

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770222

研究課題名(和文)脊椎動物頭部の進化的起源の解明

研究課題名(英文)On the metamerism

研究代表者

尾内 隆行 (Onai, Takayuki)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・研究員

研究者番号：20617279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物頭部の進化的起源を調べる為に頭索類ナメクジウオと脊椎動物の発生機構を比較した。その結果ナメクジウオ胚において中胚葉の領域マーカーは重なったままであるのが脊椎動物胚ではこれらのマーカーが前後軸方向にヘテロトピックシフトをおこなっていることがわかった。これらのことから脊椎動物の頭部はナメクジウオのbody planを前後軸方向に引き延ばすことのできた新規形質であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：To understand the evolutionary origin of the vertebrate head, we examined the developmental mechanisms of amphioxus and vertebrates. We found that during the gastrula stage, regional domain markers of the dorsal mesoderm were co-expressed in amphioxus while these markers shifted heterotopically in vertebrate embryos. These findings suggest that the vertebrate head evolved from an amphioxus like ancestor by heterotopic shift for anterior/posterior direction.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：分節問題 反復説 脊索動物 頭部形態進化 発生拘束 シグナル経路 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の頭部の進化的起源は未だ謎が多い。そこで我々は脊椎動物の形態が祖先的な脊索動物であるナメクジウオのような動物からどのように進化したのか調べることにした。

2. 研究の目的

ゲートは脊椎動物の頭部は分節構造の連続であるといった。この分節構造は体幹部の椎骨から由来すると彼は考え、つまり頭、という構造の原型は椎骨であると考えた。一方動物学者グッドリッチはこの学説をさらに発展させて脊椎動物の頭はナメクジウオのようなカラダの前まで分節構造が観察される動物から進化したと考えた。そこで我々はグッドリッチの仮説の検証をおこない、脊椎動物の頭部の起源を調べることにした。

3. 研究の方法

脊椎動物とナメクジウオの中胚葉の前後軸パターンを比較するためにそれぞれの胚を観察し、細胞の運動や領域マーカー遺伝子の発現パターンの解析、及びパターンを形成するのに重要な分子機構を調べた。

4. 研究成果

(1) これまでの研究からナメクジウオの中胚葉の領域マーカーである *en*, *pax3/7*, *Tbx1/10*, *pitx* は前後軸に沿ってそれぞれ重なっていることがわかっている。一方脊椎動物胚においてこれらの領域マーカーの発現パターンは頭部と体幹部にそれぞれ分かれている。

(2) このことから発生過程のどこかの時期にこれらの領域マーカーが分かれる現象が脊椎動物にはあるのに対し、ナメクジウオにはその機構がないことが考えられる。従って我々は原腸胚期に着目しナメクジウオと脊椎動物胚の発生過程を観察したところ背側中胚葉マーカーの *Gsc*, *Brachyury*, *Delta* が前後軸にそってナメクジウオ胚ではかさなったままであるのに対し、脊椎動物胚では重ならずに分かれていることがわかった。このことは脊椎動物胚においてナメクジウオ胚にみられる *Gsc*, *Brachyury*, *Delta* の発現がヘテロトピックに移動していることを示している。

(3) 次に我々はナメクジウオ胚において体節の発生が脊椎動物胚の体節の発生機構と同じシステムを利用しているか調べた。脊椎動物において *Notch/delta* signal は体節の発生に必須であることが知られている。そこでナメクジウオ胚において同様に *Notch/delta* signal が体節の形成を制御しているのか調べるため、*Notch/delta* signal の阻害剤である DAPT で胚を処理したところ幼

生期において体節が正常に分節せずにつながっていることがわかった。これらのことから脊椎動物の体節形成機構はナメクジウオのものに似ていることが示唆された。

(4) これまでの結果から脊椎動物の背側中胚葉はナメクジウオのもの前後方向へのヘテロトピックシフトによってできたこと、またナメクジウオの体節と脊椎動物の体節は相同であることが示唆された。そこで次にヘテロトピックシフトを阻害することで脊椎動物胚の発生パターンをナメクジウオに見られるものにかえられるか調べてみた。具体的には細胞の運動を制御する *Wnt/pcp* signal 経路の下流因子である *Dsh* 遺伝子の dominant negative mutant である *xdd1* の capped mRNA を胚に微量注入し、細胞の運動を阻害することで背側中胚葉のマーカーの発現を観察した。その結果、ナメクジウオ胚でみられるように *Gsc*, *Brachyury*, *Delta* の発現がかさなったままであった。

(5) 次に脊椎動物胚(カエル)におけるヘテロトピックシフトの阻害がより後期の発生ステージに与える影響を観察した。野生型の尾芽胚の頭部の構造は最も前方に脳が湾曲した状態で位置しやや後方下部に脊索、さらに横後方に第一体節が位置する。一方 *xdd1* mRNA を微量注入した胚では脳の湾曲が見られず脊索の前端とほぼ同じに位置し体節は脊索、脳よりも前方に位置していた。この神経管、脊索、体節の相対的な位置関係はナメクジウオ胚神経胚期にみられる状態と同じであった。このことは尾芽胚期においても *xdd1* mRNA を微量注入した胚はナメクジウオの発生機構を模倣したことを示唆する。

(6) 尾芽胚期における形態的な観察から *xdd1* mRNA を微量注入した胚はナメクジウオ胚の発生機構を模倣した。それでは遺伝子発現レベルではナメクジウオの発生機構を模倣しているのだろうか？このことを調べる為に *in situ hybridization* 法を用いて鰓弓中胚葉の領域マーカーである *Tbx1* の発現を解析した。野生型の胚において *Tbx1* は鰓弓中胚葉にのみ発現する。一方 *xdd1* mRNA を微量注入した胚では体節の腹側に *Tbx1* の発現が異所的に観察された。ナメクジウオ胚において *Tbx1* のホモログである *Tbx1/10* は鰓弓中胚葉の一部と体節の腹側に発現することが知られている。これらのことから遺伝子発現においても *xdd1* mRNA を微量注入した尾芽胚はナメクジウオの発生機構を模倣したことがわかった。

(7) 今までの研究から細胞運動が脊椎動物の背側中胚葉の発生に必須であることがわかった。一方中胚葉を前後軸にそって領域化するために必要なシグナル経路は脊椎動物とナメクジウオでどのようになっているの

だろうか？このことを調べる為に脊椎動物の背側中胚葉の前後軸パターン形成に必須のシグナルである Wnt/bcatenin シグナル経路が脊椎動物とナメクジウオでどのようになっているのか調べた。原腸胚後期のカエル胚では wnt/bcatenin 経路の下流因子である bcatenin の免疫染色のデータから前方でシグナルの level が低く、後方で高いことがわかっている。一方ナメクジウオ胚では前後軸に沿って bcatenin の核内移行が一樣に観察された。また xdd1 mRNA を微量注入した胚ではナメクジウオ胚のように bcatenin の核内移行がやや一樣になった。

これらのことから背側中胚葉の前後軸パターンを制御する Wnt/bcatenin シグナル経路は脊椎動物で成立したシステムであることがわかった。

(8) xdd1 mRNA を微量注入したカエル胚では背側中胚葉が原腸陥入を十分に行わないことがわかっているが背側の外胚葉の陥入には細胞膜に存在する c-cadherin の分解が必須であることが知られている。またこの c-cadherin の分解には膜タンパク質である flrt3 と small GTPase である Rnd1 が必須であることがわかっている。

そこでこのシステムがナメクジウオにすでに存在しているのか調べたところ flrt3 がゲノムに存在しないことがわかった。一方 Rnd1 のホモログは存在していた。次にナメクジウオ胚において Rnd1 の発現パターンを観察したところ原腸胚後期において背側中胚葉の原口周辺に発現していた。そこでナメクジウオの Rnd1 がカエル胚においてカエルの Rnd1 の機能を補えるか調べたところ Rnd1 の機能阻害をナメクジウオ Rnd1 は回復できなかった。

これらのことからナメクジウオ胚には c-cadherin を分解する遺伝的機構が存在しないことがわかった。

つまり脊椎動物の背側中胚葉は cadherin を分解することで前後軸方向の領域マーカーのヘテロトピックシフトを起こしておりナメクジウオでは見られないこの発生機構が脊椎動物に独自の形態を進化させたと考えられる。

またナメクジウオの中胚葉パターン形成がナメクジウオでのみおこる特殊な現象であるのか、もしくは他の後生動物でもおこるのか調べる為に新口動物の中でも原始的なものである半索動物ギボシムシや棘皮動物ウニの原腸胚期における Gsc や Brachyury の発現パターンを文献で調べたところそれぞれ Gsc や Brachyury の発現は原腸胚期を通じて重なったままであった。また左右相称動物の

祖先であると考えられている刺胞動物においてもこれらの遺伝子発現は重なったままであることからナメクジウオで観察された中胚葉のパターンはナメクジウオでみられる特殊化したパターンではなく、より祖先でもすでに存在していた一般的なパターンであることが示唆され、従って脊椎動物の背側中胚葉のパターンは脊椎動物において進化した特殊なパターンであると考えられる。

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 1 件)

尾内隆行、入江直樹、倉谷滋、

タイトル: Evolutionary Origin of the Vertebrate Body Plan: The Problem of Head Segmentation

雑誌名: Annual Review of Genomics and Human Genetics Vol. 15 (Volume publication date September 2014)
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genom-091212-153404>、査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)CDB-IDGB-KAIST joint meeting

発表場所: 理化学研究所発生再生科学総合研究センター

発表年月日 2013/0219-0220

発表者名: 尾内 隆行

タイトル: Mesoderm formation of cephalochordate and the evolution of the vertebrate head (口頭発表)

(2)CDB シンポジウム

発表場所: 理化学研究所発生再生科学総合研究センター

発表年月日 2014/0310-0312

発表者名: 尾内 隆行

タイトル: polarization of Anterior-posterior signaling in the ancestral chordate mesoderm and evolution of the vertebrate head. (ポスター発表)

(3)第47回日本発生生物学会

発表場所: WINC 愛知、名古屋

発表年月日 2014/0527-0530

発表者名: 尾内 隆行

タイトル: Anterior/posterior patterning of the dorsal mesoderm in vertebrates evolved as a novelty from the ancestral chordate mesoderm by heterochronic/heterotopic shifts. (口頭発表、ポスター発表)

6. 研究組織

(1)研究代表者

職名 研究員

尾内 隆行 (ONAI, Takayuki)
理化学研究所発生再生科学総合研究センター
研究者番号: 20617279