

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21006

研究課題名(和文)ポリプテルスの外鰓形成から解き明かす、脊椎動物の呼吸器官の進化

研究課題名(英文) External gill development in bichirs and the evolution of vertebrate respiratory organ

研究代表者

藤村 衡至 (Fujimura, Koji)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：90722140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の肺は硬骨魚類の祖先で咽頭弓と関連して形成される形で獲得され、条鰭類の系統で肺から鰾へと進化したと考えられている。系統樹上で鰓呼吸する真骨類と肺呼吸する羊膜類の中間に位置する生物は、幼生期に外鰓をもつ。ポリプテルスの外鰓形成を実験発生学的に調べ、外鰓形成と咽頭弓のパターニングが密接に関係していることを明らかにした。本研究では、RNAseqによりポリプテルスの外鰓形成にかかわる分子機構を解析した。

研究成果の概要(英文)：Structure of the ventral lung is thought to be acquired in the common ancestor of actinopterygians and sarcopterygians, associated with pharyngeal pouch formation, and evolved as dorsal swimbladder in the actinopterygian lineages. Some animals of the lineages between gill-breathing teleosts and air-breathing tetrapods, have external gills during their larval period. The external gill development of *Polypterus senegalus* was examined experimentally, and found close related to the pharyngeal arch patterning. Thus, molecular mechanism of the external gill development was analyzed using RNA-seq.

研究分野：進化発生

キーワード：ポリプテルス 外鰓 RNAseq

1. 研究開始当初の背景

水中に生息する魚類は呼吸器官として鰓を用いるが、陸上に生息する羊膜類は肺を用いる(図1)。このように、脊椎動物が水中から陸上へと進出した際に、呼吸器官は大きく変化した。しかし、肺は、陸上進出に伴って新奇に獲得されたわけではなく、水中で生活していた硬骨魚類の祖先で獲得されたと考えられている。

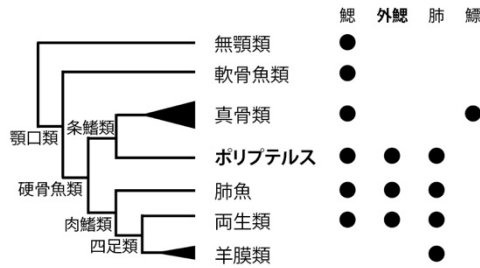


図1 脊椎動物の呼吸器官の進化

では、肺はどうやって生じたのだろうか？肺は、個体発生上、咽頭直後の食道前端に膨らみとして形成される。Makuschok(1914)はこの肺原基を、胚発生の咽頭の内側にくぼみとして形成される咽頭嚢と相同なものとして捉え、その最後尾に出来たものであろうと考えた。

そのようにして形成された、“気体を含む”袋”は、はじめ浮力調整に機能し、その後、呼吸器官として役割をもつようになったと思われる。

一方で、咽頭弓の繰り返し構造も呼吸器官の進化と関連して変化した。咽頭弓から形成される、鰓を支持する鰓弓骨格は、鰓をもつ真骨魚では5対と保存されているのに対し、鰓呼吸をしなくなった四足類では4対から1対へと徐々に数を減らし喉頭の骨格へと変貌した。Edgeworth(1935)は、この鰓弓の減少は咽頭弓の発生プログラムの変化によって引き起こされたと考えた。

肺は上述のように咽頭弓と関連して形成され進化したと解釈されるが、現在までのところ、それを裏付けるデータはない。

ポリプテルスは、現在、条鰭類の最も祖先的な系統として分類されているが、肺をもち、鰓弓を4つしかもたないなど、真骨類と四足類の中間的な形質を示す。

ポリプテルス・肺魚・両生類のような、系統

樹上で真骨類と羊膜類の中間に位置する動物には、幼生期に外鰓をもつものがある。外鰓は、鰓が形成されるよりかなり早い時期に、鰓弓の背側に形成される。鰓蓋の内側に形成される鰓とは対照的に、体の外側に飛び出して形成される外鰓は、新鮮な水に絶えず接することができるため、成長に伴って消失するまで、鰓呼吸の補助をしていると考えられる。

これまで外鰓の発生について詳細に研究されていない。ポリプテルスや肺魚の胚はそもそも取得することが難しく、また発生学によく用いられる無尾両生類は痕跡程度の外鰓しかもたない。

本研究代表者は、ホルモン剤を用いたポリプテルス (*Polypterus senegalus*)の繁殖法を確立し、ポリプテルスの発生学的に研究できる体制を整えた。そして、本研究の予備実験として、ポリプテルスの外鰓形成について実験発生学的に調べ、

- 1) 神経堤細胞自体には受動的な役割しかなく、外側に存在する表皮外胚葉からのシグナルが外鰓形成を誘導していること
- 2) その外側の表皮外胚葉からのシグナルが、内側の咽頭内胚葉(咽頭嚢)の膨出を引き起こし、咽頭弓のパターニングにも影響を与えていること

を明らかにした。これらの結果は、外鰓形成が、咽頭弓のパターニングを通じて、肺形成に影響を与えている可能性を示唆した。

この予備実験の成果を踏まえ、「外鰓形成に関わった分子機構が、脊椎動物の進化の過程で、肺を創り出し、鰓弓の減少を引き起こしたのではないか」という仮説を立てた(図2)。

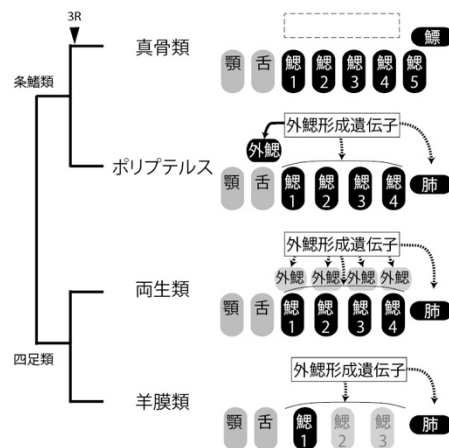


図2 外鰓形成と咽頭弓のパターニングと肺形成との関係性を示す概念図

2. 研究の目的

本研究は、古代魚ポリプテルスの外鰓形成の分子機構を明らかにし、咽頭弓のパターニングや肺形成との関係性を調べることによって、脊椎動物の肺の進化的起源や咽頭弓の進化の道筋を実験的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、

- ①ポリプテルスの「表皮外胚葉」の組織片から RNA を抽出し RNAseq 解析をおこない、外鰓形成の誘導に関与する遺伝子の候補を選び出す。
- ②ポリプテルス胚の樹脂包埋切片を作成し、外鰓形成と肺形成について詳細な組織学的解析をおこなう。
- ③ポリプテルス胚を用いて発現解析や機能解析をおこない、候補遺伝子が外鰓形成にどのように関わっているのか、明らかにする。
- ④咽頭弓のパターニングや肺形成は外鰓形成と関連性があるのか、実験的に検証する。

をおこなうことによって、ポリプテルスの外鰓形成の分子機構を明らかにし、咽頭弓のパターニングや肺形成との関係性を実験的に検証することを、当初の計画とした。

4. 研究成果

研究計画①「表皮外胚葉」の組織片の RNAseq 解析は、*P. senegalus* のゲノム解読の一環としておこなった。本研究の RNAseq 解析には、レファレンスとなるゲノムデータと遺伝子のアノテーションデータが必要であったためである。

ゲノム解読は慈恵医大の岡部正隆教授を中心としたコンソーシアムによっておこなわれており、本研究代表者も参画している。

現在までに、国立遺伝学研究所の藤山秋佐夫教授・豊田敦准教授により、*P. senegalus* の全ゲノムの塩基配列を決定されている。また、本研究代表者が調整した、成魚の臓器（嗅上皮・眼球・脳・肝臓・脾臓・腎臓・精巢・肺・消化管・心臓・筋肉・表皮・卵巣）および発生段階（St. 19-21, St. 24-25, St. 28-30）の各サンプルを用い RNAseq 解析がおこなわれ、それらのデータや既存のトラ

ンスクリプトームデータに基づき *P.*

senegalus の全遺伝子が特定されている。

しかし、これらのゲノム情報が整うまでに時間が要した。一般的な魚である真骨類のゲノムサイズは 1GB 弱であるのに対して、ポリプテルスのゲノムサイズが 3 倍大きいためである。

そのため、本研究についても、当初の計画より大幅に遅れ、現在も、①の「St. 19-21 の表外胚葉の組織片」の RNAseq 解析をおこなっているところである。予定していた研究期間を終了してしまったが、引き続いて①の RNAseq 解析をおこない、当初計画の③の発現解析と機能解析、および④の実験的検証を遂行する予定である。

また、②の組織発生的解析に関しても、使用する胚サンプルを研究室で繁殖飼育することによって取得する計画であったが、初年度、幾度か試みたものの取得できなかった。水槽設備があった建物が老朽化していて水質環境が悪かったためであると考え、別建物へ移設し環境改善を図った。その結果、次年度、ようやく胚サンプルを取得できるようになった(図 3、4)。こちら引き続きおこなう予定である。



図 3 産み付けられた受精卵



図 4 回収し、シャーレに分け、恒温器の中で育てている受精卵

解読されたポリプテルスのゲノムデータを用いて、比較ゲノム解析をおこない、肺形成に関わる分子メカニズムが硬骨魚類の祖先の段階で獲得されていたことを明らかにした。

Tbx4 遺伝子は肺形成に関わることが知られていて、これまでに肺での発現を制御する肺エンハンサーが実験的に特定されていた。

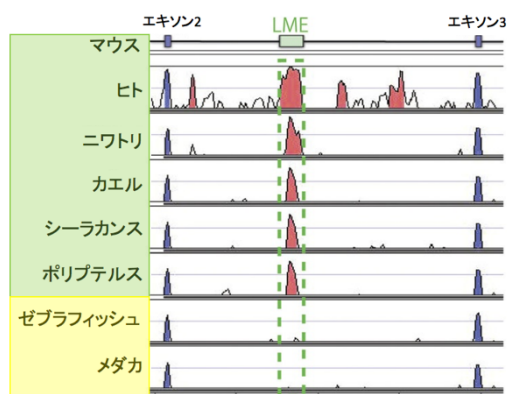


図5 *Tbx4* 遺伝子の比較ゲノム解析

そこで、我々の研究グループは、ゲノム解読されている他の脊椎動物の *Tbx4* 遺伝子領域とともに比較解析し、鰾をもつ条鰭類には肺エンハンサーが存在しないのに対し、陸上の四足類だけでなくシーラカンスやポリプテルスにも *Tbx4* 遺伝子の肺エンハンサー (LME) が存在することを発見した(図5)。さらに、それらがニワトリ胚の肺形成で機能することを実験的に示した。

これらの研究成果を発展させる形で、「硬骨魚類で生じた肺から鰾への進化」と「真骨類で生じた有管鰾から無管鰾への進化」に関するゲノム進化も解析している。

本研究を遂行し、将来的に、脊椎動物の肺と鰾の進化を包括的にまとめる予定である。

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1件)

- 1) 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*, 査読有り, 2016, 6, 30580. doi:10.1038/srep30580.

[学会発表] (計2件)

- 1) 藤村 衡至. 「熱帯魚を使った、肺/鰾に関する進化発生学的な研究」新潟大学コア・ステーション 形の科学研究センター シンポジウム, 口頭発表, 2016/9/3, 新潟大学理学部附属臨海実験所 新潟県佐渡市.
- 2) 渡邊和、福寿悠星、藤村 衡至. 「ナイルティラピアの鰾形成について」第6回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, ポスター発表, 2016/8/6, 東京慈恵会医科大学 東京都港区.

[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]

研究室ホームページ:

<http://env.sc.niigata-u.ac.jp/~kojifuji/top-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 衡至 (FUJIMURA, Koji)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 90722140