

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07384

研究課題名(和文) 第二心臓予定領域の進化

研究課題名(英文) Evolution of second heart field

研究代表者

日下部 りえ (Kusakabe, Rie)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：70373298

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)：頭部と体幹部の境界領域では、複数の中胚葉系列(頭部中胚葉、側板中胚葉、体節)が互いに入り組み、首、肩、前肢、心臓など、脊椎動物特有の構造が現れる。本研究では、このような中胚葉領域パターニングの進化的背景を探る目的で、頭部中胚葉の一部である第二心臓予定領域(SHF)に注目し、その分子的特徴を、祖先的な形質を残す動物種(ヤツメウナギ、サメ)で解明することを目指した。遺伝子の発現パターンの解析および機能解析により、頭部/体幹部境界領域に生じる上記の筋組織およびそのほかの中胚葉性組織が、神経堤細胞などに由来する骨格や結合組織と連携し「神経-筋-骨格」という緻密な連携を作り出す過程の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで骨格筋や心筋は発生のごく初期に、独立した中胚葉領域に確立されるものと考えられ、それぞれの筋分化を制御する遺伝子が調べられてきた。本研究は頭部と体幹部の境界領域という、複数の細胞系列が入り混じる身体的な部位に焦点をあて、中胚葉だけでなく神経堤細胞などの移動性細胞も視野に入れた。この身体領域は脊椎動物に特徴的であり、系統ごとに多様な形態と機能を獲得している。本研究は最初期に分岐した動物群に、SHFの存在と分布様式を見出す試みである。また祖先的・単純な形質を残す動物から、細胞移動や分化を制御する遺伝子を見出し、系統間の比較を行うことで様々な器官の起源と多様化機構の解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the vertebrate head-trunk interface, multiple mesodermal precursor cell populations (head mesoderm, lateral plate mesoderm and somites) are combined to form the complex structures characteristic to vertebrates, such as the neck, shoulder, forelimbs and the chambered heart. In this study, we chose the lampreys and sharks as the models to clarify the molecular features and evolution of patterning mechanisms of these structures, focusing on the origin of second heart field (SHF), a subdomain of head mesoderm. We carried out comparative analyses of expression patterns and functions of developmental genes during embryogenesis. The results revealed the process of differentiation in which the muscles, the heart and other mesodermal organs are formed through the interaction between muscle precursors and non-mesodermal tissues such as neural crest cells.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：ヤツメウナギ 形態進化 骨格筋 中胚葉 心臓 発生・分化 円口類 軟骨魚類

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物のからだには、形態も機能も特殊化した筋肉(骨格筋、心筋、平滑筋)が配置され、運動、呼吸、血液循環、消化など、生命維持に不可欠な機能を果たしている。発生過程において、体幹部の骨格筋は体節に(図1a)、頭部の骨格筋(咀嚼筋など)の多くは、分節性をもたない頭部中胚葉(図1b)に由来する。さらに前方の体節から、一部の筋芽細胞が脱上皮化して頭部に侵入し、鰓下筋系(例:哺乳類の舌筋)を形成する(図1c)。

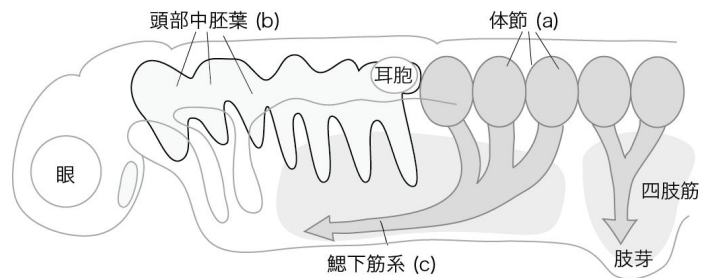


図1. 脊椎動物胚における筋前駆細胞の挙動(体の左側面)。体幹部の骨格筋は体節に由来する。四肢(対鰭)筋、舌筋(鰓下筋)は、体節から筋芽細胞が長距離移動してできる(矢印)。

頭部と体幹部の境界領域(図2)は、上述の鰓下筋の移動経路であると同時に、複数の中胚葉領域や神経堤細胞が出会い、筋肉・骨格・神経の連携が作り出される領域である。鰓下筋が円口類ヤツメウナギにも存在することなどから、この領域のパターニング機構は、脊椎動物進化の初期に獲得されたと推察される(Kusakabe et al., 2011)。

この領域から派生し、脊椎動物特有の複雑な器官に分化する細胞集団として、第二心臓予定領域(second heart field; SHF)がある。SHFの細胞は頭部中胚葉に属し、形成中の原始心筒(側板中胚葉の前方部分=first heart fieldに由来)に向かって遊走し(図2)、流出路や右心室など特定の部位を形成する。SHFは発生の初期に、転写因子 Islet1 や Tbx1 を特異的に発現する細胞集団であり、哺乳類のほか、ゼブラフィッシュやツメガエルにも存在することが示唆されてきた(Brade et al., 2007; Cai et al., 2003; Hami et al., 2011)。しかし、頭部中胚葉内にどのような位置情報が作用してSHFが成立するか、SHF細胞の移動と分化はどのように制御されるか、また、SHF細胞が長距離を移動して心臓形成に加わることの機能的・進化的な意義については、未解明なままであった。

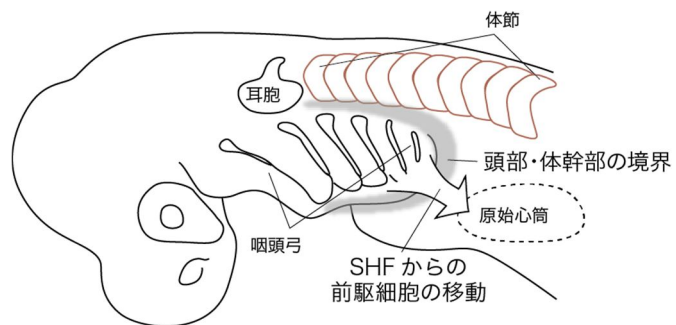


図2. 頭部中胚葉には第二心臓予定領域(SHF)が存在し、そこから遊走する前駆細胞(矢印)は、頭部・体幹部境界を越えて、形成中の心臓(原始心筒)に付加される。

## 2. 研究の目的

上記の問題に迫る第一歩として、より祖先的な動物でのSHFの存在と、遺伝子レベル・細胞レベルの挙動の比較を行う必要がある。本研究では、円口類ヤツメウナギや板鰓類(軟骨魚類)トラザメを用いて、頭部・体幹部境界領域の中胚葉の区域化と細胞移動パターン、そして他の心臓前駆細胞(側板中胚葉や神経堤細胞)との相互作用を調べ、心臓そのものおよび近傍の器官(肩帯や前肢など)の複雑化がどのように関連しているかを解き明かす。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の解析により、ヤツメウナギおよびトラザメの SHF の分布と挙動を、分子マーカーを用いて解明し、形態学的な観察と合わせて記述する。また心臓原基への移動について、細胞の移動能とガイダンスに関わる遺伝子間相互作用を明らかにし、他の脊椎動物の場合と比較する。

(1) ヤツメウナギおよびトラザメの胚の組織切片標本を作製し、一般的な染色法により、咽頭弓中胚葉・側板中胚葉・神経堤細胞に由来する筋肉や軟骨組織を可視化し、位置関係の変化を詳細に観察する。

(2) *Islet1*, *Tbx* 遺伝子群、*Itbp3*, *Mesp* など SHF に特異的に発現する遺伝子、*Alx4* などの咽頭弓中胚葉で働く遺伝子、および *GATA4/5/6* や *Nkx2.5* など心筋分化に必須な遺伝子の発現パターンを詳細に調べ、1) で得られる知見と照合する。得られた結果から、SHF がヤツメウナギやサメに存在するか否かを検討する。

(3)(1)と(2)の過程で得られる遺伝子候補について、ゲノム編集技術によるレポーター遺伝子のノックインおよび、遺伝子機能破壊(ヤツメウナギ)を行う。

これらの結果を羊膜類での知見とも比較し、脊椎動物の共通祖先に備わっていた頭部/体幹部境界領域の中胚葉区分とその変遷を解明する。

#### 1. 研究成果

##### (1) ヤツメウナギ およびトラザメにおける新規遺伝子の単離と発現パターンの解析

日本産カワヤツメ *Lethenteron japonicum* について、心臓形成および骨格筋形成に関連する遺伝子(上述のものを含む)を単離し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、初期胚における発現パターンを調べた。また、体節の一領域である皮筋節および神経堤細胞の挙動を観察するために、*Pax3/7* 抗体やミオシン抗体を用いた免疫染色も行った。またトラザメ *Scyliorhinus torazame* についても初期胚における遺伝子発現解析を行い、ヤツメウナギおよび羊膜類での知見と比較した。これらの実験結果から、ヤツメウナギの体節由来骨格筋とサメの軸下筋の分化タイミングを対比し、顎口類の軸下筋の多様化・複雑化の機序について考察した。

##### (2) ヤツメウナギ 受精卵を用いた遺伝子操作技術の確立

上記の個々の遺伝子について胚における機能を解析する必要があるが、ヤツメウナギとサメは人工的な環境での継代が不可能であり、トランスジェニックシステムを用いた研究には不向きである。この問題点を踏まえ、受精卵において遺伝子操作(ゲノム編集)を行った個体そのものを用いて、表現型を観察する実験も行った。得られた胚のゲノム DNA を抽出し、配列を解読したところ、編集を行った領域が破壊されていることが確認できた。遺伝子破壊率は各個体でばらつきがあるが、高い確率で破壊が起こっている個体について形態の異常を調べた。

試行実験では体節に由来する筋肉に特異的な遺伝子のターゲティングを試み、次世代シーケンスでの解析のゲノム配列解析を行ったところ、F0 世代における欠損効率が個体レベルで明

らかになった。ヤツメウナギは人工的な継代が不可能な動物であるが、この技術により、遺伝子が高率で破壊された個体を選別した上で表現型解析に進むことが可能となった。また、羊膜類で

### (3) トラザメにおける細胞系譜追跡実験

トラザメについてもマイクロインジェクションによる細胞標識を行い、特定の中胚葉組織の挙動を発生過程を通じて観察した。

### (4) 結果の総括

(1)-(3)の結果をヤツメウナギとトラザメで比較し、羊膜類で得られている知見と合わせて検討し、次のような考察をまとめた。

筋前駆細胞の挙動に関わる遺伝子が脊椎動物の共通祖先に獲得され、軟骨魚類の分岐以前に重複し、筋肉の複雑なパターン形成を担うに至った。

トラザメの体節細胞のうち咽頭底の前方まで進展するもの、および鰓弓部背側の筋前駆細胞は、長期に渡って未分化状態が保たれ、非体節性の骨格との連携を確立しながら分化する。

顎口類の鰓下筋のうち最も前方のものは、顎口類の共通祖先で獲得されたノベルティであると考えられる。

頭部と体幹部の境界領域という、複数の細胞系列が入り混じる身体的な部位には、鰓弓筋（顎や咽頭の筋肉）、舌筋、食道に付随する筋、また本研究の主要なテーマである心臓など、さまざまな組織の前駆細胞が派生する。周辺の非筋組織（軟骨や神経に分化する神経堤細胞など）は前駆細胞の移動環境として機能し、結果として「神経-筋-(骨格)」という緻密な連携をつくりだす。本研究により、頭部・体幹部境界領域に働く制御遺伝子の相互作用について、祖先的な動物（ヤツメウナギ、サメ）において、他の系統と比較可能な知見を得ることができた。

### 引用文献

Brade, T., Gessert, S., Kuhl, M., Pandur, P., 2007. The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Dev Biol* 311, 297-310.

Cai, C.L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.H., Pfaff, S.L., Chen, J., Evans, S., 2003. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5, 877-889.

Hami, D., Grimes, A.C., Tsai, H.J., Kirby, M.L., 2011. Zebrafish cardiac development requires a conserved secondary heart field. *Development* 138, 2389-2398.

Kusakabe, R., Kuraku, S., Kuratani, S., 2011. Expression and interaction of muscle-related genes in the lamprey imply the evolutionary scenario for vertebrate skeletal muscle, in association with the acquisition of the neck and fins. *Dev Biol* 350, 217-227.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuratani Shigeru, Kusakabe Rie, Hirasawa Tatsuya	4. 巻 444
2. 論文標題 The neural crest and evolution of the head/trunk interface in vertebrates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 S60 ~ S66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2018.01.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tani-Matsuhana Saori, Kusakabe Rie, Inoue Kunio	4. 巻 228
2. 論文標題 Developmental mechanisms of migratory muscle precursors in medaka pectoral fin formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development Genes and Evolution	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00427-018-0616-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eri Okamoto, Rie Kusakabe, Shigehiro Kuraku, Susumu Hyodo, Alexandre Robert-Moreno, Koh Onimaru, James Sharpe, Shigeru Kuratani and Mikiko Tanaka	4. 巻 1
2. 論文標題 Migratory appendicular muscles precursor cells in the common ancestor to all vertebrates.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Ecol. Evol.	6. 最初と最後の頁 1731-1736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41559-017-0330-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 日下部りえ	4. 巻 34
2. 論文標題 ヤツメウナギで解き明かす進化の謎	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3086-3090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Rie Kusakabe
2. 発表標題 Lbx genes and evolution of skeletal muscles
3. 学会等名 The 6th Society of Skeletal Muscle Cells (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日下部りえ
2. 発表標題 ヤツメウナギとサメから探る、脊椎動物の初期進化
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第70回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Evolution and development of muscle tissues at the head/trunk interface.
3. 学会等名 2nd Biennial Meeting Pan-American Society for Evolutionary Developmental Biology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日下部りえ、樋口真之輔、倉谷滋
2. 発表標題 頭部 - 体幹部境界領域における筋肉の発生と進化
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Evolution and development of muscles in the head/trunk interface of vertebrates
3. 学会等名 Frontier of Myogenesis meeting: Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Development and Homeostasis in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Divergence and elaboration of skeletal musculature in early vertebrates
3. 学会等名 The 11th International Congress of Vertebrate Morphology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Development and evolution of mesodermal components of early vertebrates
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 75th Annual Meeting-International Society of Differentiation 19th International Conference (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Kusakabe
2. 発表標題 Molecular basis for divergence and elaboration of skeletal muscles
3. 学会等名 第4回若手による骨格筋細胞研究会 The 4th Society of Skeletal Muscle Cells (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Evolution and development of skeletal musculature in early vertebrates: with special reference to the head/trunk
3. 学会等名 International Symposium: Morphological Evolution of Vertebrates: The Joint meeting of The 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 公益社団法人日本動物学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 800
3. 書名 動物学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考