

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06787

研究課題名(和文) 円口類胚を用いた脊椎動物頭部骨格筋の進化的起源の解明

研究課題名(英文) Study of ultra structure during embryogenesis in lampreys

研究代表者

尾内 隆行 (Onai, Takayuki)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20617279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の頭部がどの様に祖先から進化したかは謎である。これまでナメクジウオ様な動物の体節が脊椎動物の頭部に存在したとした仮説があった。近年の分子発生学研究は、この仮説に疑問を呈する。しかし、円口類ヤツメウナギの発生学的知見が不足しているため、結論が出せずにいた。レーザー顕微鏡と走査型電子顕微鏡連続切片解析(SBF-SEM)により、我々は、ヤツメウナギ頭部中胚葉には、個性的な細胞集団が複数あることを発見した。これらは、体節の様なロゼッタパターンをしておらず、遺伝的にも体節形成に関わるものが発現していなかった。よって脊椎動物の頭部は、初期進化において新しくまた多様化が起きていたことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで比較形態学の分野で最大の謎であった、頭部分節性問題の根幹に迫った。円口類ヤツメウナギの頭部の組織学的解析は1902年以降行われていなかった。そこで我々は、最先端の技術を導入し、この研究を進めた。その結果、これまで言われていた様な頭部に体節は存在しないと証明した。さらにユニークな細胞集団を複数見つけたことで、脊椎動物の初期進化がこれまで以上に多様性に富んでいたことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：How vertebrate heads evolved from their ancestors is a mystery. One hypothesis has been that the somites of amphioxus were present in the heads of vertebrates. Recent molecular embryological studies challenge this hypothesis. However, lack of embryological knowledge of the lamprey has prevented any conclusions. Using laser scanning microscopy and scanning electron microscopy serial section analysis (SBF-SEM), we found that the lamprey head mesoderm contains several distinct cell populations. These cells did not have a rosette pattern like somites and were not genetically related to the formation of body segments. This suggests that vertebrate heads were new and diversified during early evolution.

研究分野：進化発生学

キーワード：脊椎動物 中胚葉 分節性 ナメクジウオ ギボシムシ ロゼッタ 体節

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々脊椎動物の最も大きな特徴は、明瞭な頭部を持つことである。この頭部は高度に複雑な解剖学的特徴を持っており、脳、脳神経、骨格筋、頭蓋など様々な要素が独自の連関を行い、機能面では咀嚼、感覚器系、脳による情報処理、感情表現などを可能にしている。この様な頭部が、長い年月をかけ、どのように進化したのかは謎めいている。これまで脊椎動物の頭部は、体幹部の様な脊髄と脊髄神経の様な分節構造であるとする仮説とこれと全く逆で、分節構造ではないという仮説とが対立していた。前者の仮説は、脊索動物ナメクジウオの様な高度に分節的な動物を脊椎動物の共通祖先として想定していた。そして円口類、顎口類の頭部中胚葉において、ナメクジウオにみられる体節が存在するという証拠を理由に、その仮説の正当性を主張していた。他方、この様な体節の相同物は、組織学的にも遺伝子発現の視点からもみられないとする学説もあった。この様な状況にあって、最も不足している研究は円口類ヤツメウナギの発生の詳細であった。そこで、ヤツメウナギの頭部中胚葉の発生を組織学的、遺伝学的に調べることで、この問題の答えを得ることとした。

2. 研究の目的

頭部の進化問題に不足していた情報は、円口類ヤツメウナギの頭部中胚葉の発生の詳細であった。そこでこの点を明らかにすることを研究の主たる目的とした。また脊椎動物の形態形成を理解する上で比較対象がナメクジウオのみであるとこれらの形態が異なる場合、どちらのパターンが祖先的かはわからない。そこで out group として半索動物の発生を観察することで、祖先の状態を理解することとした。

3. 研究の方法

ヤツメウナギの頭部中胚葉に体節の様な形態があるか？という問いに答えるため、神経胚から咽頭胚までの胚を固定した。そしてレーザー顕微鏡で、これらのステージの頭部中胚葉の連続切片を作成した。作成したのちに、3次元再構築を行い、頭部中胚葉と体幹部中胚葉の発生のダイナミズムを調べた。発生ダイナミズムの詳細を理解するために、三次元立体再構築を行なった、頭部中胚葉、神経管、体節、脊索の相対的位置関係を、ベクトルの内積として計算した。またそれぞれの距離を定量し、時系列に沿って変化の様子をグラフ化した。

また超微細構造の解析を行い、頭部中胚葉の個々の細胞の位置関係、形態、細胞間の構造を調べ、体節と比較した。比較の中で、従来の透過型電子顕微鏡観察では、到達できない解像度のデータを取得する必要があったため、透過型電子顕微鏡連続切片(SBF-SEM)をヤツメウナギにおいて世界で初めて導入し、実験系を確立し、データの取得を行なった。

また頭部中胚葉に体節形成関連遺伝子が発現するか調べるために、遺伝子発現解析を行った。体節関連遺伝子としては、これまでの知見から、Wnt, Notch, Fgf, Retinoic acid 主要経路が関連していることが知られていた。そこでヤツメウナギにおいて、これらの関連遺伝子を単離し、In situ hybridization 法を用いて、各遺伝子の発現領域を調べた。

最後に、脊索動物の共通祖先の発生機構の進化過程を理解するために、台湾の研究者との共同研究から、半索動物ギボシムシ (*P. flava*) の胚をもらい、これらの胚における中胚葉関連遺伝子の遺伝子発現解析を行なった。対象とした遺伝子は、我々がこれまで脊椎動物とナメクジウオの中胚葉発生で比較に用いていた *gsc* と *delta* である。

4. 研究成果

ヤツメウナギの頭部中胚葉の形態をレーザー顕微鏡で調べたところ、顎骨中胚葉と舌骨中胚葉に体節にみられるロゼッタに似たパターンが見つかった。そこでこのロゼッタ様パターンが体節のそれとどの程度同じなのかを明らかにするために、透過型電子顕微鏡(TEM)による解析を行った。その結果、これらのロゼッタは、不定形もしくはカラム状の細胞からなり、中心から放射状に細胞が並ぶ体節ロゼッタとは異なることがわかった。さらに頭部中胚葉ロゼッタの実態に迫るため、SBF-SEMにより、これらの三次元立体再構築を行った。その結果、頭部中胚葉ロゼッタの細胞間には、様々な空所が見られ、体節の様なロゼッタとは異なることがわかった。よってこれらは、ロゼッタではないことがわかった。

さらにより後期の頭部中胚葉において、ロゼッタパターンがみられるかレーザー顕微鏡で調べたところ、上唇中胚葉、velum 中胚葉でロゼッタパターンがみられた。TEMによる解析を行った結果、上唇中胚葉ロゼッタは、三叉神経が中心に枝を伸ばしていることがわかった。また velum ロゼッタは、複数の小さな細胞からなり、体節ロゼッタとは異なることがわかった。

分節とは、細胞のブロックが無細胞の直線状の境界で分かれ、これらブロックが複数並ぶことである。この定義によると、今回見つかった頭部中胚葉ロゼッタは、分節構造ではない。よってヤツメウナギの頭部中胚葉には、体節はないことがわかった。

さらに半索動物の中胚葉発生を調べたところ、gsc, delta の発現は、ナメクジウオ のそれと似ており脊椎動物のものと異なっていた。よって脊椎動物の中胚葉パターンは、この系統において生じた可能性がある。近年脊索動物ホヤにおいて、脊椎動物の頭部中胚葉由来の細胞集団に似た(cardio/pharyngeal mesoderm)があることが指摘されている。ホヤの中胚葉は、間葉で体節から構成されていないことから、ホヤと脊椎動物の最後の共通祖先において、間葉を主要とした頭部中胚葉が進化した可能性がある。しかしながらホヤは多くの遺伝子を二次的に失っており、その祖先の再構築が困難である。よって、脊索動物の状態で、どの程度脊椎動物の頭部中胚葉の状態ができていたかについては、限定的なことしかわからないだろう。

本研究成果は、SBF-SEM をこの研究分野に世界で初めて導入し、最先端の解像度を頭部中胚葉の形態理解に導入した結果、これまでになく理解が生まれ、全く新しい研究の方向を開くことが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 ロゼッタ中胚葉からわかった脊椎動物頭部の進化
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 超微細構造解析によるヤツメウナギ頭部中胚葉における分節要素の探索
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 頭部分節問題：円口類頭部中胚葉ダイナミクスからの洞察
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 超微細構造解析によるヤツメウナギ頭部中胚葉における分節要素の探索
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 円口類と脊椎動物頭部の形態進化:中胚葉分節の存在について
3. 学会等名 日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾内 隆行
2. 発表標題 Mesoderm formation in lampreys and the evolution of the vertebrate head
3. 学会等名 Panam Evo-devo 3rd meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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	菅原 文昭 (sugahara fumiaki) (00611005)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	

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