

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770217

研究課題名(和文)トラザメ胚を用いた脊椎動物の顎の進化の発生学的考察

研究課題名(英文)Developmental study of vertebrate jaw evolution by using shark embryos

研究代表者

武智 正樹 (Masaki, Takechi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・テニュアトラック助教

研究者番号：10455355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物における顎の進化の発生学的背景を明らかにするため、マウスやゼブラフィッシュの顎の発生に関わる遺伝子について、トラザメの相同遺伝子を単離し、発現パターンを詳細に解析した。Dlx1-6は咽頭弓領域で入れ子式に発現しており、顎の背腹軸に沿ったパターンニングは他の顎口類と同様にDlxコードによって成立することが示唆された。またBapx1は咽頭内胚葉や一次顎関節に発現しており、この遺伝子発現パターンをトラザメ胚、ニワトリ胚、マウス胚で比較したところ、哺乳類系統で一次顎関節の発生位置が背側に移動したことが示唆された。またこの発生イベントが哺乳類の鼓膜が下顎領域に進化する契機になったことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the developmental basis of jaw patterning in the vertebrate evolution, I tried to examine jaw development in the shark embryo (*Scyliorhinus torazame*). I isolated genes that are considered to be involved in jaw patterning in the shark, and examined expression pattern of these genes in shark embryos. Expression pattern of Dlx1-6 genes suggest that jaw patterning along the dorsal-ventral axis in the shark is established by Dlx-code as in the other jawed vertebrates. I also compared expression pattern of Bapx1 gene in the mouse, chick and shark, and found that the position of the expression shifted dorsally in the mammalian lineage. We suggest that this developmental event led to tympanic membrane formation in the lower jaw region in a mammalian ancestor.

研究分野：進化発生学

キーワード：顎 形態進化 トラザメ 軟骨魚類 鰓弓 咽頭弓 鼓膜 中耳

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物は実に様々な環境に適応しているが、この背景として摂餌機能を飛躍的に進歩させた顎の獲得が挙げられる。顎の獲得の分子発生的メカニズムについては、顎を持たない円口類ヤツメウナギを用いた研究で一定の成果が挙げられている。この際、比較対象の顎口類としてニワトリなどの羊膜類が用いられたが、これが必ずしも顎口類を代表しているわけではないことが発生的に指摘されてきた。顎は脊椎動物が無顎類と分岐後、少なくとも約 5 億 2700 万年前にはすでに獲得されており、最も古い起源を持つ現生の顎口類は軟骨魚類である。従って軟骨魚類の顎のパターニング機構を調べ、羊膜類と同じであるかどうかを調べることで、より正確な顎の進化のシナリオを描く上で特に重要である。さらに哺乳類の進化においては、顎の一部が中耳に取り込まれる形態進化が起こっているが、この背景にある発生的な変化についてはほとんどわかっていなかった。

研究代表者は、一年を通じて日本近海で容易に入手可能である同属のトラザメ (*Scyliorhinus torazame*) に着目し、恒常的に胚を供給できるシステムを構築しようと考えた。平成 20 年度より関東の太平洋沿岸で操業する漁師にトラザメを確保してもらい、所属研究室の水槽で維持し、人工海水の水質改善を繰り返すことで恒常的に胚を得ることが可能になった。また、従来のシークエンス法 (サンガー法) と次世代シーケンサーを用いてトラザメ胚の EST 解析を行い、遺伝子配列データベースを構築・公開し、分子発生的解析のためのインフラ整備を完了した。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者がこれまでに整備してきたトラザメを用いる研究環境を活用し、羊膜類と軟骨魚類の顎パターニング機構の共通点と相違点について比較検討することを目的とした。特に哺乳類の進化過程において生じた、摂食器官である顎の一部が聴覚器官である中耳に取り込まれるという形態変化について、この進化の背景にあった発生的なイベントを解明することも目的の一つとした。

3. 研究の方法

トラザメ胚の上下顎突起が第 1 咽頭弓の神経堤細胞のみから形成されるかどうかを明らかにするため、神経堤細胞形成ステージに神経堤領域を *Dlx* で標識し、細胞の追跡実験を行う。次に、すでにマウスやゼブラフィッシュで明らかにされている顎のパターニング遺伝子についてトラザメの相同遺伝子を単離する。顎形成期の胚で時間空間的な発現パターンを調べ、これらを羊膜類であるニワトリやマウスの発現パターンと比較する。

また、羊膜類で顎のパターニングに重要とされる *Fgf/Bmp* シグナリングカスケードがトラザメ胚にも存在するか調べるため、これらシグナリングカスケードの阻害剤をトラザメ胚に導入し、表現型を羊膜類と比較する。

4. 研究成果

研究代表者が自ら構築したトラザメ胚の EST データベース (Vertbrate TimeCapsule) を用いることにより、マウスやゼブラフィッシュで顎のパターン形成に関わる遺伝子について、トラザメの相同遺伝子を単離した。具体的には、*Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx3*, *Dlx4*, *Dlx5*, *Dlx6*, *Fgf8*, *Bmp4*, *Hand2*, *Ednra*, *Msx1*, *Barx1*, *Lhx6*, *Bapx1*, *Edn1* 等の遺伝子配列を得た。これらの遺伝子について、トラザメ胚の顎の形成期 (ステージ 19-28) における発現パターン解析を、ホールマウントサンプルと切片に対して *in situ* hybridization 法により行い、羊膜類の顎のパターニング時に見られる発現パターンと時間空間的な興津店や相違点があるかについて調べた。まず、トラザメの *Dlx1-6* が咽頭弓領域で入れ子式に発現していることを明らかにした (図 1)。このことは、トラザメの顎の背腹軸に沿ったパターニングが *Dlx* コードにより成立することを示し、このパターニング機構が顎口類全体に保存されていることを示唆する。

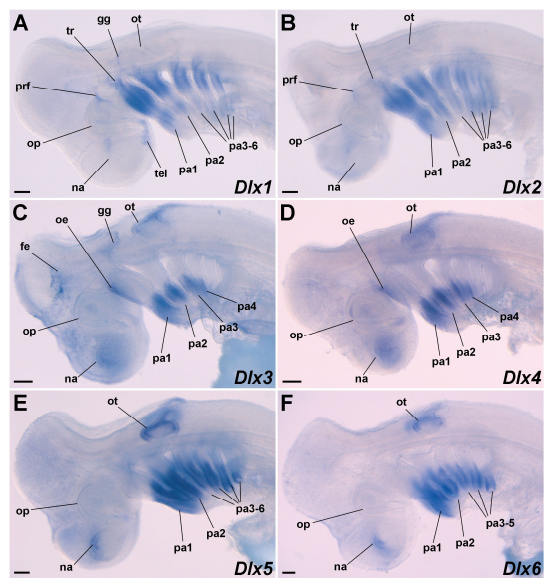


図 1 トラザメ胚咽頭弓領域における *Dlx1-6* の発現パターン。研究業績 [雑誌論文 2] より引用

また、*Bapx1* は他の顎口類と同様に咽頭内胚葉や一次顎関節の領域に発現していることがわかった (図 2)。この発現パターンをトラザメ胚、ニワトリ胚、マウス胚で比較したところ、第一咽頭嚢の位置に対する発現部位がトラザメ胚とニワトリ胚の間では同様であったが、マウスの発現部位はこれらの動物よりも顕著に背側に位置していた。これらの結果から、哺乳類の進化において一次顎関

節の発生位置が背側に移動したこと、またこの発生イベントにより哺乳類の鼓膜が下顎領域に形成されたことが示唆された。

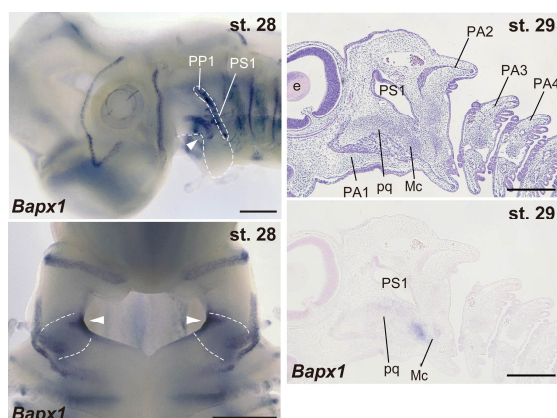


図2 トラザメ胚咽頭弓領域における Bapx1 の発現パターン。研究業績〔雑誌論文1〕より改変して引用

一方、トラザメ胚の細胞標識や阻害剤投与の実験については、トラザメの卵殻の一部(4mm×3mm程度)をメスで切り取って胚を露出させ、先端を尖らせたガラスピペットを用いて、神経堤領域や間葉細胞を DiI で標識すること、あるいは Fgf シグナルや Bmp シグナルの阻害剤を神経堤細胞の移動完了時期に投与する計画であったが、技術的な困難により、明瞭な研究結果を得ることはできなかった。

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 3 件)

1. Kitazawa, T.*, Takechi, M.* (*equally contributed), Hirasawa, T., Adachi, N., Narboux-Neme, N., Kume, H., Maeda, K., Hirai, T., Miyagawa-Tomita, S., Kurihara, Y., Hitomi, J., Levi, G., Kuratani, S. & Kurihara, H., (2015), Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids, *Nature Communications*, 査読有, 6: 6853, DOI: 10.1038/ncomms7853

2. Takechi, M., Adachi N., Hirai, T., Kuratani, S., Kuraku, S., (2013), The Dlx genes as clues to vertebrate genomics and craniofacial evolution, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 査読有, 24 (2): 110-118, DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.12.010.

3. Adachi, N., Takechi, M., Hirai, T., Kuratani, S., (2012), Development of the head and trunk mesoderm in the dogfish *Scyliorhinus torazame*. II. Comparison of gene expression between the head mesoderm and somites with reference to the origin of the vertebrate head. *Evolution and*

Development, 査読有, 14: 257-276: DOI: 10.1111/j.1525-142X.2012.00543.x.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Masaki Takechi, Taro Kitazawa, Junko Takei, Yukiko Kurihara, Sachiko Iseki, Hiroki Kurihara, Shigeru Kuratani, Comparative developmental analysis of middle ear formation in mouse and chicken embryos, 第120回日本解剖学会全国学術集会、神戸国際会議場・展示場、2015年3月22日

2. 武智正樹、顎と中耳の形態形成機構—先天異常から進化まで、第3回硬組織疾患ゲノムセンターセミナー(招待講演)、2014年9月30日、東京医科歯科大学

3. 武智正樹、北沢太郎、栗原由紀子、井関祥子、栗原裕基、倉谷滋、哺乳類中耳の進化発生学的解析、日本動物学会第85回仙台大会2014年9月13日、東北大学

4. 武智正樹、顎・中耳の先天異常と形態形成機構について、第54回日本先天異常学会学術集会(招待講演)、2014年7月26日、麻布大学

5. Masaki Takechi, Tamami Hirai, Jiro Hitomi, Shigeru Kuratani, Coupling and Decoupling of Developmental Programs in the Mammalian Middle Ear Evolution. CDB symposium 2013, March 4-6, RIKEN CDB.

6. Masaki Takechi, Tamami Hirai, Jiro Hitomi, Shigeru Kuratani, Comparative developmental Study of the Mammalian Middle Ear Evolution, Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012, October 4-9, 2012, Taipei Innovation City Convention Center, Taiwan.

7. 武智正樹、平井珠美、人見次郎、倉谷滋 哺乳類独自の聴覚器官の進化を可能にした発生プログラムの解明、日本進化学会第14回東京大会、2012年8月21日、首都大学東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cmnm/tenu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武智 正樹 (TAKECHI Masaki)

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究
科・テニユアトラック助教
研究者番号：10455355