

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590233

研究課題名(和文)脊椎動物頸部の比較解剖学的、比較発生学的解析

研究課題名(英文)Comparative embryological analysis on the vertebrate neck

研究代表者

長島 寛(Nagashima, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40435665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類や鳥類では舌に関わる筋と四肢の筋が特殊な発生様式でできてくる。メダカでは、舌に相当する筋と胸鰭の筋は隣り合っており、この特殊な発生様式で作られていることが分かった。さらに、メダカではこれらの筋が同じ素材からできていた。ヒレを持たない原始的な脊椎動物であるヤツメウナギでは、舌に相当する筋の作り方は他の動物と同じであった。よって、胸鰭(前肢)の筋は舌の筋を転用することで進化した可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In avians and mammals, muscles related to tongue and limbs develop through a specialized developmental mechanism. In medaka, teleost fish, these muscles were adjacent, developed by using the developmental machinery, and had the same developmental source. In lamprey, the muscle homologous to the tongue muscle in amniotes represented the similar developmental mechanism. Thus, tongue muscle appears to have co-opted to evolve the pectoral fin muscle.

研究分野：comparative embryology

キーワード：evolution development

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の体は頭部と体幹からできており、これらはそれぞれ異なった発生学的、解剖学的、文脈で作られている。すなわち頭部では腹側で複数の咽頭弓が分節リズムを刻み、頭部神経堤細胞が結合組織を作り、その中に頭部神経堤細胞由来の鰓弓骨格(顎の骨、舌骨など)があって、それを頭部中胚葉由来の筋がつないでいる。これら鰓弓筋は特殊臓性運動ニューロンによって支配されている。一方、体幹ではその背側で体節が分節リズムを刻み、結合組織は中胚葉に由来し、この中にまた中胚葉由来の骨格と筋があり、この筋は体性運動ニューロンによって支配されている。そしてこれら頭部と体幹の間にあるのが頸部である。頸部にあって頭部と体幹を結ぶのが僧帽筋群と舌筋群である。僧帽筋群は近年、その筋原基のほとんどが頭部に属することが示唆されたため、本研究はこれらのうち舌筋群の発生に着目した。羊膜類の舌筋群はその頭側端は舌として頭部に位置し、さらに尾側端は肩帯にまで伸びている。このように頭部と体幹の両方に位置しながら、その神経支配は脊髄の体性運動ニューロンによって行われている解剖学的には純粋に体幹に属する筋群である。

ところで、羊膜類の筋は二通りの発生様式によって作られる。すなわち、肋間筋のように上皮性の皮筋節が伸長しながら筋分化を行い、分節的な筋を作るタイプと、舌筋群、四肢筋のように皮筋節から脱上皮化した細胞が移動し、移動先で筋分化して作られる筋である(MMP様式)。原始的な脊椎動物であるヤツメウナギには舌筋群に相当する筋(鰓下筋)はあるが、対鰓自体がない。そしてこのヤツメウナギの鰓下筋はMMP型の遺伝子発現パターンを示すことが知られている(Kusakabe et al., 2011)。分節的な筋のパターンはナメクジウオにも見られるから、MMP様の発生メカニズムは、ヤツメウナギの鰓下筋に生じた新しい発生機構であると推察されている(Kusakabe and Kuratani, 2005)。しかしこれまで鰓下筋と鰓筋の関係性について着目した研究はない。

2. 研究の目的

メダカの鰓下筋と胸鰭筋の発生を観察し、これらの共通性を明らかにする。同時に、ヤツメウナギ、トラザメの筋発生を観察し、メダカや羊膜類のそれと比較を行い、胸鰭筋、鰓下筋発生プログラムの進化的変遷を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)メダカの鰓下筋、胸鰭筋の発生様式を確かめる。

鰓下筋の同定は舌下神経の支配に基づいて行った。MMP様の筋発生と、肋間筋型の筋発生では関わる遺伝子も異なることが知られている。すなわち羊膜類のMMP型筋発生

では、移動中の筋前駆細胞が*Lbx*, *Pax3*を発現し、移動後に筋分化を開始するために*Myf5*などの筋分化調節因子を発現する。一方で、肋間筋タイプの筋発生では、筋分化調節因子が早期から発現しているのが特徴である。メダカの鰓下筋、胸鰭筋がこのどちらの様式でできるのかを確かめるため、発生に伴って発現する遺伝子パターンの解析を行った。またこれらの発生様式では細胞の組織構造が異なるので、組織形態の観察を行った。他に、鰓下筋、胸鰭筋がどの体節に由来するのかを確かめるため、GFPを全身で発現するGFPメダカの体節を、白メダカに移植、孵卵して、GFP細胞の挙動を観察した。

(2)ヤツメウナギの鰓下筋の発生様式を確かめる。

ヤツメウナギの鰓下筋原基の組織構造を確かめるため、透過型電子顕微鏡観察、細胞極性分子の局在を免疫組織化学染色で確かめた。

(3)トラザメの鰓下筋、胸鰭筋の発生様式を確かめる。

トラザメの鰓下筋、胸鰭筋の発生様式を確かめるため、遺伝子発現と組織構造を他の動物のものと同様に確かめた。

4. 研究成果

(1)メダカの鰓下筋、胸鰭筋の発生様式。ホールマウント免疫染色法によって末梢神経の発生を観察したところ、Iwamatsuステージ34(Iステージ; Iwamatsu, 2004)で腕神経叢と舌下神経が作られた。前者は第一から第四脊髄神経からなり、後者は第一脊髄神経のみからなっていた。従って腕神経叢と舌下神経は第一脊髄神経を共通根としていた。これはMa et al. (2010)の結果と同様であり、脊椎動物の原始的パターンであると考えられている。

メダカの胸鰭筋原基はIステージ25から、鰓下筋原基はIステージ29からMMP型の筋発生に特徴的な*Lbx*, *Pax3*の発現として観察された。一方、これらのステージでは*Myf5*は発現せず、Iステージ32で発現が見られた。この発現パターンは、これらの筋がMMP型の発生機構で作られることを示唆していた。

GFPキメラメダカ作成の結果、鰓下筋と胸鰭筋は、一部で同じ体節から作られていた。また、移動中のGFP+細胞を観察したところ、これらは上皮性ではなく、バラバラな間葉性の細胞であった。

以上からメダカの鰓下筋と胸鰭筋は遺伝子発現パターン、組織形態ともにMMP型の発生様式を示していた。またそれらのポピュレーションの一部は発生起源を共有しており、筋の神経支配も重なっていることが分かった。

(2)ヤツメウナギの鰓下筋は移動性の間葉

細胞から作られる。
ヤツメウナギの移動中の鰓下筋原基は密に凝集した細胞塊からなっていた。しかし基底膜、細胞接着分子は見つからなかった。よってこれらの細胞は間葉として移動していると考えられた。

(3) トラザメの鰓下筋、胸鰭筋は改変型肋間筋様式で発生する。

サメの鰓下筋、胸鰭筋の神経支配は四足動物以外の顎口類のものとは異なり、舌下神経と腕神経叢が分離しているとされていたが (Ma et al., 2010) トラザメではこれらは神経根を共有しており、上記の原始的パターンであった。

鰓下筋は咽頭弓の後縁を回り込む分節状の細胞集団から作られた。それぞれの集団の横断面は腔所を伴った管状であった。ここでは *Lbx*, *Pax3* の他に *Myf5* も発現していた。基底膜は観察されなかったが、細胞接着分子、細胞極性が見られた。

胸鰭筋は、個々の皮筋節から外側へとくびれ切れる上皮様の細胞集団からできていた。これは以前の報告 (Neyt et al., 2000) すなわち、胸鰭筋が皮筋節の単純な伸長だということと異なっていた。鰓下筋同様に、*Lbx*, *Pax3* の他に *Myf5* の発現も見られ、基底膜は観察されなかったが、細胞接着分子、細胞極性があった。

よって、トラザメの鰓下筋、胸鰭筋は基本的には上皮性の細胞集団からでき、その点では MMP 様式ではないが、*Lbx* の発現、皮筋節との関係から純粋な肋間筋様式とも異なることが分かった。

(4) 胸鰭筋の進化について

Neyt et al. (2000) によれば、サメの胸鰭筋は皮筋節の伸長として形成され、これが鰭筋 (四肢筋) の原始的な発生様式であるされてきた (Haines and Currie, 2001; Cole et al., 2007, 2011)。本研究から、サメの鰭筋は単純な皮筋節の伸長ではないことは明らかである。むしろ鰓下筋がヤツメウナギ、メダカ、羊膜類では MMP 様式で作られているのに対して、サメでは MMP 様式ではない方法で作られていることから、サメの鰓下筋発生メカニズムは二次的に変化したものである可能性が高い。従って、サメの胸鰭筋もまた、原始的な発生過程を表しているというよりも、板鰓類に特異的な二次的表現形であると推察される。むしろ、メダカにおける鰓下筋と胸鰭筋の由来、神経支配の共有、共通の発生機構を考えると、鰓下筋が MMP として進化し (ヤツメウナギ) その後、鰓下筋の発生プログラムの二次的転用として胸鰭筋が進化した可能性があると考えられた。

<引用文献>

Kusakabe R, Kuraku S, Kuratani S,

Expression and interaction of muscle-related genes in the lamprey imply the evolutionary scenario for vertebrate skeletal muscle, in association with the acquisition of the neck and fins. *Dev Biol*, 350, 2011, 217-227

Iwamatsu T, Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*., *Mech Dev*, 2004, 121, 605-618

Ma LH, Gilland E, Bass AH, Baker R, Ancestry of motor innervation to pectoral fin and forelimb. *Nat Commun*, 2010, doi: 10.1038/ncomms1045.

Neyt C, Jagla K, Thisse C, Thisse B, Haines L, Currie PD, Evolutionary origins of vertebrate appendicular muscle. *Nature*, 2000, 408, 82-86

Haines L1, Currie PD, Morphogenesis and evolution of vertebrate appendicular muscle. *J Anat*, 2001, 199, 205-209

Cole NJ1, Currie PD, Insights from sharks: evolutionary and developmental models of fin development. *Dev Dyn*, 2007, 236, 2421-2431

Cole NJ1, Hall TE, Don EK, Berger S, Boisvert CA, Neyt C, Ericsson R, Joss J, Gurevich DB, Currie PD, Development and evolution of the muscles of the pelvic fin. *PLoS Biol*. 2011, 9, e1001168

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Hiroshi Nagashima, Fumiaki Sugahara, Masahiro Shibata, Daisuke Koga, Satoru Kusumi, Akina Chiba, Tatsuo Ushiki, Noboru Sato

“Evolution of the pectoral fin/limb and the vertebrate neck”

第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2015 年 3 月 22 日

神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

長島 寛, 柴田 昌宏, 佐藤 昇

「頸部についての比較発生学的研究」

第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2014 年 3 月 28 日

自治医科大学 (栃木県下野市)

長島 寛, 柴田 昌宏, 佐藤 昇

「脊椎動物頸部の比較発生学的解析」

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2013 年 3 月 29 日

サンポートホール高松・かがわ国際会議場

(香川県高松市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/an1/welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長島 寛 (NAGASHIMA, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40435665

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし