

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24657148

研究課題名(和文)軟骨魚類サメの鱗の細胞系譜解析－脊椎動物の骨格の起源の解明－

研究課題名(英文)Developmental origin of vertebrate exoskeleton

研究代表者

島田 敦子(Shimada, Atsuko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20376552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軟骨魚の鱗の骨形成細胞が由来する組織を細胞系譜解析によって明らかにするために、胚操作技術をトラザメに導入すること、また、メダカやゼブラフィッシュの鱗や鰭条が体節内のどの細胞を起源とするのかについて明らかにすることを目指した。その結果、30ゲージ注射針を用いていわゆる腹腔手術の要領でトラザメ胚の胚操作が可能であること、また、ゼブラフィッシュ体節細胞のうち脊索近くに位置する皮筋節細胞群の一部が移動して背側の間葉集団に分化し、これらの一部が鰭条の骨細胞を供給することが示唆された。本研究によって脊椎動物の骨格の進化について新たな知見が得られる道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate mineralized skeleton is known to have first emerged as an exoskeleton that extensively covered the fossil jawless fish. The evolutionary origin of this exoskeleton has long been attributed to the emergence of the neural crest, but experimental evaluation for this is still poor. Here we tried to develop long-term labeling methods to Dogfish (*Scyliorhinus canicula*) in order to determine the embryonic origin of ancestral scales. It was found that labeling of somite cells could be possible by injection of DNA with 30 gage needles that are inserted through a thinned eggshell. Next we tried to find the progenitor cells of fins and scales within zebrafish somites and suggested that a small cell population near the notochord could be a candidate progenitor for bone forming cells of the fins and scales.

研究分野：発生学

キーワード：exoskeleton

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の最大の特徴の一つは、リン酸カルシウムからなる骨格を獲得したことである。これまで骨格の起源に関しては「無顎類の化石種がまとっていた最古の骨格である甲冑(外骨格)が歯様組織であったことから、神経堤によってもたらされた」とする“神経堤説”が広く受け入れられてきた。しかし骨格の細胞系譜解析は羊膜類でしか行われておらず、この説を裏づける実験データは非常に乏しかった。

我々は最近、長期細胞系譜解析法をメダカで初めて開発し、甲冑と同じ外骨格である鱗や鰭条が神経堤由来ではなく体節由来であることを見いだした。この結果から、脊椎動物の骨格は実は神経堤が獲得したものではない可能性が出てきた。そこで、現存する最古の外骨格であり、甲冑の組織構造の特徴をほぼそのまま保っている軟骨魚類のサメの鱗(皮歯)の由来する組織を調べる必要が生じた。

2. 研究の目的

本研究では、実験発生学技術がほとんど開発されていないサメにこの技術を導入し、サメの鱗の骨形成細胞の由来する組織を知ることを目指した。また、メダカやゼブラフィッシュにおいて、鱗や鰭条が体節内のどの細胞を起源とするのかについても明らかにし、脊椎動物の骨格の進化について新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) サメ胚操作の基本技術の開発

トラザメ胚は卵黄膜が薄く、卵殻から取り出すと容易にくずれてしまうため、卵殻の一部に小さな穴を空けて胚操作を行い、そのまま発生させる方法を確立する。

(2) メダカ皮筋節細胞の細胞系譜解析実験系の作出

体節細胞由来の細胞が鱗や鰭条へ分化する過程を解析するために、メダカを用いて体節細胞をラベルしてトレースする実験系作出了。まず beta アクチンプロモーターの下

流に CreER をつないだトランスジェニック (Tg)メダカを作製した。この Tg とすでに確立されていた beta アクチンプロモーター-loxP-mCherry-loxP-GFP Tg の F1 に対して Tamoxifen を処理し、時期特異的に GFP を発現させる条件を検討した。

4. 研究成果

(1) トラザメ胚体節形成中期 (st20 前後) に胚操作を行えるかどうかを検討した。まず、卵殻の一部をサンドペーパーなどで薄くして外部から発生段階を特定できるようにする必要はあるが、紙ヤスリで殻を薄くすれば、殻が破れることなく中の胚が可視化できることがわかった。次にその薄い殻に 30 ゲージ針を使って微小な穴を数箇所あければ、胚が浸っている卵液を一時的に抜くこと、また遺伝子導入用の DNA 溶液を注入できることがわかった。つまり、いわゆる腹腔手術の要領で胚操作ができることがわかり、エレクトロポレーションによる遺伝子導入技術をサメに応用できることがわかった。

(2) 鱗や鰭条が体節内のどの細胞に由来するのかを調べた。まず、beta アクチンプロモーターの下流に CreER をつないだトランスジェニック (Tg)メダカを作出し、この Tg と beta アクチンプロモーター-loxP-mCherry-loxP-GFP Tg の F1 幼魚に対して 5uM Tamoxifen を処理したところ、鱗や鰭条に分化すると推定される体節の体側に位置する皮筋節細胞群(鱗や鰭条に分化すると推定される)がモザイク的にラベルされることがわかった。少数の皮筋節細胞群がラベルされた個体を選べば、細胞追跡が可能となる。次に osterix-GFP : beta アクチン-DsRed double Tg の細胞を胚期で野生型に移植し、そのうち骨に分化したことを GFP で証明できる実験系を作出した。実際に予定中胚葉領域に 100 個程度の細胞を移植すれば高い確率で少数の体節細胞を追跡できることがわかった。beta アクチンプロモーター-GFP が一生安定に発現し続けることは確認済みである。予備的な実験から、体節細胞のうち脊索近くに位置する皮筋節細胞群

の一部が移動して背側の間葉集団に分化することが示唆され、これらの一部が鰭条の骨細胞を供給する可能性が高いことがわかった。今後、ラベルされた細胞が鱗と鰭条の骨細胞に分化する過程を時系列的に追跡する予定である。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Hojo, M., Omi, A., Hamanaka, G., Shindo, K., Shimada, A., Kondo, M., Narita, T., Kiyomoto, M., Katsuyama, Y., Ohnishi, Y., Irie N., Takeda, H. Unexpected link between polyketide synthase and calcum carbonate biomineralization. *Zoological Letters*, 1: 3, 2015. DOI: 10.1186/s40851-014-0010-0.
2. Okuyama, T., Yokoi, S., Abe, H., Isoe, Y., Suehiro, Y., Imada, H., Tanaka, M., Kawasaki, T., Yuba, S., Taniguchi, Y., Kami, Y., Okubo, K., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Oka, Y., Kubo, T., Takeuchi, H. A neural mechanism underlying mating preference for familiar individuals in medaka fish. *Science*, 343: 91-94, 2014. DOI: 10.1126/science.1244724.
3. Tsuboko, S., Kimura, S., Shinya, M., Suehiro, Y., Okuyama, T., Shimada, A., Takeda, H., Naruse, K., Kubo, T., Takeuchi, H. Genetic control of startle behavior in medaka fish. *PLoS One*, 9: e112527, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0112527.
4. Shimada, A., Kawanishi, T., Kaneko, T., Yoshihara, H., Yano, T., Inohaya, K., Kinoshita, M., Kamei, Y., Tamura, K., Takeda, H. Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nat Commun.*, 4: 1639., 2013. DOI: 10.1038/ncomms2643.
5. Matsuo, M., Shimada, A., Koshida, S., Saga, Y., Takeda, H. The establishment of rotational polarity in the airway and ependymal cilia: analysis with a novel cilium motility mutant mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 304(11): L736-45, 2013. doi: 10.1152/ajplung.00425.2012.
6. Kawanishi, T., Kaneko, T., Moriyama, Y., Kinoshita, M., Yokoi, H., Suzuki, T., Shimada, A., Takeda, H. Modular development of the teleost trunk along the dorsoventral axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*, 140: 1486-96, 2013. DOI: 10.1242/dev.088567.
7. 島田敦子、武田洋幸 メダカのウロコが証す脊椎動物の骨格の進化、細胞工学、32 (8): 884-885、2013。(日本語総説・査読無し)
8. Moriyama, Y., Kawanishi, T., Nakamura, R., Tsukahara, T., Sumiyama, K., Suster, M.L., Kawakami, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Yasuoka, Y., Nagao, Y., Sawatari, E., Shimizu, A., Wakamatsu, Y., Hibi, M., Taira, M., Okabe, M., Naruse, K., Hashimoto, H., Shimada, A., Takeda, H. The medaka *zic1/zic4* mutant provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr Biol*, 2(4): 601-7, 2012. DOI: 10.1016/j.cub.2012.01.063.
9. Morita, A., Nakahira, K., Hasegawa, T., Uchida, K., Taniguchi, Y., Takeda, S., Toyoda, A., Sakaki, Y., Shimada, A., Takeda, H., Yanagihara, I. Establishment and characterization of Roberts syndrome and SC phocomelia model medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ.*, 54(5): 58-604, 2012. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2012.01362.x.
10. Qu, W., Hashimoto, S., Shimada, A., Nakatani, Y., Ichikawa, K., Saito, T., Ogoshi, K., Matsushima, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Takeda, H., Morishita, S. Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns. *Genome Res.*, 2(8): 1419-25, 2012. DOI: 10.1101/gr.140236.112.

[学会発表] (計 2 件)

1. Suzuki H., Shimada A., Takeda, H. Dynamic cell movement during somite morphogenesis in zebrafish. MBI-Japan Joint Symposium 2014. National University of

Singapore, Singapore, October, 21-24, 2014.

2. Shimada, A. Origin of scales and fin rays, The 1st NUS-TLL-NIBB Joint practical workshop on Genetice, Genomics and Imaging in Medaka & Zebrafish, Singapore, July, 22-31, 2012.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/hassei/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

島田 敦子 (SHIMADA, Atsuko)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：20376552