

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02416

研究課題名(和文)脊椎動物に頸部筋が出来るまで：筋・骨格・神経系のパターンから

研究課題名(英文) Before and after the neck: to understand the vertebrate body elaboration from the perspective of muscle, skeleton, and nerve development

研究代表者

倉谷 滋 (Shigeru, Kuratani)

国立研究開発法人理化学研究所・倉谷形態進化研究室・主任研究員

研究者番号：00178089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物は頭部中胚葉の存在で特徴付けられる。体節のみからなるナメクジウオを用いた研究から、頭部中胚葉の出現が初期中胚葉の脊椎動物特異的な移動に起因し、移動を抑えるとナメクジウオの中胚葉を一部模写できることを示した。

鰓下筋研究では、主として円口類を比較検索の対象とした。結果、顎口類では囲心腔と咽頭の相対的位置関係が変化したために、顎口類鰓下筋がより内側に発生すると推測された。現在進行中の鰓下筋研究では、軟骨魚類における検索から、二つのLbx遺伝子が排他的なパターンで発現し、顎口類を特徴付ける前方と後方の鰓下筋がそれぞれ異なる制御を受けることを発見している。

研究成果の概要(英文)：vertebrate can be characterized by the possession of head mesoderm. Through the study using amphioxus, an animal with no head mesoderm, we found that the head mesoderm was obtained by topographical shift of early mesoderm, and by suppression of this shift, we showed that amphioxus-like mesoderm could be partially phenocopied in vertebrate embryos.

Cyclostomes were employed for the study of hypobranchial muscle (HBM) development. Through comparative embryological observation and cell lineage analyses, we found that the deep position of the gnathostome HBM arose as the result of the shift of relative positions between the pharynx and pericardium. In the ongoing study using elasmobranch (shark) embryos, we have so far found that two paralogues of Lbx genes are differentially expressed in the anterior and posterior portions of the HBM primordia. Of those, cyclostome HBM resemble more the posterior. We suspect gene duplication behind the novel patterns of muscle.

研究分野：進化発生学

キーワード：脊椎動物 頭頸部 発生 進化 中胚葉 体節 体壁 ナメクジウオ

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の複雑で精妙な形態も、間違いなく祖先的動物の単純な分節パターンから始まっている。この進化的elaborationを理解するためには、大規模な比較発生学的検索が必要であると同時に、可能な限りの実験的実証が必要となる。なかでも、円口類と現生顎口類において最も異なる鰓下筋系(頭頸部の移動性筋 - MMP 筋)の獲得は脊椎動物の進化史において、もっとも含蓄に富んだ現象であり、筋骨格系の形態進化において最も重要な発生機構的進化の理解の鍵が、これら筋の発生機構と、それが発生する頭部・体幹境界に潜んでいると考えた。

### 2. 研究の目的

脊椎動物体の各部には、独特の形態と機能を持った多種多様な筋や骨格がある。発生過程や化石から分かるように、これらは少数の基本パーツが二次的に変形したものに過ぎない。本研究では、脊椎動物が進化した足跡を明瞭に示す、頭部・体幹境界にできる筋の進化の機構的解明を目指し、これを通じ、脊椎動物の解剖学的構築の多様性を理解する。その内容は以下の通り: 1) 中胚葉特異化としてみた鰓弓筋、体幹筋の進化的成立(鰓弓筋と体幹の骨格筋がなぜ異なるのかが焦点); 2) 鰓弓系と二次心臓領域からなる胚環境の進化と鰓下筋系の成立(四肢筋や鰓下筋など、二次的な胚環境との相互作用の変化を通じて成立した筋の起源に焦点を当て、顎口類の成立過程に肉薄する); 3) 羊膜類における筋骨格系の多様化の機構的理解(横隔膜のように、高度に特化した筋の形態形成機構とその進化的成立の理解が目的である)である。

### 3. 研究の方法

A. 非モデル動物における実験発生学的手法の確立。各種動物胚において、効率的な遺伝子機能阻害を試み、発生に及ぼす影響を調べる。あるいは蛍光色素注入による細胞標識により、前駆細胞の挙動を詳細に検索する。

B. 組織特異的に発現する遺伝子、および発生制御因子の同定。同定すべき遺伝子は、鰓下筋芽細胞の移動を細胞自律的、非自律的に促進・阻害している因子、舌下神経と鰓弓神経の分布に差異をもたらす因子、円口類と顎口類の鰓下筋のパターンの違いを生み出している因子など。各動物初期胚トランスクリプトーム・データベースの構築も考慮。

C. 胚の頭部・体幹部境界領域における前駆細胞の挙動の観察。既存の筋肉特異的抗体による免疫染色のほか、HE染色による組織切片上での細胞形態の検索、さらに、筋前駆細胞や、筋が接続する骨格の前駆細胞の配置の詳細を明らかにする。この情報をベースに、舌下神経、舌筋原基の発生パターンを経時的に比較、舌下神経の伸長、舌筋原基の移動に

関わる遺伝子の経時的発現パターンを各種動物において比較発生学的に検索。

### 4. 研究成果

(A) ナメクジウオの中胚葉: 脊椎動物の体幹骨格筋を形成する体節と同等の中胚葉のみからなると考えられているのがナメクジウオの中胚葉である。とりわけ、脊椎動物は無分節の頭部中胚葉を持つことで特徴付けられる。ナメクジウオと脊椎動物の初期中胚葉を比べると、中胚葉の前後の極性を定める遺伝子群、*gsc*, *bra*, *delta* の発現は、発生初期において差がないが、発生が進むにつれて脊椎動物においてのみ、各遺伝子発現ドメインが分離してゆくことが分かった。これはもっぱら、初期中胚葉の脊椎動物特異的な移動によるもので、脊椎動物胚においてこれを抑えるとナメクジウオ的な中胚葉を一部模写できることが分かった。また、脊椎動物における体節形成に機能する Notch シグナリングが、ナメクジウオ中胚葉の原腸からのくびれに機能するシステムの転用である可能性も示された(論文 5,20,21; 関連論文 18)。

(B) 脊椎動物における頭部中胚葉: 脊椎動物頭部中胚葉に関し、ナメクジウオ中胚葉の特異化、円口類ヤツメウナギにおける外眼筋の発生を扱った共同研究、ならびに、軟骨魚類における頭部の擬似的分節、頭腔についての考察、脊椎動物において頭部神経堤細胞と頭部中胚葉の複合からなる神経頭蓋の進化についての考察を発表した(論文 5,13,14,16)。

(C) 頭部中胚葉と体幹中胚葉の違い: 脊椎動物において特徴的に現れる頭部中胚葉と咽頭弓の拡張のため、脊椎動物胚には頭部・体幹境界がもたらされる。この構造の理解が、脊椎動物の頭頸部における複雑な筋骨格系の理解に必須となる(論文 4,15)。

(D) 円口類における鰓下筋: 円口類にも鰓下筋と類似の形状を示す鰓下筋前駆体が存在し、それが舌下神経によって支配されていることは古くから報告されてきた。しかし、この筋は鰓弓・咽頭域の表層に存在し、機能も顎口類における鰓下筋とは大きく異なる。そこで、詳細な組織発生学的検索、トランスジェニックマウスを用いた細胞系譜の追跡を行ったところ、円口類も顎口類も、鰓下筋原基は囲心腔に対し同等な位置関係を以て発生するが、囲心腔と咽頭の位置関係が変化したために、顎口類における鰓下筋がより内側の位置に発生するに至ったことが推測された(論文 2)。

(E) 現在進行中の鰓下筋研究について: 軟骨魚類における検索から、遺伝子重複により生じた二つの *Lbx* 遺伝子が排他的なパターンで発現し、顎口類を特徴付ける前方と後方の鰓下筋(哺乳類のオトガイ舌骨筋、胸骨舌骨

筋に相同)がそれぞれ異なる発生遺伝子に制御されることを発見、また、トラザメの Lbx 遺伝子群は対鰭筋、僧帽筋および体壁筋にも発現し、大きく異なるこれらの筋の分化タイミングに対応する発現パターンを示すことも見出した。これらから、脊椎動物の進化において、皮筋節の腹側が二次的に進展し体幹部腹側を覆う発生機構が獲得され、その吻側部分である頸部筋の複雑化に Lbx の発生制御遺伝子の重複が関わったことが示唆された。ヤツメウナギにおける遺伝子欠失個体の作成とゲノム配列解析により、Lbx 遺伝子が円口類の鰓下筋前駆体の伸長に必須であることを確認した(関連論文 6,7,10)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件、すべて査読あり)

1. Pascual-Anaya, J., Sato, I., Paps, J., Yandong, R., Sugahara, F., Higuchi, S., Takagi, W., Ruiz-Villalba, A., Ota, K. G., Wang, W., and Kuratani, S. (2018). Hagfish and lamprey Hox genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 859-866. doi: 10.1038/s41559-018-0526-2
2. Adachi, N., Pascual-Anaya, J., Hirai, T., Higuchi, S., and Kuratani, S. (2018). Development of hypobranchial muscles with special reference to the evolution of the vertebrate neck. *Zool. Lett.* 4: 5. doi.org/10.1186/s40851-018-0087-x
3. Kuratani, S., Kusakabe, R., and Hirasawa, T. (2018). Neural crest and evolutionary origin of the vertebrate body. *Dev. Biol.* doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.017.
4. Kuratani, S., and Ahlberg, P. E. (2018). Evolution of the vertebrate neurocranium: Problems of the premandibular domain and trabecula. *Zool. Lett.* 4: 1. doi: 10.1186/s40851-017-0083-6.
5. Onai, T., Adachi, N., and Kuratani, S. (2017). Metamerism in cephalochordates and the problem of the vertebrate head. *Int. J. Dev. Biol.* 61, 621-632. doi: 10.1387/ijdb.170121to.
6. Matsubara, Y., Hirasawa, T., Egawa, S., Hattori, A., Sukanuma, T., Kohara, Y., Nagai, T., Tamara, K., Kuratani, S., Kuroiwa, A., and Suzuki, T. (2017). Anatomical integration of the sacral-hindlimb unit by GDF11 coordination of Hox expression drove the evolutionary divergence of hindlimb positioning in tetrapods. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1392-1399. doi: 10.1038/s41559-017-0247-y.
7. Okamoto, E., Kusakabe, R., Kuraku, S., Onimaru, K., Kuratani, S., and Tanaka, M. (2017). Appendicular muscles of selachian *S. canicula* is not derived by direct extension of epithelialized somites. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1731-1736. doi: 10.1038/s41559-017-0330-4.
8. Hu, H., Guo, S., Uesaka, M., Shimai, K., Lu, T.-M., Li, F., Fujimoto, S., Liu, S., Sasagawa, Y., Zhang, G., Kuratani, S., Yu, J.-K., Kusakabe, T. G., Khaitovich, P., and Irie, N.; EXPANDE Consortium. (2017). Constrained vertebrate evolution by pleiotropic genes. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1722-1730. doi: 10.1038/s41559-017-0318-0.
9. Furutera, T., Takechi, M., Kitazawa, T., Takei, J., Yamada, T., Vu Hoang, T., Rijli, F. M., Kurihara, H., Kuratani, S., and Iseki, S. (2017). Differing contribution of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick. *Development* 144, 3315-3324. doi: 10.1242/dev.149765.
10. Noguchi, K., Ishikawa, R., Miyoshi, K., Kawaguchi, M., Kawasaki, T., Hirata, T., Fukui, M., Kuratani, S., Tanaka, M., and Murakami, Y. (2017). Expression patterns of *Sema3A* in developing amniote limbs: with reference to the diversification of peripheral nerve innervation. *Dev. Growth Diff.* 59, 270-285. doi: 10.1111/dgd.12364.
11. Sugahara, F., Murakami, Y., Pascual-Anaya, J., and Kuratani, S. (2017). Reconstruction of the ancestral vertebrate brain. *Dev. Growth Diff.* 59, 163-174. doi: 10.1111/dgd.12347
12. Hirasawa, T., Oisi, Y., and Kuratani, S. (2016). *Palaeospondylus* as a primitive hagfish. *Zool. Lett.* 2: 20. doi: 10.1186/s40851-016-0057-0
13. Kuratani, S., Oisi, Y., and Ota, K. G. (2016). Evolution of the vertebrate cranium: viewed from the hagfish developmental studies. *Zool. Sci.* 33, 229-238. doi:10.2108/zs150187
14. Kuratani, S., and Adachi, N. (2016). What are head cavities? - History of

- studies on the vertebrate head segmentation. *Zool. Sci.* **33**, 213-228. doi:10.2108/zs150181
15. Higashiyama, H., Hirasawa, T., Oisi, Y., Sugahara, F., Hyodo, S., Kanai, Y., and Kuratani, S. (2016). On the vagal cardiac nerves, with special reference to the early evolution of the head-trunk interface. *J. Morphol.* **277**, 1146-1158. doi: 10.1002/jmor.20563.
  16. Suzuki, G. D., Fukumoto, Y., Kusakabe, R., Yamazaki, Y., Kosaka, J., Kuratani, S., and Wada, H. (2016). Morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey reveals the ancestral head structure and its developmental mechanism of vertebrates. *Zool. Lett.* **2**:10. doi: 10.1186/s40851-016-0046-3.
  17. Sugahara, F., Pascual-Anaya, J., Oisi, Y., Kuraku, S., Aota, S., Adachi, N., Takagi, W., Hirai, T., Sato, N., Murakami, Y., and Kuratani, S. (2016). Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain. *Nature* **531**, 97-100. doi: 10.1038/nature16518
  18. Kaji, T., Reimer, J. D., Morov, A. R., Kuratani, S., and Yasui, K. (2016). Amphioxus mouth after dorso-ventral inversion. *Zool. Lett.* **2**: 2.
  19. Takechi, M., Kitazawa, T., Hirasawa, T., Hirai, T., Iseki, S., Kurihara, H., and Kuratani, S. (2016). Developmental mechanisms of the tympanic membrane in mammals and non-mammalian amniotes. *Congenit. Anomal.* **56**, 12-17. doi:10.1111/cga.12132
  20. Onai, T., Aramaki, T., Inomata, H., Hirai, T., and Kuratani, S. (2015). On the origin of vertebrate somites. *Zool. Lett.* **1**: 33. doi: 10.1186/s40851-015-0033-0
  21. Onai, T., Aramaki, T., Inomata, H., Hirai, T., and Kuratani, S. (2015). Ancestral mesodermal reorganization and evolution of the vertebrate head. *Zool. Lett.* **1**: 29. doi: 10.1186/s40851-015-0030-3.
- Developmental Program Behind The Evolutionary Novelty” 18<sup>th</sup> International Congress of Developmental Biology June 18-22, 2017 Singapore. Singapore
3. 倉谷 滋「亀の起源は進化のトリック」理化学研究所科学講演会 in 長崎 2017年2月5日 NBC ビデオホール (一般向け講演会)
  4. Shigeru Kuratani “Embryology of the hagfish and the early evolution of vertebrates “ The Joint meeting of The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, OIST(Onnason) Okinawa Convention Center(Ginowan) , Okinawa, Japan Nov14-19,2016
  5. Shigeru Kuratani ” Development of hagfish and early evolution of vertebrates ” International Conference on Lamprey Immune System. Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian, China Sep19-21, 2016
  6. Hirasawa T., Fujimoto., S., Kuratani, S. “ Evolutionary Origin of the Diaphragm ” Society of Vertebrate Paleontology 76<sup>th</sup> Annual Meeting Grand America Hotel, Salt Lake City, U.S.A. October 26-29, 2016
  7. Kuratani S., Sugahara F, Ota K, Oisi Y. “ Evolution and development of the head in agnathans and fishes ” The 11<sup>th</sup> International Congress of Vertebrate Morphology Bethesda North Marriott Hotel & Conference Center, Washington, D.C. U.S.A June 29-July 3, 2016
  8. 倉谷 滋「カメを作った発生プログラムの進化」化石研究会第34回総会・学術大会 シンポジウム「カメ類の起源と進化を考える」早稲田大学・早稲田キャンパス 2016年6月11日・12日
  9. Shigeru Kuratani “Hagfish development and early evolution of vertebrates” Palaeontological and Molecular Approaches to Early Vertebrate Evolution The Royal Swedish Academy of Sciences Uppsala, Sweden May12-13 2015
  10. 倉谷 滋「カメの甲はどうやって出来たか」日本進化学会第17回大会 シンポジウム「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」2015年8月20日～23日 中央大学後楽園キャンパス

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 倉谷 滋「かたちの進化と発生」名古屋大学 EGER グリーン自然科学レクチャー 2017年7月13日 名古屋大学 ES ホール
2. Shigeru Kuratani “Acquistion of The Turtle Shell: Changes in

〔図書〕(計 2 件)

1. 倉谷 滋「新版・動物進化形態学 - Evolutionary Morphology: Bauplan and

Embryonic Development of Vertebrates」,  
(Natural History Series) , (2017) 東  
京大学出版会.

2. 倉谷 滋「分節幻想: 脊椎動物の起源をめ  
ぐる科学思想史」(2016) 工作舎.

〔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.riken.jp/research/labs/chief/evol\\_morphol/](http://www.riken.jp/research/labs/chief/evol_morphol/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

倉谷 滋 (KURATANI, Shigeru)

国立研究開発法人理化学研究所・倉谷形態進  
化研究室・主任研究員

研究者番号: 00178089