

令和元年6月7日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08145

研究課題名(和文)四肢動物の祖先モデルとしての古代魚ポリプテルスの実験動物化にかかる基盤整備

研究課題名(英文) Infrastructure development for experimental animalization of ancient fish  
Polypterus as an ancestor model of tetrapods

研究代表者

岡部 正隆 (Okabe, Masataka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10300716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ポリプテルスは、幼魚期に外鰓を有し、成魚では肺呼吸を行うなど、両生類に近い形態を数多く有する最も原始的な条鰭類魚類である。ゲノム科学的・分子発生遺伝学的研究に優れたポリプテルスをより扱い易い実験動物として本邦から発信するために、本課題では、安定的な個体・胚サンプルの収集を可能にする飼育環境の整備、ポリプテルスに適した遺伝子改変技術の開発を達成した。さらに、呼吸器官(外鰓・肺)・運動器官(鰭)の発生・形態に関する研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で実施したゲノム科学的・分子発生学的アプローチからの進化発生学的研究の成果は、新聞・メディア・学会や論文公表を通じて多数発信することができ、ポリプテルスが実験動物として身近なものになるよう努めた。文化的背景から、進化学研究は欧米よりも日本で推進しやすい環境にあり、また子供たちを含む社会一般からも注目される科学分野である。本邦医学部の基礎医学・解剖学分野からこうした進化学研究の情報発信ができたことは、国民の科学リテラシーを高める貢献ができたと思う。

研究成果の概要(英文)：Polypterus senegalus (bichir) is a member of the Actinopterygii; the larva has external gill and the adult uses lung for respiration. To establish the bichir bioresource in Japan, we have developed breeding systems and transgenic/gene-editing methods, for a stable supply of bichir embryos and larvae. We have investigated mechanisms of development of respiratory organs (external gill and lung) and the morphology of locomotor organs (appendages).

研究分野：進化発生学

キーワード：ポリプテルス 肺 外鰓 鰭 進化 発生 形態

## 1. 研究開始当初の背景

アフリカ原産の淡水魚であるポリプテルスは、幼魚期に外鰓を有し、成魚では肺呼吸を行うなど、両生類に近い形質を数多く有する最も原始的な条鰭類魚類である。四肢動物と、ゼブラフィッシュやメダカのような真骨魚（より進化した条鰭類）との中間的な形質を多く持つ点で進化的に注目され、また卵の直径が約 2mm と大きく、受精後 2 日半で孵化し、組織移植実験も可能であるなど発生学の研究材料として優れている<sup>1</sup>。現在広く実験に用いられているゼブラフィッシュやメダカはその祖先が条鰭類の進化系譜の中で全ゲノム倍加を起こしたのに対し、ポリプテルスはこの全ゲノム倍加以前に分岐したため、四肢動物を含む肉鰭類と同じ数の遺伝子レパートリーを有し、四肢動物ゲノムと cis 制御領域の比較などを容易に行うことができる。このことはゲノム科学上の大きなアドバンテージである。

脊椎動物の上陸にかかる形態進化を考える上で、四肢動物に進化的に近い水棲実験動物が望まれる。しかし、ハイギョ類は解読不能なほどゲノムサイズが巨大な上に繁殖が困難、シーラカンスはゲノム解読を成し遂げたものの<sup>2</sup>、形態形成研究が困難な卵胎生の動物である。そのような研究背景の中、四肢動物に最も近く発生学ゲノム科学的な実験動物になり得るのがポリプテルスである。最も原始的な条鰭類ということで、四肢動物だけでなく硬骨魚類（真骨魚）の進化を考える上でも重要な脊椎動物である。

我々は、これまでポリプテルスを研究室で繁殖させることに成功し、基本的な発生学的観察を行ってきた他、ハプロイド 3.5Gbp のゲノムシーケンスの解読（完了）、4 倍のゲノムを包括する BAC ゲノムライブラリーとスクリーニング用の 3D プールの作成（完了）、さらに 13 万リードの胚由来 RNA の EST 解析（完了）を行ってきた。また、これらの遺伝情報を共有して解析する研究グループとして国内 12 研究室が参加するポリプテルスゲノムコンソーシアムを構築し、四肢動物と真骨魚類の進化に関する理解を深めようと研究を進めてきた。

### <引用文献>

- 1 Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. The Genus Polypterus (Bichirs): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-Finned Fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harbor Protocols* 117 (2009)
- 2 Nikaido M et al. Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome research* 23(10) 1740-1748 (2013)

## 2. 研究の目的

ゲノム科学的・分子発生遺伝学的研究に優れたポリプテルスをより扱いやすい実験動物として本邦から発信するために、以下(1)~(3)の技術の確立が望まれた。(1)胚の発生ステージを同調させた受精卵を得るための人工授精技術の開発、(2)トランスジェニック動物作製法の検討、(3)遺伝子ノックアウトおよびゲノム編集法の確立を本課題の研究目的とした。また(4)これまで本研究室で行ってきた脊椎動物の上陸のさらなる理解を本課題の研究目的とし、呼吸器官・運動器官などに着目した研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1)の人工授精技術の開発に関しては、両生類（アホロートルやアフリカツメガエル）において盛んに研究・開発されていた。これらに従えば、雌個体からの未受精卵の摘出、ならびに雄個体の精巣摘出によって精子を採取することにより人工授精を行うことが最も簡便な方策であると考えられた。そこでこれに至る前段階として卵・精子の調製や、成熟個体の飼育環境設備改善を行った。

(2)および(3)の遺伝子改変個体作製に関しては、真骨魚類のゼブラフィッシュにおいて盛んに研究・開発されてきた。本研究室においてはこれまで、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子改変個体作製が成功していたこともあり、同様の方策によってこれを達成できると考えて研究・開発を行った。

(4)の「脊椎動物の上陸」を理解する研究に関しては、研究代表者・岡部と研究分担者・矢野のみならず、研究室員を研究協力者として、各人の専門分野を生かしながら共通テーマの研究遂行に注力した。また共通のテーマで研究可能な国内外の研究チームと積極的な共同研究締結を行い遂行した。

## 4. 研究成果

### (1) 飼育環境設備ならびに受精卵採取法の改善

研究計画立案・研究開始以降、海外情勢を理由に国内におけるポリプテルスの流入量は減少した。したがって精巣摘出によって個体を失う方法は、モデル動物で汎用される技術であるが、研究遂行の持続性を考えると現実的でないことが想定された。一方で自然交配によって定期的に受精卵が量産できるシステムが構築されれば、本課題の目的は達成できるため、4 年の補助期間を通じてまずは飼育環境設備の改善を行った。研究開始以前は肉食魚用人工食餌の提供、中性・弱アルカリ性飼育水の維持、上部フィルター・外部フィルターろ過装置による水質浄化を

基本とした飼育を行ってきたが、これらを再検討し、現在までに草食魚用人工食餌の提供、弱酸性・中性飼育水の維持、フィルターを用いない止水環境下での水質浄化といった大幅な改善により、継続的な採卵と飼育作業負担の大幅軽減を達成した。これにより、最終年度においては200に及ぶ卵はほとんどが受精卵として胚に成長し、以降の幼魚・若魚飼育にまで通年・定期的に移行させるシステムを構築できた。一方で、幼魚・若魚に関しては、研究機関の飼育設備スペースの問題上、これら改善策にすべてを移行させることが叶わず、従来の外部フィルター・自動循環装置の使用を余儀なくされた。肉食を基本とするポリプテルス幼魚は、共食いによる個体減少が激しいため、今後さらなる改善が必要ではあるが、飼育スペースの許す限りで個別飼育を行うことによってこれは改善可能であると考えられる。また幼魚における食餌の検討を長期間重ねたものの、水質汚染・飼育作業負担・実験コストのすべてを改善できる最良策には到達しなかった。

また受精卵の採取法に関して、本課題を遂行する上で難点であったのが、受精卵の卵膜の粘着性が高いことであった。本研究室での自然交配法は、飼育水槽における水質とは異なる真水条件下において、上部フィルター循環・隔離シェードを使用し、人工毛糸（産卵床）を水中に浮かべた交配水槽をセットすることで卵の採集を行ってきた。雌雄隔離されたポリプテルスは交配水槽での水質変化をきっかけにペアでの交配を開始し、卵を長時間ゆっくりかけて産卵床に産み落とすが、卵膜の粘着性があるために卵の回収は数時間を要し、受精卵への連続的な顕微注入は困難であった。そこでタンニン酸を用いた卵の粘性除去<sup>1</sup>を検討し、0.05%タンニン酸含有の交配水槽水を卵に10分程度処理することで卵膜粘性が無くなることが分かった。胚発生は正常かつ、顕微注入時に卵を静置するためのアガロースゲル上でも容易にピンセットで作業可能となった。さらにタンニン酸無処理条件下では、ガラスキャピラリーを卵に挿入すると多くの場合で卵が破裂してしまうが、タンニン酸処理により卵膜が硬化し、溶液のインジェクションが簡便となった。

限られた個体数において人工授精系を検討するために、上記交配には不向きな老齢個体から精巢・卵巣を摘出し、組織の取り扱い方法について検討した。自然交配ができない老齢個体にもかかわらず、精子鞭毛は活動的であったことから、一部精子凍結を施した。また卵巣に関しては一部成熟した卵胞を確認できたものの、これを賦活化し受精に至らせることは補助期間中には達成できなかった。しかし代替案として検討した、上記の受精卵採取法の改善ならびに飼育設備改善により、幼魚・若魚の維持と、成熟個体の維持・継代が可能になった。今後の課題としては、現行の幼魚・若魚飼育システムでは性成熟に至るまでの期間が非常に長く（2年以上）、安定的な系統維持にはさらなる検討が必要である。

## (2)および(3) 遺伝子改変個体の作製

(1)において偶然ではあったが、遺伝子改変に至る前段階として受精卵調製法が確立したため、ゼブラフィッシュと同じToI2 transposon法による遺伝子改変を行った。*Ef1a*遺伝子プロモーター下で*EGFP*遺伝子が発現する遺伝子コンストラクトは、ゼブラフィッシュ遺伝子組換え技術においてベースとして汎用されるDNA試薬であり<sup>2</sup>、本課題でも同一の試薬・方法で実験を行った。受精後2日胚において、骨格筋組織や表皮においてGFPの蛍光が蛍光顕微鏡下で観察され、受精後10日（摂餌開始時期）においてもGFP蛍光が観察されたことから、ToI2 transposonによるゲノムへの遺伝子挿入が起きていることが分かった。また個体によってはハーフトランスジェニック個体として胚の半身にのみ遺伝子改変を導入することも可能であったことから、本課題で確立された技術により、ハーフトランスジェニック個体作製の難しい真骨魚類の形態・形質を研究するうえで、ポリプテルスの有用性があることが分かった<sup>学会発表</sup>。

またCRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins)法を用いたゲノム編集技術においては、近年目ざましい技術革新によりモデル動物・非モデル動物において技術応用がなされている。本課題の開始当初は、ごく初期バージョンのgRNAコンストラクト・Cas9 mRNAを用いた改変技術がゼブラフィッシュにおいて機能していたため、同一の方法をポリプテルスにおいて検討を行った。DNAコンストラクトを多数作製したのち、gRNA合成ならびに顕微注入実験をおこなったものの、ToI2遺伝子改変技術とは異なり正常発生する個体を得ることができず、またゲノムシーケンズ解析においてもゲノム編集が機能していなかった。そこでゲノム編集技術を用いる前段階として、CRISPR/Cas9法自体のプロトコルを見直し、補助期間中にはゼブラフィッシュを用いて良好な結果が得られる段階まで達成した。注入試薬はポリプテルスのToI2遺伝子改変法と類似したものを準備できるため、今後の課題としては、本補助事業で達成された遺伝子改変法を駆使し、後述する研究テーマの遂行ならびに国内外における共同研究の推進を行っていく。

## (4)「脊椎動物の上陸」を共通テーマとした研究課題の推進

ポリプテルスは、両生類・条鰭類魚類の双方の形質を併せもったユニークな脊椎動物である。脊椎動物の進化研究において、こうした原始的な形質をもつ動物を研究対象とすることで、「水棲動物の陸棲化に伴う形態進化メカニズム」や「水棲動物の水棲深化に伴う形態進化メカニズム」に迫ることができ、脊椎動物の上陸イベントを多面的に理解することを可能とする。本課題の遂行によって安定的に胚・個体を得られるというアドバンテージは、補助期間内において極めて重要な知見をもたらした。

ポリプテルスの特徴的な形質として、条鰭類魚類であるにもかかわらず肺に似た呼吸器官を有する点が第一に挙げられた。そこでポリプテルスの呼吸器官の発生過程について遺伝子・ゲノムレベルでの解析を行い、発生様式ならびに発生遺伝子を制御するゲノム領域（エンハンサー配列）が陸棲動物のそれらと酷似していることを示し、ポリプテルスの呼吸器官が分子発生学的に肺として定義づけられることを明らかにした<sup>発表論文</sup>。また肺発生は受精後9日というごく早い段階に開始するが、肺を機能的な呼吸器官として利用する以前の幼魚期においては、外鰓によってガス交換を行う。ポリプテルスの外鰓形成、特に鰓蓋部の筋発生について明らかにするために、頭部筋発生と神経支配について時空間的变化を記載し、脊椎動物の陸棲化への変遷において失われた可能性のある条鰭類特異的な舌骨弓の筋について新たな知見を得た<sup>発表論文</sup>。以上の結果は、我々ヒトに至る脊椎動物の陸棲化のキーポイントとなる「空気呼吸のための肺という呼吸器官」の形成メカニズムは、原始的な水棲脊椎動物が既に備えていた頑健なシステムの一例であった。一方で原始的な水棲脊椎動物がもつ外鰓の筋形成は、真骨魚へもしくは四肢動物へ進化する方向性それぞれに合わせて変化しうるシステムの一例であった。こうした剛柔を併せもった形態進化システムが垣間見れた本成果は、進化学として興味深くかつ発展的課題を秘めたものであった。

また脊椎動物の陸棲化に伴って、運動器官である付属肢（鰭・四肢）の骨パターン変化が起こったことは重要な点である。四肢動物であるマウス・ニワトリといったモデル動物の骨パターンとの比較対象として、真骨魚類であるゼブラフィッシュの鰭は骨パターンを研究する格好の材料であるが<sup>3</sup>、真骨魚類は水棲深化した形質であると言えるため、より原始的な条鰭類魚類の鰭の骨パターン解析が必要であった。そこでポリプテルスの骨パターンでも特に鰭条骨に着目した。脊椎動物の陸棲化において、扇子の骨組みのように配向する鰭条骨は鰭から失われ、代わりに指骨を獲得することで四肢として定義される。四肢動物の指骨の指節間関節は関節包・関節包を有した可動関節である一方で、鰭の鰭条骨同士の連結部分は節間靭帯と呼ばれる密性（線維性）結合組織から成ると考えられてきた。そこでポリプテルス成魚の鰭条骨を組織学的解析したところ、関節腔が存在し、これは節間靭帯によって関節包状に覆われていることが明らかとなり、これを鰭節間関節と定義できる可能性が浮上した<sup>学会発表</sup>。以上の成果は、指骨と鰭条骨の発生遺伝学的共有性（deep homology）を考えるうえで今後新しい着眼点を与えるものであると考えている。

この他にはポリプテルスを用いた共同研究の推進により、本邦の進化学研究・発生学研究の進展に貢献した（5. 主な発表論文等を参照）。また南米・ヨーロッパ・アフリカ諸国の研究者と補助期間中に直接話し合い、情報交換・共同研究の締結等を行うことで、本課題で達成された技術革新や最新の知見を補助期間終了後も発展できるように努めた。

#### < 引用文献 >

- 1 楠田 聡、寺西哲夫. 卵の粘性除去とその管理方法について. *魚と水* 33 37-42 (1996)
- 2 Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174(2):639-649 (2006)
- 3 Yano T, Abe G, Yokoyama H, Kawakami K, Tamura K. Mechanism of Pectoral Fin Outgrowth in Zebrafish Development. *Development* 139(16):2916-2925 (2012)

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Noda M, Miyake T, Okabe M. Development of cranial muscles in the actinopterygian fish Senegal bichir, *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829. *Journal of morphology* 278(4) 450-463 (2017) 査読有 DOI: 10.1002/jmor.20636.

Tatsumi N, Kobayashi R, Yano T, Noda M, Fujimura K, Okada N, Okabe M. Molecular developmental mechanism in polypterid fish provides insight into the origin of vertebrate lungs. *Scientific reports* 6 30580 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep30580.

Nagasawa T, Kawaguchi M, Yano T, Sano K, Okabe M, Yasumasu S. Evolutionary changes in the developmental origin of hatching gland cells in basal ray-finned fishes. *Zoological science* 33(3) 272-281 (2016) 査読有 DOI: 10.2108/zs150183.

Moriyama Y, Ito F, Takeda H, Yano T, Okabe M, Kuraku S, Keeley FW, Koshiba-Takeuchi K. Evolution of the fish heart by sub/neofunctionalization of an elastin gene. *Nature communications* 7 10397 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/ncomms10397.

Hayashi S, Kobayashi T, Yano T, Kamiyama N, Egawa S, Seki R, Takizawa K, Okabe M, Yokoyama H, Tamura K. Evidence for an amphibian sixth digit. *Zoological letters* 1 17 (2015) 査読有 DOI: 10.1186/s40851-015-0019-y.

〔学会発表〕(計 13 件)

矢野十織、岡部正隆. 条鰭類の鰭条骨関節の組織学形態と分子特性. 動物学会第 71 回支部大会 中央大学後楽園キャンパス (東京都). 2019. 3.9

井上龍太郎 他. MALDI-TOF を用いたポリプテルス側線感丘形成予定表皮の網羅的分子解析. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学 (東京都) 2018. 3.28-30

Shigetani Y 他. Transition of basal lamina during lateral line migration in Polypterus. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (Kobe, Japan) 2017.12.6-9

矢野十織 他. 原始魚類ポリプテルスの実験動物化を目指した基盤整備. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎大学坂本キャンパス (長崎県) 2017. 3.27-30

重谷安代 他. ポリプテルスの体軀側線感丘は発生を通じて表層に見られる. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎大学坂本キャンパス (長崎県) 2017. 3.27-30

辰巳徳史 他. 肺が先、鰾が後 ポリプテルスでわかった肺、鰾の進化. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎大学坂本キャンパス (長崎県) 2017. 3.27-30

岡部正隆. 脊椎動物の進化発生学研究における「古代魚」ポリプテルス. (シンポジウムトーク). 第 39 回日本分子生物学会年会 (神奈川県) 2016.12.1

重谷安代 他. ポリプテルス側線感丘の形態形成. 第 6 回東京形態形成研究会 (東京都) 2016.8.6

辰巳徳史 他. ポリプテルスは四足動物と共通した肺を持つ. 第 6 回東京形態形成研究会. (東京都) 2016.8.6

Shigetani Y 他. Morphogenesis of lateral line neuromast in the trunk of Polypterus. The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016) (Yokohama, Japan) 2016.6.5-9

長澤竜樹 他. 孵化腺細胞は 2 種類の下位条鰭類の間で異なる胚葉から分化する. 第 86 回日本動物学会 新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ (新潟県) 2015. 9.17-19

長澤竜樹 他. 脊椎動物孵化腺細胞の発生進化的解析. 第 17 回日本進化学会 中央大学後楽園キャンパス (東京都) 2015. 8. 20-23

重谷安代 他. 原始的特徴を示す魚ポリプテルスにおける体幹の側線感丘の形態形成. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド (兵庫県) 2015.12.2

〔図書〕(計 1 件)

矢野十織、阿部玄武、岡部正隆、田村宏治. 脊椎動物の上陸 ー水面の下でつくり込まれた陸生装備ー. 動物学の百科事典. 日本動物学会編. 丸善出版 162-163 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/02\\_sokaibo.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/02_sokaibo.html)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：矢野十織

ローマ字氏名：YANO Tohru

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10648091

(2)研究協力者

研究協力者氏名：辰巳徳史

ローマ字氏名：TATSUMI Norifumi

研究協力者氏名：長澤竜樹

ローマ字氏名：NAGASAWA Tatsuki

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。