

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650073

研究課題名(和文)鳥類多様性進化の発生研究基盤：ペンギンの水中飛翔を可能にする発生メカニズム

研究課題名(英文)Embryological basis of diversification of avian morphology: developmental mechanism that enables the penguin to fly in the water

研究代表者

田村 宏治 (TAMURA, Koji)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70261550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペンギンの胚発生研究を可能とする実験基盤を構築した。ペンギン卵を胚操作できる状況を各種許可申請を得るなど制度的にも実質的にも作り出した上で、細胞系譜追跡実験など胚操作実験を行った。その結果、ペンギン前肢の第1指形成不全が発生段階27以降に生じること、この過程で細胞増殖の低下が見られること、過剰な**bmp4**遺伝子の発現が見られること、などが明らかとなった。風切羽形態の特殊性を明らかにするために、ニワトリ胚における風切羽発生について詳細な記述を行った。本研究計画によって、世界で唯一かつ初めての試みとしてペンギン胚の発生研究モデル化の基盤が構築できた。

研究成果の概要(英文)：We established experimental basis of penguin embryology. The basis enabled us to transfer penguin eggs from an aquarium in Tokyo to our laboratory in Sendai, incubate eggs, and manipulate penguin embryos. We found that developmental defects of the first digit in the penguin forelimb (wing) start at stage 27 and that decrease of cell proliferation and ectopic expression of **bmp4** can be seen during the process. We also described developmental process of flight feather formation in the chick and penguin embryos. We are now preparing some manuscripts for publishing the data on penguin wing development. Thanks to this project, a model system of penguin embryology was successfully established for the first time in the world.

研究分野：発生生物学

キーワード：多様性進化 鳥類 ペンギン 前肢 共有派生形質 形態形成

1. 研究開始当初の背景

10000種を超える現存鳥類は類似した形態をもっており、どの鳥を見ても一目で鳥とわかる。飛翔のために特殊化した前肢(翼)と羽毛、あるいはクチバンなど鳥類に固有の形態が鳥類を特徴づけるからである。鳥類と恐竜類の直接的な系統関係(Tamura et al., 2011, Science)から考えると、鳥類における保存形態の成立は、単なる鳥類学研究の範疇にとどまらず恐竜学に展開する大きな命題である。

鳥類の中にも、極めて特殊化・多様化した形態をもつ動物種がいる。ダーウィンフィンチの研究に象徴されるとおり、保存形態を有しながら多様化する鳥類の特殊性は進化学における多様性形成研究の格好のモデルである。このような特殊化した形態と鳥類に保存された形態の比較研究は数が少ないのが現状で、その原因の一つはニワトリのようなモデル動物以外に、特殊形態を持った鳥類のモデル動物が存在しないことにある。

鳥類の中でも、とくに形態が特殊化した動物群にペンギンがいる(図1)。ペンギンは他の多くの水鳥とは異なり、前肢を羽ばたかせて潜水し水中を飛翔することが可能である。小翼羽・風切羽を喪失させ手首関節を固定すると同時に、扁平化し骨密度をあげて重くした骨格をもつなど、潜水と水中飛翔を可能にする特殊化を果たしている。きわめて特徴的な形態をもった特殊な動物種の胚を実験動物として利用できるようになれば、さまざまな研究応用が期待できる。



図1. フンボルトペンギンとその骨格

(説明)(左)ペンギンの外観には、立ち姿であること、風切羽が無いこと、などの特徴がある。(右)ペンギンの骨格には、親指が無い、四肢骨が扁平、中足骨が短い、など、特殊な形態が数多く見られる。

2. 研究の目的

本研究ではこのような興味深いペンギンの特徴をモデル系に、ペンギン胚と比較のためのニワトリ胚を用いて、極めて保存性の高い共有派生形質(ある動物群全体に共通かつ

その動物群にしかない特徴)の変形を引き起こす発生メカニズムを明らかにする。ダーウィンも注目した特殊形態をもつ本動物の多様性形成メカニズムの理解は、単なるペンギン研究では全くなく、恒温有羊膜類における発生進化学の重要なモデルケースとしての意義が高い。本研究はその研究基盤を確立させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ペンギン胚の発生段階表の作成

ペンギン卵の確保とペンギン胚の獲得のシステムを構築し、ペンギン胚の発生段階表を作る。

(2) ペンギン胚肢芽の形態変化および骨組織の形態学的・組織学的データ分析

水中飛翔に関係すると考えられる、ペンギンに特徴的ないくつかの形質が、発生過程のいつ形成されるかを詳細に解析する。

(3) ペンギンの特徴を生み出す発生メカニズム解析

ペンギンの特徴を生み出すメカニズムをとくに細胞レベルでの解析を中心に行う。

4. 研究成果

(1) ペンギン胚の発生段階表の作成

2年間をかけて、葛西臨海水族園の多大な協力のもと、ペンギン胚を東北大学(申請者の研究室)で取り扱うための基盤を構築した。譲渡手続きのための申請(水族園、大学、環境省) 実際の輸送方法(保温、振動回避、などの条件検討)ふ卵方法(至適温度、湿度など) など実験基盤を構築し、年間数十個のペンギン卵を東北大学に移送し、研究を行える環境が整った。とくに、世界で初めて生きたペンギン卵に施術を行うことに成功し(滅菌条件などいくつかの条件をクリアした) モデル動物としての実験操作が可能となったことは、本研究課題における最大の研究成果といえる。

これを基盤としてさまざまな研究を行っていった。まず、本研究遂行以前に予備実験として写真撮影してあったペンギン胚の発生段階(図2、次ページ)が正しいものであることを確認できた。さらに、初期胚・後期胚の発生段階など、発生段階表を完成させることができた。また、ふ卵温度と発生進行との関係なども考察できるようになった。とくに、四肢発生に関する詳細な発生段階表を、軟骨分化の指標となる aggrecan 遺伝子発現、軟骨パターンおよび骨染色、肢芽外観のニワトリ胚との比較、などを行うことにより、ニワトリ胚の標準発生段階表である Hamburger and Hamilton の発生段階表と比較できるまでに作り上げた。

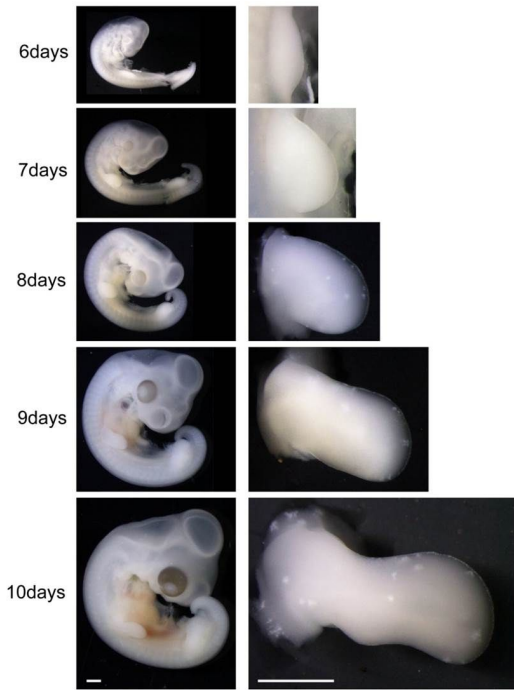


図2. フンボルトペンギン発生段階(抜粋)
(説明)本研究開始時には、いくつかのペンギン胚をすでに得ており、発生段階をいくつかの胚において記録してあった。本研究でその発生期間についてより正確な記載が可能となった。

(2) ペンギン胚肢芽の形態変化および骨組織の形態学的・組織学的データ分析

ペンギン胚を用いて、その後期発生過程において骨組織の発生様式の特徴をとくに四肢骨(指骨)について解析した。

ペンギンではいくつかの四肢骨格要素が癒合する傾向にあるが、前肢(翼)の第一指(親指)が第二指(人差し指)の中手骨(掌の骨)と癒合する様子を観察することに成功した(図3)。

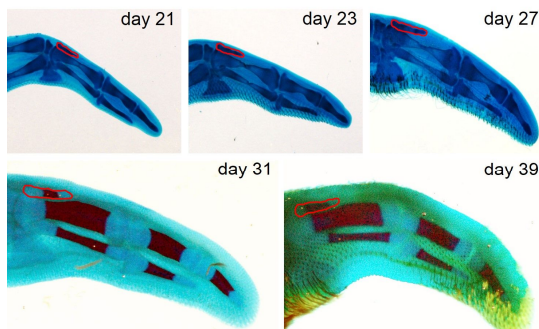


図3. ペンギン胚前肢第一指の形成と癒合
(説明)青色は軟骨、赤色は硬骨。赤で囲んである部分が、前肢の第一指。発生が進むにつれて、隣接した第二指の中手骨に癒合していく様子がわかる。

これにより、骨格標本上では第一指が欠失したように見えるが、実際にはこれは単純な欠失によるものではなく発生後期における骨の癒合によるものであることが明らかになった。

(3) ペンギンの特徴を生み出す発生メカニズム解析

第一指の矮小化

図3にも表れるペンギン前肢形態の特徴は、発生初期段階における第一指の矮小化に起因することを予想し、それに関わる発生メカニズムの同定と解析を進めた。

いくつかの遺伝子マーカーの発現解析を行い、その中で *fgf8* 遺伝子発現によって表される特殊な上皮肥厚構造(AER)の発生不全(退縮)がペンギン胚においてみられることを突き止めた(図4)。ペンギン骨格の特徴の一つは、発生過程のある時期に起こる形態形成メカニズムの変形(遺伝子発現の変化による発生メカニズムの時空間的変更)によるものと推測される。

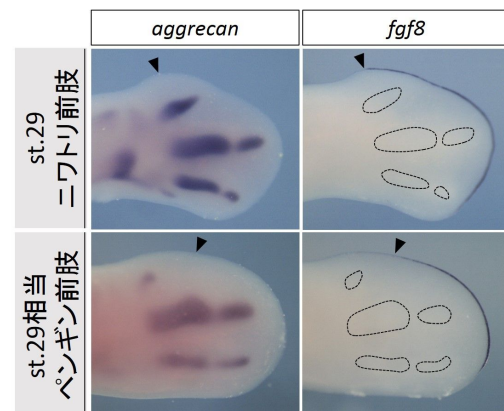


図4. ペンギン胚前肢における *fgf8* 発現の退縮傾向(図中の 印)

(説明) *aggrecan* の発現を見ると、この発生段階ですでに第一指がきわめて矮小化していることがわかる。さらに、*fgf8* の発現はニワトリでは第一指を覆うように分布するが、ペンギン胚では第一指原基は *fgf8* 発現領域の外にあることがわかる。

さらにその退縮傾向がより早い発生段階28ですでにみられることも見出した(図5)。ただし、それ以上早い発生段階では、ニワトリ胚とペンギン胚における明瞭な相違は観察されなかった。これは、ペンギン胚に対して行った細胞系譜追跡実験(データは示していない)においても確認され、ペンギンに特徴的な第一指の矮小化の形質は、発生段階28以降に可視化されるイベントとして形成される可能性が強く示唆された。

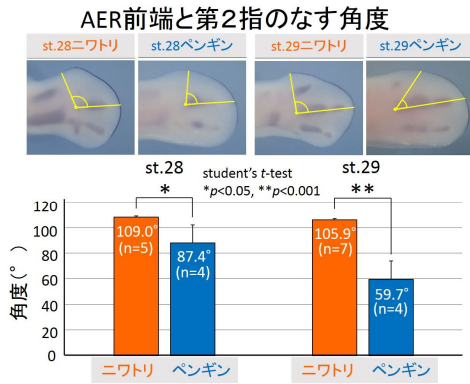


図5. st.28 からペンギン前肢では AER 前端が過剰に退縮している (説明) 第二指と fgf8 発現前端のなす角度を計測すると、ニワトリ胚に比べペンギン胚では顕著に角度が小さい。その傾向は、発生段階 28 ですでに明瞭である。

これらの結果は、発生段階 28 以前にすでにペンギンに特徴的な形態 (形質) を生み出す形態形成メカニズムの変更が起きている可能性を示唆するものである。

そこでさらに解析を進め、発生段階 27 において発現がニワトリとペンギンで異なる遺伝子を探索した。その結果、bmp7 遺伝子がペンギン胚前肢芽前方で異所的かつ過剰に発現していることを見出した (図6)。Bmp 遺伝子は指形成 (とくに第一指) に対して抑制的な働きを持つことが知られており、この時期にペンギン胚前肢において bmp7 遺伝子が過剰かつ異所的に発現することにより、細胞増殖が抑制され (結果は示していない) 結果的に指の矮小化が引き起こされる可能性が考えられる。

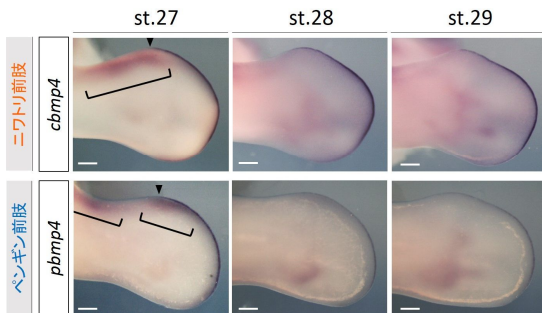


図6. 前肢における bmp4 の発現 (説明)st.27 ペンギン前肢の前側で bmp4 の発現領域が拡大している (図中のカッコ部分) のがわかる。

今後は、今回の研究から得られた結果をもとに作成した鳥類の進化過程におけるペンギン系統の指消失機構の推定 (図7) に基づき、他の鳥類における指形成過程を解析することによってより詳細な推定や正しい推論を目指していきたい。現在、(ペンギンとは直接には離れるが) ジュウシマツ (キンカチヨウ) 胚を用いてペンギンと同様の解析を行っており、図7の推定の検証を行っている。

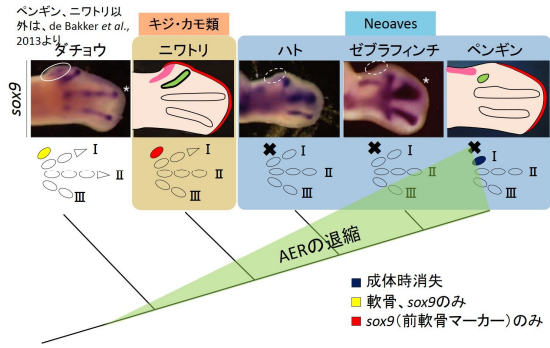


図7. 鳥類における自脚部前側の進化の推定 (説明) 2013年にNatureに発表された論文 (de Bakker et al.) によると、鳥類は進化の変遷過程で前肢前側の構造を矮小化する傾向にある。ペンギンは二次的に第一指を無くすメカニズムを獲得したのではなく、鳥類が持つ矮小化傾向を強く発揮したに過ぎないかもしれない。

風切羽形成

ペンギンは (見かけ上) 風切羽を持たないという特徴を持つ。このペンギン特有の特徴の形成メカニズムを解明することを目的としているが、そもそも風切羽形態の特徴の形成メカニズムや発生過程そのものが不明である。そこで本研究ではペンギン胚と比較するためにニワトリ胚における風切羽発生機構について調べた。

本研究以前には古くから、風切羽の特徴は幼鳥 (ひな、ひよこ) から成鳥に成長する過程で行われる換羽 (羽毛の生え代わり) によってもたらされると考えられてきた。しかし本研究におけるニワトリ胚後期発生過程および孵化後のヒヨコにおける、組織学的解析、遺伝子発現解析から、鳥類において風切羽は孵化前の発生期から形成されていること、換羽前の羽毛もすでに風切羽形成領域では (骨に到達するまで陥入するなど) 特徴的な形態形成が行われていること、などを見出した (図8)。ペンギンでは風切羽領域における羽毛形成がニワトリなど他の鳥類に比べて遅い時期にはじまる可能性があり、興味深い。

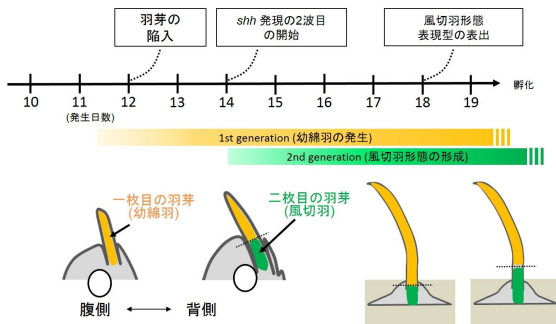


図8. 風切羽発生の概要

(説明) 詳細なデータは割愛するが本研究から得られた結果から風切羽の発生過程をまとめるとこの図のようになり、胚発生過程において風切羽の特徴が形成されることが明確になった。

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 5 件)

Seki, Kitajima, Matsubara, Suzuki, Saito, Yokoyama, and Tamura (2015) AP-2 is a transcriptional regulator for determination of digit length in tetrapods. *Developmental Biology*, 査読あり、407, 75-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.006

Hayashi, Kobayashi, Yano, Kamiyama, Egawa, Seki, Takizawa, Okabe, Yokoyama, and Tamura (2015) Evidence for an amphibian sixth digit. *Zoological Letters*, 査読あり、1, 17. doi: 10.1186/s40851-015-0019-y

Wakasa, Cádiz, Echenique-Díaz, Iwasaki, Kamiyama, Nishimura, Yokoyama, Tamura, and Kawata (2015) Developmental stages for the divergence of relative limb length between a twig and a trunk-ground Anolis lizard species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 査読あり、324, 410-423. doi: 10.1002/jez.b.22627

Egawa, Miura, Yokoyama, Endo, and Tamura (2014) Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration. *Development, Growth and Differentiation*, 査読あり、56, 410-424. doi: 10.1111/dgd.12136

Nomura, Yokoyama, and Tamura (2014) Altered developmental events in the anterior region of the chick forelimb give rise to avian-specific digit loss. *Developmental Dynamics*, 査読あり、243, 741-752. doi: 10.1002/dvdy.24117

〔学会発表〕(計 5 件)

田村宏治、関亮平、北嶋慶一、植本俊明、佐藤智彦、近藤真央、阿部玄武、城石俊彦、Cai Li、入江直樹、Guojie Zhang、Developmental and genomic aspects of macroevolution in vertebrates, Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform 2016年3月29日、台北(台湾)

佐藤智彦、阿部玄武、山本達也、田村宏治、ペンギン前肢における第1指形成不全機構、日本動物学会第86回大会、2015年9月17日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

近藤真央、松原遼、関亮平、阿部玄武、田村宏治、風切羽に特異的な発生プロセス、日本動物学会第86回大会、2015年9月17日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

田村宏治、鳥類を特徴づける形態と発生機構とゲノム配列、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜

(神奈川県横浜市)

田村宏治、鳥は本当に恐竜なのか!? - 動物学の威力と魅力 -、日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月13日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

〔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.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 宏治 (TAMURA, KOJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：70261550