

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号：19770200
 研究課題名 (和文) メクラウナギ類の神経堤細胞
 研究課題名 (英文) Neural Crest Cells in Hagfishes
 研究代表者
 太田 欽也 (OTA KINYA)
 独立行政法人理化学研究所 形態進化研究グループ 研究員
 研究者番号：40415104

研究成果の概要：メクラウナギ類は脊椎動物の進化発生学上重要とされてきたがおよそ半世紀の間その研究に進展が無かった。今回、我々は日本近海に生息するメクラウナギ目メクラウナギを用いて胚体の入手及び、神経堤細胞の観察を行った。この結果、この動物にも脊椎動物の重要な共有派生形質である脱上皮化し移動する神経堤細胞が存在することが確認された。本研究成果は今後、化石種無顎類を含めた初期脊椎動物の進化を考える上で重要な知見をもたらしたといえる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：円口類、メクラウナギ、神経堤細胞、発生進化

1. 研究開始当初の背景

メクラウナギ類は脊椎動物の進化研究において重要と考えられてきた。その理由としてこの動物が脊椎動物の進化系統樹上重要な地位を占めるからである。現在の分子進化学的手法によると脊椎動物は顎を有する顎口類（ほとんどの脊椎動物がこちらに含まれる）と顎を持たない円口類（メクラウナギ類とヤツメウナギ類が含まれる）の大きく二つに分けられる。一方、化石を用いた形態学的研究によるとメクラウナギ類は脊椎動物の中でもっとも早い段階で他の系統から分岐したと考えられている。いずれの場合においても、メクラウナギ類はヤツメウナギ類とともに脊椎動物の共通祖先の姿を知たために現

世まで生き残った数少ない手がかりとなる動物であることに間違いは無い。しかしながら、ヤツメウナギ類の受精卵が容易に入手可能であるのに対し、メクラウナギ類の受精卵は、この動物が深海性であることから研究が困難とされてきた。19 世紀中ごろから欧米の研究者を中心に世界中の海域で調査が行われてきたが、Dean(1899)や Conel(1941)をなど北米の研究者が発生過程と一部の組織学的観察を行ってから、約半世紀の間、メクラウナギ類の発生学には進展が無い。

また、Conel (1941) が残したこの動物の神経堤細胞のスケッチが後のこの動物の取扱いについて問題を残していることも述べる必要がある。一般的な脊椎動物では発生過

程において、背側の神経管が脱上皮化し移動する神経堤細胞へと分化し、後に軟骨、末梢神経、色素細胞へと分化する。しかしながら、Conel (1941)によるとメクラウナギ類の神経堤細胞は脱上皮化せずに袋状の構造を呈するとされている。つまり、脊椎動物の系統においてメクラウナギ類の持つ神経堤細胞だけが異なることが報告されたのである。この報告を追試する必要性は研究者の間で認識されてきたが、胚を得ることが難しいだけでなく、初期胚の入手が極めて困難であるために研究がまったく進んでおらず、神経堤細胞について扱う国内外の教科書や論文においてその記述が曖昧なまま今日に至っている。

この曖昧さは神経堤細胞の問題だけにとどまらず、古生物学が研究の対象とする化石種の無顎類と現世脊椎動物との系統関係や、神経堤細胞の派生物である軟骨の脊椎動物の進化的由来に関する議論についても影響を及ぼしている。とりわけ、系統関係については先にも述べた、メクラウナギ類をもっとも最初に他の脊椎動物から分岐した動物であるか否かについての分子進化学者と古生物学者の議論の中心となっているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メクラウナギ類における神経堤細胞の発生過程における挙動を観察し、他の脊椎動物と比較するところにある。そして、この比較によって脊椎動物の共通祖先の基本的な発生プログラムがいかなるものであったかを知るところにある。しかしながら、この目的を達成するにはメクラウナギ類の飼育・産卵系、発生学的観察方法、分子レベルでの神経堤細胞の観察方法の確立などの小目的を設定し順次これらを解決する形で進める必要がある。とりわけ、分子レベルでの神経堤細胞の観察は半世紀の間、ほとんど進展の無いこの動物の知見を現代的な理解へと導くために重要であると位置づける。なぜならば、この動物にも脱上皮化して移動する神経堤細胞が存在するの否かという問題を明らかにするために必須であるからである。

この問題設定に基づいて研究を進めた場合、導かれる結論は次の二者であると推測される(1)メクラウナギ類においても脱上皮化して移動する神経堤細胞が存在する、あるいは(2)メクラウナギ類における神経堤細胞は他の脊椎動物とは異なり、Conel (1941)が示すような袋状の構造を呈する。これらのうち前者の結果が導かれた場合は、この動物が神経堤細胞において他の脊椎動物とはなんら変わることが無いことが明らかとなる。一方、後者の場合は、この動物が他の脊椎動物とはまったく異なる神経堤細胞を有する

ことになり、脊椎動物全体の重要な派生形質である神経堤細胞がこの動物において特殊であり、この動物が脊椎動物全体から進化の早い段階で分岐した系統関係を支持した場合、この動物の持つ神経堤細胞が祖先的な形質をとどめていることを示唆する結果となる。これらいずれか二つの結論のうち、どちらが正しいかについて実験的に確かめ、そして、他の脊椎動物との比較を通じて、今後の脊椎動物研究におけるメクラウナギ類の発生学的、系統学的取扱いを明確にすることが本研究の重要な目的であるといえる。

3. 研究の方法

メクラウナギ類のほとんどは深海性であるが、本国に生息数種メクラウナギ類のうち、ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) は浅海性に生息することが知られている。よって、本研究ではこの種を中心に用いて研究を進めた。また、特定の発生段階の胚を得るためには、人口管理下で胚体を観察しながら、胚体に処理を施す時期を吟味することが望ましいため、本研究では飼育環境下でヌタウナギに産卵・受精を促し、胚体を得る方法を確立した。この方法の確立には大量の親魚が必要となるが、これらの親魚の入手は島根県江津漁協の協力を得て行った。

親魚となるヌタウナギは底質にプラスチックチューブや細砂を用いた水槽内で9月から11月にかけて飼育した。その結果、本研究期間中に産卵が認められ、受精卵を得ることに成功した。なお、この飼育管理に関する方法は特許申請中である。これら得られた受精卵はブアン固定液およびセラ固定液などの複数の固定液で固定し、胚体の概観を実態顕微鏡下で観察し、組織切片を作成し、HE染色法により観察、Dean (1899) や Conel (1941) との比較を行った (図1)。



図1. 本研究で得られたヌタウナギ胚

また、顎口類の神経堤細胞を特異的に染色するとされている HNK1 抗体や Sox9、SoxE、Pax3/7、Pax6 の4つの遺伝子マーカーを用いた遺伝子の発現の観察を行った。遺伝子発現の際には Section *in situ* hybridization 法と Whole mount *in situ* hybridization 法を行った。得られた胚体が7つと限られていたために、Section *in situ* hybridization 法を主に用い、ひとつの胚体に対してのみ Sox9 遺伝子を用いた Whole mount *in situ*

hybridization 法を行った。Whole mount *in situ* hybridization 法を施した胚体についてはビブラトームを用いて約 200 マイクロの厚切り切片を作成し観察を行った。

4. 研究成果

胚体の観察においてこの動物にも前脳、中脳、後脳という典型的な脊椎動物の脳の構造が見られた。また、体幹部の組織切片像の観察から、神経管、脊索、側板中胚葉、軸索中胚葉などの典型的な脊椎動物の胚体が持つ組織像が観察された。問題となる神経堤細胞については神経管の背側から腹側にかけて脱上皮化し移動する細胞として確認され、この動物も他の脊椎動物と同様の神経堤細胞を有することが確認された。HNKI 抗体による神経堤細胞の染色を試みたところ、この細胞は染色されなかった、しかしながら、神経堤細胞の派生物とされる背側神経根は強く染色された。また、*Pax3/7* は神経管および体節の背側にその発現がみられ、*Pax6* は神経管全体にその発現が見られた。*Sox9* 遺伝子は神経管の背側に位置する神経堤細胞とともに移動中の神経堤細胞にも確認された。*SoxE* 遺伝子は背側の神経堤細胞を染色する結果となった。これらの遺伝子マーカーのうちで *Sox9* が注目される神経堤細胞を染色したことから、この遺伝子を用いて Whole mount *in situ* hybridization を行ったところ。胚体の後方では神経管の背側に、前方に行くにしたがい、発現部位を広げ、脱上皮化した神経堤細胞に観察される様子が観察された。

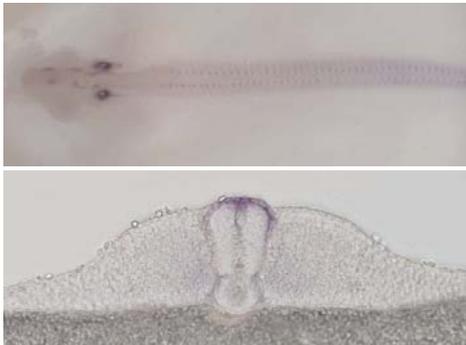


図 2. スタウナギ胚における Sox9 の発現。
背側からの観察(上)と体幹部の
ビブラトーム切片の観察(下)

また、他の脊椎動物では *Sox9* が内耳にも発現することが知られているが、この動物においても同様の発現パターンが確認された。

これらの一連の観察結果が示唆するところはこの動物は他の脊椎動物とほとんど変わらない発生プログラムを備えているという点である。この事実は、この動物が他の脊椎動物から一番早い段階で分岐したとする系統関係、ヤツメウナギ類と姉妹群を形成する系統関係のどちらを採択した場合におい

ても、神経堤細胞をはじめとする脊椎動物の基本的な発生プログラムは脊椎動物の共通祖先が各系統に分岐する前のおよそ 4 億年以前から存在し、保存されてきたことを示唆する結果となった。本研究成果は 2007 年に Nature 誌に掲載され、その後も詳細な研究内容について他の国際誌においても報告された。

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 Kuratani S, and Ota KG, Hagfish (Cyclostomata, Vertebrata): searching for the ancestral developmental plan of vertebrates, *BioEssays*, 30, 167-172 (2007), 査読あり
- ② Ota KG and Kuratani S, Cyclostome embryology and early evolutionary history of vertebrates, *Integr. Comp. Biol.*, 47, 329-337 (2007) 査読あり
- ③ Ota KG, Kuraku S and Kuratani S, Hagfish embryology with reference to the evolution of the neural crest, *Nature*, 446, 672-675 (2007) 査読あり
- ④ Ota KG, and Kuratani S, Developmental Biology of Hagfishes, with a report on newly obtained embryos of the Japanese Inshore Hagfish, *Eptaretsu burgeri*, *Zool Sci*, 25, 999-1011 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Ota KG, Developmental Evolutionary Study of the Japanese Inshore Hagfish (*Eptaretsu burgeri*), The Sixth Okazaki Biology Conference: Marine Biology, 2007 年 1 月 2 月 4 日, 岡崎市
- ② Ota KG, Developmental evolutionary study of the hagfish embryo, 2008 Annual SICB meeting, 2008 年 1 月 6 日, San Antonio (USA)
- ③ 太田欽也, 倉谷滋, スタウナギ類の発生学についての報告, マリンバイオテクノロジー学会, 2008 年 5 月 24 日, 京都大学
- ④ 太田欽也, 倉谷滋, スタウナギ胚からみる円口類の単系統性, 日本進化学会, 2008 年 8 月 22 日, 東京大学駒場キャンパス
- ⑤ 太田欽也, 倉谷滋, スタウナギ類に脊椎骨はあるのか?, 日本動物学会, 2008 年 9 月 6 日, 福岡大学
- ⑥ 太田欽也, 倉谷滋, スタウナギ発生学から

見た脊椎動物の起源、日本魚類学会、2008
年9月21日、愛媛大学

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：メクラウナギ類の卵の最終方法、及び
採集用具並びに微細底砂攪拌式底面濾過水
槽、および水生生物の飼育方法

発明者：太田欽也 倉谷滋

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特願

番号：2006-213513

出願年月日：平成18年8月4日(2006.8.4)

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 欽也 (Ota Kinya)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

形態進化研究グループ・研究員

研究者番号：40415104