の頭部神経堤エンハンサーに GFP を連結したレポーター遺伝子と、そのレポーター遺伝子の配列の一部を有袋類型に変更した変異型レポーター遺伝子を作成した。これらのレポーターをニワトリ胚に導入したところ、マウス型のレポーターを用いた場合には形成された頭部神経堤細胞で GFP の発現が検出されたのに対し、有袋類型変異を持つレポーターでは内在性の Sox9 がまだ発現していない

ような非常に早い時期に予定神経堤領域に検出された。これらのことから、有袋類に特徴的な Sox9 遺伝子の発現パターンを実現するために必要なゲノム配列を同定できたと考えられた。

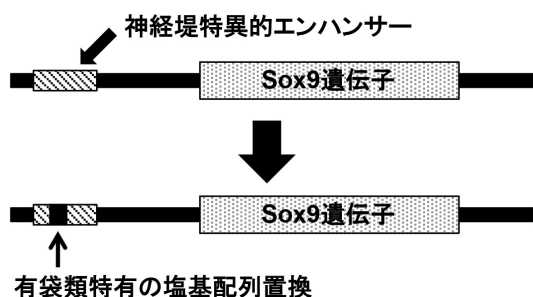


図2：羊膜類の共通祖先の Sox9 遺伝子（上）にあったであろう神経堤特異的エンハンサー配列に、有袋類の進化過程で塩基置換がおき（下）これにより Sox9 遺伝子の発現時期が早くなったと考えられる。

(3) 培養温度、培養液やその添加物、酸素分圧などのパラメーターを変更しながらオポッサムの初期胚の全胚培養実験をおこない、至適条件の探索をおこなった。現在までに遺伝子導入実験まで進められるような十分な結果は得られていないが、比較的低い培養温度（35℃）と非常に高い酸素分圧（95% O₂）が一定の効果を持つことがわかった。

これらの研究成果により、有袋類の頭部神経堤と顎原基のヘテロクロニ的発生について、分子的、遺伝的メカニズムの一端が明らかになった。一方、オポッサム胚の培養・遺伝子導入実験系の開発は道半ばであり、有袋類の発生研究のためには今後の改善が必須である。

<引用文献>

Wakamatsu Y, Nomura T, Osumi N, Suzuki K. Comparative gene expression analyses reveal heterochrony for Sox9 expression in the cranial neural crest during marsupial development. *Evolution and Development* 16, 197-206, 2014.
 Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Gunther T, Schule R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. *Developmental Biology* 291, 382-397, 2006.

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 4 件)

- (1) Wakamatsu Y, Nomura T, Osumi N, Suzuki K. Comparative gene expression analyses reveal heterochrony for Sox9 expression in the cranial neural crest during marsupial development. *Evolution and Development* 16, 197-206, 2014. DOI: 10.1111/ede.12083 (査読有り)
- (2) Hatakeyama J, Wakamatsu Y, Nagafuchi A, Kageyama R, Shigemoto R, Shimamura K. Cadherin based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development* 141, 1671-1682, 2014. DOI: 10.1242/dev.102988 (査読有り)
- (3) Okada H, Suemitsu M, Kanno T, Tamamura R, Nakada H, Sasaki Y, Kaneda T, Endoh M, Wakamatsu Y, Suzuki K. Histological Features of the Submandibular Glands in the Gray Short-Tailed Opossums (*Monodelphis domestica*). *Journal of Hard Tissue Biology*. 23, 357-362, 2013. (査読有り)
- (4) Okada H, Suemitsu M, Kanno T, Tamamura R, Kuyama K, Murakami H, Kato T, Wakamatsu Y, Suzuki K. Morphological Features of the Posterior Lingual Glands in the Gray Short-Tailed Opossums (*Monodelphis domestica*). *Journal of Hard Tissue Biology*. 22, 489-492, 2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 若松義雄. 「有袋類の頭部形成におけるヘテロクロニ的発生機構解明の試み」 4th Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2014年7月12日、東京慈恵医科大学付属病院、東京
- (2) Shida H, Kawae T, Osumi N, Miyata T, Wakamatsu Y. Delta-1-expressing otic precursor cells migrate within the preplacodal epithelium to form the otic placode during avian embryonic development. 日本発生生物学学会年会第47回大会、2014年5月28日、ウインクあいち、名古屋
- (3) Wakamatsu Y, Osumi N, Shida H. Involvement of Notch-mediated lateral inhibition and subsequent planar cell migration of Delta01

expressing cells in avian otic placode formation. "17th International Congress of Developmental Biology" 2013年6月19日、カンクン(メキシコ)

- (4) Wakamatsu Y, Nomura T, Osumi N, Suzuki K. Molecular mechanisms regulating heterochronic development of marsupial cranial neural crest. 日本発生生物学会年会第46回大会、2013年5月30日、くにびきメッセ、松江
- (5) Shida H, Osumi N, Wakamatsu Y. Involvement of Notch-mediated lateral inhibition and subsequent planar cell migration of Delta1-expressing cells in avian otic placode formation. "Chick7, The 7th International Chick Meeting" 2012年11月16日、野依記念学術交流館、名古屋
- (6) Shida H, Osumi N, Wakamatsu Y. Comparative gene expression analysis of heterochronic development of marsupial cranial neural crest. 日本発生生物学会年会第45回大会、第64回日本細胞生物学会年会合同大会、2012年5月30日、神戸国際会議場、神戸

〔図書〕(計 1件)

- (1) 若松義雄. 化学同人「ニューロンの誕生・分化・回路形成」末梢神経の発生、神経堤とプラコード、2013、pp. 157-169

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 義雄 (WAKAMATSU YOSHIO)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60311560

(2) 研究分担者

鈴木 久仁博 (SUZUKI KUNIHIRO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：30256903

(3) 連携研究者

()

研究者番号：