

令和元年5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14789

研究課題名(和文) オウム類の前後にずれた嘴はいかにして作られるか？脊椎動物の顔面形態進化機構に迫る

研究課題名(英文) How is the beak of parrots formed? Understanding evolutionary mechanisms of vertebrate facial morphology.

研究代表者

土岐田 昌和 (TOKITA, Masayoshi)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：80422921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-seqを用いて、オカメインコ、ウズラ、アヒルの胚の上下それぞれの嘴源基で発現する遺伝子の発現プロファイルを種間で比較し、オカメインコの上下嘴間でのみ発現レベルに顕著に差がある遺伝子(DEG)を探索した。in situハイブリダイゼーション法を用いて、ランキング1位の構造タンパク質をコードするDEGの胚顔面部における発現パターンを調べ、パターンの種間比較を行った。オカメインコ胚では下嘴間葉での本DEGの発現ドメインの顕著な拡大が認められた。以上の結果から、本DEGはオウム類の嘴において間葉の分化に対して抑制的に働くことで、下嘴の伸長を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物は餌を上下の顎で保定し、噛み砕くため、ほとんどの種で上下の顎の長さは等しくなっている。興味深いことに、ヒトで上顎に比べ下顎が短くなる「小顎症」と呼ばれる先天性疾患が知られる。「小顎症」は呼吸障害や摂食障害を引き起こすため、生存に不利である。本研究では一般に生存に不利であると考えられる「前後にずれた」嘴をもつオウム目の鳥類に着目し、彼らの嘴の発生機序を探究した。本研究により、オウム目の嘴形成メカニズムの一端が明らかになったことで、ヒト小顎症の発生機序の理解や治療法の開発にも洞察を与えることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using RNA-seq, expression profiles of the genes expressing in the upper and lower beak primordia were compared among 3 species of birds: the cockatiel (a species of parrots), Japanese quail, and duck, and the genes differentially expressed between the upper and lower beaks of cockatiel embryos were identified. Next, using in situ hybridization, expression pattern of the top-ranked differentially expressed gene (DEG) was described in the upper and lower beak tissues of the embryos of 3 species of birds and the pattern was compared among the species. The expression domain of this top-ranked DEG, which is encoding a structural protein, was significantly expanded in the mesenchyme of the lower beak of cockatiel embryos. The result suggests that the gene may inhibit the growth of the lower beak of parrots through repressing mesenchymal differentiation of their lower beak.

研究分野：形態進化生物学

キーワード：脊椎動物 オウム類 嘴 形態 発生 比較 進化 小顎症

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

### 1. 研究開始当初の背景

オウム目は約 350 種から構成され、南半球を中心に繁栄を遂げた鳥類系統の 1 つであるが、その繁栄にあたっては本群特有の頭部形態の獲得があったと考えられる。例えば、「篩骨下顎筋」と「擬咬筋」は鳥類の中でもオウム類だけがもつ顎筋であり、これら独自の筋を獲得することにより咬合力を増大させ、他の系統の鳥が消費することができない硬い種皮を持つナッツ類を摂食できるようになった。本群は他にも上嘴に大きな可動性を与える溝状の「頭蓋顔面蝶番」など特異な骨格構造も併せもつ。これら一連の新奇形態は近縁なスズメ目やハヤブサ目の鳥には一切見られず、頭部を構成する複数の組織を巻き込んでいることから、オウム類は頭部形態を大規模に改変することで複合適応形態を獲得した“ナチュラルミュタント”であると言える。本研究は鳥類ひいては脊椎動物全体でも珍しいオウム類の“前後にずれた”嘴に焦点を当て、進化発生学的手法により、その形成メカニズムの解明を目指すものである。

### 2. 研究の目的

オウム類の大きな特徴の 1 つである“前後にずれた”嘴を作り出す分子・細胞レベルのメカニズムを解明するため、胚発生期の嘴組織における細胞の分裂活性を定量評価するとともに、嘴形態を決定する主要な遺伝子を特定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

オウム類における“前後にずれた”嘴の形成メカニズムを明らかにするため、本研究では以下の 4 つの解析を実施する予定であった。

細胞増殖マーカー EdU を用いた嘴組織での分裂期細胞の分布パターンの定量評価

qRT-PCR 法による候補遺伝子の嘴組織における発現動態の記述

RNA-seq 法を用いた嘴形態の制御に関わる遺伝子のスクリーニング

ニワトリ胚におけるウィルスベクターによる候補遺伝子の機能解析

上記解析 ~ では“正常な”嘴を持つウズラ（キジ目）とアヒル（カモ目）をオカメインコ（オウム目）との比較に用いる計画であった。

### 4. 研究成果

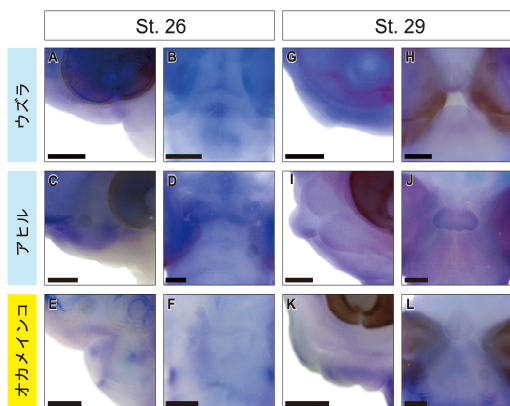
研究の初年度に当たる平成 28 年度は細胞増殖マーカーである

EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を用いて、鳥類胚の嘴組織での分裂期細胞の分布パターンの定量評価を行う計画であった。鳥類の嘴形態の多様性が作り出される背景には、嘴を構成する細胞がいかに増殖するかが大きく関わっていると予想される。鳥類の胚期の嘴源基先端部には細胞の分裂活性が極めて高い「成長域 (growth zone)」と呼ばれる領域が存在し、海外の研究チームが実施した先行研究により形状の異なる嘴を持つウズラとアヒルの胚では上顎の成長域の空間パターンが異なることが報告されていた。しかしながら、先行研究では下顎の解析は行われておらず、上下で長さの揃った正常な嘴を作り出す上で細胞の増殖様式がどう関わっているかは長らく不明であった。そこで、研究代表者は細胞増殖マーカー、EdU を用いて、オカメインコ（オウム目）、ウズラ（キジ目）、アヒル（カモ目）の 3 種の鳥類の嘴形成期にある一連の発生段階の胚の上下の嘴組織において、分裂期細胞を特異的に染色し、分裂期細胞の分布パターンの記述と得られたパターンの種間比較を試みた。標準プロトコールに従い、鳥類胚顔面組織に EdU を導入し、組織切片を作成後、EdU で標識された細胞の検出を試みたが、上下顎に十分な数の標識細胞を持つ標本を一定数得ることができなかつたため、3 種間の定量比較を行うことはできなかつた。この結果を受け、EdU 導入のプロトコールを自ら確立し、解析に供することが可能な標本を得ようと試みたが、最終的にプロトコールの確立まで至らず、目的のデータを得ることができなかつた。

研究二年目に当たる平成 29 年度はオカメインコ、ウズラ、アヒルの胚（いずれも胚発生ステージ 26）の上下それぞれの嘴源基で発現する全ての遺伝子をハイスループット DNA シーケンサを用いた RNA-seq により網羅的に特定し、その発現プロファイルを種間で比較することで、オカメインコの上下嘴間でのみ発現レベルに顕著に差がある遺伝子 (DEG) を特定するという当初の計画に則り、研究を進めた。ウズラとアヒルについては、ゲノム情報がすでに公開されているためそれらをリファレンスとして、塩基配列のマッピングを行った。その結果、ウズラで約 80%、アヒルで約 70% の配列をマッピングすることができた。一方で、オカメインコについてはゲノム情報が公開されていないため、同じオウム目の種であるセキセイインコのゲノム情報をリファレンスに用いて、配列のマッピングを行った。その結果、20% 程度の低い確率でしか配列をマッピングすることができなかつた。ウズラとアヒルの 2 種については、Stringtie を利用することで、DEG の検出を行うことができた。オカメインコについては、リファレンスゲノムへの配列のマッピングがうまくいかなかつたことから、RNA アセンブリによる転写物配列の一覧表の作成を進めた。その結果、インコの上下嘴間でのみ発現レベルに顕著に差がある遺伝子 (DEG) を複数特定することができた。

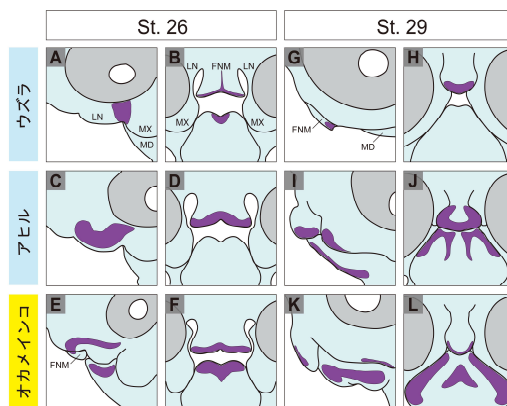
研究最終年度である平成 30 年度は、前年度の解析の結果同定された DEG のオカメインコ、ウズラ、アヒルの胚の顔面部における発現パターンについて、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて調べ、パターンの種間比較を行った。DEG として複数個の遺伝子が特定されたが、そのうち種間差がもっとも顕著であったランキング 1 位の（構造タンパク質をコードする）DEG に注目し、発現解析を実施した（図）。

オカメインコ、ウズラ、アヒルの各ステージにおける 遺伝子X の発現領域



スケールバー | 1 mm

オカメインコ、ウズラ、アヒルの各ステージにおける 遺伝子X の発現領域の模式図



FNM: 前頭鼻隆起、LN: 外側鼻隆起、MD: 下顎突起、MX: 上顎隆起

胚発生ステージ 26 では、3 種間の上嘴において本 DEG の発現パターンに顕著な差は認められなかった。一方、下嘴では、オカメインコでのみその先端領域で発現が確認された。胚発生ステージ 29 の上嘴では、ウズラとアヒルに比べ、オカメインコでは本 DEG の発現領域が相対的に狭かった。また下嘴では、ウズラ・アヒルに比べ、オカメインコでは（ステージ 26 に比べての）発現ドメインの顕著な拡大がみられた。以上の結果から、本 DEG はオウム類の嘴において間葉の分化に対して抑制的に働くことで、下嘴の伸長を抑制している可能性が示唆された。

研究の遅れもあり、上記解析の「ニワトリ胚におけるウィルスベクターによる候補遺伝子の機能解析」を実施するには至らなかった。

5. 主な発表論文等  
なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

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。