

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03289

研究課題名(和文)陸から海にもどった羊膜類の適応形質進化機構の法則を探る

研究課題名(英文)Unveiling the common evolutionary mechanisms of adaptive characters possessed by aquatic amniotes

研究代表者

土岐田 昌和 (Tokita, Masayoshi)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：80422921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず、塩類腺をもつアオウミガメと塩類腺をもたない淡水棲のクサガメおよびスッポンの胚頭組織における腺形成関連遺伝子の発現様式を比較した。その結果、複数の腺形成遺伝子が、アオウミガメの胚頭部でのみ異所的に発現していた。また、四肢形成期のアオウミガメ胚、スッポン胚、クサガメ胚の前肢原基からtotal RNAを抽出し、ハイスループットシーケンサを用いてトランスクリプトームの種間比較を行った。その結果、ウミガメ胚の前肢原基でのみ発現が変動している複数の遺伝子が特定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上の生物種の多くが海で暮らしているが、海生適応形質を獲得することによって、一部の羊膜類が再び海へと進出したことで、海洋生物の種多様性は一段と高まることとなった。本研究で得られた成果により、海生羊膜類における適応形質獲得機構の一端が明らかになった。これにより、今日の海洋生物多様性が生み出された仕組みについての理解が一層深まるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The expression patterns of genes that are responsible for gland formation in vertebrate embryos were compared among the embryonic head tissues of the green sea turtle with salt glands and freshwater turtles without salt glands. The results showed that multiple gland-forming genes were ectopically expressed only in the embryonic head of the green sea turtles. Total RNA was extracted from the forelimb primordia of green sea turtle, Chinese softshell turtle, and Reeve's pond turtle embryos during limb formation, and the transcriptomes were compared between species using a high-throughput DNA sequencer. As a result, some genes whose expression varied only in the forelimb primordium of sea turtle embryos were identified.

研究分野：比較生物学

キーワード：羊膜類 適応形質 形態 発生 比較 進化 海

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む脊椎動物は約7万の現生種を含む大きな分類群であり、5億年におよぶその進化の歴史の中で形態を著しく多様化させ、さまざまな環境に適応してきた。ヒトが属する哺乳類は、爬虫類および鳥類とともに「羊膜類」と呼ばれるクレードを構成し、“羊膜”を持つことで特徴づけられる。羊膜類は、乾燥から身を守る外皮や多様な食性、陸上での推進力に優れた四肢や空中移動を可能にする翼を獲得したことで、陸上および空中の様々な環境に進出し、現存する陸上脊椎動物数の75%を占めるまでに繁栄した。ところが、羊膜類のいくつかの系統は陸を離れ、かつて祖先系統が暮らしていた海へと生活の場をもどした。

陸と海では物理条件が大きく異なるため、陸上環境に適した体を再び海洋環境に適した体へと作りかえることには大きな変革が伴う。一方、海洋環境は生物に対し一定方向の選択圧をかけるため、海へともどった羊膜類には共通の特徴が認められることが多い。海生の爬虫類・鳥類の頭部に備わり、海水中から体内に取り込まれた過剰な塩分を体外に排出するための器官である塩類腺、海中で大きな推進力を得るためにひれ状に変化した前肢(以下、胸びれ)、海洋独自の光波長を吸収する視物質などである。

しかしながら、海生羊膜類で共通して獲得されたこれらの適応形質の進化機構については、一部の系統についての断片的な報告が少数あるのみで、羊膜類全体における総合的な理解は得られていない。そこで研究代表者らは羊膜類の海生適応形質の進化機構に関するデータを集め、その総理解をめざすことにした。

2. 研究の目的

本研究では、進化の過程で独立に海生適応を果たした3つの羊膜類系統：ウミガメ類、ウミヘビ類、ペンギン類を材料に用いて、3つの主要な海生適応形質(塩類腺、胸びれ、眼)の形成機構を系統間で比較する。これにより、本動物群における海生適応形質の進化機構の一般性と多様性の両面を評価し、動物進化における一大イベントである“陸から海への再進出”の背景にある進化基盤を定式化することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 塩類腺形成の調査

塩類腺をもつ爬虫類・鳥類系統と、比較種として塩類腺をもたない各系統の一連の発生段階にある胚頭組織切片を作成し、細胞核をヘマトキシリン、細胞質をエオジン、軟骨をアルシアンブルーで染色することで、組織形成様式を種間および系統間で比較する。組織染色切片から、三次元モデルを構築し、各系統の塩類腺形成様式を立体的に評価する。また、腺形成に關与するとされる一連の遺伝子 *Fgf10*、*Bmp4*、*Bmp7*、*Shh*、*Pax6*、*Gli3*、*Sox9* の発現様式を海生種と非海生種の頭部組織形成過程において調べ、種間で発現様式の類似性と相違性を評価する。

(2) 鰭形成の調査

ウミガメの対鰭と非海生カメ種の四肢の骨格形成様式を形態測定法により定量比較する。まず、四肢形成期にあるウミガメおよび非海生カメ種の胚の前肢原基の組織切片を作成し、指軟骨原基での細胞分裂率を3種間で比較する。ついで、四肢形成期にあるウミガメおよび非海生カメの胚の前肢自脚部より total RNA を抽出し、ハイスループットシーケンサを用いてトランスクリプトームの種間比較解析を行う。これにより、ウミガメ胚の前肢自脚部でのみ発現量が大きく変動している遺伝子を複数特定する。特定された遺伝子が各カメ胚の前肢組織においてどのような時空間パターンで発現するかを *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて調べる。

(3) 視物質の発現量調査

海生適応を果たしたアオウミガメと、比較種として淡水生のカメ種の眼より total RNA を抽出し、ハイスループットシーケンサを用いてトランスクリプトームの比較解析を行う。これにより、ウミガメ胚の眼でのみ発現量が変動している遺伝子を複数特定する。

4. 研究成果

(1) 塩類腺形成に関する調査

涙腺が塩類腺へと変化したアオウミガメ、鼻腺が塩類腺へと変化したフンボルトペンギン、そして比較種、すなわち塩類腺ではなく涙腺をもつカメ類(クサガメ、スッポン)および塩類腺ではなく鼻腺をもつ鳥類(ウズラ、オカメインコ)の一連の発生段階にある胚を材料に用いて、頭部の組織切片を作成し、腺形成様式を組織学的に比較した。その結果、塩類腺形成直前期のアオウミガメ胚およびペンギン胚では、眼窩周辺にアルシアンブルー陽性な間葉の凝集がみられた。また、各種の胚頭部組織切片から三次元モデルを構築し、腺の形成様式を種間で比較した。その結果、各系統の塩類腺は形成が進むにつれて腺上皮が分岐を繰り返して肥大化するのに対し、非海生カメ類の涙腺および非海生鳥類の鼻腺形成では腺上皮の分岐や肥大化は観察されなかった。次いで、腺形成に関与するとされる一連の遺伝子(*Fgf10*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Shh*, *Pax6*, *Gli3*, *Sox9*)を3種のカメ胚より単離した。単離した各遺伝子の発現パターンを塩類腺/涙腺形成直前期および腺形成期にある3種のカメ胚の頭部で調べた。その結果、ウミガメ胚の眼窩周辺にみられる間葉凝集では、複数の腺形成遺伝子が異所的に発現していることがわかった。

(2) 鱗形成に関する調査

指骨が伸長し、指間が結合組織によって充填されることで硬化し、鱗状になった手足をもつアオウミガメ、淡水生でありウミガメ同様に指骨が伸長した手足をもつスッポンモドキ、淡水生であり指骨が伸長していない手足をもつクサガメおよびスッポンの一連の胚を材料に用いて、四肢の骨格形成パターンを4種間で比較した。その結果、ウミガメおよびスッポンモドキでは、四肢形成期に前肢の指骨が急激に伸長することがわかった。また、形態測定法を用いて、4種のカメ胚の四肢の骨格形成過程を定量比較した結果、ウミガメでは、四肢形成が進むにつれて前肢が後肢の1.5倍の長さまで伸長するのに対し、スッポンモドキでは前肢は後肢と同程度、他の2種では前肢は後肢の0.9倍の長さまでしか伸長しないことがわかった。ウミガメの胚発生でのみ前肢の指が急激に伸長する背景にある分子・細胞基盤を明らかにするため、四肢形成期における前肢の指軟骨原基の細胞分裂率をウミガメ、クサガメ、スッポンの3種間で比較した。その結果、ウミガメでは軟骨原基の細胞分裂率がほかのカメ種の1.7倍にまで上昇していることが分かった。次いで、四肢形成に必須とされる成長因子の遺伝子*Fgf8*の発現パターンを3種のカメ胚で比較した結果、ウミガメ特有の遺伝子発現パターンが観察された。さらに、四肢形成直前期にある4種のカメの胚の前肢原基からtotal RNAを抽出し、ハイスループットシーケンサを用いてトランスクリプトームの比較解析を行った。その結果、ウミガメ胚の前肢原基でのみ発現が変動している複数の遺伝子が検出された。

(3) 視物質の発現量調査

ウミガメおよび非海生カメであるクサガメ、スッポン胚の眼よりtotal RNAを抽出し、ハイスループットシーケンサを用いてトランスクリプトームの比較解析を行った。その結果、海生適応を果たしたウミガメの眼でのみ、オプシン遺伝子の発現量が顕著に上昇していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokita Masayoshi, Watanabe Takumi, Sato Hiromu, Kondo Satomi, Kitayama Chiyo	4. 巻 140
2. 論文標題 A comparative study of cranial osteogenesis in turtles: implications for the diversification of skull morphology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoomorphology	6. 最初と最後の頁 539 ~ 554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00435-021-00544-2	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 Masayoshi Tokita, Hiromu Sato	4. 巻 25
2. 論文標題 Creating morphological diversity in reptilian temporal skull region: a review of potential developmental mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Evolution & Development	6. 最初と最後の頁 15 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ede.12419	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤大夢, 土岐田昌和
2. 発表標題 爬虫類頭蓋形態の多様性創出機構を探る
3. 学会等名 日本動物学会 関東支部第75回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤大夢, 土岐田昌和
2. 発表標題 海洋進出を果たしたウミガメの鱗状四肢形成
3. 学会等名 日本進化学会年大会 第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤大夢, 土岐田昌和
2. 発表標題 海洋進出を果たしたウミガメの鱗状四肢形成
3. 学会等名 日本動物学会 第93回早稲田大会2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	寺井 洋平 (Terai Yohey) (30432016)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教 (12702)	
研究分担者	岸田 拓士 (Kishida Takushi) (40527892)	ふじのくに地球環境史ミュージアム・学芸課・准教授 (83811)	
研究分担者	田村 宏治 (Tamura Koji) (70261550)	東北大学・生命科学研究所・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------