

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06683

研究課題名(和文) 鰓下筋群の複雑化をもたらした新規の遺伝子制御

研究課題名(英文) Developmental regulatory mechanisms of hypobranchial muscles with evolutionary perspectives

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の頭部および頸部には、さまざまな発生起源をもつ筋肉が存在する。なかでも鰓下筋群(哺乳類では舌筋および舌骨下筋群が含まれる)の前駆細胞は、後頭部の体節から脱上皮化し、咽頭の後方を迂回して長距離を移動するという特殊な発生過程をたどる。本研究では、円口類や軟骨魚類など、脊椎動物進化の初期に分歧した動物群にも鰓下筋群が存在することに注目し、前駆細胞の移動と分化のタイミングの相違点に注目した。本研究では、脊椎動物の初期進化において、筋芽細胞の移動と分化タイミングの制御に関わる遺伝子が重複し、脊椎動物の複雑で多様な形態に寄与したことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで鰓下筋の発生過程は、顎口類のいくつかのモデル動物(主にマウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ)で研究されてきたが、前方の体節ごとに細胞運命を追ったものがほとんどである。一方で、種ごとに大きく異なる顎顔面形態との関連や、鰓下筋の可塑性・多様性に迫った研究は例がなかった。

本研究では、寄与する鰓下筋のドメインが体節ごとにあらかじめ決まっているという仮定を取り払い、脱上皮化して体節を離れた筋芽細胞のそれぞれが、周辺の非筋組織との相互作用に応じて分化のタイミングを決めている可能性に注目した。得られた結果から、鰓下筋を構成する筋要素が段階的に付け加わり、複雑化したという進化過程が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Vertebrates possess a wide variety of skeletal muscles with highly specialized function and morphology. In the trunk, skeletal muscles develop from somites that undergo active proliferation followed by either an epithelial growth or migration as individual mesenchymal cells. Undifferentiated muscle precursor cells that undergo long-distance migration are specified in the early somites adjacent to the limb/fin buds and the cervical region, but not in the flank. To clarify how these migrating cells are controlled, we compared the expression and function of genes involved in myogenesis, such as Lbx genes, between multiple fish species. Comparison of the tissue structure and the expression of Lbx and other developmental regulatory genes have illustrated the temporal order of differentiation of various muscles in each species. Our analyses provided new insights for cellular and molecular characteristics of associated with the complexity of the vertebrates with hypobranchial muscles.

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 舌筋 鰓下筋 筋分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、骨格に連結し、身体各部の運動を担う随意筋群であり、動物のからだの複雑な動きを可能にするうえ、呼吸、嚥下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、頭部の筋（咀嚼筋、表情筋など）の多くは分節性をもたない頭部中胚葉に由来する。また体幹部では、前方の数個の体節から、一部の筋前駆細胞が脱上皮化して移動し、咽頭部の後方を迂回して頭部に侵入し、鰓下筋群を形成する。羊膜類の鰓下筋群には、舌筋と舌骨下筋群が含まれる。

研究代表者はこれまで、このような筋形成パターンが辿った進化的変遷を研究してきた。鰓下筋が、祖先的な脊椎動物である円口類ヤツメウナギにも存在することから、鰓下筋に見られる特殊なパターン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 *Dev. Biol.* など）。さらに、四肢動物の系統では、長距離移動する体節筋は、四肢の筋肉や僧帽筋、横隔膜などをも形成する。このことから、鰓下筋型のパターンニング機構は、顎口類では四肢を含む複雑な形態を作り出す基盤となったと考えられる（Okamoto, Kusakabe et al. 2017, *Nature Ecol. Evol.* など）。

ヤツメウナギ鰓下筋は、咽頭部左右の腹側側面を覆い、咽頭部全体の収縮を担う。一方、顎口類（魚類など、舌を持たない動物も含む）はヤツメウナギよりも格段に複雑な鰓下筋をもち、その前方部分が正中線上で合一し、口腔内に進展し、前端が下顎の骨格に付着する。この部分は、哺乳類・爬虫類・鳥類に見られる実に多様な舌筋の原型となるものと考えられる。しかし、ヤツメウナギのような単純な鰓下筋がどのような変遷を経て、羊膜類の複雑な舌筋や舌骨下筋群へと進化したのかは、全く未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鰓下筋群についてより祖先的な形質を残す動物（ヤツメウナギ、サメ）を比較対象に、細胞移動や分化を制御する遺伝子とその連携を見出すことである。発生過程において、鰓下筋の筋分化（多核の筋繊維の形成）は、他の筋（体幹の体壁筋や、頭部中胚葉由来の鰓弓筋）に比べて、かなり遅い発生段階で起こる。このことは、鰓下筋の前駆細胞が体節を離れて前方に向かって移動する間、筋分化が抑制されていることを示唆する。また分化後の鰓下筋の分節性は鰓弓構造に一致しており、筋分化のパターンは、鰓下筋が連結する鰓弓骨格や腱との相互作用に依存すると予想される。本研究では、体節の筋分化を制御する因子を見出し、その背景にある遺伝子が系統分岐とともにどのように変化したか明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では下記の解析により、ヤツメウナギおよびトラザメの鰓下筋の前駆細胞の移動パターンと、周辺の軟骨や結合組織（腱、靭帯、筋膜など）との連携がどのような順序で確立するかを調べ、成体での形態的な観察と合わせて記述する。また、鰓弓部および口腔内への移動能とガイダンスに関わる遺伝子相互作用を明らかにし、他の脊椎動物の場合と比較する。

各年度の5~7月は北海道産ヤツメウナギ受精卵が得られる時期であるため、(2)で得られる遺伝子の

阻害実験（CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集）をまとめて行い、8月以降にジェノタイピングと表現型解析を行う。

- (1) ヤツメウナギおよびトラザメ胚の組織切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオシンなど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) 上記の動物において、長距離移動する体節筋での機能が知られている遺伝子、腱の形成に必須な遺伝子、および軟骨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、鰓下筋の各領域が分化し鰓弓部の骨格と連携を作り出す際の、時空間的な関係を明らかにする。
- (3) (2)で得られる遺伝子候補について、ゲノム編集技術による遺伝子破壊を行う。
- (4) *Lbx1* 遺伝子は現在のところ、移動性筋前駆細胞の唯一のマーカーであり（図4）、ノックアウトマウスの表現型などから、筋芽細胞の移動と分化抑制に必須であることが知られる。一方で、パラログ遺伝子である *Lbx2* の筋肉における役割は報告されていない。そこで *Lbx2* 遺伝子についても、魚類での発現パターンを調べ、ヤツメウナギでの単独の *Lbx* 遺伝子の発現部位との比較を行う。

これらの実験結果を総合し、円口類～羊膜類を網羅した鰓下筋前駆細胞の運命決定、および分化に至るまでの遺伝子相互作用の概略を明らかにする。また、頭部～頸部における中胚葉組織や神経堤細胞の相互作用の全貌を解明し、さらに多種生物の知見（ホヤ *Abitua et al.* 2012 など）との比較により、進化的変遷を浮き彫りにする。

4. 研究成果

(1) ヤツメウナギにおける骨格筋形成過程の観察

ヤツメウナギについて、二つの異なる筋特異的抗体を用いて、発生の起源（頭部中胚葉あるいは体節の異なる骨格筋が分化する順序を可視化することができた。体節由来の体幹筋は、咽頭胚期から分化が始まるが、頭部中胚葉に由来する鰓弓筋は、それよりかなり遅れて、孵化期以降に、前方から後方へという順序で分化が起きた。また、その鰓弓筋を腹側でつなぐように鰓下筋が分化するが、これはアンモシーテス幼生期直前という遅い時期で起きた。このことは、体節に由来するにも関わらず、鰓下筋は頭部（鰓弓部）での筋分化タイミングに合わせて、遅く分化するように制御されていることを示唆する。

(2) トラザメにおける鰓下筋および対鰭筋の分化過程

トラザメではヤツメウナギで用いた二つの抗体は、ほぼ同じパターンで同じ骨格筋を可視化した。鰓下筋の分化は、ヤツメウナギと同様、体幹部の筋よりかなり遅れて起き、心臓の両脇にV字型の対を形成する。その後、V字型の閉じた前方部分に新たな筋が平行につけ加わり、正中線上で融合して、下顎骨および舌骨につながる、舌筋の相同物を形成した。また、胸鰭原基では、体節に由来する骨格筋が背側と腹側に分化した。その際、近傍の体壁筋は、胸鰭原基に侵入することはなく、腹側正中線に向かって伸長していた。このことから、鰭の筋肉は体壁筋の派生物ではなく、移動してきた筋前駆細胞が胸鰭原基内で独立に制御を受けて分化することを示唆した。

(3) トラザメの *Lbx1*, *Lbx2* 遺伝子の発現領域の特定と、分化前の筋前駆細胞の観察

ヤツメウナギは単独の *Lbx* 遺伝子を持つが、トラザメには *Lbx1* と *Lbx2* の二つのパラログがあり、これらは祖先型の単一遺伝子が重複して出現したと考えられる。In situ ハイブリダイゼーションで胚発生期における発現パターンを調べた。トラザメ *Lbx1* は四足動物の *Lbx1* と同様、対鰭原基に侵入した筋前

駆細胞に発現していた。その発現は、対鰭原基に隣接する体節の腹側で始まり、筋原基が移動する間持続していた。筋原基は従来言われていたように、ばらばらに遊離することはなく、体節からちぎれた細胞塊として移動していた。また、上皮構造に特異的な ZO-1 抗体を用いて調べたところ、対鰭の筋前駆細胞は対鰭原基内でも ZO-1 陽性であり、これはマウスなど羊膜類の四肢筋の場合とは異なっていた。すなわち、軟骨魚類では長距離移動型の筋前駆細胞は、完全に脱上皮化することなく進展することが明らかになった。意外なことに、*Lbx1* 遺伝子は鰓下筋原基の大部分の細胞では発現していなかった。鰓下筋に広く発現するのは、次に述べる *Lbx2* 遺伝子であり、*Lbx1* 遺伝子は伸びてきた鰓下筋の最も前方の部分のみに短時間発現した。

一方、トラザメ *Lbx2* 遺伝子はすべての体節の腹側と、そこから腹側に伸長する体壁筋に発現していた。また、体節のうち最前方のものからは *Lbx2* を発現する細胞が、鰓弓の後方を迂回して鰓弓部の底部に伸長し、鰓下筋の原基となった。また *Lbx2* は *Lbx1* とは異なり、対鰭筋では全く発現していなかった。

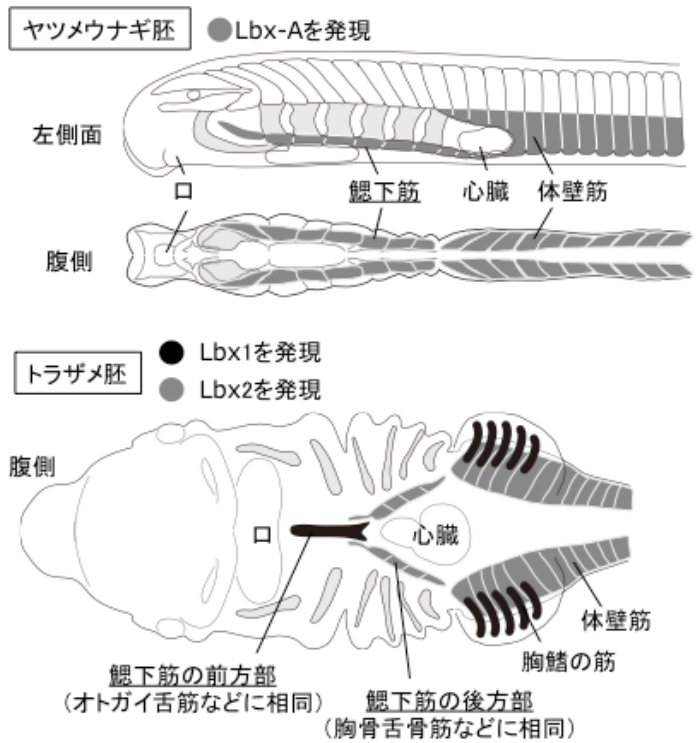


図1. ヤツメウナギとトラザメの鰓下筋の比較。ヤツメウナギでは鰓下筋は鰓の左右外側に位置するが、サメでは鰓下筋の前方部分が正中線上で合一し、口腔に達する。この前方部分は、*Lbx1* を特異的に発現する前駆細胞からできる。一方、後方部分は *Lbx2* を発現する。(Kusakabe et al., 2020 を改変)

(4) ヤツメウナギにおける *Lbx* 遺伝子の機能解析

ヤツメウナギの *Lbx* 遺伝子に対しガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 法を用いて遺伝子破壊実験を行った。ガイド RNA を 2 種類混ぜ、Cas9 タンパク質とともに受精卵に顕微注入した。幼生期直前まで育てた胚を固定し、尾部を切断してゲノム DNA を抽出した。顕微注入した個体としていない個体について、ゲノム DNA の *Lbx* 遺伝子座位を PCR で増幅し、電気泳動で DNA の変異の有無を予測した。また、これらの実験胚からの PCR 産物を個体ごとに異なる短い塩基配列で修飾し、次世代シーケンサーによる配列解読を行なった。その結果、ガイド RNA を打った胚では高効率で *Lbx* 遺伝子が破壊されていた。これらの胚で骨格筋の分化状況を調べたところ、鰓下筋のみが特異的に形成不全を起こしていることが観察された。この結果より、*Lbx* 遺伝子がヤツメウナギの鰓下筋の形成に不可欠であることを示している。また、同じく鰓下筋原基に発現する *Pax37* 遺伝子も鰓弓部周辺で発現しなくなっていたことから、鰓下筋の形成不全は筋分化の阻害ではなく、前駆細胞（体節由来の鰓下筋原基）が前方へと伸長するステップが阻害されていると考えられる。

(5) 結果の総括と展望

(1)～(3)の結果を総括すると図1に示すように、脊椎動物の共通祖先で出現した鰓下筋原基が軟骨魚類の系統では、前方部分に正中線上の舌筋相同物が付け加わり、複雑化したと考えられる。その際、重複した *Lbx* 遺伝子群の機能分担が形態の複雑化の鍵となったことが示唆された。一方で、*Lbx2* 遺伝子については、哺乳類では筋では発現しておらず、舌骨下筋群の形成への関与も未知である。今後は哺乳類や両生類、真骨魚類での鰓下筋群を制御する遺伝子機能が解明されることで、脊椎動物全体の多様な生態の背景にある進化プロセスが明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kusakabe Rie, Tanaka Masako, Kuratani Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Developmental Evolution of Hypaxial Muscles: Insights From Cyclostomes and Chondrichthyans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 760366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.760366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kusakabe Rie, Higuchi Shinnosuke, Tanaka Masako, Kadota Mitsutaka, Nishimura Osamu, Kuratani Shigeru	4. 巻 18
2. 論文標題 Novel developmental bases for the evolution of hypobranchial muscles in vertebrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-020-00851-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Shunya, Adachi Noritaka, Kusakabe Rie, Kuratani Shigeru	4. 巻 7
2. 論文標題 Developmental fates of shark head cavities reveal mesodermal contributions to tendon progenitor cells in extraocular muscles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-021-00170-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani.
2. 発表標題 Morphological complexity and its genetic background in vertebrate skeletal muscles
3. 学会等名 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日下部りえ、倉谷滋
2. 発表標題 脊椎動物の対鰭筋および鰓下筋の進化
3. 学会等名 (社)日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunya Kuroda, Noritaka Adachi, Rie Kusakabe, Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Lineage tracing of premandibular mesoderm: studies on zebra finch and shark
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日下部 りえ
2. 発表標題 骨格筋の進化発生学
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会フォーラム2F-05 『骨格筋細胞研究がリードする新しい健康科学の分子生物学新機軸 (招待講演)』
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Kusakabe
2. 発表標題 Evolution and development of skeletal musculature in early vertebrates: insights from lamprey and shark embryos
3. 学会等名 Randall Centre for Cell & Molecular Biophysics Seminar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani
2. 発表標題 Myogenesis at the Head/Trunk Interface and Acquisition of Gnathostome-specific Musculature
3. 学会等名 The 12th International Cogress of Vertebrate Morphology (国際学会)
4. 発表年 2019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 52th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田春也、足立礼孝、日下部りえ、倉谷滋
2. 発表標題 頭部顔面発生における外眼筋の位置づけ:板鰓類胚の場合
3. 学会等名 日本進化学会第21会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 Acquisition of the neck and neck muscles」 in 『Evolutionary Developmental Biology - A Reference Guide. 』	

1. 著者名 Rie Kusakabe and Shigeru Kuratani	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 「Acquisition of the neck and neck muscles」 in 『Evolutionary Developmental Biology - A Reference Guide. 』	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------