

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04374

研究課題名(和文)動物群に特徴的な保存形態を生み出す発生メカニズムとそれを制御する保存ゲノム配列

研究課題名(英文) Developmental mechanisms and conserved genomic sequences that are involved in the formation of common characteristics of morphology of an animal clade.

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの鳥は一目見て鳥と分かる鳥に特徴的な形態(保存形態)を共通してもっている。本研究は、その中でも、翼のなかの「3本指」「風切羽」、骨盤の骨である「寛骨(鳥が2本足で立つために独自の形態をもつ)」の形態について、保存形態の形成メカニズムを「発生」と「ゲノム」という観点から明らかにする試みである。本研究では、鳥類のゲノムがもつ遺伝子の塩基配列を網羅的に比較し、鳥類のみで保存された配列の中に、「風切羽」の発生に関わると考えられるSim1遺伝子の発現を調節する領域が含まれることを明らかにした。また、「3本指」「寛骨」についてもそれぞれ保存形態が形成される発生メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、1万種近く存在する現存鳥類全体を対象とした「保存性」に着目していることが特色である。本研究は、鳥類ゲノムにおいて鳥類のみで保存された塩基配列のほとんどが遺伝子そのものをコードした領域以外にあること、それらの配列によってSim1などの遺伝子が鳥類独自の発現様式を獲得したことが、鳥類の保存形態の形成に繋がっているであろうことを示した。これらの成果は、動物進化を駆動するゲノム変化について大きなインパクトを与える成果となった。また、これらの鳥類の保存形態の多くが鳥類の祖先である恐竜にも存在することから、恐竜の進化を発生学的に考察する新しい進化学、恐竜学の基礎を作った研究成果であるともいえる。

研究成果の概要(英文)：We can recognize a bird as a bird at the first glance because of the birds'-specific features. This study attempted to elucidate the mechanisms of the formation of these unique features, that is, common characteristics of the morphology in birds especially from the viewpoints of "development" and "genome". Among its characteristics, we focused on "three digits in wings", "flight feathers" and "hip joint (which has a unique morphology for bipedal walking on two legs)". Comparative analysis of birds' genomes revealed that one of the avian-specific highly conserved genomic region could be involved in the development of flight feathers through regulating Sim1 gene expression. We also described the developmental mechanisms of the formation of three digits in wings and hip joint.

研究分野：発生生物学

キーワード：進化発生 ゲノム進化 鳥類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物形態がどのようにして形成されるのかは生命科学の重要命題のひとつである。しかし、これまでの発生進化的研究の多くは、系統的に近縁な動物群の比較により、形態の多様性がどのように生じるかを研究するものであった。一方で、動物形態の発生進化を考える上でもう一つの重要な要素である形態の保存性について解析するためには、大きく多様化してもなお変わらない形態を対象とすることが望ましいが、そのためには、より大きな動物群を比較解析することが必要となる。しかしその解析には膨大な情報が必要なこともあり、研究はあまりされていない状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、鳥類という脊椎動物内の“綱(こう)”レベルの大きな動物分類群が共通に持つ形態的特徴の形成メカニズム解析を基軸に、形態の保存性を生み出す“ゲノム配列”と“形態形成メカニズム”の関係を明らかにすることにある。これにより、「ゲノム発生メカニズム保存形態」の関係を明らかにし、動物形態の進化の原理を帰納する。研究目的を達成するため、以下の3つの項目(1)~(3))を具体的な研究内容とした。

- (1) 鳥類特異的な保存形態の発生メカニズムの解明
- (2) 鳥類特異的なゲノム保存配列を元にした、特徴的形態制御配列の同定
- (3) 保存形態の喪失メカニズムの解明

これら3つの項目は有機的に関連した内容となっており、全体が達成されることによって研究目的である「ゲノム発生メカニズム保存形態」の関係を明らかにし、「動物形態の進化の原理を帰納する」ことができる。本計画によって、発生進化とゲノム進化を結ぶ新しい概念を創出し、鳥類の祖先である恐竜の進化にまで言及できる広い波及効果を生み出す。

### 3. 研究の方法

研究目的の3つの項目について、以下の研究を遂行した。

#### (1) 鳥類特異的な保存形態の発生メカニズムの解明

##### (1)- 前肢三本指の形態

鳥類独特の指形態の形成が shh 遺伝子機能と相関する可能性をすでに見出していたため、遺伝子発現解析(下流遺伝子や AER マーカー遺伝子)と細胞系譜追跡実験をあわせてその可能性を検証した。また、shh 機能の違いにより三本指形態が形成されるメカニズムを移植実験などの微細操作により検証した。

##### (1)- 風切り羽の羽毛形態

羽毛原基マーカー遺伝子と枝芽の軸形成遺伝子の発現の部位別比較により風切り羽特異的な発生メカニズムを推定した。また、風切り羽の羽毛形成異常があるニワトリ変異体の胚におけるこれらの遺伝子発現を調べた。

##### (1)- 大腿骨および寛骨の形態

爬虫類(ヤモリ)と鳥類(ニワトリ)における大腿骨頭の形成過程の違いを、各種軟骨・硬骨の分化マーカーや領域特異的マーカー分子の発現解析を行って詳細に調べた。さらに、骨頭形成の自立性を解析するための組織培養系を確立し、鳥類型の形態が形成される原因となる遺伝子の機能とその作用機序を解析した。

#### (2) 鳥類特異的なゲノム保存配列を元にした、特徴的形態の制御配列の同定

中国 BGI との共同研究により同定した現存鳥類 50 種の全ゲノム配列を元に鳥類にだけ保存されたゲノム配列についての解析を行った。とくに Sim1 遺伝子の第 7 イントロンに存在することが確認された鳥類特異的なゲノム配列について、ニワトリ胚ではエレクトロポレーション法およびウイルスを用いて、マウス胚ではトランスジェニック技術を利用して in vivo エンハンサー解析を行った。

#### (3) 保存形態の喪失メカニズムの解明

3 本指と風切り羽が例外的に喪失しているペンギン類を用いて、第 1 指のみが矮小化する原因の特定を行うため、ペンギン胚において枝芽形成関連遺伝子の発現解析を行った。また、その中で特に第 1 指矮小化と相関がみられた fgf8 遺伝子について、fgf8 タンパク質の枝芽への添加実験などの機能解析を行った。

### 4. 研究成果

研究目的の3つの項目について、以下の研究成果を得た。

#### (1) 鳥類特異的な保存形態の発生メカニズムの解明

##### (1)- 前肢三本指の形態

鳥類前肢の第 4 指と第 5 指が形成されないことと、その領域における AER と ZPA (shh 発現領域)の性質と関連があることを、主に第 5 指のみ形成されない鳥類後肢と比較することで明らかにした。

##### (1)- 風切り羽の羽毛形態

羽毛形成に関わる遺伝子および胚発生期の枝芽の軸形成に関わる遺伝子に関して、胚発生中の羽毛原基における発現状態を解析し、風切り羽形態が胚発生期にすでに形成されていること、また風切り羽の形成位置と枝芽の軸との詳細な位置関係を明らかにした。さらにニワトリ変異

体を用いた解析から、肢芽の軸形成が風切り羽の形成に必要であることを示唆する結果を得た。

(1) 大腿骨および寛骨の形態

鳥類(ニワトリ)では爬虫類(ヤモリ)と異なり、大腿骨頭と接する寛骨臼に穴が開くが、組織培養系を用いた組織間相互作用の解析により、関節部位のインターゾーンと呼ばれる間充織組織が寛骨臼の穴の形成に関わることを明らかにした。

(2) 鳥類特異的なゲノム保存配列を元にした、特徴的形態の制御配列の同定

ニワトリ胚とマウス胚でエンハンサー解析をそれぞれ行い、鳥類特異的ゲノム配列として同定された Sim1 遺伝子近傍の配列が、Sim1 遺伝子のニワトリ特異的な発現を制御されていることを明らかにした。また、ニワトリ胚において Sim1 遺伝子の発現解析を詳細に行い、この遺伝子発現が風切り羽の羽芽形成位置と強く相関することを明らかにした。

(3) 保存形態の喪失メカニズムの解明

ペンギンの第1指形成期における肢芽の形態と四肢骨格パターンの形成に関わる遺伝子発現や細胞死の検出などの解析から、ペンギン胚においては、特定の時期に第1指近傍で肢芽先端部の外胚葉性の肥厚(AER)が退縮する現象が見られることが明らかとなり、このことが第1指の矮小化に関わることを示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- (1) Egawa, S., Saito, D., Abe, G. and Tamura, K. Morphogenetic mechanism of the acquisition of the dinosaur-type acetabulum. *Royal Society Open Science*. 2018, 5: 180604. doi: 10.1098/rsos.180604, 査読有
- (2) Kondo, M., Sekine, T., Miyakoshi, T., Kitajima, K., Egawa, S., Seki, R., Abe, G. and Tamura, K. Flight feather development: its early specialization during embryogenesis. *Zoological Letters*. 2018, 4:2. doi: 10.1186/s40851-017-0085-4, 査読有
- (3) Matsubara, H., Saito, D., Abe, G., Yokoyama, H., Suzuki T., and Tamura, K. Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud. *Developmental Dynamics*, 2017, 246, 417-430. doi: 10.1002/dvdy.24493, 査読有
- (4) Seki, R., Li, C., Fang, Q., Hayashi, S., Egawa, S., Hu, J., Xu, L., Pan, H., Kondo, M., Sato, T., Matsubara, H., Kamiyama, N., Kitajima, K., Saito, D., Liu, Y., Gilbert, M.T.P., Zhou, Q., Xu, X., Shiroishi, T., Irie, N., Tamura, K., and Zhang, G. Functional roles of Aves class-specific cis-regulatory elements on macroevolution of bird-specific features. *Nature Communications*, 2017, 8, 14229. doi: 10.1038/ncomms14229, 査読有
- (5) Seki, R., Kitajima, K., Matsubara, H., Suzuki, T., Saito, D., Yokoyama, H. and Tamura, K. AP-2 is a transcriptional regulator for determination of digit length in tetrapods. *Developmental Biology*. 2015, 407, 75-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.006, 査読有

[学会発表](計 23 件)

- (1). 田村宏治. ニワトリ脚羽系統と羽毛恐竜をつないだゲノム比較研究. NBRP 第4期開始記念シンポジウム - 基礎研究から応用研究にわたる成果報告. 2017年
- (2). 宮腰拓, 米井小百合, 関亮平, 阿部玄武, Sean D. Keeley, 工樂樹洋, 牧野能士, 田村宏治. 鳥類において収斂進化した水かきの形成に関わる、保存されたゲノム配列と発生メカニズムの探索. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017年
- (3). 北嶋慶一, 川平直史, 大塚大輔, 阿部玄武, 森下喜弘, 田村宏治. 肢芽間充織培養系における軟骨パターン形成過程の定量解析. 日本動物学会第88回富山大会 2017. 2017年
- (4). 田村宏治. 鳥エンハンサー獲得までの道のり - 大規模ゲノム情報を動物学にどう使っているか. 日本動物学会第88回富山大会 2017. 2017年
- (5). 江川史朗, 阿部玄武, 齋藤大介, 田村宏治. 恐竜型股関節の獲得過程の復元: 実験発生学的観点から. 日本進化学会大9回大会. 2017年
- (6). 江川史朗, 阿部玄武, 齋藤大介, 田村宏治. 恐竜はいかにして恐竜型の股関節を獲得したのか? 第7回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 2017年
- (7). 北嶋慶一, 川平直史, 阿部玄武, 森下喜弘, 田村宏治. Quantitative analysis of chondrogenic pattern in cultured limb mesenchymal cells. 50th annual meeting of the JSDB, cosponsored by APDBN. 2017年
- (8). 江川史朗, 阿部玄武, 齋藤大介, 田村宏治. The evolution of acetabular morphogenesis on the line to extant birds. 50th annual meeting of the JSDB, cosponsored by APDBN. 2017年
- (9). 北嶋慶一, 川平直史, 阿部玄武, 森下喜弘, 田村宏治. Quantitative analysis of chondrogenic patterning in cell culture of developing limb mesenchyme. The 2017 Japan-NIH joint Symposium -on Advances in Biomedical Research and Disease-. 2017年
- (10). 江川史朗, 阿部玄武, 田村宏治. 実験発生学的観点からの恐竜研究. 日本古生物学会 第166回例会. 2017年

- (11). 杉浦雄貴、阿部玄武、田村宏治 . 四足動物における基脚部（手根骨・足根骨）の発生 . 第 39 回日本分子生物学会年会 . 2016 年
- (12). 田村宏治 . ヒレから四肢への進化を考える進化細胞生物学 . 第 39 回日本分子生物学会年会 . 2016 年
- (13). 北嶋慶一、阿部玄武、田村宏治 . 様々な培養系を用いた、四肢形態形成の複雑さへのアプローチ . 日本動物学会・平成 28 年度東北支部大会 . 2016 年
- (14). 田村宏治 . Roles of Aves class specific cis-regulatory elements on macroevolution of bird-specific features . JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology . 2016 年
- (15). 田村宏治 . Re-patterning and re-sizing in regeneration of vertebrate appendages . Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists . 2016 年
- (16). 北嶋慶一、阿部玄武、田村宏治 . An approach with cell culture to a complex system of limb patterning . 第 22 回国際動物学会 第 87 回日本動物学会 合同大会 . 2016 年
- (17). 田村宏治 . Flight feather formation; new insights from integration of B10K project with developmental biology . 第 22 回国際動物学会 第 87 回日本動物学会 合同大会 . 2016 年
- (18). 江川史朗、阿部玄武、田村宏治 . Inference for the acquisition of a dinosaur-type acetabulum . 第 22 回国際動物学会 第 87 回日本動物学会 合同大会 . 2016 年
- (19). 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
- (20). 近藤真央、松原遼、関亮平、阿部玄武、齋藤大介、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 新潟 . 2015 年
- (21). 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 新潟 . 2015 年
- (22). 江川史朗、阿部玄武、田村宏治 . 恐竜の股関節形態形成機構の推論 . 日本進化学会第 17 回東京大会 . 2015 年
- (23). 松原遼、齋藤大介、田村宏治 . Initial activation of restricted sonic hedgehog expression in early limb development . 13th International Limb Development & Regeneration Conference . 2015 年

〔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

<https://researchmap.jp/read0046791/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：関 亮平

ローマ字氏名：SEKI, Ryohei

研究協力者氏名：入江 直樹

ローマ字氏名：IRIE, Naoki

研究協力者氏名：Guojie Zhang

ローマ字氏名：-

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。