

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840133

研究課題名(和文) 円口類ヤツメウナギ、ヌタウナギを用いた、対鼻性獲得のための分子発生学的変遷の解明

研究課題名(英文) Evolutionary developmental study of the cyclostome towards acquisition of the paired nostrils.

研究代表者

菅原 文昭 (Sugahara, Fumiaki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00611005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：まず、ヤツメウナギ鼻下垂体プラコードの形態観察を行った。既報通りプラコードの肥厚は鼻プラコード部から始まることが確認され、さらにDilによる細胞系譜トレース実験と遺伝子発現解析から、下垂体プラコードとなる外胚葉は、二次的な後方への伸長により視床下部と接触するのではなく、発生初期から視床下部に接触していることが示された。つまり、視床下部と下垂体プラコードの協調的な発生機構は顎口類と共通するらしい。Dilによる汎プラコード域の細胞運命を追う実験については一定の結果を経て、解析を進めている。ヌタウナギについてはいくつかの発生ステージの胚を得ることに成功し、遺伝子発現解析のため準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：First, we observed the morphological development of the naso-hypophyseal placode (NHP) in lampreys by using a confocal microscope and a scanning electron microscope. We found that the placode thickening was seen only in the nasal area and not in the ectoderm ventral to the hypothalamus where the hypophyseal placode is formed in gnathostomes. Previous reports suggested that lamprey NHP is initially distant from the hypothalamus, grows caudally and attaches secondarily to the hypothalamus. However, our gene expression analysis and Dil labeling experiments have shown that the hypophyseal placode cells are not supplied by migration from the nasal area. Next, we tried Dil labeling to trace the presumptive nasal placode cells in the pre-placodal region (PPR). This experiment has been successfully done and the analysis is in progress. Finally, we successfully got a few hagfish embryos and made histological sections for in situ hybridizations.

研究分野：進化発生学

キーワード：円口類 ヤツメウナギ ヌタウナギ 鼻下垂体プラコード 顔面形成 脊椎動物

1. 研究開始当初の背景

顎をもつ脊椎動物(顎口類)の頭部には外鼻孔が1対存在し、鼻孔も2つ開く。ところが、化石記録によると、脊椎動物の進化の初期には鼻の穴は1つであったらしい。デボン紀に栄えた顎のない脊椎動物セファラスピスなど、いくつかの動物群は、鼻孔が1つ、正中に開いていたことが分かっている。また近年、デボン紀の無顎類ガレアスピスは、顎がないにも関わらず鼻孔がすでに2つに分かれていたことが報告された。つまり、「対鼻性」の獲得は顎の進化に先だって起こった可能性が高く、脊椎動物の初期進化において、「対鼻性」の獲得が、顎の獲得も含めた脊椎動物の頭部進化に大きな変化をもたらしたのは間違いない。

現生の円口類ヌタウナギ類、ヤツメウナギ類も外鼻孔は1つであり、顎を持たない。このため、円口類は脊椎動物の祖先的形態を保持している可能性があり、脊椎動物の初期進化のモデル生物となりうる。顎口類の鼻が対であるということは、発生初期の頭部パターンニングにおいて、鼻プラコードと呼ばれる肥厚した外胚葉の原基が2つあることに由来する。ところがヤツメウナギでは、鼻プラコードは正中に1つしか形成されない。しかも下垂体プラコードは顎口類と異なり口腔よりも前方に発生し、鼻プラコードと一体化して鼻下垂体プラコードを形成する。この鼻下垂体プラコードという、円口類に特異な構造については、その分子発生メカニズムはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

なぜヤツメウナギの下垂体プラコードは口腔外に発生し、鼻プラコードは正中に形成されるのか。顎口類では、すべての頭部プラコード細胞は、「予定プラコード領域(Pre-Placodal Region ;PPR)」と呼ばれる、神経板と表皮外胚葉との境界に由来する。ここで、顎口類では、下垂体プラコードは最前方に1つ形成されるのに対し、鼻プラコードは、その側面に2個形成される。では、単一の鼻を持つヤツメウナギの鼻プラコードはPPRのどこから由来するのか？

もし、由来する細胞が顎口類と同様に側面に2カ所存在するならば、その細胞は発生途上で正中で融合するに違いない。また、由来する細胞が当初から正中に位置するならば、下垂体プラコードと極めて近い位置から発することになる。前者の場合、ヤツメウナギ鼻プラコード予定細胞は二次的に正中で融合すると予想され、後者のシナリオでは、鼻プラコード予定領域の位置決定機構がそもそも異なることが想定される。本研究の目的は上記のいずれが正しいかを明らかにし、脊椎動物の「対鼻化」に必要な発生学的な機構とその進化的変遷の理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヤツメウナギ鼻下垂体プラコード前駆細胞は予定プラコード領域のどこから来るのか？

これまで、円口類の頭部プラコードの予定運命を解析した研究は皆無である。そこで、神経胚初期の PPR の細胞を脂溶性蛍光色素 Dil 注入により標識し、その細胞運命を追うことにより、ヤツメウナギの鼻下垂体プラコードが PPR のどの領域に由来するのかを明らかにする。また同時に、蛍光タンパクを受精卵に導入することにより細胞のライブイメージングを行い、鼻プラコード予定細胞の動態を観察する。

(2) 鼻下垂体プラコードの位置決定機構に、円口類と顎口類にどのような違いがあるのか？

鼻および下垂体プラコードの初期マーカー遺伝子、および PPR の領域化に関わると思われる遺伝子群を網羅的に解析し、顎口類との比較により、ヤツメウナギの鼻下垂体プラコード領域形成機構が顎口類とどのように異なるのかを明らかにする。

(3) ヌタウナギの鼻下垂体プラコードは、ヤツメウナギと同様の発生メカニズムを有するか？

ヌタウナギ胚は、数を得るのが非常に困難なので、まず得られた胚で鼻下垂体プラコードの組織学的観察を行い、ヤツメウナギとの類似性を確認する。可能であれば、いくつかの遺伝子発現を観察し、ヤツメウナギで得られた知見が円口類一般に保存されたものなのかを確認する。

4. 研究成果

まず、ヤツメウナギの鼻下垂体プラコードの形態的な観察を行った。これまでの報告通り、プラコードの肥厚はその前端部、すなわち鼻プラコード部から始まることが確認された。先行研究では、下垂体プラコードも含めた鼻下垂体プラコードの前駆体がこの前部で形成され、発生が進むにしたがって細胞が後方に移動することで二次的に視床下部と接触し、腺性下垂体を形成すると考察されていた。しかし、今回 Dil による細胞系譜トレース実験を行ったところ、その結果はそれを否定するもので、下垂体プラコードとなる外胚葉は、その発生初期から視床下部に接触していることが示された。また、このことは遺伝子発現解析においても上記の結果は支持された。すなわち下垂体初期マーカーの Pitx, Lhx3 などは、プラコード肥厚以前から視床下部直下の外胚葉において発現していた。顎口類では FGF シグナルが視床下部から分泌され、下垂体プラコードの分化を誘導する。興味深いことに、ヤツメウナギで FGF シグナルをブロックすると下垂体での遺伝子発現が消失した。つまり、視床下部と下垂体

プラコードの協調的な発生機構はヤツメウナギにも存在するらしい。

PPR の蛍光標識による細胞運命を追う実験については、Dil 注入実験に関しては一定の結果を経て、現在解析を進めている。これに対し、蛍光タンパク KAEDE の mRNA を受精卵に注入し、特定の部位に紫外線を照射することで蛍光波長を緑から赤に転換することで細胞運命を追う試みを行ったが、ヤツメウナギ胚の強い自家蛍光のため、成功しなかった。

ヌタウナギについてはいくつかの発生ステージの胚を得ることに成功し、遺伝子発現解析のための組織切片を作製した。遺伝子発現解析はこれから行う。

また、頭部プラコードの発生は、前述のとおり脳との位置関係およびその協調的発生過程の理解が非常に重要である。そのため、他の研究資金と合わせてヌタウナギ、およびヤツメウナギの脳の領域化についても並行して研究を行い、学会発表および論文として発表した。

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 4 件)

1. Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain.

Sugahara F, Pascual-Anaya J, Oisi Y, Kuraku S, Aota S, Adachi N, Takagi W, Hirai T, Sato N, Murakami Y, Kuratani S

Nature 531(7592) 97-100 2016 年 3 月

DOI: 10.1038/nature16518

査読有

2. Reevaluating Emx gene phylogeny: homopolymeric amino acid tracts as a potential factor obscuring orthology signals in cyclostome genes.

Noro M, Sugahara F, Kuraku S

BMC evolutionary biology 15(1) 78

2015 年 5 月

DOI: 10.1186/s12862-015-0351-z

査読有

3. Body wall development in lamprey and a new perspective on the origin of vertebrate paired fins.

Tulenko FJ, McCauley DW, Mackenzie EL, Mazan S, Kuratani S, Sugahara F, Kusakabe R, Burke AC

PNAS 110(29) 11899-11904 2013 年 7 月

DOI: 10.1073/pnas.1304210110

査読有

4. Evolution of the regionalization and patterning of the vertebrate

telencephalon: what can we learn from cyclostomes?

Sugahara F, Murakami Y, Adachi N, Kuratani S

Current opinion in genetics & development 23(4) 475-483 2013 年 8 月

DOI: 10.1016/j.gde.2013.02.008

査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Brain development of the hagfish; the origin of complex brain compartmentalization of the vertebrates

Fumiaki Sugahara, Yasuhiro Oisi, Juan Pascual-Anaya, Shigehiro Kuraku, Shin-ichi Aota, Noritaka Adachi, Tamami Hirai, Yasunori Murakami & Shigeru Kuratani

Inaugural 2015 meeting of the Pan-American Society for Evolutionary Developmental Biology (Berkeley, U.S.A) 2015 年 8 月 5 日

2. 円口類ヤツメウナギにおける鼻下垂体プラコードの発生から探る、脊椎動物の対鼻性獲得の過程

菅原 文昭他

日本進化学会第 16 回大阪大会(高槻現代劇場、高槻市) 2014 年 8 月 21 日

3. ヤツメウナギ終脳形成における Foxg1 を介した DV パターニング機構と脊椎動物終脳の進化

菅原 文昭他

日本発生生物学会(つくば国際会議場、つくば市) 2015 年 6 月 2 日

4. ヤツメウナギ終脳における Foxg1 による領域化機構; 脊椎動物終脳の DV パターニング

菅原 文昭他

第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会(神戸国際会議場) 2015 年 3 月 21 日

5. Brain Development of the Hagfish, with Reference to the Vertebrate Brain Evolution

菅原 文昭他

5th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology (Wien, Austria) 2014 年 7 月 23 日

6. 円口類ヤツメウナギにおける鼻下垂体プラコード(NHP)の発生からみた脊椎動物顔面形態の進化

菅原 文昭他

日本解剖学会総会・全国学術集会(自治医科大学、下野市) 2014 年 3 月

〔図書〕(計 1件)

1. In Situ Hybridization Methods
(Neuromethods)
Fumiaki Sugahara, Yasunori
Murakami and Shigeru Kuratani
Humana Press 2015年2月28日
ISBN:1493923021

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

円口類から解き明かされる脳の領域化の進
化的な起源
菅原文昭, 倉谷 滋
ライフサイエンス 新着論文レビュー 2016
年3月
DOI: 10.7875/first.author.2016.015

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 文昭 (SUGAHARA, FUMIAKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00611005

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし